UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

UFR Sciences et Techniques Biologiques

Ecole doctorale Biologie, Santé, Environnement

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

En Biologie Cellulaire

Par **Julie LECOMTE**

EFFETS DES LIGANDS DE PPARγ SUR LA VOIE DE SIGNALISATION DES OESTROGENES DANS LES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES

Soutenance publique prévue le 2 Février 2009 devant la commission d'examen

Membres du jury :

Rapporteurs : Mme Marie-Christine Rio (Docteur, Responsable du Laboratoire de Biologie Cellulaire du Cancer du Sein, IGBMC, Illkirch)
Mme Irmgard Irminger-Finger (Docteur, Responsable du Laboratoire de Gynécologie-Obstétrique Moléculaire, Hôpitaux Universitaires, Genève)

Examinateurs : Mme Martine Duterque-Coquillaud (Chargée de recherche, CNRS, Lille)
Mr Marc Diederich (Docteur, LBMCC, Luxembourg)
Mme Isabelle Grillier-Vuissoz (Docteur, Co-directrice de thèse, UHP, Nancy Université)
Mr Stéphane Flament (Professeur, Directeur de thèse, UHP, Nancy Université)

EA 3442 Aspects cellulaires et moléculaires de la reproduction et du développement – Faculté des Sciences et Techniques – Boulevard des Aiguillettes BP239 – 54506 Vandoeuvre – lès – Nancy - France

LISTE DES ABREVIATIONS

15d-PGJ_2 : 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-Prostaglandine J_2

ACTR : activateur des récepteurs de l'hormone thyroïdiennes et de l'acide rétinoïque

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

AF : Activating function

AIB: Amplified In Breast cancer

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens

AJCC : American Joint Committee on Cancer

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

AP : Activating Protein

ARNm : Acise RiboNucléique messager

BADGE : Bisphenol Acid Diglycide Ether

CARM-1 : Coactivator-asociated Arginine Methyltransferase 1

CDDO: 2-Cyano-3, 12-Dioxoolean-1, 9-Dien-28-Oic acid

cdk: cyclin-dependent kinase

CGZ : ciglitazone

ChIP: Chromatin ImmunoPrecipitation

CHIP : carboxyl terminus of HSC70-interacting protein

COX : Cyclooxygenase

CREB: cAMP Responsive Element Binding Protein

DBD : DNA Binding Domain

DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane

DRIP 205: Vitamin D Receptor Interacting Protein

E1: œstrone

E2: 17β- œstradiol

E3: œstriol

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EGR-1: Early Growth Response-1

ER : Estrogen Receptor

ERBF-1 : Estrogen Receptor promoter B associated Factor 1

ERE : Estrogen Response Element

ERF1 : Eukaryotic Release Factor 1

ERR : Estrogen Related Receptor

ERα : Estrogen Receptor α

ERβ : Estrogen Receptor β

FGF : Fibroblast Growth Factor

FSH : Follicle-Stimulating Hormone

GPR30: G protein-coupled receptor 30

GRIP1 :Glucocorticoid receptor interacting protein 1

HDCA:Histone DeaCetylAse

HETE : acide hydroxyeicosatétraénoique

HODE : acide hydroxyoctadécadiénoique

Hsp : Heat Shock Protein

ICAM : InterCellular Adhesion Molecule

IGF : Insulin like Growth Factor

Kd : constante de dissociation

KDa : KiloDalton

LBD : Ligand Binding Domain

LH-RH : Luteinizing Hormone-Releasing Hormone

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MMP : Matrix Metalloprotease

N-CoA 1/2: co-activateur 1/2 du récepteur nucléaire

NCoR : Nuclear receptor CoRepressor

NF-κB: Nuclear Factor kappa B

NPM1 : NucleoPhosMin 1

p/CIP : protéine I associée à CBP/p300

PCB : Polychloro Biphényls

PDGFβ : *Platelet-derived growth factor*

PGZ :pioglitazone

PI3K/Akt : PhosphoInositol-3-Kinase/Akt

PKA: protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor

PPRE : PPAR-responsive element

PR : Progesterone Receptor

pRb : protéine du retinoblastoma

PRIP: PPAR gamma-interacting protein

PTEN: Phosphatase and TENsin homolog

RAC3 : Receptor Associated Co-activator 3

RAP 250 : nuclear Receptor-Activating Protein 250

RAR : Retinoic Acid Receptor

REA : Repressor of Estrogen receptor Activity

RGZ :rosiglitazone

RPF-1 : Receptor potentiating factor 1

RXR : Retinoid X Receptor

SAHA : SuberoylAnilide Hydroxamic Acid

SAP30: Sin3A-sin-associated polypeptide 30 kDa

SERM: Selective Estrogen Receptor Modulator

SH2 : Src Homology domain

SHBG: Sex Hormone Binding Globulin

SMRT : Silencing Mediator for Retinoic acid receptor and Thyroid hormone receptor

Sp-1 : GC-box Binding Protein

SPARMγ : Selective PPAR Modulators γ

SRA : steroid receptor RNA activator

Src : avian sarcoma vius

SRC: Steroid Receptor Coactivator

SUMO: Small Ubiquitin like Modifiers

TGF : Transforming Growth Factor

TGZ : troglitazone

TIF 2: Transcriptional Intermediary Factor

TIMP-1 : Tissue Inhibitor of MetalloProteinases 1

TNM : Tumor Node Metastases

TRAIL: Tumor necrosis factor-alpha (TNF)-Related Apoptosis-Inducing Ligand

TRAM-1 : Thyroid receptor activating molecule

TRAP 220: Thyroid Hormone Receptor-associated Protein

TRBP: Thyroid hormone Receptor-Binding Protein

TZD : ThiaZolidineDione

UICC : Union Internationale Contre le Cancer

UTR : UnTranslated Region

VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule-1

VDR : Vitamin D Receptor VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

SOMMAIRE

CHAPITRE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I : LE CANCER DU SEIN 1

I. Le sein normal : architecture et développement 1

1.1. Architecture 1

1.2. Développement 1

II. Le cancer du sein 2

2.1. Mécanisme de déclenchement tumoral 2

2.2. Développement tumorale, invasion et métastases 5

2.2.1. Croissance de la tumeur 6

2.2.2. Angiogenèse 6

2.2.3. Invasion tumorale et métastase 7

2.3. Anatomie pathologique des cancers du sein 8

2.3.1. Classification clinique 8

2.3.2. Classification histologique 9

III. Incidence, facteurs de risque, facteurs de survie 10

3.1. Incidence 10

3.2. Facteurs de risque 10

3.2.1. Facteurs génétique 10

3.2.2. Facteurs environnementaux 11

3.2.3. Facteurs hormonaux 12

3.2.3.1. Hormones endogènes 12

3.2.3.2. Hormones exogènes 13

3.3. Facteurs pronostiques et survie 14

IV. Stratégies thérapeutiques 15

4.1. Chirurgie 15

4.2. Radiothérapie 15

4.3. Chimiothérapie 15

4.4. Hormonothérapie 16

4.4.1. Hormonothérapie soustractive 16

4.4.2. Hormonothérapie additive 16

4.4.3. Hormonothérapie inhibitrice 17

4.4.4. Hormonothérapie compétitive 18
4.5. Nouvelles stratégies thérapeutiques 18

PARTIE II : LES RECEPTEURS DES OESTROGENES 20
I. Les œstrogènes 20
II. Les récepteurs des œstrogènes 21
2.1. Distribution tissulaire 21
2.2. Rôles 21
III. Le récepteur ERα 21
3.1. Le gène codant ERα 21
3.1.1. Organisation génomique 21
3.1.2. Les différents variants et isoformes d'ARNm 22
3.1.3. Expression et régulation dans la tumeur mammaire 22
3.2. Structure du récepteur ERα 24
IV. Le récepteur ERβ 25
4.1. Le gène codant ERβ 25
4.1.1. Organisation génomique 25
4.1.2. Les différents isoformes d'ARNm 26
4.2. Structure du récepteur ERβ 26
V. Modifications post-traductionnelles des ER 27
5.1. Phosphorylation 27
5.2. Ubiquitination 28
5.2.1. Structure du protéasome 26S 28
5.2.2. Le système d'ubiquitination 29
5.2.3. Dégradation de ERα par le protéasome 30
5.2.4. Dégradation de ERβ par le protéasome 31
5.3. Autres modifications post-traductionnelles 31
VI. Mécanismes d'action des ER 32
6.1. Activation de la transcription par la voie génomique 32
6.1.1. Interaction directe des ER sur l'ADN : les ERE 33
6.1.2. Interaction indirecte des ER sur l'ADN : les sites Sp1 et AP-1 34
6.1.3. Les co-régulateurs transcriptionnels des ER 34
6.1.3.1. Les co-activateurs 35

6.1.3.2. Les co-répresseurs 35
6.2. Activation de la transcription par la voie non génomique 36
6.2.1. Les récepteurs membranaires 36
6.2.2. Activation de la transcription en absence de ligand 37
VII. Implication des ER dans la tumeur mammaire 37
7.1. Gènes cibles des œstrogènes et de ERα 38
7.2. Implication de ERβ dans la tumeur mammaire 39
7.3. Cas particulier des ERR 41
VIII. Les anti-œstrogènes 41
8.1. Mécanisme d'action des anti-œstrogènes sur les ER 41
8.2. La résistance au traitement par anti-œstrogènes 42

PARTIE III : PPARγ ET CANCER DU SEIN 44
I. Les peroxysomes et proliférateurs de peroxysomes 44
II. Les Récepteurs Activés par les Proliférateurs de Peroxysomes (PPAR) 44
2.1. Le gène codant PPARγ 45
2.2. La protéine PPARγ 45
2.2.1. Structure du récepteur PPARγ 45
2.2.2. Mécanisme d'action de PPARγ 46
III. Distributions tissulaires et principaux rôles de PPARγ 48
IV. Les ligands de PPARγ 49
4.1. Les ligands naturels 49
4.2. Les ligands synthétiques 50
4.2.1. Les ligands de la famille des thiazolidinediones 50
4.2.2. Les ligands synthétiques non TZD 51
4.2.3 Les antagonistes de PPARγ 53
V. Ligands de PPARγ et cancer du sein 53
5.1. Expression de PPARγ dans les cellules cancéreuses mammaires 53
5.2. Effets anticancéreux des ligands de PPARγ 54
5.3. Effets anti-cancéreux des TZD indépendamment de PPARγ 56
5.4. "Cross talk" entre ER et PPARγ 58
5.5. Essais cliniques des ligands de PPARγ sur le cancer du sein 59

VI. Objectif de la thèse 60

CHAPITRE II : RESULTATS

I. Caractérisation de la dégradation de ERα par les ligands de PPARγ 62
1.1. Introduction 62
1.2. Principaux résultats 62
1.3. Conclusion 64
II. Dérivés de la troglitazone et récepteurs des œstrogènes 65
2.1. Introduction 65
2.2. Principaux résultats 66
2.3. Conclusion 68

CHAPITRE III : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Effets des ligands de PPARγ : inhibition du cycle cellulaire ou apoptose? 69
II. Altération de la signalisation œstrogènique 70
III. Dégradation différentielle de ERα et ERβ 72
IV. Protéolyse de ERα et mécanisme PPARγ-indépendant 73
V. Intérêt thérapeutique des TZD et de leurs dérivés? 74
VI. Conclusion générale 75

CHAPITRE IV : RESULTATS ANNEXES

I. Ethanol et activation ligand-indépendante de ERα 76
1.1. Introduction 76
1.2. Principaux résultats 77
1.3. Conclusion 78
II. Ethanol et voies de signalisation de l'A_{2A}AR et de ERα 79
2.1. Introduction 79
2.2. Principaux résultats 79
2.3. Conclusion 80

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 81

CHAPITRE I

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I : LE CANCER DU SEIN

I. Le sein normal : architecture et développement

1.1. Architecture

Le sein est une glande exocrine située sur la paroi antérieure du thorax **(Figure 1)**. De forme conique ou hémisphérique, son extrémité se termine par un relief de forme cylindrique ou conique appelé mamelon. Celui-ci est entouré d'un disque cutané pigmenté de diamètre variable : l'aréole. Le revêtement cutané du sein est épais à la périphérie et devient mince au voisinage de la plaque aréolo-mamelonaire. La solidarité de la peau avec la glande est d'autant plus intime que l'on se rapproche du mamelon.

La glande mammaire est discoïde et de contour irrégulier. Elle est constituée de 2 compartiments cellulaires : le compartiment mésenchymateux, renfermant des vaisseaux sanguins et des nerfs, et le compartiment épithélial qui s'articule autour d'un réseau de canaux galactophores et de lobules. Ces deux compartiments sont séparés par une membrane basale composée de collagène de type IV, de laminine et de glycosaminoglycanes. Les acini sont groupés autour de canaux alvéolaires qui se réunissent pour former un canal lobulaire qui draine un lobule. Plusieurs canaux lobulaires se réunissent à leur tour pour former un canal galactophore. Chaque canal galactophore converge vers le mamelon.

1.2. Developpement

Le sein se développe tout au long de la vie de la femme, du stade fœtal à la ménopause, sous l'influence des hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone) et d'un certain nombre de facteurs de croissance. Son développement commence au cours de la vie fœtale, dès la quatrième semaine, à partir de l'ectoderme. C'est lors du troisième trimestre de la grossesse que les œstrogènes et la progestérone produite par la mère, provoquent une canalisation de l'épithélium mammaire, une différenciation du parenchyme, la formation des canaux galactophores ainsi que le développement du réseau lobulo-alvéolaire. Après la naissance et jusqu'à la puberté, les modifications morphologiques et histologiques sont modestes.

Durant l'étape pubertaire, les modifications sont importantes mais essentiellement dues à une augmentation du tissu graisseux. Avec la mise en place des cycles menstruels, la glande

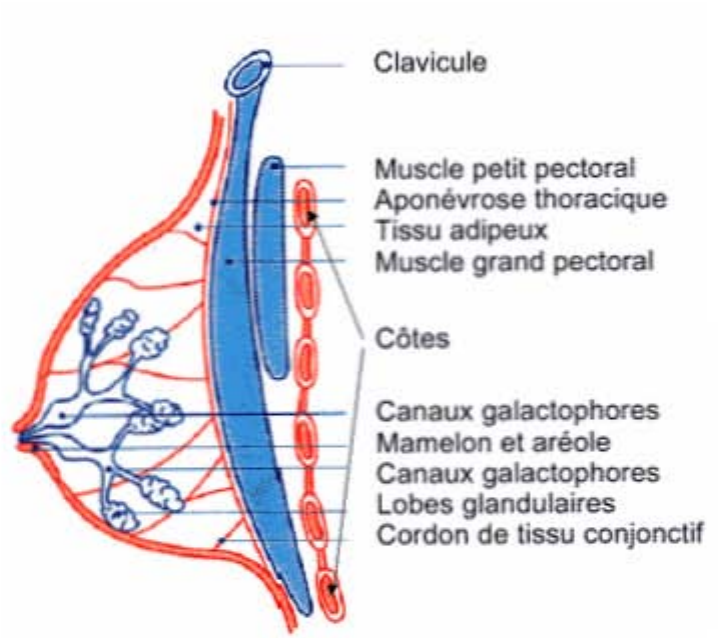


Figure 1 : Anatomie du sein.

mammaire est soumise à une alternance d'exposition aux œstrogènes (1ère moitié du cycle) et à la progestérone (2ème moitié du cycle). Ces changements d'équilibres hormonaux sont incapables d'induire le véritable développement de la glande mammaire. Ce sont essentiellement les canaux qui vont se développer et se diviser pour former des bourgeons terminaux. Ces bourgeons terminaux sont à l'origine de nouvelles ramifications qui vont former des bourgeons alvéolaires, on parle alors de lobules de type 1 **(Figure 2)**. Au cours de la maturation sexuelle, ces lobules évolueront en lobules de type 2 puis de type 3, et ce lentement jusqu'à l'âge de 35 ans. La différenciation totale de ces lobules ne pourra être atteinte si aucune gestation ne survient (Russo *et al.*, 2004) **(Figure 2).**

La gestation et la lactation entraînent des modifications importantes du sein. Il augmente de volume, le mamelon devient saillant, l'aréole se pigmente comme le mamelon et prend un aspect grenu. Durant la grossesse, les ramifications terminales des canaux se multiplient et de nombreuses alvéoles se développent (jusqu'à 80 alvéoles par lobule) sous l'influence notamment des hormones œstrogènes/progestérone et de facteurs de croissance tels que le TGF-α (Tumor Growth Factor-α) (Lamote *et al.*, 2004). Les cellules sécrétrices sont totalement différenciées et on parle alors de lobules de type 4. Après l'accouchement, durant 2 à 3 jours, la sécrétion mammaire est fluide et jaunâtre, c'est le colostrum. Au 3e jour, la sécrétion graisseuse augmente et le colostrum se transforme en lait. Ainsi la glande mammaire n'achève son développement qu'avec la première lactation.

A la ménopause, le déclin des fonctions ovariennes provoque une régression des structures de la glande mammaire : les canaux galactophores sont maintenus, mais les alvéoles restantes ainsi que les lobules continuent de régresser avec l'âge **(Figure 2)**.

II. Le cancer du sein

2.1. Mécanisme de déclenchement tumoral

Le cancer du sein, comme tous les cancers, résulte d'altérations génétiques et épigénétiques affectant des cellules normales. Par la suite, ces changements touchent non seulement les cellules malignes mais peuvent également atteindre les cellules qui interagissent avec la tumeur telles que les cellules immunitaires, vasculaires et stromales (Osborne *et al.*, 2004). La plupart des modifications génétiques sont acquises, et ne sont présentes que dans les cellules malignes, on parle alors de cancers du sein sporadiques. Dans seulement 10 % des cas, ces altérations

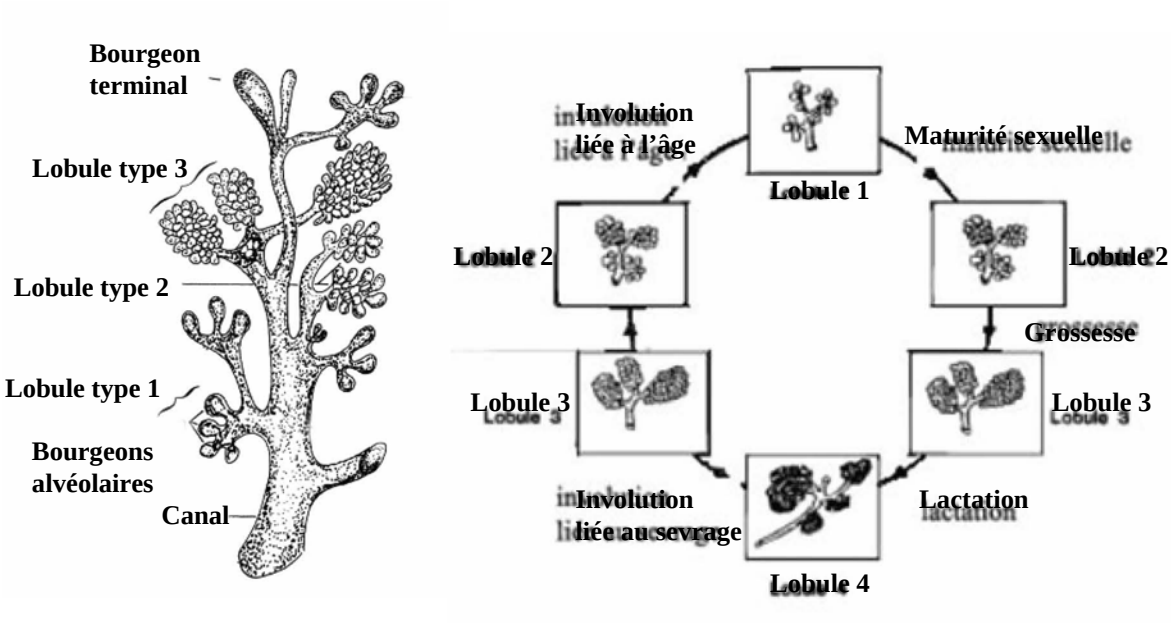


Figure 2 : Structure et développement des lobules mammaires.

génétiques sont héritées et prédisposent les individus à développer ce type de cancer. Dans tous les cas, ces évènements permettent aux cellules d'acquérir un certain nombre de caractéristiques : autonomie vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire, insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance cellulaire, évasion du système de mort cellulaire programmée (apoptose), capacité à maintenir l'angiogénèse, potentiel de réplication illimité et capacité d'invasion tissulaire (potentiel métastatique) (Hanahan *et al.*, 2000).

De très nombreuses données tendent à prouver l'existence d'une hiérarchie cellulaire dans les tumeurs solides, dirigée par des cellules cancéreuses ayant des propriétés de cellules souches : les cellules souches cancéreuses (CSC). L'existence de cellules souches normales (CSN) dans le sein à l'état adulte est très probable au regard même de la biologie de la glande. Les CSN épithéliales organisent le fonctionnement de la glande mammaire grâce à des propriétés intrinsèques spécifiques. Ces propriétés associent une longue durée de vie et une capacité à s'auto-renouveler et à produire des cellules filles capables de se différencier. La capacité d'auto-renouvellement permet de préserver et de réguler le *pool* de CSN dans la glande mammaire. Dans le cancer du sein, les CSC proviendraient directement des CSN adultes de l'épithélium mammaire qui seraient seules le siège des altérations génétiques tumorales **(Figure 3)** (Ginestier *et al*., 2007). Enfin, les données épidémiologiques montrent qu'une grossesse précoce diminue considérablement le risque de cancer du sein et ce, parce qu'elle entraîne une différenciation terminale des cellules épithéliales mammaires (Polyak *et al.*, 2001).

La première étape de la cancérisation est une phase d'initiation durant laquelle une cellule normale est irréversiblement altérée de telle sorte qu'elle ne peut terminer sa différenciation ou entrer en apoptose. Sa croissance reste cependant contrôlée par son environnement cellulaire notamment via les jonctions serrées. Dans un second temps, la division de ces cellules pré-malignes va être stimulée, c'est la phase de promotion. Les cellules filles sont immortelles. La présence de nombreux facteurs endogènes (hormones, facteurs de croissance, cytokines) et exogènes (composés promoteurs de tumeurs), le maintien de leur prolifération et l'absence d'apoptose, va favoriser leur accumulation. Par ailleurs elles acquièrent une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance et perdent leur capacité de communication intercellulaire. Après de multiples divisions, d'autres altérations génétiques et épigénétiques apparaissent. Celles-ci génèrent de nouveaux phénotypes, stables et totalement indépendants des facteurs externes grâce notamment à l'activation d'oncogènes ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (anti-oncogènes) : c'est la phase de progression (Trosko *et al.*, 2005).

Les oncogènes et les anti-oncogènes jouent un rôle prépondérant dans la carcinogenèse mammaire **(Tableau 1).** Les oncogènes sont des gènes qui, activés ou surexprimés, induisent

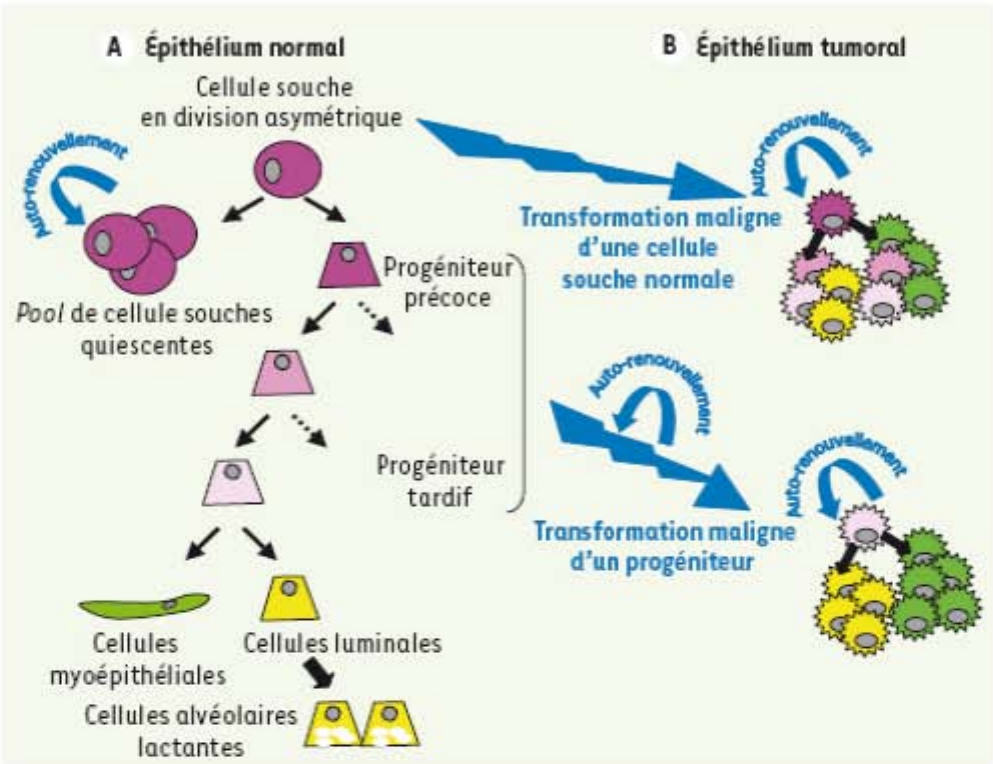


Figure 3. Différenciation de l'épithélium mammaire normal et tumoral. A. Le pool de cellules souches de l'épithélium mammaire normal (CSN) est globalement dans un état quiescent**.** Une CSN peut se diviser de façon asymétrique afin de donner naissance à une cellule souche identique à la cellule d'origine grâce à la propriété d'auto-renouvellement, et une cellule progénitrice engagée dans la voie de la différenciation. **B.** Lors de l'oncogenèse, les cellules ciblées par la transformation maligne pourront être soit les cellules souches, soit les progéniteurs de l'épithélium normal. Les cellules souches cancéreuses (CSC) garderont les propriétés des cellules souches de l'épithélium normal, c'est-à-dire l'auto-renouvellement pour guider la tumorigénicité et la capacité à se différencier. Lorsque les CSC ont comme cellule d'origine un progéniteur, elles réacquièrent la propriété d'auto-renouvellement lors de la transformation maligne.

Oncogènes	Gènes suppresseurs de tumeur
HER-2 Ras PI3K Akt EIF-4E Cyclin D1 Cyclin E C-myc C-fos	p53 p27 BRCA-1 BRCA-2 CHK2 ATM PTEN Rb

Tableau 1: Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans les cancers du sein (Osborne *et al*., 2004)

des signaux de prolifération cellulaire. Les anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs, freinent la prolifération cellulaire. Lorsqu'ils sont inactivés par une mutation, par exemple, ils n'exercent plus leur rôle de régulation négative. Schématiquement, à l'état normal, il existe un équilibre entre l'expression des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Des mutations successives de ces gènes rompent cet équilibre, entraînant une prolifération excessive des cellules tumorales. Les mutations des oncogènes sont souvent des mutations qui rendent ces gènes hyperactifs.

Plus d'une centaine d'oncogènes ont été identifiés. Certains sont connus pour causer des cancers mammaires lorsqu'ils sont surexprimés dans des modèles de souris transgéniques. L'oncogène *HER-2*, connu également sous le nom de *erbB-2*, est surexprimé dans 20 à 30 % des cancers du sein invasifs. Il code un récepteur membranaire dont l'activation peut se faire de manière autonome si le nombre de récepteurs présents dans la membrane cellulaire est suffisant. L'activation de ce récepteur entraîne la stimulation de nombreuses voies de signalisation dont celle des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et de la PI3K/Akt (Phosphoinositol-3-Kinase/Akt). Cela favorise la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, l'altération des contacts cellulaires, la résistance à l'apoptose et la migration cellulaire. L'oncogène *c-myc* est surexprimé dans 15 à 25% des tumeurs mammaires. Il s'agit d'un facteur de transcription qui forme un dimère avec la protéine Max et induit la prolifération cellulaire (Osborne *et al.*, 2004; Wazer *et al.*, 1999). Deux anti-oncogènes majeurs interviennent dans la régulation du cycle cellulaire : la protéine du rétinoblastome (pRb) et le produit du gène p53. La protéine Rb, en fonction de son état de phosphorylation, régule la transition du cycle cellulaire de phase G1 à la phase S. pRb présente de nombreux sites de phosphorylation qui correspondent pour la plupart à des sérines ou des thréonines. Ces résidus sont la cible des cdk. En début de phase G1, pRb n’est pas phosphorylée puis subi une phosphorylation partielle. Dans ces 2 états, pRb inhibe le facteur de transcription E2F en interagissant avec lui. A la fin de la phase G1, pRb est complétement phosphorylée et ne peut plus interagir avec E2F. Ce dernier est alors libérer et permet la transcription des gènes nécessaire à la réalisation de la phase S. La phosphorylation de pRb suit l’apparition des complexes cycline/cdk. Dans un premier temps, seule cdk4 associée à la cycline D phosphoryle pRb. Cette phosphorylation induit le changement de conformation de pRb et permet ainsi le recrutement du complexe cycline E/cdk2 qui phosphoryle une deuxième fois pRb sur des sites différents de ceux utilisés par cdk4. Les complexes cycline A/cdk2 et cycline B/cdk1permettrait de maintenir pRb dans un état phosphorylé **(Figure 4).**

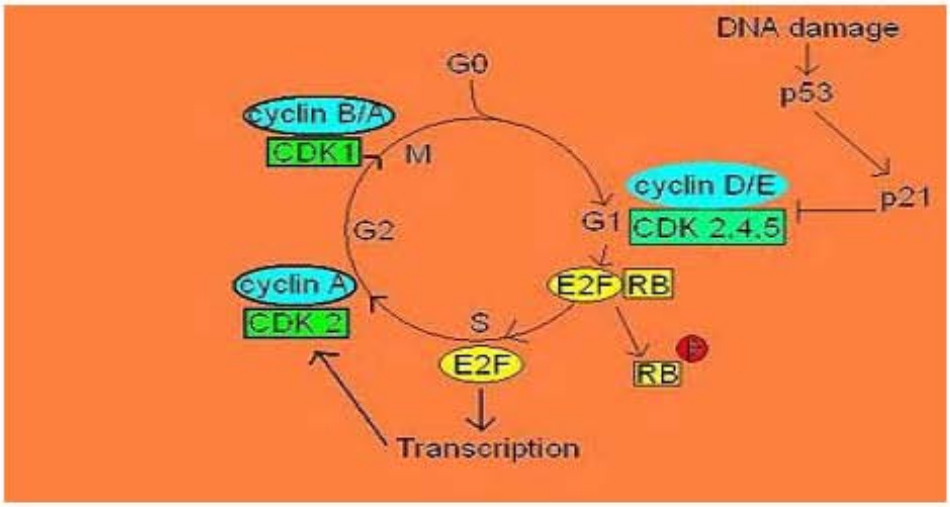


Figure 4: Schéma simplifié du cycle cellulaire et de quelques régulateurs. Chaque phase du cycle cellulaire est régulée par un ou plusieurs complexe cdk/cycline. La protéine du rétinoblastome (RB) à létat hypophosphorylé bloque le cycle cellulaire en phase G1 via la séquestration du facteur de transcription E2F. Sous l'influence de facteurs mitogènes, la protéine RB perd son état hypophosphorylé et le cycle cellulaire progresse. Le facteur de transcription E2F peut alors aller initier la transcription d'ARNm nécessaires à la phase S du cycle cellulaire. Lorsque l'ADN est endommagé, la protéine p53 se trouve phosphorylée et induit la production de la protéine p21. Celle çi se lie aux complexes cycline/cdk de la phase G1 inhibant ainsi leur activité kinase pour RB, le cycle cellulaire est alors arrêté.

Le stade hypophosphorylé de pRb est notamment maintenu par le TGF-β (Tumor Growth Factor-β), qui bloque en même temps l'expression de c-myc. Une mutation ou une perte de fonctionnalité du TGF-β ou de son récepteur provoque de manière concomitante la phosphorylation de pRb donc une avancée des cellules dans le cycle cellulaire, et l'expression de c-myc, favorisant la prolifération cellulaire. Le gène p53 code une phosphoprotéine de 53 KDa. Deux rôles particuliers sont dévolus à cette protéine : soit l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S, soit la mort cellulaire par un phénomène d'apoptose. La protéine p53 se fixe sur une séquence spécifique d'ADN aboutissant à la transcription du gène WAF1 / Cip1, (pour Wild Type p53-activated fragment et cdk2 inhibiting protein). La protéine, $p21^{waf1}$se lie à la kinase cdk2, et inhibe son activité. La cellule s'arrête alors avant la synthèse de l'ADN et peut réparer d'éventuels dommages **(Figure 4)**. Lors d'une agression cellulaire, la concentration et la demi-vie de p53 s'accroissent par une diminution de sa dégradation physiologique. Il a été montré expérimentalement qu'une simple lésion double brin suffisait à induire une augmentation du taux de p53. Un autre mécanisme déclenchant est constitué par un mésappariement de bases ou une insertion/délétion de bases. En présence de p53 mutée, l'ADN n'est plus réparé, il en résulte une instabilité génomique associée à une accumulation de mutations provoquant une croissance incontrôlée (Wazer *et al.,* 1999). Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont également des anti-oncogènes et sont avec *p53* à l'origine de la plupart des cancers du sein héréditaires.

2.2. Développement tumoral, invasion et métastases

Les cancers évoluent en deux phases: une phase locale caractérisée par la croissance tumorale et l'invasion locale, et une phase générale se traduisant par une dissémination tumorale à distance de la tumeur initiale (métastase). Cette phase de dissémination, spécifique du cancer, est responsable de sa gravité. Les étapes nécessaires à l'apparition de métastases sont : la croissance de la tumeur, l'angiogenèse et l'accès aux vaisseaux sanguins et lymphatiques, la réduction de l'adhésivité et de la cohésion des cellules tumorales, leur mobilité accrue et la production d'enzymes protéolytiques permettant le passage à travers la matrice extracellulaire et la paroi des vaisseaux (Heimann *et al,*. 2000).

2.2.1. Croissance de la tumeur

La croissance des tumeurs mammaires se fait essentiellement sous l'influence des hormones et des facteurs de croissance. En effet, de nombreuses études montrent que l'IGF-I (Insulin-like Growth Factor I), l'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGFα ou encore le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2) stimulent la prolifération des cellules cancéreuses mammaires (Stull *et al.*, 2004). Les hormones impliquées sont essentiellement les œstrogènes. Le récepteur alpha des œstrogènes (Estrogen Receptor alpha, ERα), est présent dans 50 à 80 % des tumeurs mammaires. De plus, de nombreuses études, *in vivo* et *in vitro*, ont montré que les œstrogènes avaient une activité mitogène sur les cellules cancéreuses mammaires (Platet *et al.*, 2004). Les cellules présentes aux environs de la tumeur peuvent également jouer un rôle important dans son développement. Les cellules myoépitheliales en sont un premier exemple. Elles présentent à l'état normal des propriétés anti-proliferatives, anti-invasives et anti-angiogéniques médiées par l'expression d'inhibiteurs de protéases (serpines, TIMP-1) et d'inhibiteurs de l'angiogenèse (thrombospondine-1, récepteur soluble du FGFβ). Il est possible que la destruction de ces cellules ou des facteurs produits par celles-ci favorise la prolifération, le comportement invasif et l'angiogenèse des cellules cancéreuses mammaires. Les fibroblastes jouent également un rôle important dans la tumorogenèse mammaire. De nombreuses hormones, des facteurs de croissance et de différenciation sont sécrétés par ces cellules. De plus les fibroblastes contribuent à la formation de la matrice extracellulaire. Enfin, des études suggèrent une implication des macrophages, des granulocytes éosinophiles et des cellules endothéliales dans la tumorogenèse (Polyak, 2001).

2.2.2. Angiogenèse

L'oxygène et les nutriments apportés par le réseau vasculaire sont cruciaux pour le fonctionnement et la survie cellulaire, obligeant virtuellement les cellules d'un tissu à se situer à moins de 100 µM d'un capillaire sanguin (Hanahan *et al.*, 2000). Aussi, lorsqu'une tumeur atteint 1 à 2 mm^3 sa croissance est dépendante de la formation de nouveaux vaisseaux (Miller *et al.*, 2002). Elle met donc en place un processus de vascularisation appelé angiogenèse **(Figure 5)**. L'angiogenèse physiologique n'est pas sous le contrôle d'un facteur unique mais elle est régulée par un équilibre entre des facteurs pro-angiogéniques et des facteurs antiangiogéniques. Le premier facteur pro-angiogénique identifié fut le "Fibroblast growthfactor" ou FGF. De

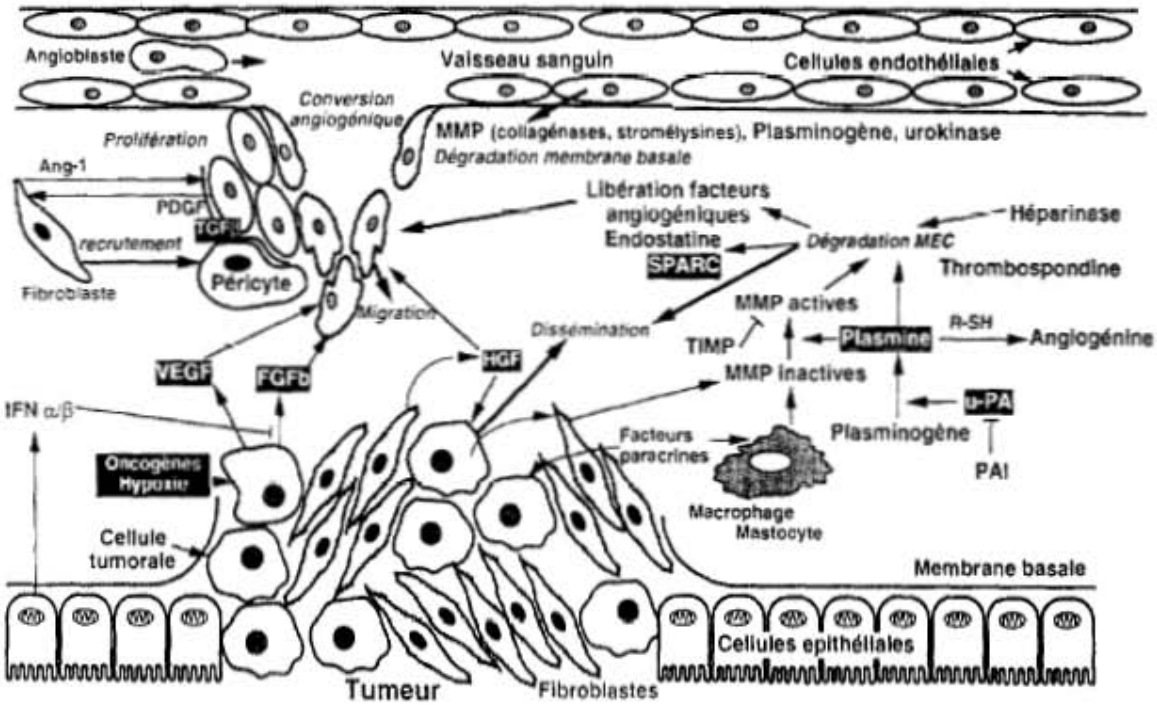


Figure 5 : Interactions entre cellules endothéliales, cellules tumorales et stromales pendant l'angiogenèse et l'invasion tumorale (André *et al*., 1998).

nombreux agents ont depuis été identifiés. Ils constituent un ensemble très hétérogène de par leur nature, leur mécanisme d'activation et leur fonctionnement. Cet ensemble comprend des substances dont l'activité est essentiellement vasculaire comme l'angiogénine, l'angiotropine, le facteur de perméabilité vasculaire, des facteurs dont le rôle biologique est complexe ou mal élucidé (prostaglandines, héparine, TNFα…) et surtout des facteurs de croissance (TGFα, TGFβ, EGF, βFGF, VEGF…) (Guinebretiere *et al.*, 2005). Parmi ces substances, le VEGF se distingue car son inhibition par des anticorps spécifiques est suivie d'un arrêt de la croissance tumorale (Kim *et al.*, 1993). De plus, il est surexprimé dans les cellules cancéreuses ainsi que dans les cellules entourant la tumeur (Boudreau *et al.*, 2003).

L'angiogenèse est mise en place par les cellules tumorales en hypoxie. Sous l'action de facteurs pro-angiogéniques issus de la tumeur, les cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux existants synthétisent des enzymes protéolytiques qui vont altérer la lame basale endothéliale. Puis, les cellules endothéliales prolifèrent sous l'action du VEGF et synthétisent les éléments constitutifs de la lame basale du nouveau vaisseau (collagènes, protéoglycanes, etc), puis les molécules d'adhésion, les sélectines (E,P) et les intégrines (IC AM1, IC AM2, VC AM1). Ce nouveau réseau de vaisseaux permet à la tumeur de se développer et de mettre en place les processus d'invasion métastatique.

2.2.3. Invasion tumorale et métastases

Le processus métastatique commence par la réduction de l'adhérence et de la cohésion des cellules tumorales. L'adhérence des cellules tumorales est assurée par des déterminants moléculaires variés. La E-cadhérine est le prototype des molécules d'adhésion des épithéliums. C'est une molécule transmembranaire qui, en présence de calcium, se lie à une structure identique présentée par la cellule voisine. Une perte d'expression des E-cadherines est observée dans plus de 85% des tumeurs invasives (Cowin *et al.*, 2005). Par ailleurs, des changements dans l'expression des intégrines, protéines permettant aux cellules de se lier aux différents substrats de la matrice extracellulaire, sont également observés. En effet, la migration oblige les cellules à s'adapter à de nouveaux environnements tissulaires et donc à de nouveaux composants de la matrice. En conséquence, la réussite de la colonisation de nouveaux sites (locaux ou distants) demande une adaptation des cellules cancéreuses. C'est en changeant de sous-type d'intégrines (on en compte plus de 22), que la cellule tumorale va réussir cette adaptation. Les intégrines liant préférentiellement la matrice extracellulaire des épithéliums "normaux" sont remplacées par les intégrines liant les composants du stroma dégradés par les

protéases (Hanahan *et al.*, 2000). La dégradation de la membrane basale, de la matrice extracellulaire ainsi que de toutes leurs protéines de structure est une caractéristique importante de l'invasion tumorale. Les cellules tumorales et environnantes sécrètent les enzymes nécessaires à cette dégradation. Parmi ces enzymes, on trouve les métalloprotéases (MMP). Il s'agit d'une famille d'endopeptidases zinc-dépendantes. Il en existe 19 qui peuvent être divisées en sous-groupes : les collagénases (MMP-1, 8 et 13), les gélatinases (MMP-2 et -9), les stromélysines (MMP-3, 7, 10 et 11) et les métalloprotéases membranaires. Le collagène de type IV, composant majoritaire de la lame basale, peut ainsi être dégradé par les gélatinases. De nombreuses études ont montré l'implication de ces enzymes dans les processus invasifs des cellules cancéreuses mammaires. D'ailleurs, dans les cancers du sein, un taux élevé de MMP-2 est souvent associé à un faible pronostique de survie (Duffy *et al.*, 2000).

Une fois le processus de migration enclenché, les sites métastatiques peuvent être nombreux. Néanmoins dans environ 30 % des cas, les métastases sont retrouvées au niveau des os. Les poumons et le foie sont également des sites privilégiés puisqu'ils sont concernés dans respectivement 12% et 3% des cas.

2.3. Anatomie pathologique des cancers du sein

Deux classifications sont couramment utilisées : la classification clinique et la classification histologique.

2.3.1. Classification clinique

La classification TNM (Tumor Node Metastases, Tumeur ganglions métastases) de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) est la plus utilisée. Elle se base sur la taille de la tumeur (T), la présence de ganglions (N) et la présence de métastases (M) **(Tableau 2)**. Une autre classification clinique, plutôt utilisée par les anglo-saxons, est la classification de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) **(Tableau 3)**.

T	Tumeur primitive
TX **T0** **Tis** **T1** **T2** **T3** **T4**	Détermination de la tumeur primitive impossible Pas de signe de la tumeur primitive Carcinome *in situ* Tumeur ≤ 2cm dans sa plus grande dimension T1a ≤ 0,5 cm T1b >0,5 cm et <1 cm T1c >1 cm et < 2 cm Tumeur >2 cm et ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension Tumeur >5 cm dans sa plus grande taille Tumeur de toutes tailles avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau T4a extension à la paroi thoracique T4b oedème ou ulcération cutanée du sein T4c à la fois 4a et 4b T4d carcinome imflammatoire
N	Adénopathies régionales
NX **N0** **N1** **N2** **N3**	Appréciation impossible de l'atteinte ganglionnaire Absence de signes d'envahissement ganglionnaire régional Ganglions axillaires cliniquement suspects homolatéraux mobiles Ganglions axillaires homolatéraux fixés entre eux ou à d'autres structures Ganglions mammaires internes homolatéraux
M	Métastases à distance
MX **M0** **M1**	Détermination impossible de l'extension métastatique Absence de métastases à distance Présence de métastases à distance

Tableau 2: Classification TNM de l'UICC

Stade	Statut de la tumeur	Statut des nodules	Statut des métastases
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade I	T1	N0	M0
Stade IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
Stade IIB	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stade IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1 et N2	M0
Stade IIIB	T4	Tout N	M0
	Tout T	N3	M0
Stade IV	Tout T	Tout N	M1

Tableau 3: Classification de l'AJCC

2.3.2. Classification histologique

►Les carcinomes non infiltrants

●**Le carcinome intracanalaire ou canalaire *in situ* :** il se définit comme un carcinome se développant dans le canal, n'infiltrant pas le tissu conjonctif. Il représente environ 4 % des cancers et se caractérise par sa découverte fréquente sur des microcalcifications mammographiques et par sa multicentricité.

●**Le carcinome lobulaire *in situ* :** il se définit comme un carcinome intéressant les canalicules intra-lobulaires comblés et distendus par une prolifération de cellules de petite taille sans envahissement du tissu conjonctif voisin. Il représente environ 2,5 % des cancers et se caractérise par son caractère multicentrique et sa tendance à la bilatéralisation.

►Les carcinomes infiltrants

●**Le carcinome canalaire infiltrant :** c'est la forme la plus fréquente : 70 % des cancers du sein. Il peut présenter trois types d'architectures : bien différencié avec des structures tubulaires prédominantes, moyennement différencié et indifférencié avec une absence de structures glandulaires.

●**Le carcinome lobulaire infiltrant :** il représente 5 à 15 % des cancers. Il se caractérise par sa tendance à la bilatéralité et à la multicentricité.

► **Le carcinome mucineux :** il s'agit d'un carcinome riche en mucus extracellulaire. Histologiquement, cette tumeur est constituée de nappes de mucus ponctuées de petits îlots épithéliomateux avec ou sans différenciation glandulaire.

►**Le carcinome médullaire :** c'est un carcinome bien limité, constitué de nappes de cellules peu différenciées dans un stroma peu abondant, lymphoïde.

►**Les autres tumeurs malignes :** les tumeurs malignes en dehors des carcinomes primitifs du sein sont rares. Elles représentent moins de 1% de toutes les tumeurs malignes du sein et constituent un groupe de lésions disparates comportant les sarcomes phyllodes, les sarcomes mésenchymateux ou sarcomes du stroma, les angiosarcomes, les lymphomes malins non hodgkiniens primitifs du sein.

III. Incidence, facteurs de risque et facteurs de survie

3.1. Incidence

Le cancer du sein est le plus fréquent des cancers dans les pays occidentaux et constitue le premier cancer féminin dans le monde avec environ 1 million de cas par an (Dumistrescu *et al*., 2005). Le cancer du sein reste rare chez les hommes puisque 1% d'entre eux présentent cette pathologie. En 2005, sur 60 000 femmes qui sont décédées d'un cancer, environ 11 000 l'ont été à la suite d'un cancer du sein, ce qui fait de cette maladie la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Avec près de 42 000 nouveaux cas estimés chaque année, cela représente 36,7 % de l'ensemble des nouveaux cas de cancers chez la femme. Une femme sur 10 développera un cancer du sein au cours de sa vie. Cette pathologie est rare avant 30 ans, 95% des cas surviennent après 40 ans dont près de la moitié sont diagnostiqués entre 50 et 69 ans. Par ailleurs, son incidence s'accroît régulièrement, + 60% en 20 ans, ce qui fait de cette pathologie un problème majeur de santé publique (Trétarre *et al*., 2004 ; Hill & Doyon, 2008).

3.2. Facteurs de risque

Il n'existerait pas de facteur unique responsable de l'apparition d'un cancer du sein. En réalité, plusieurs facteurs de risque susceptibles d'augmenter le développement de ce type de cancer ont été mis en évidence : facteurs génétiques, environnementaux et hormonaux.

3.2.1. Facteurs génétiques

Seuls 5 à 10% des cas de cancer sont liés à des anomalies génétiques héréditaires. La probabilité qu'une femme de 30 ans, ayant une mère ou une sœur atteinte d'un cancer du sein, développe cette pathologie avant l'âge de 70 ans est comprise entre 7% et 18% (Sakorafas *et al*., 2002). Plusieurs gènes impliqués dans la carcinogenèse mammaire héréditaire ont été identifiés. Les principaux sont *BRCA1, BRCA2, p53, PTEN* et ataxia-telangiectasia (*AT*). La grande majorité des cancers du sein héréditaires peuvent être attribués aux gènes *BRCA1* et *BRCA2* (Dumitrescu *et al*., 2005).

BRCA1 est localisé sur le chromosome 17 et code une protéine nucléaire impliquée notamment dans le contrôle de la recombinaison mitotique, dans la ségrégation des chromosomes, la régulation transcriptionnelle ainsi que dans la réparation de l'ADN. Cette protéine agit comme

une ubiquitine ligase de type E3 dont les substrat sont certaines histones, la tubuline γ, ERα, NPM1, la sous unité d'ARN polymérase II, l'isoforme A du PR et le facteur TFIIE (Wu *et al*., 2008).

BRCA2 est localisé sur le chromosome 13 et code une histone acétyle transférase impliquée dans la régulation de la transcription avec une fonction suppresseur de tumeur. Elle est impliquée dans la réparation de l'ADN et interagit avec BRCA1 dans les voies d'activation de la protéine p53. Les femmes portant des mutations de type délétion au niveau de BRCA1 ou BRCA2, présentent un risque considérable de développer un cancer du sein (80%). Ce risque est environ dix fois supérieur à celui de la population générale (Daly *et al*., 2005).

Le gène *p53* localisé sur le chromosome 17 est un des gènes les plus communément mutés dans les cancers humains (environs 50% des cancers). Les femmes affectées par une mutation de *p53* présentent un risque plus élevé de développer un cancer du sein avant l'âge de 45 ans. Enfin, les mutations des gènes *PTEN* et *AT*, observées chez des patientes atteintes respectivement du syndrome de Cowden et de l'ataxie télangiectasie, augmentent de 25 à 50% le risque de cancérogenèse mammaire (Dumitrescu *et al*., 2005).

3.2.2. Facteurs environnementaux

Les variations d'incidence observées entre différents pays et zones géographiques amènent à parler de risques environnementaux.

Les radiations ionisantes constituent le facteur de risque environnemental le mieux décrit. Les animaux de laboratoire et les populations humaines ayant été exposés à de fortes doses de radiations ionisantes présentent un taux de cancer du sein relativement élevé (Ronckers *et al*., 2004).

Un certain nombre de produits chimiques environnementaux peuvent augmenter le risque de cancer du sein. C'est notamment le cas des organochlorés tels que le Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) ou les Polychlorobiphényls (PCB) qui ont longtemps été utilisés comme pesticides. Les dioxines ou encore les solvants organiques utilisés dans l'industrie sont également incriminés (Coyle *et al*., 2004).

Le régime alimentaire semble aussi avoir une importance dans l'apparition des cancers mammaires. La surconsommation de protéines et de graisses animales a longtemps été incriminée or il apparaît qu'un régime alimentaire riche en acide gras oléique trouvé dans l'huile d'olive par exemple protège des cancers du sein (Wang *et al*., 2008). Par ailleurs, le taux

de cancer mammaire est plus élevé dans les contrées occidentales qu'au Japon ou autres pays d'Asie moins consommateurs de graisses animales.

Il est clairement démontré que les femmes obèses post-ménopausées présentent un risque supérieur de développer un cancer mammaire (Carmichael *et al*., 2004 ; Dumitrescu *et al*., 2005). La consommation d'alcool ainsi qu'une consommation active ou passive de tabac augmente également ce risque (Morabia *et al*., 1996 ; Johnson *et al*., 2000 ; Thygesen *et al*., 2008). Enfin, la pratique d'une activité physique diminue le risque de développer un cancer du sein chez les femmes pré et post-ménopausées (Maruti *et al*., 2008).

3.2.3. Facteurs hormonaux

Certaines hormones stéroïdes jouent un rôle important dans le développement de la glande mammaire. Elles jouent aussi un rôle important en tant que facteur de risque du cancer du sein. Les carcinomes mammaires hormono-dépendants s'observent chez approximativement 60% des patientes pré-ménopausées et chez 75% des patientes ménopausées. On distingue les hormones endogènes (œstrogènes et progestérone) des hormones exogènes pouvant être apportées par les contraceptifs oraux, les traitements hormonaux substitutifs ou encore les xénoœstrogènes.

3.2.3.1. Hormones endogènes

Le risque semble dépendre essentiellement du temps d'exposition de l'épithélium mammaire à ces hormones. De nombreuses variables, incluant l'âge des premières règles, celui de la première grossesse et de la ménopause ainsi que le nombre de grossesses, sont à prendre en compte. Chez les femmes pré-ménopausées, les œstrogènes sous forme d'œstradiol sont majoritairement produits par les ovaires. Après la ménopause, les œstrogènes continuent à être produits au niveau du tissu adipeux notamment dans la glande mammaire.

Une ménarche précoce (avant 12 ans) augmente de 10 à 30 % le risque de cancer mammaire. De même, une ménopause tardive élève le risque de 3% pour chaque année dépassant l'âge moyen de la ménopause. Ces résultats s'expliquent par l'augmentation, chez ces femmes, du nombre de cycles ovulatoires. A l'inverse, des grossesses précoces ou nombreuses et des lactations prolongées, diminuent le risque de cancer du sein (Dumitrescu *et al.*, 2005; Sakorafas *et al.*, 2002).

D'une manière générale, la concentration et le type d'hormones présentes dans le sérum influencent le risque de carcinogenèse mammaire. Ainsi, une augmentation du taux d'oestrone,

d'oestradiol et/ou de testostérone est corrélée à une augmentation du risque de cancer du sein (Feigelson *et al.*, 1996; Key *et al.*, 2002). La progestérone agit par l'intermédiaire de son récepteur (PR), dont il existe deux isoformes (PR A et et PR B), transcrites à partir de deux promoteurs différents d'un même gène. Le rôle des isoformes est mal connu dans la tumeur mammaire mais il apparaît que l'augmentation du rapport A/B induit des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire aboutissant à la migration des cellules cancéreuses vers la moelle osseuse ce qui correspond à un phénotype plus aggressif (Jacobsen *et al.*, 2002) Mais une étude contradictoire a rapporté que la progestérone n'augmenterait pas ce risque et pourrait avoir un effet préventif (Campagnoli *et al.*, 2005).

3.2.3.2. Hormones exogènes

Les traitements hormonaux substitutifs et la contraception orale sont les deux sources d'hormones exogènes les plus étudiées. Les contraceptifs oraux contiennent généralement un œstrogène et de fortes doses de progestérone. Les résultats, même s'ils sont pour la plupart controversés, montrent qu'ils n'augmentent que modestement le risque de cancer du sein. Ce risque varie selon l'âge d'ingestion des premiers contraceptifs et devient nul environ 10 ans après l'arrêt du traitement (Henderson *et al.*, 2000; Dumitrescu *et al.*, 2005).

En France, les traitements hormonaux substitutifs les plus couramment prescrits combinent des œstrogènes, généralement administrés sous forme de patchs ou de gels, à de la progestérone micronisée ou à des progestatifs de synthèse. Par ailleurs, les autorités sanitaires recommandent désormais un traitement hormonal substitutif de courte durée. L'examen des taux de cancer selon le type d'hormones suggère qu'avec l'œstrogène utilisé seul (traitement réservé aux femmes hystérectomisées), le sur-risque de développer un cancer du sein est minime voire inexistant. En revanche, lorsqu'il est associé à un progestatif de synthèse, le risque de cancer du sein est augmenté de 40 % et ce, indépendamment de la voie d'administration de l'œstrogène. La combinaison œstrogène et progestérone micronisée semble dépourvue d'effet cancérigène, tout du moins à court terme (Fournier *et al.*, 2005). Les xénoœstrogènes sont des substances chimiques, d'origine naturelle ou synthétique, capables de se lier aux récepteurs des œstrogènes (ER) et d'induire ou moduler une réponse relayée par ces récepteurs. Ces xénoœstrogènes ou œstrogèno-mimétiques proviennent essentiellement de l'industrie, de l'agriculture et des rejets urbains. Les lignées de tumeurs mammaires MCF-7 et T47D, sensibles à l'œstradiol, se multiplient davantage en présence de ces molécules (Soto *et al.*, 1995; Lascombes *et al.*, 2000).

Ces résultats suggèrent que ces molécules peuvent avoir un impact non négligeable sur l'incidence des cancers mammaires hormono-dépendants.

3.3. Facteurs pronostiques et survie

Un grand nombre de facteurs interviennent dans l'établissement d'un pronostic de survie. L'âge joue un rôle très important : en absence de métastases, la survie à 5 et 10 ans d'une patiente est respectivement de 67% et 52% lorsqu'elle a moins de 35 ans, de 79% et 63% entre 35 et 65 ans ; pour les femmes de plus de 75 ans la survie passe à 51% et 25%. L'évolution de la maladie est d'autant plus sévère que la taille de la tumeur est volumineuse. Le taux de survie à 5 ans est de 99 % si la tumeur est de 1 cm ou moins, alors qu'il n'est plus que de 86 % pour une taille comprise entre 3 et 5 cm (Donegan *et al.*, 1997).

L'envahissement ganglionnaire axillaire est le meilleur indicateur de survie des patientes atteintes d'un cancer du sein. Le nombre de ganglions infectés et leur niveau d'envahissement suffisent à prédirent le taux de survie. En effet, le taux de survie à 5 ans est de 73 % pour des patientes ayant de 1 à 3 ganglions infectés, de 45,7 % pour 4 à 12 ganglions et de 28,4 % pour 13 ganglions ou plus. Les formes d'emblée métastatiques ont un très mauvais pronostique à 5 et 10 ans : respectivement 15 % et 5 % (Cianfrocca *et al.*, 2004).

Enfin, la présence des récepteurs hormonaux a aussi valeur de facteur pronostique. La survie à 5 ans pour un cancer du sein non métastatique est de 74 % en présence de récepteurs des œstrogènes α et de 66 % en leur absence. Pour les récepteurs à la progestérone, la survie à 5 ans est de 81 % en leur présence et de 73 % en leur absence. Ces facteurs sont plutôt favorables, parce que la présence de ces récepteurs est indicateur de la sensibilité des cellules tumorales à l'hormonothérapie d'une part, et car de nombreuses études montrent que les récepteurs des œstrogènes diminuent les capacités invasives des cellules tumorales d'autre part (Platet *et al.*, 2004).

Le grade histologique est aussi un facteur pronostic important. Il est basé sur la différenciation glandulaire, le pléïomorphisme nucléaire et le nombre de mitoses par champ (Bundred *et al.*, 2001).

IV. Stratégies thérapeutiques

L'objectif du traitement du cancer du sein est d'enlever la tumeur et de supprimer toutes les cellules cancéreuses. Il existe différents types de traitements qui peuvent être réalisés seuls ou en associations.

4.1. Chirurgie

La chirurgie est le traitement le plus anciennement utilisé pour soigner les cancers du sein. Il en existe 2 types: la chirurgie conservatrice (tumorectomie) qui a pour but d'enlever la totalité de la tumeur sans enlever la totalité du sein, et la mastectomie qui consiste à enlever tout le sein (Houssami *et al.*, 2006).

4.2. Radiothérapie

Comme la chirurgie, la radiothérapie est un traitement local du cancer. Elle consiste à utiliser des rayons qui atteignent la tumeur et détruisent les cellules cancéreuses. Selon la zone à traiter, les rayons utilisés peuvent être différents (photons, rayons X ou électrons). Ces divers types de rayons peuvent être combinés. La radiothérapie peut être proposée avant une chirurgie du sein (radiothérapie préopératoire) pour diminuer la taille de la tumeur ou après une chirurgie du sein (radiothérapie post-opératoire) pour diminuer le risque de rechute locale (Brennan *et al.*, 2005).

4.3. Chimiothérapie

Il s’agit d’un traitement utilisé pour les formes métastatiques pour lesquelles la chimiosensibilité est largement démontrée, et en traitement adjuvant pour les formes non métastatiques. De nombreux médicaments existent et sont prescrits seuls ou en associations. Ils peuvent être classés en 4 familles selon leur mode d'action : les anti-mitotiques qui bloquent les cellules en métaphase aboutissant ainsi à l'apoptose ; les agents alkylants sont des molécules de synthèse qui inhibent la progression de l'ADN polymérase ; les antimétabolites qui perturbent la synthèse de l'ADN en bloquant les enzymes nécessaires à la synthèse des nucléotides et enfin les inhibiteurs de la topoisomérase II qui inhibent la religation des 2 brins d'ADN après le relâchement des contraintes de torsion nécessaires au processus de réplication. La durée

optimale de la chimiothérapie est en général de quatre ou six cures. Le taux de réponse est relativement élevé puisqu'il est de 70 à 90% quelque soit l'agent choisi (Brain *et al.*, 1999).

4.4. Hormonothérapie

Le traitement médical par hormonothérapie est ancien. En effet, c'est en 1896 que Beatson rapporte 2 cas de régression temporaire de cancers mammaires métastasés après ovariectomie. Dès lors, de nombreuses hormonothérapies ont été mises au point. Ce traitement est, d'une manière générale, bien toléré et peut permettre des survies très prolongées et n'est efficace que dans les tumeurs hormono dépendantes. Cette hormonosensibilité est déterminée par la présence ou non de récepteurs hormonaux dans les cellules cancéreuses, notamment de récepteurs des œstrogènes (ER) et de la progestérone (PR). La limite permettant de déterminer si une tumeur est ER ou PR positive ou négative a été le sujet de nombreux débats. Actuellement, les résultats des méthodes permettant de quantifier ces récepteurs sont considérés comme positifs si la quantité de récepteurs est supérieure à 10 fmol par mg de protéines cytosoliques. Les patientes présentant des tumeurs ER+/PR+ seraient 80% à répondre à l'hormonothérapie alors que le taux de réponse n'est que de 30 % pour les tumeurs ER+/PR- et de 45 % pour les tumeurs ER- /PR+ (Wittliff *et al.*, 1984). Il existe 4 types d'hormonothérapie : soustractive, additive, inhibitrice et compétitive.

4.4.1. Hormonothérapie soustractive

L'hormonothérapie soustractive consiste à supprimer rapidement par castration la source d'œstrogènes que constituent les ovaires. La méthode longtemps utilisée fut l'ovariectomie chirurgicale. Cette technique est actuellement remplacée par une ovariolyse radiothérapique. La suppression ovarienne est obtenue dans les 6 à 10 semaines suivant la radiothérapie. Son intérêt est démontré en situation métastatique ou en traitement adjuvant chez les femmes non ménopausées présentant des tumeurs hormono-dépendantes.

4.4.2. Hormonothérapie additive

L'hormonothérapie additive consiste à utiliser des progestatifs constituant une hormonothérapie de deuxième ou de troisième intention dans les cancers métastatiques, après échec des anti-œstrogènes ou des inhibiteurs d'aromatase. Leur mode d'action n'est pas clairement défini, mais

des études montrent qu'ils diminuent les taux d'ER et d'œstrogènes circulants. Le taux de réponse est d'environ 30% avec une rémission complète chez 5% de ces patientes (Benghiat *et al.* 1986). Ces agents présentent cependant des effets secondaires non négligeables dont une prise de poids importante, une hypertension et des risques thromboemboliques.

4.4.3. Hormonothérapie inhibitrice

On distingue tout d'abord les inhibiteurs hypophysaires gonadotropes. Il s'agit d'agonistes de la LH-RH (facteur de libération de l'hormone lutéinisante) obtenus par synthèse. Ces molécules de demi-vie longue stimulent l'hypophyse en permanence, supprimant le caractère pulsatile de la sécrétion physiologique de la LH-RH par l'hypothalamus. De ce fait, l'hypophyse ne sécrète plus de LH ni de FSH, entraînant une chute de la production d'œstrogènes et de progestérone par les ovaires. Les effets sont identiques à ceux obtenus par castration mais celle-ci est réversible 1 à 2 mois après l'arrêt du traitement (Kaufman *et al.*, 1989). Cependant, il existe initialement une augmentation transitoire des gonadotrophines et donc de la synthèse d'hormones sexuelles qui peuvent amener une aggravation brutale de la maladie. Au début, le traitement est donc souvent associé à un inhibiteur des récepteurs des œstrogènes.

L'hormonothérapie inhibitrice fait également appel aux inhibiteurs d'aromatase. L'aromatase est l'enzyme qui catalyse la transformation des androgènes en œstrogènes. Les molécules à activité anti-aromatase agissent soit en prenant la place du précurseur, en l'occurrence les androgènes (inhibiteurs stéroïdiens ou de type I), soit en se liant à l'enzyme et inhibant ainsi toutes les activités enzymatiques liées à celle-ci (inhibiteurs non stéroïdiens ou de type II). Les inhibiteurs actuellement utilisés sont l'anastrozole, le létrozole et l'exemestane plus connus sous les noms de Arimidex®, Femara® et Aromasin®. De récentes études montrent que ces inhibiteurs d'aromatase sont plus efficaces que le tamoxifène (Howell *et al.*, 2004; Yue *et al.*, 2005). Contrairement à ce dernier, ils n'augmentent pas le risque de cancer de l'endomètre ni de thromboses veineuses. En revanche, ils diminuent fortement la densité minérale osseuse et augmentent le risque de fractures. Actuellement, les inhibiteurs d'aromatase sont utilisés uniquement chez les femmes ménopausées, soit en première ligne de maladie métastatique, soit en situation adjuvante.

4.4.4. Hormonothérapie compétitive

Ce type d'hormonothérapie utilise les anti-œstrogènes. Ils bloquent l'action cellulaire des œstrogènes en se fixant à la place de l'œstradiol sur l'ER. Le chef de file est le tamoxifène qui fut mis sur le marché en 1970 et qui reste encore aujourd'hui le composé le plus utilisé dans le traitement des cancers du sein hormono-dépendants. D'autres dérivés ont été synthétisés : le raloxifène, le torémifène ou encore le fulvestrant. Le raloxifène n'est pas utilisé en cancérologie mais plutôt dans la prévention de l'ostéoporose, même si son efficacité dans le traitement des cancers du sein non métastatiques est supérieure à celle du tamoxifène (Lee *et al.*, 2008). Le torémifène est commercialisé avec comme indication le traitement de première intention du cancer du sein hormonosensible, situation dans laquelle il obtient des résultats comparables au tamoxifène (Lucchi-Angellier, 2001). Le fulvestrant ou ICI 182,780 est un anti-œstrogène stéroïdien sans effet agoniste qui se fixe sur l'ER, le bloque et induit sa dégradation ("pure antagoniste"). Son administration se fait par voie intra musculaire (1 injection mensuelle). Elle est indiquée dans les cancers hormono-dépendants avancés ou métastatiques et progressant sous traitement par des anti-œstrogènes traditionnels (Howell, 2005). Les mécanismes d'action des anti-œstrogènes sur les ER sera développé dans le paragraphe VIII du Chapitre 2.

4.5. Nouvelles stratégies thérapeutiques

De nouvelles stratégies thérapeutiques sont à l'étude et sont regroupées sous le terme de thérapies ciblées. Elles concernent l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui agissent comme des interrupteurs en bloquant les voies de signalisation surexprimées dans la cellule cancéreuse. L'anticorps monoclonal anti-HER-2 recombinant connu sous le nom de trastuzumab ou Herceptin™ est utilisé dans le traitement du cancer du sein métastatique avec surexpression tumorale de HER-2 (erbB2). Par ailleurs, les essais cliniques avec le Lapatinib ou Tykerb® qui est aussi une molécule inhibitrice de HER-2 ont montré des résultats très prometteurs et la molécule a été mise sur le marché en 2007. Une autre stratégie vise à inactiver la cyclooxygénase-2 (COX-2), dont l'implication dans la progression et l'angiogenèse des tumeurs a été démontrée. Le celecoxib, un inhibiteur sélectif de cette enzyme, a notamment été utilisé en association avec la chimiothérapie entraînant peu d'effets cytotoxiques additionnels mais augmentant le taux de réponse de 20 % (Chow *et al.*, 2005). Actuellement, les recherches se penchent vers des inhibiteurs des voies de signalisation des facteurs de croissance dont

beaucoup interagissent avec l'ER et contrôlent le développement et la croissance des tumeurs (Nicholson *et al.*, 2005).

