



HAL
open science

Etude du facteur de transcription précoce EGR1 dans l'effet anti-prolifératif des ligands de PPARgamma sur les cellules cancéreuses mammaires

Sarra Chbicheb

► **To cite this version:**

Sarra Chbicheb. Etude du facteur de transcription précoce EGR1 dans l'effet anti-prolifératif des ligands de PPARgamma sur les cellules cancéreuses mammaires. Cancer. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2011. Français. NNT : 2011NAN10039 . tel-01320531v2

HAL Id: tel-01320531

<https://hal.science/tel-01320531v2>

Submitted on 24 May 2016

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

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

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE
Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Sarra CHBICHEB**

**Etude du facteur de transcription précoce EGR1 dans l'effet
antiprolifératif des ligands de PPAR γ sur les cellules cancéreuses
mammaires**

Soutenance prévue le 22 Juin 2011

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mme Martine DUTERQUE-COQUILLAUD (Chargée de Recherches, CNRS, Lille)

Mr Jean-François BODART (Professeur, Université de Lille 1)

Examineurs :

Mme Marie-Christine RIO (Directrice de Recherches, INSERM, Strasbourg)

Mr Norbert LATRUFFE (Professeur, Université de Bourgogne)

Mlle Sabine MAZERBOURG (Maître de Conférences, Co-directrice de thèse, UHP)

Mr Stéphane FLAMENT (Professeur, Directeur de thèse, UHP)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mr le Professeur Stéphane Flament, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour mon Master puis pour cette thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée. Je le remercie aussi en tant que mon directeur de thèse, ainsi que Mlle Sabine Mazerbourg, ma co-directrice de thèse, pour avoir assuré l'encadrement scientifique et technique de cette thèse, mais surtout pour leur disponibilité, leur rigueur et leurs conseils au cours de la rédaction de ce manuscrit. J'ai beaucoup apprécié vos qualités humaines.

J'exprime tous mes remerciements aux membres du jury, Mme Martine Duterque-Coquillaud, Chargée de Recherches CNRS, Mr Jean-François Bodart, Professeur à l'Université de Lille 1, Mme Marie-Christine Rio, Directrice de Recherches CNRS et Mr Norbert Latruffe, Professeur à l'Université de Bourgogne, pour avoir accepté de participer à ma soutenance de thèse et de juger mon travail.

Ce travail est bien sûr le fruit de plusieurs collaborations :

Je remercie l'équipe des chimistes du Docteur Yves Chapleur (UMR CNRS 7565, UHP). Un remerciement particulier à Michel Boisbrun pour sa gentillesse et pour l'intérêt qu'il porte à nos recherches.

J'exprime aussi mes remerciements au Professeur Jean-Luc Rodeau pour m'avoir accueillie à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives de Strasbourg (CNRS UPR-3212) et de m'avoir initié à la technique du dosage de calcium par imagerie.

Je remercie le Professeur Gerald Thiel, directeur du département de Biologie Moléculaire et de Biochimie Médicale au centre hospitalier universitaire de la Sarre à Homburg pour sa collaboration. Je remercie tous les membres du laboratoire pour leur accueil mais plus particulièrement Oliver Rössler et Daniel Spohn.

Merci à Nicolas Etique (mon encadrant de M1, aujourd'hui Maître de conférence à Reims. Et oui, ça passe vite !) de nous avoir fourni les cellules MCF-10A au moment où je n'espérais plus.

Je remercie également tous les membres du laboratoire, pour leur accueil, leur bonne humeur et les moments conviviaux passés ensemble.

Je remercie particulièrement Angelina d'avoir été la meilleure « co-bureau » que je pouvais rêver et surtout amie. Pour deux thésardes commençant en même temps, notre relation a été exceptionnelle. Nos sorties ciné, concerts et resto japonais ont permis d'égayer quelques-unes de nos soirées.

Merci aussi à Hussein pour sa bonne humeur et à Imane de s'être toujours souciée de mon état physique et psychologique.

Je remercie également Martine Chillet pour sa sympathie, sa bonne humeur et son aide technique.

Je remercie aussi les Docteurs Isabelle Grillier-Vuissoz et Nadège Touche pour leurs conseils scientifiques, leur soutien et leur sympathie.

Chia-I, voilà déjà deux ans que tu as quitté le laboratoire...Ta nouvelle vie t'a amenée à t'éloigner de Nancy (ce que je regrette) mais je sais que notre amitié qui a dépassé les murs de l'ancienne EA3442, ne s'est pas arrêtée et ne s'arrêtera pas à quelques milliers de kilomètres! J'ai été très heureuse de partager mes débuts de thèse avec toi, merci pour tes encouragements et ton soutien. Je te souhaite tout le bonheur que tu mérites pour ta nouvelle vie à Cincinnati...Bonne chance pour la suite.

Mes remerciements vont aussi à ma famille et mes ami(e)s qui, avec ces questions récurrentes « t'as publié ? Quand est-ce que tu soutiens ta thèse ? », bien qu'angoissantes en périodes de doutes, ont permis de ne jamais dévier de l'objectif final.

Je dédie cette thèse à ma famille Chbicheb/Faqir, particulièrement à ceux qui ont cru en moi et demandé souvent des nouvelles de mon travail.

A maman et papa, à qui je dois tout, vous m'avez toujours soutenue, supportée et remotivée. Merci pour votre amour et votre confiance. Vous avez toujours pris pour mes frères et moi les bonnes décisions aux bons moments. Sans vous, je n'aurais jamais pu envisager d'effectuer un tel parcours. Un grand merci aussi à mes frères, Choai'b alias Joachim et Zakaria. Je sais que vous m'aimez et que vous êtes fiers de moi. Je vous aime tous très fort.

Il y a beaucoup de personnes que je voudrais remercier, pour tout ce qui n'était pas la thèse pendant ces années de thèse. J'aimerais remercier tous ceux avec qui il est bon d'oublier les activités professionnelles, ceux qui sont capables en un week-end de donner l'impression d'avoir passé au moins une semaine de vacances.

Merci à Fadwa pour nos années d'amitié. Merci pour nos week-ends parisiens et surtout de m'avoir présenté les membres du groupe 1001-nuits (Ibrahim, Anir, Assim, Nissrine, Samira, Mouna, Redouane, Khalid, Moad, Rachid, Selma, Simo, Ahmed...). Merci à tous pour votre accueil. Le camping à Saint-Malo et le week-end à Venise resteront de très bons souvenirs.

Enfin, merci à mes ami(e)s de Fac. A Greg et Estelle pour nos soirées resto et surtout nos vacances londoniennes ainsi qu'à mes deux couples préférés, Fouz-youness & future maman Emilie-guéno pour les bons moments passés ensemble, cérémonie de mariage, vacances et week-ends de « décompression ». Je regrette beaucoup votre départ de Nancy.

Abréviations

%	: pourcentage
°C	: Degré Celsius
µg	: microgramme
µL	: microlitre
µORF	: micro open reading frame
15d-PGJ2	: 15-deoxy-Δ12,14-Prostaglandine J2
aa	: acide aminé
ACE	: Carcinoembryonic antigen
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF	: Activating function
AIF	: Apoptosis inducing factor
AJCC	: American Joint Committee on Cancer
AML	: Actine musculaire lisse cKit
AMPc	: Adénosine monophosphate cyclique
AP	: Activating protein
APO-1	: Apoptosis antigen-1
AR	: Androgen receptor
ARA70	: Androgen receptor (AR)-associated coregulator 70
ARE	: Antioxydant response element
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
AS	: Asparagine synthase
ASK1	: Apoptosis signal-regulating kinase 1
AT	: Ataxia-telangiectasia
ATCC	: American Type Culture Collection
ATF	: Activating transcription factor
ATP	: Adénosine triphosphate
AUC	: Area Under the Curve
BADGE	: Bisphenol Acid Diglycide Ether
BAPTA-AM	: N,N,N',N'-tetraacetic acid acetoxymethyl ester
BC1	: Breast cancer 1
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
BCR	: B-cell receptor
BiP	: Binding immunoglobulin protein
Bmk1	: Big MAP kinase
BNIP3L	: BCL2/adenovirus E1B 19kDa Interacting Protein 3-like
BRCA	: Breast cancer gene
BSA	: Sérum albumine bovine
bZIP	: basic leucine zipper
CA	: Cancer antigen
Ca ²⁺	: Calcium
CaM	: Calmoduline
CaMK	: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase
Cat-1	: Cationic amino acid transporter-1 gene
CBF	: CCAAT-binding factor
CBP	: CREB binding protein

CD95	: Cluster of differentiation 95
CD95L	: CD95 ligand
cdk	: cyclin-dependent kinase
CEA	: Carcino embryonic antigen
CGZ	: Ciglitazone
CHAC1	: ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli)
CHOP	: CEBP homologous protein
Cip1	: Cdk2 inhibiting protein
CK II	: Casein kinase II
CK	: Cytokératines
COX	: Cyclooxygenase
CRE	: cAMP responsive element
CREB	: cAMP responsive element binding protein
CREB-RP	: cAMP-response-element-binding protein (CREB)-related protein
CREM	: CRE modulator
CSC	: Cellules souches cancéreuses
CSN	: Cellules souches normales
CXCL9	: Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
Cyfra 21-1	: Cytokeratin-21-Fragment
DZGT-2	: Denozatilgort-2
DAG	: Diacylglycérol
DBD	: DNA binding domain
DDIT3	: DNA-damage-inducible transcript 3
DDT	: Dichlorodiphényltrichloroéthane
Ddx20	: DEAD box protein 20
DEPC	: Diethyl pyrocarbonate
DMEM	: Dubelcco's modified essential medium
DMSO	: diméthylsulfoxyde
DNAJB9	: DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9
dNTP	: Désoxynucléoside triphosphate
DO	: Densité optique
DOC	: Downstream of CHOP
DR	: Direct repeat
DRIP	: Vitamin D receptor interacting protein
dsRNA	: Double-stranded RNA
DTT	: Dithiotréitol
E2F1	: Elongation factor of E1A virus
EBS	: EGR1 binding site
EC50	: Half maximal effective concentration
ECD	: Extra cellular domain
ECL	: Electrochimiluminescence
EDEM	: ER degradation-enhancing-mannosidase-like protein
EGF	: Epidermal growth factor
EGFR	: Epidermal growth factor receptor
EGR1	: Early growth response gene 1
EGTA	: Ethylene glycol tetraacetic acid
eIF2	: Eukaryotic translation initiation factor 2
Elk-1	: Ets-like transcription factor
ER	: Estrogen receptor
ERAD	: ER-associated protein degradation

erbB-2 : v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
 ERdj4 : Endoplasmic reticulum-localized DnaJ homologue
 ERE : Estrogen response element
 ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinases 1/2
 ERN1 : Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1
 ERO1 α : Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1- α
 ERSE : ER stress-response element
 ESE-1 : Epithelium specific ETS factor
 ETS-1 : E26 Transformation-specific Sequence-1
 FADD : Fas associated protein with death domain
 FasL : Fas ligand
 FATP : Fatty acid transport protein
 FDA : Food and drug administration
 FGF : Fibroblast growth factor
 FLIP : (FLICE (FADD-like IL-1-converting enzyme) inhibitory protein)
 Flk : Fetal liver kinase
 Flt-1 : Fms-like tyrosine kinase 1
 Fra-1 : Fos-related antigen 1
 FSH : Follicle-stimulating hormone
 Fura-2 AM : Fura-2-acetoxymethyl ester
 GADD34 : Growth arrest and DNA-damage-inducible protein
 GADD45A : Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
 GATA 3 : GATA-binding protein 3
 GCN : General control of nitrogen metabolism
 GDF15 : Growth differentiation factor 15
 GDP : Guanosine diphosphate
 Gemin : Gem (nuclear organelle) associated protein
 GLS : Golgi localization signal
 GLUT : Glucose transporter
 GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
 GRP78 : Glucose regulated protein 78
 GTTP : Guanosine triphosphate
 H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
 Hac1 : acronym of homologous to ATF/CREB 1
 HAT : Acétyl-transférase
 hCG : Gonadotrophine chorionique humaine
 HDAC : Histone deacetylase
 HEK293 : Human embryonic kidney cell line
 HER : Human epidermal growth factor receptor
 HERP : Homocysteine responsive protein
 HERPUD1 : Homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1
 hGM-CSF : Human granulocyte macrophage colony stimulating factor
 HNF 3 : Hepatocyte nuclear factor 3
 HODE : Acide hydroxyoctadécadiénoïque
 HPA : Héparanase
 HRI : Heme-regulated inhibitor
 Hsp : Heat shock protein
 HSPA5 : Heat shock 70 kDa protein 5
 hTERT : human telomerase reverse transcriptase

