

# Étude d'un effet répresseur de la forme apo d'ER$\alpha$ dans le contrôle de la prolifération cellulaire

Kévin Devidal

▶ **To cite this version:**

Kévin Devidal. Étude d'un effet répresseur de la forme apo d'ER$\alpha$ dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. dumas-01959220

**HAL Id: dumas-01959220**

**https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01959220**

Submitted on 18 Dec 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**AGROCAMPUS OUEST**

☐ **CFR Angers**

☐ **CFR Rennes**

Année universitaire : 2017 – 2018

Spécialité : BMC

Biologie Moléculaire et Cellulaire

Spécialisation (et option éventuelle) :

……

**Mémoire de Fin d'Études**

☐ d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage

☐ de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage

☐ d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

# Etude d'un effet répresseur de la forme apo d'ERα dans le contrôle de la prolifération cellulaire

Par : Kévin DEVIDAL

***Soutenu à Rennes le 11 juin 2018***

**Devant le jury composé de :**

- Laurent Richard-Parpaillon, Maître de Conférence des Universités, IGDR
- Jean-Marc Fraslin, Maître de Conférence Agrocampus Ouest
- Denis Tagu, Directeur de recherche INRA

*Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST*

**Résumé long:**

Estrogens are steroidal hormones which are known to be sexual hormones in female. Those estrogens have plenty of functions within numerous organs including breast and womb. Among those functions, estrogens are responsible for the activation of the menstrual cycle but also for the growth of breast cells. To fulfil their functions, estrogens need to interact and to bind to their receptor, ERα which is a nuclear receptor. Oestrogens act via two different pathways: the genomic pathway which involves the binding of an homodimerized ERα to the DNA and the non-genomic pathway, which involves the activation of protein signalling pathways like the MAPK pathway. Estrogen receptors are major proteins because they're the main target of different therapies used to cure breast cancer. Indeed, the first stage of the treatment is to use drugs to either block the binding of E2 on ERα or to destroy the receptor to avoid E2 to activate the proliferation pathways. Although ERα is partly responsible for the development of a certain kind of hormone-dependent breast cancer, it is also known that it plays a maintaining role of the differentiated phenotype of the breast cells, avoiding the cancerous cells to evolve into a more aggressive form. However, more than half of the cancer which were responding to the treatments develop a resistance. This resistance is characterized by the inactivation of the effects of E2 on ERα and by the activation of ERα without E2 which leads the cells to proliferate. This let us think that unliganded ERα may have a repressive role against the proliferation of breast cells when the stage of the cancer is not advanced. In order to better understand the protecting effect of ERα on the differentiation state of the cell and to understand how resistance against drugs aiming ERα occurs at a certain point of the therapy, we've decided to highlight this repressive effect of ERα on the proliferation and to try to understand how this effect is removed when cells divide.

To show this effect of ERα on the cells, we first plan to calculate the increase of the number of splitting cells (MCF7) when ERα is inhibited by siER. We then plan to determine through which pathway this increase is controlled. To do so, we'll do a western blot on a protein, Erk, which is known to be phosphorylated when the MAPK pathway is activated. We will then show the effects of this activation on the phosphorylation state of some histone marks and we'll determine through RT-PCR if the expression level of different types of genes is modified by the inactivation of ERα. To determine how this repressive effect is removed,

we'll analyse by immunofluorescence the relation between the concentration of ERα and the size of the cells. To better understand the process, we will treat MCF7 cells with different drugs: E2 and 4 hydroxytamoxifène, Y27 632/C3 Transferase and NSC 23766 which are inhibitors of the RhoGTPases.

We first confirmed that the inhibition of ERα causes the increase of the number of cells which are splitting. We also showed that this increase may be caused by the activation of the MAPK pathway. Indeed, the use of siER in MCF7 involves the increase of the phosphorylation level in both Erk and H3S10 which is a histone mark specially activated by the MAPK pathway. Moreover, we showed that the inactivation of ERα increased slightly the expression of genes which are usually expressed via the non-genomic pathway. We've also highlighted that ERα has a specific dynamic which causes its intranucleus concentration to decrease when the area of the cell increases. Moreover, we've seen that treating the cells with commons treatments like E2 or 4OHT changes these observations and modifies the concentration of ERα within the nucleus. More than that, treating cells contribute to change the area of cells which are dividing, and we showed that the less ERα a cell has, and the smaller will be the cell when it will divide. Repeating these experiments to extrapolate our observations to the volume of the cells showed us that what we had shown was only true when we apply it to the area of the cells and not to the volume. Indeed, we showed that cells which are treated with E2 have the smallest areas, but they also are those with the bigger volumes. These conducted us to think that the removal of the repressive effects of unliganded ERα may not be regulated by a dilution effect but by the action of RhoGTPase which are known to control the tension forces applied on the cell. We indeed showed that the inhibition of these proteins involves the stabilization and homogenisation of the cells. When Rho are inhibited, ERα is highly detectable in the nucleus of MCF7 cells and remains high when the area of the cell increases. Likewise, inhibiting Rac drives the cell to decrease its concentration of ERα but it also remains stable and doesn't change when the area of the cell does.

To conclude, we've confirmed that unliganded ERα has a repressive effect on the proliferation of MCF7. The removal of this repressive effect seems to be driven by a decrease of the concentration of ERα in the cells when the cells grow before the division. The decrease of the concentration is not due to a dilution of the receptor but seems to be induced by the activation of RhoGTPases.

**Introduction** ---------- *p.1-3*

**Matériels et méthodes**

- *Culture cellulaire* ---------- *p.4*
- *Transfection des cellules*
- *RT PCR quantitative* ---------- *p.4-5*
- *Western Blot* ---------- *p.5*
- *Immunomarquage* ---------- *p.6*
- *Traitement des images*
- *Détermination du volume cellulaire* ---------- *p.7*

**Résultats**

- *ERα sans son ligand E2 présente une activité répressive de la prolifération cellulaire* ---------- *p.7-9*
- *La concentration en ERα suit une dynamique particulière dépendante de la superficie des cellules.* ---------- *p.10-11*
- *La corrélation entre la concentration nucléaire de ERα et la surface cellulaire est modulée par les ligands.* ----------*p.12-13*
- *La diminution de la concentration nucléaire* ERα *en fonction de l'étalement cellulaire n'est pas liée à un phénomène de dilution.* ---------- *p.14-15*
- *La diminution de la concentration nucléaire* ERα *en fonction de l'étalement cellulaire est contrôlée par les RhoGTPases Rho et Rac.* ---------- *p.15-16*

**Discussion** ---------- *p.17-19*

**Références** ---------- *p-20*

**Liste d'abréviations :**

4OHT : 4 Hydroxytamoxifène

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

E1: Estrone

E2: Estradiol

E3: Estriol

E4: Estetrol

ERα/β: *Estrogen Receptor α / Estrogen Receptor β*

ERE: *Estrogen Responsive Element*

Erk*: Extracellular signal-regulated kinase*

HER2: *Human Epidermal growth factor Receptor-2*

MCF-7: *Michigan Cancer Foundation – 7* (cell line)

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

N-CoR: *Nuclear Co-Receptor*

NGF: *Nerve growth factor*

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

SERM: *Selective estrogen receptor modulator*

SRC 1/2/3: *Steroïd Recepteur Coactivator 1/2/3*

# Introduction

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes qui jouent le rôle d'hormone sexuelle primaire chez la femelle. Les œstrogènes forment un groupe constitué de quatre molécules : l'estrone (E1), l'estradiol (E2), l'estriol (E3) et l'estetrol (E4).

Les œstrogènes ont un rôle dans plusieurs fonctions métaboliques indispensables. Ils sont notamment connus pour leur rôle dans la reproduction en participant, par exemple, à la réalisation et l'activation de l'ovogénèse. Les œstrogènes participent de même à la prolifération des cellules épithéliales de l'endomètre lors du cycle menstruel et participent également au développement de la glande mammaire au moment de la puberté.

Bien qu'indispensables au maintien de la fonction de reproduction chez la femme, les œstrogènes peuvent de diverses manières présenter des caractères carcinogènes : Ils permettent la stimulation de la prolifération cellulaire, ils peuvent induire l'augmentation du taux de mutation génique par le biais de l'activation du cytochrome p450 et pour finir, ils peuvent entraîner une aneuploïdie des cellules (Russo and Russo, 2006). L'une des fonctions des œstrogènes est de contribuer au développement du tissu mammaire. De ce fait, ils entraînent l'activation de la prolifération cellulaire. Cette fonction est délétère dans le cas du cancer du sein où elle est exacerbée.

Les œstrogènes agissent sur les cellules selon deux voies différentes : la voie génomique et la voie non-génomique. Ces deux voies nécessitent pour être activées, la présence d'une protéine particulière qui joue le rôle de récepteur pour ces œstrogènes.

Il existe deux récepteurs aux œstrogènes différents : les récepteurs α (ERα) et les récepteurs β (ERβ). Ces deux récepteurs étant des récepteurs nucléaires, ils possèdent une forme générale semblable, divisible en 6 domaines : deux domaines de transactivation qui serviront à recruter les cofacteurs nécessaires à l'activité transcriptionnelle du récepteur, un domaine de liaison à l'ADN, caractérisé par la présence de deux domaines à doigt de zinc, et un domaine de liaison au ligand (Arnal *et al*., 2017). De plus, les d(Jeselsohn et al., 2017)omaines de liaison à l'ADN présentent une très forte homologie (Yi *et al*., 2002), mais ne sont généralement pas exprimés dans les mêmes tissus (Dechering *et al*., 2000).