PARTIE II : LES RECEPTEURS DES OESTROGENES

I. Les oestrogènes

Les œstrogènes, comme toutes les hormones stéroïdes, sont des molécules liposolubles qui diffusent, après leur synthèse, à travers la membrane des cellules vers la circulation sanguine. Elles ne peuvent circuler dans le sang que liées à des protéines non spécifiques comme l'albumine ou à des protéines spécifiques comme la SHBG (Sex Hormone Binding Globulin). Dans les organes cibles, les œstrogènes peuvent traverser la membrane plasmique et nucléaire. Ils sont produits essentiellement par l'ovaire et le cortex surrénalien à partir du cholestérol qui subit l'action d'une cascade enzymatique complexe faisant intervenir des enzymes de la famille des cytochromes P450 **(Figure 6)**. Trois œstrogènes sont produits naturellement chez la femme. Le 17β-œstradiol (œstradiol ou E_2) est produit au niveau des ovaires chez les femmes non ménopausées. Il constitue l'œstrogène le plus actif car il possède la meilleure affinité pour les récepteurs des œstrogènes : la constante de dissociation de l'E_2 pour l'ERα et l'ERβ est égale à $4.04.10^{-10}$ M et $7,98.10^{-10}$ M, respectivement (Usami *et al*., 2002). Sa concentration dans le sang varie de 40 à 400 pg/mL en fonction du cycle menstruel. Après la ménopause, le taux d'œstradiol circulant ne dépasse pas 20 pg/mL. L'œstrone (E_1), moins actif que l'œstradiol est un de ses métabolites. Il peut également être produit directement par conversion de l'androsténedione dans le tissu adipeux. Chez les femmes ménopausées, l'ovaire cesse de produire de l'œstradiol mais l'hypophyse continue à fabriquer de l'androsténedione, précurseur de l'œstrone, et de ce fait le taux d'œstrone circulant reste inchangé. Le troisième œstrogène est l'œstriol (E_3) qui est aussi un métabolite de l'E_2. L'œstriol est le principal œstrogène produit par le placenta durant la gestation mais il est retrouvé en plus faible quantité que l'œstradiol et l'œstrone chez les femmes non gestantes (Ruggiero *et al*., 2002). Les œstrogènes agissent principalement par 2 types de récepteurs nucléaires: les récepteurs des œstrogènes alpha (ERα) et bêta (ERβ).

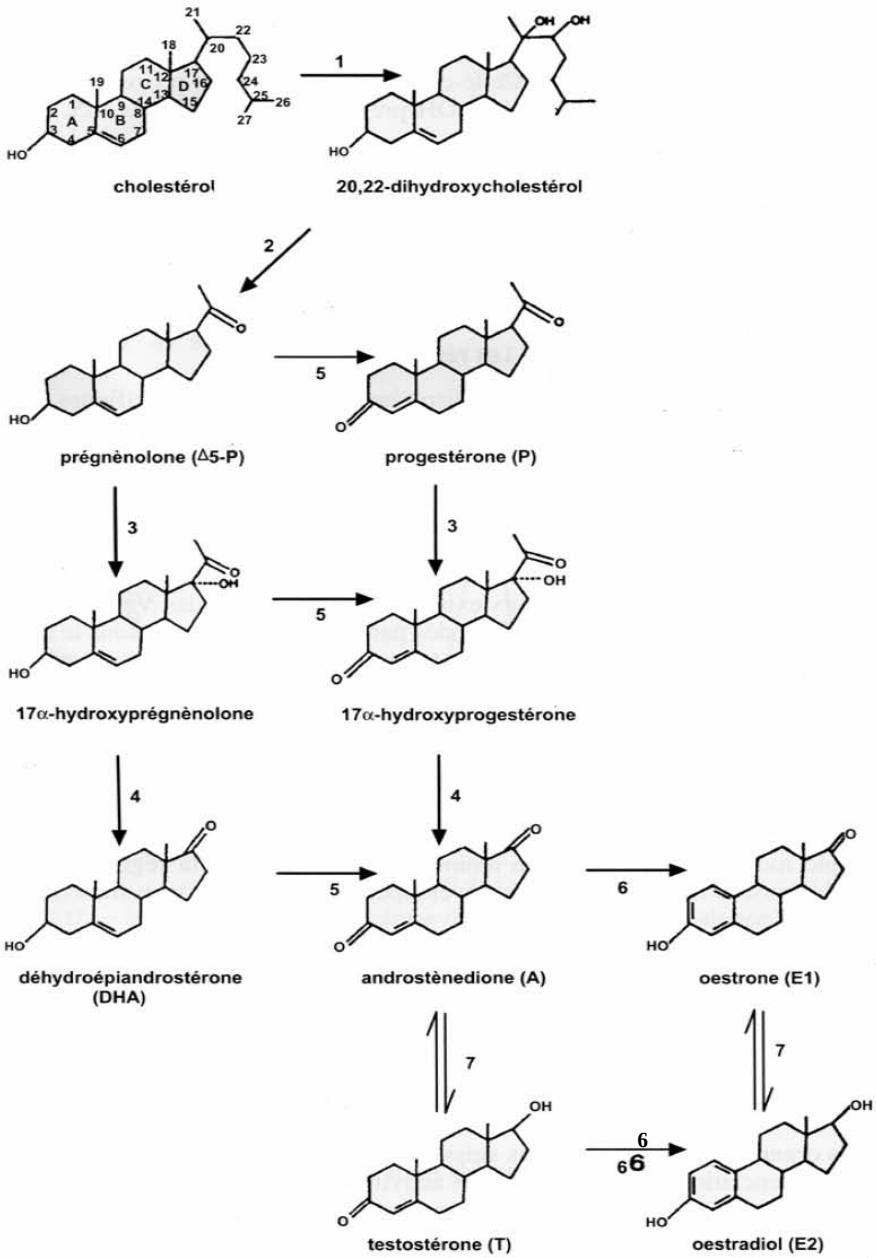


Figure 6 : Cascade enzymatique de la biosynthèse des œstrogènes à partir du cholestérol. 1,2 : cytochrome P450scc; 3,4 : cytochrome P45017α; 5 : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase (3β-HSD); 6 : cytochrome P450 aromatase; 7 : 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase (17β-HSD).

II. Les Récepteurs des œstrogènes

2.1. Distribution tissulaire

Dans les tissus, bien que souvent co-exprimés, ERα et ERβ présentent aussi une expression différentielle (Balfe *et al.*, 2004). ERα est surtout présent dans l'utérus, le foie, les reins et le cœur. ERβ est très exprimé dans l'ovaire, la prostate, les poumons, l'appareil digestif, la vessie, les systèmes immunitaire et nerveux. ERα et ERβ sont coexprimés dans la glande mammaire, l'épididyme, la thyroïde, la glande surrénale, les os et certaines régions du cerveau. Enfin, ERβ est exprimé lors du développement de l'utérus et de l'hypophyse et ERα est ensuite exprimé dans le tissu mature (Matthews *et al*., 2003).

2.2. Rôles

Les récepteurs des œstrogènes influencent de nombreux processus physiologiques chez les mammifères comme ceux impliqués dans la reproduction, les maladies cardio-vasculaires, le développement osseux, la cognition, le comportement. Etant donné leurs nombreux rôles, il n'est pas surprenant que les récepteurs des œstrogènes soient aussi impliqués dans le développement de nombreux cancer comme le cancer du sein, des ovaires, de l'utérus ou de la prostate, ou dans d'autres maladies comme l'ostéoporose, les maladies cardio-vasculaires ou neurodégénératives, ou l'obésité (Pearce & Jordan, 2004).
Les ER, en particulier ERα, sont fortement impliqués dans le développement tumoral mammaire. Ce point sera développé dans un prochain paragraphe.

III. Le récepteur ERα

3.1. Le gène codant ERα

3.1.1. Organisation génomique

Localisé sur le bras long du chromosome 6, le gène ESR1 contient 8 exons qui représentent environ 140 kb. La comparaison de la séquence de l'ADNc de ERα humain avec celle du poulet, du rat ou encore de la souris montre un haut niveau de conservation entre ces espèces

excepté pour l'extrémité 5'. Cependant, l'analyse d'autres membres de la famille des récepteurs nucléaires indique que la présence de multiples promoteurs est une caractéristique commune des récepteurs des hormones stéroïdiennes. Ainsi, de nombreux exons situés en amont de l'exon 1 et correspondant à une région 5' non traduite de l'ARNm de ERα ont été identifiés **(Figure 7)**. Ils sont au nombre de 8 et sont nommés A, B, C, D, E, F, T1 et T2. Il existe également sept promoteurs différents situés en amont de chacun des exons (1 seul promoteur pour les exons T1 et T2). La traduction des différents variants d'ARNm est initiée au niveau d'un site commun d'épissage situé approximativement à 163 pb en amont de l'exon 1, et la traduction des différents variants engendre une protéine unique (Flouriot *et al*., 1998 ; Kos *et al*., 2001).

3.1.2. Les différents variants et isoformes d'ARNm

En plus des variants correspondant à l'utilisation différentielle des sept promoteurs, des variants issus d'épissage alternatif sont détectés dans de nombreux tissus normaux tels que le sein, l'endomètre ou encore l'hypophyse. De tels variants sont également trouvés dans de nombreuses variétés de tumeurs incluant les tumeurs mammaires, les carcinomes de l'endomètre et les méningiomes. Bien que beaucoup de ces variants aient été majoritairement détectés dans les tissus cancéreux, les études réalisées ont été incapables de démontrer une différence dans leur niveau d'expression par rapport aux tissus sains suggérant que ces variants pourraient aussi jouer un rôle dans les processus physiologiques. Les variants les plus retrouvés sont ceux présentant une délétion des exons 2, 3, 4, 5, 6 ou 7. Leur traduction engendre pour la plupart des protéines tronquées (Ascenzi *et al*., 2006) **(Figure 8).** En plus des variants délétés d'un seul exon, des variants présentant des délétions multiples ou partielles ont été également identifiés, notamment dans les tissus cancéreux mammaires. Des duplications d'exons ou des insertions sont également possibles (Herynk & Fuqua, 2004). Même si la plupart des tumeurs mammaires expriment les variants de ERα, l'isoforme sauvage reste la forme prédominante (Zhang *et al*., 1996).

3.1.3. Expression et régulation de ERα dans la tumeur mammaire

L'expression de ERα est significativement modifiée durant le développement du cancer du sein et de ce fait, les mécanismes qui régulent le taux d'ARNm de ERα ont été bien étudiés. Il a été

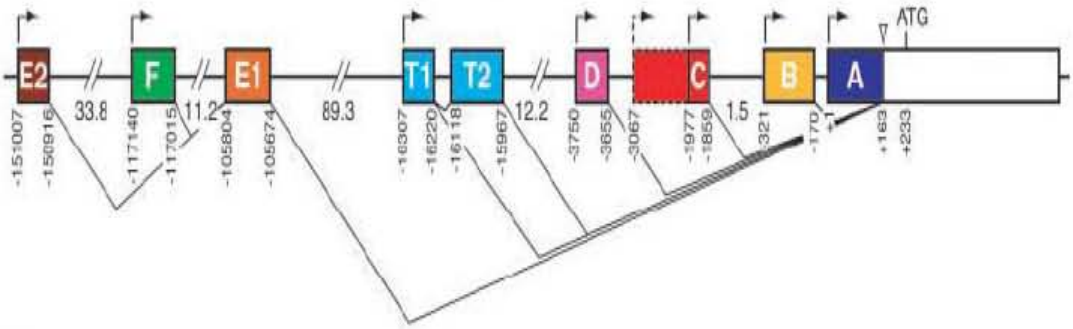


Figure 7: Organisation génomique de la région promotrice du gène ERα humain. Les rectangles colorés représentent les différents exons selon la nomenclature actuelle. Les nombres situés en dessous des exons indiquent leur distance par rapport au premier site de début de la transcription (+1). Les nombres situés entre les exons indiquent la taille des introns en kilo paire de bases. Le site commun accepteur d'épissage est indiqué par un triangle (d'après Kos *et al*., 2001).

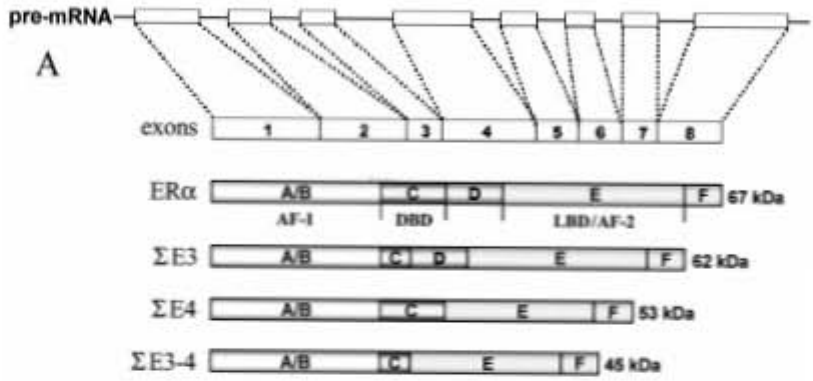


Figure 8. Les isoformes de ERα. Le pré-ARNm de ERα contient 8 exons séparé par de longs introns. Les isoformes Σ E3, Σ E4 et Σ E3-4 sont délétées des exons 3 et 4. (Ascenzi *et al*., 2006)

montré que dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, les promoteurs A et C sont utilisés alors que dans les cellules ZR-75-1 seul le promoteur A est exploité. D'autres études montrent une plus grande utilisation du promoteur B dans le sein normal et le tissu utérin (Grandien *et al*., 1995). Par ailleurs, une utilisation différentielle du promoteur C dans les cellules mammaires normales et cancéreuses a été démontrée (Kos *et al*., 2001). Globalement, les promoteurs situés à 2 kb en amont du site d'épissage commun (promoteurs A, B et C) sont majoritairement utilisés dans les lignées cellulaires et tissus exprimant des taux élevés de ERα, alors que les promoteurs les plus éloignés (E et F) sont utilisés dans les tissus où ERα est peu abondant tels que le foie ou les os (Herynk & Fuqua, 2004). Néanmoins, certains promoteurs semblent être utilisés dans tous les tissus et même dans les tissus pour lesquels un promoteur spécifique a été décrit. Il est donc possible que les promoteurs qui sont actifs dans tous les tissus, produisent un taux basal d'ARNm de ERα et que les promoteurs tissus spécifiques augmentent le taux d'expression de ERα en accord avec les besoins de la cellule (Kos *et al*., 2001).

Les mécanismes responsables de la surexpression de ERα observée dans les tumeurs mammaires sont complexes et font intervenir des activateurs et des répresseurs qui ne sont pas tous clairement identifiés. Cependant, deux facteurs de transcription appelés ERF-1 et ERBF-1 ont été mis en évidence. Ils activent la transcription via leur fixation sur les promoteurs A et C, respectivement (Pinzone *et al*., 2004). ERBF-1 est par ailleurs exclusivement exprimé dans les cellules exprimant des transcrits ERα issus du promoteur C dont les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et T-47D (Tanimoto *et al*., 1999 ; Hayashi *et al*., 2003). Une autre séquence activatrice a été identifiée approximativement à 3700 pb du site de début de transcription. Elle semble essentielle à la surexpression de l'ERα observée dans les cellules cancéreuses mammaires ER-positives. Cette séquence appelée ER-EH0 consiste en un site AP-1, liant les protéines c-fos et c-jun, et en une séquence adjacente liant d'autres facteurs encore inconnus (Tang *et al*., 1997). Enfin, un facteur de transcription appelé AP2γ membre de la famille des facteurs de transcription AP-2, est également impliqué dans la surexpression de l'ERα observée dans les tumeurs mammaires (Turner *et al*., 1998).

Le niveau d'expression de ERα dans les tumeurs mammaires est également régulé par des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, la condensation de la chromatine des régions promotrices via une hyperméthylation ou une acétylation entraînant une diminution du taux d'ARNm de ERα (Pinzone *et al*., 2004).

L'exposition aux œstrogènes joue aussi un rôle dans l'expression de ERα mais les mécanismes moléculaires de cette autorégulation ne sont pas clairement établis. La présence d'éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) dans certaines régions promotrices du gène de ERα pourrait expliquer cette observation (Denger *et al*., 2001). Enfin le facteur de transcription AP-2γ est surexprimé en présence d'œstrogènes et ceci grâce à la présence d'un ERE consensus et d'un ERE dégénéré dans sa région promotrice (Orso *et al*., 2004).

3.2. Structure du récepteur ERα

Le récepteur alpha des œstrogènes est composé de 595 acides aminés et sa masse moléculaire est d'environ 65000 Daltons. L'utilisation de récepteurs chimères entre le récepteur des œstrogènes et celui des glucocorticoïdes, et l'analyse de mutants ont permis de diviser sa séquence en 6 domaines fonctionnels notés A à F **(Figure 9)**.
Les domaines amino-terminaux A et B possèdent un domaine de transactivation appelé fonction d'activation 1 (AF-1) qui contient une fonction d'activation ligand-indépendante ainsi que de nombreux sites de sumoylation et de phosphorylation. Le domaine AF-1 présente la plus grande variabilité parmi les récepteurs stéroïdiens. La région A/B contient également un domaine de corégulation qui peut lier des coactivateurs et des corépresseurs et ainsi modifier l'activité transcriptionnelle.

Le domaine central C contient le domaine de fixation à l'ADN (DBD) composé de deux motifs en doigts de zinc. Le premier motif appelé P-box (Proximal box) est responsable de la fixation spécifique du récepteur aux éléments de réponse aux œstrogènes (ERE). Les ERE sont constitués d'une séquence palindromique en répétition inversée de 13 paires de bases contenant 3 paires de bases de nature variable (Gruber *et al*., 2004) **(Figure 10)**. Le second motif du doigt de zinc appelé D-box (Distal box) est impliqué dans la dimérisation.

Le domaine D, appelé région charnière, contient une partie du domaine de transactivation AF-2a et une portion du signal de localisation nucléaire ainsi que des sites de sumoylation et d'acétylation.

Les domaines carboxy-terminaux E et F contiennent le domaine de fixation au ligand ou LBD (Ligand Binding Domain). Le LBD contient lui-même le domaine de transactivation AF-2 présentant une fonction d'activation ligand-dépendante. Le domaine LBD des récepteurs nucléaires adopte un repliement communément appelé sandwich d'hélice α anti-parallèles. Le

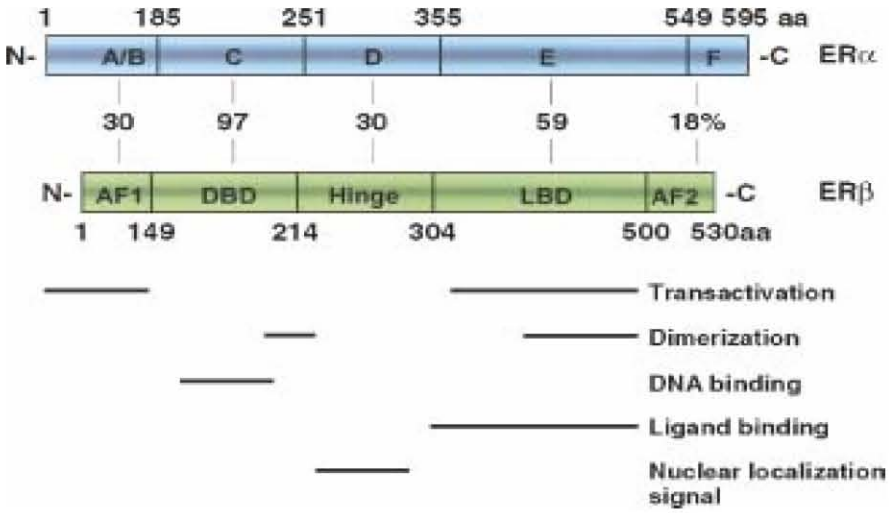


Figure 9. Domaines fonctionnels (A à F) des protéines ERα et ERβ. Le pourcentage de similarité en acides aminés entre les 2 récepteurs est représenté ainsi que la fonction de chaque domaine (Speirs & Walker,2007).

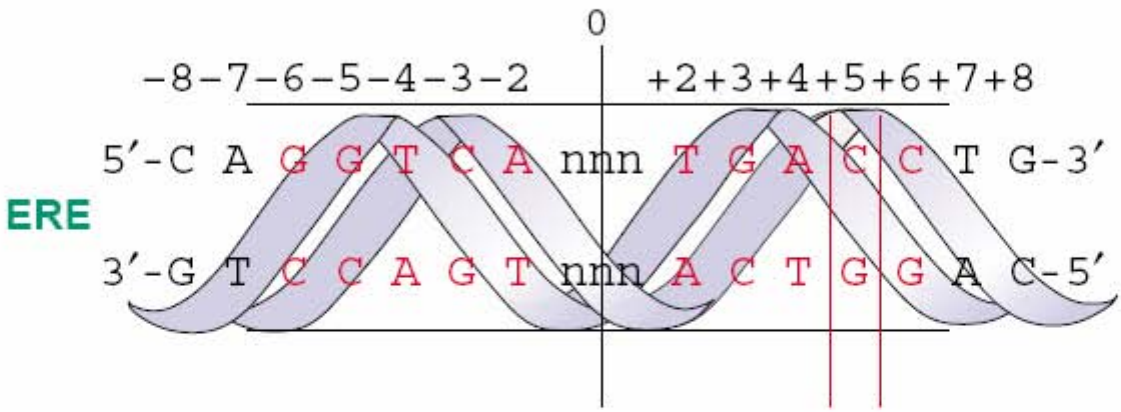


Figure 10. Séquence consensus de l'élément de réponse aux oestrogènes (ERE) dérivant des gènes de la vitellogènine A1, A2, B1 et B2 de *Xenopus laevis*. Il s'agit d'une séquence palindromique en répétition inversée de 13 paires de bases présentant un espace de 3 paires de bases variables (en rouge)(d'après Gruber *et al*., 2004).

LBD des ER est composé de 12 hélices α arrangées en trois couches formant une poche hydrophobe permettant la fixation du ligand: la couche centrale, constituée de trois hélices α (H5-6, H9 et H10), est prise en sandwich entre 2 couches additionnelles d'hélice α (H1-4, H7, H8 et H11). La géométrie de l'hélice H12, qui contient le domaine AF-2, est variable selon la présence ou l'absence d'E_2. En présence d'E_2, H12 se referme sur la cavité de fixation et vient se plaquer contre les hélices H3, H5-6 et H11. H12 n'établit pas de contact direct avec l'E_2 et son positionnement est nécessaire pour le recrutement de co-activateurs. Les co-activateurs interagissent avec les résidus des H3, H4, H5 et H12 **(Figure 11).**

Les résidus cystéine du LBD des ER jouent un rôle important dans la fixation des ligands. En particulier la Cys530 impliqué dans la fixation de l'E_2 et les Cys381 et Cys417, qui eux, sont impliqués dans la reconnaissance des anti-oestrogènes (Ascenzi *et al*., 2006).

La région E/F est aussi impliquée dans la dimérisation du récepteur et la fixation de protéines corégulatrices et de protéines chaperonnes telles que les protéines de choc thermique Hsp70 et Hsp90 (Sommer *et al*., 2001 ; Herynk & Fuqua, 2004).

IV. Le récepteur ERβ

4.1. Le gène codant ERβ

4.1.1. Organisation génomique

L'organisation du promoteur du gène ERβ n'est pas clairement établie. Chez l'homme, le gène ESR2 est localisé sur le chromosome 14 et s'étend sur une longueur de 61,2 Kb. Il comporte 2 promoteurs nommés 0N et 0K (Hirata *et al*., 2001). La protéine ERβ est produite à partir des 8 premiers exons. Le récepteur ERβ a d'abord été identifié dans la prostate du rat puis cloné chez la souris et l'Homme (Kuiper *et al*., 1996 ; Mosselman *et al*., 1996 ; Tremblay *et al*., 1997). L'exon supplémentaire cx, du côté 3' est contenu dans l'isoforme ERβ2/cx (Kuipper *et al*., 1996) **(Figure 12)**.

Figure 11. Structure tri-dimensionnelle du complexe LBD-E_2 du récepteur ERα.
Les hélices α sont représentées en violet, les feuillets β en vert, et l'hélice H12 en bleu.
Les atomes de l'E_2 sont représentés en blanc et rouge (Ascenzi *et al*., 2006).

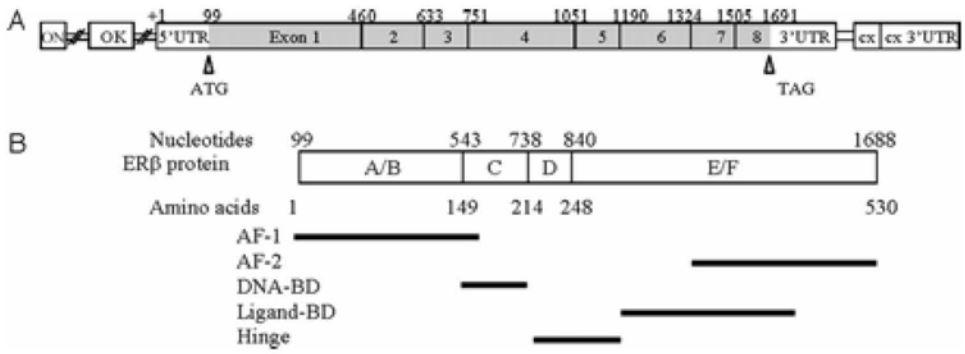


Figure 12. A. ARN messager de ERβ. Les promoteurs alternatifs sont montrés à gauche du site d'inititation de la transcription (+1). Les rectangles foncés correspondent aux régions codantes. Les exons sont numérotés de 1 à 8 et délimités par les nucléotides inscrits entre les exons. ATG représente le codon start et TAG le codon stop. **B.** Domaines fonctionnels de la protéine ERβ. Les domaines sont notés de A à F. Les chiffres au dessus correspondent aux nucléotides délimitant les exons qui codent chaque domaine. Les acides aminés sont numérotés en dessous (Herynk & Fuqua, 2004)

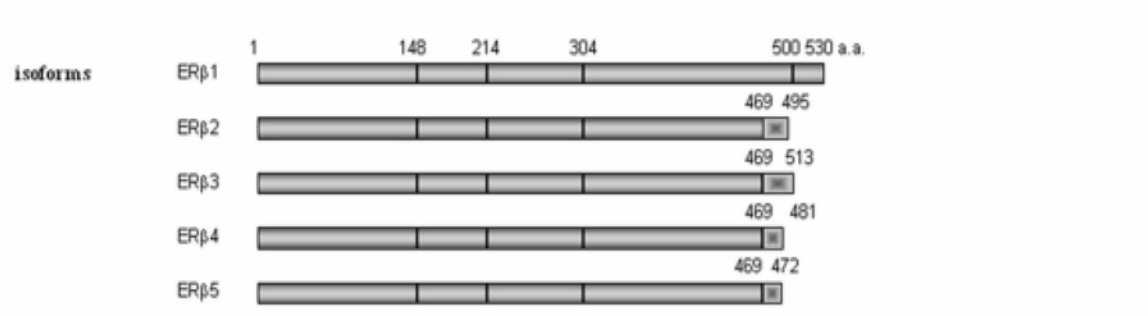


Figure 13. Isoformes de ERβ**.** Le rectangle ombré indique la divergence de la région C terminale de chaque isoforme. Les nombres d'acides aminés constituant chaque isoforme et chaque domaine sont indiqués au dessus (Zhao *et al*., 2008).

4.1.2. Les différentes isoformes d'ARNm

Chez l'Homme, 5 transcrits ont été décrits et notés ERβ1 à 5. La forme ERβ1 (appelée ERβ) contient 8 exons et correspond, après traduction, à la protéine de type sauvage de 530 acides aminés et de 59,2 KDa. Les autres transcrits sont constitués des exons 1 à 7 mais ils possèdent des séquences uniques à la place de l'exon 8 (Moore *et al*., 1998). Ils divergent à partir de l'acide aminé 469 à l'intérieur du LBD jusqu'à l'extrémité C terminale. Le variant ERβ2/cx code une protéine de 55,5 KDa constituée de 495 acides aminés. Le domaine AF-2 est absent et cette forme n'a donc pas d'affinité pour les œstrogènes. Cependant, une étude a montré que ERβ2/cx inhibe l'activité transcriptionnelle de ERα induite par les ligands sur une construction plasmidique contenant un ERE (Ogawa *et al*., 1998). Des études *in vitro* ont montré que les protéines ERβ4 et ERβ5 peuvent s'hétérodimériser avec ERβ1 et stimuler sa transactivation de façon dépendante du ligand. L'expression de ERβ3 est limitée aux testicules (Moore *et al*., 1998) **(Figure 13)**.

4.2. Structure du récepteur ERβ

ERβ et ERα possèdent des structures similaires avec une forte homologie entre les domaines DBD et LBD. Le domaine A/B est le moins conservé puisque le pourcentage d'homologie est de 20% ce qui montre que ce domaine contribue à l'action spécifique de chaque récepteur sur les gènes cibles dans un type cellulaire donné. En effet, une étude rapporte que la région AF-1 du domaine A/B de ERα permet une stimulation d'un gène rapporteur contenant un ERE dans différentes lignées cellulaires tandis que l'activité de AF-1 de ERβ est négligeable dans ces mêmes lignées (Nilsson *et al*., 2001).
Le domaine DBD de la région C est hautement conservé entre ERα et ERβ avec 97% d'homologie en acides aminés.

Les domaines LBD de la région E/F de ERα et ERβ ont des structures tridimensionnelles très similaires. Cependant, la cavité de fixation du ligand de ERβ est plus petite (environ 20%) que celle de ERα.

Les ER agissant comme facteurs de transcription, leur localisation dans les cellules est essentiellement nucléaire. Cependant, il a été montré que les ER pouvaient être présents dans la membrane plasmique. En effet, des cellules endothéliales issues de souris KO pour ERα et

ERβ ne présentent ni forme nucléaire ni forme membranaire alors que les cellules sauvages expriment les 2 isoformes de ER dans les 2 compartiments (Razandi *et al*., 2004). La localisation membranaire des ERα et ERβ ne représente que 5% de la localisation totale des récepteurs. Ces récepteurs membranaires sont issus des mêmes gènes codant les récepteurs nucléaires et sont donc identiques (Matthews *et al*., 2003) **(Figure 9).**

V. Modifications post-traductionnelles des ER

Différents types de modifications post traductionnelles des récepteurs des œstrogènes ont été rapportées. Parmi elles, la phosphorylation et l'ubiquitination sont les mécanismes les plus importants par lesquels l'activité des récepteurs est régulée.

5.1. Phosphorylation

ERα et ERβ sont des phosphoprotéines. Les phosphorylations concernent les résidus sérine et tyrosine des ER. La phosphorylation de ERα a lieu en réponse à une stimulation à l'E_2 mais l'existence d'une activation de ERα par phosphorylation de manière indépendante du ligand a été mise en évidence (voir paragraphe 6.2.2). La phosphorylation de ERβ suite a une stimulation par l'E_2 n'a pas été caractérisée mais l'activation de la voie MAPK augmente la phosphorylation du récepteur.

ERα est phosphorylé sur les Ser104, Ser106, Ser118, Ser137, Ser167, localisées dans le domaine AF-1 de la région A/B, et la Ser236 localisée dans le domaine DBD de la région C. Le résidu Tyr537 situé dans le domaine LBD de la région E est aussi phosphorylé. En réponse à l'E_2, ERα est préférablement phosphorylé sur la Ser118. La phosphorylation des résidus sérine du domaine AF-1 influence le recrutement de co-activateurs. La phosphorylation de la Ser236 n'est pas impliquée dans l'activation de la transcription via ERα. La phosphorylation de la Tyr537 joue un rôle dans la fonction de AF-2 et permet la fixation du domaine SH2 de Src (Ascenzi *et al*., 2006). La Ser87 du domaine A/B de ERβ correspond à la Ser118 de ERα **(Figure 14).**

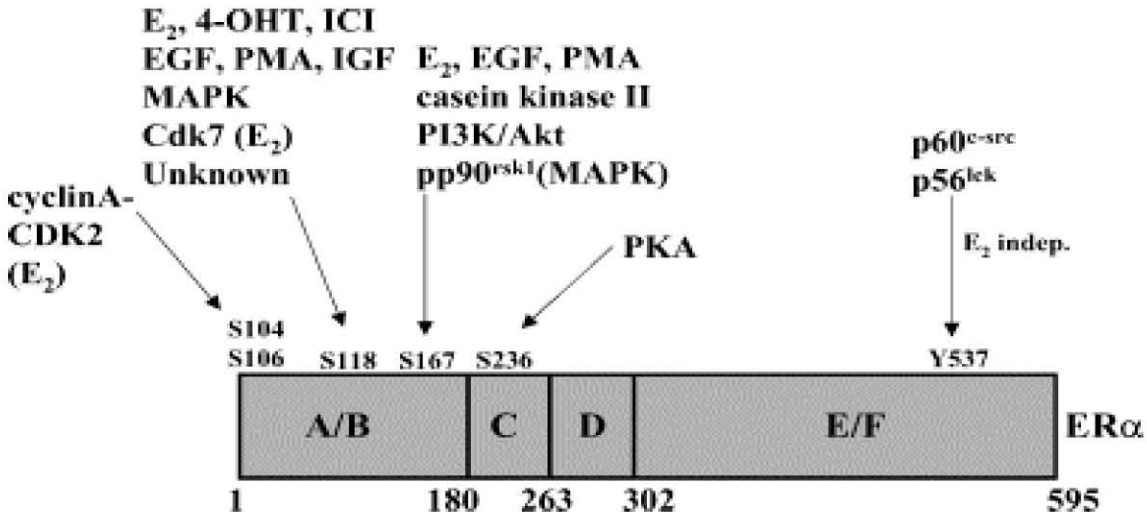


Figure 14. Les différents sites de phosphorylation de ERα (Pearce & Jordan, 2004)

5.2. Ubiquitination

Comme de nombreux composés cellulaires, les protéines sont renouvelées en permanence, c'est-à-dire que parallèlement à la synthèse il existe des processus de dégradation. Quatre types d'enzymes protéolytiques sont impliquées dans la dégradation des protéines : les caspases qui sont actives dans les mécanismes de l'apoptose, les calpaïnes (enzymes Ca^{2+} -dépendantes et ATP-indépendantes qui dégradent principalement les protéines membranaires, celles du cytosquelette et certains facteurs de transcription), les cathepsines qui se situent dans les lysosomes. Le dernier système est constitué d'un complexe enzymatique appelé système protéolytique ubiquitine-protéasome 26S qui dégrade la majorité des protéines.

5.2.1. Structure du protéasome 26S

Le protéasome 26S dégrade les conjugués polyubiquitinés. Il est constitué d'un cœur catalytique, le protéasome 20S, porteur des activités peptidasiques et protéolytiques, et de deux complexes régulateurs 19S, régulant ces activités (Attaix *et al*., 2001). Les sous unités 19S flanquent l'une ou les deux extrémités du protéasome 20S. Il est constitué d'au moins 17 sous-unités différentes, dont 6 sous-unités ATPasiques qui forment un anneau hexamérique interragissant avec le protéasome 20S. Les sous unités 19S sont responsables de la reconnaissance des protéines destinées à être dégradées. L'autre fonction de ces sous unités est de déplier les protéines destinées à la dégradation. En effet, les diamètres du conduit d'entrée (1 nm) et de la chambre interne (5 nm) ne permettent pas au protéasome 20S d'encapsuler des protéines natives. Les protéines doivent donc être dépliées avant de pénétrer dans la particule 20S : ce dépliement des protéines reconnues par les sous unités 19S est réalisé par les sous-unités ATPasiques grâce à l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP. Ces ATPases sont également responsables de l'ouverture de la barrière qui ferme l'entrée du protéasome 20S et de l'injection des protéines dépliées dans la chambre protéolytique.

Le protéasome 20S est la protéase neutre la plus abondante connue à l'heure actuelle (environ 1% des protéines solubles). Il est majoritairement présent dans le cytoplasme et le noyau, mais est également associé au réticulum endoplasmique où il dégrade les protéines anormales immédiatement après leur biosynthèse. Le protéasome 20S est composé de 14 sous-unités différentes assemblées en quatre anneaux comportant chacun 7 sous-unités. Les deux anneaux internes, constitués de sous-unités β, portent les sites actifs responsables des activités protéolytiques et peptidasiques. Les anneaux externes sont formés de sous-unités α sur

lesquelles se lient différents complexes régulateurs du protéasome 20S (Attaix *et al*., 2001). L'empilement de ces anneaux délimite deux antichambres et une chambre catalytique centrale renfermant au moins cinq activités peptidasiques de type trypsine, chymotrypsine et peptidylglutamyl peptide hydrolase, ou clivant préférentiellement les liaisons peptidiques après un acide aminé à chaîne ramifiée ou un petit acide aminé neutre. Le protéasome 20S est donc virtuellement capable d'hydrolyser la plupart des liaisons peptidiques. C'est une protéase auto-compartimentée, car l'assemblage des sous-unités α en anneau forme un pore central de très faible diamètre. Les anneaux α constituent une barrière physique limitant l'accès des substrats à la chambre protéolytique délimitée par les anneaux β. Cette architecture complexe prévient l'hydrolyse incontrôlée des protéines intracellulaires. En effet, pour être dégradé le substrat devra être dénaturé avant d'accéder à la chambre catalytique. De plus, le confinement des sites peptidasiques dans un nanocompartiment permet l'hydrolyse rapide des substrats en peptides comprenant entre 3 et 20 acides aminés et donc peu susceptibles de conserver une activité biologique **(Figure 15)**.

5.2.2. Le système d'ubiquitination

L'ubiquitine est une petite protéine (76 acides aminés) dont la séquence est hautement conservée chez les eucaryotes. Elle se fixe de façon covalente aux protéines cibles par une liaison isopeptidique entre le groupement COOH de sa glycine C-terminale et le groupement NH2 d'un résidu lysine du substrat. L'ubiquitination des substrats est réalisée par une série de réactions mettant en jeu plusieurs familles d'enzymes. Schématiquement, l'ubiquitine est d'abord activée par l'enzyme E1, puis transférée sur l'une des enzymes de conjugaison de l'ubiquitine, E2. Ces enzymes E2 catalysent la liaison de l'ubiquitine aux substrats protéiques soit directement, soit en présence d'une ubiquitine protéine ligases E3, qui reconnait les protéines cibles. Toutes les réactions impliquant E3 conduisent à la formation de conjugués polyubiquitinés, l'ubiquitine se fixant généralement sur le résidu lysine 48 de l'ubiquitine précédemment liée au substrat (Pickart., 2001).

Le protéasome 26S ne reconnaît que les protéines marquées par une chaîne de polyubiquitine comprenant au moins 4 molécules d'ubiquitine. Les substrats polyubiquitinés doivent avoir perdu leur conformation native pour être reconnus par le protéasome 26S. La base du complexe 19S et/ou des protéines chaperonnes extra protéasomales seraient impliquées dans ces altérations de conformation. Le complexe 19S contient également un ou plusieurs sites responsables de la reconnaissance des protéines mal conformées ou partiellement dénaturées,

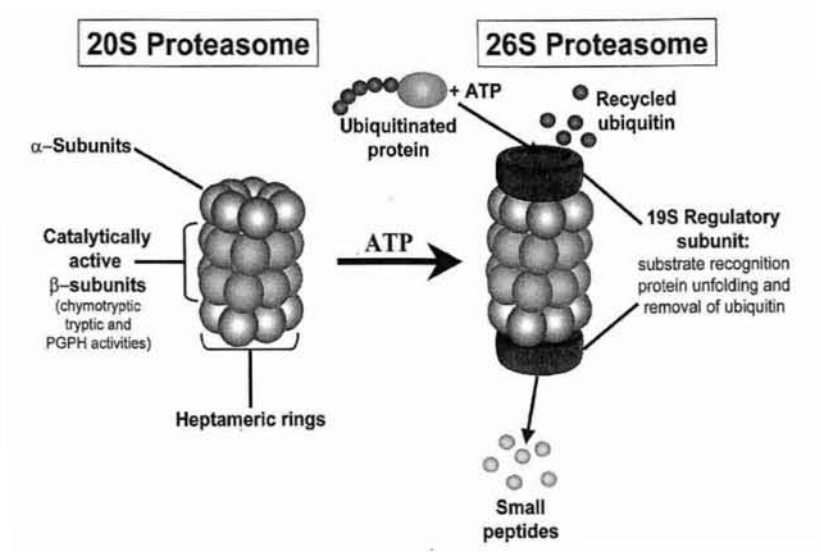


Figure 15. Structure et activité du protéasome 26S. Le cœur catalytique appelé protéasome 20S est coiffé par les sous-unités régulatrices 19S. L'ensemble constitue le protéasome 26S. Les protéines sont hydrolysées à l'intérieur du cœur 20S. Les sous-unités régulatrices 19S permettent la reconnaissance et le passage des protéines polyubiquitinées dans le cœur 20S (http://www.benbest.com).

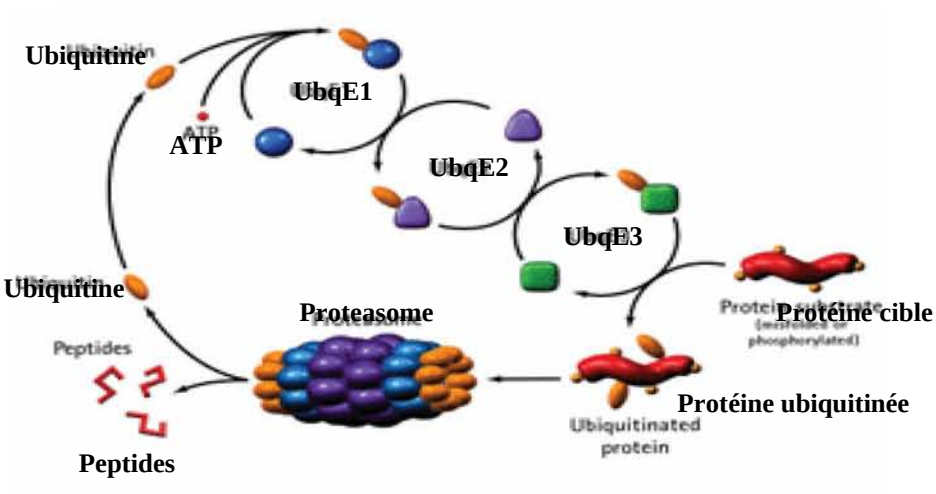


Figure 16. Dégradation des protéines par le protéasome 26S. La protéine cible est liée de façon covalente à des molécules d'ubiquitine (Ub) transportées par un système multi-enzymatique ATP-dépendant (E1, E2 et E3). La protéine ubiquitinée est reconnue par le protéasome 26S puis dégradée en peptides. L'ubiquitine est ensuite recyclée. (http://www.emdbioscence.com)

indépendamment de leur état d'ubiquitination (Thrower *et al*., 2000 ; Strickland *et al*., 2000) **(Figure 16).**

5.2.3. Dégradation de ERα par le protéasome

De nombreuses études se sont focalisées sur l'implication du protéasome dans la dégradation des récepteurs des œstrogènes et plus particulièrement sur ERα. A la fin des années 60, les premières études sur la dégradation de ERα ont montré qu'un traitement à l'E_2 réduisait de facon significative le taux ERα dans l'utérus de ratte ayant subi une ovariectomie (Jensen *et al.*, 1969). Plus récemment, il a été mis en évidence que ERα est dégradé en présence ou en absence d'E_2 par 2 mécanismes différents. Tous 2 convergent vers une dégradation dépendante du protéasome 26S qui peut être bloquée par des inhibiteurs de protéasome comme le MG132 ou la lactacystine (Ascensi *et al*., 2006). Dans les cellules MCF-7, il a été établi que l'ubiquinitation de ERα en absence de ligand est médiée par une ubiquitine ligase de type E3 appelée CHIP (Carboxy terminus of Hsc70-Interacting Protein) qui est capable de distinguer la forme ERα liée à l'E_2 de la forme non liée. CHIP est principalement localisée dans le cytoplasme. En absence de ligand, ERα est associé entre autres aux protéines chaperonnes Hsp90 et Hsp70 qui stabilisent le récepteur. CHIP est qualifiée de molécule cochaperonne car elle interagit avec les protéines Hsp70 et Hsp90. Une étude par spectrométrie de masse a montré que ERα sans ligand interagit avec le complexe CHIP/Hsp90/Hsp70/Hsp40 et d'autres molécules cochaperonnes comme Bag1. Le complexe est alors dirigé vers le protéasome. Une fois ERα dégradé, CHIP lie des ubiquitines aux Hsp entraînant aussi leur protéolyse (Tateishi *et al*., 2004 ; Berry *et al*., 2008).

La fixation d'E_2 sur ERα diminue de façon significative sa stabilité. Dans ces conditions, ERα est rapidement dégradé via le protéasome. En effet, dans les cellules MCF-7, le taux de ERα diminue de 50% après seulement 3h de traitement avec l'E_2 (Horner-Glister *et al*., 2005). Il est possible que la fixation des œstrogènes à ERα induise la dissociation de CHIP et le recrutement d'autres ubiquitine ligases E3 (Tateishi *et al*., 2004) **(Figure 17).**

Une étude récente a démontré que la protéine BRCA1 est impliquée dans la dégradation de ERα via le protéasome. En effet, BRCA1 s'associe à la protéine BARD1. Le complexe possède une activité ubiquitine ligase de type E3 ciblant l'ERα en présence d'E_2 ou de tamoxifène (Eakin *et al*., 2007).

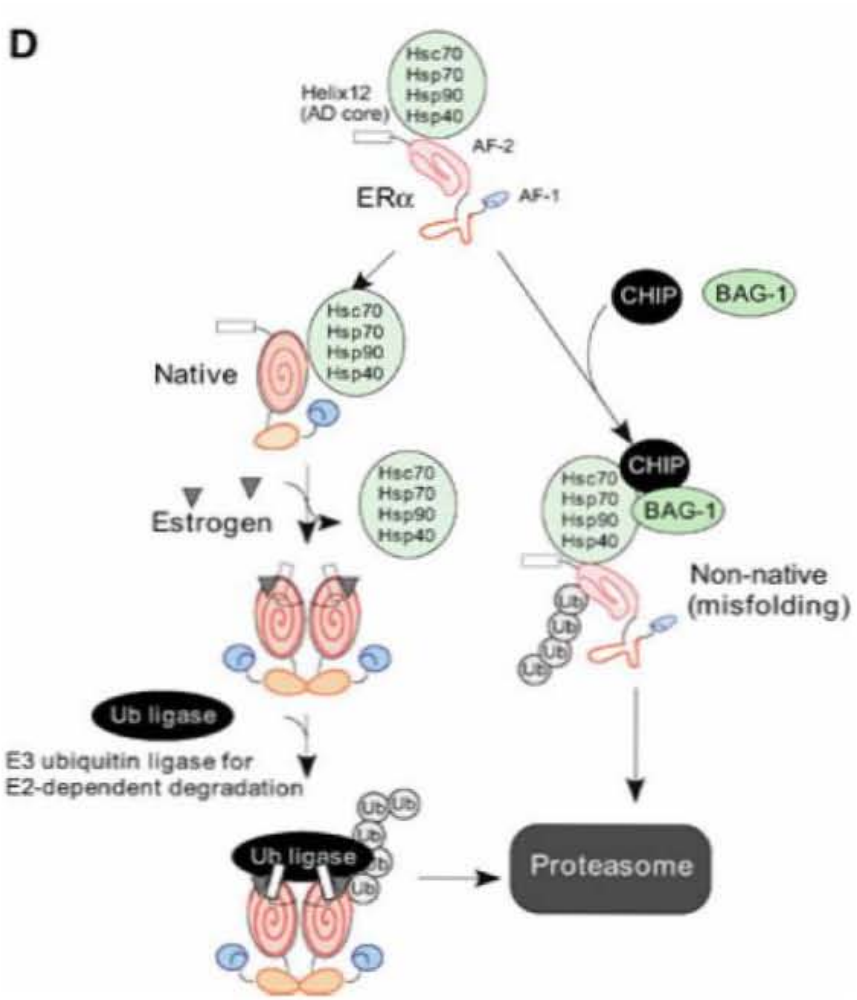


Figure 17. Dégradation de ERα selon deux modes d'ubiquinitation. En présence d'E_2, ERα est dégradé sans avoir recours à l'enzyme CHIP. En absence d'E_2, l'enzyme CHIP est associée au complexe de molécules chaperonnes et cochaperonnes. Ces 2 voies aboutissent à la dégradation de ERα via le protéasome 26S (Tateishi *et al*., 2004).

Par ailleurs, le tamoxifène, qui est un agoniste partiel de ERα, n'entraînent pas la diminution du taux de ERα mais plutôt sa stabilisation et donc son accumulation. Les antagonistes purs comme l'ICI 182,780 diminuent la stabilité de ERα et entraînent sa dégradation par le protéasome. Récemment, il a été établi que les résidus lysine K302 et 303 étaient des sites d'ubiquination en présence d'ICI 182,780 (Berry *et al*., 2008).

5.2.4. Dégradation de ERβ par le protéasome

Les études sur la dégradation de ERβ sont moins approfondies que pour ERα. Il existe une différence majeure entre les 2 récepteurs concernant leur protéolyse. En effet, la protéolyse de ERβ via le protéasome 26S a lieu uniquement en présence d'œstradiol. En absence d'E_2, le domaine F de la région C terminale de ERβ protège le récepteur de la dégradation en adoptant une conformation empêchant sa reconnaissance par les sous unités régulatrices du protéasome 26S. Lorsque l'E_2 se fixe à ERβ, la région C terminale change de conformation et l'effet protecteur du domaine F est aboli ce qui conduit à sa dégradation. Comme pour ERα, l'enzyme ubiquitine ligase CHIP est nécessaire à l'ubiquitination de ERβ (Tateishi *et al*., 2006) **(Figure 18).** De plus, le tamoxifène n'entraîne pas de dégradation de ERβ mais le stabilise (Horner-Glister *et al*., 2005).

5.3. Autres modifications post-traductionnelles

ERα et ERβ subissent d'autres modifications post-traductionnelles régulant leur activité transcriptionnelle comme :

► Acétylation : ERα est acétylé par CREB/p300 sur les résidus Lys266 et Lys 268 en présence d'E_2 et de SRC. L'acétylation n'affecte pas ERβ.
► Glycosylation : la glycosylation affecte de nombreuses protéines nucléaires, cytoplasmiques et membranaires pour permettre leur transport vers leur destination finale. Plusieurs résidus Asn de ERα et ERβ sont des sites potentiels de N-glycosylation.

► Myristoylation : elle consiste en l'ajout d'acide myristique sur les résidus Glycine de l'extrémité N terminale. Cette modification n'a été observée que sur ERα membranaire et peut être responsable de la translocation de l'E_2 de la membrane au noyau.

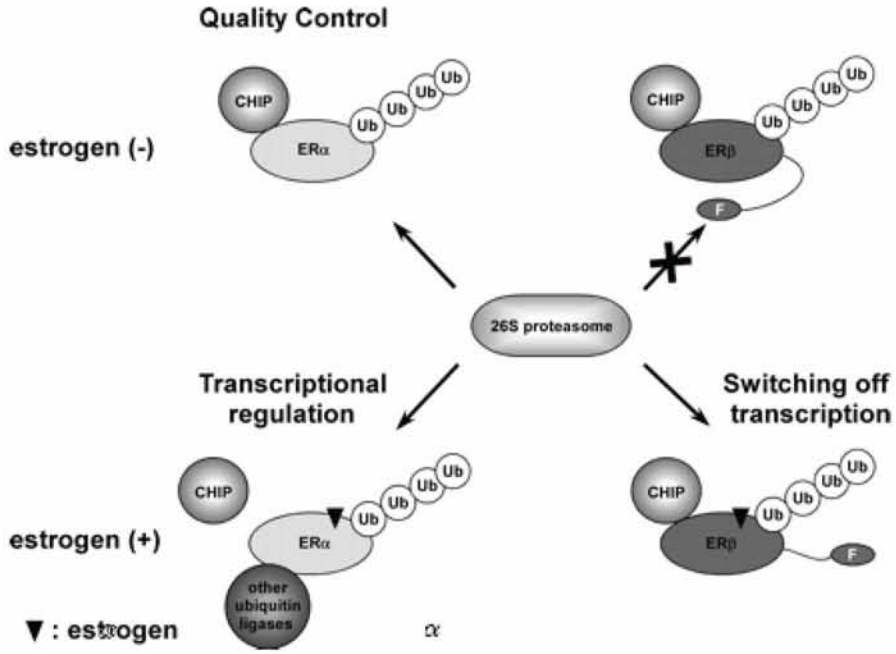


Figure 18. Représentation schématique de la dégradation de l'ERα et de l'ERβ. ERα est lié à CHIP en absence d'œstrogènes. Lorsque le ligand est fixé, CHIP est dissocié de l'ERα. L'ERβ est lié à CHIP en présence et en absence d'œstrogène. Sans E_2, la dégradation de l'ERβ ubiquitiné est inhibée par le domaine F. Lorsque les œstrogène se fixent à l'ERβ, la conformation du domaine F change permettant le recrutement du protéasome 26S (Tateishi *et al*., 2006).

► Nitrosylation : l'oxyde nitrique exerce ses actions dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques. La nitrosylation des résidus Cys formant les doigts de Zinc du domaine DBD de ERα entraîne une libération du zinc aboutissant à une diminution de la capacité de fixation de ERα sur l'ADN. La nitrosylation affecte aussi ERβ.

► Palmitoylation : elle consiste en l'ajout d'un acide palmitique (acide gras saturé en C16) via une liaison thioester sur un résidu Cys. Elle facilite les interactions protéines-membranes et protéines-protéines. La palmitoylation des ER a lieu dans le domaine LBD et elle est facilitée par la fixation de l'E_2.

► Sumoylation : ce processus consiste en la fixation de protéines SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifiers) sur les résidus Lysine du domaine D des ER. Les protéines SUMO sont structuralement peu différentes des ubiquitines. D'un point de vue biochimique, le processus de sumoylation est très proche de l'ubiquination mais il n'entraîne pas la dégradation des protéines cibles par le protéasome. La sumoylation régule le traffic intracellulaire, les interactions protéiques et l'activité transcriptionnelle des ER (Ascenzi *et al*., 2006).

VI. Mécanismes d'action des ER

Les récepteurs ERα et ERβ présentent des mécanismes d'activation transcriptionnelle similaires selon différentes voies : la voie dite génomique et la voie dite non génomique.

6.1. Régulation de la transcription par la voie génomique

La voie d'activation de la transcription dite génomique implique la fixation du ligand sur les ER, la dissociation des protéines de choc thermique (par exemple Hsp90) des ER et la dimérisation des récepteurs. Associés à des protéines co-activatrices, les dimères (ERα/ERα, ERβ/ERβ ou ERα/ERβ) interagissent de manière directe ou indirecte sur une séquence d'ADN située dans le promoteur de gènes cibles dont ils vont moduler la transcription. La séquence d'ADN sur laquelle les ER se fixent directement est appelée ERE (Estrogen Response Element). Lorsque les ER exercent leur action de manière indirecte, ils interagissent avec d'autres facteurs de transcription sur des séquences d'ADN appelées site AP-1 ou Sp-1 **(Figure 19).**

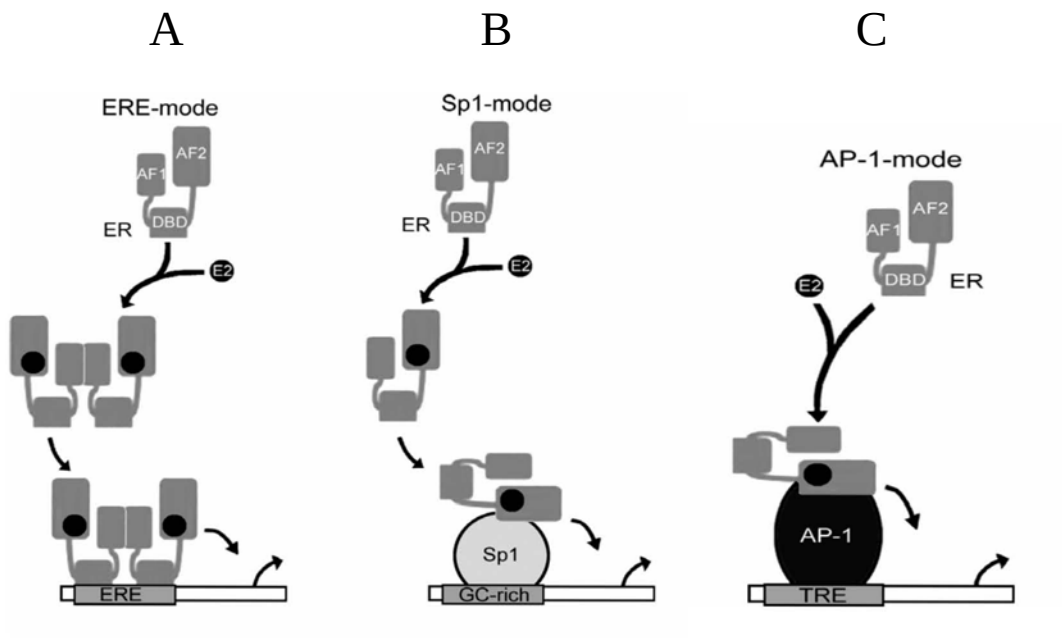


Figure 19. Représentation schématique des 3 modes par lesquels les ER modulent la transcription des gènes cibles. La voie classique en A représente l'interaction des ER avec un élément de réponse (ERE) consensus. Les 2 autres modèles (B et C) représentent les fixations indirectes des ER via des interactions avec des protéines sur les sites Sp-1 et AP-1 de l'ADN (Ascenzi *et al*., 2006).

6.1.1. Interaction directe des ER sur l'ADN : les ERE

L'élément de réponse des récepteurs des œstrogènes alpha et béta (ERE) est constitué de deux demi-sites (AGGTCA) configurés de façon palindromique et séparés par trois nucléotides (AGGTCAnnnTGACCT) **(Figure 10)**. Bien que le nombre de nucléotides séparant les deux demi-sites ne puisse varier, la séquence des demi-sites peut dévier de la séquence consensus. De plus, la présence d'un seul demi-site parfait est suffisante pour assurer la liaison du récepteur à l'ADN. Cette caractéristique rend difficile la localisation des ERE fonctionnels par l'inspection des séquences régulatrices de façon manuelle ou à l'aide d'outil bio-informatique.

Deux critères majeurs doivent être respectés pour s'assurer que la séquence régulatrice est une cible des récepteurs des œstrogènes. La région doit conférer la réponse à l'œstradiol à un promoteur hétérologue et il doit être démontré que le récepteur peut reconnaître cette région *in vitro* et préférablement *in vivo*. L'association directe du facteur de transcription à une région génomique se vérifie notamment par la méthode d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) dans des cellules vivantes. Plusieurs séquences régulatrices associées à des gènes cibles des ER ont été établies à l'aide de cette technique et l'examen de ces séquences démontre que plusieurs d'entre elles contiennent des ERE palindromiques classique, tels que *TFF1(pS2)*, *Cathepsine D*, *EBAG9*, *LTF* (lactoferrine), et *OXT* (ocytocine) alors que d'autres séquences régulatrices répondant à l'œstradiol ne contiennent que des demi-sites (par exemple le gène *SPP1*). La technique ChIP combinée à des puces à ADN (ChIP-chip) est un outil plus précis pour cartographier les sites de liaison de facteurs de transcription à l'échelle du génome humain. La puce (chip) peut être constituée de régions pouvant contenir des séquences régulatrices comme les ilôts riches en paires cytosine/guanine, des séquences directement en amont des sites d'induction de la transcription ou de potentielles séquences régulatrices prédites par des études bio-informatiques. L'analyse des données obtenues par cette méthode permet de localiser rapidement un très grand nombre de sites de liaison pour un facteur de transcription d'intérêt et elle a été utilisée pour détecter les promoteurs reconnus par l'ERα dans les lignées cancéreuses mammaires MCF-7, ZR-75-1 et T47D (Laganière & Giguère, 2006 ; Lin *et al*., 2004). L'expression des gènes cibles des récepteurs des œstrogènes dans la tumeur mammaire sera détaillée dans un chapitre suivant.

6.1.2. Interaction indirecte des ER avec l'ADN : les sites Sp1 et AP-1

Un troisième type de séquences ne contenant ni ERE consensus ni demi-site a été identifié comme un site permettant aux ER de s'associer indirectement à ces séquences par une interaction avec un autre facteur de transcription, notamment AP-1 et Sp1.

► Le site AP-1

Le complexe protéique AP-1 est un facteur de transcription constitué entre autres des proto-oncogènes *jun* et *fos*. Ce complexe se fixe sur le site AP-1 situé dans le promoteur de gènes cibles impliqués dans la croissance cellulaire, la différenciation et le développement. Une étude a établi que l'activité de fixation du complexe protéique sur le site AP-1 est augmentée dans les cellules MCF-7 résistantes aux antioestrogènes suggérant ainsi le rôle de ce complexe dans les cellules cancéreuses mammaires agressives (Dumont *et al*., 1996).

► Le site Sp1

La protéine Sp-1 (Specific Protein 1) fut le premier facteur de transcription identifié en 1980 (Dynan & Tjian, 1983). Il appartient à la famille Sp/KLF (Sp/Krüppel-like family) qui regroupe 25 facteurs de transcription. La particularité des membres de cette famille est de reconnaître des sites de fixation riches en bases GC dans le promoteur des gènes cibles de mammifères ou de virus. La protéine Sp1 est sur-exprimée dans les cellules cancéreuses mammaires ER positives et ER négatives et joue un rôle important dans la régulation des gènes dont l'expression dépend des œstrogènes (Mertens-Talcott *et al*., 2007).

6.1.3. Les co-régulateurs transcriptionnels des ER

Lorsque les ER agissent par la voie génomique directe ou indirecte, ces récepteurs nécessitent la présence de protéines co-régulatrices (co-activateurs ou co-répresseurs) de manière à former un complexe macro-moléculaire destiné à stimuler la transcription. Le domaine AF-2 des ER est le site cible pour le recrutement de ces co-activateurs (Smith & O'Malley., 2004).

6.1.3.1. Les co-activateurs

La stimulation de la transcription des gènes cibles des ER activés par leurs ligands n'est permise que par la capacité du récepteur à recruter une série de protéines co-activatrices. Les co-activateurs interagissent avec le récepteur et ne se fixent jamais de façon directe sur l'ADN. Plus de 50 co-activateurs ont été dénombrés et la première famille à avoir été identifiée est celle des protéines p160 dont les co-activateurs SRC sont membres. On distingue 3 types de SRC : SRC-1(appelé aussi p160-1 et N-CoA-1), SRC-2 (ou TIF-2, GRIP-1, N-CoA2) et SRC-3 (ACTR, AIB, P/CIP, PRIP, RAC3, RAP250, TRAM1 et TRBP). Les SRC présentent un site d'interaction avec les récepteurs nucléaires correspondant à 3 motifs conservés LXXLL (où L est la leucine et X n'importe quel acide aminé) qui reconnaissent spécifiquement le site AF-2 du domaine LBD du récepteur. Tous les co-activateurs de type SRC contiennent 2 domaines d'activation de la transcription, AD-1 et AD-2, impliqués dans le recrutement du co-facteur CBP/p300 et de la protéine co-activatrice CARM1 à activité arginine méthyltransférase. Les complexes SRC-1, SRC-3 et CBP/p300 possèdent une activité histone acétyltransférase permettant un remodelage de la chromatine facilitant ainsi l'accès de l'ARN polymérase II qui permet la transcription.
D'autres co-activateurs peuvent interagir avec le récepteur des œstrogènes tels que TRAP220/DRIP205. Par ailleurs, un ARN activateur (SRA) a été identifié comme un stimulateur de l'assemblage des différents co-activateurs entre eux. Enfin, les facteurs Med-20 et Brg1/Brm sont recrutés pour établir un pont entre le récepteur nucléaire et les co-activateurs.

Des modifications post-traductionnelles des ER et des co-activateurs entrainent une inhibition de la fixation de ces co-activateurs sur les récepteurs nucléaires ou sur d'autres activateurs transcriptionnels. Ces modifications altèrent les interactions de surfaces entre les protéines. Par exemple, l'acétylation de SRC-3 par p300 perturbe les interactions entre le récepteur et les co-activateurs avec pour conséquence une diminution de la transcription des gènes cibles des ER. De plus, les ER sont les substrats de p300. L'acétylation des ER modifie leur association avec d'autres co-activateurs et donc leur activité transcriptionnelle (Ascenzi *et al*., 2006).

6.1.3.2. Les co-répresseurs

En règle générale, les co-répresseurs se fixent sur les récepteurs nucléaires en absence de ligand. Ce n'est pas toujours le cas pour les récepteurs des œstrogènes sur lesquels les co-

represseurs se fixent en présence d'un antagoniste. En effet, la fixation d'un antagoniste sur l'ER va induire une inhibition de la transcription suite au changement conformationnel du récepteur permettant ainsi le recrutement de co-répresseurs NCoR (nuclear receptor co-repressor) et SMRT (silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor) (Edward *et al*., 2000). Ces antagonistes peuvent néanmoins, selon le type cellulaire et tissulaire, avoir un activité antagoniste partielle sur ERα, ils sont alors appelés Modulateurs Sélectifs des ER (SERM (Selective ER Modulators). Le raloxifène et le tamoxifène sont des composés de type SERM. Les SERM bloquent le domaine AF-2 mais n'affectent pas le domaine AF-1 qui peut alors selon les cellules et les promoteurs, induire la transcription du gène cible. Contrairement à ERα, les SERM agissent comme des antagonistes purs pour ERβ. Ces réponses opposées pourraient s'expliquer par les différences entre les régions N terminales des 2 récepteurs (Matthews *et al*., 2003). Puisque les co-represseurs sont capables d'inhiber le potentiel agoniste des SERM, le phénomène de résistance à ces molécules observé dans les cellules MCF-7 peut s'expliquer par une diminution du taux de co-répresseurs dans les cellules (Lavinsky *et al*., 1998).

En plus de NCoR et SMRT, d'autre co-represseurs des ER ont été caractérisés, par exemple, SAP30, la protéine Sharp, REA qui réprime l'activité des ER en présence d'œstrogènes ou d'anti-oestrogènes, et le co-répresseurs RPF1 (Ascenzi *et al*., 2006).

6.2. Activation de la transcription par la voie non génomique

6.2.1. Les récepteurs membranaires

De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence une action non génomique des œstrogènes par la présence d'ER membranaires. La nature exacte de ces récepteurs est très controversée mais les ER membranaires pourraient être de même nature que les ER nucléaires. Par ailleurs, les ER ne contiennent pas de domaine transmembranaire donc leur association de avec la membrane plasmique est peut être dû à une interaction avec des protéines membranaires telle que la cavéoline, ou/et à l'addition post-traductionnelle de lipide aux ER (palmitoylation). Cette voie de signalisation est fréquemment associée à l'activation de diverses cascades de protéines kinases (Ascenzi *et al*., 2006 ; Song & Santen, 2006). Or plusieurs études ont établit qu'un autre type de récepteur appelé GPR30 (récepteur orphelin couplé à une protéine G) apparaissait comme un effecteur de l'activité œstrogénique. En effet, dans les cellules MCF-7 et

SKBR-3, l'activation de GPR30 par l'E2 est associée à des fonctions prolifératives en stimulant l'expression de l'oncogène *c-fos* ou en inhibant l'expression du TGF-β (Maggiolini *et al.*, 2004 ; Kleuser *et al.*, 2008). Les effets de l'E_2 médiés par GPR30 sont très rapides (Maggiolini *et al*., 2004).

6.2.2. Activation de la transcription en absence de ligand

ERα peut activer la transcription de certains gènes cibles en absence d'E_2 via la phosphorylation du récepteur. Peu d'études sur ce mécanisme ont été réalisées sur ERβ. La phosphorylation de ERα est réalisée par les voies de signalisation PI3K/Akt, PKC, AMPc/PKA et MAPK. Ces voies correspondent à des cascades de réaction dont la dernière étape consiste à activer ERα par phosphorylation de certains de ses résidus (Bunone *et al*., 1996 ; Martin *et al*., 2000 ; Schreihofer *et al*., 2001 ; Driggers *et al*., 2002). La présence de certains facteurs de croissance peut déclencher ces réactions. Par exemple, IGF-1 est capable de stimuler l'activité transcriptionnelle de ERα. L'EGF peut aussi stimuler ERα par phosphorylation par les MAPK permettant le recrutement de co-régulateurs transcriptionnels. Une concentration élevée en AMPc stimule l'activité de ERα. Il n'est pas clairement défini si les voies de signalisation ligand-indépendantes sont impliquées dans la progression tumorale indépendante des œstrogènes ou dans la résistance aux hormonothérapies mais il apparaît qu'une forte activité de la voie AMPc/PKA est associée à une forme de résistance aux traitements actuels. En effet, la PKA peut phosphoryler ERα sur la sérine 305 induisant un changement de conformation du récepteur expliquant la résistance au tamoxifène (Dudek & Picard, 2008).

VII. Implication des ER dans la tumeur mammaire

Les ER sont nécessaires au développement et à la maturation de la glande mammaire. Dans la glande mammaire normale, seulement 7 à 10% des cellules épithéliales expriment ERα et cette expression varie selon le cycle menstruel. A l'inverse, l'expression de ERβ est relativement élevée puisque 80 à 85% des cellules épithéliales l'expriment (Heldring *et al*., 2007). L'apparition de la tumeur mammaire est associée à une forte exposition du tissu épithélial à l'E_2 (McEwan, 2004). L'E_2 se fixe préférentiellement sur ERα et stimule la prolifération cellulaire. Durant le processus de tumorogénèse, le rapport ERα/ERβ change. En effet, dans les carcinomes canalaires *in situ* de même que dans les cancers du sein invasifs, 75% des

cellules présentent un fort taux d'ERα. Parallèlement, une réduction de ERβ est observée (Herynk & Fuqua, 2004). ERα apparaît comme le récepteur jouant le rôle le plus important dans le cancer du sein puisque son expression permet de définir le statut de la tumeur. Longtemps controversé, le rôle de ERβ dans la progression des cancers mammaires fait l'objet désormais de nombreuses études le décrivant comme indicateur de pronostic favorable.