IEG : Immediate-early response gene
 IFN γ : Interféron gamma
 IGF : Insulin like growth factor
 IGF-1R : Insulin-like growth factor 1 receptor
 INO1 : Inositol-1-phosphate synthase
 IP3 : Inositol-1,4,5-phosphate-receptor
 IRE 1 : Inositol requiring ER-to-nucleus signal kinase 1 ; inositol requiring kinase 1
 IRES : Internal ribosome entry site
 JAK/STAT : Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription
 JIK : c-Jun NH2-terminal inhibitory kinase
 JNK : c-Jun N-terminal kinase 1
 Kb : Kilo bases
 Kd : Constante de dissociation
 KDa : KiloDalton
 KDR : Kinase insert domain-containing receptor
 Keap1 : Kelch-like-Ech-associated protein 1
 KO : Knock out
 Krox : Krüppel box
 LBD : Ligand binding domain
 LH : Hormone lutéinisante
 LH-RH : Luteinizing hormone-releasing hormone
 LLC : Lewis lung carcinoma
 LPL : Lipoprotein lipase
 LTP : Potentialisation à long terme
 mA : Milliampère
 MALDI-TOF : Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight
 MAPK : Mitogen-activated protein kinase
 MCA : Mucin-like carcinoma-associated antigen
 MCF : Michigan cancer foundation
 MDG1 : Microvascular differentiation gene 1
 MEF : Mouse embryonic fibroblast
 MEK : MAPK/ERK kinase
 MIG : Monokine induced by Interferon- γ
 Min : minute
 mL : millilitre
 mM : Millimolaire
 mm³ : millimètre cube
 MMLV : Moloney murine leukemia virus
 MMP : Matrix metalloprotease
 MPZ : Myelin protein zero
 MUC1 : Polymorphic epithelial mucine
 MYB : Myeloblastosis viral oncogene homolog
 NAB : NGFI-A-binding protein
 NCD : NAB conserved domain
 NCoR : Nuclear receptor corepressor
 NCX : Na⁺-Calcium-Exchanger
 NDRG1 : N-myc downregulated gene 1
 NF-Y : Nuclear factor Y
 NF- κ B : Nuclear factor kappa B
 NGF : Nerve growth factor

NGFI	: Nerve growth factor induced gene
NK	: Natural killer
NLS	: Nuclear localisation signal
nm	: Nanomètre
nM	: nanomolaire
NMDA	: N-methyl-D-aspartate
NPM1	: NucleophosMin 1
NR1C	: Nuclear receptor subfamily 1
Nrf2	: NF-E2 related factor 2
NSAID	: Non steroidal anti-inflammatory drugs
O-GlcNAc	: O-linked β -N-acetylglucosamine
OK	: Opossum kidney
OMS	: Organisation mondiale de la santé
OsO ₄ ⁻	: Tétraoxyde d'osmium
PAI-1	: Plasminogen activator inhibitor-1
PAR	: Protease-activated receptor
PARP	: Poly (ADP-ribose) polymerase
Pb	: Paire de bases
PBP	: PPAR binding protein
PBS	: Phosphate buffer saline
PCB	: Polychloro Biphényles
PCR	: Polymerase chain reaction : réaction de polymérisation en chaîne
PDGF	: Platelet-derived growth factor
PDI	: Protein disulfide isomerase
PERK	: double-stranded RNA-activated kinase (PKR)-like ER kinase
PGC-1	: PPAR γ coactivator-1
PGE2	: Prostaglandine E2
PGZ	: Pioglitazone
PHA	: Phyto-Hemagglutinin-A
PI3K	: PhosphoInositol-3-Kinase
PKA	: Protéine kinase A
PKC	: Protéine kinase C
PKG	: Guanosine monophosphate (cGMP)-dependent protein kinase
PKR	: Protein kinase dsRNA dependent
PLC	: Phospholipase C
PMA	: Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMCA	: Plasma-membrane-calcium-ATPase
PME	: Polymorphic epithelial mucine
PP1	: Protéine phosphatase 1
PPAR	: Peroxisome proliferator-activated receptor
PPI	: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
PPP1R15A	: Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A
PPRE	: PPAR-responsive element
PR	: Progesterone receptor
pRb	: protéine du retinoblastoma
PRC8	: Proteasome component C8
PRIC	: PPAR-interacting cofactor
PSA	: Prostate-specific antigen
PTDM	: Post-transplant diabetes mellitus
PTEN	: Phosphatase and Tensin homolog

PTP1B	: Protein tyrosine phosphatase 1B
q	: Bras long du chromosome
QSP	: Quantité suffisante Pour
Raf	: Murine leukemia viral oncogene homolog
Ras	: Viral oncogene homolog
Rb	: Retinoblastoma protein
RE	: Réticulum endoplasmique
Ref-1	: Redox factor-1
RGZ	: Rosiglitazone
RIP140	: Receptor interacting protein 140
RNAse	: Ribonucléase
ROCC	: Receptor-operated-calcium-channels
ROS	: Reactive oxygen species
RPLPO	: Human acidic ribosomal phosphoprotein
RT	: Reverse transcription : Transcription inverse
RTK	: Récepteur tyrosine kinase
RXR	: Retinoid X receptor
RyR	: Ryanodine
S1P	: Site-1 Protease
S2P	: Site-2 Protease
SAHA	: Suberoylanilide hydroxamic acid
SAPK	: Stress activated protein kinase
SCF	: Skp1/Cul1/F-box protein
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	: Sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sec	: seconde
SENP	: Sentrin-specific protease
SERCA	: Sarco/Endoplasmic-reticulum-Ca ²⁺ -ATPase
SH	: Src homology
shRNA	: short hairpin RNA
siRNA	: small interfering RNA
Skp2	: S-phase kinase-associated protein 2
SMRT	: Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor
SOCC	: Store-operated-calcium-channels
Sp1	: GC-box binding protein: Specificity protein 1
SPARM γ	: Selective PPAR modulators γ : Modulateurs sélectifs de PPAR γ
Src	: Avian sarcoma virus
SRC	: Steroid receptor coactivator
SRE	: Serum responsive element
SRF	: Serum responsive factor
STAT	: Signal transducer and activator of transcription
SUMO	: Small ubiquitin-related modifier
SVF	: Sérum de veau fœtal
TAD	: Transcriptional activation domain
TAE	: Tris acétate EDTA
Taq	: Thermus aquaticus
TBX2	: T-box-2
TCF	: Ternary complex factor
TCR	: T cell receptor
TFF1	: Trefoil factor family 1

Tg	: Thapsigargine
TGF	: Transforming growth factor
TGZ	: Troglitazone
TIMP	: Tissue inhibitors of metalloproteinases
TIS8	: TPA inducible sequence 8
TNF	: Tumor necrosis factor
TNM	: Tumor node metastases
TNT	: Tris-HCL, NaCl, Tween
TPA	: 12-O-tétradécanyl-phorbol-13-acétate
TPS	: Tissue polypeptide specific antigen
TRAF2	: TNF receptor-associated factor
TRAIL	: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRAP	: Thyroid hormone receptor-associated protein
TRE	: TPA responsive element
TZD	: Thiazolidinedione
UICC	: Union internationale contre le cancer
uORF	: upstream open reading frame
uPa	: urokinase plasminogen activator
UPR	: Unfolded protein response
UPRE	: Unfolded protein response element
UTR	: Untranslated region
UV	: Ultraviolet
V	: Volt
v	: Volume
VCIP	: Vascular endothelial growth factor and type I collagen inducible protein
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
VEGFR	: Vascular endothelial growth factor receptor
VOCC	: Voltage-operated-calcium-channels
VSMC	: Vascular smooth muscle cell
WAF1	: Wild type p53-activated fragment
WT1	: Wilm's tumor 1
XBP1	: X-box binding protein 1
ZENK	: acronyme Zif-268, egr1, ngfi-a et krox-24
zif268	: Zinc finger cDNA 68

Sommaire

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I : Le cancer du sein	1
I. Le sein normal : architecture et développement	1
1. Architecture	1
2. Développement.....	1
II. Le cancer du sein	2
1. Mécanisme de déclenchement tumoral.....	2
2. Développement tumoral, invasion et métastases.....	5
3. Anatomie pathologique des cancers du sein.....	8
III. Incidence, facteurs de risque et facteurs de survie	13
1. Incidence.....	13
2. Facteurs de risque.....	14
3. Facteurs pronostiques et survie.....	17
IV. Stratégies thérapeutiques	18
1. Chirurgie	18
2. Radiothérapie.....	18
3. Chimiothérapie	19
4. Hormonothérapie.....	19
5. Nouvelles stratégies thérapeutiques	21
PARTIE II : PPARγ et Cancer	23
I. Les peroxysomes et proliférateurs de peroxysomes	23
II. Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes	23
1. Le gène codant PPAR γ	24
2. La protéine PPAR γ	24
III. Distribution tissulaire et principaux rôles de PPARγ	28
IV. Le ligand PPARγ	31
1. Les ligands naturels	31
2. Les ligands synthétiques.....	32
V. Les effets anticancéreux des TZD	35
1. Les mécanismes cellulaires cibles des ligands de PPAR γ	35
2. Effets PPAR γ -indépendants.....	38
3. Essais cliniques des ligands de PPAR γ sur différents types de cancer.....	44