Comme évoqué précédemment, les œstrogènes peuvent agir sur deux voies différentes. La voie génomique est activée lorsque les œstrogènes se lient au récepteur ER, que celui-ci se dissocie des protéines chaperonnes auxquelles il est lié, et qu'il s'homodimérise avec un autre ER activé par une molécule d'œstrogène. Ce complexe est ensuite importé jusque dans le

noyau où il se liera à des ERE (*Estrogen Response Elements*), focalisés sur des promoteurs de gènes oestrogénodépendants. Après fixation sur l'ADN via le domaine C d'ER, des cofacteurs sont recrutés afin de permettre d'initier le rôle activateur ou répresseur du récepteur aux œstrogènes. Ces cofacteurs peuvent être des co-activateurs, tels les membres de la famille p160 (SRC1, SRC2 et SRC3) ou encore p300 (Hall and McDonnell, 2005). En plus des co-activeurs, les récepteurs aux œstrogènes peuvent se lier à des co-répresseurs tels N-CoR , protéine à activité histone déacétylase (Kurebayashi *et al*., 2000) ou SMRT qui fait partie d'un complexe contenant des histones déacétylases et d'autres complexes répresseurs tels Sin3 (Lavinsky *et al*., 1998). L'activité transcriptionnelle des récepteurs aux œstrogènes est en partie régulée par l'état épigénétique de la chromatine. Ce statut épigénétique est contrôlé par la présence des cofacteurs qui peuvent modifier les marques d'histones en les (dé)méthylant ou en les (dé)acétylant, par exemple.

La voie « non génomique » est activée lorsque la fixation du ligand au récepteur entraîne l'activation de voies signalétiques cytoplasmiques classiques comme la voie des MAP kinases (MAPK). L'activation de telles voies signalétiques entraîne, en aval, la modification de l'accessibilité de la chromatine puis l'activation de gènes oestrogénodépendants particuliers, comme Areg, HSPB8, LRRC52 ou PMAIP1, qui participent notamment à l'activation de la prolifération des cellules. Le rôle du récepteur aux œstrogènes est fondamental puisqu'il est comme nous allons le voir, très impliqué dans le fonctionnement et le traitement des cancers du sein.

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes en France. Il représente la première cause de décès chez les femmes de plus de 50 ans. Les cancers du sein sont classés selon plusieurs paramètres : cliniques, histopathologiques ou moléculaires. La classification la plus couramment adoptée repose sur les propriétés moléculaires tumorales des cancers du sein (Sørlie *et al*., 2003). Les cancers du sein dits "*luminaux*" sont caractérisés par l'expression du récepteur aux œstrogènes (ER). Ces tumeurs sont dites "*luminales*" car leurs gènes codent les protéines des cellules épithéliales de la lumière des canaux ou des lobules du sein
Les cancers luminaux sont les plus fréquents, ils représentent près des deux tiers des cas de cancers. Environ 70 % des cancers du sein sont liés aux récepteurs hormonaux et expriment le récepteur aux œstrogènes, le récepteur à la progestérone ou les deux (Jeselsohn *et al*., 2017).
Les thérapies de premier plan utilisées pour traiter les cancers du sein luminaux visent les récepteurs aux œstrogènes. Le tamoxifen, traitement classique utilisé pour les cancers du sein luminaux, est l'un d'eux. Son principe actif, le 4 hydroxytamoxifene est un SERM (*Selective estrogen receptor modulator*). Dans ce cas précis, il agit en tant qu'antagoniste en empêchant

la fixation d'E2 sur le récepteur dans les tissus mammaires. Le but de ce traitement est d'empêcher l'initiation de l'induction de la prolifération cellulaire par l'E2. Cependant, parmi les cancers luminaux répondant initialement à ces traitements, une très grande majorité des cancers va développer un phénomène de résistance à ces traitements. Bloquer l'action d'E2 n'aura alors quasiment plus d'effet, et les récepteurs ERα en absence de ligand (forme apo du récepteur) vont être activés par la phosphorylation de voies de communication cellulaire comme la voie des MAPK et entraîner l'emballement du système cellulaire. Ce phénomène de résistance à l'hormonothérapie due à la modification du comportement d'ER est encore peu compris.

L'importance de ce récepteur dans les thérapies contre le cancer du sein et son rôle dans l'évolution des cancers vers des formes plus agressives expliquent l'intérêt que lui porte l'ensemble de la communauté scientifique travaillant sur le sujet. La très grande majorité des publications concerne l'étude du rôle d'ERα lorsqu'il est lié à E2. L'effet inducteur causé par la liaison du ligand E2 au récepteur est donc majoritairement mis en évidence. La mise en place du phénomène de résistance à l'hormonothérapie lié à l'activation des voies cytoplasmiques comme la voie des MAPK, nous a laissé penser que dans des cas moins avancés, ERα -sous sa forme apo- pourrait avoir un effet sur la cellule et plus particulièrement sur la prolifération. Le but de notre projet est d'étudier l'effet répresseur d'ERα sur la prolifération cellulaire, lorsque celui-ci n'est pas associé à son ligand. Il est connu que les récepteurs aux œstrogènes sans leur ligand ont un rôle fondamental dans le maintien de l'état de différenciation et du statut épithélial des cellules mammaires. En effet, l'analyse du cistrome d'ERα sans son ligand montre que de nombreux gènes -le gène codant pour le facteur de transcription MIST1 par exemple- sont impliqués dans le maintien du phénotype luminal et sont exprimés différemment lorsque ERα est supprimé grâce à l'utilisation de shERα (Caizzi *et al*., 2014). Des travaux réalisés par mon équipe d'accueil ont de plus montré qu'au sein de cellules PC12, les récepteurs aux œstrogènes ERα non liés à l'œstradiol, empêchent la différenciation neuronale induite par NGF (Mérot *et al*., 2009). Cet effet du récepteur est levé lors de l'ajout d'œstradiol dans le milieu. Ces observations nous ont poussés à nous questionner sur ce rôle répresseur d'ERα sans son ligand dans un cadre de cancer du sein et plus généralement dans le fonctionnement des cellules mammaires. Pour montrer ce rôle, nous allons mettre en évidence l'effet d'une inhibition d'ERα sur la prolifération cellulaire. Nous chercherons ensuite à caractériser les mécanismes permettant l'augmentation observée du nombre de cellules en division. Afin d'approfondir les observations que nous serions amenés à faire, une étude des cellules par immunomarquage sera réalisée en utilisant divers anticorps permettant l'analyse des images. Cette approche

microscopique nous permettra de déterminer le mécanisme de levée du rôle répresseur du récepteur aux œstrogènes lorsque celui-ci n'est pas lié à son ligand E2.

# Matériel et méthodes

## Culture cellulaire :

Les cellules utilisées sont les cellules cancéreuses mammaires MCF-7. Ces cellules sont cultivées dans des flasks de 75cm2, dans du DMEM *(Life Technologies*) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Biowest) et 1% d'antibiotique (*Life Technologies*). Pour les expériences, ce milieu est remplacé par du milieu déstéroidé composé de DMEM sans rouge de phénol (*Life Technologies*), de 2.5% de SF déstéroidé (Biowest) et de 1% d'antibiotique. Les cellules sont maintenues à 37°C dans un incubateur avec 5% de CO2. Les cellules sont traitées avec de l'œstradiol (E2, $10^{-8}$ M), du 4 hydroxytamoxifène (4OHT, $10^{-6}$ M), du coenzyme C3 (C3, 125 ng/ml, inhibiteur de Rho), du Y27632 (Y27, 15 µM, inhibiteur de ROCK) et/ou du NSC 23766 (NSC, 50 µM, inhibiteur de Rac).

## Transfection des cellules :

24 heures avant la transfection, les cellules sont ensemencées dans des plaques de 6 ou 24 puits à raison de $1.10^6$ et $5.10^5$ cellules par puits respectivement, afin d'obtenir une densité cellulaire proche de la confluence. Une heure avant la transfection, les cellules sont lavées avec du PBS *(Life Technologies*) et le milieu est remplacé par du milieu déstéroidé. Les cellules sont transfectées avec des SiARN contrôle et ERα (MISSION esiRNA, Sigma-Aldrish) à l'aide du kit jetPRIME (Polyplus transfection) selon les instructions du fabricant. Après 24 heures d'incubation des cellules avec le mélange de transfection, le milieu déstéroidé est renouvelé et les cellules sont traitées pendant 24 heures par de l'E2 ($10^{-8}$ M) ou du 4OHT ($10^{-6}$ M).