7.1. Gènes cibles des œstrogènes et de ERα

Les gènes cibles de ERα sont, par définition, les gènes dont ERα régule significativement la transcription. Les différentes voies d'activation des ER rendent complexe l'étude de ces gènes. Comme nous l'avons décrit dans un paragraphe précédent, ERα peut réguler non seulement la transcription de gènes contenant dans leur région promotrice des ERE mais également la transcription de gènes régulés par d'autres facteurs de transcription de type AP-1 ou Sp1 ou par la voie non génomique. Des études par immunoprécipitation de chromatine ont identifié des gènes sensibles à l'E_2, régulés par ERα et surexprimés dans la tumeur mammaire. Ces gènes ne contiennent pas forcément des ERE consensus. Par exemple, les gènes codant les protéines suivantes contiennent des sites Sp1 dans leur promoteurs : Hsp27, Cathepsine D, c-fos, RARα1, bcl-2, E2F1, VEGF, cycline D1, thymidylate synthase, adénosine déaminase insulin-like growth factor-binding protein 4, créatine kinase B, DNA polymerase α, folate receptor α, ERR-α, PR, PADI4, EGFR, IGF-1, VDR, LDL… (Safe & Kim, 2008). Certains de ces gènes contiennent en plus des sites Sp1, d'autres sites pour de nombreux facteurs de transcription. Par exemple, la cycline D1 possède dans son promoteur des sites de fixation AP-1 et des sites de fixation pour STAT-5 et Nf-κB qui pourraient être la cible de ERα via les voies génomique et non génomique.
D'autres gènes positivement régulés par ERα, contiennent dans leur promoteur non seulement un site de fixation consensus ERE mais aussi un site AP-1 : par exemple, le gène codant la protèine pS2 (Safe & Kim, 2008).

Il existe un certain nombre de gènes cibles de ERα contenant à la fois des demi-sites ERE et des sites Sp1 et AP-1. C'est le cas du gène codant le récepteur à la progestérone, très exprimé dans la tumeur mammaire. Ce gène contient 2 promoteurs : A et B. Le promoteur A possède un demi-site ERE situé à proximité d'un site Sp1. Le promoteur B contient 2 sites Sp1. Un site

AP-1 est situé entre les 2 promoteurs (Schultz *et al*., 2003). L'activation transcriptionnelle par l'E_2 est alors optimale lorsque les 2 sites sont utilisés (Björnström *et al*., 2005).

D'autres gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose ont leur expression modulée par l'E_2. En effet, l'E_2 entraîne une activation transcriptionnelle des stimulateurs de la prolifération et une répression des régulateurs négatifs de la prolifération. Ces résultats expliquent la stimulation de la prolifération et la suppression de l'apoptose observée sur les cellules cancéreuses mammaires ER-positives traitées aux œstrogènes. Ainsi, l'E_2 augmente l'expression de gènes comme celui de la cycline D1, de la cycline A2, de cdc2 et cdc20 impliqués dans la progression du cycle cellulaire. L'E_2 stimule également des gènes impliqués dans la synthèse d'ADN comme *CDC6*. Le gène de la survivine (*BIRC5*), qui code un inhibiteur de l'apoptose, est également surexprimé en présence d'E_2. D'autre part, de nombreux facteurs impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire voient leur expression diminuée par l'ERα. C'est le cas de la cycline G2 et des gènes codant des cytokines et des facteurs de croissance tels que les membres de la superfamille du TGFβ (Frasor *et al*., 2003).

7.2. Implication de ERβ dans la tumeur mammaire

La présence de ERβ dans la tumeur mammaire de statut ERα+/ERβ+ est associée à un pronostic de survie plus favorable par rapport aux tumeurs exprimant seulement ERα (Omoto *et al*., 2001). Peu d'études portent sur les tumeurs de type ERα-/ERβ+, plus agressives et dans lesquelles ERβ est associé à des fonctions proliératives (Speirs, 2008). Le niveau d'expression de ERβ est plus élevé dans le tissu mammaire normal et diminue lorsque la tumeur progresse d'un stade préinvasif vers un stade invasif (Roger *et al*., 2001). La perte de l'expression de ERβ serait due à la méthylation du promoteur du gène ERβ ce qui suggère que ERβ joue le rôle de gène suppresseur de tumeur (Skliris *et al*., 2003 ; Rody *et al*., 2005). Un faible niveau de ERβ est synonyme de mauvais pronostic (Lin *et al*., 2007). Les multiples isoformes d'ARNm de ERβ ont été détectées dans des lignées cancéreuses non invasives ERα+ et invasives ERα- (Tong *et al*., 2002). Les isoformes d'ARNm ERβ1, ERβ2/cx et ERβ5 sont prédominantes et l'expression des isoformes 2 et 5 est supérieure à l'expression de l'isoforme sauvage. De plus le niveau d'expression de ces trois isoformes est similaire dans les tumeurs ERα+/ERβ+ et ERα-/ERβ+. En terme de protéines, une étude a montré, par immunofluorescence, que les isoformes ERβ1 et ERβ2/cx sont détectée dans les tumeurs ERα+/ERβ+ et ERα-/ERβ+, avec une forte

prédominance pour l'isoforme ERβ2/cx (Skliris *et al*., 2008 ; Speirs *et al*., 2008). Par ailleurs, la localisation de ERβ2/cx est déterminante pour la réponse à l'hormonothérapie. En effet, une localisation uniquement nucléaire de ERβ2/cx est un facteur de bon pronostic tandis qu'une localisation seulement cytoplasmique ou cytoplasmique et nucléaire est synonyme de mauvais pronostic. (Speirs *et al*., 2008).

Peu d'études concernant les gènes cibles de ERβ dans la tumeur mammaire ont été réalisées. Cependant, il a été montré que ERβ et ERα interagissent avec la partie C terminale de la protéine Sp1 et contrôlent l'expression de gènes cibles contenant un site Sp1 comme l'isoforme A du PR, Cathepsin D, TGFα, c-myc, Hsp27, et la télomérase (Safe & Kim, 2008).

Le rôle protecteur de ERβ dans les cellules cancéreuses mammaires exprimant ERα a été confirmé par plusieurs études qui montrent que ERα et ERβ produisent des effets opposés. En effet, dans les cellules MCF-7, ERβ réprime l'expression des gènes cibles de ERα codant des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire comme la cycline A, entraînant l'inhibition de la prolifération par arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Paruthiyil *et al*., 2004). ERα inhibe la voie de signalisation du TGFβ ce qui entraîne la croissance tumorale. L'expression de ERβ régule cette voie et inhibe la prolifération tumorale (Chang *et al*., 2006). De plus, ERβ inhibe la croissance tumorale mammaire chez les souris xénogréffées avec des cellules T47D par diminution de l'expression de facteurs impliqués dans l'angiogénèse tels que VEGF et PDGFβ (Hartman *et al*., 2006). Dans ces mêmes cellules, ERβ est associé à un faible niveau d'expression des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN comme DNAL2 ou CKS2 (Lin *et al*., 2007). *In vivo*, l'expression de ERβ inhibe la croissance tumorale mammaire chez des souris dans lesquelles des cellules MCF-7 ont été injectées (Behrens *et al*., 2007). Par ailleurs, ERα active la transcription via un ERE mais aussi par interaction avec les facteurs de transcription c-Jun et c-Fos du site AP-1(Paech *et al*., 1997). ERβ altère quant à lui le recrutement des protéines du complexe AP-1 ce qui explique en partie l'effet antagoniste de ERβ sur ERα (Matthews *et al*., 2006). Puisque ERβ est associé à un pronostic favorable, il serait judicieux de considérer ce récepteur pour définir le statut de la tumeur et prédire ainsi le niveau de réponse aux thérapies endocrines dans les tumeurs ERα+/ERβ+ (Skliris *et al*., 2008).

7.3. Cas particulier des ERR

Les ERR (Estrogen Related Receptor), sont des récepteurs nucléaires orphelins et comme les ER, ils interagissent avec la séquence consensus ERE mais ils ne fixent pas l'E_2 bien qu'il y ait des homologies dans les DBD et LBD des 2 types de récepteurs. Trois types d'ERR ont été identifiés : ERRα, ERRβ et ERRγ. Ils ne sont pas activés par les ligands naturels et exercent une activité transcriptionnelle constitutive en absence de ligands exogènes. Par contre, ils sont activés par des œstrogènes de synthèse (Ariazi & Jordan, 2006).

En plus des ER, il s'avère que les ERR sont impliqués dans la voie de signalisation des œstrogènes et jouent un rôle non négligeable dans la croissance des cellules normales et cancéreuses. L'isoforme ERRα est majoritaire dans les cellules cancéreuses mammaires. Les ERR contrôlent l'expression du gène codant pS2. En effet, l'activité transcriptionnelle des 3 isoformes d'ERR sur le promoteur de pS2 est stimulée en présence des membres de la famille des SRC. Cette observation est appropriée dans une large proportion de tumeurs mammaires qui présentent une surexpression de SRC-3 lequel peut stimuler l'activité transcriptionnelle des ERR dans les cellules cancéreuses mammaires, même en absence de ligands endogènes (Lu et al., 2001).

VIII. Les anti-œstrogènes

Le but de la thérapie des cancers du sein hormono-dépendants est de bloquer la production d'œstradiol circulante soit par ovariectomie soit en inhibant le mécanisme de conversion des précurseurs stéroïdes en œstrogènes en utilisant des inhibiteurs d'aromatase. Un troisième type de traitement qui a pour but d'inhiber l'action des récepteurs des œstrogènes est également proposé en utilisant soit des inhibiteurs compétitifs de l'action des œstrogènes (composés de type SERM) soit des anti-œstrogènes purs (ICI 182,780).

8.1. Mécanisme d'action des anti-œstrogènes sur les ER

Les SERM, par exemple le tamoxifène ou le raloxifène, présentent une activité agoniste partielle selon les tissus et selon les concentrations utilisées. Par exemple, le tamoxifène, agit comme anti-œstrogènes dans la tumeur mammaire en se fixant sur ERα. Le récepteur change de conformation et permet le recrutement de co-répresseurs NCoR et SMRT aboutissant à

l'inhibition de la prolifération tumorale par blocage du cycle cellulaire en phase G1 ou G2. Les études cristallographiques du LBD de ERα complexé avec le tamoxifène montrent que le noyau formé par le domaine AF-2 et l'hélice H12 est positionné différemment par rapport à celui observé lorsque le LBD est complexé avec un agoniste (Shiau *et al*., 1998) **(Figure 20)**. ERα est alors incapable de recruter des co-activateurs. Le récepteur n'est pas dégradé, il s'accumule dans la cellule. Par contre, il agit comme un agoniste sur les ER en favorisant le recrutement de co-activateurs SRC-1 dans les cellules de l'utérus favorisant ainsi la survenue d'un cancer du myomètre (MacGregor & Jordan, 1998). ERβ répond de façon différente au tamoxifène. En effet, il agit comme un antagoniste partiel pour ERα mais comme un antagoniste pur pour ERβ (Matthews *et al*., 2003).

Les anti-oestrogènes purs (appelés aussi dérégulateurs sélectifs de l'ER), quant à eux, se fixent sur les ER, provoquent un changement conformationnel du récepteur ce qui va empêcher la dimérisation. La fixation sur l'ADN est impossible, le récepteur est ensuite détruit par le protéasome 26S. Lors d'un traitement des cellules MCF-7 avec l'ICI 182,780, une réduction du nombre de cellules en phase S, une augmentation du taux de pRB hypo-phosphorylée ainsi qu'une diminution des ARNm et des protéines cycline D1 sont observées expliquant ainsi l'inhibition de la prolifération (MacGregor & Jordan, 1998).

8.2. La résistance au traitement par anti-œstrogènes

En plus des effets secondaires indésirables, certaines patientes traitées avec des anti-œstrogènes ne répondent pas à ce type de traitement. La résistance aux anti-œstrogènes peut s'expliquer par différents mécanismes :

- L'accumulation intra–tumorale des métabolites du tamoxifène.
- L'activation ligand indépendante de ERα
- La diminution de co-represseur ou l'augmentation de co-activateurs (comme par exemple AIB-1).
- La surexpression des facteurs de croissance et l'augmentation de l'angiogénèse.
- En présence d'anti-oestrogènes, les ERR sont capables de stimuler l'expression de gènes cibles contenant un ERE consensus et impliqués dans la prolifération. Cette capacité peut affecter l'éfficacité des traitements anti-oestrogéniques (Ascenzi *et al*., 2006).

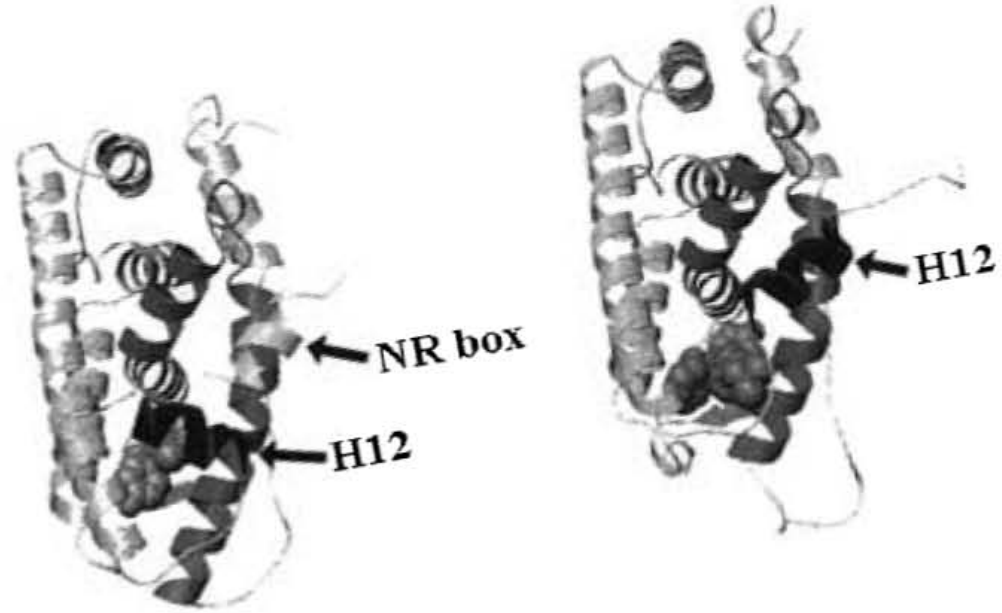


Figure 20. Structure du site de reconnaissance des coactivateurs p160 du domaine AF-2. Lorsque le ligand est un agoniste, ici l'E_2, le complexe formé par le domaine de fixation au ligand et l'E_2 permet la liaison du coactivateur SRC-2 par le biais d'une séquence de 13 acides aminés correspondant à la boîte de liaison au récepteur nucléaire (NR box). Lorsque le récepteur lie un anti-œstrogène, ici le tamoxifène, l'hélice 12 tourne et se place là où se fixe habituellement le coactivateur. L'hélice 12 (H12) qui contient le noyau AF-2 et la boîte de liaison aux récepteurs nucléaires (NR box) sont indiqués (d'après Edwards., 2000).

La fréquence non significative de mutations sur les ER n'explique pas la résistance aux anti-oestrogènes (MacGregor & Jordan, 1998).

PARTIE III : PPARγ ET CANCER DU SEIN

I. Les peroxysomes et proliférateurs de peroxysomes

Découverts en 1966 par l'équipe de Christian de Duve, les peroxysomes sont de petits organites délimités par une membrane et dépourvus de matériel génétique. Ils se multiplient majoritairement par scission. La fonction métabolique majeure des peroxysomes est la β-oxydation des acides gras à longues chaînes (c'est-à-dire plus de 18 atomes de carbone). Les peroxysomes doivent leur nom au fait que la première étape d'oxydation des acides gras se traduit par la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les peroxysomes sont aussi impliqués dans la synthèse de la bile, du cholestérol et du plasmalogène. Ils ont également un rôle non négligeable dans le métabolisme des acides aminés et des purines.

Les peroxysomes sont présents dans toutes les cellules eucaryotes. Chez les mammifères, ils sont abondants dans les hépatocytes.

Les proliférateurs de peroxysomes sont des composés naturels (lipides) ou chimiques incluant les fibrates (utilisés en médecine comme médicaments hypolipémiants), les plastifiants, les pesticides et les solvants. Chez les rongeurs, un traitement à court terme avec ces composés entraîne la prolifération des peroxysomes, une hyperplasie et une hypertrophie du foie et une augmentation de l'expression des gènes codant les enzymes de la β-oxydation des acides gras. A plus long terme, ils induisent le développement d'hépatocarcinomes. Cet effet carcinogène n'a jamais été observé chez l'Homme. Les proliférateurs de peroxysomes exercent leurs effets sur un récepteur nucléaire dont le premier identifié fut nommé Récepteur Activé par les Proliférateurs de Peroxysomes α (PPARα) (Issemann *et al*., 1990 ; Desvergne *et al*., 1999).

II. Les Récepteurs Activés par les Proliférateurs de Peroxysomes

Identifiés dans un premier temps comme récepteurs orphelins, les PPARs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes/stéroïdiennes (classe II) qui se définissent comme des facteurs de transcription modulant l'expression d'un certain nombre de gènes en réponse à l'activation par un ligand. Trois types de PPAR ont été identifiés chez le Xénope, les rongeurs et chez l'Homme: PPARα, PPARβ/δ (NUC-1 ou FAAR) et PPARγ (NR1C1, NR1C2 et NR1C3, respectivement) (Issemann *et al*., 1990 ; Dreyer *et al*., 1992).

Chaque type de PPAR est codé par un gène distinct et se caractérise par une distribution tissulaire différente (Braissant *et al*., 1996).

2.1. Le gène codant PPARγ

D'abord cloné dans les cellules souches hématopoïétiques, le gène PPARγ est localisé sur le chromosome 6 de la souris et sur le chromosome 3 chez l'Homme (Sher *et al*., 1993 ; Greene *et al*., 1995 ; Jones *et al*., 1995). Il contient 6 exons communs avec les gènes PPARα et PPARβ et s'étend sur une longueur de 125 Kb (Krey *et al*., 1993 ; Zhu *et al*., 1995 ; Fajas *et al*., 1997).
L'usage de 4 promoteurs distincts associé à un épissage alternatif d'exons localisés en 5' UTR, génère 4 transcripts : PPARγ1, PPARγ2, PPARγ3 et PPARγ4. Les ARNm possèdent 6 exons en commun. L'ARNm de PPARγ1 possède les exons non codants A1 et A2 en 5'. L'ARNm PPARγ2 possède un exon spécifique B partiellement traduit apportant ainsi 29 et 30 acides aminés supplémentaires à la protéine PPARγ2 chez l'Homme et la souris respectivement (Fajas *et al*., 1997). Un troisième promoteur situé en amont de l'exon A2 code un transcrit PPARγ3. La quatrième isoforme d'ARNm, PPARγ4, contient uniquement les 6 exons communs. Les protéines PPARγ1, PPARγ3 et PPARγ4 sont identiques (Wang *et al*., 2006).
Chez le singe, 3 autres isoformes de PPARγ (PPARγ5, 6 et 7) dues à la présence de 2 nouveaux exons non codants, C et D localisés dans la région 5', ont été identifiés dans les macrophages (Zhou *et al*., 2002). Chez l'Homme, seule la forme PPARγ6 n'a pas été mise en évidence dans les mêmes cellules (Chen *et al*., 2006) **(Figure 21)**.

2.2. La protéine PPARγ

2.2.1. Structure du récepteur PPARγ

Les récepteurs PPAR ont une organisation commune aux autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. PPARγ est caractérisé par les 6 domaines fonctionnels notés de A à F **(Figure 22).**
Le domaine A/B situé du côté N terminal est très variable dans sa composition en acides aminés. Il est peu conservé entre les 3 types de PPAR et confère la spécificité des PPAR vis-à-vis du ligand. Il possède un site de transactivation AF-1 indépendant du ligand pouvant être phosphorylé sur des résidus sérine. La phosphorylation module l'activité du récepteur. *In vivo*,

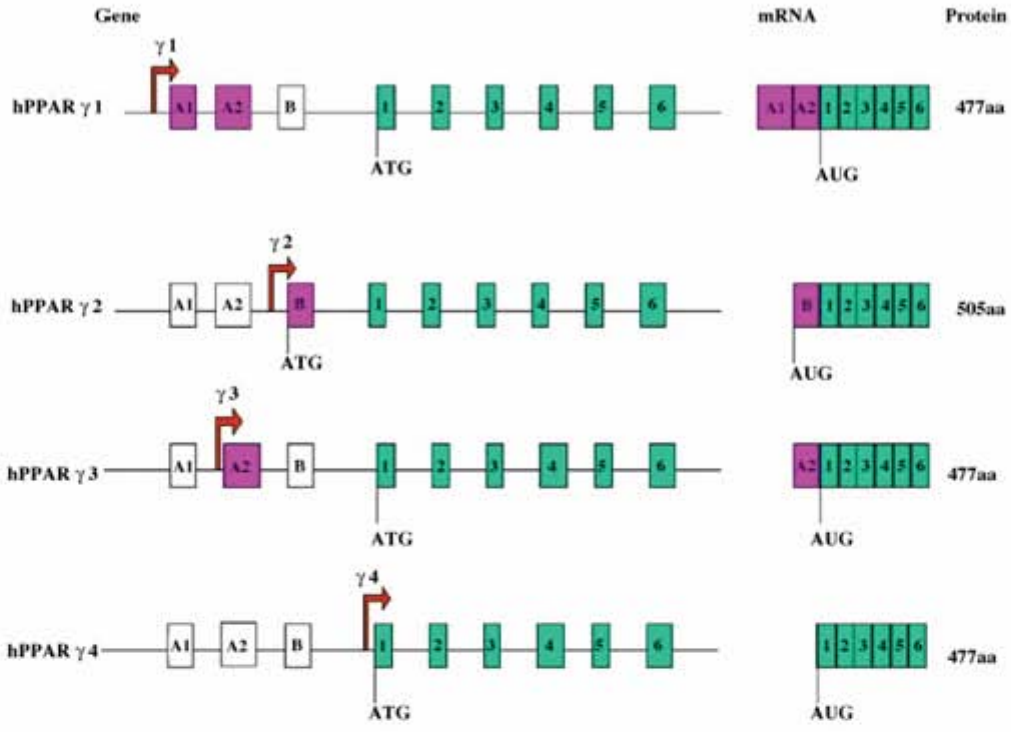


Figure 21. Organisation génomique du gène PPARγ chez l'Homme. L'utilisation de promoteurs différents et l'épissage alternatif génèrent 4 transcrits différents: PPARγ1, PPARγ2, PPARγ3 et PPARγ4. Les exons 1 à 6 sont communs aux 4 transcrits. Les ARNm PPARγ1, PPARγ3 et PPARγ4 codent la même protéine (Wang *et al*., 2006).

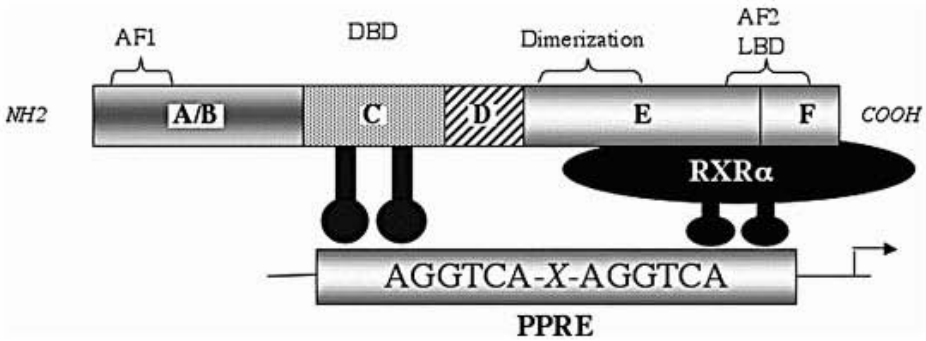


Figure 22. Structure et domaines fonctionnels des PPARs. Le domaine A/B situé en N terminal contient la fonction d'activation indépendante du ligand AF-1. Domaine C: DNA Binding domain. Domaine D: région charnière. Le domaine E/F, situé du côté C terminal, contient la fonction d'activation dépendante du ligand AF-2 et permet la dimérisation avec RXRα (Diradourian *et al*., 2004).

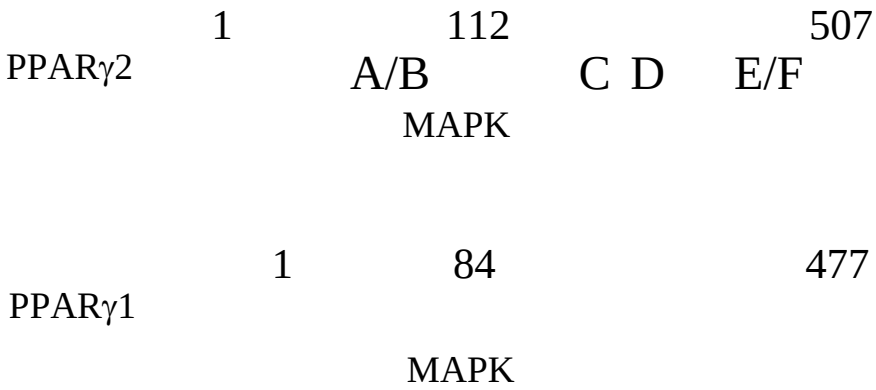


Figure 23. Localisation des sites de phosphorylation de PPARγ (Rochette-Egly, 2003).

PPARγ est phosphorylé par la voie MAP-Kinase. La phosphorylation de la sérine 112 par la voie MAP-Kinase inhibe l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante de PPARγ2. Cette inhibition est expliquée par une modification de la communication entre les domaines A/B et LBD qui réduit l'affinité du ligand (Shao *et al*., 1998). Chez l'Homme, PPARγ1 est phosphorylé sur le résidu sérine 84, dont la mutation entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle du récepteur (Blanquard *et al*., 2003) **(Figure 23)**.

La région C compte entre 66 et 68 acides aminés et correspond au domaine de fixation du récepteur sur l'ADN appelé DBD (DNA Binding Domain). La fixation est permise par deux régions en doigts de zinc comportant chacune 4 cystéines. Les analyses par cristallographie ou par résonance magnétique nucléaire ont montré que le domaine DBD est très conservé entre les PPAR et les récepteurs des œstrogènes. Chaque doigt de zinc possède une séquence invariante en acides aminés. Le premier doigt de zinc possède une séquence appelée P-box (CEGCKG) permettant le contact spécifique avec les nucléotides de l'élément de réponse et dont la mutation abolit l'activité transcriptionnelle du récepteur (Myers *et al*., 1997). La région entre les 2 premiers résidus cystéine du second doigt de zinc est appelée D-box et est impliquée dans la dimérisation du récepteur et la reconnaissance de l'espace entre les 2 demi-sites de l'élément de réponse. La D-box des PPARs contient seulement 3 acides aminés au lieu des 5 acides aminés que possèdent les récepteurs nucléaires aux hormones **(Figure 24).**

Le domaine D correspond à une région charnière et contient une séquence NLS responsable de la translocation nucléaire du récepteur. Ce domaine interagit avec des protéines coactivatrices ou des corépresseurs.

Le domaine E est le domaine de fixation du ligand ou LBD (Ligand Binding Domain). Il contient le site AF-2 situé dans l'hélice H12 : site de transactivation du récepteur dépendant du ligand et impliqué dans la dimérisation avec RXRα (voir paragraphe suivant). Le domaine LBD de PPARγ est constitué de 12 hélices α nommées H1 à H12 et d'un feuillet β à 4 brins antiparallèle **(Figure 25)**.

2.2.2. Mécanisme d'action de PPARγ

PPARγ est activé par des processus de déphosphorylation et par la fixation de ligands naturels ou synthétiques que nous détaillerons dans un autre chapitre. La fixation du ligand induit le changement conformationnel du domaine LBD et plus spécialement du domaine AF-2. La

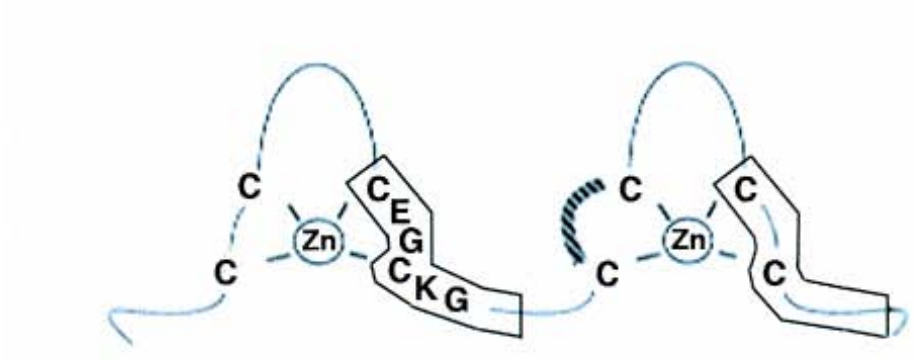


Figure 24. Représentation schématique des doigts de Zinc du DNA binding domain des PPAR. La boîte P (en rouge) est localisée en C terminal du premier doigt de Zinc et présente une séquence CEGCKG conservée dans les 3 types de PPAR. La boîte D (en vert) est située entre les 2 premiers résidus cystéine du second doigt de Zinc et comprend 3 acides aminés différents selon les PPARs (Escher & Whali, 2000).

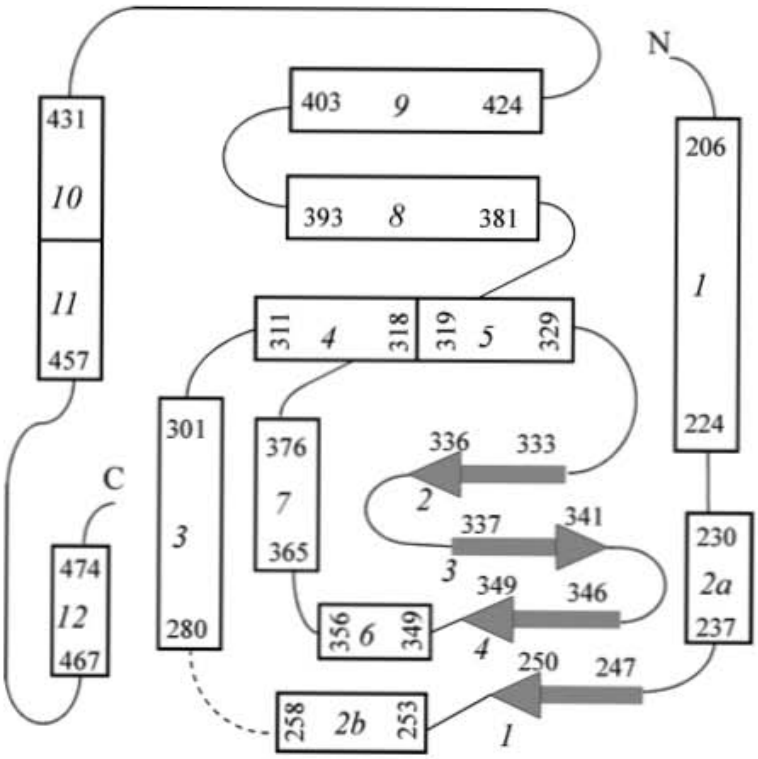


Figure 25. Structure secondaire du domaine LBD de PPARγ humain en absence de ligand. Les hélices sont numérotées de 1 à 12 selon la convention utilisée pour tous les récepteurs nucléaires. Les brins anti-parallèles du feuillet β sont symbolisés par des flèches numérotées de 1 à 4. Les hélices sont délimitées par un nombre d'acides aminés (Uppenberg *et al*., 1998).

fixation d'un ligand induit un changement de conformation du récepteur et entraîne le repositionnement de H12 sur la poche de fixation. Par ailleurs, la fixation du ligand à PPARγ module une communication intra-moléculaire entre le domaine A/B et le domaine LBD (Schoonjans *et al*., 1996).

Les interactions ligand-récepteur causent le changement de conformation de AF-2 et permettent la fixation de co-activateurs comme SRC-1, via son motif LXXLL, suivie de l'activation du récepteur (Iwata *et al*., 2001).

SRC-1 possède une activité histone acetyltransférase. D'autres cofacteurs à activité histone acetyltransférase sont également recrutés comme CBP/p300, RIP140, PGC-1α, TRAP et DRIP. Il a été observé des différences d'activité transcriptionnelle de PPARγ dues au recrutement de co-activateurs différents en fonction des ligands utilisés. En présence de ligand, le recrutement des co-activateurs est associé au départ des co-répresseurs comme NCoR ou SMRT (Grommes *et al*., 2004).

La régulation transcriptionnelle par les PPAR nécessite une hétérodimérisation avec le récepteur à l'acide *9-cis* rétinoïque, RXR (NR2B). RXR appartient à la même superfamille de récepteurs nucléaires que les PPAR (Kliewer *et al*., 1992 ; Keller *et al*., 1993). L'hétérodimère PPAR/RXR peut se former en absence de ligand. Le domaine LBD de RXRα est composé de 11 hélices α et de 2 feuillets β. Les 2 domaines LBD de l'hétérodimère PPARγ/RXRα conservent leur structure hélicoïdale **(Figure 26)**. Les hélices H3, H7 et H10 de PPARγ forment une cavité hydrophobe dite poche de fixation du ligand ou LBP (Ligand Binding Pocket), plus large que celle des autres récepteurs nucléaires (1300 $Å^3$), à l'intérieur de laquelle des ligands variés se fixent (Iwata *et al*., 2001). Après activation de PPAR/RXR par leur ligand respectif, la transcription d'un gène cible est modulée par la fixation de l'hétérodimère sur une séquence spécifique de son promoteur du appelée PPRE (PPAR Response Element) (Dreyer *et al*., 1992 ; Kliewer *et al*., 1992 ; Tugwood *et al*., 1992). Cet élément de réponse est généralement de type DR-1 (Direct Repeat-1) et se compose de 2 demi-sites à répétition directe de la séquence consensus AGGTCA espacée d'un nucléotide. Le PPRE est présent en une seule ou plusieurs copies dans le promoteur du gène cible. PPAR et RXR se fixent, respectivement, sur les côtés 5' et 3' des demi-sites. Ceci reflète probablement la configuration unique de l'hétérodimère PPAR/RXR sur le DR-1 avec PPAR localisé en 5' de RXR (IJpenberg *et al*., 1997) Le contrôle transcriptionnel par PPAR/RXR nécessite une interaction avec des co-régulateurs. Ces derniers sont co-activateurs pour la stimulation de l'expression du gène cible

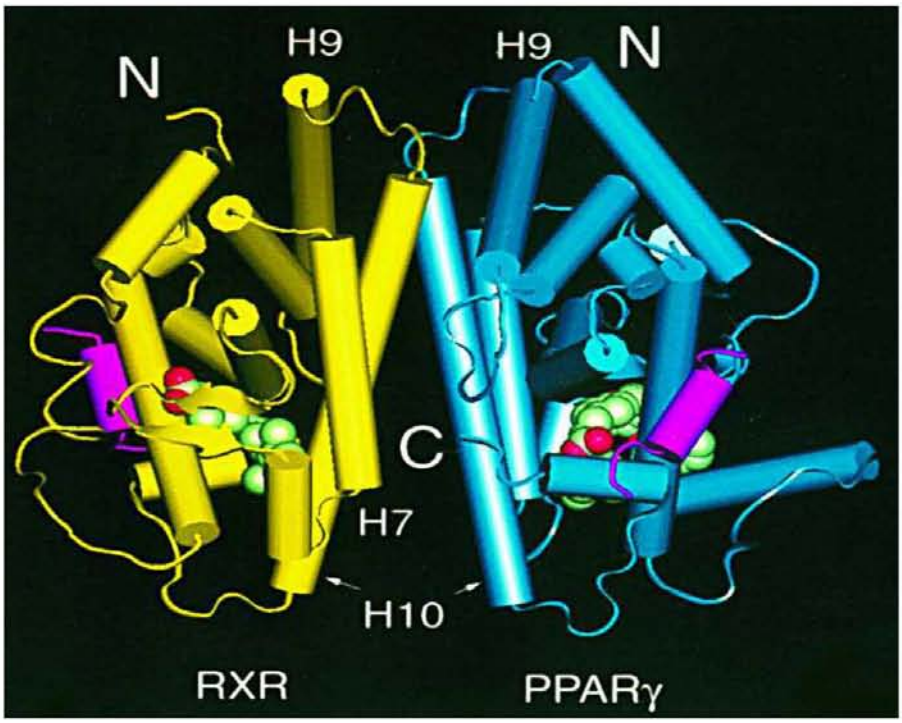


Figure 26. Structure de l'hétérodimère PPARγ/RXRα. Les hélices sont représentées par des cylindres. RXR est coloré en jaune, PPARγ en bleu, et les 2 peptides SRC-1 en violet. Les ligands de RXRα et PPARγ (colorés en vert et rouge) se situent dans la poche de fixation de leur récepteur respectif (Gampe *et al*., 2000).

ou co-répresseurs pour son inhibition (Dowell *et al*., 1999 ; Guan *et al*., 2005 ; Yu *et al*., 2005) **(Figure 27)**.

III. Distribution tissulaire et principaux rôles de PPARγ

Les différents types de PPAR présentent une expression tissulaire spécifique. PPARγ est exprimé principalement dans le tissu adipeux, la forme majoritaire étant PPARγ2. Dans la rate, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon, la forme PPARγ1 prédomine. Une expression modérée voire faible de PPARγ est décrite dans la glande mammaire, l'appareil génital, les reins, la rétine et le système nerveux central. PPARγ n'est pas exprimé dans le foie et la peau (Braissant *et al*., 1996).

PPARγ est impliqué dans le contrôle du diabète. En effet, les ligands de PPARγ, notamment les thiazolidinediones, exercent un effet antidiabétique par l'interaction au niveau des organes cibles de l'insuline tels que les muscles squelettiques, le foie et le tissu adipeux (Olefsky., 2000). La stimulation de PPARγ améliore la sensibilité à l'insuline par différents mécanismes :

- Augmentation de l'expression du transporteur de glucose GLUT4 (Ciaraldi *et al*., 1997 ; Spiegelman, 1998 ; Liao *et al*., 2007).
- Adipogenèse (les adipocytes ainsi formés sont de plus petite taille et sont plus sensibles à l'insuline) (Spiegelman, 1998).-
- Diminution de la néo-glucogenèse hépatique.

PPARγ (en particulier PPARγ2) intervient dans la phase précoce de la différenciation adipocytaire (Tontonoz *et al*., 1994). En effet, il a été montré que la surexpression de PPARγ dans des fibroblastes cultivés, en présence d'agonistes entraînait leur différentiation en adipocytes (Tontonoz *et al*., 1994). Par ailleurs, l'invalidation du gène PPARγ se traduit par une absence de tissu adipeux chez la souris (Rosen *et al*., 1999). De plus, PPARγ est important pour le maintien des fonctions des adipocytes matures. En effet, il intervient dans la régulation de l'expression des gènes importants du métabolisme lipidique comme l'acyl-CoAsynthase, la lipoprotéine lipase (LPL) et la protéine de liaison des acides gras aP2, marqueur de la différenciation adipocytaire (Spiegelman, 1998 ; Auwerx, 1999). Enfin, l'activation de PPARγ stimule aussi l'apoptose des adipocytes, évitant ainsi leur hypertrophie (Yamaushi *et al*., 2001).

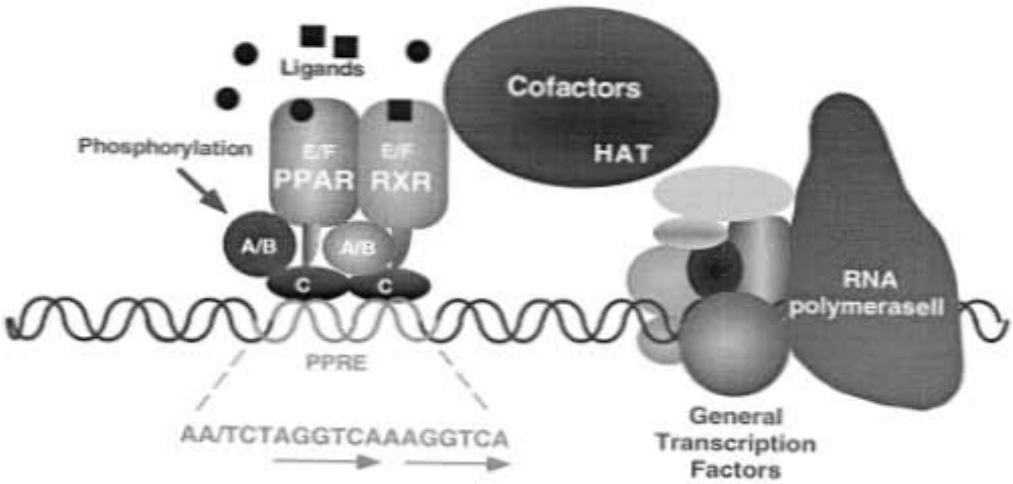


Figure 27. Mécanisme de transactivation. L'hétérodimère PPAR/RXR se fixe sur le PPRE (PPAR Response Element) localisé dans le promoteur des gènes cibles par le domaine C (DNA-Binding Domain) de chacun des récepteurs. L'activité de PPAR est régulée par la phosphorylation du domaine A/B et du domaine E/F (Ligand-Binding-Domain). L'hétérodimère PPAR/RXR activé s'associe avec des cofacteurs possédant une activité Histone acétyl-transférase (HAT) modifiant la structure du nucléosome par recrutement des facteurs généraux de la transcription (d'après Escher & Wahli, 2000).

Il est maintenant établi que les agonistes de PPARγ réduisent l'athérosclérose *in vivo* dans les modèles animaux mais aussi chez les patients souffrant de cette maladie. L'expression de PPARγ est induite lors de la différenciation des monocytes en macrophages. L'athérosclérose est caractérisée par une prolifération des cellules musculaires lisses des artères dues à l'action de cytokines pro-inflammatoires synthétisées par les macrophages aboutissant à des lésions. L'effet bénéfique des ligands de PPARγ sur l'athérosclérose s'expliquerait par une inhibition de la production de cytokines inflammatoires par les macrophages localisés au niveau de ces lésions, par une inhibition de l'adhésion des monocytes sur les parois de l'endothélium et par une diminution de la prolifération des cellules musculaires lisses de l'endothélium (Gizard & Bruemmer, 2007 ; Duan *et al*., 2008). Ces effets expliqueraient ainsi la régression de la progression des plaques d'athérome observée chez des patients traités avec des agonistes de type TZD (Michalik *et al*., 1999).

PPARγ est essentiel pour la maturation d'un placenta fonctionnel. En effet, les études d'invalidation chez la souris ont montré l'importance de PPARγ dans l'implantation de l'embryon dans l'utérus et dans le développement et le fonctionnement placentaire (Barak *et al*., 1999). Chez la femme, PPARγ est aussi exprimé dans le placenta. Son activation stimule l'expression et la sécrétion d'hormones nécessaires à la grossesse et au développement du fœtus (Tarrade *et al*., 2001).

Par ailleurs PPARγ est également exprimé dans la glande mammaire. Régulateur de la prolifération des cellules cancéreuses, PPARγ activé par ses ligands peut présenter un intérêt dans le traitement du cancer du sein que nous détaillerons dans le paragraphe VII.

IV. Les ligands de PPARγ

4.1. Les ligands naturels

Différents acides gras insaturés tels que les acides arachidonique, linoléique et linolénique sont capables de se lier et d'activer les 3 types de PPAR. Des expériences de compétition ont montré que trois acides gras polyinsaturés pouvaient se fixer sur PPARα et PPARγ avec des valeurs d'IC_{50} situées entre 2 et 20 µM (ces acides gras activent préférentiellement PPARα). Ces valeurs sont proches des concentrations en acides gras non estérifiés circulant dans le sérum

humain. Ces observations ont permis d'établir que les acides gras peuvent activer les PPARs *in vivo* (Kliewer *et al*., 1997).

Les dérivés métaboliques des acides arachidonique et linoléique sont aussi des ligands naturels de PPARγ (Escher & Wahli., 2000 ; Gelman *et al*., 2007). L'acide linoléique est quant à lui métabolisé uniquement par la voie des lipooxygénases et génère les dérivés 9-HODE et 13-HODE. L'acide arachidonique, généralement incorporé dans les membranes cellulaires, est mobilisé par la phospholipase A2 puis dégradé selon deux voies métaboliques enzymatiques : la voie des cyclooxygénases et la voie des lipooxygénases. Les eicosanoïdes issus de cette dégradation sont des ligands de PPARγ. Parmi eux, le dérivé des prostaglandines de la série D, le 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-PGJ_2 (15d-PGJ_2) est l'activateur naturel le plus puissant de PPARγ avec un Kd situé entre 325 nM et 2.5 µM (Forman *et al*., 1995 ; Kliewer *et al*., 1995) **(Figure 28)**.

4.2. Les ligands synthétiques

4.2.1. Les ligands de la famille des thiazolidinédiones

Dans le cadre de leur recherche de molécules possédant des propriétés hypolipémiantes, les industries chimiques Takeda (Osaka, Japon) ont identifié la première molécule appartenant à cette famille en 1982 : la **Ciglitazone** (Sohda *et al*., 1982) .

Les premiers essais effectués sur des rongeurs obèses et diabétiques ont montré que la Ciglitazone améliorait la sensibilité à l'insuline accompagnée d'une diminution du taux de triglycérides plasmatiques (Fujita *et al*., 1983). En 1988, un nouvel agent antidiabétique de la famille des TZD, la **Troglitazone** (appelée aussi **CS-045** (Sankyo) montra également sur des modèles animaux présentant des taux lipidiques et une glycémie élevée les mêmes résultats que ceux observés avec la Ciglitazone (Fujiwara *et al*., 1988).

Devant l'intérêt de cette famille de molécules en vue d'une utilisation clinique chez des patients présentant un diabète accompagné d'une résistance à l'insuline, d'autres composés de type glitazone furent développés : **Englitazone** (Pfizer) (Stevenson *et al*., 1990), **Pioglitazone** (Takeda) (Sohda *et al*., 1990), **Rosiglitazone** (ou **BRL 49653**) (Beecham) (Cantello *et al*., 1994), **Darglitazone** (Chaiken *et al*., 1995) et **MCC-555** (**Isaglitazone**) (Upton *et al*., 1998 ; Reganito *et al*., 1998). Ces composés sont des agonistes synthétiques de PPARγ. Possédant en commun la structure thiazolidine-2-4-dione, ils sont classés parmis les Thiazolidinediones (Ibrahimi *et al*., 1994 ; Forman *et al*., 1995 ; Lehmann *et al*., 1995) **(Figure 29)**. La RGZ à été

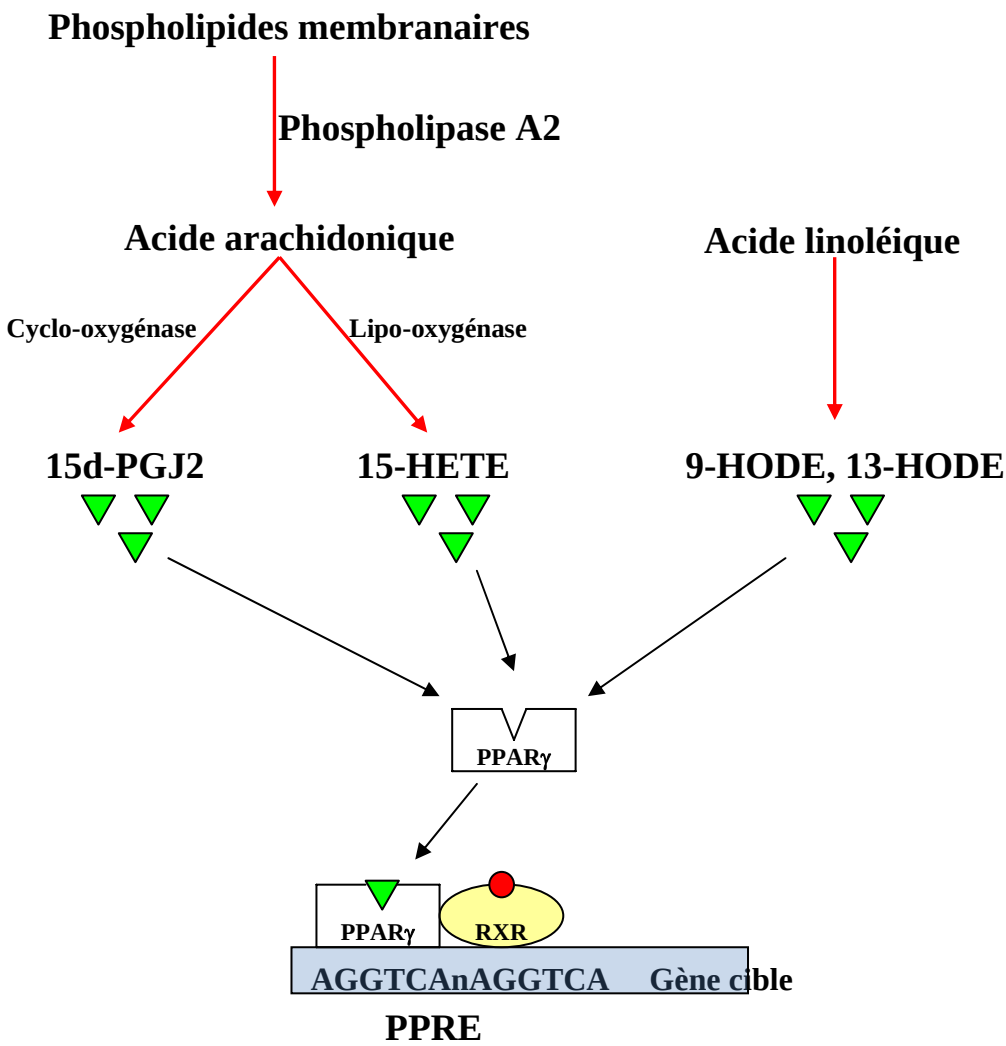
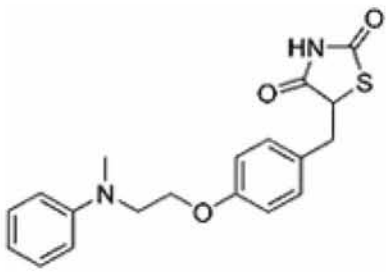
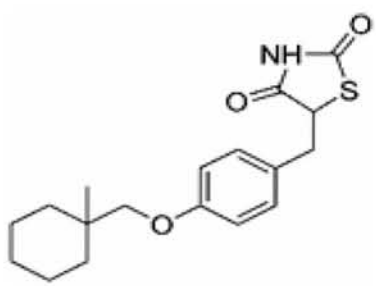


Figure 28. Ligands naturels et activation de la transcription par PPARγ. (HODE:acide hydroxyoctadécadiénoique ; HETE: acide hydroxyeicosatétraénoique 15d-PGJ$_2$: 15-déoxy-$\Delta^{12,14}$-prostagladine J$_2$)



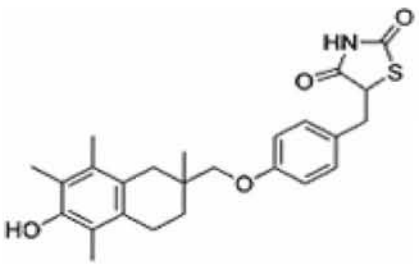
Rosiglitazone

Masse Moléculaire: 356, 44g
Formule moléculaire: $C_{19}H_{20}N_2O_3S$



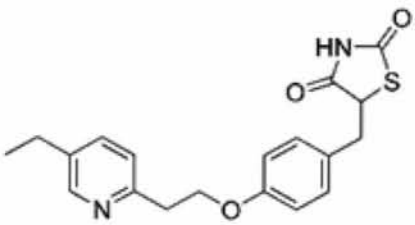
Ciglitazone

Masse Moléculaire: 333, 45g
Formule moléculaire: $C_{18}H_{23}NO_3S$



Troglitazone

Masse Moléculaire: 439, 57g
Formule moléculaire: $C_{25}H_{29}NO_4S$



Pioglitazone

Masse Moléculaire: 356, 44g
Formule moléculaire: $C_{19}H_{20}N_2O_3S$

Figure 29. Formule chimique de 4 Thiazolidinediones (Rosiglitazone, Ciglitazone, Troglitazone et Pioglitazone). Le cercle rouge indique le cycle thiazolidinedione : cycle à 5 liaisons avec un atome de soufre et un atome d'azote, substitué par 2 cétones. Ce cycle est aussi appelé cycle glitazone. (http://www.dalton.com)

identifiée comme le premier ligand de la famille des TZD ayant une très haute affinité de fixation sur PPARγ avec un Kd égal à 40 nM. La rosiglitazone (RGZ) ou BRL49653 établissent des liaisons hydrogènes entre l'atome d'N de la molécule TZD, les résidus tyrosine 473 et les histidines 323 et 449 de PPARγ **(Figure 30).** En outre, des liaisons hydrophobes sont réalisées avec le résidu lysine 469. Tous ces résidus sont localisés dans la région AF-2. Par ailleurs, le groupement pyridyl de la RGZ forme des interactions hydrophobes avec PPARγ. Les co-activateurs p300 et SRC-1 ont une faible affinité pour PPARγ lorsqu'il est activé par la troglitazone (TGZ). L'affinité est plus forte en présence de RGZ (Camp *et al*., 2000). Le co-régulateur CBP semble activer PPARγ en présence de ligands naturels issus de la voie lipooxygénase tandis que SRC-1 amplifie de préférence l'action de la 15d-PGJ_2 (Gelman *et al*., 2007).

Selon Willson *et al*., l'affinité de fixation des ligands est établie selon l'ordre : RGZ>PGZ>TGZ=CGZ (Willson *et al*., 1996). Par ailleurs, les ligands de type TZD n'ont pas d'effet agoniste ou antagoniste sur PPARα et PPARβ.

La Rosiglitazone (commercialisée sous le nom Avandia®) et la Pioglitazone (commercialisée sous le nom Actos®) sont toujours utilisées pour le traitement du diabète de type II mais toujours associées à la Metformine ou aux sulfonylurées (Boccara & Cohen, 2004).

Les essais cliniques avec la Troglitazone, Ciglitazone, Darglitazone et l'Englitazone ont été arrêtés car un certain nombre d'effets secondaires hépatiques sont apparus (Watkins & Whitcomb, 1998). Le MCC-555 est actuellement testé en essais cliniques de phase II (Parker, 2002).

4.2.2. Les ligands synthétiques non TZD

D'autres composés non TZD ont été mis au point et appartiennent à 3 classes définies : les agonistes mixtes, les agonistes complets, les SPARM :

►**Les agonistes mixtes**:

Les composés de cette classe pharmacologique visent à obtenir les effets hypoglycémiants de PPARγ sur le plan métabolique, éventuellement en les associant aux effets bénéfiques hypolipémiants des agonistes de PPARα, tout en minimisant les effets indésirables des thiazolidinediones. Muraglitazar, tesaglitazar, ragaglitazar, TAK 559, JTT 501, KRP-297 sont des exemples d'agonistes mixtes PPARα/γ (Shearer & Billin, 2007).

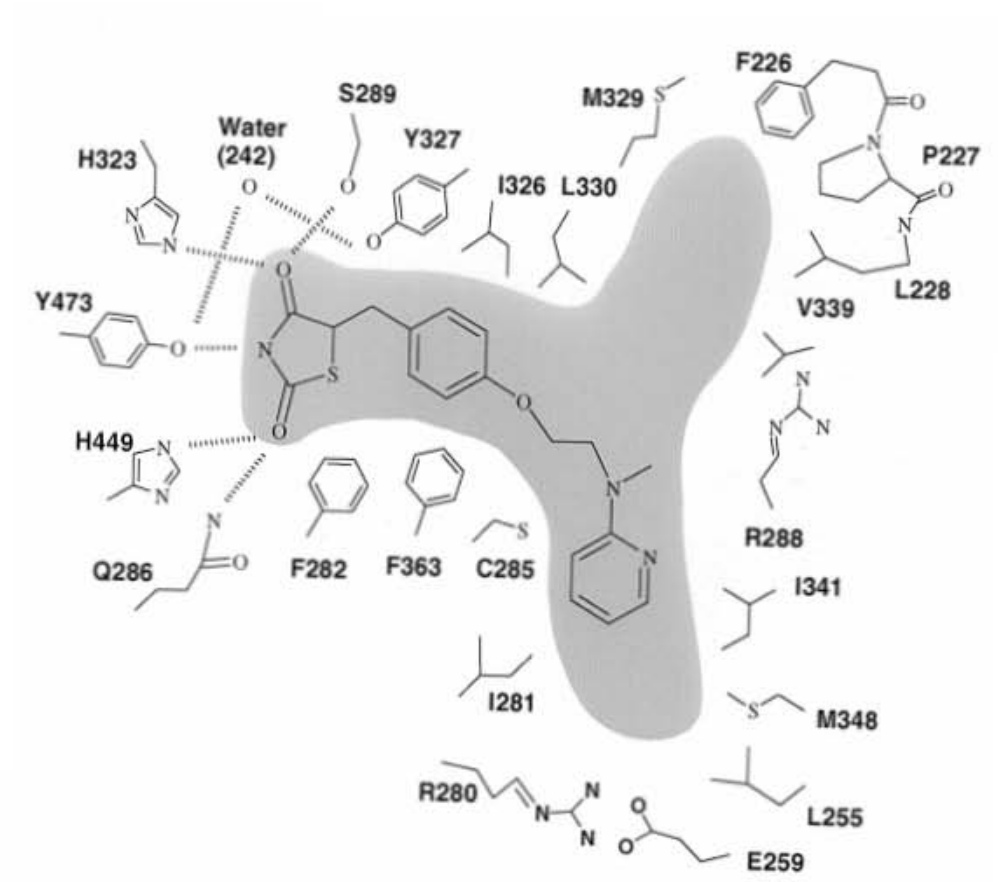


Figure 30. Représentation schématique de l'interaction entre la Rosiglitazone et le domaine LBD de PPARγ (Iwata *et al*., 2001).

►**les agonistes complets ou pan agonistes :**

Un agoniste complet est capable d'activer les 3 types de récepteurs PPARα, β, et γ. Ils ont actuellement en essais précliniques sur des rongeurs dans le traitement du diabète de type II.Ce sont par exemple : GW677954 et LY465608 (Shearer & Billin., 2007).

►**les SPARMγ** (Modulateurs Sélectifs de PPARγ):

Les SPARMγ sont des ligands qui, fixés sur PPARγ, induisent le changement spécifique de la conformation du récepteur et induisent la transcription d'un panel spécifique de gènes cibles. Le succès des SERMs (Tamoxifène et Raloxifène) a inspiré le développement des SPARMγ qui conserveraient l'efficacité observée avec les TZD mais diminueraient les effets secondaires liés à cette famille de molécule. Le mode d'action de ces ligands est différent de celui des TZD. Les SPARM auraient une affinité pour PPARγ supérieure à celle des TZD : ils activeraient PPARγ à des concentrations de l'ordre du nanomolaire voire sub-nanomolaire.

La modulation sélective de PPARγ est une nouvelle approche pharmacologique basée sur l'interaction entre récepteurs et co-facteurs. L'activité des SPARM varie selon le type de cellules et la quantité de co-activateurs présents. En effet, le niveau d'agonisme induit par un ligand est régulé par la quantité de co-activateurs recrutés dans un tissu donné. Par conséquent, un SPARM peut avoir différentes propriétés selon son contact avec les résidus du domaine LBD de PPARγ: il peut agir comme un agoniste entier dans un tissu si la concentration en co-activateurs est suffisante et comme un agoniste partiel ou un antagoniste dans un autre tissu si le niveau en co-activateurs est faible. Par ailleurs, le changement de conformation du récepteur induit pas le ligand joue un rôle clé dans le recrutement de co-activateurs.

Exemples de SPARMγs : GW 7845, GW 0207, MCC-555, GW0072, AMG-131, FK614, nTZDpa, S26948 (Fujimura *et al*., 2006 ; Shearer & Billin, 2007). Ils sont en cours d'essais thérapeutiques. Par exemple, le GW 7845 qui possède une activité anti-diabétique et inhibe la carcinogenèse et l'athérosclérose chez les rongeurs. Le GW 0207 est un ligand puissant et très sélectif qui agit sur la concentration plasmatique de glucose chez le rat (Houseknecht *et al*., 2002 ; Harrington *et al*., 2007).Le S26948 augmente la sensibilité à l'insuline mais, contrairement aux TZD classiques, il ne déclenche pas l'adipogénèse ce qui n'aboutit pas à la prise de poids habituellement observée avec des molécules de type TZD (Carmona *et al*., 2007).

►Les composés anti – inflammatoires non stéroidiens (AINS) :

Les composés anti-inflammatoires non stéroïdiens ont été identifiés comme activateurs de PPARγ. Parmi eux, l'indométhacine, utilisée pour la recherche sur la différenciation adipocytaire, active PPARγ. Il en est de même pour d'autres AINS comme l'ibuprofène et le fénoprofène. Les AINS activent PPARγ à des concentrations de l'ordre du micromolaire (Lehmann *et al*., 1997).

4.2.3. Les antagonistes de PPARγ

Utilisés en premier lieu pour inhiber la différenciation adipocytaire, les antagonistes de PPARγ les plus utilisés sont le GW9662, le T0070907 et le BADGE (Bisphénol A diglycidyl ether). Le GW9662 est le plus puissant de ces antagonistes et se fixe par liaison covalente sur le résidu Cys285 du domaine LBD de PPARγ (Leesnitzer *et al*., 2002). L'antagoniste T0070907 se fixe par liaison covalente au résidu Cys313 de PPARγ (Lee *et al*., 2002). BADGE est l'antagoniste ayant le moins d'affinité pour PPARγ (Wright *et al*., 2000).

V. Ligands de PPARγ et cancer du sein

Les fonctions de PPARγ ont surtout été explorées dans le cadre d'études sur la différenciation adipocytaire, l'inflammation et l'athérosclérose. Puisque les ligands de PPARγ sont capables d'induire la différenciation des adipocytes normaux, les premières études sur l'utilisation des TZD dans les processus cancéreux ont été réalisées sur des liposarcomes humains *in vitro* et *in vivo* (Tontonoz *et al*., 1997 ; Demetri *et al*., 1999). Devant les résultats encourageants montrant une inhibition de la croissance et une différenciation de ce type de tumeur, les études ont alors été élargies sur d'autres types de cancer, notamment les cancers du sein.

5.1. Expression de PPARγ dans les cellules cancéreuses mammaires

Les données de la littérature sont à ce propos contradictoires. PPARγ est exprimé dans le tissu mammaire sain et plusieurs auteurs ont établi que PPARγ est exprimé dans les cellules cancéreuses mammaires issues de tumeurs métastatiques ou non (Mueller *et al*., 1998). Le taux de protéines PPARγ est très élevé dans les tumeurs invasives par rapport au tissu mammaire environnant normal (Elstner *et al*., 1998). L'expression de PPARγ est augmentée de façon

drastique dans les tumeurs mammaires sur-exprimant ErbB2, en comparaison du tissu normal adjacent (Yang *et al*., 2003). En revanche, d'autres études rapportent que le tissu cancéreux mammaire, métastatique ou non, présente un faible taux d'ARNm PPARγ par rapport au tissu normal. Par ailleurs, un faible niveau d'ARNm PPARγ a été détecté dans des tumeurs de stade 3 à 4 de la classification TNM et dans des tumeurs issues de patientes ayant eu une récidive locale ou décédées de ce cancer (Badawi & Badr, 2003). Enfin, Yee *et al* ne montrent pas de différence d'expression de PPARγ entre tissu sain et tissu cancéreux (Yee *et al*., 2003).

Des données contradictoires existent aussi quant au lien entre mutation ou surexpression du gène PPARγ et l'apparition de cancer du sein. En effet, il a été montré que la surexpression de PPARγ chez des souris augmente le risque d'apparition de cancer de la glande mammaire (Saez *et al*., 2004). Une autre étude a établi que les souris hétérozygotes PPARγ+/- sont plus susceptibles que les souris sauvages à développer une tumeur mammaire induite par des carcinogènes (Koeffler, 2003).Une étude réalisée sur des lignées cancéreuses mammaires humaines suggère que les mutations de PPARγ dans ces cellules sont très rares (Posch *et al*., 2004).

5.2. Effets anticancéreux des ligands de PPARγ

L'induction de la différenciation de cellules cancéreuses ou de leur apoptose par les ligands des récepteurs nucléaires a été obtenue en premier lieu avec l'acide rétinoique notamment sur les cancer de la peau, de la tête et du cou (Hong *et al*., 1990 ; Lippman *et al*., 1992). Par la suite, les études se sont portées sur l'activation de PPARγ par ses ligands naturels ou synthétiques qui aboutit une inhibition de la prolifération, à l'apoptose ou à la différenciation des cellules cancéreuses. Ces résultats prometteurs permettent d'envisager une nouvelle approche thérapeutique pour le cancer du sein **(Figure 31)**.

► Ligands de PPARγ et différenciation :

Les premières études réalisées sur des cellules de liposarcome ont montré que les ligands de PPARγ induisaient leur différenciation terminale en adipocytes (Tontonoz *et al*., 1997). Par la suite, Mueller *et al*, ont établi que l'activation de PPARγ dans les cellules cancéreuses mammaires traitées par des ligands de type TZD entraîne une accumulation lipidique considérable, un changement de l'expression de gènes associés à un phénotype plus différencié ainsi qu'une diminution de la multiplication clonale (Mueller *et al*., 1998).

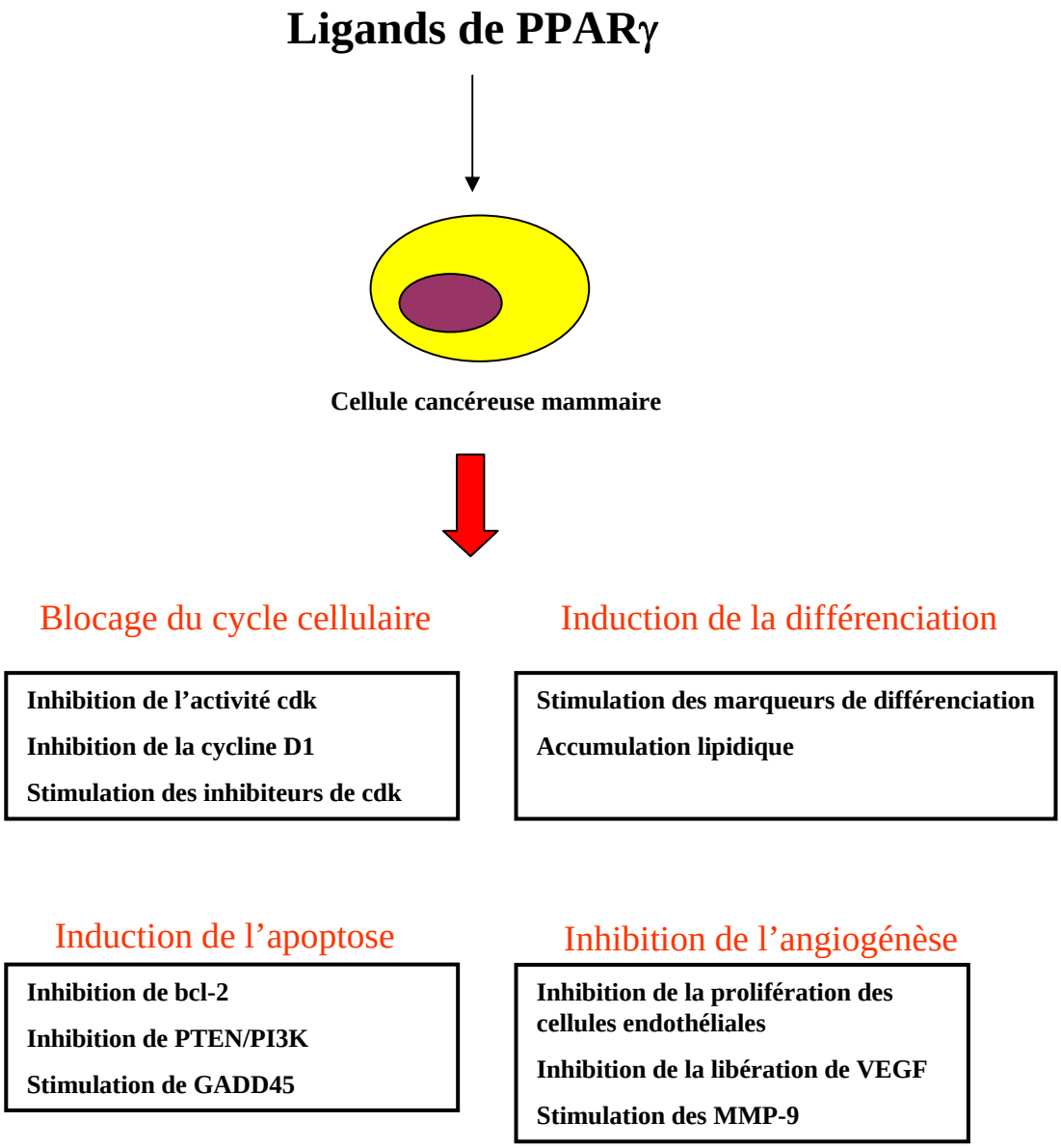


Figure 31. Mécanismes moléculaires impliqués dans les effets anti-prolifératifs des ligands de PPARγ sur les cellules cancéreuses mammaires.

► Ligands de PPARγ et arrêt du cycle cellulaire :

PPARγ est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire de lignées tumorales d'origines variées. Le mécanisme de régulation du cycle cellulaire repose essentiellement sur l'inhibition des cdk (cyclin-dependent kinase). La prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 traitées à la troglitazone est inhibée par blocage du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S. Une analyse par cytométrie de flux montre qu'un traitement à la troglitazone augmente le pourcentage de cellules en phase G1. Le passage de la phase G1 à la phase S est sous le contrôle de la protéine du rétinoblastome Rb. L'hyperphosphorylation de pRb est un évènement critique de la phase G1 permettant à la cellule d'entrer en phase S. La phosphorylation de pRb est principalement réalisée par le complexe cycline D1/cdk4. L'accumulation des cellules traitées à la troglitazone en phase G1 est expliquée par une atténuation de la phosphorylation de pRb associée à une diminution de l'activité du complexe cycline D1/cdk4 (Yin *et al*., 2001).