PARTIE III : EGR1 et cancer	47
I. Les gènes précoces immédiats (IEGs)	47
1. Définition des gènes précoces immédiats.....	47
2. Historique et terminologie.....	47
II. Les gènes de la famille EGR	48
1. Le gène EGR1.....	48
2. Le gène EGR2.....	56
3. Le gène EGR3.....	56
4. Le gène EGR4.....	56
III. Les protéines EGR	56
1. La protéine EGR1.....	57
2. La protéine EGR2.....	58
3. La protéine EGR3.....	58
4. La protéine EGR4.....	59
IV. Rôles des facteurs de transcription EGR dans les processus biologiques	59
1. Rôles du facteur de transcription EGR1.....	59
2. Rôles du facteur de transcription EGR2.....	63
3. Rôles du facteur de transcription EGR3.....	64
4. Rôles du facteur de transcription EGR4.....	65
V. Régulation post-traductionnelle de l'activité d'EGR1	65
1. Phosphorylation.....	65
2. Acétylation.....	66
3. Ubiquitination.....	66
4. Glycosylation.....	67
5. Oxydoréduction.....	67
6. SUMOylation.....	68
7. Les corépresseurs transcriptionnels NAB.....	68
PARTIE IV : Stress du réticulum et cancer	70
I. Réticulum endoplasmique	70
1. Réticulum endoplasmique et homéostasie calcique.....	70
2. Repliement protéique et contrôle qualité.....	71
3. La voie ERAD (ER-Associated Degradation).....	73
II. La réponse au stress du réticulum ou réponse UPR	74
1. Structure des transducteurs de la réponse UPR.....	75
2. Transduction du signal UPR.....	76
3. Voies de signalisation UPR.....	78
4. Interaction des différentes voies UPR.....	84

5. La voie apoptotique activée à partir du RE	84
III. Les inducteurs du stress du RE	86
IV. Le stress du réticulum : une cible thérapeutique	88
OBJECTIFS DE THESE	92
 RESULTATS	
I. Etude du facteur de transcription EGR1 dans l'effet antiprolifératif des ligands de PPARγ ..	92
1. Introduction	92
2. Résultats	93
3. Conclusions	95
4. Résultats complémentaires	96
II. Induction PPARγ-indépendante du stress du réticulum endoplasmique	99
1. Introduction	99
2. Résultats	100
3. Conclusion	103
III. EGR1 et induction PPARγ-indépendante du stress du réticulum endoplasmique	108
1. Introduction	108
2. Matériel et méthodes	109
3. Résultats	114
3.1. Effet des TZDs	114
3.2. Effet d'inducteurs de stress du RE	120
3.3. Calcium, MAPK et stress du RE	122
3.4. EGR1 et stress du RE	124
4. Conclusions/Discussion	126
4.1. Conditions de culture	126
4.2. Effets différentiels des thiazolidinediones	127
4.3. EGR1 et stress du RE	127
4.4. Calcium et stress du RE	129
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	130
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

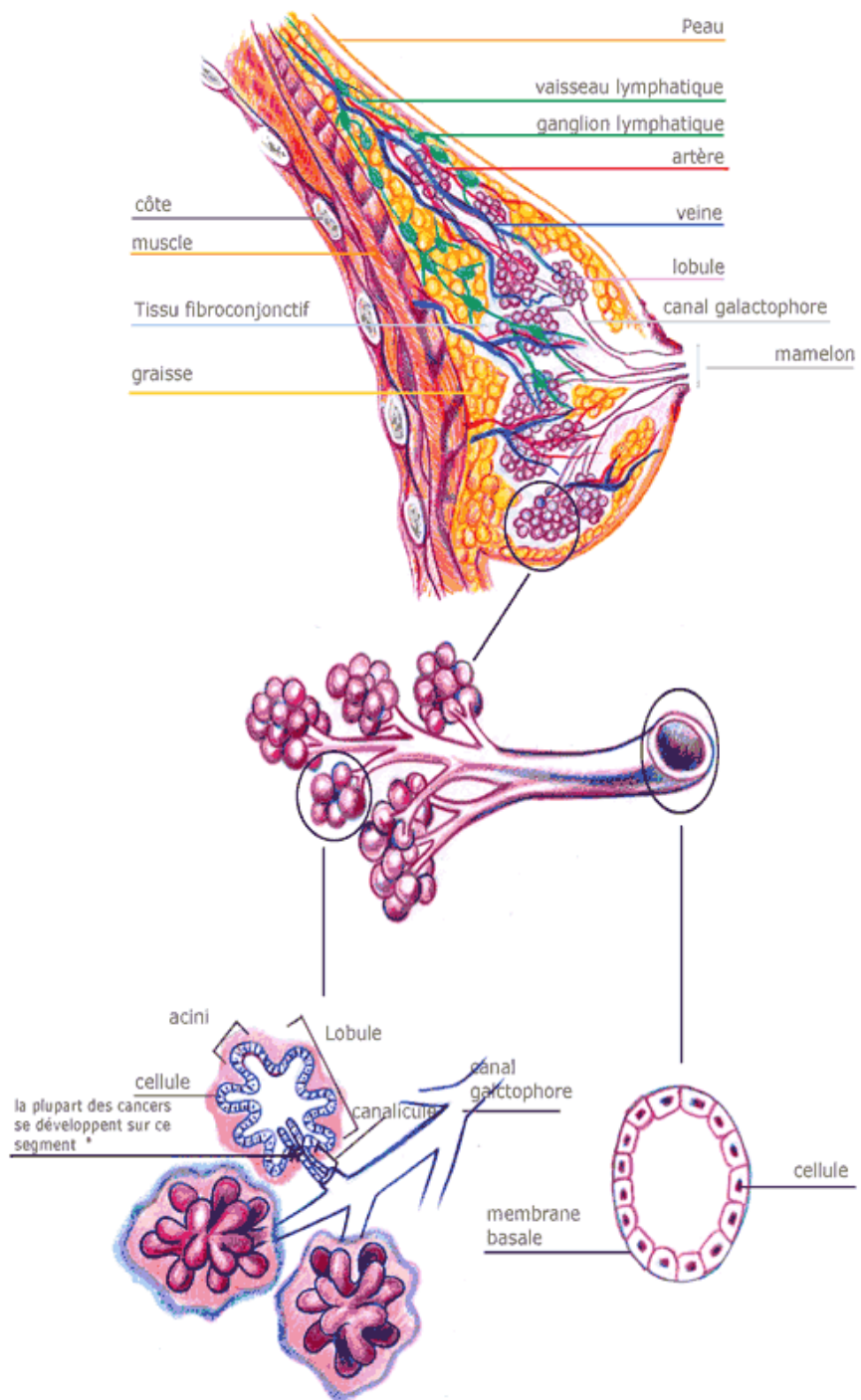


Figure 1 : Anatomie du sein et structure du réseau lobulo-alvéolaire.

PARTIE I : Le cancer du sein

I. Le sein normal : architecture et développement

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-mamelonnaire. 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.

2. Développement

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

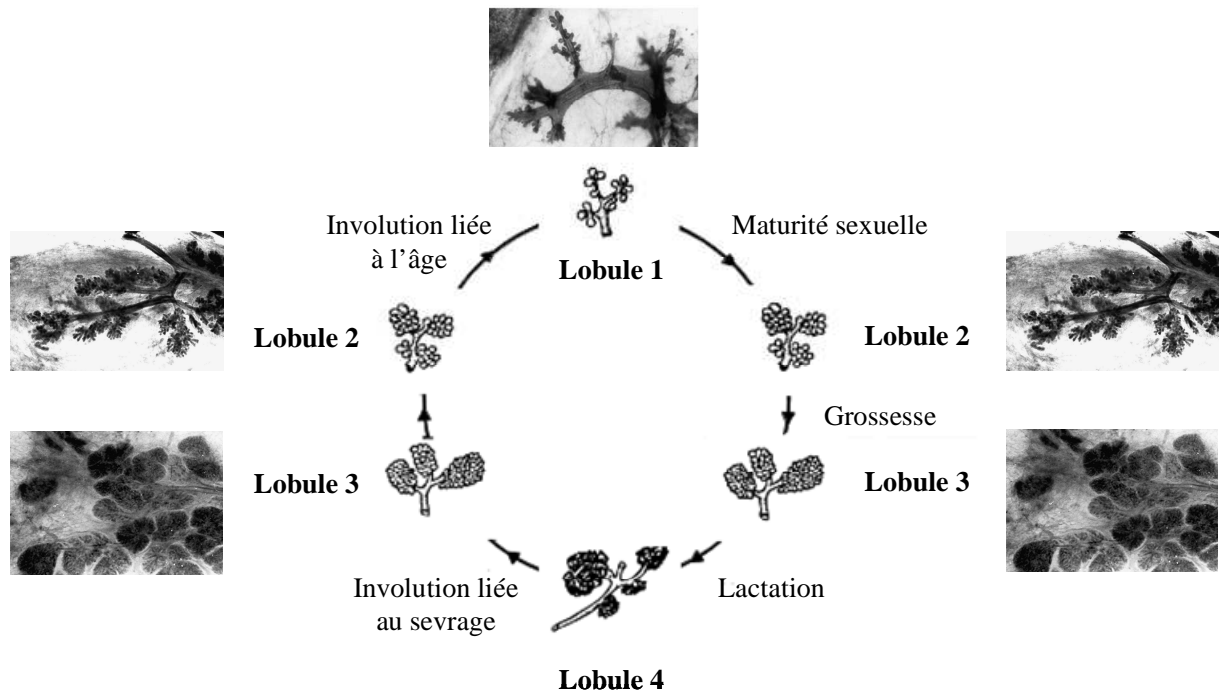


Figure 2 : Structure et développement des lobules mammaires (adapté de Russo et Russo, 1998).

mammaire est soumise à une alternance d'exposition aux œstrogènes (1^{ère} moitié du cycle) et à la progestérone (2^{ème} 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 Russo, 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 3^{ème} jour, la sécrétion grasseuse 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

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 génétiques sont héritées et prédisposent les individus à développer ce type de

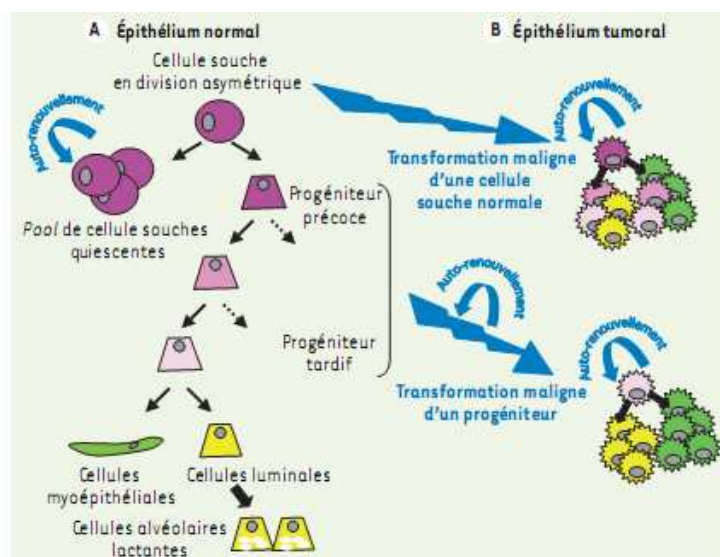


Figure 3 : Différenciation de l'épithélium mammaire normal et tumoral. **A.** Le pool de cellules souches de l'épithélium mammaire normal (CSN) est globalement dans un état quiescent. Une CSN peut se diviser de façon asymétrique afin de donner naissance à une cellule souche identique à la cellule d'origine grâce à la propriété d'auto-renouvellement, et une cellule progénitrice engagée dans la voie de la différenciation. **B.** Lors de l'oncogénèse, 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 (d'après Ginestier et al., 2007).