## RT-PCR quantitative :

A partir de cellules ensemencées dans des plaques 6 puits, l'extraction des ARN totaux est réalisée à l'aide du kit d'extraction Nucléospin RNA plus (Macherey-Nagel) selon le protocole fourni par le fabricant. La quantité et la qualité des ARN sont mesurées à l'aide d'un Nanodrop 8000 (ThermoFisher). La reverse-transcription est réalisée sur 1µg d'ARN total à partir d'hexamères aléatoires en utilisant le kit « *iScript Reverse Transcription Supermix* » de chez Biorad. La RT-PCR quantitative est effectuée à l'aide du kit *« iQ*

*SYRB_Green Supermix* » de chez Biorad sur un appareil CFX384 Touch Real Time PCR (Biorad). Ci-joint le tableau des amorces utilisées, TBP est utilisé comme gène de référence.

**Tableau 1 : Référencement des amorces utilisées pour la RT-PCT quantitative (ordre : Forward, Reverse)**

| | |
|---|---|
| *GREB1* | (GAGGATGTGGAGTGGAGACC, CAGTACCTCAAAGACCTCGGC) |
| *LRRC54* | (GGGCTACACGACGTTGGCT, GAGGTCAAGCGACTCCAGGTA) |
| *CXCL12* | (CACCATTGAGAGGTCCGGAAG, AATGAGACCCGTGTTTGCAG) |
| *PS2* | (ACCATGGAGAACAAGTGA, CCGAGCTCTGGCCTAATCA) |
| *HSPB8* | (TGGATACGTGGAGGTGTCTGG, GATCCACCTCTGCAGGAAGC) |
| *PMAIP1* | (CGAAAGACCTCAAGCTGCTC, CCAATCCATTGCCTTTATGG) |
| *TBP* | (TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA, CACATCACAGCTCCCCACCA) |

## Western Blot :

A partir de cellules ensemencées dans des plaques 6 puits, les extraits cellulaires totaux sont obtenus par lyse des cellules dans 200µl de tampon de Laemmli 3X par puits, suivi d'une sonication et d'une dénaturation à 95°C pendant 5min. Les protéines sont ensuite séparées par migration sur un gel de polyacrylamide (10% SDS-page), puis transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Protan) pendant 1h à 15V. La membrane est saturée toute une nuit à 4°C dans du PBS contenant 0.1% Tween (*Sigma Aldrich*) et 5% lait. Elle est ensuite incubée pendant 2h à température ambiante en présence d'un anticorps primaire (ERα : HC20, sc-543 ; phospho ERK : sc-7383 ; ERK1 : sc-94 ; Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/1000 dans du PBS, 0.1% Tween (*Sigma Aldrich*) et 5% lait. Après 3 lavages, la membrane est alors incubée pendant 1h en présence d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase diluée au 1/1000 dans du PBS, 0.1% Tween (*Sigma Aldrich*) et 5% lait. Après rinçage, l'anticorps secondaire est révélé avec le système ChemiDoc$^{TM}$ et le logiciel Image Lab$^{TB}$ (Biorad) en ajoutant le substrat de la peroxydase.

## Immunomarquage :

Les cellules sont ensemencées sur des petites lamelles circulaires placées au fond des puits d'une plaque 24 puits. Après le traitement des cellules en culture, le milieu est éliminé et les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 3% pendant 15 min puis rincées 3 fois au PBS. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec du PBS 0.2% triton X-100 pendant 15 min, puis 3 rinçages au PBS. L'incubation avec les anticorps primaires {(ERα : HC20, sc-543 ; CBP : sc-369 ; PCNA : sc-9857 ; Cytokeratine 18 : sc-51582, Santa Cruz Biotechnology), (ERα : 6F11, Thermo Fisher) et (rétinoblastome, Rb : ab6075, Abcam)} dilués au 1/1000 est réalisée pendant la nuit à 4°C dans du PBS à 3% de sérum. Après 3 lavages au PBS, les cellules sont incubées en présence des anticorps secondaires (Alexa Fluor 594 et 488, Abcam) dilués au 1/1000 dans du PBS à 3% sérum pendant 2h. Les lamelles sont montées sur lames de verre avec du milieu de montage contenant du DAPI (Duolink). Les images sont acquises sur un microscope à épifluorescence AxioImager Z1 Apotome AxioCam connecté au logiciel AxioVision (Zeiss).

## Traitement des images :

Les images de microscopie à épifluorescence sont traitées à l'aide du logiciel Fiji. Le contour des cellules est dessiné manuellement à l'aide du logiciel à partir du marquage de la cytokératine 18 (Figure 1). L'intensité moyenne de fluorescence du marquage nucléaire de ERα, CBP ou Rb est déterminée pour chacune des cellules dont le contour a été dessiné. Les données obtenues sont alors classées par ordre croissant de taille cellulaire et regroupées par fenêtres d'intensité de 100 unités. La moyenne de l'intensité du marquage nucléaire de ERα, CBP ou Rb est alors calculée par fenêtre, toutes les 100 unités.

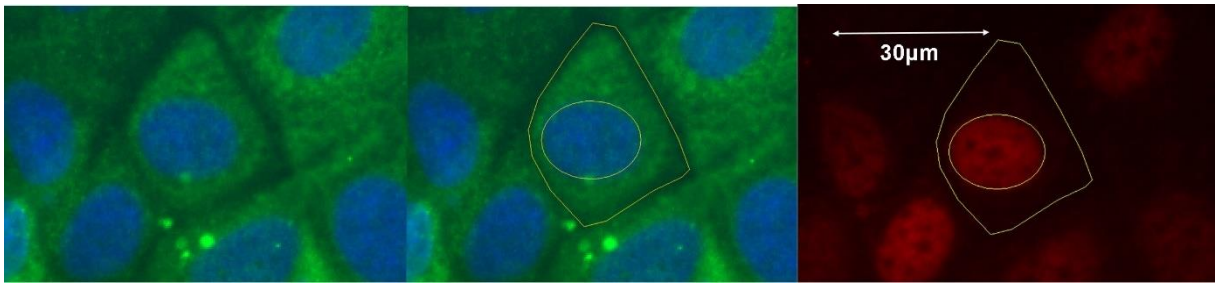



**Figure 1 :** Méthodologie employée pour déterminer la surface cellulaire et l'intensité protéique au sein du noyau. En vert est représenté le marquage à la cytokératine 18, en bleu le DAPI et en rouge le marquage d'ERα

## Détermination du volume cellulaire :

Le volume cellulaire est déterminé grâce au Z2 Cell Coulter Counter. Après le traitement des cellules en culture, le milieu est éliminé puis les cellules sont rincées au PBS. Les cellules sont ensuite trypsinées, reprises dans du milieu de culture puis stockées dans des tubes Falcon. Après un passage au vortex, 500µL de cellules sont ajoutés à 10mL d'isoton. Le mélange est ensuite analysé par l'appareil.