Le CDDO, un ligand synthétique non TZD, induit un arrêt complet du cycle cellulaire avec une accumulation des cellules en phase G1 due à la diminution de l'expression de la cycline D1 corrélée à l'augmentation du taux de l'inhibiteur de cdk, $p21^{waf1/cip1}$ (Lapillonne *et al*., 2003).

► Ligands de PPARγ et apoptose :

L'apoptose est régulée d'une part par l'expression de gènes suppresseurs de tumeur comme p53 et BRCA1, d'autre part par la famille des protéines bcl-2 et des caspases.

Les ligands de PPARγ induisent l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires *in vivo* et *in vitro*. *In vivo*, la TGZ induit l'inhibition de la croissance tumorale et l'apoptose sans signe de toxicité chez des souris immunodéficientes dans lesquelles des cellules MCF-7 ont été injectées (Elstner *et al*., 1998). *In vitro*, l'exposition des cellules cancéreuses mammaires à la TGZ entraîne une diminution du taux de la protéine anti-apoptotique bcl-2 à un niveau quasi-indétectable. Un effet similaire est observé dans une culture de tissus mammaires cancéreux issus de biopsies. Il n'est pas observé dans un tissu sain (Elstner *et al*., 1998).

L'apoptose est corrélée à une stimulation de l'expression du gène GADD45 impliqué dans l'arrêt de la croissance cellulaire. Une inhibition de l'expression de GADD45 par ARN interférence annule l'apoptose induite par la TGZ (Yin *et al*., 2004).

L'apoptose associée à l'expression des inhibiteurs de cdk, $p21^{waf1/cip1}$ et $p27^{kip1}$, est également observée pour les cellules métastatiques de la lignée MDA-MB-231 traitées à la 15d-PGJ_2 (Clay *et al*., 1999 ; Clay *et al*., 2001).

La RGZ induit l'apoptose en stimulant l'expression de PTEN (gène suppresseur de tumeurs) jouant un rôle clef dans l'apoptose ; ceci est corrélé à une diminution de l'activité PI3K (activée de façon constitutive dans de nombreux types de cancers) ayant pour conséquence une inhibition de la prolifération (Patel *et al*., 2001).
L'apoptose des cellules MCF-7 est observée lorsque la protéine ErbB2 appartenant à la famille des EGF, très exprimée dans les tumeurs mammaires et associée à un mauvais pronostic, est inhibée par la 15d-PGJ_2 (Pignatelli *et al*., 2001).

► Ligands de PPARγ et inhibition de l'angiogénèse :

Comme nous l'avons vu précédemment, l'angiogenèse est un processus décrivant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants. C'est un processus physiologique normal mais aussi pathologique et primordial dans la croissance des tumeurs malignes et le développement des métastases.
In vivo, un traitement à la RGZ entraîne la diminution des métastases pulmonaires chez les souris ayant développé une tumeur mammaire, par inhibition de l'activité MMP-9 (Magenta *et al*., 2008). *In vitro*, la migration des cellules MDA-MB-231 est inhibée par la 15d-PGJ_2 (Liu *et al*., 2003).
La RGZ, la TGZ et la 15d-PGJ_2 limitent l'angiogénèse notamment par l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales et la libération de facteurs de la famille des VEGF (Fenner & Elstner, 2005).

5.3. Effets anti-cancéreux des TZD indépendamment de PPARγ

Bien que le potentiel thérapeutique des ligands de PPARγ comme agents anti-tumoraux soit clairement établi, leur mécanisme d'action et le rôle de PPARγ sont mal connus. Le rôle de PPARγ dans l'inhibition de la croissance des tumeurs mammaires a son importance pour interpréter les résultats des essais cliniques effectués avec les TZD et comprendre ainsi leur pharmacologie. Les cibles directes de PPARγ qui entraînent l'inhibition de la prolifération sont difficiles à définir de façon précise et plusieurs éléments suggèrent que les effets inhibiteurs des TZD sont indépendants du récepteur PPARγ.
Par exemple, il n'existe pas de corrélation entre la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires aux ligands de PPARγ et le niveau d'expression du récepteur lui-même (Mueller *et al*., 1998). En outre, *in vitro*, l'effet anti-tumoral des TZD est indépendant de leur puissance

d'activation de PPARγ : la TGZ et la CGZ ont une action antitumorale plus forte que la RGZ et la PGZ. Enfin, des cibles non spécifiques de PPARγ sont impliquées dans les effets antiprolifératifs des TZD. Par exemple : la TGZ et/ou la CGZ induisent une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique EGR-1 dans les cellules de carcinome coliques (Baek *et al*., 2003) et des inhibiteurs de CDK p27 et p21 des cellules cancéreuses pancréatiques ou leucémiques (Sugimura *et al*., 1999 ; Motomura *et al*., 2000). Ces cibles apparaissent comme spécifiques du type cellulaire.

Peu d'études rapportent les effets des TZD indépendants de PPARγ dans les cellules cancéreuses mammaires. Pour étudier cette voie, deux approches ont été envisagées : l'utilisation d'antagonistes de PPARγ et l'utilisation d'analogues inactifs des TZD qui n'activent pas le récepteur.

L'apoptose des cellules MDA-MB-231 induite par la 15d-PGJ_2 est indépendante de l'activation de PPARγ et n'est pas inhibée par l'antagoniste GW9662 (Clay *et al*., 2002).

La TGZ induit l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires suite à une diminution du pH et à une inhibition de la synthèse d'ADN. Cet effet n'est pas inhibé par le GW9662. Il est confirmé dans les cellules NIH3T3 mutées pour PPARγ (Turturro *et al*., 2004).

Un co-traitement des cellules cancéreuses mammaires avec l'antagoniste GW9662 et la RGZ n'empêche pas l'inhibition de croissance cellulaire induite par la RGZ (Seargent *et al*., 2004).

La TGZ et la CGZ, en combinaison avec le GW9662, entraînent une diminution du taux de cycline D1 dans les cellules cancéreuses mammaires hormono-dépendantes et non hormono-dépendantes indépendamment de PPARγ (Huang *et al*., 2005).

Les antagonistes GW9662 et BADGE utilisés seuls, inhibent également la prolifération des cellules cancéreuses mammaires (Seargent *et al*., 2004 ; Lea *et al*., 2004).

L'étude de la voie PPARγ-indépendante à l'aide d'antagonistes ne s'est pas limitée aux cellules cancéreuses mammaires. En effet, les ligands de type TZD inhibent la croissance cellulaire et entraînent l'apoptose des cellules cancéreuses du côlon, de gliomes, des cellules leucémiques et des cellules souches embryonnaires de souris $PPAR\gamma^{-/-}$ (Palakurthi *et al*., 2001 ; Abe *et al*., 2002 ; Perez-Ortiz *et al*., 2004 ; Pandhare *et al*., 2006).

Pour expliquer le phénomène d'apoptose induite par les ligands de PPARγ, il a été établi que ces ligands agissent sur le potentiel de membrane mitochondrial et sur la libération des facteurs apoptotiques à partir de la mitochondrie dans les cellules cancéreuses ce qui constitue une voie alternative à celle de PPARγ (Perez-Ortiz *et al*., 2004 , Clay *et al*., 2002).

La synthèse de dérivés inactifs des TZD a permis de dissocier les effets liés à la voie PPARγ–indépendante de ceux liés à la voie PPARγ-dépendante. Ces analogues, appelés Δ2, différent des molécules de base par addition d'une double liaison à proximité du noyau thiazolidine-2,4-dione **(Figure 32)**. L'inactivation de PPARγ par ces composés à été vérifiée dans les cellules cancéreuses de prostate. Ces cellules ont été transfectées avec un plasmide contenant un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur contenant l'élément de réponse de PPAR (PPRE). L'activité luciférase mesurée montre qu'aucun de ces dérivés n'a de pouvoir trans-activateur de PPARγ (Shiau *et al*., 2005). La perte d'activité de PPARγ est attribuée à la rigidité structurale des analogues due à l'addition de la double liaison supplémentaire.

Les effets de ces molécules ont surtout été étudiés sur les lignées cancéreuses de prostate. La Δ2-TGZ inhibe de façon plus drastique la prolifération cellulaire que la TGZ. Un effet similaire est observé avec la Δ2-CGZ. Par contre la Δ2-RGZ et laΔ2-PGZ n'ont pas d'effet sur la prolifération cellulaire (Weng *et al*., 2006).

Une étude effectuée sur les cellules cancéreuses mammaires rapporte qu'un traitement avec les dérivés Δ2-TGZ ou Δ2-CGZ entraînent une protéolyse de la cycline D1 plus importante que celle observée avec un traitement à la TGZ ou la CGZ (Huang *et al*., 2005).

Le composé Δ2-TG-6 est un analogue plus puissant que la TGZ et la Δ2-TGZ pour l'induction de la dégradation de la cycline D1 et l'inhibition de la prolifération des cellules MCF-7. L'effet antiprolifératif est attribué à l'induction de l'apoptose par clivage des PARP (Weng *et al*., 2006).

5.4. "Cross-talk" entre ER et PPARγ

Il existe peu d'études qui relatent une interaction entre les voies de signalisation des ER et de PPARγ. Néanmoins il semble que le cross talk soit bidirectionnel. Une seule étude rapporte que les ERα et β inhibent la transactivation de PPARγ stimulé par la RGZ dans les cellules cancéreuses mammaires non hormono-dépendantes MDA-MB-231, bien que l'expression des ER soit faible dans ces cellules (Wang & Kilgore., 2002).

Suzuki *et al*. montrent qu'il existe une forte corrélation entre PPARγ et ERα dans les carcinomes mammaires, ce qui suggère une possible modulation de l'action œstrogénique par PPARγ. Le ligand naturel de PPARγ, la 15d-PGJ_2 inhibe la transactivation d'un ERE transfecté

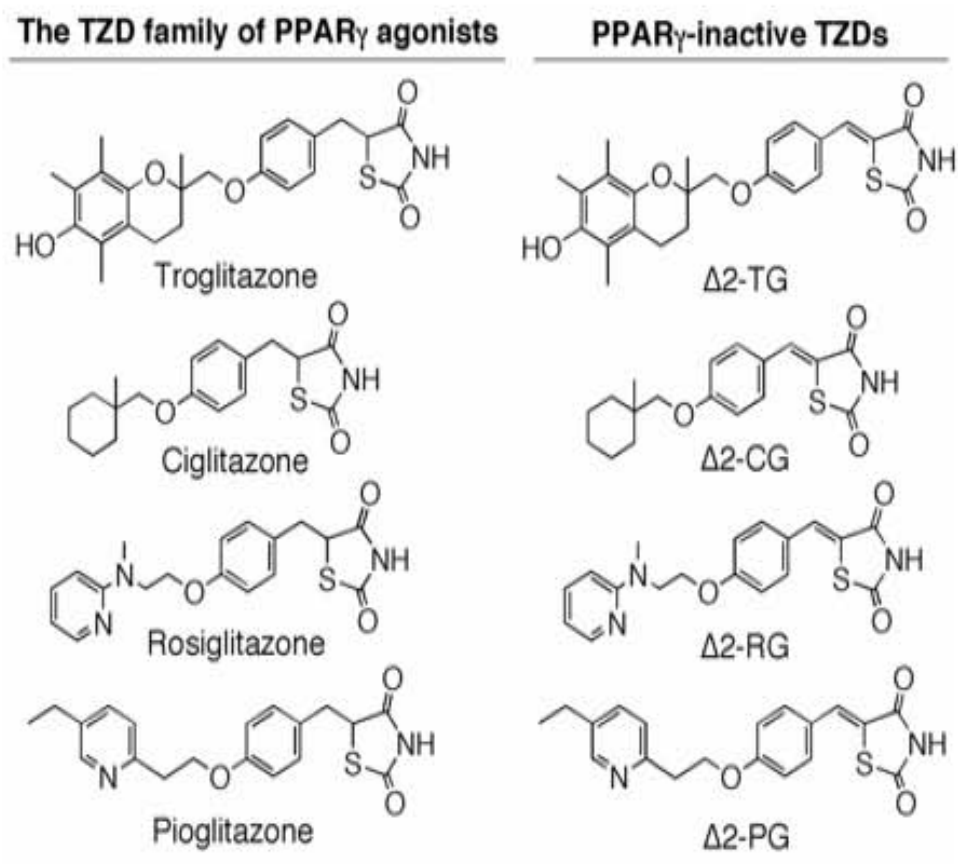


Figure 32. Structure chimique des analogues inactifs de quatre thiazolidinediones. Par rapport à la molécule de base, ces analogues possèdent une double liaison près du noyau thiazolidine-2,4-dione (Weng *et al*., 2006)

dans les cellules MCF-7 traitées à l'E_2. Cet effet est aussi observé après un traitement avec 2 autres ligands de PPARγ : le GW1929 et la ciglitazone. Ce résultat a été confirmé sur un gène cible de ERα : le Récepteur à la Progestérone, dont l'expression diminue en présence de 15d-PGJ_2. De plus, la prolifération des cellules MCF-7 médiée par les œstrogènes est inhibée lors d'un traitement à la 15d-PGJ_2 (Suzuki *et al*., 2006).

5.5. Essais cliniques des ligands de PPARγ sur le cancer du sein

Un essai clinique est une étude scientifique réalisée en thérapeutique médicale humaine ou animale pour évaluer l'innocuité et l'efficacité d'une méthode diagnostique ou d'un traitement. Un essai clinique se déroule le plus souvent en quatre phases bien distinctes. La phase I est une étude préliminaire sur l'efficacité d'un médicament. Elle a lieu après la phase d'expérimentation animale. Il s'agit d'évaluer la tolérance et l'absence d'effets secondaires chez des sujets le plus souvent volontaires sains, rémunérés pour cela. Parfois ces essais peuvent être proposés à des patients en impasse thérapeutique, pour lesquels le traitement étudié représente la seule chance de survie. Les groupes étudiés sont le plus souvent de petite taille (20 à 80 participants). La phase II consiste à déterminer la dose optimale et à contrôler les effets secondaires. Cette phase fait appel à des groupes de 20 à 300 participants. La phase III est une étude comparative d'efficacité proprement dite. Elle compare le traitement soit à un placebo, soit à un traitement de référence. Les groupes sont de taille importante, souvent plusieurs milliers de participants. Il s'agit de programmes extrêmement onéreux, payés par les compagnies pharmaceutiques. La phase IV correspond au suivi à long terme d'un traitement et vise à dépister des effets secondaires rares ou des complications tardives.

Suite aux nombreux résultats précliniques *in vitro* et *in vivo* décrivant les effets anti-prolifératifs de la TGZ sur les cellules cancéreuses, des essais cliniques ont été envisagés. Les premiers essais cliniques ont été réalisés sur des patients atteints de liposarcomes qui, traités à la TGZ, ont montré une différenciation adipocytaire des cellules tumorales (Demetri *et al*., 1999).

Concernant le cancer du sein, l'étude publiée par Burstein *et al*. a été réalisée en 1999 sur 22 patientes d'une moyenne d'âge de 53 ans, qui présentaient un cancer du sein avancé ou métastatique ne répondant plus aux thérapies classiques. Les patientes ont reçu 800 mg de TGZ (Rezulin®) par jour et l'essai a été programmé pour une durée de 6 mois. Cette étude avait pour but de déterminer le pourcentage de patientes qui présentaient une évolution tumorale stabilisée

ou diminuée après 6 mois de traitement. La TGZ est bien tolérée mais pour la plupart des patientes, la maladie n'a pas régressé suite au traitement. Seules 3 patientes ont vu une évolution de leur cancer stabilisée (Burstein et al., 2003). Mais en 2000, un rapport public rendu par la FDA (Food and Drug Administration (USA)) a établi que la troglitazone provoque de sérieux dysfonctionnements hépatiques entraînant ainsi son retrait du marché aux USA et au Japon. En Europe, la troglitazone est retirée du marché au Royaume Uni et dans les autres pays les essais cliniques sont suspendus (Scheen, 2001).

Les effets de la RGZ ont été testés sur 38 patientes atteintes d'un cancer du sein *in situ* ou invasif. Les patientes ont reçu 8 mg de RGZ par jour sur une durée comprise entre 2 et 6 semaines. La RGZ est bien tolérée. La prolifération tumorale est analysée en regardant l'expression du marqueur Ki67 (protéine nucléaire exprimée par les cellules en prolifération). Les résultats ont montré que la RGZ n'a pas d'effet sur la prolifération car il n'y a pas de différence d'expression de Ki67 avant et après le traitement. L'absence d'effet sur la prolifération tumorale est peut être due à la durée courte du traitement (Yee *et al*., 2007). La RGZ est toujours sur le marché dans le cadre du traitement du diabète de type II.

Pour conclure, nous pouvons dire que les essais cliniques avec les composés de type TZD utilisés seuls montrent peu de résultats encourageants malgré un effet inhibiteur observé avec la TGZ sur un petit nombre de patientes. Comme le suggèrent des études précliniques, il serait envisageable de combiner les TZD avec d'autres molécules comme les rétinoïdes et observer ainsi une diminution de la croissance tumorale (Elstner *et al*., 1998 ; Elstner *et al*., 2002).

VI. Objectif de la thèse

Le récepteur alpha des œstrogènes est une cible privilégiée dans le traitement du cancer du sein. En effet, 70% de ces tumeurs sont hormono-dépendantes, c'est-à-dire qu'elles expriment ERα et que les œstrogènes contrôlent leur prolifération. Puisque les agonistes de PPARγ présentent des propriétés anti-prolifératives et proapoptotiques, nous avons étudié leurs effets sur la voie de signalisation des œstrogènes.

Les résultats obtenus au cours de la thèse sont présentés sous forme d'articles parus ou à soumettre. Chaque article est précédé d'une introduction brève situant les principales données disponibles au moment des travaux.

La première partie s'intitule "Caractérisation de la dégradation de ERα par les ligands de PPARγ" et correspond à un article paru. Nous y démontrons que certains composés de la famille des thiazolidinediones induisent une dégradation des récepteurs des œstrogènes alpha qui est obtenue de façon PPARγ-indépendante.

La deuxième partie présente des résultats non encore publiés relatifs à l'élucidation des mécanismes impliqués dans la protéolyse de ERα. Nous avons montré que ERβ n'est pas affecté par les différents ligands de PPARγ, ce qui pourrait être intéressant au vu de son association à un pronostic favorable. Nous avons également pu obtenir un dérivé biotinylé plus efficace que le composé d'origine. Ceci laisse envisager la possibilité de modifier chimiquement ces molécules pour les utiliser en thérapeutique.

Tous les résultats obtenus sont discutés dans le dernier chapitre intitulé "Conclusions et perspectives".

En annexe, sont présentés deux articles auxquels j'ai contribué mais qui ne concernent pas directement le sujet de ma thèse : ils relatent les effets de l'alcool sur les cellules cancéreuses mammaires. Le premier article est paru, le second est soumis.

CHAPITRE II

RESULTATS

I. Caractérisation de la dégradation de ERα par les ligands de PPARγ

Disruption of ERα signalling pathway by PPARγ agonists: evidences of PPARγ-independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines.
Julie LECOMTE, Stéphane FLAMENT, Stéphane SALAMONE, Michel BOISBRUN, Sabine MAZERBOURG, Yves CHAPLEUR and Isabelle GRILLIER-VUISSOZ. Breast Cancer Research and Treatment, 112:437-51, 2008.

1.1. Introduction

Les ligands de PPARγ, principalement les thiazolidinediones, exercent un effet antiprolifératif sur les cellules cancéreuses mammaires et induisent leur différenciation *in vivo* et *in vitro*. (Elstner *et al*., 1998 ; Mueller *et al*., 1998 ; Kim *et al*., 2006). L'inhibition de la prolifération est associée à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et à l'apoptose (Fenner & Elstner, 2005 ; Yin *et al*., 2001). Par leurs propriétés anti-tumorales, les agonistes de PPARγ ont été proposés pour des essais cliniques sur des patientes atteintes de cancer mammaire (Burstein *et al*., 2003 ; Yee *et al*., 2007).
Près de 70% des cancers du sein surexpriment ERα. Associé à la prolifération tumorale, ERα représente une cible thérapeutique des cancers du sein hormono-dépendants. Au début de notre étude, les données de la littérature rapportaient qu'un traitement des cellules MCF-7 avec la ciglitazone, induit la dégradation de ERα via le protéasome 26S entraînant ainsi un arrêt de la prolifération cellulaire (Qin *et al*., 2003). Cette dégradation n'était pas qualifiée comme indépendante de PPARγ. Pour notre part, nous démontrons que la dégradation de ERα et l'inhibition de la prolifération cellulaire ne sont pas équivalentes selon les ligands utilisés. Par ailleurs, nous constatons que l'altération de ERα induite par la TGZ et indépendante de PPARγ n'est pas restreinte à la lignée MCF-7. Ces résultats offrent une perspective pour la synthèse de nouveaux dérivés thérapeutiques efficaces sur la dégradation de ERα et n'activant pas PPARγ.

1.2. Principaux résultats

Dans un premier temps, nous avons analysé l'effet de la troglitazone sur l'expression du gène codant le récepteur à la progestérone (PR) afin d'apprécier la fonctionnalité de la voie de signalisation des récepteurs des œstrogènes. Les analyses par RT-PCR semi-quantitative ont

montré que le taux d'ARNm du PR diminue lorsque les cellules MCF-7 et ZR-75-1 sont traitées avec 1, 10 et 25 µM de TGZ pendant 24h. Dans les cellules MCF-7, ce taux d'ARNm diminue de 2,7 et 16 fois pour les doses de TGZ de 10 et 25 µM respectivement. Les cellules ZR-75-1 sont plus sensibles à la TGZ que les cellules MCF-7 puisque le taux d'ARNm diminue de 3,5, 10 et 25 fois pour les doses de TGZ de 1, 10 et 25 µM respectivement. De plus, l'effet stimulateur de l'œstradiol (1nM) sur l'expression du PR est fortement inhibé par la TGZ (25 µM). Ainsi, nous avons conclu que la TGZ affecte la voie de signalisation des œstrogènes dans les cellules MCF-7 et ZR-75-1.

Suite à ce résultat, nous avons alors étudié le taux de protéines ERα dans chaque type cellulaire. Après traitement des cellules pendant 24h avec 25 µM de TGZ, l'analyse par Western blot révèle une diminution complète du signal ERα pour les cellules ZR-75-1 et de 86% pour les cellules MCF-7. La diminution du taux protéique n'est pas corrélée à une diminution du taux d'ARNm codant ERα. En utilisant un inhibiteur de protéasome, le MG 132 (5 et 10 µM), nous démontrons que la dégradation de ERα induite par la TGZ est dépendante du protéasome dans les 2 lignées cellulaires après 18h de traitement.

Nous avons ensuite comparé la TGZ d'autres agonistes de PPARγ pour leur capacité à induire la protéolyse de ERα. Nous avons choisi 2 autres molécules synthétiques de la famille des thiazolidinediones : la CGZ et la RGZ, et un ligand naturel : la 15d-PGJ_2. Nous avons, d'une part, vérifié que les différents composés activent PPARγ par transfection des cellules MCF-7 avec la construction plasmidique pPPRE3tkLuc. Après 24h de traitement avec 25 µM de RGZ, TGZ, CGZ et 15d-PGJ_2, l'activité luciférase est stimulée de 2,39, 1,93, 1,88, et 1,72 fois respectivement. D'autre part, dans les cellules MCF-7, la 15d-PGJ_2 induit une dégradation aussi efficace que la TGZ tandis que la CGZ a un effet plus faible. La RGZ n'induit pas la protéolyse de ERα. Le même résultat est observé pour les cellules ZR-75-1. Cependant, cette lignée est plus sensible à la TGZ et à la CGZ. La RGZ n'induit pas une dégradation significative de ERα. Les cellules exposées à la RGZ et à la TGZ ont été étudiées par immunocytochimie. Conformément aux résultats obtenus par Western blot, le marquage nucléaire observé avec un anticorps dirigé contre ERα est maintenu dans les cellules traitées à la RGZ alors qu'il disparaît dans les cellules traitées à la TGZ. En revanche, le marquage nucléaire est maintenu lorsque les cellules sont cotraitées à la TGZ et au MG 132.

Nous avons également mesuré la prolifération des cellules MCF-7 et ZR-75-1 traitées avec chaque ligand à la concentration de 25 µM pendant 24h. La prolifération des 2 lignées n'est pas

affectée par la RGZ tandis qu'un traitement à la CGZ, la TGZ ou la 15d-PGJ_2 diminue significativement le nombre de cellules. Cette diminution est plus drastique pour la lignée ZR-75-1. L'effet de la RGZ à été évalué sur une durée de 72h. La prolifération des 2 lignées cellulaires est inhibée significativement après 48h et 72h de traitement.

Nous avons déterminé si la protéolyse de ERα est liée à l'activation de PPARγ. Pour cette analyse, nous avons principalement utilisé la TGZ. Dans un premier temps, nous avons cotraité les cellules MCF-7 et ZR-75-1 avec des doses plus faibles de TGZ (10 et 15 µM) et de l'Acide *9-cis* Rétinoïque (*9-cis* AR) (10^{-7} M). La dégradation de ERα n'est pas amplifiée par le *9-cis* AR dans chaque lignée cellulaire. Dans un second temps, pour déterminer si la dégradation de ERα induite par la TGZ dépend de PPARγ, nous avons cotraité les 2 lignées cellulaires avec la TGZ (25 µM) et 3 antagonistes de PPARγ : GW 9662, T0070907 et BADGE. Pour la lignée MCF-7, T0070907 et BADGE potentialisent cette protéolyse. Le niveau de dégradation induit par la TGZ associée au GW 9662 est le même que celui induit par la TGZ seule. Pour la lignée ZR-75-1, les 3 composés n'antagonisent pas la protéolyse de ERα induite par la TGZ. Par ailleurs, la protéolyse de ERα est toujours induite par la TGZ et la 15d-PGJ2 lorsque l'expression de PPARγ est inhibée par ARN interférence. Enfin, la protéolyse de ERα est toujours observée après exposition des cellules MCF-7 et ZR-75-1 à un dérivé insaturé de la TGZ qui n'active pas PPARγ, la Δ2-TGZ.

1.3. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons confirmé que les ligands de PPARγ affectent la voie de signalisation des œstrogènes en induisant la dégradation protéasome-dépendante de ERα dans 2 lignées cellulaires mammaires hormono-dépendantes. Par ailleurs, la protéolyse de ERα s'accompagne d'une diminution de la prolifération cellulaire et ne dépend pas de la puissance d'activation des ligands de PPARγ. Enfin nous avons montré que la dégradation de ERα est indépendante de la voie PPARγ dans les 2 lignées cellulaires. L'utilisation de dérivés inactifs sur PPARγ pourrait être intéressante dans le cadre d'une thérapie du cancer du sein hormono-dépendant.

Breast Cancer Res Treat
DOI 10.1007/s10549-007-9886-z

PRECLINICAL STUDY

Disruption of ERα signalling pathway by PPARγ agonists: evidences of PPARγ-independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines

Julie Lecomte · Stéphane Flament · Stéphane Salamone · Michel Boisbrun · Sabine Mazerbourg · Yves Chapleur · Isabelle Grillier-Vuissoz

Received: 29 August 2007 / Accepted: 26 December 2007
© Springer Science+Business Media, LLC. 2008

Abstract Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) is a nuclear receptor that can be activated by natural ligands such as 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 (15d-PGJ(2)) as well as synthetic drugs such as thiazolidinediones. The treatment of human breast cancer cell lines with PPARγ agonists is known to have antiproliferative effects but the role of PPARγ activation in the process remains unclear. In the present study, we investigated the effects of four PPARγ agonists, Rosiglitazone (RGZ), Ciglitazone (CGZ), Troglitazone (TGZ) and the natural agonist 15d-PGJ(2), on estrogen receptor alpha (ERα) signalling pathway in two hormone-dependent breast cancer cell lines, MCF-7 and ZR-75-1. In both of them, TGZ, CGZ and 15d-PGJ(2) induced an inhibition of ERα signalling associated with the proteasomal degradation of ERα. ZR-75-1 cells were more sensitive than MCF-7 cells to these compounds. Treatments that induced ERα degradation inhibited cell proliferation after 24 h. In contrast, 24 h exposure to RGZ, the most potent activator of PPARγ disrupted neither ERα signalling nor cell proliferation. 9-*cis* retinoic acid never potentiated the proteasomal degradation of ERα. PPARγ antagonists (T0070907, BADGE and GW 9662) did not block the proteolysis of ERα in MCF-7 and ZR-75-1 cells treated with TGZ. ERα proteolysis still occurred in case of PPARγ silencing as well as in case of treatment with the PPARγ-inactive compound Δ2-TGZ, demonstrating a PPARγ-independent mechanism. The use of thiazolidinedione derivatives able to trigger ERα degradation by a PPARγ-independent pathway could be an interesting tool for breast cancer therapy.

Keywords Breast cancer · ERα · PPARγ · PPAR-independent · Troglitazone

J. Lecomte · S. Flament (✉) · S. Mazerbourg · I. Grillier-Vuissoz
EA 3442 Aspects cellulaires et moléculaires de la reproduction et du développement, Faculté des Sciences, Nancy-Université, Université Henri Poincaré, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, Cedex, France
e-mail: stephane.flament@scbiol.uhp-nancy.fr

S. Salamone · M. Boisbrun · Y. Chapleur
Groupe S.U.C.R.E.S., UMR 7565 Nancy-Université, CNRS, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, Cedex, France

Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPARs) are ligand-activated transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily [1]. Three types of receptors have been described in human, rodents and Xenopus: α, β (also called δ) and γ [2–4]. Activation of PPARs involves ligand binding, heterodimerization with the retinoid X receptor (RXR) and interaction with a specific response element (PPRE) leading to the transcription modulation of the target gene facilitated by coactivators recruitment [5–8].

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) is activated by endogenous ligands, the polyunsaturated fatty acids, mainly arachidonic derivatives such as 15d-PGJ(2) [9–11]. Non-steroidal anti-inflammatory drugs such as ibuprofen activate PPARγ [12]. Thiazolidinediones including Troglitazone (TGZ, Rezulin), Rosiglitazone (RGZ, Avandia), Pioglitazone (Actos) and Ciglitazone (CGZ) are synthetic PPARγ agonists belonging to a class of drugs used in the treatment of type II diabetes [13]. Recently novel non-thiazolidinedione PPARγ agonists were discovered [14].

PPARγ is more expressed in human breast carcinoma cells than in normal epithelial cells [15]. PPARγ ligands, mainly thiazolidinediones, inhibit proliferation and induce differentiation of breast cancer cell lines in vitro and in vivo [14, 16–18]. Growth inhibition is associated with apoptosis and alteration in cell-cycle progression through the over-expression of the cdk inhibitors p21 and p27 and the repression of cyclin D1 expression [19, 20]. PPARγ agonists inhibit also breast tumor angiogenesis and cell migration [21, 22]. Consequently, PPARγ agonists have been proposed as anticancer agents and tested in clinical trials for breast cancer [23, 24].

About 70% of breast cancer patients have ERα positive tumors [25, 26]. Consequently, ERα is a target for the treatment of ERα-positive breast cancer. Interestingly, ERα and PPARγ signalling pathway can interact. Indeed, in MCF-7 cells, the expression of either ERα or β lowers both basal and thiazolidinedione-stimulated PPARγ-mediated reporter activity [27]. This could be due to the fact that ERα physically associates with PPARγ [28]. PPARγ-independent mechanisms have been also reported [29–35]. For instance, the treatment of MCF-7 cells with either 15d-PGJ(2), TGZ or CGZ induces the proteolysis of cyclin D1 and ERα and inhibits cell proliferation [29, 36]. 15d-PGJ(2) significantly inhibits ERE-dependent transactivation by estradiol in MCF-7 cells, as well as estrogen-mediated proliferation of these cells [37, 38]. Covalent modifications between 15d-PGJ(2) and cysteine residues within the ERα DNA binding domain could explain that this compound inhibits both hormone-dependent and hormone-independent ERα transcriptional activity in MCF-7 [38].

In vitro studies demonstrating the PPARγ-independent alteration of ERα signalling by PPARγ ligands were only performed on one hormone-dependent cell line: MCF-7. Besides, the PPARγ-independent mechanism was deduced from studies using either PPARγ antagonists or thiazolidinedione derivatives that could not activate PPARγ. In order to extend our understanding on this process, we performed a comparative study on two estrogen-dependent cell lines (MCF-7 and ZR-75-1) exposed to four different PPARγ agonists. In both cell lines, TGZ, CGZ and 15d-PGJ(2) triggered proteasomal-dependent ERα degradation in a PPARγ-independent manner demonstrated not only by the use of antagonists and inactive TGZ derivative but also by targeting PPARγ by siRNA. The compounds that induced ERα degradation inhibited cell proliferation after a 24 h treatment. In contrast, 24 h exposure to RGZ disrupted neither ERα signalling nor cell proliferation. So, the alteration of ERα signalling by PPARγ agonists is not restricted to MCF-7 cells and this property is not a common feature of all ligands. These findings offer new perspectives for the design of PPARγ agonists-derived therapeutic agents targeting ERα in breast cancer.

Materials and methods

Cell culture and reagents

MCF-7 and ZR-75-1 human breast cancer cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD). MCF-7 cells were grown at 37°C under 5% CO_2 in phenol red Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Eurobio, Les Ulis, France) and 2 mM L-glutamine. ZR-75-1 cells were grown at 37°C under 5% CO_2 in phenol red RPMI-1640 supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine and 1mM Sodium Pyruvate.

The TGZ (Sigma-Aldrich), CGZ, RGZ, 15d-PGJ(2), proteasome inhibitor MG132 (Calbiochem, La Jolla, CA), GW 9662, BADGE (Sigma-Aldrich) and T0070907 (Calbiochem) were dissolved in DMSO. The synthesis of Δ2-TGZ was achieved according to slight modifications of known procedures [39, 40]. Experimental details will be published elsewhere. The identity and purity of this synthetic derivative was verified by proton nuclear magnetic resonance and elemental analysis. This compound was also dissolved in DMSO. Estradiol and 9-cis Retinoic Acid (RA) (Sigma-Aldrich) were dissolved in ethanol.

Cell proliferation assay

Cells were seeded in 6-well plates at the density of 8×10^4 cells/well in 2 ml of medium supplemented with 5% FCS and 2 mM L-glutamine. After 24 h of cell attachment, the medium was replaced by phenol red DMEM or RPMI-1640 supplemented with 1% FCS and 2 mM L-glutamine. After 24 h, cells were washed 3 times with PBS and treated for 24 h with RGZ, CGZ, TGZ or 15d-PGJ(2). Control wells received 0.1% DMSO. Cell proliferation was also studied after 72 h of RGZ treatment. In this case, medium was replaced every day. At the end of the treatment, cells were washed with PBS, trypsinized and counted with the CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Charbonnieres, France). Each treatment was performed in triplicate.

Transient transfection assays

Cells were seeded in 6-well plates at the density of 2×10^5 cells/well in 2 ml of medium supplemented with 5% FCS and 2 mM L-glutamine, and allowed to adhere for 24 h. Cells were transfected with pPPRE3tk-luc reporter (1 μg/well) and SV40-driven β-galactosidase (β-Gal) (0.6 μg/well), as an internal control plasmid, in the

presence of a human PPARγ expression vector (2 μg/well). Transfections were performed using Exgen 500 (Euromedex, France) according to the manufacturer's protocol. After transfection, cells were allowed to grow for 24 h in phenol-red DMEM supplemented with 10% FCS stripped in dextran-coated charcoal and 2 mM L-glutamine. Cells were then treated with RGZ, CGZ, TGZ or 15d-PGJ(2) for 24 h in fresh medium. In each sample, luciferase activity was measured by using the Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega, Charbonnieres, France). β-Gal activity was measured using the β-Galactosidase Enzyme Assay System (Promega). Luciferase activity was detected using a luminometer and normalized with respect to β-Gal activity measured using a spectrophotometer.

RNA interference

The small-interfering RNA (siRNA) duplexes for targeting PPARγ and non-specific control siRNA were purchased from Eurogentec (Liège, Belgique). The sequences of the human PPARγ siRNAs were 5′-gua-cca-aag-ugc-aau-caa-att-3′ and 5′-uuu-gau-ugc-acu-uug-gua-ctt-3′ for duplex n°1, 5′-caa-uca-gau-uga-agc-uua-utt-3′ and 5′-aua-agc-uuc-aau-cug-auu-gtt-3′ for duplex n°2. The control duplex was provided by Eurogentec (ref OR-0030-neg05). For the transfection procedure, cells were grown to 50% confluence, and PPARγ or control siRNAs were transfected using the Oligofectamine™ Reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, oligofectamine reagent was incubated with serum-free Opti-MEM 1X (Invitrogen) for 10 min. Subsequently, siRNAs were added and after incubation for 20 min at room temperature, the mixture was diluted to reach a final concentration of 100 nM. After 48 h, cells were harvested for further analyses.

Semi-quantitative RT-PCR

Cells were seeded in 6-well plates at the density of 8×10^4 cells/well in 2 ml of medium and treated as described above. Total RNA was extracted from cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized in a 20 μl volume containing 1 μg RNA, 1.5 μg random hexamer primer, 1X Invitrogen Buffer, 7.5 mM DTT, 1 mM of each dNTP, 4 U RNase inhibitor, and 100 U of MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). The mixture was incubated for 120 min at 37°C and subsequently for 5 min at 94°C in order to stop the reaction. The cDNA were further amplified by PCR. The specific primers were: 5′-tgctcaaggagggcctgccgcaggt-3′ and 5′-ctactgaaagaagttgcctctcgcc-3′ for *PR*, 5′-ctacatcatctcggttccgc-3′ and 5′-caccacgttcttgcacttcatg-3′ for *ERα*, 5′-gaccactcccactccttt-3′ and 5′-cgacattcaattgccatgag-3′ for *PPARγ*, 5′-tacatgggtggggtgttgaa-3′ and 5′-aagagaggcatcctcaccc-3′ for *β-Actin* [41–43].

The PCR was carried out in a thermal cycler in a final volume of 25 μl containing 2 μl cDNA, 1X Eppendorf Taq Buffer (Eppendorf, Le Pecq, France), 0.5X Eppendorf Taq Master, 1.5 to 2.5 mM $MgCl_2$, 200 μM of each dNTP, 0.1 μM of each primer, and 2 U Eppendorf Taq Polymerase. Negative controls were always included. Amplification was carried out under the following conditions: (1) initial denaturation at 94°C for 5 min; (2) for *PR* 30 cycles of amplification (94°C for 40 s, 65°C for 1 min and 68°C for 1 min); for *ERα* 35 cycles of amplification (94°C for 40°s, 55°C for 1 min and 68°C for 1 min); for *β-Actin* 25 cycles of amplification (94°C for 40 s, 55°C for 1 min and 68°C for 1 min); 3) 10 min extension step at 68°C for each gene. The number of cycles was chosen to realize the analysis in the linear phase of the PCR reaction. The PCR products (25 μl) were mixed with loading buffer (3 μl) and submitted to electrophoresis in a 2% agarose gel at 90 V for 60 min at room temperature. The gel was stained with ethidium bromide, viewed and photographed on an UV-transilluminator (GelDoc 2000, Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette). A software package (Quantity One v.4.3.1, Bio-Rad Laboratories) was used to quantify the PCR products.

Western immunoblotting

At the end of the treatment, MCF-7 and ZR-75-1 were washed twice with PBS in T-75 flasks, scrapped and collected by centrifugation at 1000 rpm for 10 min. The pellets were washed with PBS and suspended in 200 μl of lysis buffer containing: 25 mM MOPS pH 7.2, 60 mM β-glycerophosphate, 15 mM nitrophenylphosphate, 15 mM EGTA, 15 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 0.1 mM sodium orthovanadate and protease inhibitors (10 μg/ml aprotinin, 5 μg/ml pepsatin, 10 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml soybean trypsin inhibitor and 100 μM benzamidine). An aliquot of cell lysate was used for protein concentration determination (RC-DC kit, Bio-Rad Laboratories). After addition of 2× Laemmli buffer (1v/1v), samples were heated at 100°C for 10 min. About 30 μg of total proteins were subjected to SDS-PAGE (10%). After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membrane. The membrane was blocked in TNT buffer (5 mM Tris–HCl, 15 mM NaCl, 0.1% Tween 20) with 5% non-fat powder milk and incubated with ERα antibody (clone F-10, SC-8002, Santa Cruz Biotechnology) diluted at 1:500 or β-Actin antibody (clone C-11, SC-1615-R, Santa Cruz Biotechnology)

diluted at 1:3000 in TNT buffer overnight at 4°C. Next, the membranes were washed 5 times with TNT and incubated for 1 h with a peroxidase-linked secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology). After five washes with TNT, the membranes were developed with ECL detection reagent using chemiluminescence (Amersham, Orsay, France).

Band intensity was evaluated using a GelDoc 2000 imaging system (Bio-Rad Laboratories) and a software package (Quantity One v.4.3.1, Bio-Rad Laboratories).

Immunocytochemistry

The MCF-7 and ZR-75-1 cells were seeded on poly-L-lysine coated coverslips and grown in their respective medium as described above. Cells were treated with RGZ, TGZ, TGZ + MG132 or DMSO for 18 h. At the end of treatment, coverslips were washed with PBS and fixed in 4% PAF for 20 min. After washing in Tris Buffered Saline, preparations were treated for ERα detection using the LSAB2 kit (Dako, Trappes, France) according to manufacturer's instructions. After revelation (red brown staining for ERα), cells were counterstained with Hoechst dye to visualise nuclei. Preparations were analysed under white and U.V. illumination on a Eclipse 80i microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France). Images were collected using LuciaG software 4.81 (Laboratory imaging).

Statistical analysis

The results are expressed as mean ± standard error of the mean of three different experiments. Differences among treatment groups were tested using analysis of variance (ANOVA). Differences in which P was less than 0.05 were statistically significant. When significant differences were detected, specific post-hoc comparisons between treatment groups were examined with the Student Newman's Keuls test (SPSS v11.0 Computer Software).

Results

TGZ decreases basal and E_2-stimulated PR mRNA expression

PR is a well characterized estrogen-responsive gene that is often studied in breast cancer. To test whether TGZ had a specific effect on ERα signalling, *PR* mRNA level was determined by RT-PCR from MCF-7 and ZR-75-1 cells treated during 24 h with various concentrations of TGZ. In MCF-7 cells, TGZ drastically decreased *PR* mRNA expression compared to DMSO treatment: 2.7 and 16-fold for 10 and 25 μM respectively ($P < 0.05$) (Fig. 1a). ZR-75-1 cells were more sensitive with a 3.5, 10 and 25-fold decrease in *PR* mRNA level in presence of 1, 10 and 25 μM TGZ respectively ($P < 0.05$) (Fig. 1b).

We also studied the effect of TGZ on estrogen-mediated *PR* expression. The cells were treated for 24 h with 1 nM E_2 alone or in combination with 25 μM TGZ. RT-PCR analyses showed a significant stimulation of *PR* mRNA expression in response to E_2: 1.4-fold induction when compared to the control in MCF-7 cells (Fig. 1c) and 1.8-fold induction in ZR-75-1 cells (Fig. 1d). This effect was strongly inhibited in both cell lines in the presence of 25 μM TGZ: PR signal become barely detectable (Fig. 1c and d). Thus, TGZ altered ERα signalling in both cell lines.

TGZ induces ERα down-regulation

In order to elucidate the TGZ-induced alteration of ERα signalling, we studied ERα protein by Western blotting. The ERα staining decreased after 24 h treatment with 25 μM TGZ in both cell lines (Fig. 2a and b). This decrease was more important in ZR-75-1 cells than in MCF-7 cells: it was complete in the former while it reached only 86% in MCF-7. In both cell lines, the detection of β-Actin was not affected by treatment with TGZ. The decrease of ERα detection was observed as soon as 12 h in presence of 25 μM TGZ (data not shown). To determine if the TGZ-induced decrease in ERα detection was correlated with a decrease in its transcription, ERα mRNA levels were determined by RT-PCR. No significant effect of TGZ was observed on ERα mRNA levels neither in MCF-7 (Fig. 2c) nor in ZR-75-1 cells (Fig. 2d).

TGZ induces a proteasome-dependent degradation of ERα

A previous study indicated that TGZ induced a proteasome-dependent degradation of ERα and Cyclin D1 in MCF-7 cells [29]. To determine whether the TGZ-induced decrease in ERα detection observed in our experiments was due to a proteasomal degradation of ERα, MCF-7 and ZR-75-1 cells were treated during 18 h with 25 μM TGZ and various concentrations of MG 132, a proteasome inhibitor. In both cell lines, at 5 μM, MG 132 was efficient to inhibit the TGZ-induced decrease of ERα signal on Western blots (Fig. 3a and b). The same result was obtained in the presence of 10 μM of MG 132. When used alone at this concentration, the proteasome inhibitor did not affect ERα detection. When exposure to MG132 was

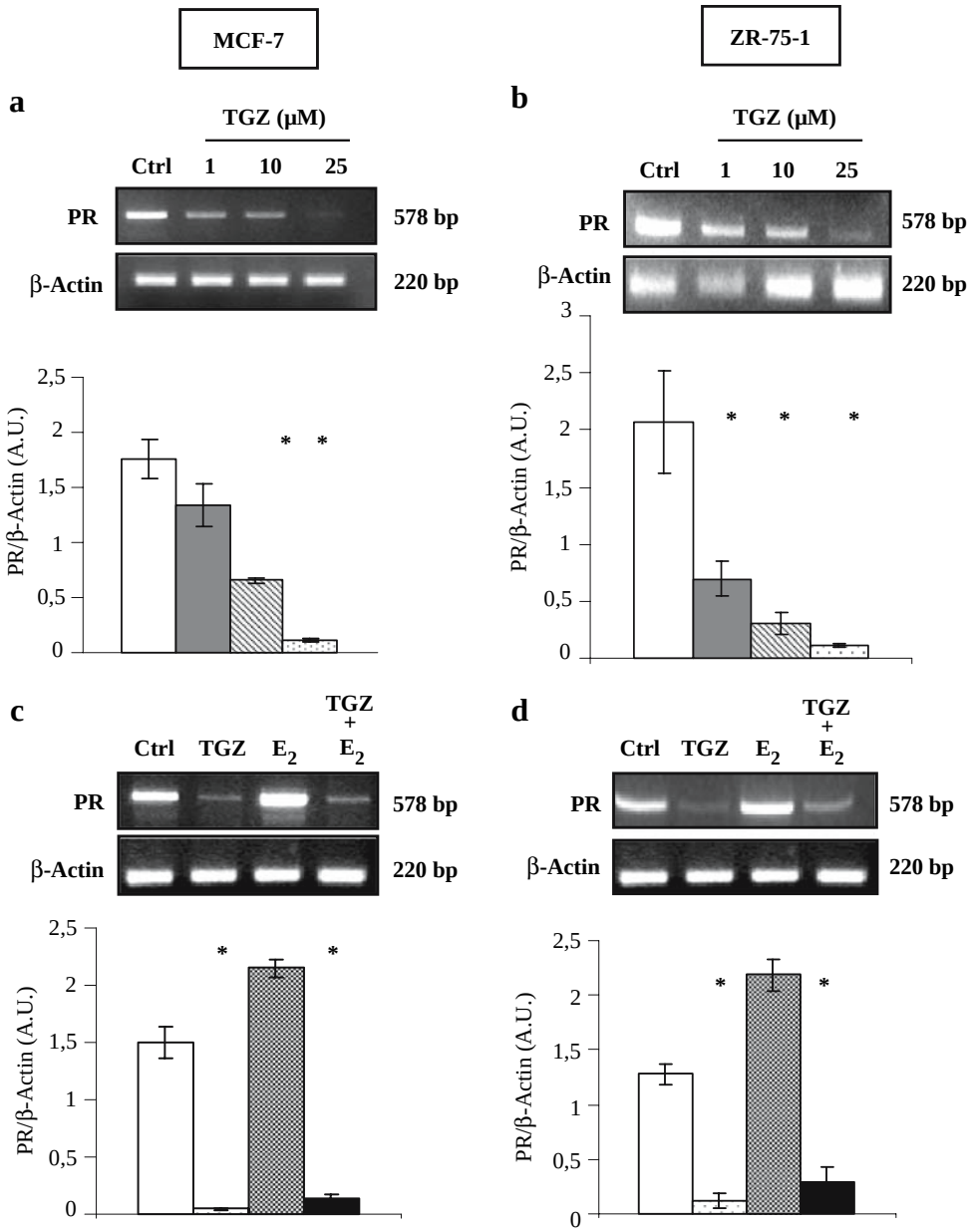


Fig. 1 RT-PCR analysis of *PR* mRNA levels in MCF-7 and ZR-75-1 cells exposed to TGZ. MCF-7 (**a, c**) and ZR-75-1 (**b, d**) cells were studied. In **a** and **b**, the cells were treated with 1, 10 or 25 μM TGZ for 24 h. In **c** and **d**, the cells were treated with TGZ (25 μM) and E_2 (1 nM) either alone or in combination. Control cells (Ctrl) were treated with DMSO (0.1%). The PCR products obtained in each sample were subjected to agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. In each panel, the band intensities of *PR* mRNA were evaluated in terms of optical density arbitrary units (A.U.) and normalized with the *β*-Actin signal intensity. The diagrams show the mean ± s.e.m. of 3 different experiments. *Significantly different from control ($P < 0.05$)

extended up to 24 h, a similar result was observed in MCF-7 cells. However, this longer treatment was toxic for ZR-75-1 cells (data not shown). So, we concluded that TGZ-induced alteration of ERα signalling was the result of a proteasome-dependent proteolysis of the receptor in both cell lines.

ERα is differentially affected by PPARγ agonists

Previous reports demonstrated differential antitumor actions of PPARγ agonists in breast cancer cells [14, 44]. Since our results clearly demonstrated that TGZ induced a degradation of ERα in the two hormone-dependent cell lines, we compared the efficiency of TGZ to other thiazolidinediones and to the natural PPARγ ligand 15d-PGJ(2). First, we verified on MCF-7 cells that the different compounds activated PPARγ. MCF-7 cells were transiently transfected with the reporter construct pPPRE3tkLuc in the presence of a human PPARγ expression vector. After 24 h of treatment with 25 μM of RGZ, TGZ, CGZ and 15d-PGJ2, luciferase activity was stimulated 2.39-, 1.93-, 1.88- and 1.72-fold respectively (Fig. 4).

Then, MCF-7 and ZR-75-1 cells were exposed to these agonists (25 μM) for 24 h and the status of ERα was studied by Western blotting. In MCF-7 cells, 15d-PGJ(2)

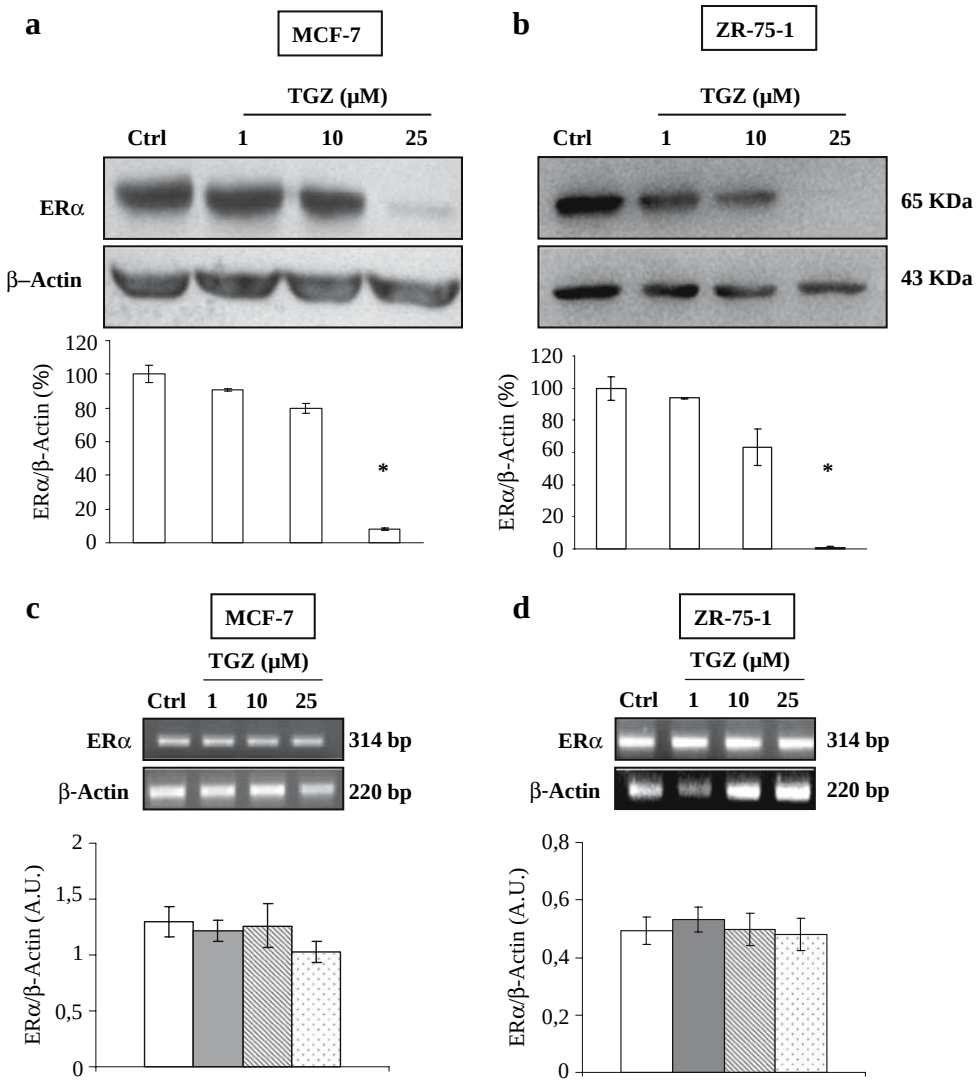


Fig. 2 Analysis of ERα protein and mRNA in MCF-7 and ZR-75-1 cells exposed to TGZ. MCF-7 (**a, c**) and ZR-75-1 (**b, d**) were treated with increasing concentrations of TGZ for 24 h. In **a** and **b**, Western blot was performed with whole cell lysates in order to analyze ERα protein content. *β*-Actin was used as an internal control. In each panel, the band intensities of ERα were evaluated in terms of optical density arbitrary units (A.U.) and normalized with the *β*-Actin signal intensity ; the ratios were expressed as percentage of control. The diagrams show the mean ± s.e.m. of 3 different experiments. In **c** and **d**, ERα mRNA level was estimated by RT-PCR. The 314 bp amplified ERα product was analyzed by agarose gel electrophoresis. The band intensities were evaluated in terms of optical density arbitrary units (A.U.) and normalized with the *β*-Actin signal intensity. The diagrams show the mean ± s.e.m. of 3 different experiments. *Significantly different from control ($P < 0.05$)

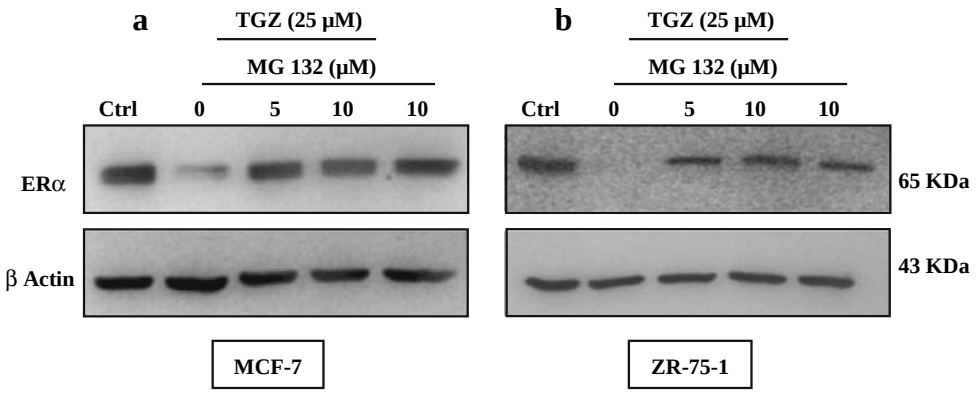


Fig. 3 Western blot analysis of ERα in MCF-7 and ZR-75-1 cells exposed to TGZ in presence of a proteasome inhibitor. MCF-7 (**a**) and ZR-75-1 (**b**) were treated for 18 h with DMSO (Ctrl), 25 μM TGZ either alone or in co-treatment with 5 or 10 μM MG132 (protease inhibitor), and 10 μM MG132 alone. For each sample, 30 μg of total proteins were subjected to SDS-PAGE and Western blotting analysis using an anti-ERα monoclonal antibody. *β*-Actin was used as an internal control. Results illustrated in this figure were observed at least in 3 separate experiments

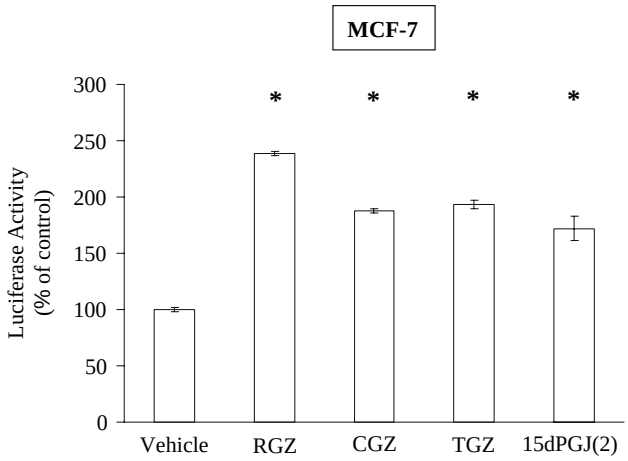


Fig. 4 PPARγ activation by natural and synthetics ligands. MCF-7 cells were transiently co-transfected with pPPRE3tkLuc and pCMV-βGal in the presence of a human PPARγ expression vector. The cells were treated for 24 h with RGZ, CGZ, TGZ or 15d-PGJ(2) (25 μM). Luciferase reporter activity was measured, normalized with the β-Gal activity and expressed as percentage of the control assumed as 100%. The values represent the means ± s.e.m. of 3 different experiments. In each experiment, the activities of transfected plasmids were assayed in duplicate transfections. *Significantly different from untreated control ($P < 0.05$)

induced ERα degradation as efficiently as TGZ whereas CGZ had a lower effect. RGZ did not affect ERα protein content (Fig. 5a).

The same results were observed in ZR-75-1 cells (Fig. 5b). However, as observed for TGZ treatment, we noticed that these cells were more sensitive than MCF-7 to CGZ that induced an almost complete ERα degradation. Despite a slight decrease in ERα detection in RGZ-treated cells, this ligand had no significant effects.

The effects of RGZ and TGZ on ERα were also studied by immunocytochemistry (Fig. 6). Cells were grown on coverslips and treated as described above with 25 μM of each compound for 18 h.

In both cell lines, a strong nuclear staining was observed in control cells treated with DMSO. This is in agreement with the fact that the majority of ERα already resides in the nucleus in absence of hormone stimulation [45]. Consistently with our Western blot results, the nuclear staining was maintained in RGZ-treated cells and decreased after TGZ treatment. Interestingly, the nuclear staining was still observed in cells treated with TGZ in presence of the proteasome inhibitor MG132 (10 μM). In ZR-75-1 cells, a cytoplasmic staining was observed. It was present in absence of primary antibody and was aspecific (not shown).

So, these data not only showed that the sensitivity of these two hormone-dependent cell lines to PPARγ agonists was different but also that this was not related to their PPARγ activation potency.

ERα degradation is correlated with the inhibition of cell proliferation

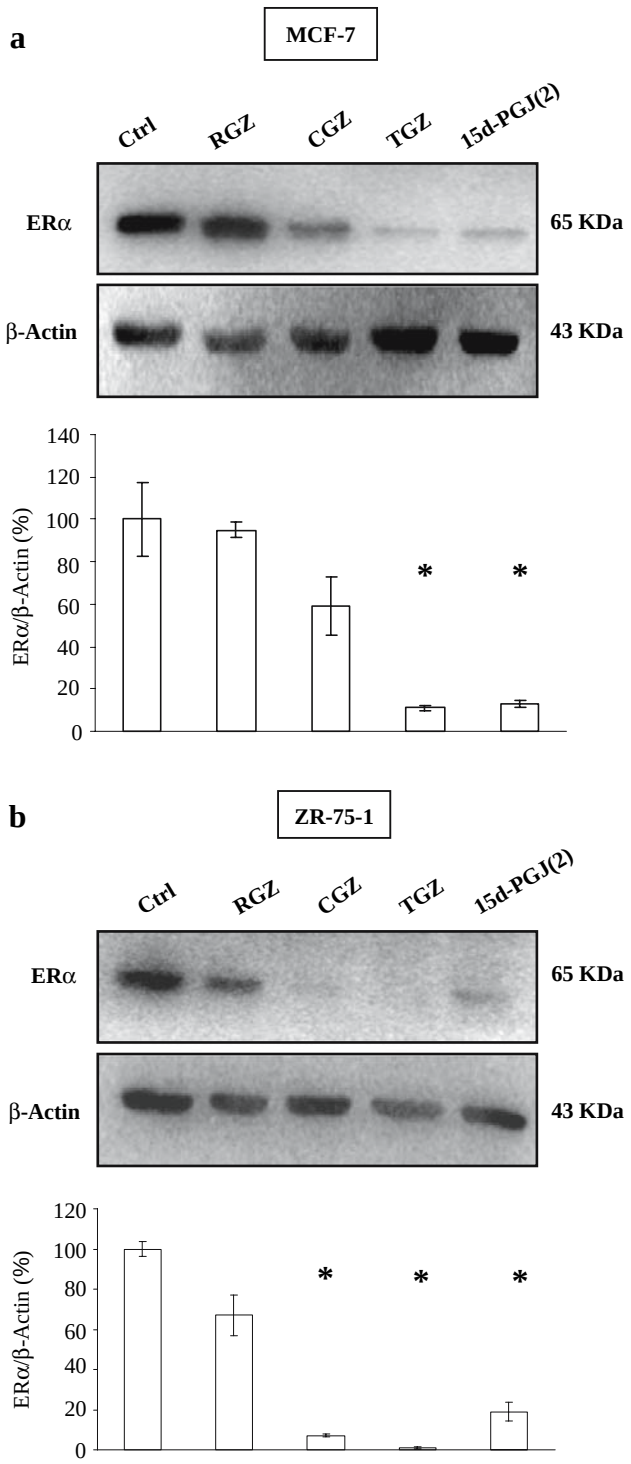
The proliferation of both cell lines was measured after 24 h treatment with 25 μM of each agonist. We observed that RGZ did not affect proliferation whereas CGZ, TGZ and 15d-PGJ(2) inhibited the proliferation of MCF-7 cells (Fig. 7a). The proliferation of ZR-75-1 cells was not affected by treatment with RGZ (Fig. 7b). These cells were highly sensitive to 15d-PGJ(2), CGZ and TGZ since the number of cells decreased during the 24 h treatment (Fig. 7b). The effect of RGZ treatment (25 μM) was studied during 72 h. In MCF-7, a significant inhibition of cell proliferation was observed after 48 h (Fig. 7c). In our culture conditions (1% SVF containing medium changed every day), the proliferation rate of ZR-75-1 cells was lower than in MCF-7 cells (Fig. 7d). In this second cell line, cell numbers were slightly reduced after 48 h of exposure to RGZ (Fig. 7d). The results obtained after 24 h of treatment with PPARγ ligands are in agreement with those showing the ligands-induced degradation of ERα in these cell lines.

RA does not potentiate TGZ-induced ERα degradation

It is well known that PPARγ effects are potentiated with ligands for RXR [46]. Thus, we tested whether TGZ and 9-cis RA were able to synergistically stimulate ERα degradation. Each cell line was treated with lower doses of TGZ (10 or 15 μM) alone or in combination with 10^{-7} M RA. In MCF-7 cells, we did not observe ERα degradation following TGZ treatment (10 or 15 μM) (Fig. 8a). In ZR-75-1 cells, ERα degradation occurred in presence of the lowest TGZ concentration (10 μM) confirming the higher sensitivity of this cell line to this compound (Fig. 8b). In both cell lines, co-treatment with RA did not potentiate the effects of TGZ (Fig. 8a and b). Since the RXR ligand did not amplify the degradation of ERα usually observed in case of PPARγ agonist-treated cells, it suggested a PPARγ-independent mechanism.

TGZ-induced ERα degradation is PPARγ-independent

To determine whether the TGZ-induced ERα proteolysis was mediated by PPARγ, we used three different PPARγ antagonists: T0070907 (15, 25 or 35 μM), BADGE (1, 5 or 10 μM) and GW 9662 (5 or 10 μM). They were used in combination with 25 μM TGZ for 24 h in MCF-7 and ZR-75-1 cells. In MCF-7 cells co-treated with TGZ and T0070907, the degradation of ERα was not antagonized but slightly potentiated (Fig. 9a). Besides, ERα detection was



◀ **Fig. 5** Western blot analysis of ERα in MCF-7 and ZR-75-1 cells exposed to different PPARγ agonists. MCF-7 (**a**) and ZR-75-1 (**b**) cells were treated with synthetic PPARγ-agonists RGZ, CGZ and TGZ (25 μM) as well as the natural PPARγ-agonist 15d-PGJ(2) (25 μM) for 24 h. About 30 μg of total proteins were subjected to SDS-PAGE and Western blotting analysis using an anti-ERα monoclonal antibody. β-Actin was used as an internal control. The band intensities of ERα were evaluated in terms of optical density arbitrary units and normalized with the β-Actin signal intensity ; the ratios were expressed as percentage of control. In each panel, the diagram shows the mean ± s.e.m. of 3 different experiments. *Significantly different from control ($P < 0.05$)

lower in cells treated with T0070907 alone (Fig. 9a). In cells treated with TGZ and BADGE, the PPARγ antagonist enhanced the degradation of ERα in a dose-dependent manner whereas BADGE used alone (10 μM) did not affect ERα content (Fig. 9b). In MCF-7 cells co-treated with TGZ and GW 9662, the degradation of ERα occurred as in cells treated with TGZ alone (Fig. 9c). In ZR-75-1 cells, BADGE (10 μM), T0070907 (35 μM) and GW 9662 (10 μM) did not antagonize the TGZ-induced degradation of ERα (Fig. 9d, e and f). A decrease in ERα detection was observed in ZR-75-1 cells exposed to T0070907 alone as previously observed in MCF-7 cells (Fig. 9d). These results strongly suggested that ERα proteolysis was triggered by a PPARγ-independent mechanism.

In order to confirm this point, we used another approach: RNA interference. First we verified that PPARγ silencing actually occurred in PPARγ siRNA transfected cells. This was performed by the analysis of *PPARγ* mRNA level. Our RT-PCR studies revealed a 6.6-fold decrease in MCF-7 cells (Fig. 10a). Besides, we verified the silencing in transfection assays. In MCF-7 cells transfected with the reporter construct pPPRE3tkLuc in the presence of a human PPARγ expression vector, RGZ (25 μM, 24 h) did not induce an increase in luciferase activity (Fig. 10b). In cells transfected with control siRNA, we observed neither a decrease in *PPARγ* mRNA level, nor an inhibition of RGZ-induced increase in luciferase activity (data not shown). Once the efficiency of the silencing ascertained, we studied ERα proteolysis following treatment with PPARγ agonists. We observed that both TGZ and 15dPGJ(2) treatments (25 μM, 24 h) still induced ERα proteolysis in MCF-7 cells submitted to PPARγ silencing (Fig. 10c).

In addition to the use of PPARγ antagonists and the silencing of PPARγ, we studied the effects of Δ2-TGZ. This is an unsaturated derivative of TGZ that is inactive in PPARγ activation [29]. When MCF-7 cells were exposed for 24 h to 25 μM of this compound, the proteolysis of ERα occurred but the effect was not as strong as in case of TGZ treatment (Fig. 11). In ZR-75-1 cells exposed to 25 μM Δ2-TGZ for 24 h, a complete proteolysis of ERα was observed (Fig. 11).

Taken together, these results demonstrated that PPARγ activation was not required for the degradation of ERα in breast cancer cells treated with PPARγ agonists.