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

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

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 Weinberg, 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, 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, vont 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, 2005).

Les oncogènes et les anti-oncogènes jouent un rôle prépondérant dans la carcinogénèse mammaire (**Tableau 1**). Les oncogènes sont des gènes qui, activés ou surexprimés, induisent des signaux de prolifération cellulaire. Les anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs,

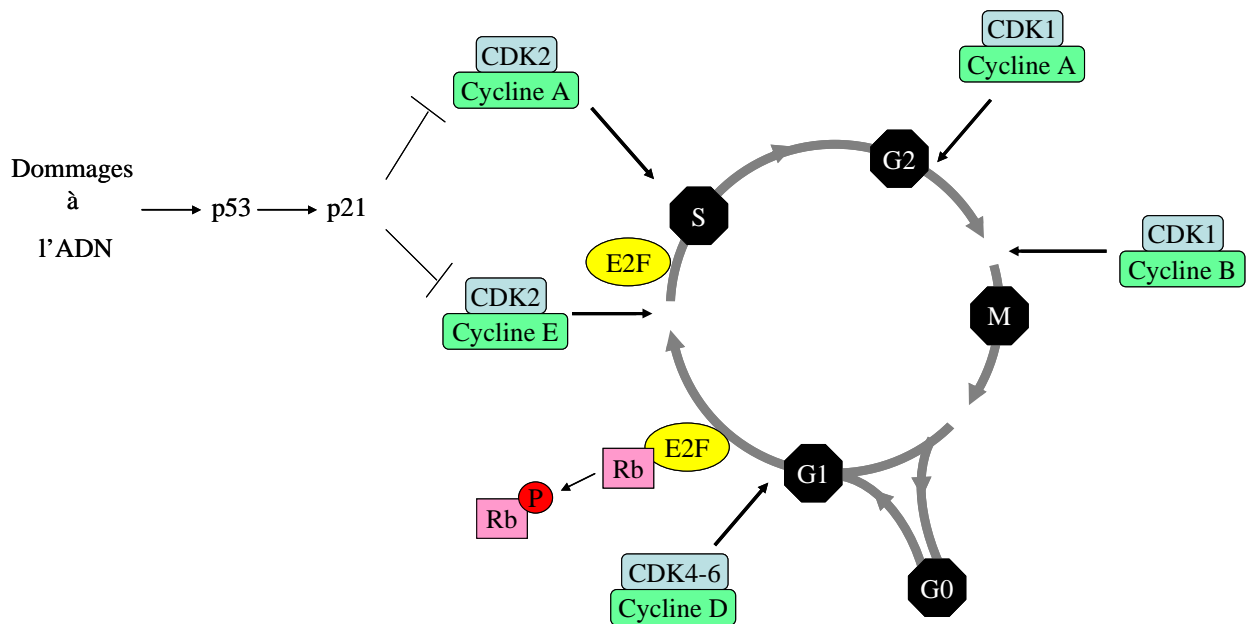


Figure 4 : Schéma simplifié du cycle cellulaire et de quelques régulateurs. Chaque phase du cycle cellulaire est régulée par un ou plusieurs complexes cdk/cycline. La protéine du rétinoblastome (Rb) à l'état hypophosphorylé bloque le cycle cellulaire en phase G1 via la séquestration du facteur de transcription 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 initier la transcription de gènes codant des enzymes de réplication de l'ADN. La cellule entre alors en 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-ci se lie aux complexes cycline/ckd de la phase G1 inhibant ainsi leur activité kinase pour Rb, le cycle cellulaire est alors arrêté.

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 HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2), connu également sous le nom de erbB2, 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 celles des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et de la PI3K/Akt (Phosphoinositol-3-Kinase/Akt). Cela favorise la prolifération cellulaire, l'angiogénèse, 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 Band, 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 la 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 de certaines cdk (cyclin dependent kinase). En début de phase G1, pRb n'est pas phosphorylée puis subit 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 complètement phosphorylée et ne peut plus interagir avec E2F. Ce dernier est alors libéré et permet la transcription des gènes nécessaire à la réalisation de la phase S. La phosphorylation de pRb suit l'apparition des complexes cycline/ckd. 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/ckd2 qui phosphoryle pRb sur des sites différents de ceux utilisés par cdk4. Les complexes cyclineA/ckd2 et cycline B/ckd1 permettraient de maintenir pRb dans un état phosphorylé (**Figure 4**).

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 et 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, (Wild type p53-activated fragment/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 Band, 1999). Les gènes BRCA1 et BRCA2 sont également des anti-oncogènes, codant des protéines impliquées dans la réparation des altérations de l'ADN qui, avec p53, sont à l'origine de la plupart des cancers du sein héréditaires.

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'angiogénèse 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 Hellman, 2000).

Angiogenèse tumorale

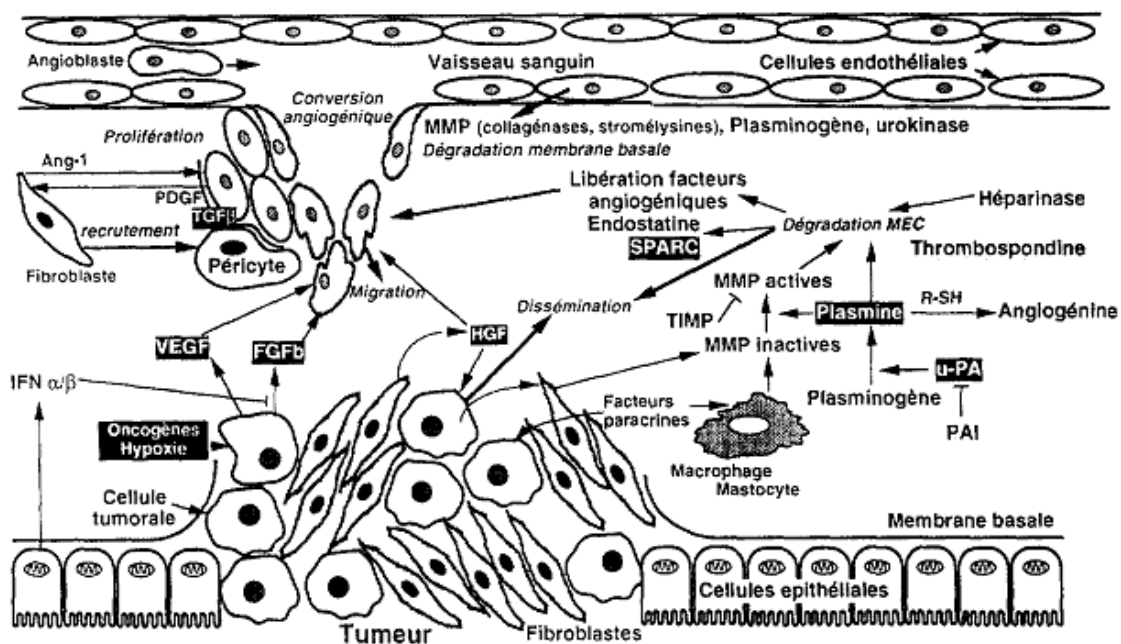


Figure 5: Interactions entre cellules endothéliales, cellules tumorales et stromales pendant l'angiogenèse et l'invasion tumorale (d'après Andre et al., 1998).

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, TNF α ...) et surtout des facteurs de croissance (TGF α , TGF β , EGF, β FGF, VEGF...) (Guinebretiere, 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 Myers, 2003). L'angiogénèse 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.

2.3. 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 sont également observés dans l'expression des intégrines, protéines permettant aux cellules de se lier aux différents substrats de la matrice extracellulaire. 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 Weinberg, 2000). La dégradation de la membrane

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, TNF α ...) et surtout des facteurs de croissance (TGF α , TGF β , EGF, β FGF, VEGF...) (Guinebretiere, 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 Myers, 2003). L'angiogénèse 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.

2.3. 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 sont également observés dans l'expression des intégrines, protéines permettant aux cellules de se lier aux différents substrats de la matrice extracellulaire. 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 Weinberg, 2000). La dégradation de la membrane

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

Tableau 3 : Classification de l'AJCC

basale, de la matrice extracellulaire ainsi que de toutes leurs protéines de structure est une caractéristique importante de l'invasion tumorale (**Figure 5**). 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 pronostic 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.

3. Anatomie pathologique des cancers du sein

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

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, extension locale), la présence de ganglions (N, extension loco-régionale) et la présence de métastases (M, extension à distance) (**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**).

3.2. Classification histologique

La classification histologique utilisée actuellement est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Elle classe les tumeurs en fonction de leur nature anatomopathologique.

➤ Les carcinomes non infiltrants

- Le carcinome intracanaulaire 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 mésoenchymateux ou

Luminales		HER2 ⁺	Basal-like
A	B	ER ^{+/-} PR ^{+/-}	HER2 ⁻ ER ⁻ PR ⁻ mutation p53 CK5/6, 14, 17 Vimentine c-kit P63 AML HER1 ⁺
Prolifération – ER ⁺ GATA3 HNF3 LIV-1 CK 7, 8, 18, 19	Prolifération + Faible expression mutation p53 HER2 ⁺		

Tableau 4 : Taxonomie moléculaire des tumeurs mammaires (d'après Lamy et *al.*, 2010).

sarcomes du stroma, les angiosarcomes, les lymphomes malins non hodgkiniens primitifs du sein.

3.3. Classification moléculaire

Les tumeurs du sein sont très hétérogènes et leur classification s'affine progressivement grâce à l'émergence d'analyses génomique, transcriptomique et protéomique à grande échelle. Perou et Sorlie ont proposé la première taxonomie moléculaire des cancers du sein. Elle a permis de classer la population en cinq types moléculaires : luminal A et B, HER2, « basal-like » et « normal-like ». Ce dernier type fut ensuite écarté car il correspondait à un biais de sélection de certaines tumeurs contaminées par du tissu mammaire non cancéreux. Ces génotypes tumoraux reflètent les profils d'expression génique des deux principales couches cellulaires du tissu mammaire normal : couches lumineales et basales/myoépithéliales.

Les tumeurs de type dit « luminal » expriment des gènes codant les protéines des cellules épithéliales proches de la lumière des canaux ou des lobules du sein. La lignée de cellules cancéreuses mammaires humaines MCF7 est de type luminal. Le type luminal A est le type qui exprime le plus fortement le récepteur aux estrogènes α (ER α), qui présente une forte expression de la GATA-binding protein 3 (GATA 3), de l'hépatocyte nuclear factor 3 (HNF 3), de LIV-1 et des cytokératines lumineales (CK) 7, 8, 18, 19. Le type luminal B présente une expression faible ou modérée des gènes spécifiques du type luminal, mais davantage de mutations de la protéine p53 que le type A. Ce type de tumeur se caractérise aussi par l'expression, dans certains cas, de l'oncogène HER2 et de marqueurs de prolifération.