# Résultats

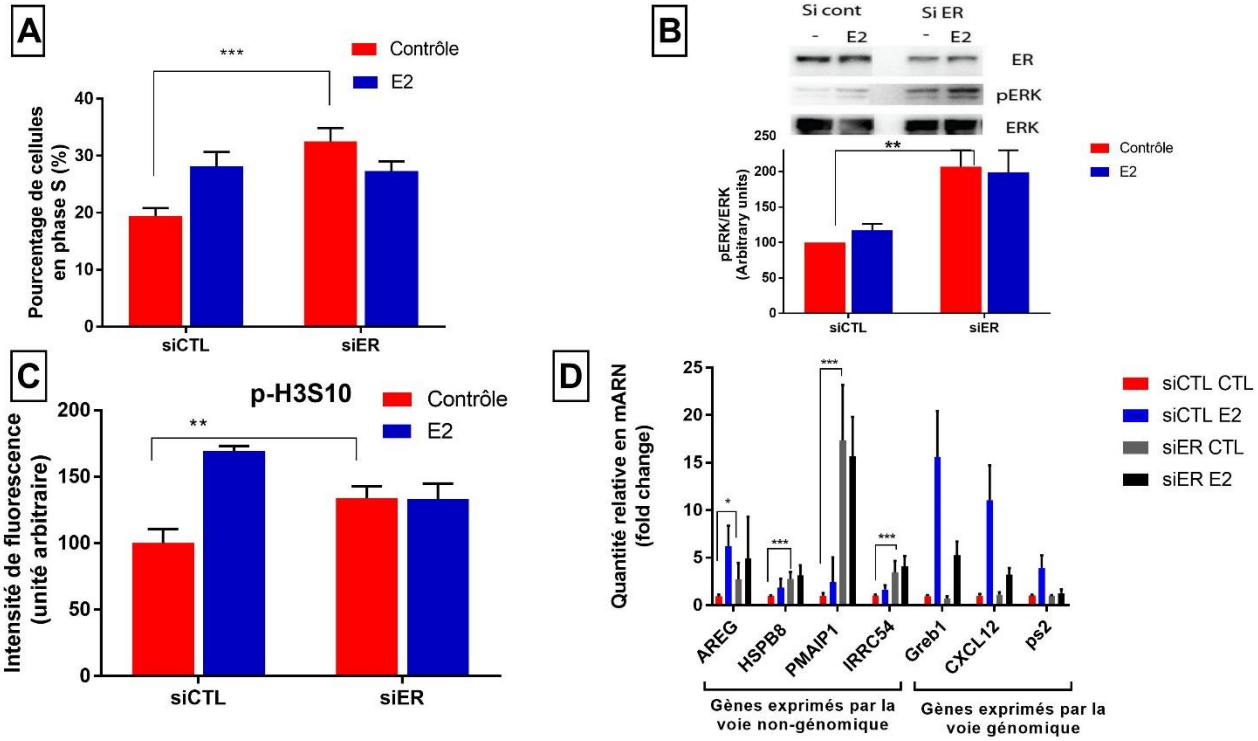



**Figure 2:** ***ERa sans son ligand présente une activité répressive.*** Des cellules MCF7 à confluence sont transfectées avec des siARN contrôle (siCTL) ou ER (siER) pendant 24h puis traitées ou non à l'oestradiol (10nM) pendant 24h. **A**, Les cellules sont ensuite fixées, peméabilisées et immunomarquées avec des anticorps anti-PCNA. Le pourcentage de cellules PCNA positives a été déterminé pour chaque condition de traitement. Il correspond au pourcentage de cellule en phase S. **B**, Western Blot analysant l'expression d'ER , de pERK et de ERK dans les cellules MCF7. Les résultats de 4 expériences indépendantes ont été quantifiés grâce au logiciel Fiji puis moyennés. **C**, Expériences d'immunofluorescence mesurant l'expression de p-H3S10 après immunomarquage. Les signaux ont été quantifiés grâce au logiciel Fiji. Les résultats correspondent à la moyenne+/- SEM de 4 expériences indépendantes. **D**, Mesure de l'expression dans les cellules MCF7 de gènes oestrogéno-régulés par RT-PCR quantitative. Les niveaux d'expression de ces gènes ont été standardisés par rapport à l'expression de l'invariant TBP. Les résultats correspondent à la moyenne+/- SEM de 3 expériences indépendantes. Toutes les données obtenues ont été soumises à une ANOVA réalisée sur Rstudio (*: p≤ 0.05, **: p≤ 0.01, ***: p≤ 0.001).

***ERα sans son ligand E2 présente une activité répressive de la prolifération cellulaire –***

Afin de vérifier l'hypothèse d'un rôle de répresseur d'ERα, nous avons étudié dans un premier temps les conséquences d'une inhibition de l'expression d'ERα sur l'initiation de la division cellulaire. Pour ce faire, le pourcentage de cellules MCF7 en phase S a été déterminé par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti-PCNA 48 heures après transfection des cellules MCF7 avec un SiARN contrôle (SiCTL) et un SiARN ERα (SiER). L'expression de la protéine ERα étant plus forte à confluence, les cellules MCF7 ont été ensemencées de telle sorte que la confluence soit de 100% dès le début de l'expérience. L'inhibition de l'expression de la protéine ERα par le SiER a été contrôlée par western blot (Fig. 2B). Elle est de 60%. L'analyse des cellules MCF7 transfectées avec le SiCTL montre qu'approximativement 20% des cellules sont en phase S en absence d'oestradiol. Ce pourcentage monte à 30% après un traitement oestrogènique. De manière intéressante, l'inhibition de l'expression de ERα à l'aide du SiER provoque une nette augmentation (1,5 fois) du nombre de cellules en phase S. La présence du récepteur en absence de son ligand semble donc freiner l'initiation de la division cellulaire.

La prolifération cellulaire étant en partie contrôlée par la voie de signalisation des MAP Kinase (MAPK), nous nous sommes alors intéressés à l'impact d'une baisse de l'expression de ERα sur l'activité de la voie MAPK et plus particulièrement sur l'état de phosphorylation de la protéine Erk. Comme précédemment, les cellules MCF7 ont été transfectées avec des SiCTL et SiER puis traitées ou non avec de l'oestradiol pendant 24 heures. L'état de phosphorylation de la protéine Erk a été mesuré par western blot à partir d'extraits cellulaires totaux (Fig.2B). Les résultats montrent clairement une augmentation d'un facteur 2 de la phosphorylation de Erk après inhibition de l'expression de ERα. L'activité de la voie MAPK n'est pas ou peu impactée par le traitement des cellules à l'oestradiol.

La voie des MAPK contrôle l'état de permissivité de la chromatine via la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone 3 (H3S10). En conséquence, nous avons étudié par immunofluorescence l'état de phosphorylation de H3S10 après transfection des cellules MCF7 avec des SiCTL et SiER afin de s'assurer que l'augmentation de la phosphorylation de Erk après inhibition de l'expression de ERα avait un impact sur la chromatine. Les résultats sont illustrés sur la Figure 2C. Dans les cellules MCF7 transfectées avec le SiCTL, l'oestradiol augmente comme attendu la phosphorylation de H3S10 (1,6 fois). Une augmentation de la phosphorylation de H3S10 d'amplitude plus faible est également observée

(1,4 fois) après l'inhibition de l'expression de ERα. La régulation par l'oestradiol disparait en présence de SiER. La baisse d'expression de ERα semble donc favoriser la permissivité chromatinienne.

Pour terminer, nous avons étudié par RT-PCR quantitative les conséquences de la baisse du taux de ERα suite à l'usage de SiARN dans les cellules MCF7 sur l'expression de gènes oestrogeno-régulés. Pour cette étude, nous avons sélectionné à la fois des gènes connus pour être directement régulés par ERα au niveau génomique (voie génomique : action transcriptionnelle et nucléaire de ERα) (*CXCL12, PS2, GREB1*) et des gènes donc la régulation par ERα est indirecte et s'effectue aux niveaux cytoplasmiques et membranaires par une modulation de l'activité de la voie des MAPK (voie non-génomique) (*AREG, HSPB8, PMAIP1 et IRRC54*). Concernant les gènes dits « régulés par la voie génomique », la baisse d'expression de ERα impacte uniquement mais fortement leur réponse au traitement oestrogénique. Leur expression basale n'est pas affectée. En revanche, les gènes dits « régulés par la voie non-génomique » présentent une forte augmentation de leur niveau d'expression basale et une perte de régulation par l'E2 après réduction du taux de ERα dans la cellule. Ces gènes sont donc réprimés par ERα en absence de son ligand.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montre que la forme apo d'ERα présente une activité répressive sur le cycle cellulaire, sur l'activité de la voie des MAPK, sur la permissivité chromatinienne et sur l'expression de gènes oestrogeno-sensibles dits « régulés par la voie non-génomique ».