Discussion

Most patients with breast cancer have hormone-dependent tumors and estrogens play an important role in the control

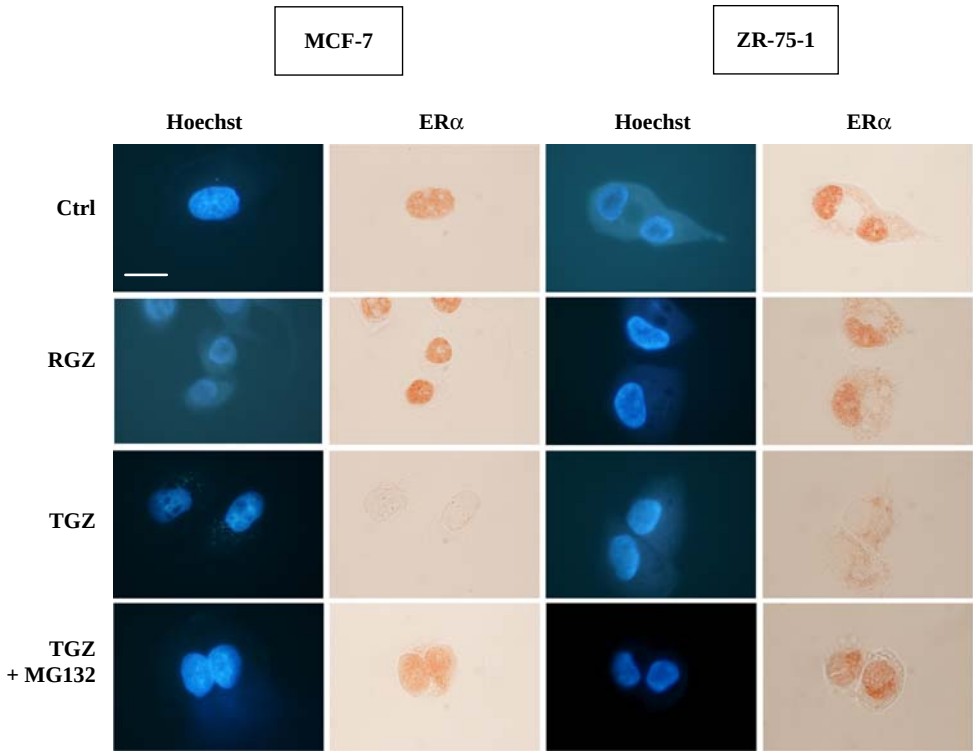


Fig. 6 Immunodetection of ERα in MCF-7 and ZR-75-1 cells exposed to different PPARγ agonists. MCF-7 and ZR-75-1 cells were treated with 25 μM RGZ or TGZ for 18 h. Cells were also treated with TGZ in the presence of 10 μM of the proteasome inhibitor MG132. Control cells (Ctrl) were treated with DMSO. The result of the counterstaining with Hoechst dye is shown for each treatment. Bar represents 30 μM and the magnification is identical for all pictures

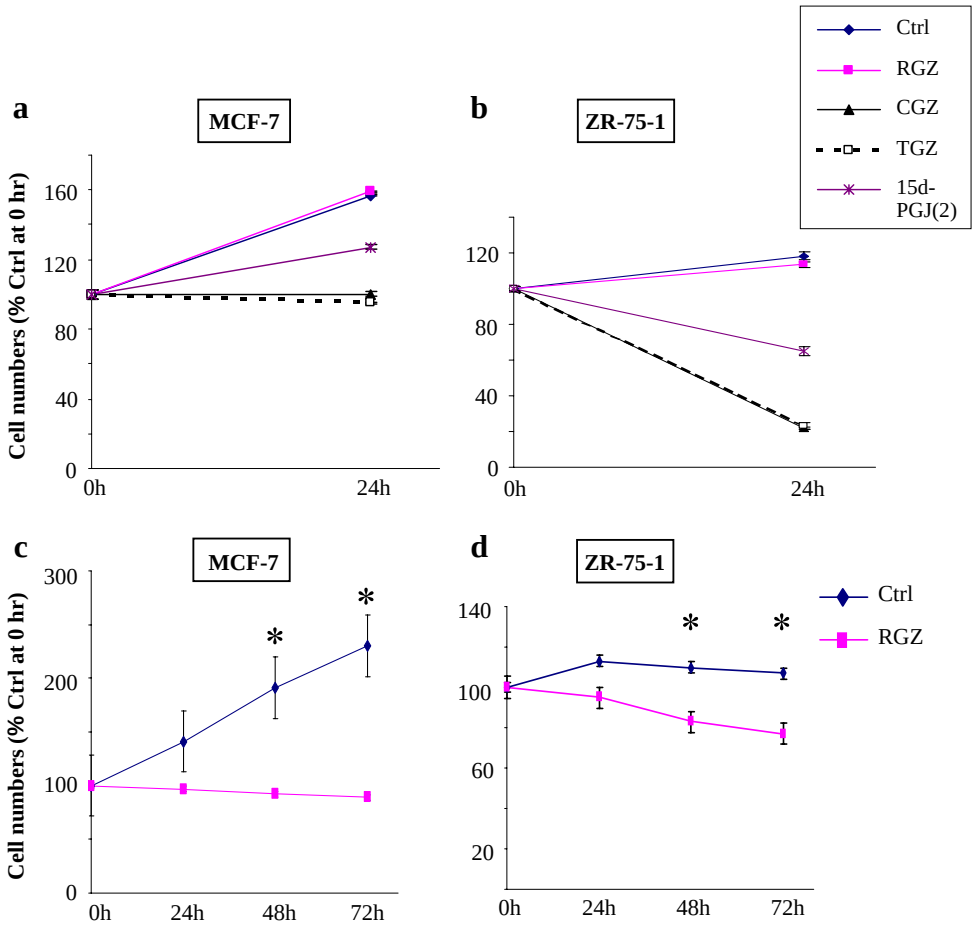


Fig. 7 Analysis of cell proliferation in MCF-7 and ZR-75-1 cells exposed to different PPARγ agonists. MCF-7 (**a, c**) and ZR-75-1 (**b, d**) cells were treated with 25 μM RGZ, CGZ, TGZ or 15d-PGJ(2). Control cells (Ctrl) were treated with DMSO. Cell numbers were evaluated after 24 h (**a, b**) or 72 h (**c, d**) using the CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay. Results are given as mean ± s.e.m. of 3 different counts. *Significantly different from untreated control ($P < 0.05$)

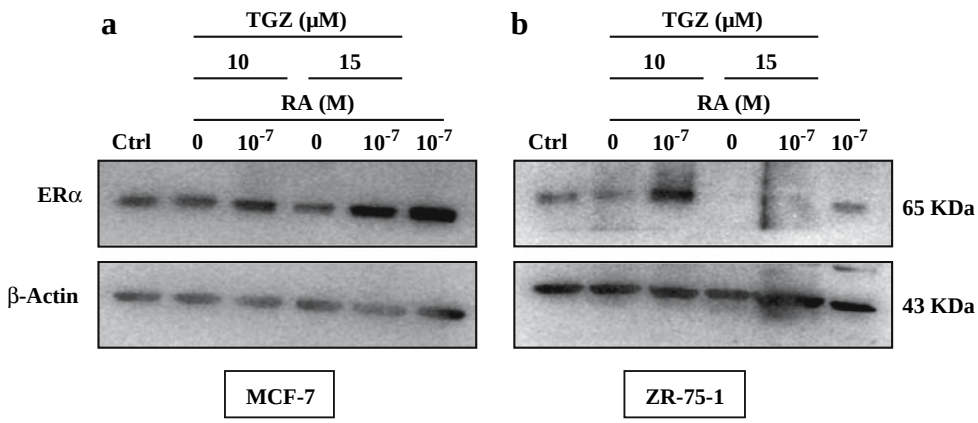


Fig. 8 Western blot analysis of ERα in MCF-7 and ZR-75-1 cells exposed to TGZ and 9-cis RA. MCF-7 (**a**) and ZR-75-1 (**b**) cells were treated with 10 or 15 μM TGZ alone or in combination with 10^{-7} M RA for 24 h. About 30 μg of total proteins were subjected to SDS-PAGE and Western blotting analysis using an anti-ERα monoclonal antibody. *β*-Actin was used as an internal control. This result was observed in 3 independent experiments

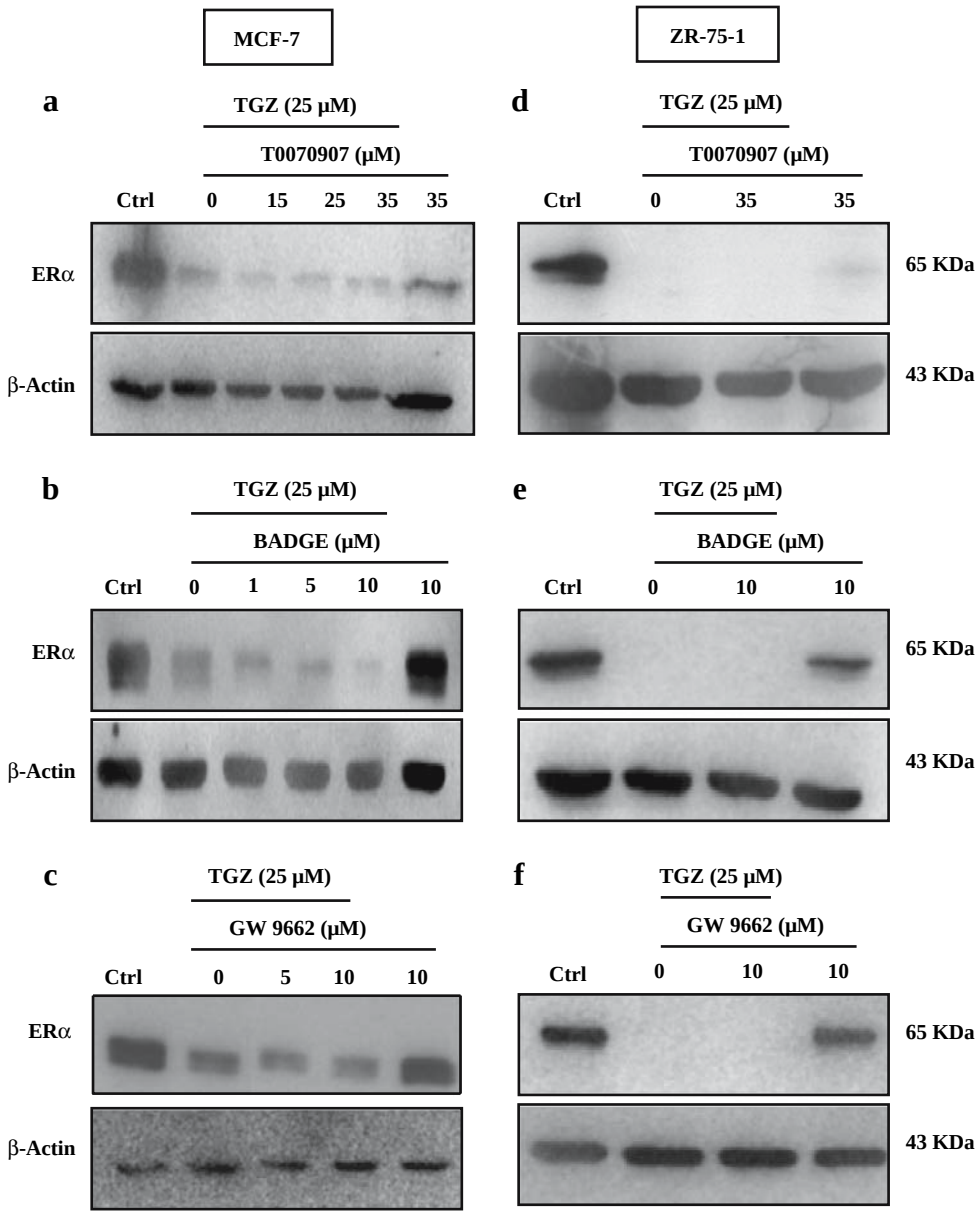


Fig. 9 Western blot analysis of ERα in MCF-7 and ZR-75-1 cells exposed to TGZ and different PPARγ antagonists. MCF-7 (**a, b, c**) and ZR-75-1 (**d, e, f**) cells were treated with T0070907, BADGE and GW9662 either alone or in combination with TGZ for 24 h. The concentrations of the different compounds are indicated on the panels. About 30 μg of total proteins were subjected to SDS-PAGE and Western blotting analysis using an anti-ERα monoclonal antibody. *β*-Actin was used as an internal control. This result was observed in 3 independent experiments

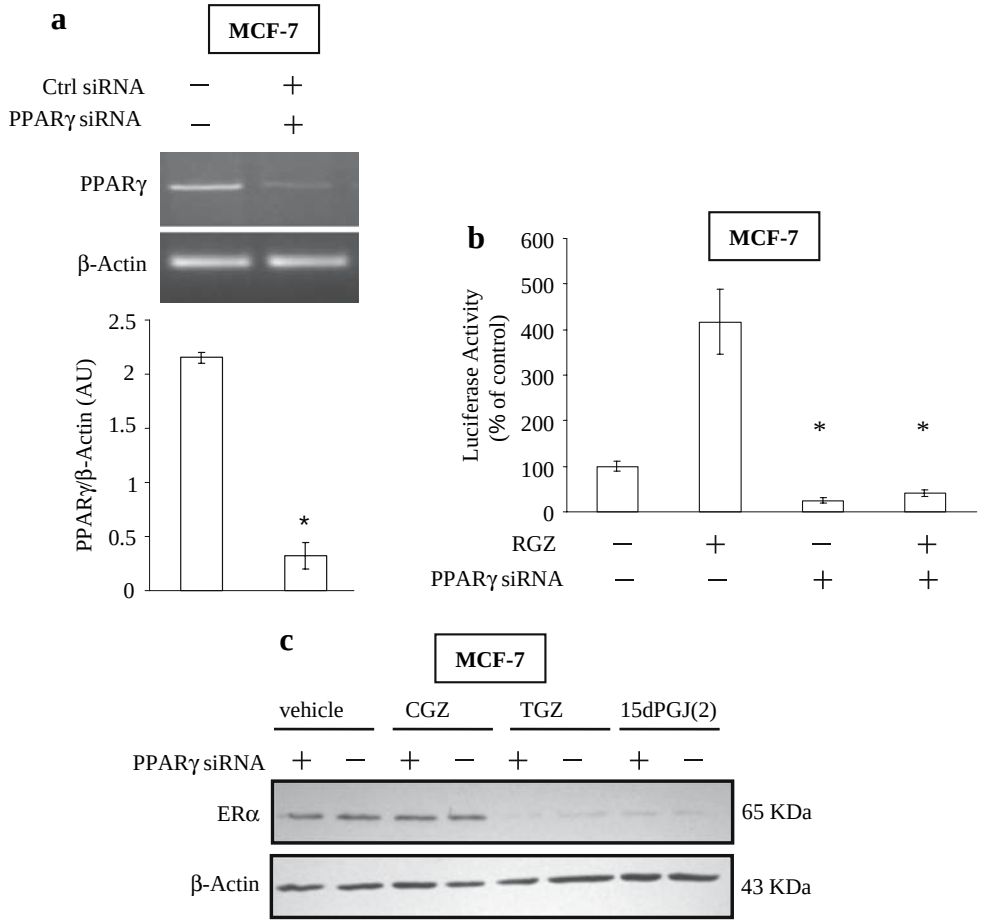


Fig. 10 Silencing of PPARγ by interference RNA. MCF-7 cells were transiently transfected with double-stranded siRNA targeting PPARγ. About 48 h after transfection, PPARγ mRNA level was estimated by RT-PCR. In panel a, the 226 bp amplified PPARγ product was analyzed by agarose gel electrophoresis. The band intensities were evaluated in terms of optical density arbitrary units (A.U.) and normalized with the β-Actin signal intensity. The diagram shows the mean ± s.e.m. of 3 different experiments. *Significantly different from control ($P < 0.05$). In panel b, 24 h after transfection, MCF-7 cells were transiently co-transfected with pPPRE3tkLuc and pCMV-βGal in the presence of a human PPARγ expression vector, and treated with RGZ (25 µM). Luciferase reporter activity was measured, normalized with the β-Gal activity and expressed as percentage of the control assumed as 100%. The values represent the means ± s.e.m. of 3 different experiments. In each experiment, the activities of transfected plasmids were assayed in duplicate transfections. *Significantly different from untreated control ($P < 0.05$). In panel c is shown a Western blot analysis of ERα in MCF-7 cells transfected with siRNA targeting PPARγ and exposed to CGZ, TGZ and 15d-PGJ(2). Cells were treated with 25 µM of each compound for 24 h. For each sample, 30 µg of total proteins were subjected to SDS-PAGE and Western blotting analysis using an anti-ERα monoclonal antibody. β-Actin was used as an internal control. The results illustrated in this figure were observed at least in 2 separate experiments

of breast cancer cell proliferation. Hence, anti-estrogens and/or inhibitors of aromatase, the estrogen synthesizing enzyme, are used in therapeutics. Interestingly, ligands of the nuclear receptor PPARγ have been described as potent inhibitors of breast cancer cell proliferation. A few studies performed only on MCF-7 cells reported that PPARγ ligands triggered the disruption of ERα signalling pathway. The aim of our work was to study the effect of 4 different PPARγ agonists on ERα signalling in two hormone-dependent cell lines.

First we studied ERα signalling pathway by means of *PR* expression analyses. *PR* is often used as an ERα target gene in breast cancer. For instance, it was recently used to show a ligand-independent activation of ERα in MCF-7 cells exposed to ethanol [47]. Moreover, the presence of *PR* expression in breast tumors is important to determine the hormone sensitive status and the type of therapy. We observed that treatment of MCF-7 and ZR-75-1 cells with TGZ decreased significantly *PR* mRNA level in a dose-dependent manner, with a higher efficiency in ZR-75-1 cells. TGZ inhibited both basal and E_2-induced ERα transcriptional activity in both cell lines. This result is consistent with other studies reporting an alteration of ERE-dependent transactivation by E_2 observed with CGZ and 15d-PGJ(2) in MCF-7 cells [37, 38]. This effect could be due to the binding of PPARγ/RXR heterodimer to ERE.

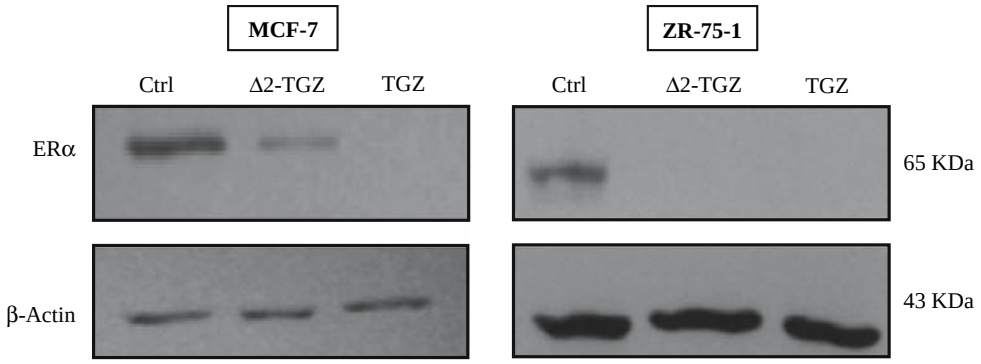


Fig. 11 Western blot analysis of ERα in MCF-7 and ZR-75-1 cells exposed to Δ2-TGZ. Cells were exposed during 24 h to 25 μM of either Δ2-TGZ or TGZ. Control cells were treated with DMSO. For each sample, 30 μg of total proteins were subjected to SDS-PAGE and Western blotting analysis using an anti-ERα monoclonal antibody. *β*-Actin was used as an internal control. Results illustrated in this figure were observed at least in 2 separate experiments

Indeed, previous studies reported that PPAR/RXR heterodimer could inhibit transactivation by ERα through competition for ERE [48].

Another hypothesis would be that the ERα protein level itself could be diminished. In order to test this hypothesis, we realized Western blot analyses. We clearly showed a decrease in ERα detection following treatment of both cell lines with 25 μM TGZ for 24 h. This was not due to a post-translational modification of ERα in the region around the binding site of the monoclonal antibody (carboxy terminus of ERα) since the same result was also observed with another immunological tool directed against another region of the protein (clone 1D5 from Dako, epitope mapping in the N terminal A/B domain; data not shown). This weaker detection was not the result of an inhibition of ERα transcription since ERα mRNA content was similar to the one of control cells.

The function of proteins is often regulated by proteasomal degradation [49]. Such a mechanism plays a crucial role in ERα regulation since binding of either E_2 or the pure antagonist Fulvestrant induces proteasome-mediated ERα degradation [50]. A concentration-dependent degradation of ERα through the proteasome pathway was previously reported in MCF-7 cells treated with CGZ, TGZ or 15d-PGJ(2) [29, 36]. Consistently with this finding, we observed that the proteasome inhibitor MG132 inhibited the decrease in ERα immunostaining on Western blot that is usually observed following TGZ treatment. Hence, we concluded to a proteasome dependent degradation triggered by this compound not only in MCF-7 but also in ZR-75-1 cells. ERα degradation in response to TGZ was more accentuated in ZR-75-1 cells. A difference in the sensitivity to TGZ was previously reported between MCF-7 and MDA-MB-231 cells in regard to cyclin D1 proteolysis [29]. This difference was not correlated to the PPARγ content of the two cell lines [29]. This could be due to a lower expression of ERα in ZR-75-1 cells than in MCF-7 cells [46]. A differential permeability of the two cell lines to TGZ could also be proposed.

Then, we analysed the effect of several PPARγ agonists on ERα degradation in MCF-7 and ZR-75-1 cells. When used at 25 μM, we observed differential effects of these compounds. As observed with TGZ, CGZ and 15d-PGJ(2) induced a degradation of ERα which was more drastic in ZR-75-1 cells. In both cell lines, RGZ (25 μM) did not affect the ERα content. These differences between MCF-7 and ZR-75-1 cells indicate a higher sensitivity of ZR-75-1 cells to the PPARγ agonists. In MCF-7 cells, it was previously reported that the minimum concentration required for the complete ablation of ERα was 60 μM for TGZ and even higher concentration for CGZ [29, 36]. In our hand, an important proteolysis of ERα (86%) was observed at 25 μM TGZ or CGZ in MCF-7 cells. This difference might be explained by culture conditions that used 5–10% FCS instead of 1% in the present work. Similarly to our results, Huang et al. indicate as a data not shown that RGZ lacked appreciable effects on cyclin D1 and ERα proteolysis [29]. The results of our Western blot studies were confirmed by immunocytochemistry, with a high correlation between the intensity of the nuclear staining obtained with anti-ERα antibodies and the level of ERα protein detected on western blots. Similar results of immunocytochemistry were reported only in MCF-7 cells treated with 15d-PGJ(2) [36].

Using transactivation assays, it was shown that the efficiency of the 4 agonists to stimulate PPRE driven expression of a reporter gene was CGZ < 15d-PGJ(2) < TGZ < RGZ [11, 51]. Our results are in agreement with this since RGZ was the most potent PPARγ agonist. So, the efficiency of the PPARγ agonists in regard to ERα proteolysis induction was not correlated to their ability to activate PPARγ. This observation suggested that ERα proteolysis was mediated by a PPARγ-independent mechanism.

Breast cancer cell lines express RARs and RXRs [16]. It is well characterized that PPARγ effects are potentiated with ligand for RXR. For instance, co-treatment of MCF-7 cells with RGZ and 9-cis RA resulted in significantly greater reporter activity when compared to RGZ treatment alone [52]. Moreover, the inhibition of proliferation of breast cancer cells treated with TGZ is potentiated by RA [46]. The combination of TGZ and all trans retinoic acid increased the number of MCF-7 cells undergoing apoptosis when compared to treatment with TGZ alone [16]. We observed that proteolysis of ERα was not potentiated by RA neither in MCF-7 nor in ZR-75-1 cells. This observation strengthens the idea of a PPARγ-independent mechanism.

In order to confirm this hypothesis, we used three PPARγ-specific antagonists, GW 9662, T0070907 and the structurally distinct BADGE. The results of our Western blot studies indicated that these compounds did not antagonize the TGZ-induced degradation of ERα in MCF-7 and ZR-75-1 cells. One could suggest that the concentration that we used was not high enough but toxic effects were observed at higher concentration as previously described. For instance, MCF-7 showed a loss of viability in response to GW 9662 with IC_{50} of 20 μM [34]. Our results are in accordance with the fact that 10 μM GW 9662 did not reverse the repression of ERα transactivity induced by 15d-PGJ(2) whereas it completely blocked 15d-PGJ(2)-induced PPRE-driven luciferase activity in MCF-7 [38]. Besides, 10 μM GW 9662 did not prevent TGZ-mediated cyclin D1 proteolysis [29]. The lack of effect of 10 μM T0070907 on 15d-PGJ(2)-induced proteolysis of cyclin D1 and ERα has also been reported in MCF-7 cells [53].

Although the absence of effect on PPARγ agonists-induced ERα proteolysis was a common feature of the three antagonists, these compounds had differential effects. Two of these antagonists, T0070907 and BADGE, potentiated ERα proteolysis in case of co-treatment with TGZ while GW9662 did not. This potentiation could explain the cell growth inhibitory effects of these compounds recently reported in the T47D breast cancer cell line and colorectal carcinoma cells [53–55].

One might suggest that the antagonists do not completely inhibit the interaction of TGZ or 15d-PGJ(2) with PPARγ and these experiments are not sufficient to ascertain a PPARγ-independent mechanism. So, we used siRNA targeting PPARγ which is a more selective approach. The efficiency of the silencing was studied at the mRNA level as well as at the protein level using transfection assays. It clearly appeared that the most active compound, i.e. RGZ, could not activate the PPRE driven expression of the luciferase reporter in this context. However, our western blot analyses revealed that the property of TGZ or 15d-PGJ(2) to trigger ERα proteolysis in MCF-7 cells was unaffected by PPARγ silencing. This method using siRNA was not used in other studies that described PPARγ-independent events including proteolysis [29, 31, 40]. The authors used either antagonists or inactive derivatives, namely Δ2-TGZ and Δ2-CGZ. We synthesized Δ2-TGZ and treated MCF-7 and ZR-75-1 cells with 25 μM. We confirmed the results obtained previously on MCF-7 and observed the same effect in the other hormone-dependent cell line ZR-75-1.

Taken together, (1) the absence of correlation between PPARγ activation potency and ERα degradation, (2) the absence of potentiation of this proteolysis by RA, (3) the lack of inhibition by the antagonists, (4) the fact that ERα proteolysis still occurs in case of PPARγ silencing and (5) the fact that inactive compounds like Δ2-TGZ can induce ERα proteolysis demonstrate a PPARγ-independent mechanism. The identity of this mechanism is still unknown. Could it be related to a covalent interaction between ERα DNA binding domain and the PPARγ agonist as recently reported for 15d-PGJ(2) in MCF-7 cells [38]? We cannot exclude this possibility. This covalent interaction occurred as soon as 2 h after the beginning of treatment but it is not known if it triggers the proteasomal degradation of the receptor [38].

Is the proteolysis of ERα required for CGZ, TGZ and 15d-PGJ(2) biological effects? In our study, we observed that when analyzed after 24 h, the effects of the PPARγ agonists on cell proliferation were correlated to their potency to induce ERα proteolysis. In particular, RGZ that did not affect ERα content did not modify the proliferation rate. Similar observations were reported in amnion-like cells: 15d-PGJ(2) and CGZ induced apoptosis whereas RGZ had no effect on cell viability [56]. The lack of effect of RGZ on ERα proteolysis was consistent with other studies [29]. Our study of cell proliferation performed after a longer exposure to RGZ indicates an inhibition of cell proliferation in both cell lines. This is in agreement with a previous study showing that a 48 h exposure to RGZ induced an inhibition of $G_0-G_1 \rightarrow S$ phase progression: the number of cells in G_0-G_1 increased from 53 to 67% and 76% with 10 and 50 μM RGZ respectively [57]. Besides, a 4 days exposure of MCF-7 cells to 10 μM RGZ also decreased cell proliferation [14]. Surprisingly, a recent study described that high doses of RGZ inhibited proliferation of MCF-7 cells while low doses of RGZ induced proliferation via ERE activation through an ERα dependent mechanism [58]. So, the mechanisms of action of RGZ seems more complex than those of the other PPARγ agonists.

To conclude, our results demonstrate that PPARγ agonists-induced ERα proteasomal degradation is not restricted to the hormone-dependent cell line MCF-7. This is an

important result in regard to the role played by estrogens and their receptor ERα in hormone-dependent breast cancer. Since different agonists are not identical in their efficiency to trigger this PPARγ-independent mechanism, some of them could serve to initiate structure-function studies and, as lead compounds, to develop new molecules for endocrine therapy.

Acknowledgements This work was supported by grants of the 'Université Henri Poincaré (BQR)', of the 'Association pour la Recherche sur le Cancer', of the 'Ligue Contre le Cancer, comité de la Haute-Marne' and of 'Canceropole Grand Est'. Julie Lecomte is recipient of a grant of the 'Ligue Contre le Cancer, comité de la Haute-Marne'. We would like to thank SANOFI AVENTIS for a studentship to Stéphane Salamone. We also thank Romain Hany, Martine Chillet, Brigitte Fernette and Sandrine Adach for technical assistance. The pPPRE3tkLuc construct and the human PPARγ expression vector were generous gifts of Pr. Philippe Becuwe and Dr. Lionel Domenjoud respectively.

References

1. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M et al (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell 83:835–839
2. Isseman I, Green S (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature 347:645–650
3. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B et al (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferators-activated receptors. Proc Natl Acad Sci USA 91: 7355–7359
4. Dreyer C, Krey G, Keller H et al (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. Cell 68:879–887
5. Issemann I, Prince RA, Tugwood JD et al (1993) The retinoid X receptor enhances the function of the peroxisome proliferator activated receptor. Biochimie 75:251–256
6. Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995) The R $\times$ R heterodimers and orphan receptors. Cell 83:841–850
7. McKenna NJ, O'Malley BW (2002) Minireview: nuclear receptor coactivators-an update. Endocrinology 43:2461–2465
8. Yang W, Rachez C, Freedman LP (2000) Discrete roles for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators. Mol Cell Biol 20:8008–8017
9. Thoennes SR, Tate PL, Price TM et al (2000) Differential transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by omega-3 and omega-6 fatty acids in MCF-7 cells. Mol Cell Endocrinol 160:67–73
10. Forman BM, Tontonoz P, Chen J et al (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. Cell 83:803–812
11. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM et al (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. Cell 83:813–819
12. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB et al (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. J Biol Chem 272:3406–3410
13. Spiegelman BM (1998) PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. Diabetes 47:507–514
14. Kim KY, Kim SS, Cheon HG (2006) Differential anti-proliferative actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in MCF-7 breast cancer cells. Biochem Pharmacol 72:530–540
15. Nwankwo JO, Robbins ME (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in human malignant and normal brain, breast and prostate-derived cells. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 64:241–245
16. Elstner E, Muller C, Koshizuka K et al (1998) Ligands for peroxisome proliferators-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. Proc Natl Acad Sci 95:8806–8811
17. Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P et al (1998) Terminal differentiation of human breast cancer through PPARγ. Mol Cell 1:465–470
18. Mehta RG, Williamson E, Patel MK et al (2000) A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, retinoids, and prevention of preneoplastic mammary lesions. J Natl Cancer Inst 92:418–423
19. Fenner MH, Elstner E (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-g ligands for the treatment of breast cancer. Expert Opin Investig Drugs 14:557–568
20. Yin F, Wakino S, Liu Z et al (2001) TGZ inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. Biochem Biophys Res Commun 286:916–922
21. Goetze S, Xi XP, Kawano H et al (1999) PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells. J Cardiovasc Pharmacol 33:798–806
22. Xin X, Yang S, Kowalski J et al (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. J Biol Chem 274:9116–9121
23. Burstein HJ, Demetri GD, Mueller E et al (2003) Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand TGZ as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. Breast Cancer Res Treat 79:391–397
24. Yee LD, Williams N, Wen P et al (2007) Pilot study of rosiglitazone therapy in women with breast cancer:effects of short-term therapy on tumor tissue and serum marker. Clin Cancer Res 13:246–252
25. Nelson NJ (2006) Migrant studies aid the search for factors linked to breast cancer risk. J Natl Cancer Inst 98:436–438
26. Massarweh S, Schiff R (2006) Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signalling crosstalk. Endocr Relat Cancer 13:S15–S24
27. Wang X, Kilgore MW (2002) Signal cross-talk between estrogen receptor alpha and beta and the peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. Mol Cell Endocrinol 194:123–133
28. Bonofiglio D, Gabriele S, Aquila S et al (2005) Estrogen receptor alpha binds to peroxisome proliferator-activated receptor response element and negatively interferes with peroxisome proliferator-activated receptor gamma signalling in breast cancer cells. Clin Cancer Res 11:6139–6147
29. Huang JW, Shiau CW, Yang YT et al (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor γ-independent ablation of cyclin D1 by Thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells. Mol Pharmacol 67:1342–1348
30. Shiau CW, Yang CC, Kulp SK et al (2005) Thiazolidenediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma. Cancer Res 65:1561–1569
31. Turturro F, Friday E, Fowler R et al (2004) TGZ acts on cellular pH and DNA synthesis through a peroxisome proliferator-activated receptor γ-independent mechanism in breast cancer-derivated cell lines. Clin Cancer Res 10:7022–7030

32. Clay CE, Monjazeb A, Thorburn J et al (2002) 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis does not require PPARgamma in breast cancer cells. J Lipid Res 43:1818–1828
33. Pandhare J, Cooper SK, Phang JM (2006) Proline oxidase, a proapoptotic gene, is induced by TGZ. Evidence for both peroxisome proliferator-activated receptor γ-dependent and -independent mechanisms. J Biol Chem 281:2044–2052
34. Seargent JM, Yates EA, Gill JH (2004) GW9662, a potent antagonist of PPARgamma, inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone, independently of PPARgamma activation. Br J Pharmacol 143:933–937
35. Wang T, Xu J, Yu X et al (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases. Crit Rev Oncol Hematol 58:1–14
36. Qin C, Burghardt R, Smith R et al (2003) Peroxisome proliferators-activated receptor-γ agonists induce proteasome-dependent degradation of cyclin D1 and estrogen receptor α in MCF-7 breast cancer cells. Cancer Res 63:958–964
37. Suzuki T, Hayashi S, Miki Y et al (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor γ in human breast carcinoma: a modulator of estrogenic actions. Endocr Relat Cancer 13:233–250
38. Kim HJ, Kim JY, Meng Z et al (2007) 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits transcriptional activity of estrogen receptor-alpha via covalent modification of DNA-binding domain. Cancer Res 67:2595–2602
39. Boschi D, Tron GC, Lazzarato L et al (2006) NO-Donor phenols: a new class of products endowed with antioxidant and vasodilator properties. J Med Chem 49:2886–2897
40. Huang JW, Shiau CW, Yang J et al (2006) Development of small-molecule cyclin D1-ablative agents. J Med Chem 49:4684–4689
41. Fazzari A, Catalano MG, Comba A et al (2001) The control of progesterone receptor expression in MCF-7 breast cancer cells: effects of estradiol and sex hormone-binding globulin (SHBG). Mol Cell Endocrinol 172:31–36
42. Okubo T, Yokoyama Y, Kano K et al (2001) ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERalpha and PR. Food Chem Toxicol 39:1225–1232
43. Morosetti R, Park DJ, Chumakov AM et al (1997) A novel, myeloid transcription factor, C/EBP epsilon, is upregulated during granulocytic, but not monocytic, differentiation. Blood 90:2591–2600
44. Weng JR, Chen CY, Pinzone JJ et al (2006) Beyond peroxisome proliferator-activated receptor gamma signalling: the muti-facets of the antitumor effect of thiazolidinediones. Endocr Relat Cancer 13:401–413
45. Leclercq G, Lacroix M, Laïos I et al (2006) Estrogen receptor alpha: impact of ligands on intracellular shuttling and turnover rate in breast cancer cells. Curr Cancer Drug Targets 6:39–64
46. Elstner E, Williamson EA, Zang C et al (2002) Novel therapeutic approach: ligands for PPAR-γ and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat 74:155–165
47. Etique N, Flament S, Lecomte J et al (2007) Ethanol-induced ligand-independent activation of ERα mediated by cyclic AMP/PKA pathway: an in vitro study on MCF-7 breast cancer cells. Int J Oncol 31(6):1509–1518
48. Keller H, Givel F, Perroud M et al (1995) Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid $\times$ receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. Mol Endocrinol 9:794–804
49. Wolf DH, Hilt W (2004) The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. Biochim Biophys Acta 1695:19–31
50. Callige M, Richard-Foy H (2006) Ligand-induced estrogen receptor alpha degradation by the proteasome: new actors? Nucl Recept Signal 4:e004
51. Henke BR, Blanchard SG, Brackeen MF et al (1998) N-(2-Benzoylphenyl)-L-tyrosine PPARgamma agonists. 1. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents. J Med Chem 41:5020–5036
52. Allred CD, Kilgore MW (2005) Selective activation of PPARgamma in breast, colon, and lung cancer cell lines. Mol Cell Endocrinol 235:21–29
53. Qin C, Morrow D, Stewart J et al (2004) A new class of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists that inhibit growth of breast cancer cells: 1,1-Bis(3′-indolyl)-1-(p-substituted phenyl)methanes. Mol Cancer Ther 3(3):247–260
54. Lea MA, Sura M, Desbordes C (2004) Inhibition of cell proliferation by potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonists and antagonists. Anticancer Res 24:2765–2771
55. Schaefer KL, Takahashi H, Morales VM et al (2006) PPARgamma inhibitors reduce tubulin protein levels by a PPARgamma, PPAR delta and proteasome-independent mechanism, resulting in cell cycle arrest, apoptosis and reduced metastasis of colorectal carcinoma cells. Int J Cancer 120:702–713
56. Keelan J, Helliwell R, Nijmeijer B et al (2001) 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis in amnion-like WISH cells. Prostaglandins Other Lipid Mediat 66:265–282
57. Bonofiglio D, Aquila S, Catalano S et al (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activates p53 gene promoter binding to the nuclear factor-kappaB sequence in human MCF7 breast cancer cells. Mol Endocrinol 20:3083–3092
58. Talbert DR, Allred CD, Zaytseva YY et al (2007) Transactivation of ERalpha by RZG induces proliferation in breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat (in press)

II. Dérivés de la troglitazone et récepteurs des œstrogènes

Effects of PPARγ ligands in breast cancer cells: absence of ERβ proteolysis and potentiation of the PPARγ-independent ERα–ablative effect of Δ2-Troglitazone by biotinylation.
Julie LECOMTE, Isabelle GRILLIER-VUISSOZ, Stéphane SALAMONE, Michel BOISBRUN, Sabine MAZERBOURG, Yves CHAPLEUR and Stéphane FLAMENT. Article à soumettre.

2.1. Introduction

La présence du récepteur alpha des œstrogènes, au même titre que le récepteur de la progestérone, définit le statut de la tumeur mammaire et permet d'offrir aux patientes un traitement par thérapie endocrine. Le rôle de ERβ n'est pas clairement établi or sa présence dans la tumeur mammaire de statut ERα+/ERβ+ est associée à un pronostic de survie plus favorable par rapport aux tumeurs exprimant seulement ERα (Omoto *et al*., 2001). Or aucune étude n'a établi l'effet de ligands de PPARγ sur l'expression de ERβ dans les cellules cancéreuses mammaires hormono-dépendantes. Par ailleurs, dans les cellules cancéreuses mammaires, l'activation transcriptionnelle de la cycline D1 en réponse à des signaux mitotiques entraîne la progression du cycle cellulaire en phase G1/S et ainsi la prolifération. La surexpression de la cycline D1 est impliquée dans la tumorigénèse mammaire en corrélation avec un mauvais pronostic dans plus de 50% des cas (McIntosh *et al*., 1995 ; Kenny *et al*., 1999). Plusieurs travaux ont rapporté que la TGZ et la CGZ ainsi que certains de leurs dérivés induisent la dégradation de la cycline D1 dans les cellules MCF-7 (Qin *et al*., 2003 ; Huang *et al*., 2005).

Nos précédents travaux ont montré que les agonistes de PPARγ, en particulier la TGZ, induisent la protéolyse de ERα de manière indépendante de PPARγ dans les cellules MCF-7 et ZR-75-1. Le mécanisme impliqué dans l'induction de cette protéolyse est inconnu. Dans les cellules MCF-7, il a été démontré que la 15d-PGJ_2 pouvait se lier de façon covalente aux résidus cystéines du second doigt de zinc du domaine de liaison à l'ADN de ERα (Kim *et al*., 2007). Ceci est le fait d'une addition Michaelienne que la 15d-PGJ_2 peut d'ailleurs effectuer sur d'autres protéines (Uchida & Shibata, 2008). Une liaison covalente similaire pourrait avoir lieu entre ERα et les thiazolidinediones ou leurs dérivés. Nous avons donc posé l'hypothèse qu'une liaison covalente entre ERα et les ligands de PPARγ pourrait mener à sa dégradation via le

proteasome 26S. Au cours de cette étude, nous avons étudié non seulement ERα, mais aussi ERβ et la cycline D1. Afin de tester notre hypothèse, notre collaboration avec l'équipe du Docteur Chapleur à été poursuivie : un dérivé biotinylé de la Δ2-TGZ a été synthétisé pour réaliser des expériences de pull-down visant à mettre en évidence l'association ERα-Δ2-TGZ. Ce composé biotinylé ne nous a pas permis de démontrer une telle association. Néanmoins, notre étude a montré que ce composé avait des propriétés accrues en terme d'induction de protéolyse non seulement de ERα mais aussi de la cycline D1. De plus, nous avons observé que ERβ n'était pas affecté lors d'une exposition des cellules MCF-7 aux ligands de PPARγ connus pour occasionner la dégradation de ERα.

2.2. Principaux résultats

Dans un premier temps, nous avons analysé, par immunocytochimie, l'expression de ERβ dans les cellules MCF-7 exposées à la RGZ, la TGZ, la CGZ, la 15d-PGJ_2 et au dérivé Δ2-TGZ. Nous avons observé que la TGZ, la CGZ, la Δ2-TGZ et la 15d-PGJ_2 qui induisent la protéolyse de ERα, n'affectent pas ERβ. En effet, en présence de chacun de ces ligands, l'intensité du marquage nucléaire obtenu avec les anticorps anti-ERβ n'est pas modifié par rapport aux cellules témoins. Ainsi, les agonistes de PPARγ affectent différemment les 2 types de récepteurs des œstrogènes. La RGZ qui n'affecte pas ERα, n'affecte pas non plus ERβ.
Une précédente étude avait montré que la 15d-PGJ_2 s'associait de façon covalente à ERα mais pas à ERβ (Kim *et al*., 2007). Nos observations étayent donc notre hypothèse d'un lien entre association covalente et protéolyse.

En outre, après 5h de traitement des cellules MCF-7 avec la 15d-PGJ_2, l'activité transcriptionnelle de ERα est inhibée suite à la fixation covalente du ligand au domaine de fixation de l'ADN (DBD) du récepteur (Kim *et al*., 2007). Dans notre étude, nous avons stimulé les cellules MCF-7 avec la TGZ ou la Δ2-TGZ (25 µM) pendant 7h en présence ou en absence d'E_2 (1nM). Les cellules MCF-7 ont préalablement été transfectées avec un gène rapporteur codant la luciférase et placé sous le contrôle d'un promoteur contenant un élément de réponse aux œstrogènes (ERE). Les mesures de l'activité luciférase ont montré que la TGZ et la Δ2-TGZ inhibent l'activité transcriptionnelle de l'ERα de façon similaire à un traitement avec la 15d-PGJ_2. Ce résultat appuie donc aussi notre hypothèse.

Pour tester l'hypothèse selon laquelle la protéolyse de ERα serait consécutive à une liaison covalente avec les ligands de PPARγ, nous avons synthétisé le composé Δ2-TGZ auquel est fixé un groupement biotine. Nous avons choisi la Δ2-TGZ car elle n'active pas PPARγ. Une expérience de pull-down a été réalisée sur les cellules MCF-7 traitées pendant 3h à la Δ2-TGZ biotinylée. Les lysats cellulaires ont été incubés avec des billes d'avidine qui ont une forte affinité pour la biotine. L'analyse par Western blot a révélée que ERα n'est pas dégradé après 3h de traitement avec la Δ2-TGZ biotinylée. Nous avons comparé le culot et le surnageant des cellules incubées avec les billes d'avidine et l'analyse par Western blot montre que ERα est détecté uniquement dans le surnageant. Ce résultat suggère qu'une liaison covalente entre la Δ2-TGZ et ERα ne semble pas se produire.

L'absence de liaison entre la Δ2-TGZ et ERα nous a amenés à vérifier si la biotinylation n'affectait pas les propriétés de la Δ2-TGZ. Nous avons, d'une part, transfecté les cellules MCF-7 avec la construction plasmidique pPPRE3tkLuc. Après 24h de traitement, l'activité luciférase n'est pas stimulée par le dérivé biotinylé ce qui indique que la molécule biotinylée n'active pas PPARγ. D'autre part, nous avons étudié l'effet anti-prolifératif de la Δ2-TGZ biotinylée sur les cellules MCF-7. La prolifération cellulaire à été mesurée après 24h, 48h et 72h de traitement. Une inhibition significative de la prolifération est observée après 72h. Enfin, nous avons vérifié la protéolyse de ERα. Les cellules MCF-7 ont été traitées avec 1, 5 et 25 µM de Δ2-TGZ biotinylée pendant 24h. Le taux de ERα a été analysé par Western blot et comparé à celui des cellules traitées avec l, 5 et 25 µM de TGZ ou de Δ2-TGZ. En présence de 5 µM de Δ2-TGZ biotinylée, le signal ERα diminue de façon significative et disparaît presque complètement avec une dose de 25 µM. Cet effet est supérieur à celui observé avec la TGZ ou la Δ2-TGZ. Par ailleurs, la diminution du signal ERα est aussi observée dans les cellules MCF-7 après un traitement de 8h avec 25 µM de Δ2-TGZ biotinylée. La diminution du signal ERα n'est pas observée en présence d'un inhibiteur sélectif du protéasome, l'epoxomycine ce qui montre que la Δ2-TGZ biotinylée induit une dégradation de l'ERα dépendante du protéasome.

Plusieurs études ont établi que les ligands de PPARγ induisent une dégradation protéasome dépendante de la cycline D1 (Qin *et al*., 2003 ; Huang *et al*., 2005). Comme pour ERα, nos résultats obtenus par Western blot montrent une diminution du taux de cycline D1 après traitement des cellules MCF-7 avec 5 et 25 µM de Δ2-TGZ biotinylée. La protéolyse de la cycline D1 est donc aussi potentialisée. Cette dégradation est également inhibée en présence d'époxomycine.

2.3. Conclusion

Nos résultats démontrent que ERα et ERβ sont affectés différemment par les ligands de PPARγ. Nos expériences de pull down n'ont pas permis d'établir que la dégradation de ERα était due à la liaison covalente avec la Δ2-TGZ. Néanmoins la potentialisation observée avec la molécule est intéressante d'un point de vue thérapeutique car elle permet d'envisager une optimisation des effets protéolytiques par modification chimique.

Shortened title: ERα and ERβ in breast cancer cells exposed to PPARγ ligands.

Pre Clinical Study

Effects of PPARγ ligands in breast cancer cells: absence of ERβ proteolysis and potentiation of the PPARγ-independent ERα–ablative effect of Δ2-Troglitazone by biotinylation.

Julie Lecomte[1], Isabelle Grillier-Vuissoz[1], Stéphane Salamone[2] Michel Boisbrun[2] Yves Chapleur[2] and Stéphane Flament[1]

(1) EA 3442 Aspects cellulaires et moléculaires de la reproduction et du développement, Nancy-Université, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy; Cedex France.
(2) Groupe S.U.C.R.E.S., UMR 7565 Nancy-Université, CNRS, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy; Cedex France.

Address for offprints and correspondence:
Stéphane Flament, EA 3442, Aspects cellulaires et moléculaires de la reproduction et du développement, Nancy-Université, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy; Cedex France.
Tél : 33(3) 83 68 42 52
Fax : 33(3) 83 68 41 96
e-mail: stephane.flament@scbiol.uhp-nancy.fr

Abstract

The treatment of human breast cancer cell lines with PPARγ agonists is known to have antiproliferative effects but the role of PPARγ activation in the process remains unclear. We have recently shown that in hormone-dependent breast cancer cells, exposure to PPARγ agonists (15d-PGJ(2) and thiazolidinediones) induced ERα proteolysis in a PPARγ-independent manner. It is known that the natural PPARγ agonist 15d-PGJ(2) is able to covalently modify ERα by reacting with cysteine residues in the COOH-terminal zinc finger of the DNA binding domain (DBD). In the present study, we have hypothetized that a similar covalent binding was involved in the effect of thiazolidinediones. First, we observed that in contrast to ERα, ERβ proteolysis did not occur in MCF-7 cells exposed to different thiazolidinedione derivatives as previously reported for 15d-PGJ(2). Moreover, transfection experiments using pEREtkLuc showed that ERα functionality was affected early after exposure to thiazolidinedione derivatives. Then, a biotinylated derivative of Δ2-Troglitazone was synthesized in order to study a potential interaction with ERα. Pull-down assays using neutravidin beads. This compound did not allow to demonstrate a covalent interaction between ERα and biotinylated Δ2-Troglitazone. When we verified the efficiency of this molecule on ERα proteolysis induction, we observed that the substitution by biotine potentiated the proteasomal degradation of ERα. Cyclin D1 proteolysis was potentiated too. Thus the design of new thiazolidinedione derivatives able to affect differentially ER isoforms in a PPARγ-independent pathway could be an interesting tool for breast cancer therapy.

Keywords: Breast cancer, ERα, ERβ, PPARγ, Troglitazone

Introduction

Clinical management of breast cancer is guided by assessment of tumour parameters. Typically, ERα is used in combination with the progesterone receptor as a functional ER pathway indicator, to guide decisions regarding evolving endocrine therapies. However, the definition of ER status in breast cancer is more complex. Indeed, two forms of ER have been identified: α and β. The role or significance of ERβ in breast cancer still remains unclear but there is strong evidence that ERβ could act as a tumour supressor [1]. Indeed, it is down-regulated during carcinogenesis and tumour progression. Methylation of ERβ promoter correlates with loss of ERβ expression in mammary carcinoma [2]. The proliferation of breast cancer cells is reduced following transfection of ERβ [3]. Moreover, establishment and growth of tumours are reduced when ERβ-transfected MCF-7 or T47D cells were engrafted in immunodeficient mice [3-5]. ERβ could also be a marker for a good prognosis since in breast cancer with unfavourable prognosis the expression of ERβ is almost completely suppressed [6]. There is often positive association of ERβ expression with good clinical outcome with respect to tamoxifen treatment [7].

PPARs are ligand-activated transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily [8]. Three types of receptors have been described: α, β (also called δ) and γ [9-11]. Their activation involves ligand binding, heterodimerization with the retinoid X receptor (RXR) and interaction with a specific response element (PPRE) leading to the transcription modulation of the target gene facilitated by coactivators recruitment [12-15].

PPARγ is activated by endogenous ligands, the polyunsaturated fatty acids, mainly arachidonic derivatives such as 15d-PGJ(2) [16-18]. Thiazolidinediones including Troglitazone (TGZ, Rezulin), Rosiglitazone (RGZ, Avandia), Pioglitazone (Actos) and Ciglitazone (CGZ) are synthetic PPARγ agonists belonging to a class of drugs used in the treatment of type II diabetes [19]. Recently novel non-thiazolidinedione PPARγ agonists were discovered [20].

PPARγ ligands, mainly thiazolidinediones, have been proposed as anticancer agents and tested in clinical trials for breast cancer [21, 22]. Indeed, such compounds inhibit proliferation and induce differentiation of breast cancer cell lines *in vitro* and *in vivo* [20, 23-25]. Growth inhibition is associated with apoptosis and alteration in cell-cycle progression

through the over-expression of the cdk inhibitors p21 and p27 and the repression of cyclin D1 expression [26, 27]. PPARγ agonists inhibit also breast tumor angiogenesis and cell migration [28, 29].

Nevertheless, the involvement of PPARγ in these effects is not clear since PPARγ-independent events have been demonstrated. For instance, the treatment of MCF-7 cells with either 15d-PGJ(2), TGZ or CGZ induces the proteolysis of cyclin D1 and ERα and inhibits cell proliferation [30, 31]. The proteasome-dependent degradation of ERα has been also observed in another hormone-dependent cell line: ZR-75-1 [32]. The PPARγ-independence of these events was shown using PPARγ antagonists, unsaturated PPARγ-derivative like Δ2-TGZ as well as PPARγ-targeted RNA interference [32]. The mechanisms involved in the induction of ERα proteolysis are unknown. Interestingly, covalent modifications between 15d-PGJ(2) and cysteine residues within the ERα DNA binding domain have been described in MCF-7 [33]. The potential relationship between such a covalent binding and the proteolysis of ERα has not been studied.

We have hypothesized that like 15d-PGJ(2), a covalent binding could occur between ERα and thiazolidinediones, and that this modification could lead to the proteasomal degradation of the receptor. Indeed, thiazolidinediones can be metabolized by formation of glutathione adducts on the thiazolidinedione moiety [34, 35]. Thus similar reactions could occur between thiazolidinediones and sulfhydryl group of cysteine residues of ERα DNA binding domain. Moreover, Δ2-TGZ contains a double bond adjoining the terminal thiazolidinedione ring of TGZ which constitutes a potential supplementary reactive site by Michael's addition. Our results show that 15d-PGJ(2) which binds covalently to ERα but not ERβ triggers only the proteolysis of ERα. So it seems that there is a correlation between the differential binding of 15d-PGJ(2) and the differential proteolysis of the ER isoforms. Thiazolidinedione derivatives affected also differentially the degradation of the two ER isoforms. Nevertheless, pull-down experiments using a biotinylated derivative of Δ2-TGZ did not demonstrate an association of the molecule with ERα. However, interestingly, this derivative was more potent in ERα proteolysis induction than its unbiotinylated counterpart. These findings offer new perspectives for the design of therapeutic agents targeting differentially ERα and ERβ in breast cancer.

Material and methods

Cell culture and reagents

MCF-7 human breast cancer cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD). MCF-7 cells were grown at 37°C under 5% CO_2 in phenol red Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Eurobio, Les Ulis, France) and 2 mM L-glutamine.

TGZ (Sigma-Aldrich), CGZ, RGZ, 15d-PGJ(2), proteasome inhibitor MG132 (Calbiochem, La Jolla, CA), Δ2-TGZ and its biotinylated derivative were dissolved in DMSO. The synthesis of Δ2-TGZ was achieved according to slight modifications of known procedures [36, 37]. The biotinylated-Δ2-TGZ was obtained by simple esterification of the phenol group of the chromane moiety by carboxylic acid group of biotin. Experimental details will be published elsewhere. The identity and purity of these synthetic derivatives was verified by proton nuclear magnetic resonance and elemental analysis.

Cell proliferation assay

Cells were seeded in 6-well plates at the density of 8.10^4 cells/well in 2 mL of medium supplemented with 5% FCS and 2 mM L-glutamine. After 24 hr of cell attachment, the medium was replaced by phenol red DMEM supplemented with 1% FCS and 2 mM L-glutamine. Cell proliferation was studied every 24 hr during 72 hr of Δ2-TGZ treatment. Control wells received 0.1% DMSO. Medium was replaced every day. At the end of the treatment, cells were washed with PBS, trypsinized and counted with the CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Charbonnieres, France). Each treatment was performed in triplicate.

Transient transfection assays

Cells were seeded in 6-well plates at the density of 2.10^5 cells/well in 2 mL of medium supplemented with 5% FCS and 2 mM L-glutamine, and allowed to adhere for 24h. For PPAR transcriptional activity measurement, cells were transfected with pPPRE3tk-luc reporter (1µg/well) and SV40-driven β-galactosidase (β-Gal) (0.6 µg/well), as an internal control plasmid, in the presence of a human PPARγ expression vector (2µg/well). For ER transcriptional activity measurement, cells were transfected with ERE3tkLuc (1µg/well) and SV40-driven β-galactosidase (β-Gal) (0.6 µg/well), as an internal control plasmid.

Transfections were performed using Exgen 500 (Euromedex, France) according to the manufacturer's protocol. After transfection, cells were allowed to grow for 24 hr in phenol-red DMEM supplemented with 10% FCS stripped in dextran-coated charcoal and 2 mM L-glutamine. Cells were then treated with different compounds for 7 hr in fresh medium. In each sample, luciferase activity was measured by using the Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega, Charbonnieres, France). β-Gal activity was measured using the β-Galactosidase Enzyme Assay System (Promega). Luciferase activity was detected using a luminometer and normalized with respect to β-Gal activity measured using a spectrophotometer.

Pull-down experiments

For in vivo incorporation of Δ2-TGZ into ERα in intact cells, MCF-7 cells were incubated with 25 µM of biotinylated Δ2-TGZ or with DMSO for 3 hr in phenol red DMEM with 1% FCS. Cells were lysed and biotinylated proteins were purified by adsorption onto Avidin beads (Sigma-Aldrich) for 2 hr. Then, ERα was detected by Western blot in the pellet and the supernatant (see hereafter).

Western immunoblotting

At the end of the treatment, MCF-7 cells were washed twice with PBS in T-75 flasks, scrapped and collected by centrifugation at 1000 rpm for 10 min. The pellets were washed with PBS and suspended in 200 µL of lysis buffer containing: 25 mM MOPS pH 7.2, 60 mM β-glycerophosphate, 15 mM nitrophenylphosphate, 15 mM EGTA, 15 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 0.1 mM sodium orthovanadate and protease inhibitors (10 µg/mL aprotinin, 5 µg/mL pepsatin, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL soybean trypsin inhibitor and 100 µM benzamidine). An aliquot of cell lysate was used for protein concentration determination (RC-DC kit, Bio-Rad Laboratories). After addition of 2X Laemmli buffer (1v/1v), samples were heated at 100°C for 10 min. Thirty µg of total proteins were subjected to SDS-PAGE (10%). After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membrane. The membrane was blocked in TNT buffer (5 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, 0.1% Tween 20) with 5% non-fat powder milk and incubated with ERα antibody (clone F-10, SC-8002, Santa Cruz Biotechnology) diluted at 1:500, Cyclin D1 antibody (Cell Signaling) diluted at 1:1000 or β-Actin antibody (clone C-11, SC-1615-R, Santa Cruz Biotechnology) diluted at 1:3000 in TNT buffer overnight at 4°C. Next, the membranes were washed five times with TNT and incubated for 1 hr with a peroxidase-linked secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology).

After five washes with TNT, the membranes were developed with ECL detection reagent using chemiluminescence (Amersham, Orsay, France).
Band intensity was evaluated using a GelDoc 2000 imaging system (Bio-Rad Laboratories) and a software package (Quantity One v.4.3.1, Bio-Rad Laboratories).

Immunocytochemistry

MCF-7 cells were seeded on Poly L-lysine coated coverslips and grown in their respective medium as described above. Cells were treated with 15d-PGJ(2),CGZ, RGZ, TGZ, Δ2-TGZ or DMSO for 24 hr. At the end of treatment, coverslips were washed with PBS and fixed in 4% PAF for 20 min. After washing in Tris Buffered Saline, preparations were treated for ERα and ERβ detection using monoclonal antibodies (clone F-10, SC-8002, Santa Cruz Biotechnology ; clone 14C8, GeneTex Inc., San Antonio, USA) and alexa fluor labelled goat anti-mouse antibodies (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Cells were counterstained with Hoechst dye to visualise nuclei. Preparations were analysed under U.V. illumination on a Eclipse 80i microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France). Images were collected using LuciaG software 4.81 (Laboratory imaging).

Statistical analysis

The results are expressed as mean ± standard error of the mean of three different experiments. Differences among treatment groups were tested using analysis of variance (ANOVA). Differences in which P was less than 0.05 were statistically significant. When significant differences were detected, specific post-hoc comparisons between treatment groups were examined with the Student Newman’s Keuls test (SPSS v11.0 Computer Software).

Results

ERβ is not affected by PPARγ ligands

Since it has been described that 15d-PGJ(2) could bind covalently to ERα whereas it did not bind to ERβ, we tested if there was a correlation between the reported binding activity and proteolysis [33]. Besides, the proteolysis of ERβ has not been studied in breast cancer cells exposed to PPARγ ligands, and this could give interesting informations about the status of ER in such treated cells. This study was performed using immunocytochemistry (Fig. 1). As expected from our previously described western blot analyses, when MCF-7 cells were exposed for 24 hours to 25µM 15d-PGJ(2), ERα staining disappeared when compared to control cells (Fig. 1) [32]. In contrast to ERα, ERβ staining was not modified in 15d-PGJ(2) treated cells (Fig. 1). When we studied ERβ status in MCF-7 cells exposed to other PPARγ ligands, we observed that whatever the compound, the ERβ staining was never affected. RGZ that does not induce ERα proteolysis does not affect ERβ. Neither 15d-PGJ(2), nor CGZ, TGZ or its derivative Δ2-TGZ which all induce ERα proteolysis, do not affect ERβ (Fig. 1). Thus, α and β ER isoforms are differentially affected by PPARγ ligands. Besides, there is a good correlation between the binding activity of 15d-PGJ(2) and ER proteolysis, that is in agreement with our hypothesis.

ERα transcriptional activity is affected early after TGZ and Δ2-TGZ exposure

It has been reported that a five hours treatment of MCF-7 cells with 15d-PGJ(2) inhibited ERα transcriptional activity through its covalent binding to the DNA binding domain of the receptor [33]. Hence, we studied the transcriptional activity of ERα in MCF-7 cells exposed during 7 hours to TGZ or Δ2-TGZ in presence or absence of E_2. The results of these transfection assays indicate a 3.2-fold increase in luciferase activity in control cells exposed to E_2 alone (1 nM) (Fig. 2). In presence of TGZ or Δ2-TGZ (25 µM), the increase in luciferase activity was 2.4- and 1.7-fold respectively (Fig. 2). So, the effects of TGZ and Δ2-TGZ are similar to those previously described with 15d-PGJ(2) that could suggest a similar mechanism of action leading to ERα proteolysis. This is still in agreement with our hypothesis.

Biotinylated Δ2-TGZ does not associate with ERα

In order to test our hypothesis of a relationship between the covalent binding of PPARγ ligands to ERα and the proteolysis of this receptor, a biotinylated derivative of TGZ was synthesised. Indeed, a similar approach was used to demonstrate a similar association between 15d-PGJ(2) and ERα [33]. In our derivative, biotin was linked to the phenol group of the chromane moiety of Δ2-TGZ. MCF-7 cells were exposed for a short time to either 25 µM biotinylated Δ2-TGZ or DMSO. Cell lysates were subjected to pull-down assay using neutravidin beads and followed by western blot with anti-ERα antibody. After 3 hours of exposure to biotinylated Δ2-TGZ, ERα was detected in similar amount in treated and in control whole cell lysates demonstrating that it was not yet degraded at this time (Fig. 3). However, when we compared pellets and supernatants after the neutravidin pull-down experiment, in both conditions ERα was detected in supernatants (Fig. 3). Thus, a covalent binding between Δ2-TGZ and ERα does not seem to occur.

ERα and Cyclin D1 proteolysis are potentiated by Biotinylated Δ2-TGZ

Before to conclude definitely to the absence of binding between biotinylated Δ2-TGZ and ERα, we verified that biotinylation did not affect the properties of Δ2-TGZ. The first point we analysed was the absence of activation of PPARγ. This was performed using MCF-7 cells transfected with pPPRE3tk-luc reporter. In contrast to TGZ used as a positive control, neither Δ2-TGZ nor biotinylated Δ2-TGZ induced a significant increase in luciferase activity (Fig. 4). The second point we studied was the anti-proliferative effect of this molecule. In our culture conditions (1% SVF containing medium changed every day), in control medium, an increase in cell numbers was measured at 24, 48 and 72 hr, time at which there was a 2-fold increase in cell numbers. When grown in the presence of biotinylated Δ2-TGZ, a slight increase in cell numbers was observed at 24 and 48 hr but a significant decrease was observed after 72 hr (Fig. 5). The third and last point we verified was the proteolysis of ERα. This receptor was studied by western blotting in whole cell lysates from MCF-7 cells exposed for 24 hr to biotinylated Δ2-TGZ. We compared the effect of this molecule with those of Δ2-TGZ and TGZ and tested three concentrations ranging from 5 to 25 µM. The intensity of the signal obtained with the anti-ERα antibody decreased significantly in lysates of MCF-7 cells

exposed to 25 µM of either TGZ or Δ2-TGZ. In the presence of 25 µM biotinylated Δ2-TGZ, the signal almost completely disappeared whereas at a dose as low as 5 µM, a significant decrease of the staining was observed (Fig. 6A). The decrease in ERα immunodetection was not only obtained at lower doses of biotinylated Δ2-TGZ but it was also obtained faster. Indeed, when used at 25µM, this compound induced a complete disappearance of the signal as soon as 8 hr after the beginning of the treatment (Fig. 6B). The disappearance of the signal was not observed when the proteasome inhibitor epoxomicin was added to the culture medium demonstrating a proteasome-dependent degradation of ERα as previously described for other PPARγ ligands (Fig. 6C) [32]. Exposure of breast cancer cells to PPARγ ligands is known to induce not only ERα but also Cyclin D1 proteasomal degradation (references). Hence, we determined if biotinylation of Δ2-TGZ potentiated not only ERα but also Cyclin D1 proteolysis. On western blots, the disappearance of Cyclin D1 immunodetection signal was observed at lower doses than with Δ2-TGZ or TGZ (Fig. 7A). The proteolysis of Cyclin D1 was also inhibited in the presence epoxomicin (Fig. 7B).

Discussion

Most patients with breast cancer have hormone-dependent tumors and estrogens play an important role in the control of breast cancer cell proliferation. Hence, both estrogen synthesis and actions through the estrogen receptor (ER) have been targeted by therapies to control hormone-dependent breast cancer. Ligands of the nuclear receptor PPARγ could be interesting for the development of a new modality for breast cancer treatment. Indeed, they have been described as potent inhibitors of breast cancer cell proliferation, and studies performed on breast cancer cell lines reported that PPARγ ligands triggered the disruption of ERα signalling pathway. This effect appears to be associated with a PPARγ-independent proteolysis of ERα but the molecular mechanisms leading to this event are not understood.

Our work was based on the hypothesis that a covalent binding of some ligands to ERα could be involved in this proteolysis. Such a covalent binding has been clearly demonstrated in case of exposure of breast cancer cells to the natural PPARγ ligand 15d-PGJ(2): this compound reacts with sulfhydryl group of cysteine residues of ERα by Michael's addition [33]. The covalent binding of 15d-PGJ(2) may be one of the mechanisms by which this electrophile lipid induces a cellular response [38]. Among the synthetic ligands of PPARγ

reported to induce ERα proteolysis in breast cancer cells, Δ2-TGZ is interesting because it is not able to induce PPARγ transactivation [30]. This molecule, resulting from the introduction of a double bond adjoining the terminal thiazolidine-2,4-dione ring of TGZ, could also react with ERα by Michael's addition. In order to test this hypothesis, a biotinylated derivative was synthesized. Indeed, biotinylation was a simple approach used to demonstrate the binding of 15d-PGJ(2) to several cellular proteins in vivo including ERα [33, 39].

Before using this compound on breast cancer cells, we studied ERβ status in MCF-7 cells exposed to 15d-PGJ(2) and various PPARγ ligands. Indeed, it has been described that 15d-PGJ(2) incorporation could occur in ERα but not ERβ [33]. So, if our hypothesis of a relationship between covalent binding and proteolysis was true, ERβ should not be affected in MCF-7 cells exposed to 15d-PGJ(2). Our immunocytochemical experiments showed that the two isoforms were affected differently by 15d-PGJ(2) which triggered only ERα proteolysis. The same result was observed with other PPARγ ligands including Δ2-TGZ, that is an interesting finding that was not described earlier [30]. One might consider that this differential behavior of the two isoforms in terms of interaction with 15d-PGJ(2) is surprising because their DNA binding regions (C domain), the site of the covalent interaction, have 96% homology [40]. Nevertheless, the other domains do not display so much homology: only 30% for domains A/B and D, and 56% for domain E/F [41]. This could contribute to slight differences in ER conformation or interaction with chaperones, leading to a different accessibility to C domain. Although the role of ERβ in mammary tissue is not completely understood, recent data suggest ERβ as a tumor suppressor gene. So, the use of compounds able to trigger ERα degradation without affecting ERβ could be of interest for breast cancer therapy [2].

Moreover, we studied ERα transcriptional activity. Indeed, the covalent binding of 15d-PGJ(2) to ERα inhibited the transcriptional activity of the receptor [33]. So, if a covalent binding occurred with other PPARγ ligands, this could also decrease the transcriptional activity of ERα. Our transfection assays using ERE3tk-Luc and E_2 stimulation demonstrated a decrease in luciferase activity after seven hours of MCF-7 cells exposure to TGZ and Δ2-TGZ. This modification appears earlier than ERα proteolysis and this result is still in agreement with our hypothesis of a covalent binding.

The results of our pull-down experiments using biotinylated Δ2-TGZ did not allow to conclude to a covalent binding between the thiazolidinedione derivative and ERα. However,

the use of biotinylated-15d-PGJ(2) was a very easy and efficient method to demonstrate the binding of 15d-PGJ(2) to several proteins including ERα [33, 39] One might suggest that in our biotinylated Δ2-TGZ, the association either to avidin or to ERα is impaired and that it could require a linker between biotin and Δ2-TGZ. However, the use of another biotinylated Δ2-TGZ including such a linker also failed to pull down ERα (not shown).

Interestingly, Δ2-TGZ biotinylated on the phenol group of the chromane moiety exhibited higher potency in inducing ERα degradation compared to TGZ or Δ2-TGZ. There was also an improvement of Cyclin D1 degradation that is known to also occur in case of treatment with Δ2-TGZ [30]. This improvement in the ERα- and cyclin D1-ablating activity of biotinylated Δ2-TGZ over Δ2-TGZ was in accordance with a previous study using Δ2-TGZ as a lead compound for structural modifications [37]. Indeed, a similar addition of various substituents to the phenol group of the chromane moiety of Δ2-TGZ resulted in a multifold increase in the cyclin D1-ablative activity.

To conclude, our results demonstrate that ERα and ERβ are differentially affected in case of treatment of breast cancer cells with PPARγ ligands. The intact status of ERβ in conditions where ERα is proteolysed could be of interest in case of application of such compounds or some derivatives to breast cancer therapy. The results of our pull-down experiments do not agree with the fact that covalent binding of those ligands could be a general mechanism leading to the proteasomal degradation of ERα and the exact mechanism is still unknown. However, the potentiation of the proteolysis not only of ERα but also of Cyclin D1 is very promising for the design of new synthetic compounds for endocrine therapy.

Acknowledgements

This work was supported by grants of the ‘Université Henri Poincaré (BQR)’, of the “Conseil Regional de Lorraine” of the ‘Association pour la Recherche sur le Cancer’, of the ‘Ligue Contre le Cancer, comité de la Haute-Marne’ and of ‘Canceropole Grand Est’. Julie Lecomte is recipient of a grant of the ‘Ligue Contre le Cancer, comité de la Haute-Marne’. We would like to thank SANOFI AVENTIS for a studentship to SS. We also thank Martine Chillet, Brigitte Fernette, Sandrine Adach and François Dupire for technical assistance. The pPPRE3tkLuc construct was a generous gift of Pr. Philippe Becuwe.