Le type HER2⁺ correspond majoritairement au type n'exprimant pas ER et PR. Le type « basal-like » est associé aux cancers dits « triples-négatifs » qui sont ER⁻, PR⁻ et HER2⁻. La lignée de cellules cancéreuses humaines MDA-MB-231 est de type basal-like. 95% des tumeurs basal-like sont ER négatives, 82 % d'entre elles présentent une mutation de p53 et incluent les tumeurs où BRCA1 est muté. Elles expriment les cytokératines basales (CK) 5/6, 14, 17, la vimentine, p63, l'actine musculaire lisse (AML), cKit et HER1/EGFR (**tableau 4**). Ces deux derniers types regroupent les cancers de haut grade, d'index de prolifération élevé et représentent les cancers de plus mauvais pronostic. Contrairement aux tumeurs ER⁺ que l'on traite par thérapie hormonale d'une part, et aux tumeurs HER2⁺ pour lesquelles on utilise des thérapies ciblant HER2, il n'existe pas de thérapeutiques ciblées pour les patientes « triples-négatives ». Leur pronostic ne peut donc pas être amélioré. De nombreuses études cherchent donc à identifier de nouvelles options thérapeutiques plus appropriées pour ces patientes

(Perou et *al.*, 2000; Lamy et *al.*, 2010). Cependant, la grande hétérogénéité tumorale rend la classification établie par Perou et sorlie instable. En 2010, Gatzka et ses collègues ont démontré que les cancers du sein peuvent être divisés en 17 sous-groupes. Leur stratégie de classification est basée sur la dérégulation des voies de signalisation oncogéniques et de gènes suppresseurs de tumeur. Chaque sous-type, initialement proposé par Pérou et ses collègues peut être divisé en plusieurs sous-groupes avec des signalisations ER, PR, HER2, E2F1, AKT, PI3K, Ras, Src, CTNB, p53, p63, INF α , INF γ , TNF α , TGF β , STAT3, Myc ou EGFR distinctes. Il existe néanmoins une bonne corrélation entre ces voies de signalisation, permettant de définir ces sous-groupes et les 5 sous-types intrinsèques de cancers du sein. Chaque sous-groupe possède un profil d'altération chromosomique différent ainsi que des caractéristiques biologiques et cliniques distinctes (Gatzka et *al.*, 2010). Cette classification, à la fois descriptive et prédictive donne une autre dimension à la classification standard.

Les modifications génétiques et transcriptionnelles lors de la transformation cancéreuse et de la progression tumorale se traduisent par des altérations quantitatives et qualitatives des protéines présentes dans la tumeur, l'environnement péri-tumoral et les fluides biologiques. L'analyse protéomique permet l'étude globale des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles. Différentes technologies de séparation (électrophorèse bidimensionnelle sur gel et/ou chromatographie), d'identification (spectrométrie de masse MALDI-TOF) et de comparaison des protéines entre échantillons témoins et pathologiques (grâce à des logiciels informatiques) ont été appliquées à l'étude des tumeurs mammaires et des sérums de patientes atteintes d'un cancer du sein.

L'antigène carcino-embryonnaire ACE a été pendant longtemps le seul marqueur circulant utilisé. Il s'agit d'une protéine onco-fœtale présente à la surface du pôle apical des cellules épithéliales du sein dont la quantité est augmentée dans les tissus néoplasiques. Actuellement, les marqueurs les plus utilisés sont ceux qui mesurent le niveau circulant de MUC1 ou PME (Polymorphic Epithelial Mucine). MUC1/PME est une glycoprotéine transmembranaire, présente en faible quantité au niveau du pôle apical des cellules mammaires normales et dont l'expression est augmentée au cours de la transformation maligne. Sa localisation est aussi modifiée, elle se retrouve autour des cellules épithéliales ayant perdu leur polarité. Le test immunométrique Cancer Antigen CA 15-3 qui reconnaît un fragment de la MUC1/PEM est le principal test utilisé. D'autres tests immunométriques existent : mucin-like carcinoma-associated antigen (MCA), CA 27–29, CA 549 etc. Le dosage de MUC1/PEM ne permet pas le dépistage ou le diagnostic précoce mais il est utile au suivi de la maladie métastatique. D'autres marqueurs appartenant au groupe des kératines, telles que les kératines 8, 18 et 19,

qui sont exprimées dans les tissus épithéliaux et surtout produites au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire, constituant de ce fait un reflet de l'activité proliférative des tumeurs. Les TPA (tissue polypeptide antigen), TPS (tissue polypeptide specific antigen) ou Cyfra 21-1 (Cytokeratin-21-Fragment) sont des tests qui permettent la reconnaissance de molécules appartenant structurellement à la famille des cytokératines. Le TPA reconnaît les kératines 8, 18 et 19 ; le TPS reconnaît les kératines 8 et 18 et le Cyfra 21-1 reconnaît les kératines 8 et 19.

Plus récemment, la mesure d'une fraction circulante de c-erbB2/HER2 a été proposée comme marqueur pronostique des cancers mammaires surexprimant c-erbB2. La protéolyse du domaine extracellulaire du récepteur membranaire libère un domaine appelé ECD (extra cellular domain) qui est une glycoprotéine nommée p105. L'ECD soluble est quantifié dans le sérum des patientes par la technique Elisa grâce à des anticorps monoclonaux.

Par ailleurs, le dosage urinaire du facteur en trèfle 1 (pS2/TFF1) pourrait être utile dans le suivi des cancers du sein hormono-dépendants. En effet, il existe une bonne corrélation entre l'expression de pS2 par la tumeur et celle du récepteur aux œstrogènes. Il constitue un facteur prédictif de réponse à l'hormonothérapie et de bon pronostic. pS2 est surexprimé dans les cancers du sein au niveau des tumeurs primitives et des métastases. Le suivi des valeurs urinaires de pS2 permet de dépister précocement les métastases.

Trois marqueurs sériques ont récemment été repérés : Breast Cancer 1 (BC1), Breast Cancer 2 (BC2) et Breast Cancer 3 (BC3). BC1 est un fragment de la chaîne lourde H4 de l'inhibiteur inter-alpha de la trypsine et BC2 et BC3 dérivent tous deux d'une même protéine du complément, la protéine C3a. BC2 représente une forme clivée de C3a alors que BC3 est la protéine C3a, délestée d'une arginine en position carboxyterminale. Ces marqueurs circulants ont été mis en évidence grâce aux nouvelles technologies de protéomique. Ils permettent de suspecter les cancers mammaires à différents stades et notamment à des stades précoces (Mathelin et *al.*, 2006). Cependant, des études ont montré que BC1 n'est pas significatif dans la discrimination entre les contrôles et les cancers contrairement à BC2 et BC3. Des étapes de validation et surtout de standardisation seront nécessaires pour les rendre utilisables en clinique. De plus, de nombreuses études se sont intéressées aux marqueurs protéiques tumoraux et sériques potentiels de la cancérisation mammaire. Il a été montré une surexpression de nombreuses protéines : GRP78 (glucose regulated protein 78), calréticuline, tropomyosine 1 et 3, vimentine, actine G, β 5-tubuline, annexine-2, galectine-1, ubiquitine, chaîne légère de la ferritine, kallikréines 5, 6 et 10 ainsi que la diminution de la protéine chaperonne 14-3-3-sigma (Hamrita et *al.*, 2010). Le taux de protéine 14-3-3 sigma est dix fois

moindre dans les cellules de cancer du sein que dans les cellules mammaires normales et son niveau apparaît très faible dans les biopsies de cancer du sein. De façon complémentaire à l'analyse protéomique, en utilisant les méthodes de la génomique, il a été montré une hyperméthylation du gène de 14-3-3 sigma dans les cellules de cancer du sein, entraînant une perte d'expression des ARNm de 14-3-3 sigma dans les tumeurs mammaires. 14-3-3 sigma est maintenant considérée comme un marqueur précoce de la cancérisation mammaire et cette protéine suscite également de l'intérêt pour son rôle potentiel dans le contrôle du phénotype tumoral. En définitive, la mise en évidence de 14-3-3 sigma comme suppresseur de tumeur illustre la complémentarité des approches de la génomique et de la protéomique pour la mise en évidence de modifications moléculaires caractéristiques du processus de cancérisation (Hondermarck, 2006).

Par ailleurs, l'altération de l'expression protéique lors de la transformation cancéreuse et la progression tumorale peut déclencher une réponse d'auto-immunité qui semble avoir un rôle crucial, dans le pronostic, le diagnostic et la création de nouvelles cibles thérapeutiques. Une nouvelle approche immuno-protéomique permettant une recherche d'auto-anticorps voit le jour.

III. Incidence, facteurs de risque et facteurs de survie

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 nouveaux cas diagnostiqués et 400 000 décès par an. Le cancer du sein reste rare chez les hommes puisque 1% d'entre eux présentent cette pathologie. En France, en 2008, environ 11 000 femmes sont décédées 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 50 000 nouveaux cas estimés chaque année. Une femme sur 10 développera un cancer du sein au cours de sa vie. Plus de 50% de ces cancers sont diagnostiqués après 65 ans et près de 10% avant 35 ans. L'incidence et le taux de mortalité se sont stabilisés à partir des années 90, diminuant même à partir de 2000. Cependant, malgré les progrès de dépistage, de traitements et de prise en charge, cette pathologie reste un problème majeur de santé publique (Institut National Du Cancer, 2009).

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.

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 carcinogénèse 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 Cotarla, 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 substrats sont certaines histones, la tubuline γ , le récepteur des œstrogènes α (ER α), NPM1 (Nucleophosmin), la sous-unité de l'ARN polymérase II, l'isoforme A du récepteur à la progestérone (PR) et le facteur de transcription général TFIIE (Wu et *al.*, 2008).

BRCA2 est localisé sur le chromosome 13 et code une histone acétyl 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, 2005). Le gène p53 localisé sur le chromosome 17 est un des gènes les plus communément mutés dans les cancers humains (environ 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 cancérogénèse mammaire (Dumitrescu et Cotarla, 2005).

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.*, 2005).

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 Polychlorobiphényles (PCB) qui ont longtemps été utilisés comme pesticides. Les dioxines ou encore les solvants organiques utilisés dans l'industrie sont également incriminés (Coyle, 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 (présent 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 Bates, 2004; Dumitrescu et Cotarla, 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).

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.

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 (Chen, 1998).

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 Cotarla, 2005; Sakorafas et *al.*, 2002).

D'une manière générale, la concentration et le type d'hormones présentes dans le sérum influencent le risque de carcinogénèse mammaire. Ainsi, une augmentation du taux d'œstrone, d'œstradiol et/ou de testostérone est corrélée à une augmentation du risque de cancer du sein (Feigelson et Henderson, 1996; Key et *al.*, 2002). La progestérone agit par l'intermédiaire de son récepteur (PR), dont il existe deux isoformes (PRA et PRB), 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 agressif (Jacobsen et *al.*, 2002). Cependant, une étude contradictoire a rapporté que la progestérone n'augmenterait pas ce risque et pourrait avoir un effet préventif (Campagnoli et *al.*, 2005).

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 contradictoires, 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 Feigelson, 2000; Dumitrescu et Cotarla, 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 cancérogène, 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 œstrogéno-mimétiques proviennent essentiellement de l'industrie, de l'agriculture et des rejets urbains. Les lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et T47D, sensibles à l'œstradiol, se multiplient davantage en présence de ces molécules (Soto et *al.*, 1995; Lascombe et *al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que ces molécules peuvent avoir un impact non négligeable sur l'incidence des cancers mammaires hormono-dépendants.