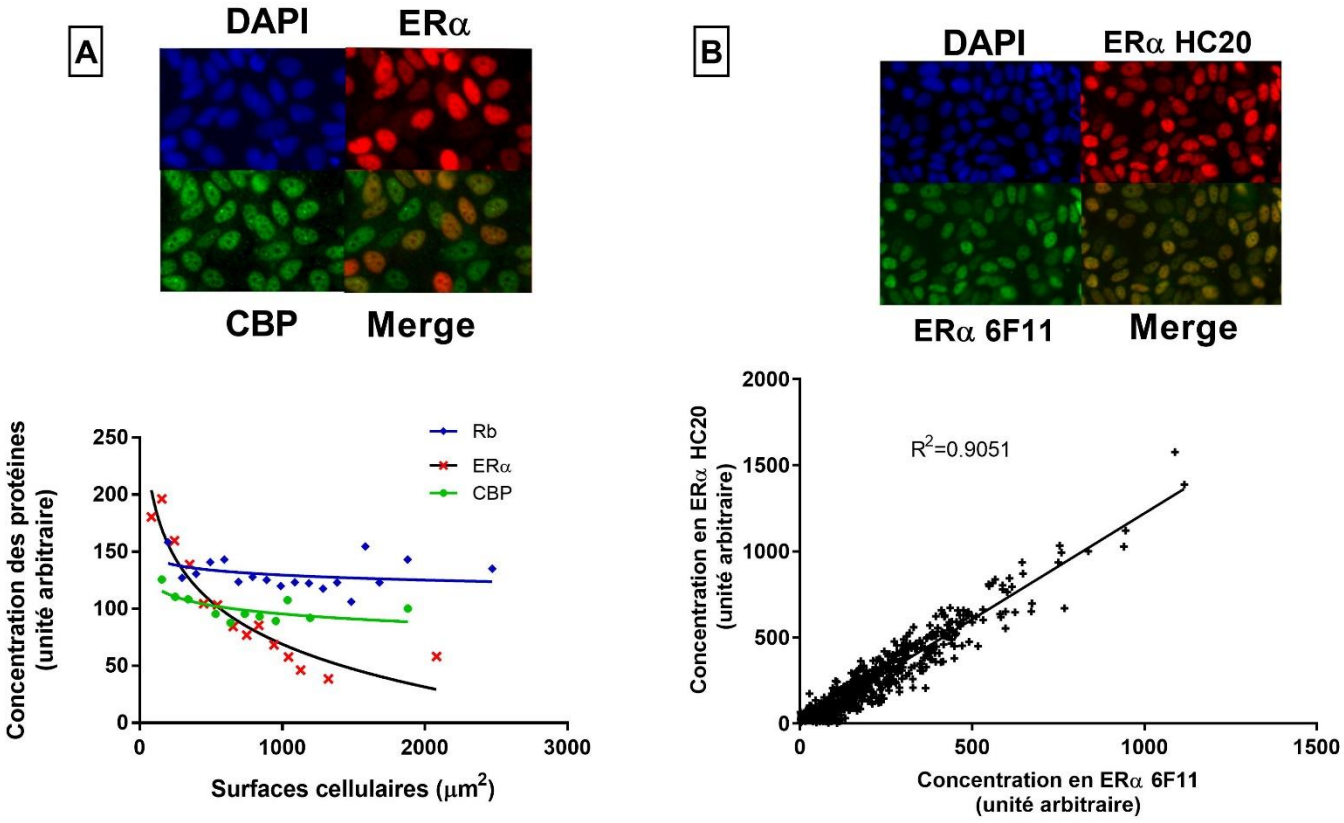



***Figure 3 : La concentration nucléaire en ERa change en fonction de la surface d'étalement des cellules***. **A**, des cellules MCF-7 à confluence pendant au moins 48h ont été immunomarquées avec des anticorps anti- ER , anti-CBP, anti-Rb et anti-cytokeratine 18. L'intensité du marquage nucléaire de ER , CBP et Rb a été déterminée pour chaque cellule puis moyennée en fonction de la surface d'étalement des cellules mesurée grâce à immunomarquage de la cytokeratine 18. Pour chaque marquage, plus de 400 cellules ont été quantifiées. Le graphe exprime la concentration nucléaire de la protéine d'intérêt en fonction de la surface cellulaire. Un comarquage de ER et CBP dans les cellules MCF7 est également montré. **B**, un comarquage à l'aide de deux anticorps anti-ER reconnaissant différentes parties de ER a été réalisé dans les cellules MCF7. L'intensité des marquages obtenus avec chaque anticorps a été déterminée pour chaque cellule puis comparée.

***La concentration en ERα suit une dynamique particulière dépendante de la superficie des cellules.***

Nous montrons qu'en absence de son ligand, la protéine ERα est un répresseur de la prolifération cellulaire. Or, le taux basal de prolifération des cellules MCF7 en absence de traitement oestrogénique n'est pas nul. Le pourcentage de cellules en phase S peut varier de 10 à 20% selon les expériences. Aussi, si ERα est un répresseur de la prolifération, son activité et/ou son niveau d'expression doivent être modifiés afin que la cellule puisse rentrer dans le cycle cellulaire. Des quantités hétérogènes de ERα par cellule seraient alors le signe d'une régulation de son expression.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence sur des cellules MCF7 à confluence et non traitées à l'œstradiol afin de mesurer la concentration nucléaire en ERα par cellule. Parallèlement, un immunomarquage de la cytokératine 18, une protéine de la famille des protéines de filaments intermédiaires participant au cytosquelette des cellules épithéliales, a permis d'identifier précisément pour chaque cellule sa surface d'étalement. Les résultats montrent que la concentration nucléaire en ERα est très variable d'une cellule à l'autre. Ils démontrent d'autre part l'existence d'une corrélation inverse entre la concentration nucléaire de ERα et la surface cellulaire. Plus une cellule est étalée, moins elle exprime le récepteur (Fig.3A). Cette observation est propre à ERα puisque l'analyse d'autres protéines nucléaires comme le coactivateur CBP ou la protéine rétinoblastome (Rb), présentent une concentration nucléaire constante quelle que soit la surface cellulaire. Un comarquage de la protéine ERα avec ces protéines confirme en effet cette observation biologique (Fig.3A). Enfin, la corrélation inverse entre la concentration de ERα et la surface cellulaire est observée quel que soit l'anticorps anti- ERα utilisé. Un comarquage des cellules MCF7 avec deux anticorps anti-ERα ciblant différentes parties de la protéine ERα (HC20 : région C-terminale ; 6F11 : région N-terminale) montre en effet une superposition parfaite des signaux (Fig.3B).

En conclusion, ces résultats démontrent qu'en absence de ligand, la concentration nucléaire de ERα varie en fonction de la superficie des cellules.

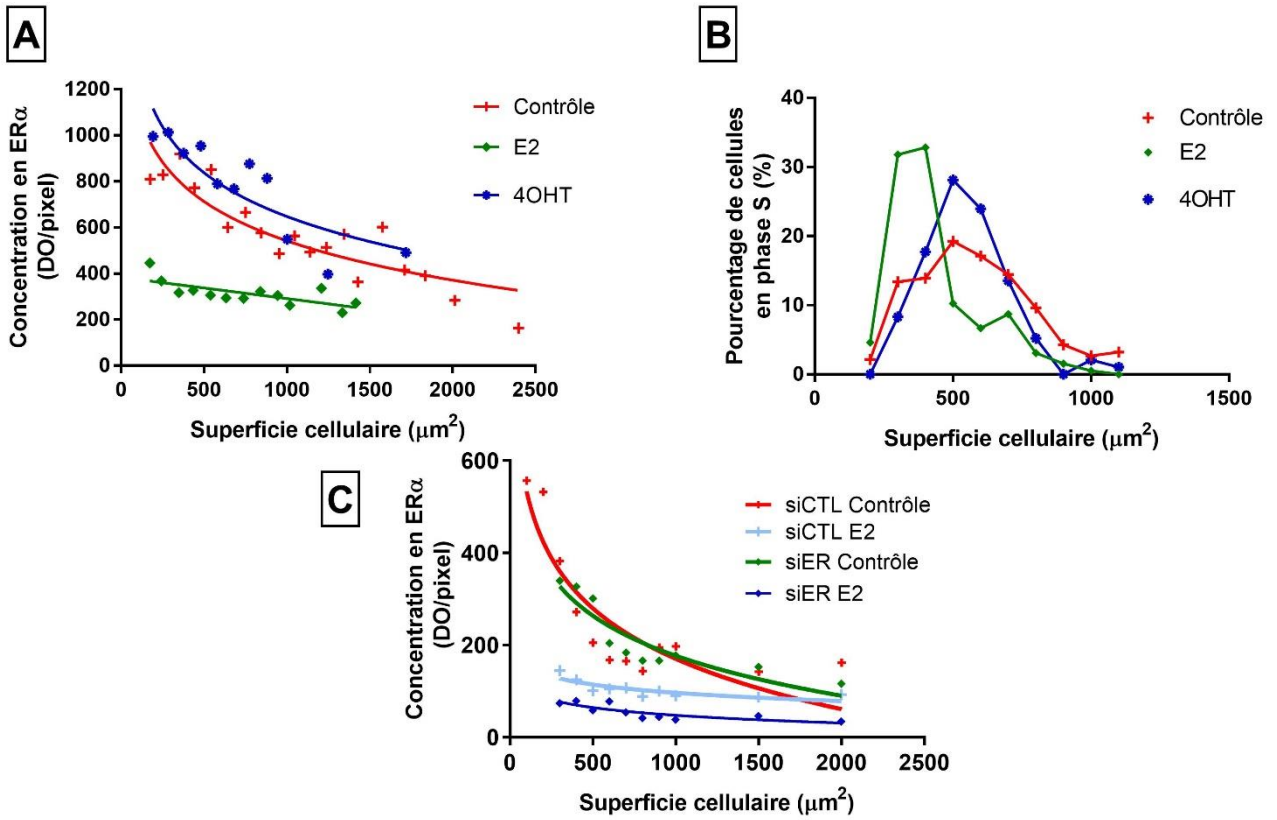



**Figure 4:** ***La corrélation entre la concentration nucléaire de ERa et la surface cellulaire est modulée par les ligands de ERa***. **A**, après 48h de culture à confluence, les cellules MCF7 sont traités ou non avec de l'E2 (10nM) ou du 4OHT (1mM) pendant 24h puis fixées, perméabilisées et immunomarquées avec des anticorps anti-HC20 (ER ) et anti-cytokératine 18. L'intensité du marquage nucléaire de ER été déterminée pour chaque cellule puis moyennée en fonction de la surface d'étalement des cellules mesurée grâce à immunomarquage de la cytokeratine 18. Pour chaque traitement, plus de 400 cellules ont été quantifiées. **B**, après 48h de culture à confluence, les cellules sont traitées ou non pendant 24h à l'E2 (10nM) ou au 4OHT (1mM) puis immunomarquées à l'aide d'anticorps anti-PCNA et anti-cytokératine 18. La surface d'étalement cellulaire de chaque cellule PCNA-positives a été déterminée grâce à immunomarquage de la cytokératine 18. Le graphe représente le pourcentage de cellules en phase S (PCNA-positives) en fonction de la surface cellulaire. **C**, Les cellules MCF-7 sont cultivées pendant 48h à confluence puis transfectées avec des siCTL ou ER avant d'être traitées ou non à l'E2. La concentration nucléaire de ER en fonction de la surface cellulaire est déterminée selon la procédure décrite pour le panel A.

***La corrélation entre la concentration nucléaire de ERα et la surface cellulaire est modulée par les ligands.***

Nous avons poursuivi notre étude en analysant l'impact de différents ligands de ERα sur la relation entre l'expression nucléaire du récepteur et la surface des cellules. Les ligands utilisés sont d'une part l'oestradiol (E2) et d'autre part le 4-hydroxytamoxifène (4OHT), un antiestrogène utilisé dans le traitement des cancers du sein ER+ qui, en plus d'empêcher la liaison de E2 à ERα, stabilise le récepteur et le concentre au niveau du noyau. Après un traitement à l'E2 de 24 heures, l'analyse du comarquage de ERα et de la cytokératine 18

montre une baisse d'expression de ERα et une homogénéisation de sa concentration nucléaire devenant ainsi quasiment indépendant de la surface cellulaire (Fig. 4A). Contrairement à ce qui est observé dans les cellules contrôles il n'y a plus d'adaptation de la concentration d'ERα en fonction de la surface cellulaire. Le traitement des cellules au 4OHT induit quant à lui une augmentation de la concentration nucléaire en ERα qui reste dépendante de la surface cellulaire.