References

1. Bardin A, Boulle N, Lazennec G et al (2004) Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. Endocr Relat Cancer 11:537-551

2. Rody A, Holtrich U, Solbach C et al (2005) Methylation of estrogen receptor beta promoter correlates with loss of ER-beta expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions. Endocr Relat Cancer 12:903-916

3. Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V et al (2004) Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. Cancer Res 64:423-428

4. Hartman J, Lindberg K, Morani A et al (2006) Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. Cancer Res 66:11207-11213

5. Behrens D, Gill JH, Fichtner I (2007) Loss of tumourigenicity of stably ERbeta-transfected MCF-7 breast cancer cells. Mol Cell Endocrinol 274:19-29

6. Ahr A, Holtrich U, Solbach C et al (2001) Molecular classification of breast cancer patients by gene expression profiling. J Pathol 195:312-320

7. Murphy LC, Watson PH (2006) Is oestrogen receptor-beta a predictorof endocrine therapy responsiveness in human breast cancer. Endocr Relat Cancer 13:327-334

8. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M et al (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell 83:835-839

9. Isseman I, Green S (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature 347:645-650

10. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B et al (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferators–activated receptors. Proc Natl Acad Sci USA 91:7355-7359

11. Dreyer C, Krey G, Keller H et al (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. Cell 68:879-887

12. Issemann I, Prince RA, Tugwood JD et al (1993) The retinoid X receptor enhances the function of the peroxisome proliferator activated receptor. Biochimie 75:251-256

13. Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. Cell 83:841-850

14. McKenna NJ, O'Malley BW (2002) Minireview: nuclear receptor coactivators-an update. Endocrinology 43:2461-2465

15. Yang W, Rachez C, Freedman L.P (2000) Discrete roles for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators. Mol Cell Biol 20:8008-8017

16. Thoennes SR, Tate PL, Price TM et al (2000) Differential transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by omega-3 and omega-6 fatty acids in MCF-7 cells. Mol Cell Endocrinol 160:67-73

17. Forman BM, Tontonoz P, Chen J et al (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. Cell 83:803-812

18. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM et al (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. Cell 83:813-819

19. Spiegelman BM (1998) PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. Diabetes 47:507-514

20. Kim KY, Kim SS, Cheon HG (2006) Differential anti-proliferative actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in MCF-7 breast cancer cells. Biochem Pharmacol 72:530-540

21. Burstein HJ, Demetri GD, Mueller E et al (2003) Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand TGZ as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. Breast Cancer Res Treat 79:391-397

22. Yee LD, Williams N, Wen P et al (2007) Pilot study of rosiglitazone therapy in women with breast cancer:effects of short-term therapy on tumor tissue and serum marker. Clin Cancer Res 13:246-252

23. Elstner E, Muller C, Koshizuka K et al (1998) Ligands for peroxisome proliferators – activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells *in vitro* and in BNX mice. Proc Natl Acad Sci 95:8806-8811

24. Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P et al (1998) Terminal differentiation of human breast cancer through PPARγ. Mol Cell 1:465-470

25. Mehta RG, Williamson E, Patel MK et al (2000) A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, retinoids, and prevention of preneoplastic mammary lesions. J Natl Cancer Inst 92:418-423

26. Fenner MH, Elstner E (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-g ligands for the treatment of breast cancer. Expert Opin Investig Drugs 14:557-568

27. Yin F, Wakino S, Liu Z et al (2001) TGZ inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. Biochem Biophys Res Commun 286:916-922

28. Goetze S, Xi XP, Kawano H et al (1999) PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells. J Cardiovasc Pharmacol 33:798-806

29. Xin X, Yang S, Kowalski J et al (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. J Biol Chem 274:9116-9121

30. Huang JW, Shiau CW, Yang YT et al (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor γ-independent ablation of cyclin D1 by Thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells. Mol Pharmacol 67:1342-1348

31. Qin C, Burghardt R, Smith R et al (2003) Peroxisome proliferators–activated receptor-γ agonists induce proteasome-dependent degradation of cyclin D1 and estrogen receptor α in MCF-7 breast cancer cells. Cancer Res 63:958-964

32. Lecomte J, Flament S, Salamone S et al (2008) Disruption of ERα signalling pathway by PPARγ agonists: evidences of PPARγ-independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. Breast Cancer Res Treat 112: 437-451.

33. Kim HJ, Kim JY, Meng Z et al (2007) 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits transcriptional activity of estrogen receptor-alpha via covalent modification of DNA-binding domain. Cancer Res 67:2595-2602

34. Prabhu S, Fackett A, Llyod S et al (2002) Identification of glutathione conjugates of troglitazone in human hepatocytes. Chem Biol Interact 142:83-97

35. Alvarez-Sanchez R, Montavon F, Hartung T et al (2006) Thiazolidinedione bioactivation : a comparaison of the bioactivation potentials of troglitazone, rosiglitazone, and pioglitazone using stable isotope-labeled analogues and liquid chromatography tandem masse spectrometry. Chem Res Toxicol 19:1106-1116

36. Boschi D, Tron GC, Lazzarato L et al (2006) NO-Donor Phenols: A New Class of Products Endowed with Antioxidant and Vasodilator Properties. J Med Chem 49:2886-2897

37. Huang JW, Shiau CW, Yang J et al (2006) Development of Small-Molecule Cyclin D1-Ablative Agents. J Med Chem 49:4684-4689

38. Uchida K, Shibata T (2008) 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2: an electrophilic trigger of cellular responses. Chem Res Toxicol 21:138-144.

39. Oh JY, Giles N, Landar A, Darley-Usmar V (2008) Accumulation of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 adduct formation with Keap1 over time: effects on potency for intracellular antioxidant defence induction. Biochem J 411:297-306

40. Fox EM, Davis RJ, Shupnik MA (2008) ERbeta in breast cancer—onlooker, passive player, or active protector? Steroids 73:10

41. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M (2006) Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health. Mol Aspects Med 27: 299-402

Figure legends

Fig. 1 – Immunocytochemical analysis of ER isoforms in MCF-7 cells exposed to various PPARγ ligands.

Fig. 2 – Inhibition of E_2-induced ERα transcriptional activity by TGZ and Δ2TGZ in MCF-7 cells. MCF-7 cells were transiently transfected with ERE3tkLuc and pCMVbGal. The cells were treated for 7h with TGZ or Δ2TGZ (25 µM) in presence or absence of E_2. Luciferase reporter activity was measured, normalized with the β-Gal activity and expressed as percentage of the control assumed as 100%. The values represent the means ± s.e.m. of 3 different experiments. In each experiment, the activities of transfected plasmids were assayed in duplicate transfections.

Fig. 3 - Western blot analysis of ERα in MCF-7 whole cell lysates after pull-down with neutravidin beads. MCF-7 cells were treated for 3 hr with DMSO (Ctrl) or 25 µM biotinylated Δ2-TGZ. SDS-PAGE and Western blotting analysis using an anti-ERα monoclonal antibody were performed either on whole cell lysates or on supernatants and pellets obtained after pull-down with neutravidin. β-Actin was used as an internal control. Results illustrated in this figure were observed at least in 3 separate experiments.

Fig. 4 - PPARγ activation by synthetics ligands. MCF-7 cells were transiently co-transfected with pPPRE3tkLuc and pCMV-βGal in the presence of a human PPARγ expression vector. The cells were treated for 24 hr with Δ2-TGZ or biotinylated Δ2-TGZ (25 µM). Luciferase reporter activity was measured, normalized with the β-Gal activity and expressed as percentage of the control assumed as 100%. The values represent the means ± s.e.m. of 3 different experiments. In each experiment, the activities of transfected plasmids were assayed in duplicate transfections. *, Significantly different from untreated control ($P<0.05$).

Fig. 5 - Analysis of cell proliferation of MCF-7 cells exposed to different PPARγ ligands. MCF-7 cells were treated with 25 µM TGZ or Δ2-TGZ. Control cells (Ctrl) were treated with DMSO. Cell numbers were evaluated every 24 hr during 72 hr using the CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay. Results are given as mean ± s.e.m. of 3 different counts. *, significantly different from untreated control ($P< 0.05$).

Fig. 6 - Western blot analysis of ERα in MCF-7 cells exposed to different PPARγ ligands. A) MCF-7 cells were treated with TGZ, Δ2-TGZ or biotinylated Δ2-TGZ (at 1, 5 and 25 μM) for 24 hr. Control cells received DMSO. 30 μg of total proteins were subjected to SDS-PAGE and Western blotting analysis using an anti-ERα monoclonal antibody. β-Actin was used as an internal control. B) Similar analysis performed after 8 hr of culture in presence of 25 μM. C) MCF-7 cells were treated with TGZ, Δ2-TGZ or biotinylated Δ2-TGZ (25 μM) for 18 hr in the presence of the proteasome inhibitor epoxomicin (10 μM). Control cells were exposed to DMSO alone.

Fig. 7 – Western blot analysis of Cyclin D1 in MCF-7 cells exposed to different PPARγ ligands. A) MCF-7 cells were treated with TGZ, Δ2-TGZ or biotinylated Δ2-TGZ (at 1, 5 and 25 μM) for 24 hr. Control cells received DMSO. 30 μg of total proteins were subjected to SDS-PAGE and Western blotting analysis using an anti-cyclin D1 monoclonal antibody. β-Actin was used as an internal control. B) MCF-7 cells were treated with TGZ, Δ2-TGZ or biotinylated Δ2-TGZ (25 μM) for 18 hr in the presence of the proteasome inhibitor epoxomicin (10 μM). Control cells were exposed to DMSO alone.

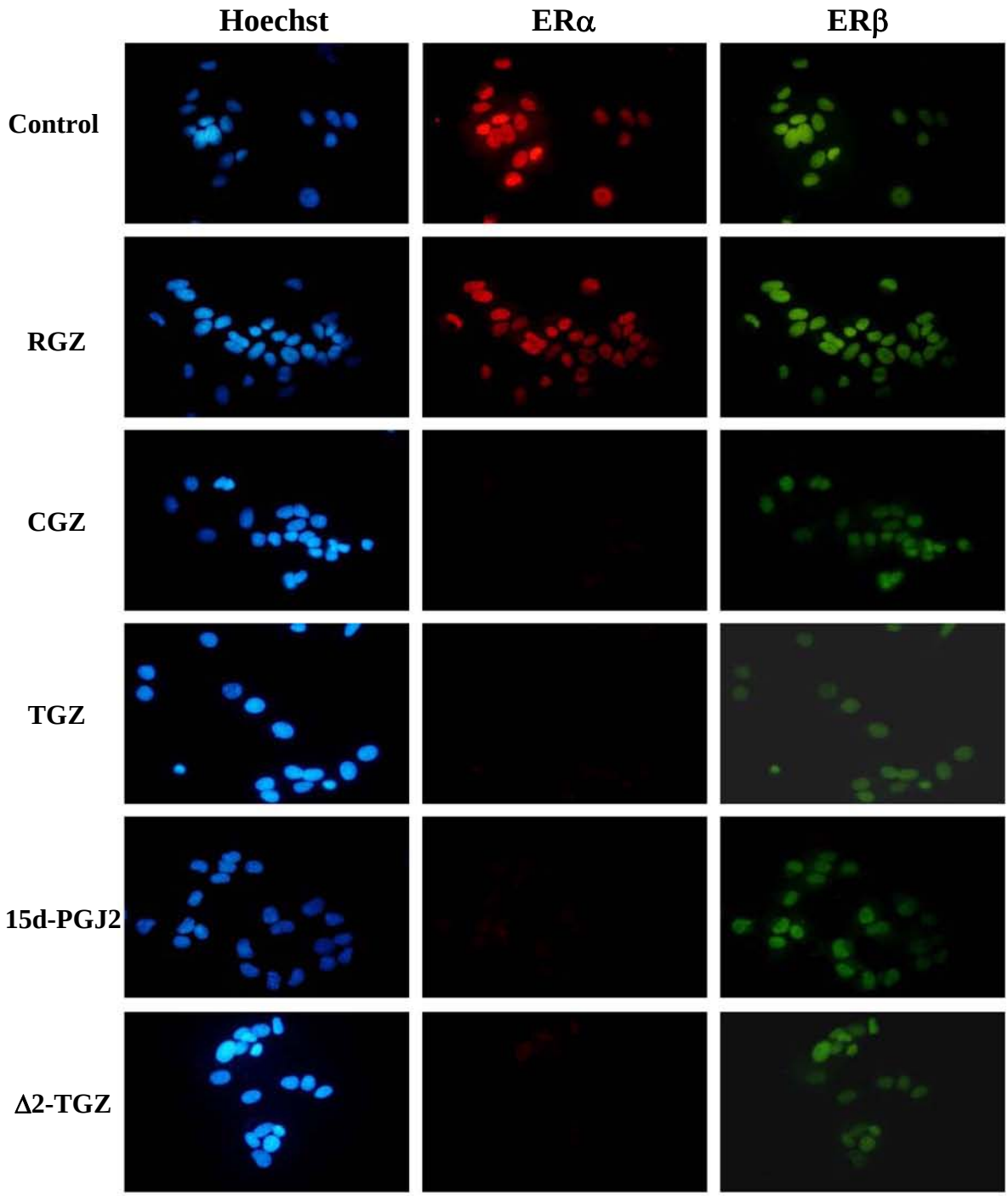


Figure 1

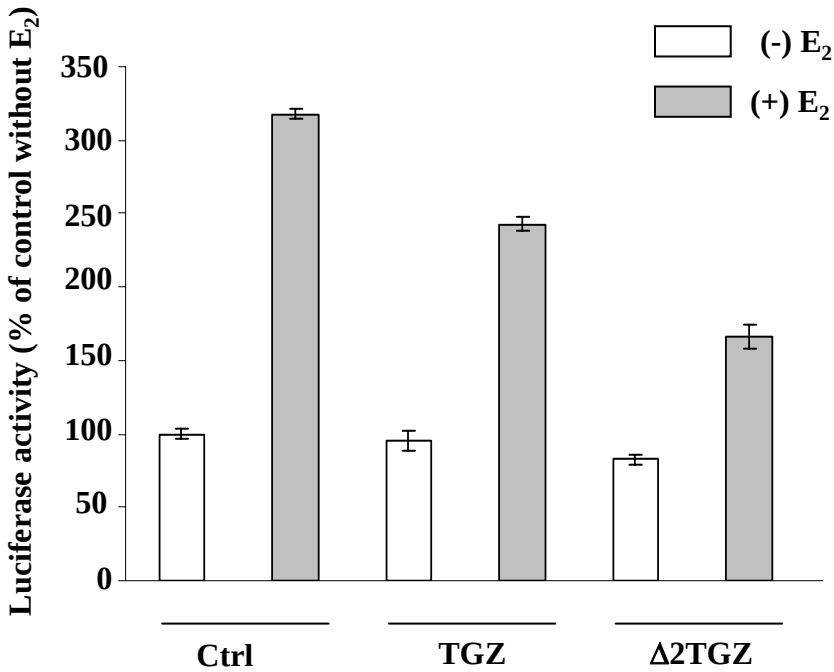

Luciferase activity (% of control without E2)
350
300
250
200
150
100
50
0
(-) E2
(+) E2
Ctrl
TGZ
Δ2TGZ

Figure 2

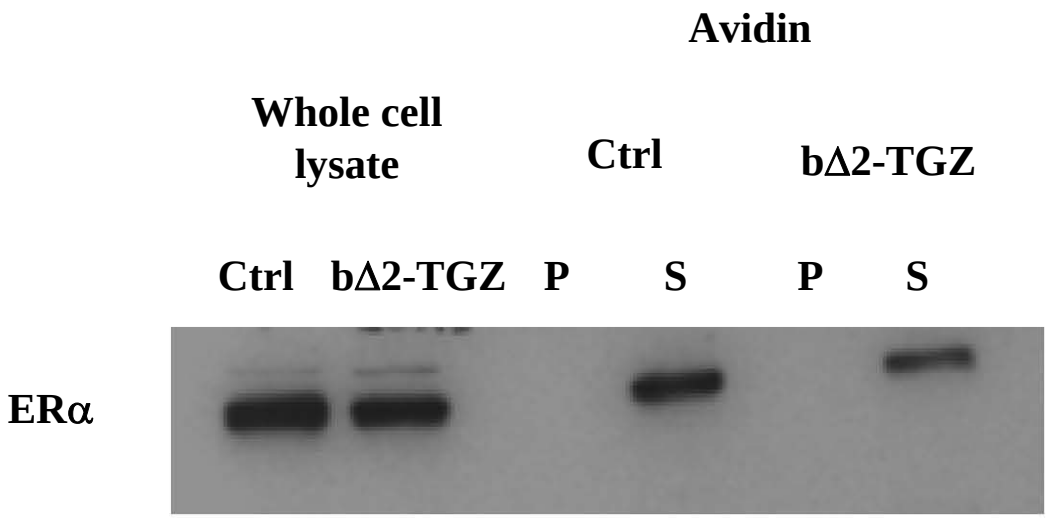


Figure 3

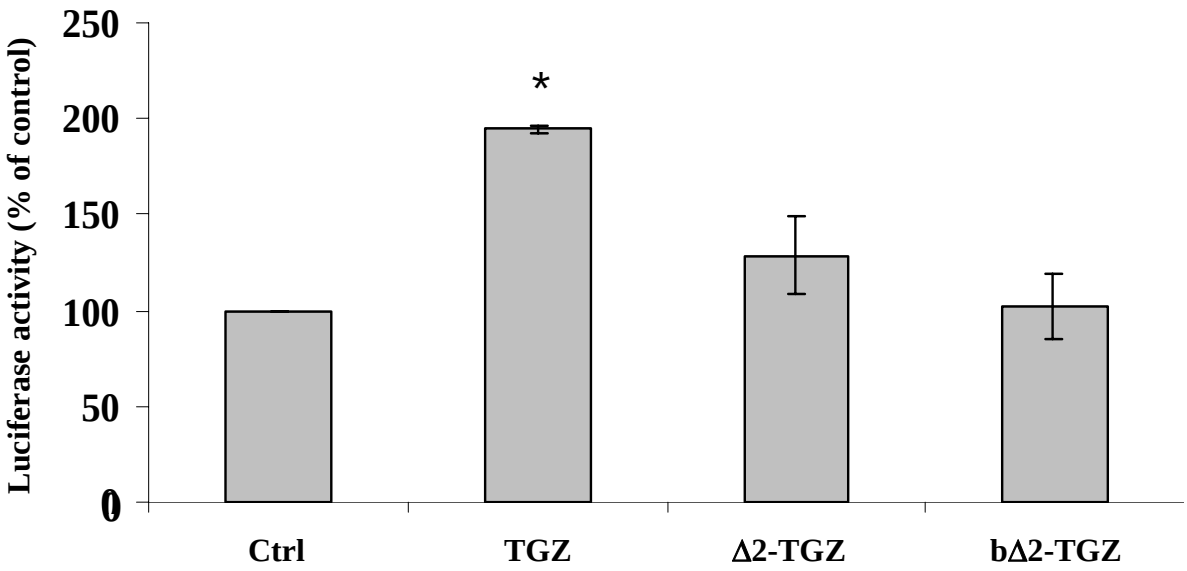

Luciferase activity (% of control)
250
200
150
100
50
0
*
Ctrl
TGZ
Δ2-TGZ
bΔ2-TGZ

Figure 4

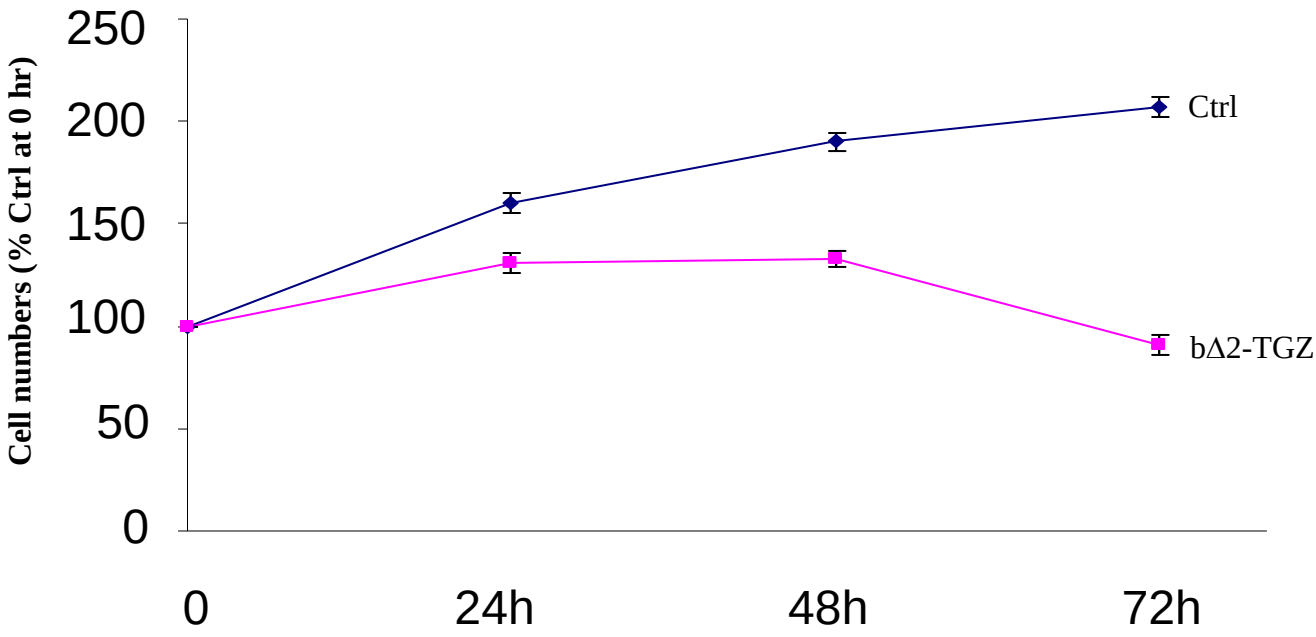

Cell numbers (% Ctrl at 0 hr)
250
200
150
100
50
0
0
24h
48h
72h
Ctrl
bΔ2-TGZ

Figure 5

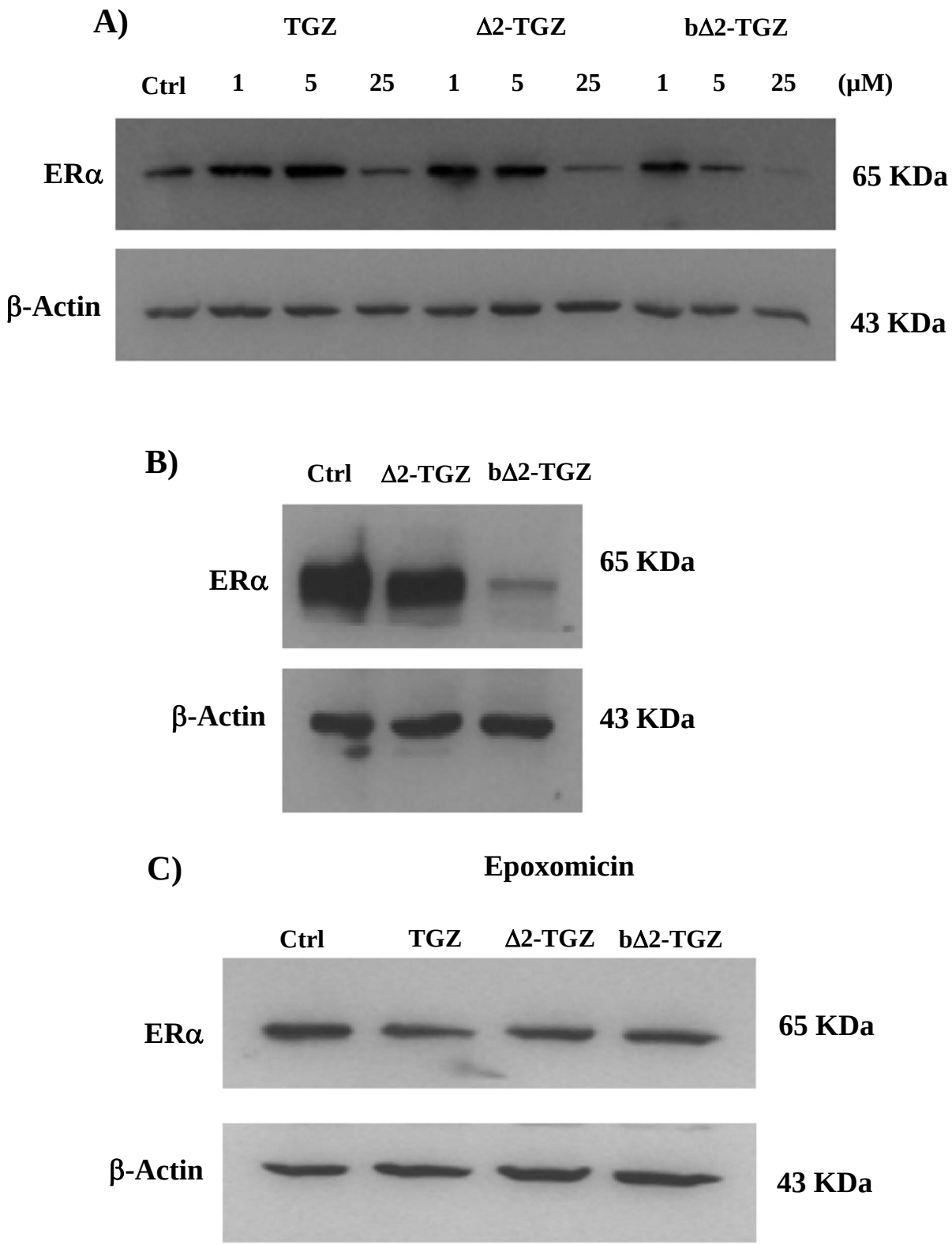
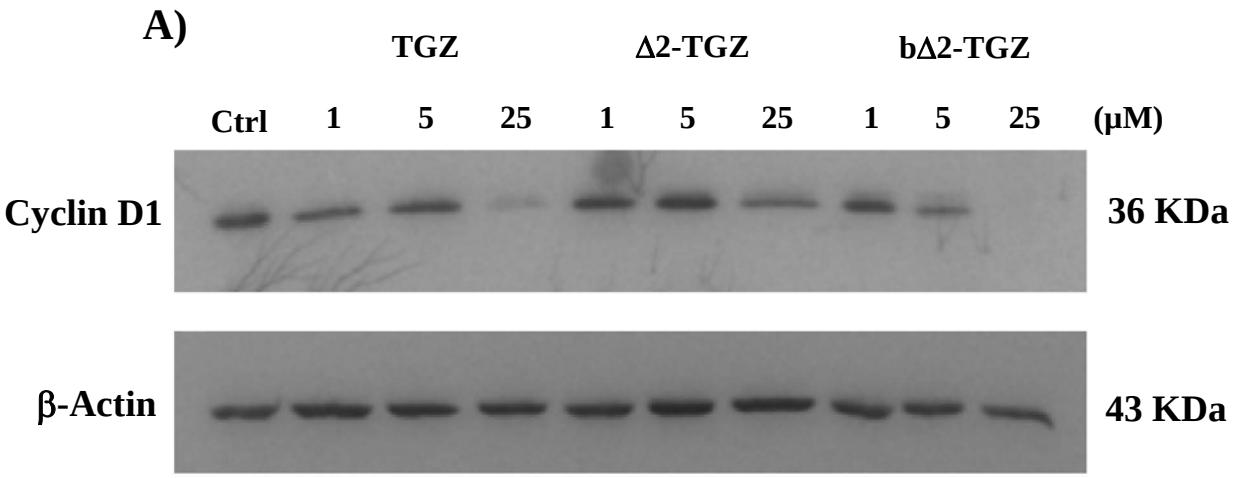

A)
TGZ
Δ2-TGZ
bΔ2-TGZ
Ctrl
1
5
25
1
5
25
1
5
25
(μM)
ERα
65 KDa
β-Actin
43 KDa
B)
Ctrl
Δ2-TGZ
bΔ2-TGZ
ERα
65 KDa
β-Actin
43 KDa
C)
Epoxomicin
Ctrl
TGZ
Δ2-TGZ
bΔ2-TGZ
ERα
65 KDa
β-Actin
43 KDa

Figure 6


A)
TGZ
Δ2-TGZ
bΔ2-TGZ
Ctrl
1
5
25
1
5
25
1
5
25
(μM)
Cyclin D1
36 KDa
β-Actin
43 KDa

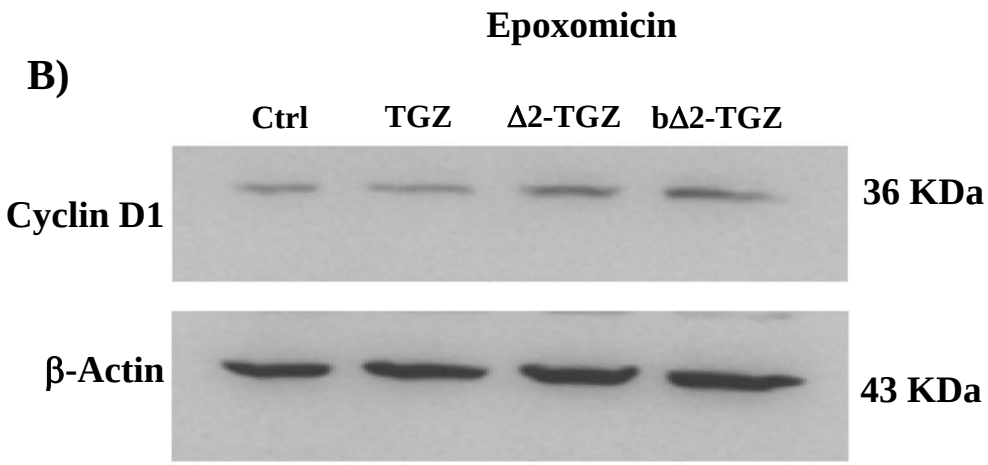

Epoxomicin
B)
Ctrl
TGZ
Δ2-TGZ
bΔ2-TGZ
Cyclin D1
36 KDa
β-Actin
43 KDa

Figure 7

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Parmi les patientes atteintes d'un cancer du sein, 70% présentent un cancer dont la progression est dépendante des œstrogènes. L'activation de ERα va déclencher un ensemble d'évènements intracellulaires, aboutissant à l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Les thérapies ciblées actuelles font notamment appel à des anti-œstrogènes (tamoxifène ou ICI 182,780) bloquant l'action du récepteur alpha des œstrogènes. Or ces traitements entraînent des effets secondaires indésirables ou des phénomènes de résistance. De nombreux travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* ont montré que les agonistes de PPARγ, particulièrement les composés de la famille des thiazolidinediones, inhibent la prolifération des cellules cancéreuses mammaires hormono-dépendantes. Notre étude visait à déterminer quels étaient les effets de ligands de PPARγ sur la voie de signalisation de ERα dans les cellules cancéreuses mammaires, en vue d'une utilisation thérapeutique potentielle.

I. Effets des ligands de PPARγ : inhibition du cycle cellulaire ou apoptose?

Au cours de notre étude, nous avons montré que les ligands de PPARγ : TGZ, CGZ, 15d-PGJ2 inhibaient la prolifération des cellules MCF-7 et ZR-75-1. Nos résultats sont cohérents avec les données précédentes de la littérature montrant que ces 3 ligands de PPARγ induisaient une inhibition de la prolifération des cellules MCF-7 (Clay *et al*., 1999 ; Yin *et al.*, 2001 ; Qin *et al*., 2003). Toutes nos mesures de prolifération ont été réalisées avec 25 µM de chaque ligand et nous avons observé une inhibition dès 24h de traitement. Par contre, d'autres études ont montré que la TGZ et la CGZ utilisées à 40 µM inhibent la prolifération des cellules MCF-7 après 48 heures et 72h de traitement respectivement (Yin *et al*., 2001 ; Qin *et al*., 2003). Cette différence s'explique probablement par le pourcentage de sérum de veau présent dans le milieu de culture puisque nous avons travaillé avec 1% de SVF tandis que ces auteurs ont travaillé avec 5% de sérum. Dans nos conditions de culture, des doses supérieures à 25 µM se sont révélées toxiques non seulement pour les MCF-7 mais aussi pour les cellules ZR-75-1. Bien que les cellules MCF-7 constituent un modèle référence pour les études *in vitro* des cancers mammaires hormono-dépendants, il est important de confirmer les résultats sur d'autres modèles. Peu d'étude ont été réalisées sur les effets des ligands de PPARγ sur la prolifération des cellules ZR-75-1. Bien que Elstner *et al* aient montré que la TGZ inhibait leur prolifération, ces auteurs n'ont pas conclu que cette lignée était plus sensible que la lignée MCF-7 (Elstner *et al*., 2002). Nous avons noté que l'inhibition de la prolifération était plus importante pour les cellules ZR-75-1 que pour les cellules MCF-7 quel que soit le ligand de PPARγ utilisé.

Nous avons observé que la RGZ n'inhibait pas la prolifération des deux lignées après 24h. Cependant, avec la lignée MCF-7, une inhibition est observée après 48h. Ce résultat est en accord avec celui de Kim *et al.* qui montrent que la RGZ induit une inhibition de la prolifération des cellules MCF-7 après 4 jours de traitement (Kim *et al*., 2006). Les mécanismes qui mènent à l'inhibition de la prolifération lors d'un traitement à la RGZ sont donc vraisemblablement différents de ceux impliqués lors de l'exposition à la TGZ, la CGZ ou la 15d-PGJ_2.

Les précédentes études ont établi que l'inhibition de la prolifération des cellules MCF-7 et ZR-75-1 induite par la TGZ, la CGZ et la 15d-PGJ_2 s'explique soit par un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 dû à l'inhibition la cycline D1 associée à une diminution de l'activité des cdk4 et cdk2 (Wang *et al*., 2001 ; Yin *et al*., 2001 ; Qin *et al*., 2003) soit par un déclenchement de l'apoptose (Elstner *et al*., 2002 ;James *et al*., 2003). Or, dans notre étude, nous n'avons pas déterminé si l'inhibition de la prolifération de nos 2 lignées était due à un blocage du cycle cellulaire ou à l'apoptose. Pour éclaircir ce point important, une analyse pourra être réalisée après marquage des cellules à l'iodure de propidium. La détection de l'apoptose pourrait être faite grâce au marquage des cellules à l'Annexine V couplée au FITC, mais aussi grâce à la fragmentation de l'ADN par la méthode TUNEL ou par la mise en évidence du clivage des PARP, substrat des caspases, par Western blot.

II. <u>Altération de la signalisation œstrogénique</u>

Au début de la thèse, une seule étude avait décrit une protéolyse de ERα dans les cellules MCF-7 exposées à la CGZ et la TGZ (Qin *et al*., 2003). Pour notre part, nous n'avons pas voulu nous limiter à cette seule lignée et nous avons choisi de travailler sur la lignée ZR-75-1. Par de multiples approches, nous avons montré une altération de la voie de signalisation des œstrogènes . Tout d'abord, l'expression des ARNm codant le récepteur à la progestérone, gène cible des œstrogènes, est affectée par une exposition à la TGZ (25 µM, 24h). Des expériences de transfection, réalisées avec un plasmide permettant d'exprimer la luciférase sous contrôle d'élément de réponse aux œstrogènes , ont confirmé ce résultat. Enfin, nous avons observé diminution du taux de protéine ERα malgré une stabilité du taux d'ARNm codant ERα. Nos résultats sont à accord avec ceux montrant une inhibition de l'activation des ERE induite par l'E_2 dans les cellules MCF-7 traitées à la ciglitazone ou à la 15d-PGJ_2 (Suzuki *et al*., 2006 ; Kim *et al*., 2007). Nous avons montré que l'altération de la voie de signalisation des

œstrogènes survient aussi dans les cellules ZR-75-1. Ces cellules ne possèdent pas les mêmes propriétés que les cellules MCF-7. En effet, les cellules MCF-7 proviennent d'un carcinome canalaire *in situ* tandis que les cellules ZR-75-1 sont issues d'un carcinome canalaire infiltrant, ce qui leur confère un caractère invasif supérieur (Soule *et al*., 1973 ; Engel *et al*., 1978). Nous pouvons ainsi confirmer que l'étude de l'impact des ligands de PPARγ sur la signalisation œstrogénique peut être étendue à des lignées hormono-dépendantes possédant des caractéristiques différentes.

Par ailleurs, nous apportons un autre élément important à savoir que la dose de ligand efficace est inférieure à celles rapportées dans les autres études. En effet, dans les cellules MCF-7 et ZR-75-1, la protéolyse de ERα est observée avec 25 µM de CGZ, 15d-PGJ_2, TGZ et du dérivé Δ2-TGZ. Or, auparavant 80 µM de CGZ, 30 µM de 15d-PGJ_2, 60 µM de TGZ ou de Δ2-TGZ et étaient nécessaires pour observer la dégradation de ERα (Qin *et al*., 2003 ; Huang *et al*., 2005). Cette observation peut être mise en parallèle des résultats concernant l'inhibition de la prolifération cellulaire. Nous expliquons la différence par le fait que nous avons travaillé avec 1% de SVF dans le milieu de culture. En effet, à plusieurs reprises, nous avons observé que cette concentration de 25 µM n'induisait pas la dégradation de ERα si le milieu contenait 5% de SVF. Peut être les ligands sont- ils adsorbés sur des protéines du sérum et sont – ils alors moins "biodisponibles".

Le troisième point important que nous avons établi est l'altération précoce de la fonctionnalité de ERα lors d'un traitement à la TGZ ou la Δ2-TGZ dans les cellules MCF-7. Ce résultat est cohérent avec celui observé lors d'un traitement de 5h à la 15d-PGJ_2 (Kim *et al*., 2007). Ces auteurs n'ont pas étudié le lien entre altération et la protéolyse.

D'autre part, l'activation de ERα peut également résulter de modifications post-traductionnelles consécutives à des phénomènes de transduction de signaux apportés par des facteurs de croissance (El-Tanani & Green, 1997). Cette activation ligand-indépendante pourrait expliquer en partie la résistance des cellules cancéreuses mammaires à l'hormonothérapie (Fox *et al*., 2008). Il serait intéressant de déterminer si des ligands de PPARγ affectent également ce type d'activation. Des cellules MCF-7 transfectées avec un plasmide permettant l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un ERE, pourraient être traitées à l'EGF ou l'IGF-1 en présence de TGZ par exemple. Ainsi nous saurions si les modifications précoces de ERα qui affectent la réponse aux oestrogènes affectent aussi l'activation ligand-indépendante.

Enfin, le récepteur membranaire à l'E_2, GPR30, exprimé dans les cellules MCF-7, est associé à des fonctions proliératives (Maggiolini *et al*., 2004 ; Kleuser *et al*., 2008). Le tamoxifène et l'ICI 182,780 agissent comme agonistes sur ce récepteur et cet effet à été évoqué pour expliquer les phénomènes de résistance à ces traitements (Fox *et al*., 2008). Nous pourrions aussi déterminer si GPR30 est affecté par les ligands de PPARγ.

III. Dégradation différentielle de ERα et ERβ

Les cellules MCF-7 expriment aussi ERβ et nos résultats montrent pour la première fois que les ligands de PPARγ qui induisent la protéolyse de ERα, n'affectent pas ERβ. Ce résultat est important car la présence de ERβ, particulièrement l'isoforme ERβ2/cx localisée dans le noyau, est synonyme d'un pronostic favorable dans les tumeurs mammaires ERα+/ERβ+ (Omoto *et al*., 2001) alors qu'il est indicateur de mauvais pronostic dans les tumeurs ERα-/ERβ+/HER-2 (Speirs, 2008).

Comment expliquer cette dégradation différentielle ? Pour expliquer le mécanisme impliqué, nous pourrions réaliser des délétions ou des mutations sur différents domaines de ERα. En effet, les données de la littérature rapportent qu'une mutation du site AF-2 du domaine LBD de ERα perturbe la protéolyse induite par l'E_2. De plus, le domaine AF-1, joue un rôle important dans l'induction de la protéolyse médiée par l'E_2 (Valley *et al*., 2005). En se basant sur ces données, il serait envisageable de transfecter les cellules avec un plasmide permettant l'expression d'un ERα délété du domaine A/B ou LBD puis de déterminer par Western blot si ces récepteur modifiés subissent aussi une dégradation lors d'une exposition aux ligands de PPARγ. La protéolyse de ERβ à lieu uniquement en présence d'E_2. En absence d'E_2, ERβ est ubiquitiné mais le domaine F le protège de la dégradation par le protéasome 26S. En présence d'E_2, ERβ change de conformation et permet sa reconnaissance par le protéasome. Le domaine A/B de ERβ est nécessaire à sa protéolyse (Tateishi *et al*., 2006). Il existe 20% d'homologie du domaine A/B entre ERα et ERβ. Cette différence explique peut être pourquoi les ligands de PPARγ n'affectent pas ERβ.

Nous pouvons exploiter une deuxième stratégie pour étudier la dégradation différentielle des deux récepteurs en formant des protéines chimères pour identifier le domaine qui serait indispensable à la protéolyse. Le domaine A/B de ERα pourrait ainsi être fusionné avec les domaine C, D et E de ERβ. Le domaine DBD de ERβ pourrait remplacer celui d'ERα. Ces

constructions seraient introduites dans les cellules MCF-7 et la dégradation des récepteurs serait étudiée après traitement avec les ligands de PPARγ.

IV. Protéolyse de ERα et mécanisme PPARγ-indépendant

Le fait que la RGZ, agoniste le plus puissant de ceux que nous avons utilisés n'induise pas la dégradation de ERα laissait fortement présager d'un mécanisme PPARγ-indépendant.
Huang *et al* ont montré ceci en utilisant le dérivé Δ2-TGZ sur la lignée MCF-7 (Huang *et al*., 2005). Pour notre part, notre étude fut plus approfondie car nous avons eu recours à plusieurs approches. Sur les lignées MCF-7 et ZR-75-1, nous avons utilisé le dérivé Δ2-TGZ et des antagonistes de PPARγ. En outre, sur la lignée MCF-7, une approche par ARN interférence dirigée contre PPARγ fut mise au point et réalisée pour la première fois au laboratoire dans le cadre de notre étude.

Un résultat surprenant fut obtenu avec l'antagoniste T0070907 : il induit, aussi, la dégradation de ERα. Une étude a montré que ce composé pouvait dégrader les tubulines dans les cellules cancéreuses du côlon de manière protéasome indépendante (Schaefer *et al*., 2007). D'autre part, le GW9662 et BADGE inhibent de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MDA MB 231 et T47D (Seargent *et al*., 2004 ; Lea *et al*., 2004). Aucune n'étude n'a été réalisée sur les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et il serait envisageable de déterminer quel est l'effet de ces 3 composé sur la prolifération cellulaire et si la protéolyse de ERα est dépendante du protéasome 26S.

A partir de l'étude de Kim *et al* qui montrait que la 15d-PGJ_2 inhibait précocement l'activité transcriptionnelle de ERα par liaison covalente avec le domaine DBD (Kim *et al*., 2007), nous avons posé l'hypothèse selon laquelle une liaison covalente entre les ligands de PPARγ et ERα pouvait être impliquée dans la protéolyse de ce dernier. Or, cette hypothèse n'a pas été validée. Nous avons pensé alors que l'association de la Δ2-TGZ biotinylée avec ERα ou les billes d'avidine avait échoué. Pour cette raison, un linker a été placé entre la Δ2-TGZ et la biotine mais l'expérience de pull down avec cette molécule modifiée n'a pas non validé notre hypothèse. Nous devrions vérifier l'ensemble de cette expérience en analysant par spectrométrie de masse les différents domaines de ERα après incubation avec la Δ2-TGZ biotinylée mais aussi avec la 15d-PGJ_2 biotinylée qui nous servirait de témoin positif.

D'autre part, nous savons que ERα est dégradé par le protéasome 26S. Il a été mis en évidence que BRCA1 pouvait former un complexe avec BARD1 et agir comme une ubiquitine ligase de type E3 : l'ubiquitination de ERα a lieu sur le résidu Lys302 du domaine LBD (Eakin *et al.*, 2007). Afin de déterminer si cette voie est impliquée dans la dégradation de ERα induite par les ligands de PPARγ, nous pourrions étudier le complexe BARD1-BRCA1 dans les cellules MCF-7 traitées avec les ligands de PPARγ.

D'autres effets PPARγ-indépendant des ligands de PPARγ ont été décrits dans les cellules cancéreuses mammaires en particulier l'apoptose. En effet, dans les cellules T47D, la TGZ induit l'apoptose par une stimulation de TRAIL et une diminution de l'expression de la cycline D3 de manière PPARγ-indépendant (Lu *et al*., 2005). Dans les cellules MDA MB 2321, l'apoptose est induite par la 15d-PGJ_2 et la TGZ indépendamment de PPARγ (Clay *et al*., 2002). Le facteur de transcription EGR-1, impliqué dans l'apoptose, est sous exprimé dans les cellules cancéreuses mammaires (Liu *et al*., 2007). Il est connu que la TGZ induit l'apoptose par stimulation de l'expression du facteur de transcription lié à l'apoptose, EGR-1 dans les cellules cancéreuses du colon (Baek *et al*., 2003). Nous envisageons d'étudier l'expression de EGR-1 dans les cellules MCF-7 en présence de ligands de PPARγ. Nous pensons qu'une analyse par technique de Microarray permettrait d'étudier les gènes impliqués dans les effets PPARγ indépendants. Les effets de la TGZ et de la Δ2-TGZ sur les cellules MCF-7 pourraient être comparés afin de distinguer les effets PPARγ dépendants et indépendants.

V. <u>Intérêt thérapeutique des TZD et de leurs dérivés?</u>

Au cours de notre étude, nous avons montré que les ligands de PPARγ induisaient la dégradation de ERα et de la cycline D1 sans affecter ERβ. En effet, nous avons montré que la TGZ ainsi que le dérivé Δ2-TGZ qui induisent la protéolyse de ERα, induisent également la dégradation de la cycline D1. Ceci est en accord avec Qin *et al* qui avait établit que la cycline D1 était dégradée en présence de CGZ et de 15d-PGJ_2 (Qin *et al*., 2003). Grâce à l'utilisation du dérivé Δ2-TGZ nous avons confirmé que la protéolyse de la cycline D1 est indépendante de PPARγ mais avec une dose inférieure à celle utilisée par Huang *et al* (30 µM) (Huang *et al*., 2005). Ceci est intéressant car ERα et la cycline D1 sont deux marqueurs impliqués dans la prolifération et la présence de ERβ dans une tumeur mammaire hormono-dépendante est un

facteur de pronostic favorable car les tumeurs ERα+/ERβ+ répondent mieux à l'hormonothérapie (Iwase *et al*., 2003). Le problème est que la dose efficace de ligands de PPARγ induisant la protéolyse est de 25 µM or, en thérapie, les concentrations physiologiques des composés utilisés doivent être de l'ordre du nanomolaire. Néanmoins, la dose efficace du dérivé Δ2-TGZ biotinylée est égale à 5 µM. Cette dose est proche de la dose efficace observée pour un autre dérivé, la Δ2-TG-6, qui induit une dégradation de la cycline D1 à partir de 2,5 µM (Huang *et al*., 2005).

Bien que la TGZ inhibe la croissance de tumeurs mammaires de souris xénogréffées (Elstner *et al*., 2002), il serait judicieux de déterminer si les effets de ce type de molécule peuvent s'ajouter à ceux d'autres composés tels que les inhibiteurs d'histone désacétylase (HDAC). En effet, une récente étude a montré que l'inhibiteur de HDCA, le SAHA, dégrade ERα et induit l'apoptose des cellules MCF-7 (Yi *et al*., 2008). Il serait ainsi envisageable de combiner des doses plus faibles de TZD ou de leurs dérivés avec ces molécules ou de les associer avec l'hormonothérapie existante. En effet, l'association du tamoxifène à la troglitazone stimule l'effet inhibiteur du tamoxifène sur la prolifération tumorale des cellules MCF-7 (Yu *et al*., 2008). L'effet de ces molécules pourrait aussi être étudié sur des lignées résistantes soit à l'hormonothérapie soit à la doxorubicine (utilisée en chimiothérapie).

VI. Conclusion générale

Nos travaux ont permis de montrer que ERα, et non ERβ, est dégradé par les ligands de PPARγ. La protéolyse ne dépend pas du récepteur PPARγ. Certes, nous n'avons pas élucidé complètement comment ces composés induisent cette dégradation. Néanmoins, cette étude nous a permis de montrer que des ligands de PPARγ modifiés chimiquement peuvent être plus efficaces que les composés d'origine. Ils méritent que leur étude soit approfondie car ces molécules, du moins les mécanismes PPARγ-indépendants qu'elles activent, pourraient aboutir à la mise au point de composés utilisables en thérapeutique pour le traitement du cancer du sein, voire d'autres pathologies. En effet, ces composés induisent aussi la dégradation du récepteur des androgènes dans les cellules cancéreuses de prostate (Yang *et al*., 2007).

CHAPITRE III

RESULTATS ANNEXES

Les études concernant l'effet de l'éthanol sur les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 ont été développées au laboratoire. Ces travaux ont montré que l'éthanol stimule la prolifération et l'expression de ERα des cellules MCF-7 (Etique *et al*., 2004). Les données de la littérature ont montré que ERα pouvait être activé en absence d'E_2 notamment par les voies de signalisation MAPK et PKA. Nicolas Etique, qui a soutenu sa thèse en 2006, avait initié les travaux de recherche qui visaient à démontrer que l'éthanol pouvait stimuler ERα de manière indépendante de l'E_2. Ainsi, en réalisant des transfections, des tests de prolifération et des extractions d'ARN totaux après traitement des cellules MCF-7, j'ai contribué à l'étude des hypothèses selon lesquelles l'éthanol pouvait activer ERα par la voie AMP/PKA notamment en stimulant le récepteur à l'adénosine A_{2A}AR.

I. Ethanol et activation ligand-indépendante de ERα

Ethanol-induced ligand-independent activation of ERa mediated by cyclic AMP/PKA signaling pathway : An in vitro study on MCF-7 breast cancer cells.
Nicolas ETIQUE, Stephane FLAMENT, Julie LECOMTE and Isabelle GRILLIER-VUISSOZ. International Journal of Oncology, 31 : 1509-1518, 2007.

1.1. Introduction

L'éthanol stimule la prolifération des cellules cancéreuses mammaires hormono-dépendantes (Przylipiak *et al*., 1996 ; Singletary *et al*., 2001 ; Etique *et al*., 2004). Cet effet est associé à une augmentation du taux de ERα et d'aromatase, enzyme responsable de la biosynthèse des œstrogènes (Etique *et al*., 2004). L'activation ligand-indépendante de ERα peut être médiée par plusieurs voies de signalisation dont la voie des MAPKs et de la PKA (Aronica *et al.*, 1994; Le Goff *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1995; Bunone *et al.*, 1996).
Outre la prolifération, l'éthanol est capable de stimuler la migration des cellules tumorales (Yirminia *et al.*, 1992; Meng *et al.*, 2000; Luo & Miller, 2000). Dans ce contexte, l'éthanol peut stimuler la sécrétion des métalloprotéases 2 et 9 par les cellules MCF-7. La sécrétion de MMP-9 induite par l'éthanol est dépendante de l'activation de ERα mais elle s'observe en l'absence d'hormones stéroïdes (milieu sans sérum de veau foetal), suggérant plutôt une activation ligand indépendante de ERα. Nous avons donc testé cette hypothèse dans le but d'élucider le mécanisme par lequel l'éthanol est capable d'activer ERα.

1.2. Principaux résultats

Dans un premier temps, nous avons montré que l'éthanol stimule l'expression de deux gènes cibles de ERα, le gène pS2 et celui codant le récepteur à la progestérone (PR). En effet, une augmentation significative du taux d'ARN messagers codant PR et pS2 est observée dans les cellules MCF-7 traitées avec 0,1% et 0,3% d'éthanol. Par la suite, nous avons montré que l'éthanol (0,3%) augmente significativement l'expression de PR et de pS2 dans les cellules MCF-7 cultivées dans un milieu dépourvu de sérum et donc d'hormones stéroïdes. Il est également capable de stimuler l'expression d'un gène rapporteur, codant la luciférase, placé sous le contrôle d'un promoteur contenant un élément de réponse aux œstrogènes (ERE). Ces résultats montrent que l'activation de ERα par l'éthanol ne dépend pas de la présence d'œstrogènes.

Lorsque les cellules MCF-7 sont traitées à l'E_2 ou à l'antioestrogène ICI 182,780, une protéolyse de l'ERα est observée. Par contre, lors d'une exposition à l'éthanol (0,3 %), aucune protéolyse de l'ERα est détectée, montrant qu'aucun ligand ne se fixe sur l'ERα et que son activation se fait selon une voie ligand-indépendante. Ce type d'activation peut être médiée par plusieurs voies de signalisation dont la voie des MAPKs et de la PKA (Aronica *et al.*, 1994; Le Goff *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1995; Bunone *et al.*, 1996). Nous avons testé ces 2 voies en étudiant la surexpression de PR et pS2 induite par l'éthanol en présence d'inhibiteurs sélectifs des MAPK et de la PKA. Seul l'inhibiteur de la PKA, H89, est capable d'inhiber la surexpression de PR et pS2 induite par l'éthanol. L'activation ligand-indépendante de ERα par l'éthanol est donc médiée par la PKA. Nous avons confirmé l'activation de cette enzyme par l'éthanol en étudiant un facteur de transcription qu'elle active spécifiquement par phosphorylation : la protéine CREB (Shaywitz & Greenberg, 1999). Lorsque les cellules sont exposées à l'éthanol, la quantité de protéine CREB phosphorylée est supérieure confirmant ainsi l'activation de la PKA par l'éthanol. Des transfections réalisées avec un plasmide contenant un gène rapporteur placé en aval d'un promoteur contenant des éléments de réponse à l'AMPc (CRE), montrent également que l'exposition à l'éthanol est capable d'activer ce facteur de transcription et donc la PKA. Puisque cette kinase peut être activée par l'AMPc. Nous avons testé l'hypothèse d'une activation de l'adénylate cyclase par l'éthanol. Nous avons étudié l'expression du PR en présence d'un inhibiteur sélectif de l'adénylate cyclase, le SQ22536. Ce composé inhibe la surexpression de PR induite par l'éthanol montrant que l'adénylate cyclase est également impliquée dans l'activation de ERα induite par l'éthanol.

1.3. Conclusion

Ces travaux nous ont permis d'une part de confirmer que l'éthanol pouvait activer ERα dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et d'autre part de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette activation. Les mécanismes par lesquels la PKA active ERα restent à élucider mais ces résultats permettent de mieux comprendre les effets de l'éthanol sur la prolifération et la migration des cellules cancéreuses mammaires.

INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 31: 1509-1518, 2007

Ethanol-induced ligand-independent activation of ERα mediated by cyclic AMP/PKA signaling pathway: An *in vitro* study on MCF-7 breast cancer cells

NICOLAS ETIQUE, STEPHANE FLAMENT, JULIE LECOMTE and ISABELLE GRILLIER-VUISSOZ

EA 3442 Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Reproduction et du Développement, Nancy-Université, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Received May 29, 2007; Accepted July 16, 2007

Abstract. Alcohol consumption is an increased risk factor for hormone-dependent breast cancer but the underlying molecular bases are unknown. Several studies suggest that ethanol could activate the estrogen signaling pathway. We have performed an *in vitro* study in order to investigate the molecular players involved in this phenomenon. Exposure of MCF-7 breast cancer cells to ethanol induced an increase in the mRNA level of two well known estrogen target genes: progesterone receptor (PR) and pS2. This result was confirmed by an increase in luciferase activity in pEREtkLuc-transfected MCF-7 cells exposed to ethanol. These effects, whose intensity was similar to those of E_2, were observed also in steroid-free medium and were inhibited by the antiestrogen ICI 182,780. This suggested a ligand-independent activation of ERα that was confirmed by the absence of ERα proteolysis in ethanol-treated cells. Using PKA inhibitor (H89), the study of phospho-CREB by Western blot and transfection experiments with a CRE-reporter construct demonstrated that PKA was involved in ethanol-induced transcription of ERα target genes. Adenylyl cyclase inhibition impaired the activation of estrogen signaling pathway induced by ethanol. The results obtained *in vitro*, are discussed in regard to alcohol consumption and relevance to humans.

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women. About 70% of human breast cancers are related to sex hormone exposure and 60% of all patients have hormone-dependent breast cancer. These tumors express estrogen receptors (ER) and require estrogens for their growth (1-3). The effects of these hormones on tumor development are mediated by the receptor ERα, a member of the superfamily of steroid nuclear receptors that commonly function as ligand-regulated transcription factors. In cells, ERα is associated in a protein complex containing heat shock protein 90, which prevents the association of the receptor with DNA. In the best understood mode of action, or 'classical pathway', ligand binding induces a conformational change of ERα and the dissociation of the protein complex. The liganded receptor then binds to specific estrogen response elements (EREs) within target genes and recruits a p160/p300 co-activator complex to the promoter (4,5). This coactivator complex promotes gene transcription by remodeling chromatin and by contacting the basal transcription machinery. For instance, progesterone receptor (PR) and pS2 are two estrogen target genes that are often studied in breast cancer (6,7). A second mode of action has been described in which, following hormone binding, the ERα could utilize unspecified protein-protein interactions to enhance the activity of heterologous transcription factors such as AP-1 (8,9) or Sp1 (10).

In addition to these hormone-dependent ERα activations, hormone-independent activation also occurs in human breast cancer cells. Indeed, many studies have shown that ERα activity can be stimulated by modulation of several kinase pathways (11). As an example, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activated by epidermal growth factor directly phosphorylates ERα in the absence of ligand and induces ER transactivation (12,13). Similarly, ligand-independent ER activators can act via the protein kinase A (PKA) signaling pathway. Activation of PKA by 8-bromo-cyclic AMP, a stable form of cyclic AMP, and an activator of adenylyl cyclase, cholera toxin or forskolin, enhances ER phosphorylation and activity (14,15).

Many epidemiological studies show that chronic alcohol consumption, even with a moderate dosage, increases significantly the incidence of breast cancer (16-19) and promotes mammary tumorigenesis (20,21). Estrogens seem to be involved in these effects since the increased risk is associated with a higher frequency of ER-positive tumors. Moreover, in pre- and post-menopausal women, alcohol consumption increases the circulating level of estrogens and DHEA (22,23).

In ER-positive breast cancer cells, several *in vitro* studies have shown that ethanol enhances cell proliferation (24-27).

Correspondence to: Professor S. Flament, Université Henri Poincaré-Nancy I, Faculté des Sciences, EA3442, Entrée 1B - 9ème étage, Boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France
E-mail: stephane.flament@scbiol.uhp-nancy.fr

Key words: breast cancer, ethanol, estrogen receptor, PKA, cyclic AMP

This effect was observed between 0.0001% and 1% depending on the study and the method used to analyze cell proliferation (24-27). We have demonstrated that this effect is associated with an increase in the expression of ERα and aromatase, the enzyme responsible for estrogen synthesis (27). Ethanol can also stimulate cell invasion (28,29). Interestingly, we have recently shown in MCF-7, that ethanol increases MMP-9 secretion via ERα activation (30). These results suggest that the estrogen signaling pathway plays a key role in the effects induced by ethanol in breast cancer cells. Furthermore, it has been reported that ethanol increases estrogen receptor activity in MCF-7 (31). Thus, ethanol could act as an 'estrogen-like' compound on breast cancer cells but the interactions between ethanol and the estrogen signaling pathway are not clearly understood.

In the present study, we show that ethanol treatment stimulates the transcription of estrogen responsive genes in MCF-7 cells. We demonstrate that ethanol induces the cyclic AMP/PKA signaling pathway leading to the activation of ERα in a ligand-independent manner. These results are discussed in regard to relevance for humans.

Materials and methods

Materials. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), L-glutamine and 17-ß-estradiol (E_2) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and fetal calf serum (FCS) from Eurobio (Les Ulis, France). ICI 182,780 was purchased from Tocris Cookson (Bristol, UK). H89 and SQ22536 were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). These chemicals were dissolved in ethanol. When added to the medium of ethanol-treated cells, the ethanol final concentration did not exceed 0.3%. For non-ethanol treated-cells, the chemicals were diluted in medium with an ethanol final concentration <0.01%.

Cell culture and treatment. The MCF-7 (HTB 22; human breast adenocarcinoma, ER-positive) cell line was obtained from the American Tissue Culture Collection (Rockville, MD). Cells were routinely grown at 37˚C in a 5% (v/v) CO_2 humidified atmosphere. They were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and 2 mmol/l L-glutamine.

For RT-PCR analyses, cells were seeded in 6-well plates at a density of $8x10^4$ cells/well in 2 ml of DMEM supplemented with 5% FCS and 2 mmol/l L-glutamine. After 24 h of incubation to allow for cell attachment, the medium was replaced with phenol-red free DMEM supplemented with 1% FCS and 2 mmol/l L-glutamine. After 24 h, the medium was eliminated and cells were washed three times with PBS. Cells were treated for 24 h with ethanol at different concentrations and/or various compounds in phenol-red free DMEM supplemented with 2 mmol/l L-glutamine with 1% FCS. Ligand-independent studies were performed in similar conditions but in serum-free medium.

For Western immunoblotting analyses, cells were treated in the same conditions but were seeded in 75 cm^2 flasks at a density of $1.5x10^6$ cells/flask.

Semi-quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthetized in a 20 μl volume containing 2 μg RNA, 1.5 μg random hexamer primer, 1X Invitrogen Buffer, 7,5 mmol/l DTT, 0.6 mmol/l of each dNTP, 4 U RNase inhibitor, and 100 U of MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). The mixture was incubated for 120 min at 37˚C and subsequently for 5 min at 94˚C in order to stop the reaction.

The cDNAs were further amplified by PCR. The specific primers were 5'-TGCTCAAGGAGGGCCTGCCGCAGGT-3' and 5'-CTACTGAAAGAAGTTGCCTCTCGCC-3' for progesterone receptor (32), 5'-TTCTATCCTAATACCAT CGACG-3' and 5'-TTTGAGTAGTCAAAGTCAGAGC-3' for pS2 (33) and 5'-TACATGGGTGGGGTGTTGAA-3' and 5'-AAGAGAGGCATCCTCACCCT-3' for ß-actin (24). PCR was carried out in a thermal cycler in a final volume of 25 μl containing 2 μl cDNA, 1X Eppendorf Taq Buffer (Eppendorf, Le Pecq, France), 0.5X Eppendorf Taq Master, 1.5-2.5 mmol/l $MgCl_2$, 125 μmol/l of each dNTP, 0.33 μmol/l of each primer, and 0.5 U Taq polymerase. Negative controls were always included. Amplification was carried out under the following conditions: 94˚C for 5 min, 25-30 one-minute cycles at 94˚C (25 cycles for pS2 and ß-actin; 30 cycles for PR) 1 min at 54-65˚C, and 1 min at 68˚C, followed by a 10-min extension step at 68˚C. For each gene, the amplification took place in the linear phase of the PCR reaction. The PCR products (25 μl) were mixed with loading buffer (3 μl) and submitted to electrophoresis in a 2% agarose gel at 90 V for 60 min at room temperature. The gel was stained with ethidium bromide, viewed and photographed on a UV-transilluminator (GelDoc 2000, Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette). A software package (Quantity One v.4.3.1, Bio-Rad Laboratories) was used to quantify the PCR products.

Real-time PCR. Real-time PCR analysis was performed on a MiniOpticon System (Bio-Rad) by using SYBR-green labeling. RNA extraction and cDNA synthesis were performed as described above for semi-quantitative RT-PCR. Oligonucleotide primer sequences for PR, pS2 and RPLP0 were described previously (34,35). Each sample was normalized on the basis of its RPLP0 content (RPLP0 is also known as 36B4 and encodes human acidic ribosomal phosphoprotein P0). Final results were expressed as the mean of the ratios: $(E_{target})^{\Delta C}t_{target}{}^{(control\text{-}sample)}/(E_{ref})^{\Delta C}t_{ref}{}^{(control\text{-}sample)}$ (36,37).

Western immunoblotting. At the end of the treatment, cells were washed twice with cold PBS. Proteins were extracted with lysis buffer containing: 25 mmol/l MOPS pH 7.2, 60 mmol/l ß-glycerophosphate, 15 mmol/l nitrophenylphosphate, 15 mmol/l EDTA, 15 mmol/l $MgCl_2$, 2 mmol/l DTT, 0.1 mmol/l sodium orthovanadate and protease inhibitors (10 μg/ml aprotinin, 5 μg/ml pepstatin, 10 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml soybean trypsin inhibitor and 100 μmol/l benzamidine). After boiling (100˚C, 5 min), an aliquot was used for protein concentration determination. Thirty micrograms of total proteins were subjected to SDS-PAGE (10%). After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked in TBST buffer with 5% non-fat powder milk (TBST-Buffer:Tris-HCl 50 mmol/l, pH 7.4, NaCl 150 mmol/l, 0.1% Tween-20) and incubated for 1 h with primary antibody. The anti-ERα (clone F-10, SC-8002,

Santa Cruz, CA) was diluted at 1:250, the anti-phospho-CREB (clone 10E9, Upstate, UK) at 1:2000 and the anti-actin (Clone 22a, Santa Cruz) at 1:1000. After washing with TBST, the membranes were incubated for 1 h in peroxydase-linked secondary antibody (Santa Cruz), washed again and developed using a chemiluminescence method (Amersham, Orsay, France).

Transient transfection assays. MCF-7 cells were plated at a density of $5x10^5$ cells in 6-well plates in 2 ml of DMEM supplemented with 5% FCS and 2 mmol/l L-glutamine, and allowed to adhere for 24 h. A 5:1 ratio of pCRE-SEAP or pEREtkLuc vector and ß-galactosidase (ß-Gal) control vector were cotransfected using Exgen 500 (Euromedex, France), as recommended by the manufacturer.

Three μg of pCRE-SEAP or pEREtkLuc and 0.6 μg of ß-Gal control vector were used for each well. The pCRE-SEAP vector contained the secreted alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene, with 3 tandem copies of the cyclic AMP response element (CRE) consensus sequence that upon CREB binding could induce transcription and activation of the SEAP reporter. The pEREtkLuc vector contained the luciferase reporter gene, with one copy of the estrogen response element (ERE) consensus sequence that upon ERα binding could induce transcription of the luciferase reporter. The ß-Gal control vector contained the CMV promoter and enhancer sequences, and served as a control for normalization of transfection efficiencies. After transfection, cells were allowed to grow for 24 h in phenol-red free DMEM supplemented with 10% FCS stripped in dextran-coated charcoal and 2 mmol/l L-glutamine. Cells were then treated for 24 h in fresh medium. SEAP activity was measured by using the BD Great Escape SEAP detection kit (BD Biosciences, CA) and Luciferase activity by using the Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega, Charbonnieres, France) as recommended by the manufacturer. ß-Gal activity was measured using the ß-Galalactosidase Enzyme Assay System (Promega). SEAP and luciferase activity were detected using a luminometer and ß-Gal activity using a spectrophotometer. SEAP and luciferase reporter activity was normalized with the ß-Gal activity.

Statistical analysis. The results are expressed as mean ± standard error of several experiments as indicated in the text. Differences among treatment groups were tested using analysis of variance (ANOVA). Statistically significance was set at P<0.05. When significant differences were detected, specific post-hoc comparisons between treatment groups were examined with the Student Newman's Keuls test (SPSS v11.0 Computer Software).

Results

Ethanol stimulates the expression of ERα target genes. To investigate the involvement of ERα signaling pathway in ethanol activity, we studied two well known estrogen responsive genes: the progesterone receptor (PR) and pS2 (6,7). Their expression was analyzed by semi-quantitative RT-PCR in MCF-7 breast cancer cells treated with various concentration of ethanol (0.1-0.7% i.e. 17-119 mmol/l) or E_2 (1 nmol/l) for 24 h in 1% FCS containing medium (Fig. 1). In case of E_2 stimulation, our results showed a significant 2.1-fold and 1.4-fold increase in the PR and pS2 mRNA levels, respectively, compared to control levels (p<0.05). In ethanol-treated breast cancer cells, we observed a significant 1.6-fold increase in PR mRNA level for either 0.1 or 0.3% ethanol and a 1.3-fold increase in pS2 expression for a dose of 0.3% (P>0.05). Since the dose of 0.3% was more efficient, we decided to use this concentration in the following experiments.

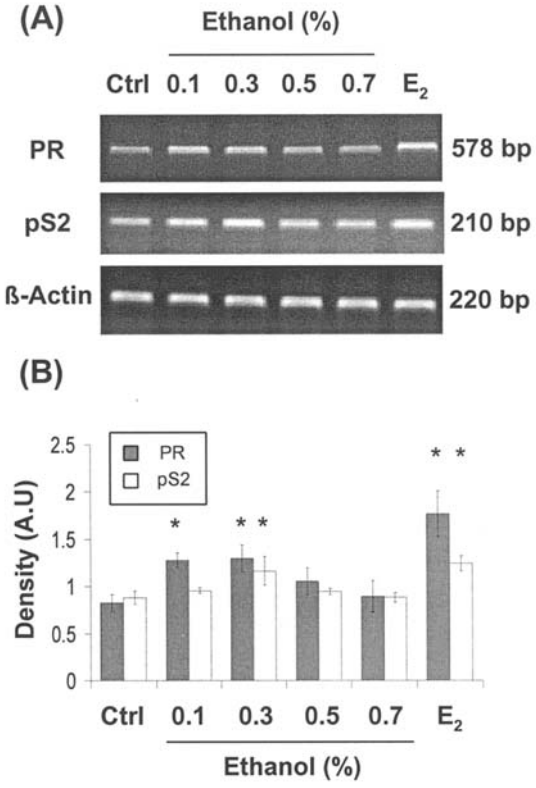


Figure 1. Ethanol stimulates the expression of two ER-responsive genes in MCF-7 cells cultured in 1% FCS containing medium. (A) Semi-quantitative RT-PCR analysis of PR and pS2 mRNAs. MCF-7 cells were stimulated for 24 h with various concentration of ethanol (0.1-0.7%) or E_2 (1 nmol/l). ß-actin mRNA levels were determined as an internal control. For each gene, the amplification took place in the linear phase of the PCR reaction. (B) The histogram represents the mean ± SE of four separate experiments in which the band intensities of PR and pS2 were evaluated in terms of optical density arbitrary units (AU) and normalized with the ß-actin signal intensity. *Significantly different from untreated control (P<0.05).