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, les taux de survie à 5 et 10 ans d'une patiente sont 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, les taux de survie passent à 51% et 25%. L'évolution de la maladie est d'autant plus sévère que la taille de la tumeur détectée 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, 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 prédire 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 pronostic à 5 et 10 ans : respectivement 15 % et 5 % (Cianfrocca et Goldstein, 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. D'une part, parce que la présence de ces récepteurs est indicateur de la sensibilité des cellules tumorales à l'hormonothérapie et d'autre part, car de nombreuses études montrent que les récepteurs des œstrogènes diminuent les capacités invasives des cellules tumorales (Platet et *al.*, 2004). Le grade histologique est aussi un facteur pronostique important. Il est basé sur la différenciation glandulaire, le pléiomorphisme nucléaire et le nombre de mitoses par champ (Bundred, 2001).

IV. Stratégies thérapeutiques

L'objectif du traitement du cancer du sein est d'enlever la tumeur et de supprimer toutes les cellules cancéreuses. Le programme thérapeutique est pluridisciplinaire et associe la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie ainsi que des thérapies ciblées.

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).

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).

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 association. 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 qui sont des molécules de synthèse inhibant 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.
- 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. 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. Il n'est efficace que pour les tumeurs hormono-dépendantes. Cette hormonosensibilité est déterminée par la présence ou non de récepteurs hormonaux dans les cellules cancéreuses, notamment les 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⁺ (Delozier, 2010). Il existe 4 types d'hormonothérapie : soustractive, additive, inhibitrice et compétitive.

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.

4.2. 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.

4.3. 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 (Kaufmann 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 (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 Dowsett, 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. 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 oncologie 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.*, 2008b). 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. 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).

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 humanisé recombinant de classe IgG1 dirigé contre HER2/erbB2 connu sous le nom de trastuzumab ou Herceptin™ est utilisé dans le traitement du cancer du sein métastatique avec surexpression tumorale de HER2. Par ailleurs, les essais cliniques avec le Lapatinib ou Tyverb/Tykerb® qui est aussi une molécule inhibitrice de HER2 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'angiogénèse des tumeurs a été démontrée. Le celecoxib, un inhibiteur sélectif de cette enzyme, a notamment été utilisé en association avec la chimiothérapie ; il entraîne peu d'effets cytotoxiques additionnels et augmente 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).

L'absence de thérapie ciblée pour certaines formes de cancer du sein telles que les tumeurs mammaires triples-négatives (ER⁻/PR⁻/HER2⁻) et le problème de résistances aux traitements existants des patientes atteintes de cancer du sein, limitent la thérapie et justifient de développer de nouveaux agents thérapeutiques. Les ligands de PPAR γ sont étudiés dans ce contexte.

PARTIE II : PPAR γ et Cancer

I. Les peroxysomes et proliférateurs de peroxysomes

Découverts en 1966 par De Duve (Prix Nobel en 1974), les peroxysomes sont de petits organites, délimités par une membrane, dépourvus de tout matériel génétique dont la prolifération se fait par bourgeonnement. Ils sont présents dans toutes les cellules eucaryotes et sont particulièrement nombreux dans les cellules hépatiques, les cellules rénales et les neurones. Ils sont considérés comme le site essentiel de l'utilisation et de la détoxification de l'oxygène moléculaire. Ils maintiennent l'homéostasie des lipides par β -oxydation des acides gras à très longue chaîne (18 atomes de carbone, C18), assurent la biosynthèse du cholestérol, des plasmalogènes (phospholipides) ainsi que le métabolisme des acides aminés et des purines. Les proliférateurs de peroxysomes sont des composés naturels (lipides) ou de synthèse incluant les fibrates, les plastifiants, les pesticides et les solvants. Chez les rongeurs, ces substances provoquent la prolifération des peroxysomes et une hypertrophie du foie. A plus long terme, ils induisent le développement de cancer. Ce phénomène n'a pas été observé chez l'homme. En 1990, Issemann et Green ont identifié chez les rongeurs un récepteur nucléaire activé par différents proliférateurs de peroxysomes qu'ils dénommèrent Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) (Issemann et Green, 1990; Desvergne et Wahli, 1999).

II. Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes

Les PPAR ont été identifiés il y a environ 20 ans, tout d'abord comme étant des récepteurs nucléaires orphelins, de la famille des récepteurs des stéroïdes, des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes (Laudet et *al.*, 1992). Trois isotypes ont été identifiés chez les vertébrés dont le xénope, la souris, le rat, le hamster et l'homme. Ils ont été nommés PPAR α (NR1C1), PPAR β (NR1C2) et PPAR γ (NR1C3) quand ils ont été découverts chez le xénope. Chez les mammifères, PPAR β a été nommé PPAR δ , FAAR ou NUCI (Dreyer et *al.*, 1992; Sher et *al.*, 1993). Chaque isotype est codé par un gène différent.

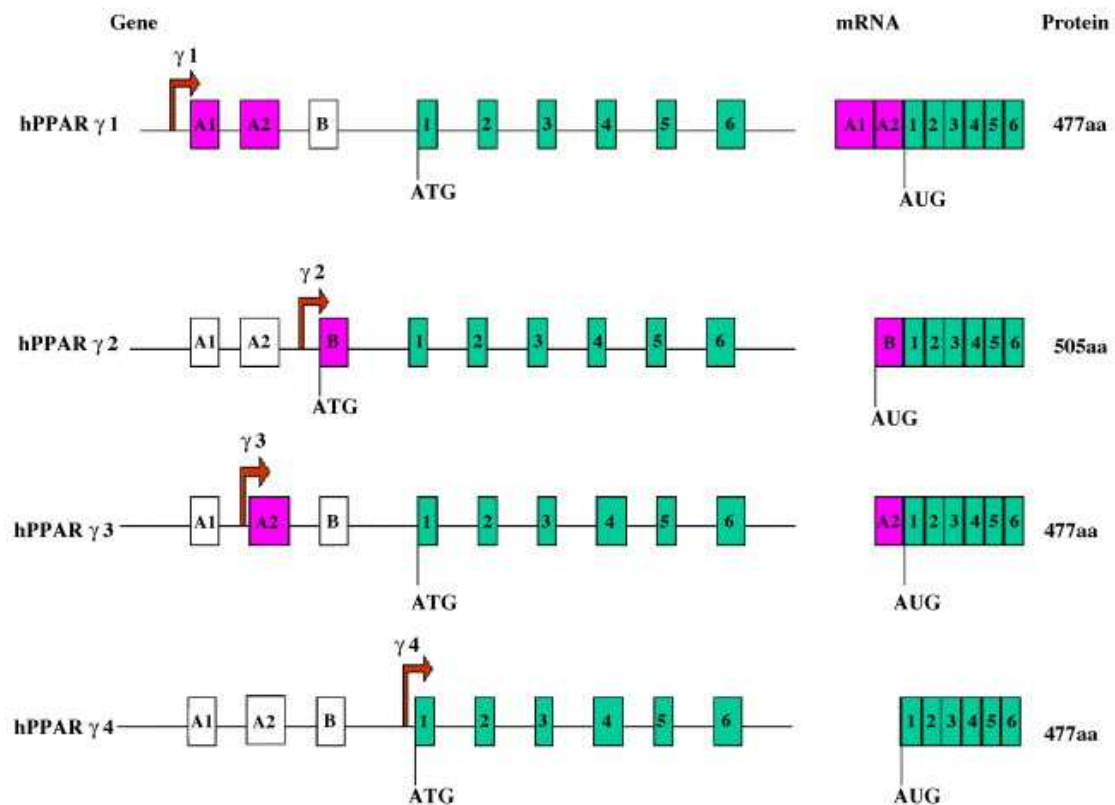


Figure 6 : Organisation du gène PPAR γ et de ses messagers chez l'Homme. L'utilisation de promoteurs différents et un épissage alternatif permettant de générer 4 types d'ARNm : PPAR γ 1, PPAR γ 2, PPAR γ 3 et PPAR γ 4. Les exons 1 à 6 sont communs aux 4 transcrits. Les ARNm PPAR γ 1, PPAR γ 3 et PPAR γ 4 codent la même protéine. L'ARNm PPAR γ 2 code une protéine possédant 28 acides aminés supplémentaires à l'extrémité N-terminale (Wang et al., 2006).

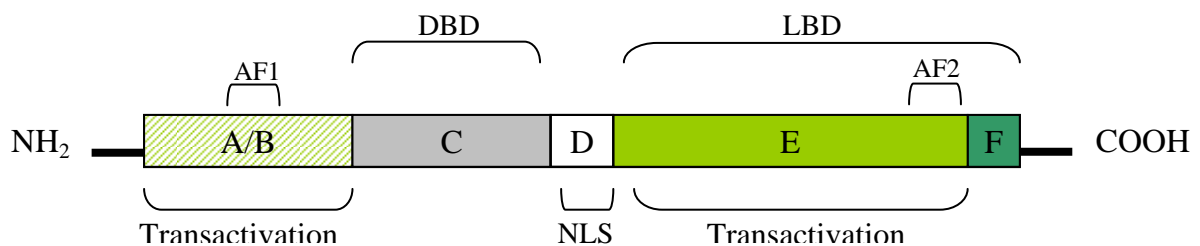


Figure 7 : Structure et domaines fonctionnels des PPAR. Le domaine A/B situé en N-terminal contient la fonction d'activation indépendante du ligand AF-1. Domaine C : DNA Binding Domain. Domaine D : région charnière contenant un signal de localisation nucléaire NLS. Le domaine E/F, situé du côté C-terminal, contient la fonction d'activation dépendante du ligand AF-2 et permet la dimérisation avec RXR α (Aranda et Pascual, 2001).