Les concentrations nucléaires en ERα varient selon les traitements appliqués. Si ERα présente une activité répressive de la prolifération, la taille des cellules initiant un cycle cellulaire doit alors s'adapter à la quantité initiale d'ERα imposée par le traitement. Nous supposons qu'une cellule présentant une concentration nucléaire élevée en ERα nécessite une surface cellulaire plus grande afin de diminuer l'expression de ERα et de pouvoir se diviser. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré, par immunomarquage des protéines PCNA et cytokératine 18, la superficie des cellules MCF7 en phase S après un traitement ou non à l'E2 ou au 4OHT. Les résultats montrent clairement que la superficie des cellules en phase S est différente selon les traitements (Fig. 4B). Les cellules PCNA-positives ont une surface cellulaire plus large dans les cultures contrôles ou traitées au 4OHT que dans les cultures cellulaires traitées à l'E2.

Pour terminer, nous nous sommes intéressés aux conséquences d'une inhibition de l'expression de ERα sur la relation entre concentration nucléaire en ERα et la surface cellulaire. Pour ce faire, les cellules MCF7 ont été transfectées avec des SiCTL et SiER avant d'être traitées ou non avec de l'E2 pendant 24 heures. L'analyse par immunofluorescence de la concentration nucléaire de ERα en fonction de la surface d'étalement cellulaire montre une relation quasiment identique entre ces deux paramètres dans les cellules contrôles transfectées avec les SiCTL ou SiER (Fig. 4C). La baisse d'expression de ERα constatée après transfection du SiER (60%) ne semble pas modifier la relation entre la concentration de ERα et la surface cellulaire. Seule, une adaptation de la taille des cellules aux changements de concentration de ERα est observée. Il y a moins de petites cellules. En revanche, en présence d'un traitement à l'E2, la transfection du SiER entraine une baisse d'expression de ERα quelle que soit la surface d'étalement de la cellule.

.

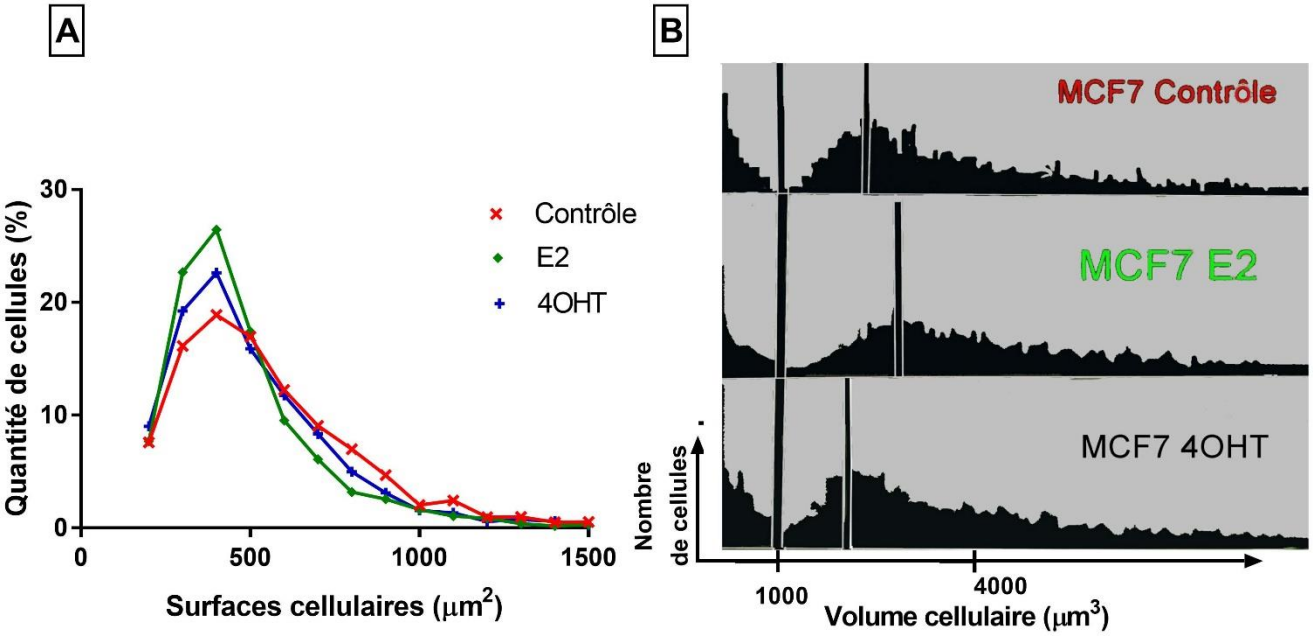



**Figure 5:** ***Comparaison de la surface d'étalement cellulaire et du volume cellulaire des cellules MCF7***. Des cellules MCF7 ont été traitées ou non pendant 24h avec de l'E2 (10nM) et du 4OHT (1mM). **A**, les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et immunomarquées avec un anticorps anti-cytokératine 18. A l'aide du logiciel Fiji La surface d'étalement cellulaire de chaque cellule a été à partir de l' immunomarquage de la cytokératine 18. Le graphe représente en pourcentage la répartition des cellules en fonction de leur surface d'étalement. **B**, Les cellules ont ensuite été trypsinées puis leur volume a été analysé grâce au Z2 Coulter Counter Analyzer. Le graphe représente la répartition des cellules en fonction de leur volume.

***La diminution de la concentration nucléaire* ERα *en fonction de l'étalement cellulaire n'est pas liée à un phénomène de dilution. –***

En absence de traitement oestrogénique, la concentration nucléaire de ERα varie en fonction de la surface cellulaire. Nous avons entrepris l'identification du (ou des) mécanisme(s) responsable(s) de ce phénomène. Notre première hypothèse de travail supposait que la protéine ERα pouvait être produite en quantité constante dans la cellule, contrairement à la plupart des protéines, dont les quantités s'adaptent au volume cellulaire afin de conserver une concentration constante. Un accroissement du volume cellulaire au cours du cycle cellulaire provoquerait alors une dilution de la protéine, levant aussi son activité répressive. Un tel phénomène a été récemment décrit pour l'inhibiteur du cycle cellulaire Whi5 chez la levure (Schmoller *et al*., 2015). Les variations de la concentration nucléaire de ERα en fonction de la surface cellulaire seraient alors liées à des variations de volume cellulaire, impliquant une corrélation étroite entre la surface d'étalement et le volume des cellules en culture. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé les variations de surfaces et de volumes cellulaires des cellules MCF7 en présence ou en absence d'un traitement par l'E2 ou du

4OHT. Pour ce faire, les surfaces cellulaires ont été déterminées par immunomarquage de la cytokératine 18. L'analyse des cellules au Z2 Cell Coulter Counter a permis de déterminer les profils volumétriques des cellules après trypsination. Nous observons que la répartition des cellules en fonction de la surface cellulaire reste globalement comparable, quel que soit le traitement (Fig. 5A). Une légère augmentation du nombre de cellules étalées est observée pour les cellules contrôles et traitées au 4OHT. De manière inattendue, l'analyse du volume cellulaire montre des résultats très différents. Les cellules traitées à l'E2 ont un volume cellulaire supérieur aux cellules contrôles, le plus petit volume cellulaire étant observé pour les cellules traitées au 4OHT (Fig.5B). Ces résultats montrent l'absence de relation directe entre l'étalement cellulaire et le volume cellulaire. En conséquence, la diminution de la concentration nucléaire en ERα en fonction de l'étalement cellulaire ne repose pas sur un phénomène de dilution du récepteur par accroissement du volume cellulaire.