In order to determine whether ERα is involved in the ethanol-induced increase in PR and pS2 expression, we used an antiestrogen: the 'pure' antagonist ICI 182,780 (37). We have recently shown that this compound was able to block the E_2-triggered increase in PR expression in MCF-7 cells with the best efficiency observed at the concentration of 100 nmol/l (30). By semi-quantitative RT-PCR analysis, we showed that at this concentration, ICI 182,780 inhibits significantly the increase in both PR and pS2 mRNAs expression induced by E_2 (1 nmol/l) as well as ethanol (Fig. 2). Besides, the level of PR mRNAs was lower than in control cells. This could be explained by the fact that ICI 182,780 binds to ERα and inhibits ER signaling not only by competition with the agonists but also by ERα proteolysis

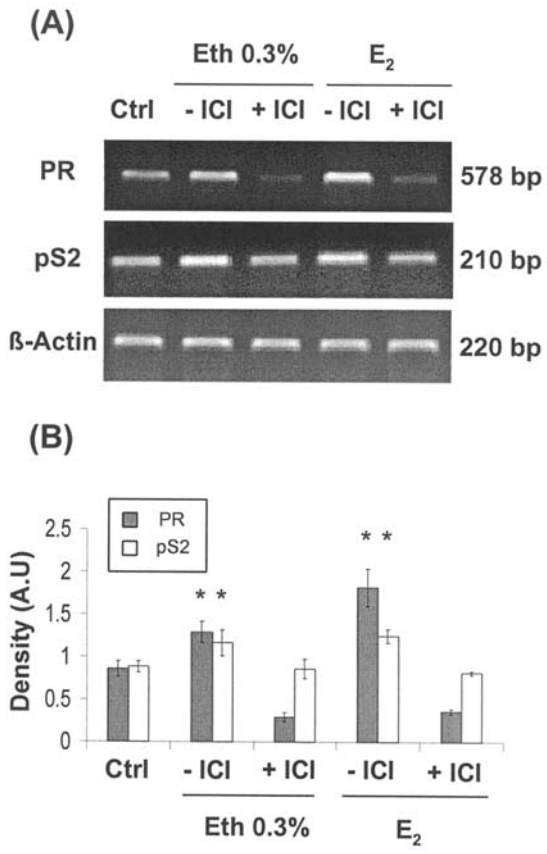


Figure 2. Induction of PR and pS2 gene expression by ethanol is inhibited by the pure antiestrogen ICI 182,780. (A) Semi-quantitative RT-PCR analysis of PR and pS2 mRNAs. MCF-7 cells were stimulated for 24 h with 0.3% ethanol (Eth) or 1 nmol/l E_2 in the presence or absence of 10 μmol/l ICI 182,780 (ICI). ß-actin mRNA levels were determined as an internal control. For each gene, the amplification took place in the linear phase of the PCR reaction. (B) The histogram represents the mean ± SE of four separate experiments in which the band intensities of PR and pS2 were evaluated in terms of optical density arbitrary units (AU) and normalized with the ß-actin signal intensity. *Significantly different from untreated control (P<0.05).

induction (38). However, pS2 expression was similar to those of control cells suggesting that the E_2 sensitivity of pS2 expression is different from those of PR in MCF-7 cells. These results demonstrated that ethanol is able to activate the estrogen signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells and enhance the transcription of these ERα target genes.

ERα activation by ethanol is ligand-independent. Our previous study showing that ethanol treatment leads to an increase in aromatase expression in breast cancer cells suggested that ERα activation could be the result of an increase in local estrogen concentration (27). To test this hypothesis, we decided to use serum-free medium which does not contain steroid hormones. PR and pS2 expressions in MCF-7 cells treated for 24 h with ethanol (0.3%) were analyzed by semi-quantitative RT-PCR (Fig. 3A and B). In control cells, the level of PR expression was lower than in our previous experiment using 1% FCS (compare with Figs. 1 and 2). This is consistent with the absence of steroids in the medium. pS2 expression was also decreased, but more modestly. This is in agreement with the lower sensitivity to E_2 of this gene in our conditions. Despite the absence of steroid hormones,

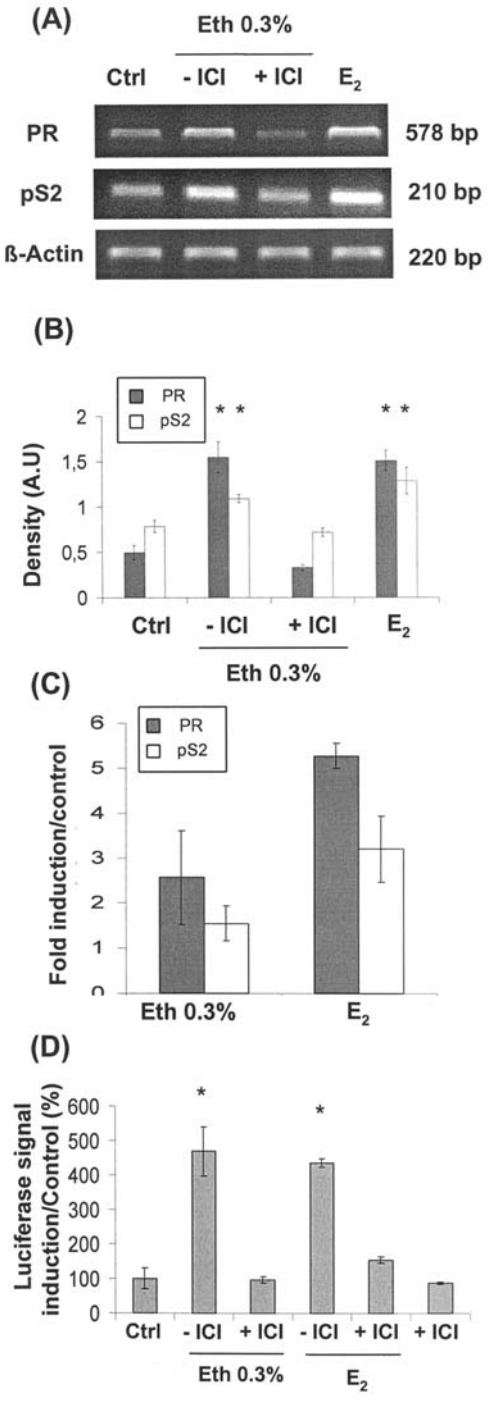


Figure 3. ERα activation by ethanol also occurs in steroid-free medium. (A) Semi-quantitative RT-PCR analysis of PR and pS2 mRNAs. MCF-7 cells were treated for 24 h in serum-free medium supplemented with 0.3% ethanol (Eth) or 1 nmol/l E_2, in the presence or absence of 10 μmol/l ICI 182,780 (ICI). ß-actin mRNA levels were determined as an internal control. For each gene, the amplification took place in the linear phase of the PCR reaction. (B) The histogram represents the mean ± SE of four separate experiments in which the band intensities of PR and pS2 were evaluated in terms of optical density arbitrary units (AU) and normalized with the ß-actin signal intensity. (C) The histogram represents the mean ± SE of real-time RT-PCR analyses of PR and pS2 expressions in MCF-7 cells that were grown in serum-free medium and treated for 24 h with ethanol or E_2 (6 and 3 independent replicates respectively) in comparison to control untreated cells. (D) MCF-7 cells were transiently cotransfected with pEREtkLuc and pCMV-ßGal. The cells were treated for 24 h with ethanol (0.3%) or E_2 (1 nmol/l) in the presence or absence of ICI 182,780 (10 μmol/l). Luciferase reporter activity was measured, normalized with the ß-Gal activity and expressed as percentage of the control assumed as 100%. The values represent the means ± SE of three different experiments. In each experiment, the activities of transfected plasmids were assayed in duplicate transfections. *Significantly different from untreated control (P<0.05).

ethanol still increased pS2 expression significantly (1.4-fold) and to a greater extent PR expression (3.1-fold). Interestingly, these increases were similar to those observed in MCF-7 cells exposed to 1 nmol/l E_2. Moreover, this ethanol-induced increase in PR and pS2 expression was inhibited by ICI 182,780 (100 nmol/l). The difference of PR expression level in cells exposed to ICI 182,780 versus control cells was not so important than in our previous experiments performed in the presence of 1% FCS. This is in agreement with the absence of steroid hormones in the medium. But again, the basal level of pS2 expression was not affected by the presence of ICI 182,780. This reinforces the lower sensitivity of its expression to E_2.

In order to confirm the transcriptional activation of ERα target genes by ethanol in steroid-free medium, we used two more quantitative approaches. First, real-time RT-PCR analyses showed an increase in PR and pS2 expressions (2.6- and 1.5-fold respectively) in MCF-7 cells exposed to a 24-h treatment with 0.3% ethanol in serum-free medium (Fig. 3C). Again, the increase in PR expression was higher than those observed for pS2. An increase in the expression of both genes was also observed in E_2-treated cells (1 nmol/l), PR showing a higher sensitivity than pS2 (5.3 and 3.2 fold respectively) (Fig. 3C).

In the second approach, MCF-7 cells were grown in medium containing 10% FCS stripped in dextran-coated charcoal and transiently transfected with the reporter construct pEREtkLuc. They were treated for 24 h with 0.3% ethanol in presence or absence of ICI 182,780 (100 nmol/l), respectively. In these conditions, ethanol treatment significantly increased luciferase activity (4.6-fold) with an intensity similar to E_2 (4.4-fold) and these stimulatory effects were inhibited by ICI 182,780 (Fig. 3D). Hence, we hypothesized that ethanol treatment triggered a ligand-independent activation of ERα.

To confirm this hypothesis, we have studied changes in ERα protein content by Western immunoblotting (Fig. 4). Indeed, it is well known that the binding of E_2 to ERα rapidly decreases ERα protein levels, which is required for the increase in transcriptional activity (38). Ligand-induced ERα degradation also occurs upon treatment with the isomer 17α-E_2 as well as antiestrogens such as ICI 182,780 even though these compounds are unable to activate ERα (37,38). Like in our RT-PCR analyses, MCF-7 cells were treated for 24 h, in serum-free condition, with ethanol (0.3%) or E_2 (1 nmol/l) in presence or absence of ICI 182,780 (100 nmol/l). In the presence of E2 or ICI 182,780, we observed a decrease in ERα protein level. In contrast, ERα protein level remained constant in ethanol-treated cells. This result confirmed that ethanol-induced ERα activation was ligand-independent.

Ethanol-induced ERα activation is mediated by the cyclic AMP/PKA pathway. In breast cancer cells, ligand-independent ERα activation can be mediated by several kinase pathways including the MAPK and PKA (12-15). Since ethanol exposure induces an increase in cyclic AMP in MCF-7 cells, we examined PKA (25). Estrogen-responsive gene expression was studied by semi-quantitative RT-PCR in MCF-7 cells that were treated with ethanol (0.3%) for 24 h, in serum-free condition, in presence or absence of H89 (10 μmol/l). The ethanol-induced increase in PR and pS2 expression was completely inhibited by the PKA inhibitor H89 (Fig. 5A). To confirm this result, MCF-7 cells were grown in medium containing 10% FCS stripped in dextran-coated charcoal and transiently transfected with the reporter construct pEREtkLuc.

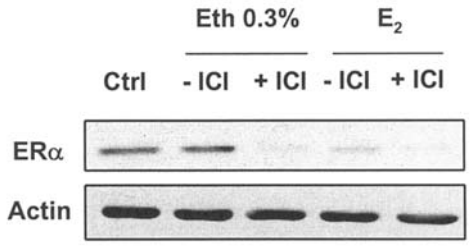


Figure 4. Absence of ERα proteolysis in MCF-7 cells exposed to ethanol. Immunoblot of ERα from MCF-7 cells treated in serum-free condition with ethanol (0.3%) or E_2 (1 nmol/l), in the presence and absence of ICI 182,780 (10 μmol/l) for 24 h.

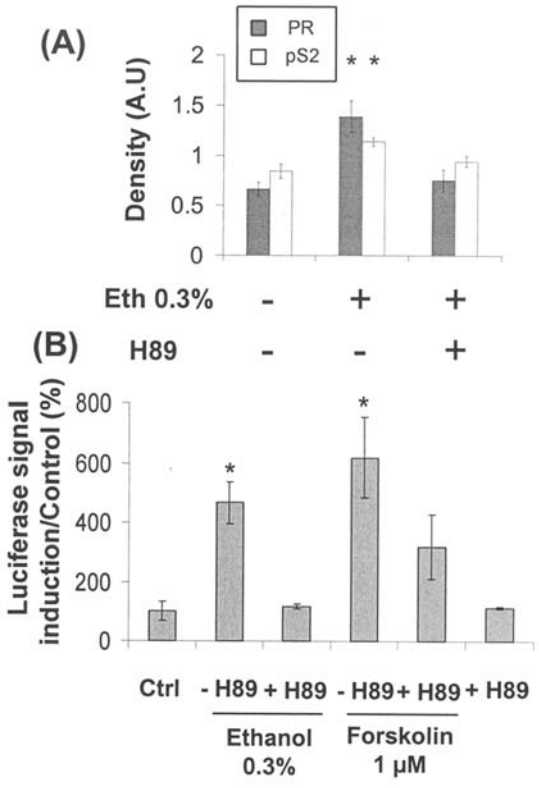


Figure 5. Ethanol-induced ERα activation is mediated by PKA. (A) Semi-quantitative RT-PCR analysis of PR and pS2 mRNAs. MCF-7 cells were treated for 24 h, in serum-free conditions, with 0.3% ethanol (Eth) and 10 μmol/l H89. ß-actin mRNA levels were determined as an internal control. The histogram represents the mean ± SE of four separate experiments in which the band intensities of PR and pS2 were evaluated in terms of optical density arbitrary units (AU) and normalized with the ß-actin signal intensity. (B) MCF-7 cells were transiently cotransfected with pEREtkLuc and pCMV-ßGal. The cells were treated for 24 h with ethanol (0.3%) or Forskolin (1 μmol/l) in the presence or absence of H89 (10 μmol/l). Luciferase reporter activity was measured, normalized with the ß-Gal activity and expressed as percentage of the control assumed as 100%. The values represent the means ± SE of three different experiments. In each experiment, the activities of transfected plasmids were assayed in duplicate transfections.*Significantly different from untreated control ($P<0.05$).

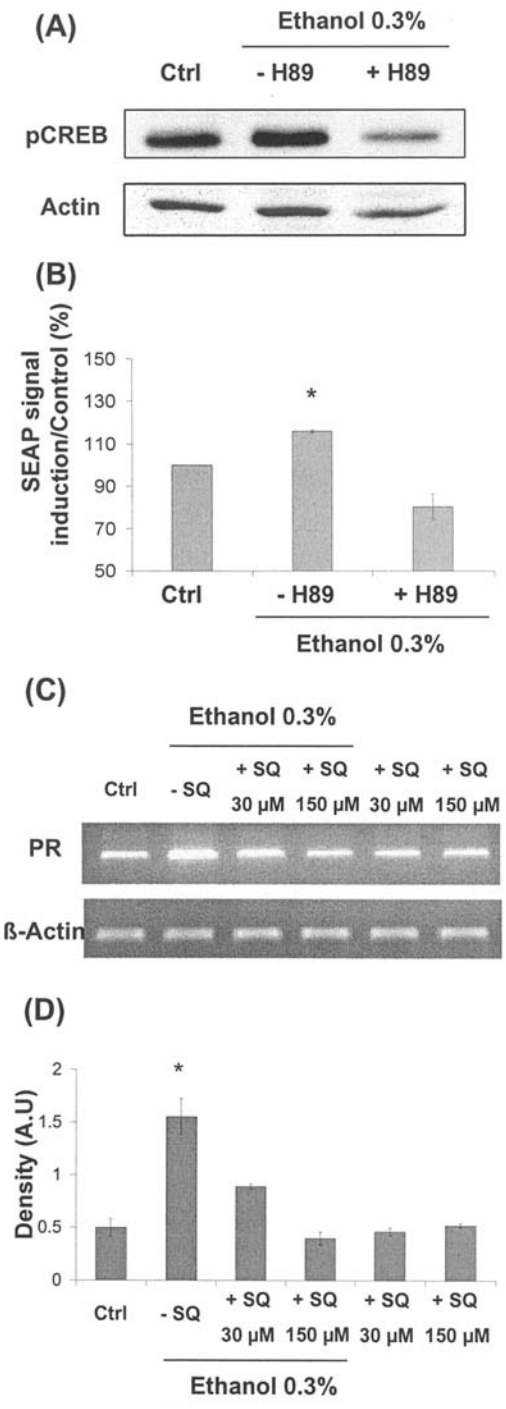


Figure 6. The cyclic AMP/PKA pathway is stimulated in MCF-7 cells exposed to ethanol. (A) Immunoblot of phosphorylated CREB (pCREB). MCF-7 cells were either untreated or treated for 24 h with ethanol (0.3%) in the presence or absence of H89 (10 μmol/l). Actin serves as loading control. (B) MCF-7 cells were transiently cotransfected with pCRE-SEAP and pCMV-ßGal. The cells were treated for 24 h with ethanol (0.3%) in the presence or absence of H89 (10 μmol/l). SEAP reporter activity was measured, normalized with the ß-Gal activity and expressed as percentage of the control assumed as 100%. The values represent the means ± SE of three different experiments. In each experiment, the activities of transfected plasmids were assayed in triplicate transfections. (C) Semi-quantitative RT-PCR analysis of PR mRNA. MCF-7 cells were treated for 24 h, in serum-free condition, with ethanol (0.3%) and the adenylyl cyclase inhibitor SQ22536 (SQ) (30 and 150 μmol/l). ß-actin mRNA levels were determined as an internal control. For each gene, the amplification took place in the linear phase of the PCR reaction. (D) The histogram represents the mean ± SE of four separate experiments in which the band intensities of PR were evaluated in terms of optical density arbitrary units (AU) and normalized with the ß-actin signal intensity. *Significantly different from untreated control (P<0.05).

They were treated for 24 h with 0.3% ethanol or forskolin (1 μmol/l) in presence or absence of H89 (10 μmol/l), respectively. Ethanol and forskolin treatment significantly increased luciferase activity (Fig. 5B). H89 inhibited partially the effect of forskolin, showing the efficiency of this inhibitor. A more total inhibition could have been observed if MCF-7 cells had been pretreated with H89 since forskolin, which is a powerfull adenylyl cyclase stimulator, acts probably more rapidly than H89. In case of ethanol-treated cells, the stimulatory effect was completely abolished by the PKA inhibitor.

The inhibitory effect of H89 on ethanol-induced activation of ERα suggested that the cyclic AMP/PKA pathway was stimulated in MCF-7 cells exposed to ethanol. In order to confirm this hypothesis, we studied CREB, a transcription factor that can be activated by PKA-dependent phosphorylation of serine 133 (S133) (39). MCF-7 cells were grown during 24 h in serum-free medium containing 0.3% ethanol. Then, proteins from cell lysates were examined by Western blot analysis using an antibody that recognizes CREB phosphorylated at residue S133 (Fig. 6A). Ethanol induced the phosphorylation of CREB. Furthermore, cotreatment of cells with H89 resulted in a complete inhibition of ethanol-induced S133 phosphorylated CREB levels.

CREB activation by phosphorylation was further analyzed by its ability to interact with its DNA-response element, the CRE (cyclic AMP response element). MCF-7 cells were transiently transfected with the reporter construct pCRE-SEAP and treated for 24 h with 0.3% ethanol in presence or absence of H89 (10 μmol/l), respectively. Ethanol treatment significantly increased CRE-SEAP activity (Fig. 6B). This stimulatory effect was inhibited by H89. The CRE-SEAP activity was also increased by forskolin treatment (1 μmol/l) (data not shown). These results confirmed that ethanol was able to upregulate the activity of PKA in MCF-7 cells.

PKA activity can be activated by the binding of cyclic AMP to its regulatory subunits (40). Using a specific adenylyl cyclase inhibitor (SQ22536), we determined the involvement of this enzyme in ethanol-induced ERα activation. PR expression was analyzed by semi-quantitative RT-PCR in MCF-7 cells treated with ethanol (0.3%) for 24 h in the presence or absence of SQ22536 in serum-free medium, respectively. The increase in PR expression usually induced by ethanol was significantly inhibited by SQ22536 (30 and 150 μmol/l) (Fig. 6C and D).

Taken together, these results established that the ligand-independent activation of ERα by ethanol was mediated by the cyclic AMP/PKA pathway.

Discussion

Alcohol consumption increases the risk for breast cancer in women by still undefined pathways (16-19). A growing number of *in vivo* and *in vitro* studies have been performed in order to identify the mechanisms involved in alcohol effects (20,21,24-31). One explanation could be that ethanol activates the estrogen signaling pathway which is responsible for estrogen-dependent breast cancers. Indeed, ethanol treatment stimulates the proliferation of hormone-dependent breast cancer cells (24-27). One study reported that ethanol

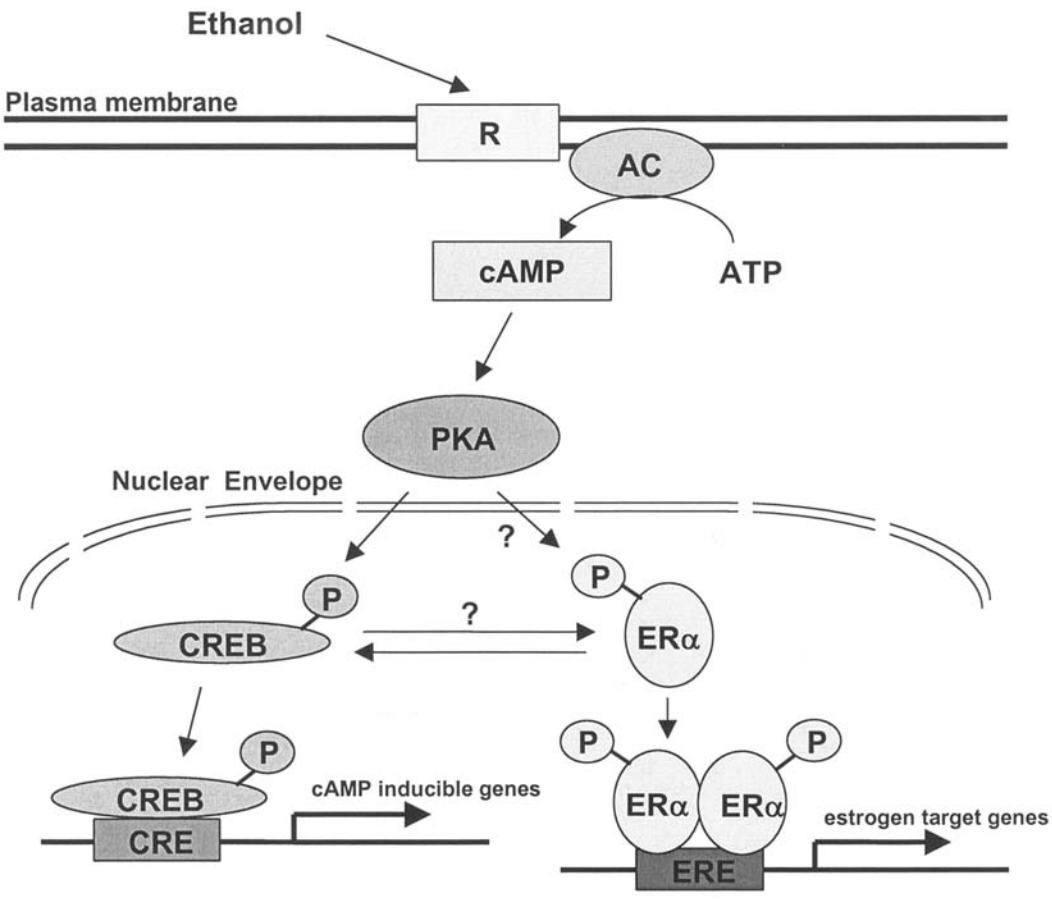


Figure 7. Schematic representation of ethanol effects in MCF-7 cells. Ethanol activates a membrane receptor (R) leading to the activation of adenylyl cyclase (AC) and the increase in intracellular cyclic AMP (cAMP) level (25). Increased cyclic AMP stimulates PKA activity which phosphorylates CREB. Phosphorylation of CREB upregulates cyclic AMP-inducible gene transcription. PKA also induces a ligand-independent activation of ERα either by a direct phosphorylation and/or by an interaction with phosphorylated CREB (14,51). The activated receptor then binds to specific estrogen response elements (EREs) within target genes, recruits the coactivator complex and promotes gene transcription.

could stimulate estrogen receptor signaling in human breast cancer cell lines (31). The authors showed that when MCF-7 or T-47-D cells were transfected with a plasmid containing an EREtkLuc construct and then incubated with E_2 plus ethanol, there was a dose-dependent increase in E_2-stimulated reporter activity. Moreover, ethanol can also stimulate breast cancer cell invasion and migration (28). We have recently observed that this might be related to an increase in MMP-2 and MMP-9 secretion (30). This effect was partially inhibited by the anti-estrogen ICI 182,780, suggesting again an activation of ERα in ethanol-treated cells. The present *in vitro* study was performed to demonstrate the activation of ERα in breast cancer cells incubated in ethanol containing medium and to determine the molecular bases of this activation.

First, we studied mRNA expression of two well known estrogen regulated genes: those encoding the progesterone receptor (6) and those encoding pS2 (7). Both PR and pS2 mRNAs were increased after 24 h of ethanol treatment, with the most efficient dose being 0.3% ethanol. The increase in PR and pS2 was modest but reliable since the same result was observed in numerous experiments (a mean of 5 replicates is shown for instance in Fig. 1). Moreover, the increase observed in case of ethanol exposure was always similar to those observed in response to E_2. The concentration of 0.3% has been previously described to stimulate the proliferation of estrogen-dependent breast cancer cell lines, not only MCF-7 but also ZR-75-1 (24-27). No significant increase in PR and pS2 transcription level was observed at higher doses. One might suggest that this was due to a decreased cell viability. However, studies by the MTT dye conversion assay showed that after a 24-h treatment, MCF-7 cell viability was not affected below 100 mmol/l (0.58%) ethanol (28). Nevertheless, our results showing that high doses of ethanol do not stimulate significantly the expression of E_2-regulated genes are consistent with the fact that the increase in cell proliferation induced by ethanol after a 24-h exposure is not always observed at high doses of alcohol (26).

What are the molecular events responsible for the higher expression of PR and pS2 observed in MCF-7 cells incubated during 24 h in 0.3% ethanol? Although the expression of both genes is regulated by estrogens, other factors could be involved. For instance, the level of MCF-7 cell pS2 mRNA can also be increased by the tumor promoter 12-0-tetra-decanoylphorbol-13-acetate (7). Similarly, PR expression in MCF-7 can be stimulated by several transcription factors such as HOXA5 (42). However, since the pure antiestrogen ICI 182,780 abolished the ethanol-induced increase in PR and pS2 expression, this clearly demonstrated the involvement of ERα in this phenomenon.

Since we have previously shown that ethanol-treated MCF-7 cells displayed a higher level of aromatase (27), we hypothesized that ethanol-induced stimulation of ERα was the result of a local production of estrogens via aromatase. Indeed, when MCF-7 cells are cultured in a low estrogen medium and treated with aromatizable androgens, there is significant cell growth stimulation which is completely inhibited by the aromatase inhibitor letrozole (43). The increase in PR and pS2 expression can also be the consequence of the aromatization of testosterone to E_2 (43,44). Similar processes seem to occur in breast tumors and women with estrogen responsive breast cancer receive not only anti-estrogen therapy with tamoxifen but also aromatase inhibitors (45). In order to determine if steroids are required for ethanol to stimulate PR and pS2 expression, we performed experiments in steroid-free medium.

In serum-free condition, ethanol treatment (0.3%) still increased PR and pS2 mRNA levels. The intensity of this response was similar between semi-quantitative RT-PCR and real-time RT-PCR analyses. It was similar to the intensity measured for E_2 (1 nmol/l) in semi-quantitative RT-PCR whereas it was lower than those of E_2 in real-time RT-PCR experiments. Whatever the method (semi-quantitative or real-time RT-PCR) and the stimulating compound (0.3% ethanol or E_2), the increase in pS2 mRNA level was always lower than those observed for PR. The response observed for PR was higher in serum-free medium than in FCS-containing medium with ethanol or E_2 whereas pS2 response was similar in both conditions. Our result on PR expression in response to E_2 is consistent with the higher sensitivity of MCF-7 cells to this steroid in terms of cell proliferation, that has already been reported in newborn calf serum versus fetal calf serum containing medium, the latter containing a higher concentration of steroids (43). In stripped serum condition, ethanol treatment (0.3%) increased luciferase activity of pEREtkLuc transfected MCF-7 cells, with an efficiency similar to those observed for E_2 (1 nmol/l). The confirmation by real-time RT-PCR analyses and transfection assays of ethanol effects deduced from semi-quantitative RT-PCR experiments is important. Indeed, these methods are quantitative and moreover, it demonstrates definitely the involvement of an ERE-mediated effect of ethanol.

The induction of E_2 target gene expression by ethanol in steroid-free medium suggested that these hormones, especially estrogens, were not involved in this mechanism. However, the inhibition of ethanol effect by ICI 182,780 prompted us to hypothesize that ERα was still implicated. Then we proposed that ethanol treatment leads to a ligand-independent activation of the receptor. Indeed, ERα activation can occur without any estrogen in the culture medium and then is dependent on several kinase pathways including the MAPK and PKA pathways (12-15). To confirm our hypothesis, we analyzed the ERα protein content by Western blotting. Indeed, it is well described that ERα is downregulated in the presence of its cognate ligand E_2, as well as in the presence of antiestrogens, through the ubiquitin proteasome pathway (38,46). On the contrary, ligand-independent stimulation of ERα transcription by the PKA pathway does not lead to receptor degradation (47). Western immunoblot analyses showed that in MCF-7 cells incubated for 24 h in ethanol containing medium, the ERα protein level was similar to those of control cells. The lower ERα detection observed in E_2-treated cells as well as in ICI 182,780-treated cells was consistent with other studies showing that ERα proteolysis is triggered by treatment with ERα ligands, with a faster and higher efficiency observed for ICI 182,780 than for E_2 itself (48). This absence of ERα proteolysis following exposure to ethanol confirmed our hypothesis of a ligand-independent activation of the receptor.

The use of the selective inhibitor of PKA (H89) allowed us to identify the kinase pathway involved in this mechanism. H89 abolished completely the increase in PR and pS2 mRNA levels induced by ethanol. The activation of PKA by ethanol was confirmed by several analyses. It is well known that CREB is activated by PKA (49). An antibody raised against phosphorylated CREB (at Ser 133) detected a higher amount of phospho-CREB in ethanol-treated MCF-7 cells. An event downstream of CREB phosphorylation is its association to CREB-binding protein (CBP) and the subsequent transcription of target genes with CRE in their promoter. As expected, ethanol stimulated the expression of the SEAP reporter gene in MCF-7 cells transfected with a CRE-SEAP construct. These findings are consistent with the fact that treatment of MCF-7 cells with PKA activators stimulates pS2 transcription in the absence of detectable estrogens (50,51). They are also in agreement with our results showing that forskolin is able to increase luciferase activity in pEREtkLuc transfected MCF-7 cells. The nature of the relationship between PKA and ERα in ethanol-treated MCF-7 cells remains to be elucidated. We questioned whether ERα activation requires its association with other partners like PKA phosphorylated-CREB and CBP or whether PKA directly phosphorylate ERα (14,52). Since it has been shown that forskolin-triggered PKA activation protects ERα from ligand-mediated degradation (47), we rather agree with the second hypothesis. Indeed, a 6-day ethanol exposure in serum-containing medium (1%) increases the ERα protein content which could be the result of a reduced proteolysis (27). Nevertheless, the use of an antibody raised against a phosphorylated synthetic peptide which represented a portion of ERα around serine 305 that is included in a consensus sequence for PKA phosphorylation (Bethyl Laboratories Inc.), did not allow us to definitely conclude on ERα phosphorylation. In addition, a stimulation of ER-target gene expression was always observed after 24 h of ethanol exposure whereas at a shorter timepoint (8 h), a high variability in this response of MCF-7 cells to alcohol was observed (not shown). This suggests that the increase in ERα target genes is an indirect event downstream of PKA activation. Additional studies are needed to elucidate that point.

Our results showing the activation of PKA are in agreement with a previous study showing an increase in cyclic AMP in MCF-7 and T47-D breast cancer cells exposed to ethanol (25). Furthermore, using an inhibitor of adenylyl cyclase (SQ22536), we observed a blockade of ethanol-induced increase of PR mRNA expression in MCF-7 cells. Adenylyl cyclase can be activated by G protein-coupled membrane receptors. Interestingly, ethanol has been reported to stimulate cyclic AMP production in both neuroblastoma x glioma hybrid cells (NG 108-15) and lymphoma cells via the

A_{2a} AR (41). A similar process could be involved in ethanol-treated MCF-7 cells.

What is the relevance to humans of our *in vitro* studies? In regard to alcohol consumption, it can be reminded that according to Widmark formula, a woman drinking 0.6 g alcohol per kg of body weight over a one-hour period has blood ethanol concentrations of approximately 0.1% one hour later (54). So, a 65-kg woman needs to drink 39 g alcohol (approximately 0.5 l of wine) to have a blood ethanol concentration of 0.1%. Obviously, studies of lethal dosage cannot be tested empirically in the laboratory, so the LD:50 for alcohol is estimated from post-mortem cases in which alcohol poisoning was found to be the primary cause of death. Most authorities agree that blood alcohol concentrations in the 0.40-0.50% range meet the requirements for the LD:50. So, the concentration of 0.3% used in most of our experiments, due to the higher intensity of its effect, could be considered as too high to mimic the *in vivo* situation. Nevertheless, we also observed the stimulation of estrogen target genes expression in response to 0.1% ethanol (Fig. 1), a concentration that is in the range of those measured *in vivo* following alcohol consumption. Besides, an increase in MCF-7 cyclic AMP content was also described in case of treatment with a concentration of 0.15% (25). The stimulatory effects of ethanol on breast cancer cell proliferation are also observed at 0.1% (24-27). Our study indicates that ethanol can be considered as a tool to study *in vitro* molecular mechanisms. In that context, high doses of ethanol are often used: for instance 100 mM (i.e. 0.6%) to study adenosine uptake in human lymphoblastoid cell lines (42). Ethanol could be an interesting tool to study ER and especially the ligand-independent activation that we have shown here.

In conclusion, our study demonstrates that ethanol treatment of MCF-7 breast cancer cells stimulates the cyclic AMP/PKA pathway which triggers two important events: an increase in the expression of genes with CRE in their promoter, like aromatase (27,55) as well as a ligand-independent activation of ERα and transcription of target genes (Fig. 7). Both events could have a dramatic effect on breast cancer cells since estrogen signaling pathway plays a key role in their physiology.

Acknowledgements

We acknowledge Professor Didier PICARD (University of Geneva, Switzerland) for the generous gift of pEREtkLuc vector and Doctors M. Duterque-Coquillaud and F. Küpper for critical reading of the manuscript. This work was supported by 'Université Henri Poincaré (BQR)', 'Ligue Contre le Cancer, comités de la Meurthe et Moselle, de la Meuse et de la Haute-Marne', 'Association pour la Recherche sur le Cancer', 'Cancéropôle Grand Est', 'Institut de Recherches Scientifiques sur les Boissons' and 'Conseil Régional de Lorraine'.

References

1. Weichselbaum RR, Hellman S, Piro AJ, Nove JJ and Little JB: Proliferation kinetics of a human breast cancer line *in vitro* following treatment with 17beta-estradiol and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. Cancer Res 38: 2339-2342, 1978.
2. Reddel RR and Sutherland RL: Tamoxifen stimulation of human breast cancer cell proliferation *in vitro*: a possible model for tamoxifen tumour flare. Eur J Cancer Clin Oncol 20: 1419-1424, 1984.
3. Lykkesfeldt AE and Briand P: Indirect mechanism of oestradiol stimulation of cell proliferation of human breast cancer cell lines. Br J Cancer 53: 29-35, 1986.
4. Hall JM and McDonnell DP: Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. Mol Interv 5: 343-357, 2005.
5. Singh RR and Kumar R: Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis. J Cell Biochem 2005, 96: 490-505, 2005.
6. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR and Chambon P: Functional domains of the human estrogen receptor. Cell 51: 941-951, 1987.
7. Nunez AM, Berry M, Imler JL and Chambon P: The 5' flanking region of the pS2 gene contains a complex enhancer region responsive to oestrogens, epidermal growth factor, a tumour promoter (TPA), the c-Ha-ras oncoprotein and the c-jun protein. EMBO J 8: 823-829, 1989.
8. Gaub MP, Bellard M, Scheuer I, Chambon P and Sassone-Corsi P: Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. Cell 63: 1267-1276, 1990.
9. De Nardo DG, Kim HT, Hilsenbeck S, Cuba V, Tsimelzon A and Brown PH: Global gene expression analysis of estrogen receptor transcription factor cross talk in breast cancer: identification of estrogen-induced/activator protein-1-dependent genes. Mol Endocrinol 19: 362-378, 2005.
10. Xie W, Duan R and Safe S: Estrogen induces adenosine deaminase gene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of estrogen receptor-Sp1 interactions. Endocrinology 140: 219-227, 1999.
11. Coleman KM and Smith CL: Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. Front Biosci 6: D1379-D1391, 2001.
12. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D and Chambon P: Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. Science 270: 1491-1494, 1995.
13. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ and Picard D: Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. EMBO J 15: 2174-2183, 1996.
14. Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ and Katzenellenbogen BS: Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. J Biol Chem 269: 4458-4466, 1994.
15. Aronica SM, Kraus WL and Katzenellenbogen BS: Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. Proc Natl Acad Sci USA 91: 8517-8521, 1994.
16. Longnecker MP: Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review. Cancer Causes Control 5: 73-82, 1994.
17. Aronson K: Alcohol: a recently identified risk factor for breast cancer. CMAJ 168: 1147-1148, 2003.
18. Ma H, Bernstein L, Ross RK and Ursin G: Hormone-related risk factors for breast cancer in women under age 50 years by estrogen and progesterone receptor status: results from a case-control and a case-case comparison. Breast Cancer Res 8: R39, 2006.
19. Rosenberg LU, Magnusson C, Lindstrom E, Wedren S, Hall P and Dickman PW: Menopausal hormone therapy and other breast cancer risk factors in relation to the risk of different histological subtypes of breast cancer: a case-control study. Breast Cancer Res 8: R11, 2006.
20. Singletary KW, McNary MQ, Odoms AM, Nelshoppen J and Wallig MA: Ethanol consumption and DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats. Nutr Cancer 16: 13-23, 1991.
21. Singletary K, Nelshoppen J and Wallig M: Enhancement by chronic ethanol intake of N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary tumorigenesis. Carcinogenesis 16: 959-964, 1995.
22. Reichman ME, Judd JT, Longcope C, Schatzkin A, Clevidence BA, Nair PP, Campbell WS and Taylor PR: Effects of alcohol consumption on plasma and urinary hormone concentrations in premenopausal women. J Natl Cancer Inst 85: 722-727, 1993.

23. Dorgan JF, Baer DJ, Albert PS, Judd JT, Brown ED, Corle DK, Campbell WS, Hartman TJ, Tejpar AA, Clevidence BA, Giffen CA, Chandler DW, Stanczyk FZ and Taylor PR: Serum hormones and the alcohol-breast cancer association in postmenopausal women. J Natl Cancer Inst 93: 710-715, 2001.
24. Przylipiak A, Rabe T, Hafner J, Przylipiak M and Runnebaum R: Influence of ethanol on *in vitro* growth of human mammary carcinoma cell line MCF-7. Arch Gynecol Obstet 258: 137-140, 1996.
25. Singletary KW, Frey RS and Yan W: Effect of ethanol on proliferation and estrogen receptor-alpha expression in human breast cancer cells. Cancer Lett 165: 131-137, 2001.
26. Izevbigie EB, Ekunwe SI, Jordan J and Howard CB: Ethanol modulates the growth of human breast cancer cells *in vitro*. Exp Biol Med 227: 260-265, 2002.
27. Etique N, Chardard D, Chesnel A, Merlin JL, Flament S and Grillier-Vuissoz I: Ethanol stimulates proliferation, ERalpha and aromatase expression in MCF-7 human breast cancer cells. Int J Mol Med 13: 149-155, 2004.
28. Meng Q, Gao B, Goldberg ID, Rosen EM and Fan S: Stimulation of cell invasion and migration by alcohol in breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 273: 448-453, 2000.
29. Luo J and Miller MW: Ethanol enhances erbB-mediated migration of human breast cancer cells in culture. Breast Cancer Res Treat 63: 61-69, 2000.
30. Etique N, Grillier-Vuissoz I and Flament S: Ethanol stimulates the secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in MCF-7 human breast cancer cells. Oncol Rep 15: 603-608, 2006.
31. Fan S, Meng Q, Gao B, Grossman J, Yadegari M, Goldberg ID and Rosen EM: Alcohol stimulates estrogen receptor signaling in human breast cancer cell lines. Cancer Res 60: 5635-5639, 2000.
32. Fazzari A, Catalano MG, Comba A, Becchis M, Raineri M, Frairia R and Fortunati N: The control of progesterone receptor expression in MCF-7 breast cancer cells: effects of estradiol and sex hormone-binding globulin (SHBG). Mol Cell Endocrinol 172: 31-36, 2001.
33. Catalano S, Mauro L, Marsico S, Giordano C, Rizza P, Rago V, Montanaro D, Maggiolini M, Panno ML and Ando S: Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor alpha in MCF-7 cells. J Biol Chem 279: 19908-19915, 2004.
34. Pfaffl MW: Quantification strategies in real-time PCR. In A-Z of Quantitative PCR. Bustin SA (ed). IUL Biotechnology Series, La Jolla, CA, International University Line: 87-120, 2004.
35. Souaze F, Ntodou-thome A, Tran CY, Rostene W and Forgez P: Quantitative Rt-PCR: limits and accuracy. Biotechniques 21: 280-285, 1996.
36. Wakeling AE and Bowler J: ICI 182,780, a new antioestrogen with clinical potential. J Steroid Biochem Mol Biol 43: 173-177, 1992.
37. Wijayaratne AL and McDonnell DP: The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. J Biol Chem 276: 35684-35692, 2001.
39. Shaywitz AJ and Greenberg ME: CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. Annu Rev Biochem 68: 821-861, 1999.
40. Herberg FW, Taylor SS and Dostmann WR: Active site mutations define the pathway for the cooperative activation of cAMP-dependent protein kinase. Biochemistry 35: 2934-2942, 1996.
41. Nagy LE, Diamond I, Casso DJ, Franklin C and Gordon AS: Ethanol increases extracellular adenosine by inhibiting adenosine uptake via the nucleoside transporter. J Biol Chem 265: 1946-1951, 1990.
42. Raman V, Tamori A, Vali M, Zeller K, Korz D and Sukumar S: HOXA5 regulates expression of the progesterone receptor. J Biol Chem 275: 26551-26555, 2000.
43. Sonne-Hansen K and Lykkesfeldt AE: Endogenous aromatization of testosterone results in growth stimulation of the human MCF-7 breast cancer cell line. J Steroid Biochem Mol Biol 93: 25-34, 2005.
44. Burak WE Jr, Quinn AL, Farrar WB and Brueggemeier RW: Androgens influence estrogen-induced responses in human breast carcinoma cells through cytochrome P450 aromatase. Breast Cancer Res Treat 44: 57-64, 1997.
45. Nabholtz JM, Buzdar A, Pollak M, Harwin W, Burton G, Mangalik A, Steinberg M, Webster A and von Euler M: Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: results of a North American multicenter randomized trial. Arimidex Study Group. J Clin Oncol 18: 3758-3767, 2000.
46. Preisler-Mashek MT, Solodin N, Stark BL, Tyriver MK and Alarid ET: Ligand-specific regulation of proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor-alpha. Am J Physiol Endocrinol Metab 282: E891-E898, 2002.
47. Tsai HW, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS and Shupnik MA: Protein kinase A activation of estrogen receptor alpha transcription does not require proteasome activity and protects the receptor from ligand-mediated degradation. Endocrinology 145: 2730-2738, 2004.
48. Marsaud V, Gougelet A, Maillard S and Renoir JM: Various phosphorylation pathways, depending on agonist and antagonist binding to endogenous estrogen receptor alpha (ERalpha), differentially affect ERalpha extractability, proteasome-mediated stability, and transcriptional activity in human breast cancer cells. Mol Endocrinol 17: 2013-2027, 2003.
49. Dash PK, Karl KA, Colicos MA, Prywes R and Kandel ER: cAMP response element-binding protein is activated by Ca^{2+}/calmod. Proc Natl Acad Sci USA 88: 5061-5065, 1991.
50. Chalbos D, Philips A, Galtier F and Rochefort H: Synthetic antiestrogens modulate induction of pS2 and cathepsin-D messenger ribonucleic acid by growth factors and adenosine 3',5'-monophosphate in MCF7 cells. Endocrinology 133: 571-576, 1993.
51. El Tanani MK and Green CD: Interaction between estradiol and cAMP in the regulation of specific gene expression. Mol Cell Endocrinol 124: 71-77, 1996.
52. Lazennec G, Thomas JA and Katzenellenbogen BS: Involvement of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and estrogen receptor phosphorylation in the synergistic activation of the estrogen receptor by estradiol and protein kinase activators. J Steroid Biochem Mol Biol 77: 193-203, 2001.
53. Mujoomdar M, Bennett A, Hoskin D and Blay J: Adenosine stimulation of proliferation of breast carcinoma cell lines: evaluation of the [^{3}H]thymidine assay system and modulatory effects of the cellular microenvironment *in vitro*. J Cell Physiol 201: 429-438, 2004.
54. Gubala W and Zuba D: Gender differences in the pharmacokinetics of ethanol in saliva and blood after oral ingestion. Pol J Pharmacol 55: 639-644, 2003.
55. Michael MD, Michael LF and Simpson ER: A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene. Mol Cell Endocrinol 134: 147-156, 1997.

II. Ethanol et voies de signalisation de l'A_{2A}AR et de ERα

A Crosstalk between Adenosine receptor (A_{2A} isoform) and ERα mediated ethanol action in MCF-7 Breast Cancer Cells.
Nicolas ETIQUE, Stephane FLAMENT, Julie LECOMTE and Isabelle GRILLIER-VUISSOZ. Article soumis au journal International Journal of Oncoloy.

2.1. Introduction

L'adénosine est un métabolite naturel possédant 4 types de récepteurs (ARs) couplés aux protéines G (A_1AR, A_{2A}AR, A_{2B}AR and A_3AR) (Fredholm *et al*., 2001). Chaque récepteur régule l'activité de l'adénylate cyclase. Dans les cellules MCF-7, l'éthanol induit une activation de ERα indépendante de l'E_2 médiée par la voie AMPc/PKA or les mécanismes moléculaires impliqués sont inconnus (Etique *et al*., 2007). Des travaux réalisés sur des cellules de neuroblastomes, NG108-15, montrent que le récepteur A_{2A} à l'adénosine est impliqué dans l'augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire de ces cellules lorsqu'elles sont cultivées en présence d'éthanol (Nagy *et al*., 1990). Nous avons émis l'hypothèse qu'un mécanisme similaire pouvait avoir lieu dans les cellules MCF-7.

2.2. Principaux résultats

Nous avons montré par RT-PCR et par immunocytochimie que le récepteur A_{2A}AR était exprimé dans les cellules MCF-7. Nous avons ensuite transfecté les cellules MCF-7 avec un plasmide contenant le gène rapporteur SEAP placé sous le contrôle d'un promoteur contenant un élément de réponse à l'AMPc (CRE). Un traitement avec un agoniste sélectif de l'A_{2A}AR, le CGS21680, induit une augmentation de l'expression de SEAP. Cet effet est inhibé lorsque les cellules sont traitées avec un antagoniste de l'A_{2A}AR, le MSX-3. Ces résultats montrent que la voie de l'A_{2A}AR est fonctionnelle dans les cellules MCF-7.
Pour vérifier l'hypothèse de l'existence d'un cross-talk entre l'A_{2A}AR et ERα, nous avons étudié l'expression d'un gène cible de ERα, le PR, en présence d'un agoniste de l'A_{2A}AR. Le taux d'ARNm du PR est augmenté en présence de 1 µM de CGS21680. Cet effet est aboli en présence d'un inhibiteur de PKA, le H89. Enfin, pour démontrer que l'A_{2A}AR stimule l'expression de gènes cible de ERα, les cellules MCF-7 ont été transfectées avec un plasmide contenant un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur contenant un

élément de réponse à ERα (pEREtkLuc). Les cellules ont été ensuite traitées avec différents composés. Les résultats ont montré que le CGS21680 (1 µM) stimule l'activité luciférase au même niveau que l'E_2 (1nM). Cet effet est médié par ERα puisque l'activité luciférase est inhibée en présence de l'anti-œstrogène pur, l'ICI182-780 (100 nM). De plus, la stimulation de la luciférase par le CGS21680 est inhibée par la présence de l'inhibiteur de PKA, le H89.

Concernant la prolifération cellulaire, le CGS21680 (1 µM) stimule la prolifération des cellules MCF-7 après 96h de traitement. L'augmentation de la prolifération est similaire à celle observée en présence d'E_2 (1 nM).

Nous avons voulu déterminer si l'A_{2A}AR est impliqué dans l'activation de ERα par l'éthanol par la voie AMPc/PKA dans les cellules MCF-7. Pour répondre à cette hypothèse, les cellules ont été traitées à l'éthanol (0,3%) pendant 24h en présence ou en absence de MSX-3 (10 et 30 µM). Nous avons ensuite analysé l'expression du PR. Le MSX-3 induit une inhibition dose-dépendante de l'expression du PR. Nous avons aussi transfecté les cellules MCF-7 avec la construction pEREtkLuc. Le MSX-3 (30 µM) induit une inhibition de l'action de l'éthanol sur l'ERE. Ce résultat démontre le rôle de l'A_{2A}AR dans l'activation de la voie de signalisation de ERα induite par l'éthanol.

2.3. Conclusion

Ces résultats démontrent l'existence d'un cross-talk entre l'A_{2A}AR et ERα, qui est impliqué dans l'action de l'éthanol sur les cellules MCF-7. Ceci permet de mieux comprendre les effets de l'éthanol sur la prolifération et la migration des cellules cancéreuses mammaires. Ces résultats ont permis également de mettre en évidence une nouvelle cible thérapeutique : le récepteur A_{2A} à l'adénosine. Son activation par l'adénosine présente en forte concentration dans l'environnement des tumeurs mammaires pourrait favoriser la tumorogenèse (Mujoonmdar *et al.*, 2004).

A Crosstalk between Adenosine receptor (A_{2A} isoform) and ERα mediates ethanol action in MCF-7 Breast Cancer Cells

NICOLAS ETIQUE, ISABELLE GRILLIER-VUISSOZ, JULIE LECOMTE and STEPHANE FLAMENT*

EA 3442 Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Reproduction et du Développement, Nancy-Université, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

**Correspondence to:* Prof. S. Flament

Fax : +33 - 3-83-68-41-96

E-mail : stephane.flament@scbiol.uhp-nancy.fr

Key words: breast cancer, estrogen receptor, adenosine receptor, alcohol.

Abbreviated running title: A_{2A}AR and ERα cross-talk

Abstract

Alcohol consumption increases the risk of breast cancer but the underlying mechanisms are not well understood. We have shown previously that ethanol activates ER signaling pathway in a cAMP/PKA-mediated ligand-independent manner. Since the activation of A_{2A} adenosine receptor ($A_{2A}AR$) by ethanol has been reported in other cell types, here we tested if a cross-talk between this Gs-coupled receptor and ERα could be involved in ethanol effects in breast cancer cells. Our study shows that $A_{2A}AR$ is expressed and functional in the hormone-dependent breast cancer cell line MCF-7. Interestingly, activation of this receptor by the selective agonist CGS21680 stimulates the transcription of progesterone receptor, a well known estrogen target gene. CGS21680 also stimulates the pEREtkLuc reporter activity in transfected MCF-7 cells, an effect antagonized by the anti-estrogen ICI182,780. Moreover, CGS21680 stimulates the proliferation of MCF-7 cells similarly to E_2. Finally, the $A_{2A}AR$ antagonist MSX-3 inhibits the ethanol-induced activation of ERα signalling pathway. These results demonstrate a cross-talk between $A_{2A}AR$ and ERα that is involved in ethanol action. This could open new perspectives for the therapy of estrogen-dependent breast cancer.

Key words: Adenosine receptor, Estrogen receptor, Cross-talk, cAMP/PKA pathway, Breast cancer, Alcohol

1. Introduction

Adenosine is a natural metabolite that plays a role in vasodilatation, cardioprotection after ischemia, inhibition of platelet aggregation, mast cell activation, cell growth (1). Four adenosine receptors (ARs) (A_1AR, A_{2A}AR, A_{2B}AR and A_3AR) have been cloned (2). Each of them regulate the activity of adenylyl cyclase : the A_1 and A_3 receptors mediate a decrease in cAMP via Gi/o whereas the two A_2 receptors mediate an increase in cAMP via Gs (3). Extracellular adenosine activates A_1 and A_{2A} receptors whereas at high concentrations, it acts mainly on A_3AR.

Adenosine and AR seem to play different roles in various types of cancer (4). In breast cancer, selective A_1AR and selective A_3AR agonists inhibit cell proliferation of both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines (5-8). An inhibitor of the ecto-5'-nucleotidase CD73, an enzyme that generates adenosine, decreases proliferation of breast cancer cells MDA-MB231 *in vitro* as well as *in vivo* in xenografts (9), while ecto-5'-nucleotidase over-expression promotes invasion, migration and adhesion of breast cancer cells (10). Breast carcinoma tissues show higher A_1 and A_3AR expression in the tumor versus adjacent non-neoplastic tissue or normal tissue (11,12). Moreover a depletion of A_1AR in MDA-MB-468 human breast tumor cells significantly induces apoptosis (12).

Breast cancer is the most common cancer in women. About 60% of all patients have hormone-dependent breast cancer. These tumors express estrogen receptors (ER) and require estrogens for their growth (13). ERα, a member of the superfamily of steroid nuclear receptors, mediates the effects of these hormones on tumor development. In the best understood mode of action, the liganded ERα receptor binds to specific estrogen response elements (EREs) within target genes and recruits a p160/p300 coactivator complex to the promoter (14,15). This coactivator complex promotes gene transcription by remodeling chromatin and by contacting the basal transcription machinery. A hormone-independent

activation of ERα also occurs in human breast cancer cells. Indeed, ERα activity can be stimulated by several kinase pathways (16). For instance, the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway activated by epidermal growth factor directly phosphorylates ERα in the absence of ligand and induces ER transactivation (17,18). In MCF-7 breast cancer cells, ethanol induces a ligand-independent activation of ERα mediated by the cAMP/PKA pathway (19). However, the mechanisms involved in the ethanol-induced activation of cAMP/PKA are unknown. Interestingly, in NG108-15 cells (neuroblastoma x glioma hybrid cells), acute ethanol exposure induces an increase in extracellular adenosine that activates A_2 receptors to stimulate cAMP production (20). Such a mechanism could exist in MCF-7 cells.

In the present study, we show that the A_{2A} isoform of adenosine receptor is expressed by MCF-7 breast cancer cells. We demonstrate that activation of this receptor leads to the activation of ERα and to cell growth stimulation. A_{2A}AR also mediates the ethanol-induced activation of ERα signalling pathway.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), L-glutamine, 17-β-estradiol (E_2), Forskolin, MSX-3 and CGS21680 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and fœtal calf serum (FCS) from Eurobio (Les Ulis, France). ICI 182,780 was purchased from Tocris Cookson (Bristol, UK). H89 and SQ22536 were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). These chemicals were dissolved in ethanol.

2.2 Cell culture treatment and proliferation assay

MCF-7 cells were routinely grown in DMEM supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine, at 37°C in a 5% (v/v) CO_2 humidified atmosphere.

Treatments were conducted as previously described (19). When ethanol was used as a control, its concentration was 0.1%. When we studied ethanol as a test compound, it was used at 0.3% For cell proliferation assay, after 48 h and 96 h, cells were counted with the CellTiter-GloTM Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Charbonnieres, France). Each treatment was performed in triplicate.

For immunocytochemistry, MCF-7 cells were seeded on Poly L-lysine coated coverslips. 24 h after attachment, coverslips were washed with PBS and fixed in 4% PAF for 20 min. After washing in Tris Buffered Saline, preparations were treated for $A_{2A}AR$ detection using the 7F6-G5-A2 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) (1:300) and an Alexa Fluor 555 conjugated-goat anti-mouse antibody (Invitrogen) (1:1000). Cells were counterstained with Hoechst dye to visualise nuclei. Preparations were analysed under U.V. illumination on a Eclipse 80i microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France). Images were collected using LuciaG software 4.81 (Laboratory imaging).

2.3 Semi-quantitative RT-PCR

For Progesterone receptor (PR) and β-Actin, the protocol for semi-quantitative RT-PCR has been described previously (19,21). The specific primers for $A_{2A}AR$ were 5'-AACCTGCAGAACGTCACCAA-3' and 5'-GTCACCAAGCCATTGTACCG-3' (22). Its amplification was carried out with 30 cycles of amplification (94°C for 40 sec, 65°C for 1 min and 68°C for 1 min). For each gene, the number of cycles was chosen to realize the analysis in the linear phase of the PCR reaction. The PCR products were quantified as previously described (19).

2.4 Transient transfection assays

MCF-7 cells were transfected with the expression plasmids using Exgen 500 as recommended by the manufacturer (Euromedex, France). The protocol for transfection experiments has been described previously (19, 21). After transfection, cells were allowed to grow for one day and treated for 24 h in fresh medium. SEAP (secreted alkaline phosphatase), luciferase and β-Galactosidase (β-Gal) activities were measured as previously described (19,21).

2.5 Statistical analysis

The results are expressed as mean +/- standard error of several experiments as indicated in the text. Differences among groups were tested using analysis of variance (ANOVA). Differences in which *P* was less than 0.05 were statistically significant. When significant differences were detected, specific post-hoc comparisons between treatment groups were examined with the Student Newman's Keuls test (SPSS v11.0 Computer Software).

3. Results

A functional $A_{2A}AR$ is expressed in MCF-7 cells

RT-PCR analyses showed the presence of the $A_{2A}AR$ mRNA in MCF-7 cells (Fig. 1). The amplified product was of the expected size of 244 bp and its identity was confirmed by sequencing (Fig. 1A,B). The presence of the protein was demonstrated by the use of an anti-$A_{2A}AR$ antibody that stained the membrane of MCF-7 cells in immunocytochemistry experiments (Fig. 2A). Moreover, in MCF-7 cells transfected with the reporter construct pCRE-SEAP (with 3 tandem copies of the cAMP Response Element (CRE) consensus sequence), the treatment with the $A_{2A}AR$ selective agonist CGS21680 induced a 1.95-fold increase in SEAP expression (Fig. 2B). This effect was inhibited by the antagonist MSX-3 (Fig. 2B).

3.2 $A_{2A}AR$ activation stimulates ERα signalling pathway

To test the hypothesis of a cross-talk between $A_{2A}AR$ and ERα, we studied if the expression of the estrogen target gene PR (19,21) could be stimulated by an $A_{2A}AR$ agonist. We observed an increased level of PR mRNA following a 24 h treatment with 1 µM CGS21680. This effect was abolished in the presence of the PKA inhibitor H89 (Fig. 3A). In order to definitely demonstrate the activation of ERα target genes expression by the $A_{2A}AR$ agonist, MCF-7 cells were transfected with the reporter construct pEREtkLuc and treated by different compounds (Fig. 3B). Similarly to E_2 (1 nM) used as a control, the $A_{2A}AR$ agonist CGS21680 (1 µM) significantly increased luciferase activity (3-fold). This effect was mediated by the activation of ERα since it was antagonized by the pure antiestrogen ICI182,780 (100 nM) which also inhibited the response to E_2. Besides, the stimulation of ERE-directed expression by CGS21680 was inhibited in presence of the PKA inhibitor H89 (Fig. 3B).

We also determined if the cross-talk between A_{2A}AR and ERα could stimulate cell proliferation. After 96 h, CGS21680 (1 μM) stimulated MCF-7 cell proliferation (Fig. 3C). A similar effect was observed with E_2 (1 nM) (Fig. 3C). Taken together, these results demonstrate a cross-talk between A_{2A}AR and ERα.

3.3 A_{2A}AR mediates ethanol-induced activation of ERα signalling pathway

We have recently shown in MCF-7 cells that ethanol activates the cAMP/PKA pathway and induces a ligand-independent activation of ERα (19). Interestingly, ethanol has been reported to stimulate cAMP production in both NG 108-15 and lymphoma cells *via* the A_{2A}AR (20). In order to test the involvement of A_{2A}AR in ethanol-induced activation of ERα signalling pathway in MCF-7 cells, PR gene expression was studied after treatment with ethanol for 24 h, in presence or absence of MSX-3 (10 and 30 μM). Ethanol was used at 0.3% since it is the most efficient dose *in vitro* (19). The antagonist induced a dose-dependent inhibition of ethanol-induced increase in PR expression (Figs. 4A and 4B).

We also studied pEREtkLuc transfected MCF-7 cells (Fig. 4C). This transfection assay showed an inhibition of ethanol action in the presence of the A_{2A}AR antagonist MSX-3 (30 μM).

4. Discussion

Although the role played by adenosine and its receptors in breast cancer is not well understood, several studies indicate that adenosine is able to promote tumor cell proliferation and migration (10,23). Nevertheless, the underlying mechanisms remain obscure. In this study, we tested the hypothesis of a cross-talk between A_{2A}Anenosine receptor and ERα in the homone-dependent breast cancer cell line MCF-7. Such a cross-talk could explain some

tumorigenic processes involving adenosine or compounds as ethanol which could increase adenosine levels (20).

Our results based on both mRNA and protein detection show that $A_{2A}AR$ is expressed in MCF-7 cells. Besides, in the transfection assays using a pCRE-SEAP reporter construct, the data obtained following treatment of the cells with a selective $A_{2A}AR$ agonist are in agreement with the increase in cAMP usually observed following $A_{2A}AR$ activation (3). Hence, the $A_{2A}AR$ pathway is functional in MCF-7 cells. These findings contrast with a previous report concluding that MCF-7 cells did not contain adenosine receptors as judged by the lack of effect of non selective agonists on adenylyl cyclase activity or intracellular Ca^{2+} levels (24). However, the same author published recently the presence of the transcript of all adenosine receptors in the same cell line, with A_3 and A_{2B} isoforms being functional as deduced from cAMP production (25).

Then, different approaches led to the demonstration of a cross-talk between $A_{2A}AR$ and ERα. First, the treatment of MCF-7 cells with an $A_{2A}AR$ agonist induced an increase in PR mRNA level that is often studied as an ER target gene (19,21). This result was confirmed by a more precise test using transfection assays with a pEREtkLuc reporter construct. In this assay it was surprising to observe that the stimulation of luciferase activity was similar in the same range in case of exposure to either an $A_{2A}AR$ agonist or E_2 itself. This similar intensity was correlated with the results of proliferation analyses.

Finally, we observed that the $A_{2A}AR$ antagonist MSX3 inhibited both the increase in PR expression and the ERE-mediated increase in luciferase activity in transfection assays that are usually observed following exposure of MCF-7 cells to ethanol. This demonstrated the important role of $A_{2A}AR$ in the ethanol-induced activation of ERα signalling pathway (19). So, ethanol acts in a similar $A_{2A}AR$-dependent manner in breast cancer cells and in NG 108-15 and lymphoma cells (20).

To conclude, our results demonstrate a cross-talk between $A_{2A}AR$ and ERα that is involved in ethanol action on MCF-7 cells. Nevertheless, the link between ethanol and $A_{2A}AR$ remains to be determined. In S49 lymphoma cells, ethanol exposure increases extracellular adenosine by inhibiting the adenosine uptake *via* the nucleoside transporter (20). A similar process could be involved in ethanol-treated MCF-7 cells to explain $A_{2A}AR$ activation. Besides, $A_{2A}AR$ is linked to estrogen signalling pathway, it can be activated by extracellular adenosine whose concentration is elevated in breast tumors environment (23), therefore $A_{2A}AR$ could constitute an interesting target for the design of new therapeutic agents.

Acknowledgements

We acknowledge Professor D. PICARD (University of Geneva, Switzerland) for the generous gift of pEREtkLuc vector and Doctor S. Mazerbourg for critical reading of the manuscript. We also thank E. Bouvry, M. Chillet and A. Kleinclauss for technical assistance. This work was supported by " Université Henri Poincaré (BQR) ", " Ligue Contre le Cancer, comité de la Haute-Marne", " Association pour la Recherche sur le Cancer, "Cancéropôle Grand Est", "Institut de Recherches Scientifiques sur les Boissons" and "Conseil Régional de Lorraine".

References

1. Linden J: Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. Annu Rev Pharmacol Toxicol 41: 775-787, 2001.

2. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN and Linden J: International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. Pharmacol Rev 53(4): 527-552, 2001.

3. Schulte G and Fredholm BB: Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. Cell Signal 15(9): 813-827, 2003.

4. Merighi S, Mirandola P, Varani K, Gessi S, Leung E, Baraldi PG, Tabrizi MA and Borea PA: A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. Pharmacol Ther 100(1): 31-48, 2003.

5. Colquhoun A and Newsholme EA: Inhibition of human tumour cell proliferation by analogues of adenosine. Cell Biochem Funct 15(2): 135-139, 1997.

6. Lu J, Pierron A and Ravid K: An adenosine analogue, IB-MECA, down-regulates estrogen receptor alpha and suppresses human breast cancer cell proliferation. Cancer Res 63(19): 6413-6423, 2003.

7. Panjehpour M and Karami-Tehrani F: An adenosine analog (IB-MECA) inhibits anchorage-dependent cell growth of various human breast cancer cell lines. Int J Biochem Cell Biol 36(8): 1502-1509, 2004.

8. Chung H, Jung J-Y, Cho S-D, Hong K-A, Kim H-J, Shin D-H, Kim H, Kim HO, Shin DH, Lee HW, Jeong LS and Kong G: The antitumor effect of LJ-529, a novel agonist to A3 adenosine receptor, in both estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative human breast cancers. Mol Cancer Ther 5(3): 685-692, 2006.

9. Zhou X, Zhi X, Zhou P, Chen S, Zhao F, Shao Z, Ou Z and Yin L: Effects of ecto-5'-nucleotidase on human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. Oncol Rep 17(6): 1341-1346, 2007.

10. Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, Yin L, Shao Z, Ou Z and Zhou P: Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells Cancer Res Clin Oncol 134(3): 365-372, 2008.

11. Madi L, Ochaion A, Rath-Wolfson L, Bar-Yehuda S, Erlanger A, Ohana G, Harish A, Merimski O, Barer F and Fishman P: The A3 adenosine receptor is highly expressed in tumor versus normal cells: potential target for tumor growth inhibition. Clin Cancer Res 10(13): 4472-4479, 2004.

12. Mirza A, Basso A, Black S, Malkowski M, Kwee L, Pachter JA, Lachowicz JE, Wang Y and Liu S: RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. Cancer Biol Ther 4(12): 1355-1360, 2005.

13. Lykkesfeldt AE and Briand P: Indirect mechanism of oestradiol stimulation of cell proliferation of human breast cancer cell lines. Br J Cancer 53: 29-35, 1986.

14. Hall JM and McDonnell DP: Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. Mol Interv 5: 343-357, 2005.

15. Singh RR and Kumar R: Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis. J Cell Biochem 96: 490-505, 2005.

16. Coleman KM and Smith CL: Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. Front Biosci 6: 1379-1391, 2001.

17. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D and Chambon P: Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. Science 270: 1491-1494, 1995.

18. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ and Picard D: Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. EMBO J 15: 2174-2183, 1996.

19. Etique N, Flament S, Lecomte J and Grillier-Vuissoz I: Ethanol-induced ligand-independent activation of ERα mediated by cyclic AMP/PKA pathway: an in vitro study on MCF-7 breast cancer cells. Int J Oncol 31(6): 1509-1518, 2007.

20. Nagy LE, Diamond I, Casso DJ, Franklin C and Gordon AS: Ethanol increases extracellular adenosine by inhibiting adenosine uptake via the nucleoside transporter. J Biol Chem 265: 1946-1951, 1990.

21. Lecomte J, Flament S, Salamone S, Boisbrun M, Mazerbourg S, Chapleur Y and Grillier-Vuissoz I: Evidence of PPARγ-independent effects of PPARγ agonists in two hormone dependent cell lines. Breast Cancer Res Treat (in press)

22. Christofi FL, Zhang H, Yu JG, Guzman J, Xue J and Kim M: Differential gene expression of adenosine A1, A2a, A2b, and A3 receptors in the human enteric nervous system. J Comp Neurol 439: 46-64, 2001.

23. Mujoomdar M, Bennett A, Hoskin D and Blay J: Adenosine stimulation of proliferation of breast carcinoma cell lines: evaluation of the [3H]thymidine assay system and modulatory effects of the cellular microenvironment in vitro. J Cell Physiol 201(3): 429-438, 2004.

24. Panjehpour M, Castro M and Klotz KN: Human breast cancer cell line MDA-MB-231 expresses endogenous A2B adenosine receptors mediating a Ca2+ signal. Br J Pharmacol 145(2): 211-218, 2005.

25. Panjehpour M, Karami-Tehrani F: Adenosine modulates cell growth in the human breast cancer cells via adenosine receptors. Oncol Res 16(12): 575-585, 2007.