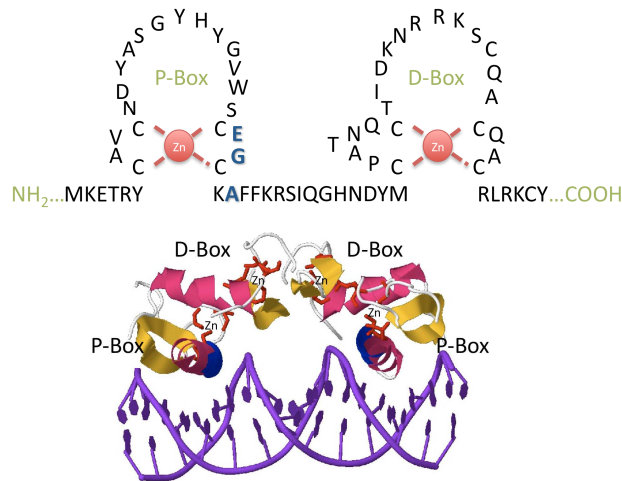
1. Le gène codant PPAR γ

Chez l'homme, le gène PPAR α (hPPAR α) est localisé au niveau du chromosome 22 (22q12-q13.1) (Sher et *al.*, 1993), le gène hPPAR γ au niveau du chromosome 3 (3p25) (Greene et *al.*, 1995) et le gène hPPAR β sur le chromosome 6 (6p21.1-p21.2) (Yoshikawa et *al.*, 1996). Chez la souris, PPAR γ est localisé au niveau du chromosome 6 alors que PPAR α et PPAR β sont localisés au niveau des chromosomes 15 et 17, respectivement (Zhu et *al.*, 1995). La région traduite des gènes PPAR est constituée de 6 exons. Un exon code le domaine A/B N-terminal, deux exons codent le domaine de fixation à l'ADN ou DBD (DNA Binding Domain) (un exon pour chacun des 2 doigts de zinc), un exon code la région charnière D, deux exons codent le domaine de liaison au ligand ou LBD (Ligand Binding Domain) (Desvergne et Wahli, 1999). Le gène hPPAR γ possède en plus de ces 6 exons, 3 exons, A1, A2 et B situés en 5'. Le gène hPPAR γ d'environ 100 Kb produit 4 ARNm différents, PPAR γ 1, PPAR γ 2, PPAR γ 3 et PPAR γ 4. Ceci est la conséquence de l'utilisation de 4 promoteurs distincts et d'un épissage alternatif des exons A1, A2 et B (**figure 6**). L'ARNm PPAR γ 1 possède 8 exons : les exons non codants A1 et A2 en amont des exons 1 à 6. L'ARNm PPAR γ 2 comporte 7 exons : en plus des exons 1 à 6, on trouve l'exon B qui contient un codon d'initiation de la traduction et qui donne une séquence N-terminale supplémentaire spécifique de la protéine PPAR γ 2. Celle-ci comporte 28 et 30 acides aminés supplémentaires chez l'homme et la souris respectivement (Fajas et *al.*, 1997; Zhu et *al.*, 1995). Le troisième ARNm, PPAR γ 3, est sous le contrôle d'un autre promoteur localisé dans la région flanquant l'exon A2 (Fajas et *al.*, 1998). Enfin, le site d'initiation de la transcription de l'ARNm de PPAR γ 4 se situe en amont de l'exon 1 (Sundvold et Lien, 2001). Les protéines codées par les ARNm PPAR γ 1, PPAR γ 3 et PPAR γ 4 sont identiques (Wang et *al.*, 2006b). Le gène hPPAR γ code donc deux protéines, γ 1 et γ 2 qui diffèrent de 28 acides aminés à l'extrémité N-terminale.

2. La protéine PPAR γ

2.1. Organisation structurale

Les récepteurs PPAR γ possèdent une organisation similaire aux autres membres de la famille des récepteurs nucléaires et comportent plusieurs domaines fonctionnels (A-F) (**figure 7**).



Récepteur	P-Box	Demi-site	Elément de réponse
PPAR	cEGckG	AGGTCA	AGGTCAnAGGTCA

Figure 8 : Représentation schématique des doigts de zinc du DNA Binding Domain des récepteurs nucléaires. La boîte P 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 est située entre les 2 premiers résidus cystéine du second doigt de zinc et comprend 3 acides aminés différents selon les PPAR au lieu des 5 acides aminés que possèdent les récepteurs nucléaires aux hormones (<http://www.nrresource.org/>).

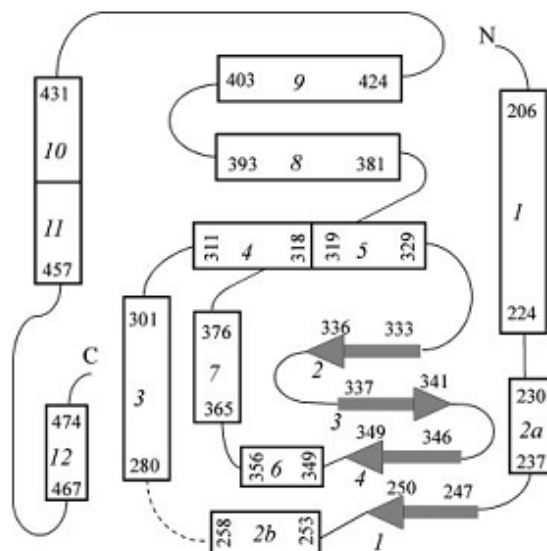


Figure 9 : Structure secondaire du domaine LBD de PPAR γ humain en absence de ligand. Les hélices sont numérotées de 1 à 12 selon la convention utilisée pour tous les récepteurs nucléaires. Les brins anti-parallèles du feuillet β sont symbolisés par des flèches numérotées de 1 à 4. Les hélices sont délimitées par un nombre d'acides aminés (Uppenberg et al., 1998).

Le domaine A/B, dans la région N-terminale, est peu conservé entre les différents isotypes de PPAR et possède une fonction de transactivation ligand-indépendante nommée AF-1, capable de lier des corégulateurs (Juge-Aubry et *al.*, 1999). La région C est la plus conservée. Elle est composée de deux doigts de zinc qui permettent la fixation à l'ADN. Le premier doigt de zinc contient une région proximale appelée P-box (CEGCKG), une hélice α responsable de l'affinité pour le demi-site de l'élément de réponse. Le deuxième doigt de zinc contient une D-box, une hélice α perpendiculaire à l'hélice P-box nécessaire à la dimérisation du récepteur et la reconnaissance de l'espace entre les 2 demi-sites de l'élément de réponse. La D-box des PPAR contient seulement 3 acides aminés au lieu des 5 acides aminés que possèdent les récepteurs nucléaires aux hormones (**figure 8**). La région charnière D est nécessaire à l'interaction du récepteur avec ses cofacteurs (coactivateurs et corépresseurs). Elle contient un signal de localisation nucléaire (NLS). Le complexe multifonctionnel (E-F) dans la partie C-terminale contient un domaine de fixation au ligand ou LBD (Ligand Binding Domain), une interface de dimérisation des récepteurs et un site de transactivation dépendant du ligand via le domaine AF-2 qui lie des corégulateurs (Michalik et Wahli, 1999). Le LBD se compose de 12 hélices α (notées H1 à H12) et de 1 feuillet β à 4 brins anti-parallèles qui forment une poche hydrophobe dans laquelle viennent se loger les ligands (Wang et *al.*, 2006b) (**figure 9**). La fixation du ligand à PPAR γ module l'interaction intramoléculaire entre le domaine A/B et le LBD (Schoonjans et *al.*, 1996). Le domaine F n'a aucune fonction connue.

2.2. Mécanisme d'action du récepteur

L'activation de PPARs peut être due à l'interaction avec les chaperonnes HSP (Heat Shock Protein), à l'activation de voies de signalisation qui modifient le statut de phosphorylation du récepteur ou à l'interaction du récepteur avec son ligand (physiologique ou pharmacologique). Cependant, l'activation de PPAR γ se fait principalement par fixation du ligand. Après activation, PPAR γ forme un hétérodimère avec le récepteur de l'acide-9-cis-rétinoïque (RXR/NR2B) qui se fixe sur un élément de réponse aux proliférateurs de peroxyosomes, PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element), en amont de gènes cibles afin de réguler leur transcription. Le PPRE est composé de deux séquences répétées directes de six nucléotides, séparées par un nucléotide aléatoire « n », 5' AGGTCA n AGGTCA 3'. Cette séquence est nommée DR1 (Direct repeat) (Kliewer et *al.*, 1992). PPAR γ interagissant avec le premier motif hexamérique AGGTCA situé en amont en 5' et RXR occupant le deuxième motif

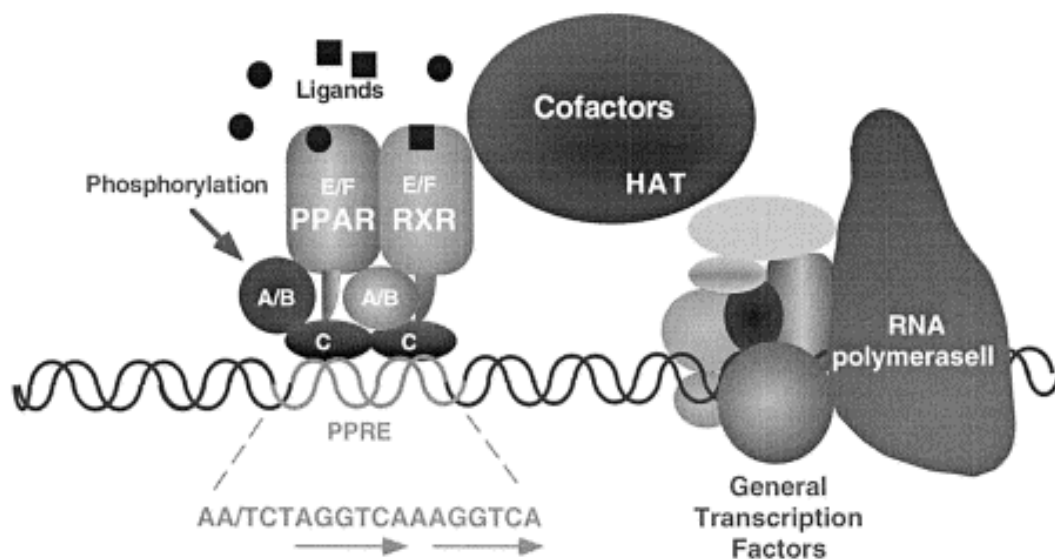


Figure 10 : Mécanisme de transactivation. L'hétérodimère PPAR/RXR se fixe sur le PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element), localisé dans le promoteur des gènes cibles, par le domaine C (DNA-Binding Domain) de chacun des récepteurs. L'activité de PPAR est régulée par la phosphorylation du domaine 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 (Escher et Wahli, 2000).

hexamérique en 3' (**figure 8 ; figure 10**) (Ijpenberg et *al.*, 1997). PPAR γ /RXR α est un hétérodimère permissif. Il peut être activé par l'un des deux ligands ou de manière synergique en présence des deux ligands (Aranda et Pascual, 2001). Le fait que l'hétérodimère puisse être activé par un seul des deux ligands a été en partie expliqué par le fait que chaque récepteur est capable de recruter des coactivateurs différents (Ijpenberg et *al.*, 2004). Une étude a montré que la formation de l'hétérodimère PPAR/RXR ne nécessiterait ni la fixation du ligand, ni la liaison à l'ADN (Feige et *al.*, 2005).