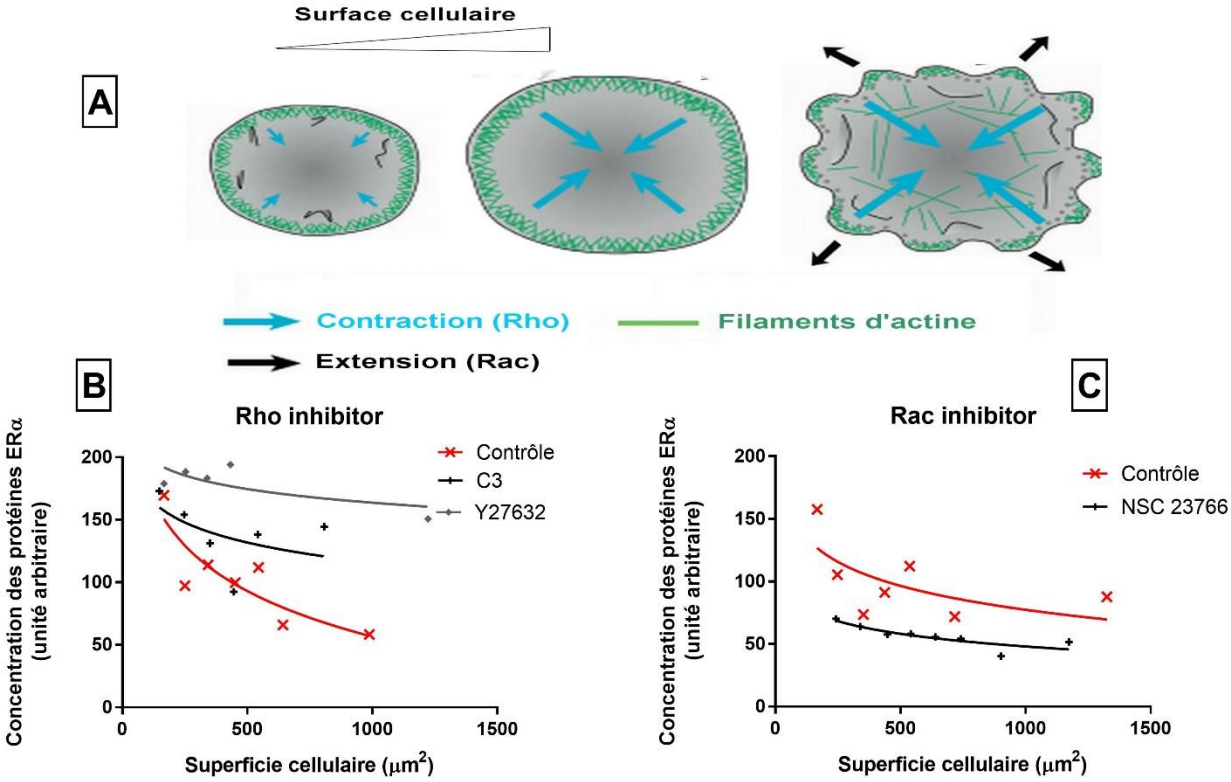



**Figure 6:** ***La diminution de la concentration nucléaire ERa en fonction de l'étalement cellulaire est contrôlée par les RhoGTPases Rho et Rac***. **A**, schéma récapitulatif du rôle des RhoGTPases étudiées ici. **B**,**C**, des cellules MCF7 à confluence pendant au moins 48h ont été traitées ou non avec du C3 (125ng/mL) (inhibiteur de Rho), de l'Y27632 (15mM) (inhibiteur de ROCK) ou du NSC 23766 (50mM) (inhibiteur de RAC) pendant 24h. Après fixation et perméabilisation, les cellules ont été immunomarquées avec des anticorps anti-ERa et anti-cytokératine 18. L'intensité du marquage nucléaire de ER été déterminée pour chaque cellule puis moyennée en fonction de la surface d'étalement des cellules mesurée grâce à immunomarquage de la cytokeratine 18. Pour chaque traitement, plus de 400 cellules ont été quantifiées. Les graphes expriment la concentration nucléaire de ER en fonction de la surface cellulaire après inhibition de Rho et ROCK (panel B) ou RAC (panel C).

***La diminution de la concentration nucléaire* ERα *en fonction de l'étalement cellulaire est contrôlée par les RhoGTPases Rho et Rac*.**

L'infirmation de notre première hypothèse de travail nous a alors amené à explorer une nouvelle hypothèse pouvant expliquer la relation étroite existant entre la concentration nucléaire de ERα et la surface cellulaire. Cette nouvelle hypothèse repose sur la mise en place de forces de tension au cours de l'étalement de la cellule à son support. Ces forces de tension augmentent avec l'étalement cellulaire. Elles sont contrôlées par les RhoGTPases. Rho favorise la contraction cellulaire alors que Rac induit l'extension (Ridley, 2001) (Fig.6A). La mise en place de ces forces pourrait aussi contrôler le niveau d'expression de ERα. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié les conséquences de l'inhibition de l'activité des deux RhoGTPases sur la relation existante entre la concentration nucléaire de ERα et la surface cellulaire. Pour ce faire, les cellules MCF7 ont été traité avec un inhibiteur de Rho (C3 Transférase), un inhibiteur de la protéine cible de Rho, ROCK, (Y27 632) et un inhibiteur de Rac (NSC 23766) avant de visualiser le marquage de ERα et de la cytokératine 18 par immunofluorescence. Les résultats montrent que l'inhibition de Rho ou de la protéine effectrice ROCK abolit la baisse de la concentration nucléaire de ERα dans les cellules étalées (Fig 6.B) L'expression de ERα reste élevée quelle que soit la surface de l'étalement cellulaire. En revanche, l'inhibition de Rac induit une diminution importante de l'expression de ERα, ainsi qu'une homogénéisation de cette expression en fonction de la surface cellulaire (Fig. 6C).

L'ensemble de ces résultats suggère une régulation inverse de la concentration nucléaire de ERα par les RhoGTPases Rho et Rac.

# Discussion

Ce projet nous a permis de mettre en évidence un rôle répresseur d'ERα sur la prolifération cellulaire lorsque ce dernier n'est pas lié à son ligand, l'E2. Nos résultats suggèrent également que cette répression pourrait être en partie levée par une diminution de la concentration d'ERα intranucléaire lorsque la surface d'étalement de la cellule à son support augmente. Cette diminution de la concentration d'ERα serait contrôlée par l'activité des RhoGTPase Rho et Rac.

L'ensemble de ce travail a été réalisé sur des cellules MCF7 ensemencées à confluence dans le but de maximiser l'effet répresseur d'ERα. En effet, la concentration nucléaire de ERα augmente progressivement avec la confluence. Si le rôle répresseur d'ERα est étroitement associé au niveau d'expression de la protéine, alors ce dernier doit être maximal lorsque les cellules sont à 100% de confluence. Nos résultats ne sont donc valables que dans ces conditions de forte confluence. Il est probable qu'à faible confluence, lorsque les cellules MCF7 sont en phase de croissance, ce rôle répresseur soit réduit et que seul l'effet potentialisateur de la prolifération (rôle inducteur) en présence de son ligand soit effectif. Ce rôle potentialisateur du récepteur est abondamment décrit dans la littérature. De nouvelles expériences devront être réalisées afin d'étudier en détail la balance entre le rôle répresseur (levé par l'œstradiol) et le rôle potentialisateur du récepteur (induit par l'œstradiol) en fonction de la confluence cellulaire.

Lors de notre étude, nous avons mesuré, à l'aide du marquage de PCNA, le pourcentage de cellules en phase S. Les variations de ce pourcentage ne sont pas nécessairement associées à des variations de prolifération cellulaire. La prolifération correspond en effet à une balance entre le taux de division cellulaire et le taux de mort cellulaire. Une mesure de l'apoptose cellulaire devra donc être réalisée après réduction de l'expression de ERα à l'aide de SiARN. Le récepteur ayant un rôle protecteur contre l'apoptose, il est probable que l'augmentation du pourcentage de cellules en phase S observée après transfection des siER soit compensée par une augmentation de l'apoptose.

Nous montrons une corrélation entre la concentration nucléaire de ERα et la surface d'étalement de la cellule exprimant le récepteur. Plus une cellule est étalée moins elle exprime de récepteur. L'étalement de la cellule à son support est une étape essentielle à la prolifération et la migration cellulaire. Par son action sur l'expression de ERα, elle pourrait participer à la levée de l'effet répresseur du récepteur. Corroborant cette hypothèse, nous observons que la

surface d'étalement des cellules en phase S est en moyenne plus grande dans les cellules contrôles ou traitées au 4OHT présentant des taux élevés en récepteur, que dans les cellules stimulées à l'œstradiol arborant de faible quantité d'ERα. L'étude de la surface d'étalement des cellules en phase S après modulation de l'expression de ERα à l'aide de SiARN et de vecteur d'expression permettra de valider ou pas cette hypothèse.

Il est intéressant de se pencher sur les effets de l'E2. Nous montrons que l'ajout d'E2 dans le milieu de culture contribue à homogénéiser le profil d'expression de ERα dans les cellules MCF7 à confluence. La concentration nucléaire en ERα devient constante et ne diminue plus lorsque les cellules grandissent. D'autre part, cette concentration est fortement diminuée par rapport à la concentration que l'on retrouve dans des cellules contrôles ou traitées au 4OHT. Ces observations nous amènent donc à réfléchir au rôle d'E2 dans ce mécanisme. Puisque l'activation du récepteur par l'E2 entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire, la baisse du récepteur et l'homogénéisation de son expression constaté après le traitement à l'E2 contribuent vraisemblablement à l'entrée des cellules en phase S. Deux hypothèses existent concernant le rôle répresseur d'ERα en présence d'œstradiol. La première suppose qu'E2 lève l'effet répresseur induit par ERα sous sa forme apo. Dans la deuxième hypothèse, l'effet répresseur du récepteur est conservé en présence de son ligand naturel. La diminution de la concentration en récepteur observée après l'ajout d'E2 dans le milieu de culture contribue à diminuer l'effet répresseur d'ERα, permettant à l'effet potentialisateur du récepteur en présence de son ligand de prendre le pas sur l'effet répresseur. Actuellement, nos données ne nous permettent pas de trancher entre ces deux hypothèses. Il serait intéressant d'approfondir la question afin de mieux comprendre les mécanismes de résistance d'ERα aux hormonothérapies que l'on retrouve dans certains cancers du sein.