Figure legends

Figure 1. $A_{2A}AR$ mRNA expression in MCF-7 cells. A) Agarose gel electrophoresis showing the 244 bp product obtained after RT-PCR with $A_{2A}AR$ specific primers. Lane 1: DNA ladder; lane 2: negative control; lane 3: MCF-7 cDNA. B) Alignment showing 100% identity between the sequence of the PCR product (PCRp) and that of human $A_{2A}AR$ (NM_000675.4).

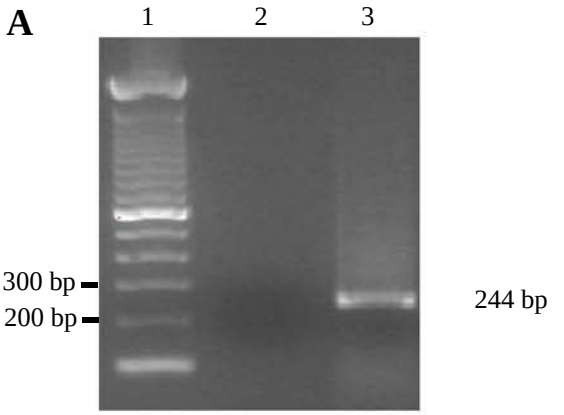
Figure 2. $A_{2A}AR$ protein expression in MCF-7 cells. A) Immunodetection of $A_{2A}AR$ in MCF-7 cells leading to membrane staining. In control cells the primary antibody was omitted. B) Expression of the SEAP reporter gene following treatment of pCRE-SEAP and pCMV-βGal co-transfected MCF-7 cells with the $A_{2A}AR$ agonist CGS21680 for 24 h in presence or absence of the $A_{2A}AR$ antagonist MSX-3. Forskolin (Frsk) treatment was used as a positive control. SEAP reporter activity was normalized with the β-Gal activity. *, significantly different from untreated control cells ($P<0.05$). **, significantly different from CGS-treated cells ($P<0.05$)

Figure 3. $A_{2A}AR$ Activation stimulates ERα target gene expression. A) Semi-quantitative RT-PCR analysis of PR mRNA. MCF-7 cells were treated for 24 h with either E_2 (1 nM) or the selective $A_{2A}AR$ agonist CGS21680 (1 µM) in presence or absence of the PKA inhibitor H89 (10 µM). β-Actin mRNA levels were determined as an internal control. B) Expression of the luciferase reporter gene following 24 h treatment of pERE-tkLuc and pCMV-βGal co-transfected MCF-7 cells with the $A_{2A}AR$ agonist CGS21680 or E2, in presence or absence of ICI182,780 or H89. Luciferase reporter activity was normalized with the β-Gal activity and expressed as percentage of the control assumed as 100%. *, significantly different from untreated control cells ($P<0.05$). C) Cell proliferation analysis. MCF-7 cells were treated with CGS21680 ($A_{2A}AR$ agonist, 1 µM), E_2 (1 nM), or ethanol (control, 0.1%). Results are

expressed in arbitrary units. The mean of 3 different experiments is shown without standard error of the mean for a better observation of the different points.

Figure 4. $A_{2A}AR$ mediates ethanol-induced activation of ER signalling pathway. A) Semi-quantitative RT-PCR analysis of PR mRNA. MCF-7 cells were treated for 24 h with ethanol (0.3%) and a selective $A_{2A}AR$ antagonist, MSX-3 (MSX) (10 and 30 μM). β-Actin mRNA levels were determined as an internal control. B) The histogram represents the mean ± S.E. of four separate RT-PCR experiments in which the band intensities of PR were evaluated in terms of optical density arbitrary units and normalized with the β-actin signal intensity. *, Significantly different from untreated control ($P < 0.05$). C) MCF-7 cells were cotransfected with pEREtkLuc and pCMV-βGal. The cells were treated for 24 h with ethanol (0.3%) in the presence or absence of MSX-3. Luciferase reporter activity was normalized with the β-Gal activity and expressed as percentage of the control assumed as 100%. In each experiment, the activities of transfected plasmids were assayed in triplicate transfections. *, Significantly different from untreated control ($P < 0.05$).

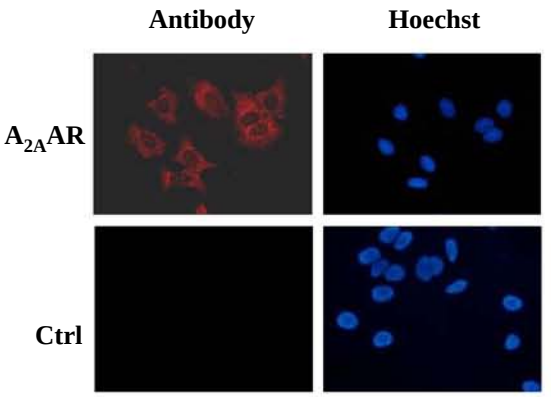
A



B

Figure 1

A


Antibody
Hoechst
A2AAR
Ctrl

B

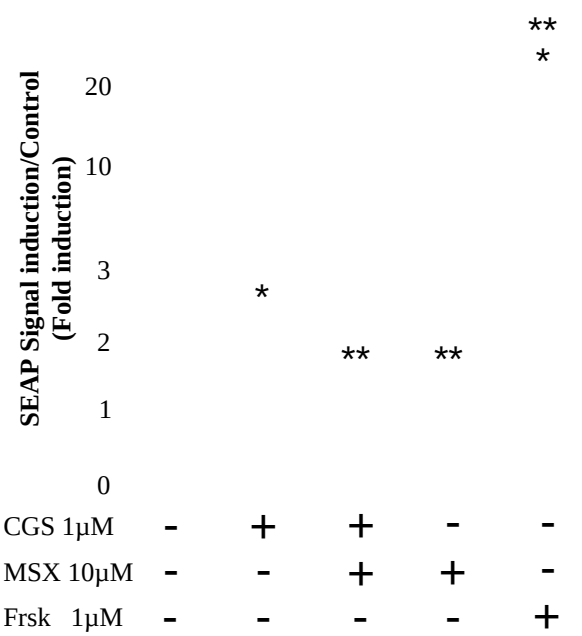

SEAP Signal induction/Control
(Fold induction)
20
10
3
2
1
0
*
**
**
**
*
CGS 1μM - + + - -
MSX 10μM - - + + -
Frsk 1μM - - - - +

Figure 2

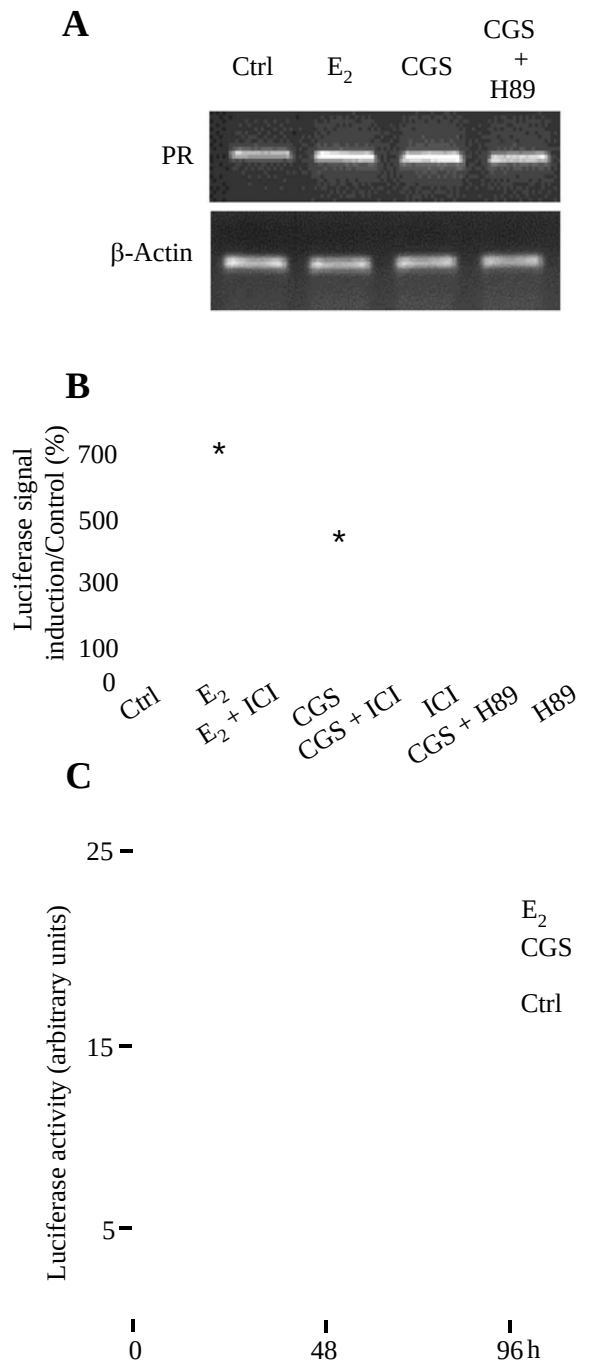
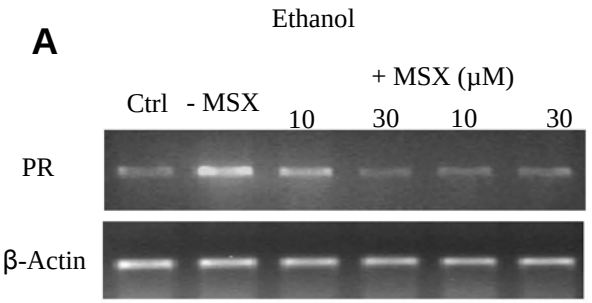
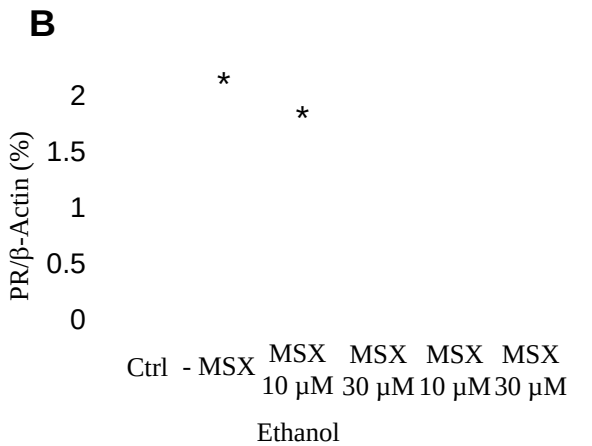

A
Ctrl
E2
CGS
CGS + H89
PR
β-Actin
B
Luciferase signal induction/Control (%)
700
500
300
100
0
*
*
Ctrl
E2
E2 + ICI
CGS
CGS + ICI
ICI
CGS + H89
H89
C
Luciferase activity (arbitrary units)
25
15
5
E2
CGS
Ctrl
0
48
96 h

FIGURE 3


A
Ethanol
+ MSX (μM)
Ctrl
- MSX
10
30
10
30
PR
β-Actin


B
PR/β-Actin (%)
2
1.5
1
0.5
0
*
*
Ctrl
- MSX
MSX 10 μM
MSX 30 μM
MSX 10 μM
MSX 30 μM
Ethanol

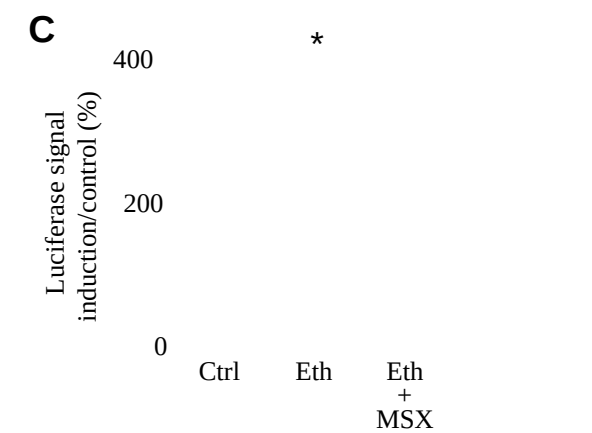

C
Luciferase signal induction/control (%)
400
200
0
*
Ctrl
Eth
Eth + MSX

FIGURE 4

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abe, A., Kiriyama, Y., Hirano, M., Miura, T., Kamiya, H., Harashima, H., and Tokumitsu, Y. 2002. Troglitazone suppresses cell growth of KU812 cells independently of PPARgamma.*Eur J Pharmacol*. 436:7-13.

Altiok, S., Oppenheim, H., Evans, RM., and Spiegelman, BM. 1997. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:237.

Andre,T., Chastre,E., Kotelevets,L., Vaillant,J.C., Louvet,C., Balosso,J., Le Gall,E., Prevot,S., and Gespach,C. 1998. Tumoral angiogenesis: physiopathology, prognostic value and therapeutic perspectives]. *Rev. Med. Interne*. 19:904-913.

Aronica,S.M., Kraus,W.L., and Katzenellenbogen,B.S. 1994. Estrogen action via the cAMP signaling pathway:stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:8517-8521.

Ascenzi, P., Bocedi, A., and Marino, M. 2006. Structure-function relationship of estrogen receptor a and b : Impact on human health. *Mol Aspects Med*. 27 : 299-402.

Attaix, D., Combaret, L., Pouch, MN., and Taillandier, D. 2001. Regulation of proteolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 4:45-9.

Auwerx, J. 1999. PPARgamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia*. 42:1033-49.

Auwerx, J. 1996. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO*. 15:5336-48.

Badawi, AF., and Badr, MZ. 2003. Expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor –gamma and levels of prostaglandin E2 and 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J2 in human breast cancer and metastasis. *Int J Cancer*. 103:84-90.

Baek, SJ., Wilson, LC., His, LC., and Eling, TE. 2003. Troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)ligand, selectively induces the early growth response-1 gene independently of PPAR gamma. A novel mechanism for its anti-tumorigenic activity. *J Biol Chem*. 278:5845-53.

Balfe,P.J., McCann,A.H., Welch,H.M., and Kerin,M.J. 2004. Estrogen receptor beta and breast cancer. *Eur. J. Surg.Oncol.* 30:1043-1050.

Barak, Y., Nelson, MC., Ong, ES., Jones, YZ, Ruiz-lozano, P., Chien, KR., Koder, A., and Evans RM. 1999. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*. 4:585-95.

Behrens, D., Gill, JH., and Fichtner, I. 2007. Loss of tumourigenicity of stably ERbeta-transfected MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*. 274: 19-29.

Benghiat,A., Cassidy,S.A., Davidson,H.E., Mancero,F.S., Pickard,J.G., and Tyrrell,C.J. 1986. Megestrol acetate in the treatment of advanced post-menopausal breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 12:43-45.

Berry, NB., Fan, M., and Nephew, KP. 2008. Estrogen receptor-alpha hinge-region lysine 302 and 303 regulate receptor degradation by the proteasome. *Mol Endocrinol*. 22:1535-51.

Bjornstrom,L., and Sjoberg,M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and non genomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol*. 19:833-842.

Blanquart, C., Barbier, O., Fruchart, JC., Staels, B., and Glineur, C. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptors : regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. J *Steroid Biochem Mol Biol*. 85: 267-73.

Boccara, F., and Cohen, A. 2004. Interplay of diabetes and coronary heart disease on cardiovascular mortality. *Heart*. 90:1371-3.

Boudreau,N., and Myers,C. 2003. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res.* 5:140-146.

Brain,E.G., Misset,J.L., and Rouess,J. 1999. Primary chemotherapy or hormonotherapy for patients with breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 25:187-197.

Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauça, M,. and Wahli, W. 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. 137: 354-66.

Brennan,M., Wilcken,N., French,J., Ung,O., and Boyages,J. 2005. Management of early breast cancer--the current approach. *Aust. Fam. Physician* 34:755-760.

Bundred,N.J. 2001. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 27:137-142.

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.

Burstein, HJ., Demetri, GD., Mueller, E., Sarraf, P., Spiegelman, BM., and Winer, EP. 2003. Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. Breast Cancer Res Treat. 79:391-7.

Camp, HS., Li, O., Wise, SC., Hong, YH., Frankowski, CL., Shen, X., Vanbogelen, R., and Leff, T. 2000. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by troglitazone and rosiglitazone. *Diabetes*. 49: 539-47.

Campagnoli,C., Abba,C., Ambroggio,S., and Peris,C. 2005. Pregnancy, progesterone and progestins in relation to breast cancer risk. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97:441-450.

Cantello, BC., Cawthorne, MA., Cottam, GP., Duff, PT., Haigh, D., Hindley, RM., Lister, CA., Smith, SA., and Thurlby, PL. 1994. [[omega-(Heterocyclylamino)alkoxy]benzyl]-2,4-thiazolidinediones as potent antihyperglycemic agents. *J Med Chem*. 37:3977-85.

Carmichael,A.R., and Bates,T. 2004. Obesity and breast cancer: a review of the literature. *Breast* 13:85-92.

Carmona, MC., Louche, K., Lefebvre, B., Pilon, A., Hennuyer, N., Audinot-Bouchez, V., Fievet, C., Torpier, G., Formstecher, P., Renard, P., Lefebvre, P., Dacquet, C., Staels, B., Casteilla, L., and Pénicaud, L; Consortium of the French Ministry of Research and Technology. S 26948: a new specific peroxisome proliferator activated receptor gamma modulator with potent antidiabetes and antiatherogenic effects. *Diabetes*. 56:2797-808.

Castro-Rivera, E., Samudio, I., and Safe, S. 2001. Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. *J Biol Chem*. 276:30853-61.

Chaiken, RL., Eckert-Norton, M., Pasmantier, R., Boden, G., Ryan, I., Gelfand, RA., and Lebovitz, HE. 1995. Metabolic effects of darglitazone, an insulin sensitizer, in NIDDM subjects. *Diabetologia*.38:1307-12.

Chang, EC., Frasor, J., Komm, B., and Katzenellenbogen, BS. 2006. Impact of Estrogen Receptor Beta on Gene Networks Regulated by Estrogen Receptor Alpha in Breast Cancer Cells**.** *Endocrinology.*147:4831-42.

Chen, Y., Jimenez, AR., and Medh, JD. 2006. Identification and regulation of novel PPAR-gamma splice variants in human THP-1 macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1759: 32-43.

Chow,L.W., Loo,W.T., and Toi,M. 2005. Current directions for COX-2 inhibition in breast cancer. *Biomed.Pharmacother.* 59 Suppl 2:S281-S284.

Cianfrocca,M., and Goldstein,L.J. 2004. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist.*9:606-616.

Ciaraldi, T., and Henry, RR. 1997. Thiazolidinediones and their effects on glucose transporters. *Eur J Endocrinol*. 137: 610-2.

Clay, CE., Atsumi, GI., High, KP., and Chilton, FH.2001. Early de novo gene expression is required for 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis in breast cancer cells. *J Biol Chem*.276:47131-5.

Clay, CE., Monjazeb, A., Thorburn, J., Chilton, FH., and High, KP.2002.15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis does not require PPARgamma in breast cancer cells. *J Lipid Res*. 43:1818-28.

Clay, CE., Namen, AM., Atsumi, G., Willingham, MC., High, KP., Kute, TE., Trimboli, AJ., Fonteh, AN., Dawson, PA., and Chilton, FH. 1999. Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 20:1905-11.

Clemons,M., Danson,S., and Howell,A. 2002. Tamoxifen ("Nolvadex"): a review. *Cancer Treat. Rev.* 28:165-180.

Cowin,P., Rowlands,T.M., and Hatsell,S.J. 2005. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.*17:499-508.

Coyle,Y.M. 2004. The effect of environment on breast cancer risk. *Breast Cancer Res. Treat.* 84:273-288.

Daly,P.A. 2005. Genetic counselling in breast and colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 16 Suppl 2:ii163-ii169.

Demetri, GD., Fletcher, CD., Mueller, E., Sarraf, P., Naujoks, R., Campbell, N., Spiegelman, BM., and Singer, S. 1999. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:3951-6.

Denger,S., Reid,G., Brand,H., Kos,M., and Gannon,F. 2001. Tissue-specific expression of human ERalpha and ERbeta in the male. *Mol. Cell Endocrinol.* 178:155-160.

Deroo,B.J., and Korach,K.S. 2006. Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest* 116:561-570.

Desvergne, B., and Wahli, W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 20: 649-88.

Diradourian, C., Girard, J., and Pégorier, JP. 2005. Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie*. 87:33-8. Review.

Donegan,W.L. 1997. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J. Clin.* 47:28-51.

Dowell, P., Ishmael, JE., Avram, D., Peterson, VJ., Nevrivy, DJ., and Leid M. 1999. Identification of nuclear receptor corepressor as peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein. *J Biol Chem*. 274: 15901-7.

Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G., Wahli, W. 1992. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 68: 879-87.

Driggers,P.H., and Segars,J.H. 2002. Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. *Trends Endocrinol. Metab* 13:422-427.

Duan, SZ., Ivashchenko, CY., Usher, MG., and Mortensen, RM. 2008. PPAR-gamma in the Cardiovascular System. *Res*. 2008:745804.

Dudek, P., and Picard, D. 2008. Genomics of signaling crosstalk of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *PLos. ONE.* 3:e1859.

Duffy,M.J., Maguire,T.M., Hill,A., McDermott,E., and O'Higgins,N. 2000. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.* 2:252-257.

Dumitrescu,R.G., and Cotarla,I. 2005. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J. Cell Mol.Med.* 9:208-221.

Dumont, JA., Bitonti, AJ., Wallace, CD., Baumann, RJ., Cashman, EA., and Cross-Doersen, DE. 1996. Progression of MCF-7 breast cancer cells to antiestrogen-resistant phenotype is accompanied by elevated levels of AP-1 DNA binding activity. *Cell Growth Differ*. 7:351-9.

Dynan, WS., and Tijan, R. 1983. The promoter specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell.* 35:79-87.

Eakin, CM., MacCoss, MJ., Finney, GL., and Klevit RE. 2007. Estrogen receptor a is a putative substrat for the BRCA1 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:5794-5799.

Edwards,D.P. 2000. The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 5:307-324.

Elstner, E., Müller, C., Koshizuka, K., Williamson, EA., Park, D., Asou, H., Shintaku, P., Said, JW., Heber, D., and Koeffler, HP. 1998. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of juman breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:8806-11.

El-Tanani, KKM., and Green, CD. 1997. Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. *Mol Endocr.* 11:928-937.

Engel, LW., Young, NA., Tralka, TS., Lippman, ME., O'Brien, SJ, and Joyce, MJ. 1978. Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res*. 38:3352-64.

Escher, P., and Wahli, W. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors:insight into multiple cellular functions. *Mutat Res*. 448:121-38.

Etique, N., Flament, S., Lecomte, J., and Grillier-Vuissoz, I. 2007. Ethanol-induced ligand-independent activation of ERα mediated by cyclic AMP/PKA pathway: an in vitro study on MCF-7 breast cancer cells. *Int J Oncol* 31: 1509-1518.

Etique,N., Chardard,D., Chesnel,A., Merlin,J.L., Flament,S., and Grillier-Vuissoz,I. 2004. Ethanol stimulates proliferation, ERalpha and aromatase expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 13:149-155.

Fajas, L., Auboeuf, D., Raspé, E., Schoonjans, K., Lefebvre, AM., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, JC., Deeb, S. Vidal-Puig, A., Flier, J., Briggs, MR., Staels, B., Vidal, H., and Auwerx, J.1997. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*. 272:18779-89.

Feigelson,H.S., and Henderson,B.E. 1996. Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis* 17:2279-2284.

Fenner, MH., and Elstner, E. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands for the treatment of breast cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 14:557-68.

Flouriot,G., Griffin,C., Kenealy,M., Sonntag-Buck,V., and Gannon,F. 1998. Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor-alpha gene are generated by alternative splicing and promoter usage. *Mol. Endocrinol.* 12:1939-1954.

Forman, BM., Tontonoz, P., Chen, J., Brun., RP., Spiegelman, BM., and Evans, RM. 1995. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*. 83:803-12.

Fournier,A., Berrino,F., Riboli,E., Avenel,V., and Clavel-Chapelon,F. 2005. Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. *Int. J. Cancer* 114:448-454.

Fox, EM., Andrade, J., and Shupnik, MA. 2008. Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids.* Sous presse.

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

Fredholm,BB., Ijzerman, AP., Jacobson, KA., Klotz, KN., and Linden, J.2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53: 527-552.

Fujimura, T., Kimura, C., Oe, T., Takata, Y., Sakuma, H., Aramori, I., and Mutoh, S. 2006. A selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator with distinct fat cell regulation properties. *J Pharmacol Exp Ther*. 318:863-71.

Fujita, T., Sugiyama, Y., Taketomi, S., Sohda, T., Kawamatsu, Y., Iwatsuka, H., and Suzuki, Z. 1983. Reduction of insulin insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, ciglitazone), a new antidiabetic agent. *Diabetes*. 32:804-10.

Fujiwara, T., Yoshioka, S., Yoshioka, U., Ushiyama, I., and Horikoshi, H. 1988. Characterization of new oral antidiabetic agent CS-045. Studies in KK and ob/ob mice and Zucker fatty rats. *Diabetes*. 37:1549-58.

Gampe, RT Jr., Montana, VG., Lambert, MH., Miller, AB., Bledsoe, RK., Milburn, MV., Kliewer, SA., Willson, TM., and Xu, HE. 2000. Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol Cell.* 5:545-55.

Gelman, L., Feige, JN., and Desvergne, B. 2007. Molecular basis of selective PPARgamma modulation for the treatment of Type 2 diabetes. Biochim Biophys Acta. 1771:1094-107.

Ginestier, C., Korkava, H., Dontu, G., Birnbaum, D., Wicha, MS., and Charafe-Jauffret, E. The cancer stem cell: the breast cancer driver. Med Sci. 23:1133-9.

Girdler,F., and Brotherick,I. 2000. The oestrogen receptors (ER alpha and ER beta) and their role in breast cancer: a review. *Breast* 9:194-200.

Gizard, F., and Bruemmer, D. 2008. Transcriptional Control of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma: Therapeutic Implications for Cardiovascular Diseases. *PPAR Res*.2008:429123.

Grandien,K., Backdahl,M., Ljunggren,O., Gustafsson,J.A., and Berkenstam,A. 1995. Estrogen target tissue determines alternative promoter utilization of the human estrogen receptor gene in osteoblasts and tumor cell lines. *Endocrinology* 136:2223-2229.

Greene, ME., Blumberg, B., McBride, OW., Yi, HF., Kronquist, K., Kwan, K., Hsieh, L., Greene, G., and Nimer, SD. 1995. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. (4-5):281-99.

Grommes, C., Landreth, GE., and Heneka, MT. 2004. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol*. 5:419-29.

Gruber,C.J., Gruber,D.M., Gruber,I.M., Wieser,F., and Huber,J.C. 2004. Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol. Metab* 15:73-78.

Guan, HP., Ishizuka, T., Chui, PC., Lehrke, M., and Lazar, MA. 2005. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev*. 19:453-61.

Guinebretiere,J.M. 2005. [Angiogenesis and breast neoplasms. The pathologist's point of view]. *Gynecol. Obstet.Fertil*. 33:140-146.

Hanahan,D., and Weinberg,R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.

Harrington, WW., S Britt, G., Wilson, J., O Milliken, N., G Binz, J., C Lobe, D., R Oliver, W., C Lewis, M., and M Ignar, D. 2007. The effect of PPARalpha, PPARdelta, PPARgamma, and PPARpan Agonists on Body Weight, Body Mass, and Serum Lipid Profiles in Diet-Induced Obese AKR/J Mice. *PPAR Res*. 2007:97125.

Hartman, J., Lindberg, K., Morani, A., Inzunza, J., Ström, A., and Gustafsson, JA. 2006. Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. *Cancer Res*. 66: 11207-13.

Hayashi,S.I., Eguchi,H., Tanimoto,K., Yoshida,T., Omoto,Y., Inoue,A., Yoshida,N., and Yamaguchi,Y. 2003. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocr. Relat Cancer* 10:193-202.

Heimann,R., and Hellman,S. 2000. Individual characterisation of the metastatic capacity of human breast carcinoma. *Eur. J. Cancer* 36:1631-1639.

Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Strön, A., Treuter, E., Warner, M., and Gustafsson, JA. 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. 87:905-31.

Henderson,B.E., and Feigelson,H.S. 2000. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21:427-433.

Herynk,M.H., and Fuqua,S.A. 2004. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr. Rev.* 25:869-898.

Hill, C., and Doyon, F. 2008. The frequency of cancer in France: mortality trends since 1950 and summary of the report on the causes of cancer. *Bull Cancer*. 95: 5-10.

Hirata, S., Shoda, T., Kato, J., and Hoshi, K. 2001. The multiple untranslated first exons system of the human estrogen receptor beta (ER beta) gene. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 78:33-40.

Hong, WK., Lippman, SM., Itri, LM., Karp, DD., Lee, JS., Byers, RM., Schantz, SP., Kramer, AM., Lotan, R., Peters, LJ., and al. 1990. Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 323:795-801.

Horner-Glister, E., Maleki-Dizaji, M., Guerin, CJ., Johnson, SM., Styles, J., and White, IN. 2005. Influence of oestradiol and tamoxifen on oestrogen receptors-alpha and –beta protein degradation and non-genomic signalling pathways in uterine and breast carcinoma cells. *J Mol Endocrinol*. 35:421-32.

Houseknecht, KL., Cole, BM., and Steele, PJ. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) and its ligands: a review. *Domest Anim Endocrinol*. 22:1-23.

Houssami,N., Cuzick,J., and Dixon,J.M. 2006. The prevention, detection, and management of breast cancer. *Med. J.Aust.* 184:230-234.

Howell,A. 2005. The future of fulvestrant ("Faslodex"). *Cancer Treat. Rev.* 31 Suppl 2:S26-S33.

Howell,A., and Dowsett,M. 2004. Endocrinology and hormone therapy in breast cancer: aromatase inhibitors versus antioestrogens. *Breast Cancer Res.* 6:269-274.

Huang, JW., Shiau, CW., Yang, YT., Kulp, SK., Chen, KF., Brueggemeier, RW., Sharipo, CL., and Chen, CS. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent ablation of cyclin D1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells. *Mol Pharmacol*. 67:1342-8.

Ibrahimi, A., Teboul, L., Gaillard, D., Amri, EZ., Ailhaud, G., Young, P., Cawthorne, MA., and Grimaldi, PA. 1994. Evidence for a common mechanism of action for fatty acids and thiazolidinedione antidiabetic agents on gene expression in preadipose cells. *Mol Pharmacol*. 46:1070-6.

IJpenberg, A., Jeannin, E., Wahli, W., and Desvergne, B. 1997. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem.* 272:20108-17.

Issemann, I., and Green, S. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 347:645-50.

Iwase, H., Zhang, Z., Omoto, Y., Sugiura, H., Yamashita, H., Toyama, T., Iwata, H., and Kobayashi, S. 2003. Clinical significance of the expression of estrogen receptors alpha and beta for endocrine therapy of breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 52Suppl1:34-8.

Iwata, Y., Miyamoto, S., Takamura, M., Yanagisawa, H., and Kasuya, A. 2001. Interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its agonists: docking study of oximes having 5-benzyl-2,4-thiazolidinedione. *J Mol Graph Model.*19:598-600.

Jacobs, MN., Dickins, M., and Lewis, DFV. 2003. Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptor β (hERβ), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor α (hERα) crystal structure, and the human peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα) ligand binding domain from the human PPARγ crystal structure. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 84: 117-132.

Jacobsen, BM., Richer, JK., Schittone, SA., and Horwitz, KB. 2002. New human breast cancer cells to study progesterone receptor isoform ratio effects and ligand-independent gene regulation. *J Biol Chem*. 277:27793-800.

James, SY., Lin, F., Kolluri, SK., Dawson, MI., and Zhang, XK. 2003. Regulation of retinoic acid receptor beta expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands in cancer cells. *Cancer Res.* 63:3531.

Jensen, EV., and De Sombre, ER. 1969. Œstrogène-receptor interaction in target tissues. *Biochem J*. 115 : 28-0.
Johnson,K.C., Hu,J., and Mao,Y. 2000. Passive and active smoking and breast cancer risk in Canada, 1994-97. The Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. *Cancer Causes Control* 11:211-221.

Jones, PS., Savory, R., Barratt, P., Bell, AR., Gray, TJ., Jenkins, NA., Glibert, DJ., Copeland, NG., and Bell, DR. 1995.Chromosomal localisation, inducibility, tissue-specific expression and strain differences in three murine peroxisome-proliferator-activated-receptor genes. *Eur J Biochem*. 233:219-26.

Kato,S., Endoh,H., Masuhiro,Y., Kitamoto,T., Uchiyama,S., Sasaki,H., Masushige,S., Gotoh,Y., Nishida,E., Kawashima,H., Metzger,D., and Chambon,P. 1995. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270:1491-1494.

Kaufmann,M., Jonat,W., Kleeberg,U., Eiermann,W., Janicke,F., Hilfrich,J., Kreienberg,R., Albrecht,M., Weitzel,H.K., Schmid,H., and . 1989. Goserelin, a depot gonadotrophin-releasing hormone agonist in the treatment of premenopausal patients with metastatic breast cancer. German Zoladex Trial Group. *J. Clin.Oncol.* 7:1113-1119.

Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K., and Wahli, W. 1993. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:2160-4.

Kenny, FS., Hui, R., Musgrove, EA., Gee, JM., Blamey, RW., Nicholson, RI., Sutherland, RL., and Robertson, JF.1999.Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. Clin Cancer Res. 5:2069-76.

Key,T., Appleby,P., Barnes,I., and Reeves,G. 2002. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J. Natl. Cancer Inst.* 94:606-616.

Kim, HJ., Choi, WS., Lee, Jaewon., Han, JY., and Kim, HS. 2008. Differential effects of histone deacetylase inhibitors on cell cycle regulation and apoptosis in human prostate cancer cells.*JTEP*. 1:27-36.

Kim, HJ., Kim, JY., Meng, Z., Wang, LH., Liu, F., Conrads, TP., Burke, TR., Veenstra, TD., and Farrar, WL. 2007. 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits transcriptional activity of estrogen receptor-alpha via covalent modification of DNA-binding domain.Cancer Res. 67:2595-602.

Kim, KY., Kim, SS., and Cheon, HG. 2006. Differential anti-proliferative actions of peroxisome proliferator-activated receptor-γ in MCF-7 breast cancer cells. Biochem Pharmacol. 72: 530-40.

Kim,K.J., Li,B., Winer,J., Armanini,M., Gillett,N., Phillips,H.S., and Ferrara,N. 1993. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362:841-844.

Kleuser, B., Malek, D., Gust, R., Pertz, HH., and Potteck, H. 2008.17-Beta-estradiol inhibits transforming growth factor-beta signaling and function in breast cancer cells via activation of extracellular signal-regulated kinase through the g protein-coupled receptor 30. *Mol Pharmacol*. 74:1533-43.

Kliewer, SA., Lenhard, JM., Willson, TM., Patel, I., Morris, DC., and Lehmann, JM. 1995. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*. 83:813-9.

Kliewer, SA., Sundseth, SS., Jones, SA., Brown, PJ., Wisely, GB., Koble, CS., Devchand, P., Wahli, W., Willson, TM., Lenhard, JM., and Lehmann, JM. 1997. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma*. Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 4318-23.

Kliewer, SA., Umesono, K., Mangelsdorf, DJ., and Evans, RM. 1992. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature*. 355: 446-9.

Koeffler, HP. 2003. Peroxisome proliferator –activated receptor gamma and cancers*. Clin Cancer Res*. 9:1-9.

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

Krey, G., Keller, H., Mahfoudi, A., Medin, J., Ozato, K., Dreyer, C., and Wahli, W. 1993. Xenopus peroxisome proliferator activated receptors: genomic organization, response element recognition, heterodimer formation with retinoid X receptor and activation by fatty acids. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 47:65-73.

Kuiper, GG., Enmark, E., Pelto-Huikk, M., Nilsson, S., and Gustafsson, JA. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:5925-30.

Kulkarni, S., Patil, DB., Diaz, LK., Wiley, EL., Morrow, M., and Khan, SA. 2008. COX-2 and PPARgamma expression are potential markers of recurrence risk in mammary duct carcinoma in –situ. *BMC Cancer*. 8:36.

Kushner,P.J., Agard,D.A., Greene,G.L., Scanlan,T.S., Shiau,A.K., Uht,R.M., and Webb,P. 2000. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74:311-317.

Laganière, J., and Giguère, V. 2006. Decoding the mode of action of the estrogen through functional genomics. *Bull Cancer*. 93:883-7.

Lamote,I., Meyer,E., Massart-Leen,A.M., and Burvenich,C. 2004. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids* 69:145-159.

Lapillonne, H., Konopleva, M., Tsao, T., Gold, D., McQueen, T., Sutherland, RL., Madden, T., and Andreeff, M. 2003. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by a novel synthetic triterpenoid 2 cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res*. 63:5926-39.

Lascombe,I., Beffa,D., Ruegg,U., Tarradellas,J., and Wahli,W. 2000. Estrogenic activity assessment of environmental chemicals using in vitro assays: identification of two new estrogenic compounds. *Environ.Health Perspect.* 108:621-629.

Lavinsky, RM., Jepsen, K., Heinzel, T., Torchia, J., Mullen, TM., Schiff, R., Del-Rio, AL., Ricote, M., Ngo, S., Gemsch, J., Hilsenbeck, SG., Osborne, CK., Glass, CK., Rosenfeld, MG., and Rose, DW.1998. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 2920-5.

Le Goff,P., Montano,M.M., Schodin,D.J., and Katzenellenbogen,B.S. 1994. Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 269:4458-4466.

Lea, MA., Sura, M., and Desbordes, C. 2004. Inhibition of cell proliferation by potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonists and antagonists. *Anticancer Res*. 24:2765-71.

Lee, G., Elwood, F., McNally, J., Weiszmamm, J., Lindstrom, M., Amaral, K., Nakamura, M., Miao, S., Cao, P., Learned, RM., Chen, JL., and LI, Y. 2002. T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J Biol Chem*. 277:19649-57.

Lee, WL., Cheng, MH., Chao, HT., and Wang, PH. 2008. The role of selective estrogen receptor modulators on breast cancer : from tamoxifen to raloxifene. Taiwan J Obstet Gynecol. 47: 24-31.

Leesnitzer, LM., Parks, DJ., Bledsoe, RK., Cobb, JE., Collins, JL., Consler, TG., Davis, RG., Hull-Ryde, EA., Lenhard, JM., Patel, L., Plunket, KD., Shenk, JL., Stimmel, JB., Therapontos, C., Willson, TM., and Blanchard, SG. 2002. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry*. 41:6640-50.

Lehmann, JM., Lenhard, JM., Oliver, BB., Ringold, GM., and Kliewer, SA.1997.Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*. 272:3406-10.

Lehmann, JM., Moore, LB., Smith-Oliver, TA., Wilkison, WO., Willson, TM., and Kliewer, SA. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*. 270:12953-6.

Liao, W., Nguyen, MT., Yoshizaki, T., Favelyukis, S., Patsouris, D., Imamura, T., Verma, IM., and Olefsky, JM. 2007. Suppression of PPAR-gamma attenuates insulin-stimulated glucose uptake by affecting both GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 293: E219-27.

Lin, CY., Ström, A., Li Kong, S., Kietz, S., Thomsen, JS., Tee, JB., Vega, VB., Miller, LD., Smeds, J., Bergh, J., Gustafsson, JA. and Liu, ET. 2007. Inhibitory effects of estrogen receptor beta on specific hormone-responsive gene expression and association with disease outcome in primary breast cancer. *Breast Cancer Res*.9:R25.

Lin, CY., Ström, A., Vega, VB., Kong, SL., Yeo, AL., Thomsen, JS., Chan, WC., Doray, B., Bangarusamy, DK., Ramasamy, A., Vergara, LA., Tang, S., Chong, A., Bajic, VB., Miller, LD., Gustafsson, JA., and Liu, ET. 2004. Discovery of estrogen receptor alpha target genes and response element in breast tumor cells. *Genome Biol.* 5:R66.

Lippman, SM., Parkinson, DR., Itri, LM., Weber, RS., Schantz, SP., Ota, DM., Schusterman, MA., Krakoff, IH., Gutterman, JU., and Hong, WK. 1992. 13-cis-retinoic acid and interferon alpha-2a: effective combination therapy for advanced squamous cell carcinoma of the skin. *J Natl Cancer Inst*. 84:235-41.

Liu, H., Zang, C., Fenner, MH., Possinger, K., and Elstner, E. 2003. PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro. *Breast Cancer Res Treat*. 79:63-74.

Liu, J., Liu, YG., Huang, R., Yao, C., Li, S., Yang, W., Yang, D., and Huang, RP. 2007. Concurrent down-regulation of Egr-1 and gelsolin in the majority of human breast cancer cells. *Cancer Genomics Proteomics*.4:377-85.

Lu, M., Kwan, T., Yu, C., Chen, F., Freedman, B., Schafer, JM., Lee, EJ., Jameson, JL., Jordan, VC., and Cryns, VL. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists promote TRAIL-induced

apoptosis by reducing survivin levels via cyclin D3 repression and cell cycle arrest. *J Biol Chem*. 280:6742-51.

Lucchi-Angellier,E. 2001. [Hormone therapy and breast cancer: a review]. *Rev. Med. Interne* 22:1213-1224.

Luo,J., and Miller,M.W. 2000. Ethanol enhances erbB-mediated migration of human breast cancer cells in culture. *Breast Cancer Res. Treat.* 63:61-69.

MacGregor, JI., and Jordan, VC. 1998. Basic guide to the mechanisms of antioestrogen action. *Pharmacol. Rev*. 50:151-96.

Magenta, G., Borenstein, X., Rolando, R., and Jasnis, MA. 2008. Rosiglitazone inhibits metastasis development of a murine mammary tumor cell line LMM3. *BMC Cancer*. 8:47.

Maggiolini, M., Vivacqua, A., Fasanella, G., Grazia Recchia, A., Sisci, D., Pezzi, V., Montanaro, D., Musti, AM., Picard, D., and Andos, S. 2004. The G Protein –coupled Receptor GPR30 mediates *c-fos* up-regulation by 17b-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 279:27008-27016.

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

Maruti, SS., Willet, WC., Feskanich, D., Rosner, B., Colditz GA. 2008. A prospective study of age-specific physical activity and premenopausal breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 100: 728-37.

Matthews, J., and Gustafsson, J.A. 2003. Estrogen signalling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*. 3: 281-92.

Matthews, J., Wihlén, B., Tujague, M., Wan, J., Ström, A., and Gustafsson, JA. 2006. Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha-mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters. *Mol Endocrinol*. 20: 534-43.

McIntosh, GG., Anderson, JJ., Milton, I., Steward, M., Parr, AH., Thomas, MD., Henry, JA., Angus, B., Lennard, TW., and Horne CH.1995.Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer. *Oncogene*.11:885-91.

Meng,Q., Gao,B., Goldberg,I.D., Rosen,E.M., and Fan,S. 2000. Stimulation of cell invasion and migration by alcohol in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273:448-453.

Mertens-Talcott, SU., Chintharlapalli, S., Li, X., and Safe, S. 2007. The oncogenic microRNA-27a target genes that regulate specific protein (Sp) transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Research*. 67:11001:11011.

Michalik, L., and Whali, W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol*. 10:564-70.

Miller,K.D. 2002. Issues and challenges for antiangiogenic therapies. *Breast Cancer Res. Treat.* 75 Suppl 1:S45-S50.

Moore, JT., McKee, DD., Slentz-Kesler, K., Moore, LB., Jones, SA., Horne, EL., Su, JL., Kliewer, SA., Lehmann, JM., and Willson, TM. 1998. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*. 247:75-8.

Morabia,A., Bernstein,M., Heritier,S., and Khatchatrian,N. 1996. Relation of breast cancer with passive and active exposure to tobacco smoke. *Am. J. Epidemiol.* 143:918-928.

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

Motomura, W., Okumura, T., Takahashi, N., Obara, T., Kohgo, Y. 2000. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27KiP1 in human. Pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res*. 60:5558-64.

Mueller, E., Sarraf, P., Tontonoz, P., Evans, RM., Martin, KJ., Zhang, M., Fletcher, C., Singer, S., and Spiegelman, BM. 1998. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell*. 1:465-70.

Mujoomdar, M., Bennett, A., Hoskin, D., and Blay, J. 2004. Adenosine stimulation of proliferation of breast carcinoma cell lines: evaluation of the [3H]thymidine assay system and modulatory effects of the cellular microenvironment in vitro. *J Cell Physio.* 201: 429-438.

Myers, KA., Lambe, KG., Aldridge, TC., Macdonald, N., and Tugwood, JD. 1997. Amino acid residues in both the DNA-binding and ligand-binding domains influence transcriptional activity of the human peroxisome proliferator activated receptor alpha. *Biochem Biophys Res Commun*. 239:522-6.

Nagy, LE., Diamond, I., Casso, DJ., Franklin, C., and Gordon, AS. 1990. Ethanol increases extracellular adenosine by inhibiting adenosine uptake via the nucleoside transporter. *J Biol Chem* 265: 1946-1951.

Nicholson,R.I., Hutcheson,I.R., Britton,D., Knowlden,J.M., Jones,H.E., Harper,M.E., Hiscox,S.E., Barrow,D., and Gee,J.M. 2005. Growth factor signalling networks in breast cancer and resistance to endocrine agents: new therapeutic strategies. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 93:257-262.

Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, JA. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 81:1535-65.

Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., Muramatsu, M. 1998. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res*. 26:3505-12.

Olefsky, JM. 2000. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Clin Invest*. 106:467-72.

Omoto, Y., Inoue, S., Ogawa, S., Toyama, T., Yamashita, H., Muramatsu, M., Kobayashi, S., and Iwase, H. 2001. Clinical value of the wild-type estrogen receptor beta expression in breast cancer. *Cancer Lett.* 163: 207-12.

Orso,F., Cottone,E., Hasleton,M.D., Ibbitt,J.C., Sismondi,P., Hurst,H.C., and De Bortoli,M. 2004. Activator protein-2gamma (AP-2gamma) expression is specifically induced by oestrogens through binding of the oestrogen receptor to a canonical element within the 5'-untranslated region. *Biochem. J.* 377:429-438.

Osborne,C., Wilson,P., and Tripathy,D. 2004. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist.* 9:361-377.

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, GG., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, PJ., Scanlan, TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*. 277: 1508-10.

Palakurti, SS., Aktas, H., Grubissich, LM., Mortensen, RM., and Halperin, JA. 2001. Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res*. 61:6213-8.

Pandhare, J., Cooper, SK., and Phang, JM. 2006. Proline oxidase, a proapoptotic gene, is induced by troglitazone: evidence for both peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*.281:2044-52.

Parker, JC. 2002. Troglitazone: the discovery and development of a novel therapy for the treatment of Type 2 diabetes mellitus. *Adv Drug Deliv Rev*. 54:1173-97.

Paruthiyil, S., Parmar, H., Kerekatte, V., Cunha, GR., Firestone, GL., and Leitman, DC. 2004. Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res*. 64: 423-8.

Patel, L., Pass, I., Coxon, P., Downes, CP., Smith, SA., and Macphee, CH. 2001. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Curr Biol*. 11:764-8.

Perez-Ortiz, JM., Tranque, P., Vaquero, CF., Domingo, B., Molina, F., Calvo, S., Jordan, J., Cena, V., and Llopis, J. 2004. Glitazones differentially regulate primary astrocyte and glioma cell survival. Involvement of reactive oxygen species and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biol Chem*. 279:8976-85.

Pickart, CM. 2001. Mechanisms underlying ubiquination. *Annu Rev Biochem*. 70:503-33.

Pignatelli, M., Cortés-Canteli, M., Lai, C., Santos, A., Perez-Castillo, A. 2001. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma is an inhibitor of ErbBs activity in human breast cancer cells. *J Cell Sci*. 114:4117-26.

Pinzone, JJ., Stevenson, H., Strobl, JS., and Berg, PE. 2004. Molecular and cellular determinants of estrogen receptor alpha expression. *Mol Cell Biol*. 24: 4605-12.

Platet,N., Cathiard,A.M., Gleizes,M., and Garcia,M. 2004. Estrogens and their receptors in breast cancer progression:a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 51:55-67.

Polyak,K. 2001. On the birth of breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1552:1-13.

Posch, MG., Zang, C., Mueller, W., Lass, U., von Deimling, A., and Elstner, E. 2004. Somatic mutations in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma are events in human cancer cells. *Med Sci Monit*. 10: BR250-4.

Przylipiak,A., Rabe,T., Hafner,J., Przylipiak,M., and Runnebaum,R. 1996. Influence of ethanol on in vitro growth of human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Arch. Gynecol. Obstet.* 258:137-140.

Qiao, L., Dai, L., Gu, Q., Chan, KW., Ma, J., Lan, HY., Zou, B., Rocken, C., Ebert, MP., and Wong, BC. 2008. Loss of XIAP sensitizes colon cancer cells to PPAR gamma independent antitumor effects of troglitazone and 15-PGJ2. *Cancer Lett*. 268:260-71.

Qin, C., Burghardt, R., Smith, R., Wormke, M., Stewart, J., and Safe, S. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-g agonists induce proteasome-dependant degradation of cyclin D1 and estrogen receptor a in MCF-7 breast cancer cells. Cancer Res. 63:958-64.

Razandi,M., Pedram,A., Merchenthaler,I., Greene,G.L., and Levin,E.R. 2004. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol. Endocrinol.* 18:2854-2865.

Reginato, MJ., Bailey, ST., Krakow, SL., Minami, C., Ishii, S., Tanaka, H., and Lazar, MA. J Biol Chem. A potent antidiabetic thiazolidinedione with unique peroxisome proliferator-activated receptor gamma-activating properties. *J Biol Chem*. 273:32679-84.

Ribieras,S., Tomasetto,C., and Rio,M.C. 1998. The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. *Biochim. Biophys. Acta* 1378:F61-F77.

Rochette-Egly., 2003. Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal*.15:355-66. Review.

Rody, A., Holtrich, U., Solbach, C., Kourtis, K., von Minckwitz, G., Engels, K., Kissler, S., Gätje, R., Karn, T., and Kaufmann, M. 2005. Methylation of estrogen receptor beta promoter correlates with loss of ER-beta expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions. *Endocr Relat Cancer*. 12:903-16.

Roger, P., Sahla, ME., Mäkelä, S., Gustafsson, JA., Baldet, P., and Rochefort, H. 2001. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. Cancer Res. 61: 2537-41.

Ronckers,C.M., Erdmann,C.A., and Land,C.E. 2005. Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res.* 7:21-32.

Rosen, ED., Sarraf, P., Troy, AE., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, DS., Spiegelman, BM., and Mortensen, RM. 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*. 4:611-7.

Ruggiero,R.J., and Likis,F.E. 2002. Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy.*J. Midwifery Womens Health* 47:130-138.

Russo,J., and Russo,I.H. 2004. Development of the human breast. *Maturitas* 49:2-15.

Saez, E., Rosenfeld, J., Livolsi, A., Olson, P., Lombardo, E., Nelson, M., Banavo, E., Cardiff, RD., Izpisua-Belmonte, JC., and Evans, RM. 2004. PPAR gamma siganling exacerbates mammary gland tumor development. *Genes Dev*. 18:528-40.

Safe, S., and Kim, K. 2008. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specific protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol*. 41:263-75.

Sakorafas,G.H., Krespis,E., and Pavlakis,G. 2002. Risk estimation for breast cancer development; a clinical perspective. *Surg. Oncol.* 10:183-192.

Schaefer, KL., Takahashi, H., Morales, VM., Harris, G., Barton, S., Osawa, E., Nakajima, A., and Saubermann, LJ. 2007. PPARgamma inhibitors reduce tubulin protein levels by a PPARgamma, PPARdelta and proteasome-independent mechanism, resulting in cell cycle arrest, apoptosis and reduced metastasis of colorectal carcinoma cells.*Int J Cancer*. 120:702-13.

Scheen, AJ. 2001. Hepatotoxicity with thiazolidinediones: is it a class effect. *Drug Saf.* 24:873-88.

Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, AM., Heyman, RA., Briggs, M, Deeb, S., Staels, B., and

Schreihofer,D.A., Resnick,E.M., Lin,V.Y., and Shupnik,M.A. 2001. Ligand-independent activation of pituitary ER: dependence on PKA-stimulated pathways. *Endocrinology* 142:3361-3368.

Seargent, JM., Yates, EA., and Gill, JH. 2004. GW9662, a potent antagonist of PPARgamma, inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone, independently of PPARgamma activation. *Br J Pharmacol*. 143: 933-7.

Shao, D., Rangwala, SM., Bailey, ST., Krakow, SL., Reginato, MJ., and Lazar, MA. 1998. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature*. 396:377-80.

Shaywitz,A.J., and Greenberg,M.E. 1999. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* 68:821-861.

Shearer, BG., and Billin, AN. 2007. The next generation of PPAR drugs: do we have the tools to finds them. *Biochim Biophys Acta*. 1771:1082-93.

Sher, T., Yi, HF., McBride, OW., and Gonzales, FJ. 1993. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functionall characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. 32:5598-604.

Shiau, CW., Yang, CC., Kulp, SK., Chen, KF., Chen, CS., Huang, JW., and Chen, CS. 2005. Thiazolidenediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma. *Cancer Res.* 65:1561-9.

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

Singh,R.R., and Kumar,R. 2005. Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis. *J. Cell Biochem.* 96:490-505.

Singletary,K.W., Frey,R.S., and Yan,W. 2001. Effect of ethanol on proliferation and estrogen receptor-alpha expression in human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 165:131-137.
Skliris, GP., Leygue, E., Watson, PH., Murphy, LC. 2008. Estrogen receptor alpha negative breast cancer patients: estrogen receptor beta as a therapeutic target. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 109: 1-10.

Skliris, GP., Munot, K., Bell, SM., Carder, PJ., Lane, S., Horgan, K., Lansdown, MR., Parkes, AT., Hanby, AM., Markham, AF., and Speirs, V. 2003. Reduced expression of estrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. *J Pathol*. 201:213-20.

Smith, CL., and O'Malley., BM. 2004. Coregulator function: a key to understanding tissue of selective receptor modulators. *Endocr Rev*. 25:45-71.

Sohda, T., Mizonu, K., Imamiya, E., Sugiyama, Y., Fujita, T., and Kawamatsu, Y. 1982. Studies on antidiabetic agents. II. Synthesis of synthesis of 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)-benzyl]thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878) and its derivatives. *Chem Pharm Bull.* 30:3580-600.

Sohda, T., Momose,Y., Meguro, K., Kawamatsu, Y., Sugiyama, Y., and Ikeda, H. 1990. Studies on antidiabetic agents. Synthesis and hypoglycemic activity of 5-[4-(pyridylalkoxy)benzyl]-2,4-thiazolidinediones. *Arzneimittelforschung*.40:37-42.

Sommer,S., and Fuqua,S.A. 2001. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 11:339-352.

Song, RX., and Santen, RJ. 2006. Membrane initiated signaling in breast cancer. *Biol Reprod*. 75:9-16.

Soto,A.M., Sonnenschein,C., Chung,K.L., Fernandez,M.F., Olea,N., and Serrano,F.O. 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* 103 Suppl 7:113-122.

Soule, HD., Vazguez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 51:1409-16.

Speirs, V., and Walker, RA. 2007. New perspectives into the biological and clinical relevance of oestrogen receptors in the human breast. *J Pathol*. 211:499-506.

Speirs, V. 2008. The evolving role of estrogen receptor beta in clinical breast cancer. Breast Cancer Res. 10:111.

Speirs, V., Green, AR., Hughes, TA., Ellis, IO., Saunders, PTK., and Shaaban, AM. 2008. Clinical importance of estrogen receptor β isoformes in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* (sous presse).

Spiegelman, BM. 1998. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. 47:507-14.

Stevenson, RW., Hutson, NJ., Krupp, MN., Volkmann, RA., Holland, GF., Eggler, JF., Clark, DA., McPherson, RK., Hall, KL., Danbury, BH., et al. 1990. Actions of novel antidiabetic agent englitazone in hyperglycemic hyperinsulinemic ob/ob mice. *Diabetes*. 39:1218-27.

Strickland, E., Hakala, K., Thomas, PJ., and DeMartino, GN. 2000. Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome. *J Biol Chem*. 25:5565-72.

Sugimura, A., Kiriyama, Y., Nochi, H., Tsuchiya, H., Tamoto, K., Sakurada, Y., Ui, M., and Tokumitsu, Y. 1999. Troglitazone suppresses cell growth of myeloid leukemia cell lines by induction of p21WAF1/CIP1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 261:833-7.

Suzuki, T., Hayashi, S., Miki, Y., Nakamura, Y., Moriya, T., Sugawara, A., Ishida, T., Ohuchi, N., and Sasana, H. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human breast carcinoma: a modulator of estrogenic actions. *Endocr Relat Cancer*. 13:233-50.

Tang,Z., Treilleux,I., and Brown,M. 1997. A transcriptional enhancer required for the differential expression of the human estrogen receptor in breast cancers. *Mol. Cell Biol.* 17:1274-1280.

Tanimoto,K., Eguchi,H., Yoshida,T., Hajiro-Nakanishi,K., and Hayashi,S. 1999. Regulation of estrogen receptor alpha gene mediated by promoter B responsible for its enhanced expressionin human breast cancer. *Nucleic Acids Res.* 27:903-909.

Tarrade, A., Schoonjans, K., Pavan, L., Auwerx, J., Rochette-Egly, C., Evain-Brion, D., and Fournier, T. 2001. PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab*. 86:5017-24.

Tateishi, Y., Kawabe, Y., Chiba, T., Murata, S., Ichikawa, K., Murayama, A., Tanaka, K., Baba, T., Kato, S., and Yanagisawa, J. 2004. Ligand-dependant switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO*. 23:4813-23.

Tateishi, Y., Sonoo, R., Sekiya, Y., Sunahara, N., Kawano, M., Wayama, M., Hirota, R., Kawabe, Y., Murayama, A., Kato, S., Kimura, K., and Yanagisawa, J. 2006. Turning off estrogen-receptor beta-mediated transcription requires estrogen-dependent receptor proteolysis. *Mol Cell Biol*. 26:7966-76.

Thrower, JS., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, CM. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO*. 19:94-102

Thygesen, LC., Morch, LS., Keiding, N., Johansen, C., and Gronbaek M. 2008. Use of baseline and uptade information on alcohol intake on risk for breast cancer: importance of latency. *Int J Epidemiol*. 37:669-77.

Tong, D., Schuster, E., Seifert, M., Czerwenka, K., Leodolte, S., Zeillinger, R. 2002. Expression of estrogen receptor beta isoforms in human breast cancer tissues and cell lines. Breast Cancer Res Treat. 71:249-55.

Tontonoz, P., Hu, E., Graves, RA., Budavari, AI., and Spiegelman, BM. 1994. mPPAR gamma 2 : tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*. 8:1224-34.

Tontonoz, P., Singer, S., Forman, BM., Sarraf, P., Fletcher, JA., Fletcher, CD., Brun, RP., Mueller, E., Tremblay, GB., Tremblay, A., Copeland, NG., Gilbert, DJ., Jenkins, NA., Labrie, F., and Giguère, V. 1997. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol.* 11:353-65.

Trétarre,B., Guizard,A.V., Fontaine,D. 2004. Cancer du sein chez la femme : incidence et mortalité, France 2000. *BEH*. 44:209-210.

Trosko,J.E. 2005. The role of stem cells and gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biomed. Pharmacother.* 59 Suppl 2:S326-S331.

Tugwood, JD., Issemann, I., Anderson, RG., Bundell, KR., McPheat, WL., and Green, S. 1992. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J*. 11:433-9.

Turner, BC., Zhang, J., Gumbs, AA., Maher, MG., Kaplan, L., Carter, D., Glazer, PM., Hurst, HC., Haffty, BG., and Williams, T. 1998. Expression of AP-2 transcription factors in human breast cancer correlates with the regulation of multiple growth factor signalling pathways. *Cancer Res*. 58:5466-72.

Turturro, F., Friday, E., Fowler, R., Surie, D., and Welbourne, T. 2004. Troglitazone acts on cellular pH and DNA synthesis through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent mechanism in breast cancer-derived cell lines. *Clin Cancer Res*. 10:7022-30.

Uchida, K., and Shibata, T. 2008. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2: an electrophilic trigger of cellular responses. *Chem Res Toxicol*.21:138-44.

Uppenberg, J., Svensson, C., Jaki, M., Bertilsson, G., Jendeberg, L., and Berkenstam, A. 1998. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma. *J Biol Chem*. 273:31108-12.

Upton, R., Widdowson, PS., Ishii, S., Tanaka, H., and Williams G. 1998. Improved metabolic status and insulin sensitivity in obese fatty (fa/fa) Zucker rats and Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats treated with the thiazolidinedione, MCC-555. *Br J Pharmacol*. 125:1708-14.

Usami, M., Mitsunaga, K. and Ohno, Y. 2002. Estrogen receptor binding assay of chemicals with a surface plasmon resonance biosensor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 81: 47-55.

Valley, CC., Métivier, R., Solodin, NM., Fowler, AM., Mashek, MT, Hill, L., and Alarid, ET. 2005. Differential regulation of estrogen –inducible proteolysis and transcription by the estrogen receptor a N terminus. *Mol Cell Biol*. 25:5417-5428.

Wang, C., Fu, C., D'Amico, M.; Albanese, C., Zhou, JN., Brownlee, M., Lisanti, MP., Chatterjee, VK., Lazar, MA., and Pestell, RG. 2001. Inhibition of cellular proliferation through IkappaB kinase-independent and peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of cyclin D1. *Molecular and Cellular Biology*. 21:3057-3070.

Wang, J., John, FM., Horn-Ross, PL., and Ingles, SA. 2008. Dietary fat, cooking fat, and breast cancer risk in a multiethnic population. *Nutr Cancer*. 60:492-504.

Wang, T., Xu, J., Yu, X., Yang, R., and Han ZC. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases.. *Crit Rev Oncol Hematol*. 58:1-14.

Wang, X., and Kilgore, MW. 2002. Signal cross-talk between estrogen receptor alpha and beta and the peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*.194:123-33.

Watkins, PB., and Withcomb, RW. 1998. Hepatic dysfunction associated with troglitazone. *NEngl J Med*. 338: 916-7.

Wazer,D.E., and Band,V. 1999. Molecular and anatomic considerations in the pathogenesis of breast cancer. *Radiat. Oncol. Investig.* 7:1-12.

Weng, JR., Chen, CY., Pinzone, JJ., Ringel, MD., and Chen CS. 2005. Beyond peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling: the multi-facets of the antitumor effect of thiazolidinediones. *Endocr Relat Cancer*. 13:401-13.

Willson, TM., Cobb, JE., Cowan, DJ., Wiethe, RW., Correa, ID., Prakash, SR., Beck, KD., Moore, LB., Kliewer, SA., and Lehmann, JM. 1996. The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J Med Chem*. 39:665-8.

Wittliff,J.L. 1984. Steroid-hormone receptors in breast cancer. *Cancer* 53:630-643.

Wright, HM., Clish, CB., Mikami, T., Hauser, S., Yanagi, K., Hiramatsu, R., Serhan, CN., and Spiegelman, BM. 2000. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 275:1873-7.

Wu, W., Koike, A., Takeshita, T., and Ohta, T. 2008. The ubiquitin E3-ligase activity of BRCA1 and its biological functions. *Cell Div*. 7: 3-1.

Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Murakami, K., Motojima, K., Komeda, K., Ide, T., Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Miki, H., Tsuchida, A., Akanuma, Y., Nagai, R., Kimura, S., and Kadawaki, T. 2001. The mechanism by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem*. 276:41245-54

Yang, Z., Bagheri-Yarmand, R., Balasenthil, S., Hortobagyi, G., Sahi, AA., Barnes, CJ., and Kumar, R. 2003. HER2 regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression and sensitivity of breast cancer cells to PPARgamma ligand therapy. *Clin Cancer Res*. 9:3198-203.

Yang, CC., Wang, YC., Wei, S., Lin, LF., Chen, CS., Lee, CC., Lin, CC., and Chen, CS. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent suppression of androgen receptor expression by troglitazone mechanism and pharmacologic exploitation. *Cancer Res*. 67:3229-38.

Yee, LD., Guo, Y., Bradbury, J., Suster, S., Clinton, SK., and Seewaldt, VL. 2003. The antiproliferative effects of PPARgamma ligands in normal human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res Treat*. 78:179-92.

Yee, LD., Williams, N., Wen, P., Young, DC., Lester, J., Johnson., MV., Farrar, WB., Walker, MJ., Povoski, SP., Suster, S., and Eng, C. 2007. Pilot study of rosiglitazone therapy in women with breast cancer: effects of short-term therapy on tumor tissue and serum markers. *Clin Cancer Res*.13:246-52.

Yi, X., Wei, W., Wang, SY., Du, ZY., Xu, YJ., and Yu, XD. 2008. Histone deacetylase inhibitor SAHA induces ERalpha degradation in breast cancer MCF-7 cells by CHIP-mediated ubiquitin pathway and inhibits survival signaling.*Biochem Pharmacol*. 75:1697-705.

Yin, F., Bruemmer, D., Blaschke, F., Hsueh, WA., Law, RE., and Herle, AJ.2004. Signaling pathways involved in induction of GADD45 gene expression and apoptosis by troglitazone in human MCF-7 breast carcinoma cells. *Oncogene*. 23:4614-23.

Yin, F., Wakino, S., Liu, Z., Kim, S., Hsueh, WA., Collins, AR., Van Herle, AJ., and Law, RE. 2001. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochem Biophys Res Commun*. 286:916-22.

Yirmiya,R., Ben-Eliyahu,S., Gale,R.P., Shavit,Y., Liebeskind,J.C., and Taylor,A.N. 1992. Ethanol increases tumor progression in rats: possible involvement of natural killer cells. *Brain Behav. Immun.* 6:74-86.

Yu, HN., Noh, EM., Lee, YR, Roh, SG., Song, EK., Han, MK., Lee, YC., Shim, IK., Lee, SJ., Jung, SH., Kim, JS., and Youn, HJ. 2008. Troglitazone enhances tamoxifen-induced growth inhibitory activity of MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 377:242-7.

Yu, C., Markan, K., Temple, KA., Deplewski, D., Brady, MJ., and Cohen, RN. 2005. The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*. 280: 13600-5.

Yue,W., Wang,J.P., Li,Y., Bocchinfuso,W.P., Korach,K.S., Devanesan,P.D., Rogan,E., Cavalieri,E., and Santen,R.J. 2005. Tamoxifen versus aromatase inhibitors for breast cancer prevention. *Clin. Cancer Res.* 11:925s-930s.

Zhang,Q.X., Hilsenbeck,S.G., Fuqua,S.A., and Borg,A. 1996. Multiple splicing variants of the estrogen receptor are present in individual human breast tumors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 59:251-260.

Zhao, C., Dahlman-Wright, K., and Gustafsson, JA. 2008. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal*. 1;6e003. Review.

Zhou, J., Wilson, KM., and Medh, JD.2002.Genetic analysis of four novel peroxisome proliferator activated receptor-gamma splice variants in monkey macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 293:274-83.

Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, JR., Chen, XN., Noya, D., Rao, MS., and Reddy, JK. 1995. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92 :7921-5.

Résumé

Le récepteur alpha des œstrogènes (ERα) est une cible privilégiée dans le traitement du cancer du sein. En effet, 70% des tumeurs sont hormono-dépendantes, c'est-à-dire qu'elles expriment ERα et que les œstrogènes contrôlent leur prolifération. Par ailleurs, les agonistes du récepteur nucléaire « Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma » (PPARγ) inhibent la prolifération des cellules cancéreuses mammaires *in vivo* et *in vitro*. L'objectif de la thèse visait à déterminer si ces composés, en particulier ceux de la famille des thiazolidinediones, interféraient avec la voie de signalisation des œstrogènes. Les travaux ont porté sur 2 lignées cancéreuses mammaires hormono-dépendantes : MCF-7 et ZR-75-1. La troglitazone (TGZ), la ciglitazone et la 15déoxy-Prostaglandine J_2 (15d-PGJ_2) altèrent la signalisation œstrogénique en induisant la dégradation de ERα. Cette protéolyse fait appel au protéasome 26S et elle est plus accentuée pour la lignée ZR-75-1. Les composés qui altèrent la signalisation œstrogénique inhibent aussi fortement la prolifération cellulaire.

La dégradation de ERα ne semble pas dépendre de l'activation des ligands de PPARγ puisqu'un agoniste puissant comme la rosiglitazone n'induit pas cet effet. L'utilisation d'antagonistes de PPARγ, de la Δ2-TGZ, dérivé de la troglitazone qui n'active pas PPARγ ainsi qu'une approche par interférence ARN ont permis de démontrer que la protéolyse de ERα est bien liée à mécanisme indépendant de PPARγ.

La littérature indiquait que la 15d-PGJ_2 se liait de façon covalente à ERα mais pas à l'isoforme ERβ. Nous avons observé que la 15d-PGJ_2 n'induisait pas la protéolyse de ERβ. Une dégradation différentielle a aussi été observée avec les thiazolidinediones. En outre, l'activité transcriptionnelle de ERα est affectée précocement après l'exposition des cellules aux différents ligands, suggérant une modification du récepteur. Afin de savoir si une liaison covalente pouvait être à l'origine de la protéolyse, un groupement biotine a été greffé sur la Δ2-TGZ afin de réaliser des expériences de pull-down. Ce composé n'a pas permis de démontrer l'hypothèse mais cette molécule induit plus efficacement que la molécule d'origine la protéolyse non seulement de ERα mais aussi de la cycline D1. Des modifications des ligands de PPARγ pourraient donc avantageusement diminuer les doses efficaces.

Ces mécanismes PPARγ-indépendants, qui aboutissent à la dégradation de la cycline D1 et ERα mais pas ERβ pourraient être intéressants dans l'optique d'une application à la thérapeutique des cancers mammaires.