Le dernier point de notre étude montre que la diminution de la concentration en ERα lorsqu'une cellule s'étale est vraisemblablement due à l'augmentation des forces de tensions mises en place au cours de l'étalement. Ces forces de tension résultent de l'activité de protéines particulières, les RhoGTPases Rho et Rac (Vogel and Sheetz, 2006). Les RhoGTPases comprennent environ 20 types de protéines, dont trois ont été particulièrement étudiées : les Rho(A/B/C), les Rac1/2 et les Cdc42 (Schaefer *et al.*, 2014). Nous n'avons ici travaillé que sur les effets des Rho et des Rac. Comme le montre la figure 5C, ces deux types de protéines ont des rôles spécifiques dans la mise en place des forces de tensions. Les RhoGTPases Rho (RhoA, B et C) participent à la contraction de la cellule et à la régulation des forces de tension appliquées au substrat. Leur inhibition par des drogues spécifiques augmente et stabilise la concentration nucléaire d'ERα. L'activation des protéines Rho lors de

l'étalement des cellules au support est donc en partie responsable de la diminution de la quantité d'ERα dans ces cellules. Les protéines Rho pourraient avoir un rôle essentiel dans la levée du rôle répresseur d'ERα. Afin de confirmer cette hypothèse, l'impact d'une inactivation de Rho sur la rentrée des cellules MCF7 dans le cycle cellulaire devra être étudié.

La protéine Rac semble également être importante dans le contrôle de l'expression d'ERα. L'inhibition de Rac à l'aide de la drogue spécifique NSC 23766 homogénéise l'expression d'ERα. Les cellules présentent globalement toutes la même concentration en ERα. Mais surtout, l'inhibition de Rac diminue la quantité d'ERα par cellule. Rho et Rac ont donc des effets opposés sur le niveau d'expression d'ERα.

En 2001, Su *et al*. ont montré que l'inactivation des RhoGTPases Rho et Rac contribue à augmenter l'activité transcriptionnelle d'ERα. Nos propres résultats démontrent que l'inactivation des RhoGTPases Rho et Rac a des effets opposés sur l'expression d'ERα. La confortation de ces deux résultats semble donc indiquer une absence de corrélation entre le niveau d'expression d'ERα et son activité de transactivation.

Les résultats que nous obtenons sont novateurs dans la mesure où ils ouvrent la voie à de nouvelles hypothèses concernant le fonctionnement du récepteur aux œstrogènes ERα. En considérant la multitude des fonctions des récepteurs aux œstrogènes dans les différents organes, un nouveau champ d'étude s'ouvre. A l'avenir, il sera intéressant d'étudier l'effet répresseur d'ERα au cours de la transformation tumorale des cellules épithéliales mammaires en s'intéressant particulièrement aux mécanismes de résistance endocrinienne. L'identification du mécanisme moléculaire permettant à ERα d'inhiber la prolifération en absence de son ligand E2 devra également être entreprise.

## Remerciements

Je souhaiterai remercier le docteur Gilles Flouriot pour son encadrement et ses conseils tout au long du stage. Je souhaiterai également remercier l'ensemble des membres de l'équipe 6 de l'Irset, qui m'ont accueilli avec gentillesse et m'ont aidé à avancer dans mon projet.

## Bibliographie


Arnal, J.-F., Lenfant, F., Metivier, R., Flouriot, G., Henrion, D., Adlanmerini, M., Fontaine, C., Gourdy, P., Chambon, P., Katzenellenbogen, B., et al. (2017). Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. Physiol. Rev. *97*, 1045–1087.

Caizzi, L., Ferrero, G., Cutrupi, S., Cordero, F., Ballaré, C., Miano, V., Reineri, S., Ricci, L., Friard, O., Testori, A., et al. (2014). Genome-wide activity of unliganded estrogen receptor-α in breast cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *111*, 4892–4897.

Dechering, K., Boersma, C., and Mosselman, S. (2000). Estrogen Receptors alpha and beeta Two Receptors of a Kind. Curr. Med. Chem. *7*, 561–576.

Hall, J.M., and McDonnell, D. P. (2005). Coregulators in Nuclear Estrogen Receptor Action: From Concept to Therapeutic Targeting. Mol. Interv. *5*, 343–357.

Jeselsohn, R., Cornwell, M., Pun, M., Buchwalter, G., Nguyen, M., Bango, C., Huang, Y., Kuang, Y., Paweletz, C., Fu, X., et al. (2017). Embryonic transcription factor SOX9 drives breast cancer endocrine resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. *114*, E4482–E4491.

Kurebayashi, J., Otsuki, T., Kunisue, H., Tanaka, K., Yamamoto, S., and Sonoo, H. (2000). Expression Levels of Estrogen Receptor-α, Estrogen Receptor-β, Coactivators, and Corepressors in Breast Cancer. Clin. Cancer Res. *6*, 512–518.

Lavinsky, R.M., Jepsen, K., Heinzel, T., Torchia, J., Mullen, T.-M., Schiff, R., Del-Rio, A.L., Ricote, M., Ngo, S., and Gemsch, J. (1998). Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. *95*, 2920–2925.

Mérot, Y., Ferrière, F., Gailhouste, L., Huet, G., Percevault, F., Saligaut, C., and Flouriot, G. (2009). Different Outcomes of Unliganded and Liganded Estrogen Receptor-α on Neurite Outgrowth in PC12 Cells. Endocrinology *150*, 200–211.

Ridley, A.J. (2001). Rho GTPases and cell migration. J. Cell Sci. *114*, 2713.

Russo, J., and Russo, I.H. (2006). The role of estrogen in the initiation of breast cancer. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *102*, 89–96.

Schaefer, A., Reinhard, N.R., and Hordijk, P.L. (2014). Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation. Small GTPases *5*, e968004.

Schmoller, K.M., Turner, J.J., Kõivomägi, M., and Skotheim, J.M. (2015). Dilution of the cell cycle inhibitor Whi5 controls budding-yeast cell size. Nature *526*, 268–272.

Sørlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., et al. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc. Natl. Acad. Sci. *100*, 8418–8423.

Vogel, V., and Sheetz, M. (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *7*, 265–275.

Yi, P., Driscoll, M.D., Huang, J., Bhagat, S., Hilf, R., Bambara, R.A., and Muyan, M. (2002). The Effects of Estrogen-Responsive Element- and Ligand-Induced Structural Changes on the Recruitment of Cofactors and Transcriptional Responses by ERα and ERβ. Mol. Endocrinol. *16*, 674–693.

| | |
|---|---|
| | Diplôme : Ingénieur Agronome<br>Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire<br>Spécialisation / option :<br>Enseignant référent : Jean-Marc Fraslin |


| | |
|---|---|
| Auteur(s) : DEVIDAL Kévin<br><br>Date de naissance* : 03/06/1995 | Organisme d'accueil : Irset (UMR 1085)<br>Adresse : 9 avenue du Prof. Léon Bernard 35000 RENNES |
| Nb pages : 20 Annexe(s) : 0 | |
| Année de soutenance : 2018 | Maître de stage : Dr. Gilles Flouriot |


**Titre français :** *Etude d'un rôle répresseur de la forme apo d'ERα dans le contrôle de la prolifération cellulaire*

**Titre anglais :** *Study of a repressive effect of unliganded ERα in the regulation of cells proliferation*


**Résumé (1600 caractères maximum) :**

Le récepteur aux œstrogènes est la cible des traitements classiques utilisés contre les cancers du sein ER+. Il est cependant très fréquemment observé que les cellules deviennent résistantes à ces traitements, entraînant ainsi la dédifférenciation des cellules cancéreuses et l'acquisition d'un phénotype plus agressif. Certaines publications suggèrent que le récepteur ERα à un rôle répresseur de la prolifération cellulaire lorsqu'il n'est pas lié à son ligand E2. Par des études classiques de Western Blot et RT-PCR nous allons mettre en évidence ce rôle répresseur joué par ERα, et nous montrerons par immunofluorescence quels mécanismes semblent contribuer à lever de ce rôle répresseur. Nous suggérons ici que l'initiation de la division cellulaire est liée à la diminution de la concentration en ERα lorsque la cellule grandit. Ce mécanisme n'est pas dû à un phénomène de dilution du récepteur lorsque la cellule grandit, mais est lié à l'activité des RhoGTPases, qui régulent les forces de tension appliquées à la cellule.

**Abstract (1600 caractères maximum) :**

Estrogen receptor is the target of classic therapies used against ER+ breast cancers, however, it is often observed that cancerous cells become resistant to these treatments, leading to the dedifferentiation of cancerous cells and the acquisition of a more aggressive phenotype. Some publications suggest that ERα has a repressive effect on proliferation when it is not bonded to its ligand E2. With Western blot and RT-PCR we'll analyse this repressive effect of ERα and we also suggest with immunostaining how this effect is removed. The removal of this repressive effect allowing the initiation of cells division is correlated to the decrease of ERα concentration in the nucleus when the cells are spreading. This mechanism isn't due to a phenomenon of dilution but is linked to the activity of RhoGTPase which control tension forces applied on the membrane and on the substrate of the cell.



**Mots-clés :** Récepteur aux œstrogènes, prolifération, effet répresseur, Rho GTPases

**Key Words:** Estrogen receptor, proliferation, repressive effect, RhoGTPases