L'interaction avec les cofacteurs est un mécanisme fondamental de la régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ (**figure 10**). Le LBD permet la fixation du ligand mais aussi l'interaction avec les coactivateurs et corépresseurs permettant respectivement, d'augmenter ou de réprimer l'activité transcriptionnelle en modulant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et en modifiant la chromatine. La fixation du ligand sur le récepteur provoque la dissociation des corépresseurs et le recrutement des coactivateurs transcriptionnels. Le récepteur PPAR γ recrute un des nombreux complexes coactivateurs classés en trois groupes. Le premier groupe contient les coactivateurs universels. Ils incluent SRC-1, SRC-2, SRC-3 et CBP/p300 (CREB binding protein) (Zhu et *al.*, 1996). Ces coactivateurs possèdent une activité histone acétyl-transférase (HAT) qui leur permet de modifier les charges portées par les histones et ainsi de provoquer la décompaction de la structure chromatinnienne nécessaire à une meilleure transcription. Le second groupe, qui contient PBP (PPAR binding protein) (Zhu et *al.*, 1997), forme un complexe de coactivateurs constitué de multiples sous-unités, appelé TRAP ou PRIC. Ces protéines ne possèdent pas d'activité enzymatique connue mais elles forment un pont entre le récepteur nucléaire et la machinerie transcriptionnelle facilitant son recrutement (Roeder, 2005). Le complexe coactivateur, TRAP/DRIP, contient au moins 12 facteurs, dont l'un d'eux permet une interaction directe, ligand-dépendante avec l'hélice 12 (H12) du LBD (TRAP220/DRIP204/PBP) (Kodera et *al.*, 2000). Le mécanisme d'action du troisième groupe de coactivateurs, incluant PGC-1 α , PGC-1 β (Puigserver et *al.*, 1998) et ARA70 (Heinlein et *al.*, 1999), est encore mal connu mais recruterait probablement des protéines possédant une activité HAT. Les protéines corégularices possèdent une courte séquence en hélice α essentielle à leur interaction avec les récepteurs nucléaires, un motif LXXLL (où L est une leucine et X est un acide aminé quelconque) dans le cas des coactivateurs et LXXXIXXXL (où I est une isoleucine) dans le cas des corépresseurs. PPAR γ peut agir en tant que répresseur

en l'absence de ligand ou en présence d'antagonistes. Deux classes de corépresseurs nucléaires NCoR (Nuclear receptor CoR) (Horlein et *al.*, 1995) et SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptors) (Chen et Evans, 1995) ont été identifiés. Leur effet répressif est essentiellement dû au recrutement des histones déacétylases (HDAC) (Robyr et *al.*, 2000). Ces HDAC induisent une compaction de la chromatine. Les corépresseurs se complexent à PPAR γ et s'associent aux promoteurs de leurs gènes cibles. Ils sont absents de certains promoteurs constitutivement actifs. L'hétérodimère PPAR γ /RXR peut se complexer à des corépresseurs en absence de ligand (Guan et *al.*, 2005). Ces corépresseurs assemblent un complexe de répression qui inclut plusieurs protéines dont Sin3, RIP140 (receptor interacting protein 140) et d'autres HDACs (Alland et *al.*, 1997; Nagy et *al.*, 1997; Treuter et *al.*, 1998).

2.3. Modifications post-traductionnelles de PPAR γ

Certaines modifications des PPAR peuvent entraîner la modulation de leur activité transcriptionnelle. A ce jour, trois types de modifications sont décrites.

2.3.1. Phosphorylation

PPAR γ est phosphorylé par différentes voies de signalisation. Sa phosphorylation au niveau des résidus sérine par les MAPK inhibe l'activité transcriptionnelle (Hu et *al.*, 1996). L'effet de la phosphorylation de PPAR γ par les MAPK serait expliqué en partie par la modification du domaine A/B du récepteur qui réduirait l'affinité du LBD pour le ligand (Shao et *al.*, 1998).

2.3.2. Ubiquitination

L'ubiquitine est une protéine de 8 KDa fixée de façon covalente sur les protéines par des enzymes à activité ubiquitine ligase. Cette fixation induit la dégradation de la protéine ubiquitinée par le protéasome 26S permettant de réguler le taux cellulaire des récepteurs nucléaires. La dégradation de PPAR γ après ubiquitination est augmentée par la fixation du ligand. Cette dégradation est inhibée par la fixation du corépresseur RIP 140 (Hauser et *al.*,

2000). Le coactivateur p300 possède une activité ubiquitine-ligase qui agit directement sur l'ubiquitination des PPAR (Grossman et *al.*, 2003).

2.3.3. SUMOylation

PPAR γ peut être modifié par SUMOylation. Cette modification post-traductionnelle consiste en la liaison covalente de protéines SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) sur un résidu lysine de la protéine cible (Ohshima et *al.*, 2004). La SUMOylation régule différents mécanismes comme la stabilité des protéines, la translocation nucléaire et la transcription (Seeler et Dejean, 2003). La SUMOylation de PPAR γ affecte sa stabilité et son activité transcriptionnelle mais pas sa localisation nucléaire (Floyd et Stephens, 2004). Des études par mutagenèse dirigée ont identifié la lysine 107 comme lysine acceptrice de la protéine SUMO-1. Ce résidu se trouve dans la partie N-terminale au niveau du domaine AF-1 et sa SUMOylation régule négativement la fonction de transactivation de PPAR γ (Floyd et Stephens, 2004; Shimizu et *al.*, 2006; Yamashita et *al.*, 2004). Ces mêmes études ont montré que la phosphorylation du résidu sérine 112 faciliterait la SUMOylation de PPAR γ .

III. Distribution tissulaire et principaux rôles de PPAR γ

Les différents types de PPAR présentent une expression tissulaire spécifique. PPAR γ est exprimé principalement dans le tissu adipeux, la forme majoritaire étant PPAR γ 2. Dans la rate, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon, la forme PPAR γ 1 prédomine. Une expression modérée voire faible de PPAR γ est décrite dans la glande mammaire, l'appareil génital, les reins, la rétine, les monocytes/macrophages et le système nerveux central. PPAR γ n'est pas exprimé dans le foie et la peau (Braissant et *al.*, 1996).

Ce récepteur joue un rôle très important dans la différenciation adipocytaire, dans la sensibilisation à l'insuline, le métabolisme lipidique. Il est aussi impliqué dans l'inflammation, l'athérosclérose, l'angiogenèse, la reproduction et le cancer.

➤ Métabolisme lipidique et diabète

Les thiazolidinediones, ligands synthétiques de PPAR γ possèdent des effets antidiabétiques reconnus en réduisant l'insulinorésistance au niveau du tissu adipeux, des muscles

squelettiques et du foie. Le rôle de PPAR γ dans la différenciation adipocytaire est clairement établi (Tontonoz et *al.*, 1994a). En effet, la surexpression de PPAR γ dans des fibroblastes ou des myoblastes en culture permet leur différenciation en adipocytes (Tontonoz et *al.*, 1994b; Teboul et *al.*, 1995). D'autre part, l'inactivation du gène PPAR γ se traduit par une absence de tissu adipeux chez la souris (Rosen et *al.*, 1999). Chez les diabétiques de type II, l'activation de PPAR γ , majoritairement localisé au niveau du tissu adipeux induit une cascade de réactions métaboliques conduisant à l'apoptose des gros adipocytes insulino-résistants et à la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes de petite taille plus sensibles à l'action de l'insuline (Picard et Auwerx, 2002; Larsen et *al.*, 2003; Spiegelman, 1998). Cette activation de PPAR γ dans l'adipocyte induit une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la capture du glucose (transporteur de glucose GLUT-4), le captage et le stockage d'acides gras circulants (acyl-CoA synthétase, lipoprotéine lipase (LPL)), le transport d'acides gras (FATP, l'adipocyte lipid binding protein aP2...). Ceci s'accompagne donc d'une diminution des lipides circulants, ce qui permet une augmentation de la sensibilité à l'insuline du muscle (Ferre, 2004; Arner, 2003; Spiegelman, 1998). De plus, l'activation du récepteur PPAR γ entraîne une modification de l'expression des gènes codant les adipocytokines (protéines ou hormones sécrétées par les adipocytes). Ainsi, la production des adipocytokines, telles que le TNF α (Tumor Necrosis Factor α), l'interleukine 6, la leptine ou la résistine qui ont des effets néfastes sur la sensibilité à l'insuline, est diminuée (Stears et Byrne, 2001), alors que l'expression et la sécrétion d'adiponectine (protéine sécrétée par l'adipocyte et impliquée dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les sujets obèses, intolérants au glucose ou diabétiques de type II) est fortement augmentée (Ferre, 2004).

➤ **Inflammation**

Dans les monocytes, les ligands de PPAR γ diminuent la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL1 et l'IL6 (Jiang et *al.*, 1998). L'expression de PPAR γ est fortement augmentée dans les macrophages activés de rat et le traitement par les ligands naturels et synthétiques de PPAR γ inhibe l'expression des marqueurs d'activation macrophagique (Ricote et *al.*, 1998).

➤ **Athérosclérose**

L'athérosclérose est caractérisée par une prolifération des cellules musculaires lisses des artères due à l'action des produits des macrophages activés (MMP-9, gélatinase B, IL-1 et TNF α) aboutissant à des lésions. Les ligands de PPAR γ pourrait donc avoir un rôle protecteur en inhibant la production de cytokines inflammatoires par les macrophages activés, 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 endothéliales de muscles lisses (Marx et *al.*, 1998; Duan et *al.*, 2008). Ces effets expliqueraient la régression des plaques d'athérome observée chez des patients traités avec des thiazolidinediones (Michalik et Wahli, 1999).

➤ **Angiogenèse**

Les ligands de PPAR γ naturels ou synthétiques sont de puissants inhibiteurs de l'angiogenèse, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Ces agonistes empêchent la prolifération et la différenciation en structures tubulaires de cellules endothéliales en culture et inhibent l'effet de facteurs de croissance exogènes sur ces cellules (Xin et *al.*, 1999). Les agonistes de PPAR γ inhibent en effet l'expression des récepteurs au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), VEGFR-1 (Flt-1) et VEGFR-2 (Flk/KDR) (Witmer et *al.*, 2003). Par ailleurs, ils inhibent l'expression d'une protéase importante dans la croissance des vaisseaux, l'urokinase plasminogen activator (uPa) et stimule celle de l'inhibiteur de l'uPa, le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) (Xin et *al.*, 1999; Marx et *al.*, 1998). L'expression de PPAR γ dans l'épithélium pigmentaire de la rétine et les cellules endothéliales des vaisseaux choroïdiens et rétiniens a ouvert un nouveau champ d'étude des maladies néovasculaires de l'œil ; cibler PPAR γ peut être une nouvelle voie d'approche thérapeutique de ces pathologies (Murata et *al.*, 2000).

➤ **Reproduction**

PPAR γ est également exprimé dans les tissus impliqués dans la reproduction : gonades (ovaire et testicule), utérus, glande mammaire, prostate, hypophyse et au niveau du système nerveux central (Komar et *al.*, 2001; Mouihate et *al.*, 2004). Chez la souris, l'inactivation conditionnelle du gène codant PPAR γ au niveau de l'ovaire conduit à une baisse de la fertilité

(Cui et *al.*, 2002). PPAR γ semble avoir un rôle important dans l'implantation de l'embryon et dans le développement et le fonctionnement placentaire (Barak et *al.*, 1999). Ces résultats sont en accord avec la forte expression de ce récepteur dans le trophoctoderme et la masse cellulaire interne du blastocyste (Mohan et *al.*, 2002). L'inactivation de PPAR γ induit plus particulièrement un défaut de vascularisation du placenta, ce qui conduit à la mort de l'embryon pendant la gestation. Chez la femme, PPAR γ est aussi exprimé dans le tissu placentaire (trophoblaste). Son activation stimule l'expression et la sécrétion d'hormones nécessaires à la grossesse et au développement du fœtus telles que l'hCG (gonadotrophine chorionique humaine) et les hormones syncytiotrophoblastiques (hormones lactogènes, hormone de croissance placentaire, leptine) (Tarrade et *al.*, 2001). L'ensemble de ces résultats montrent que PPAR γ est essentiel pour la maturation d'un placenta fonctionnel.

➤ **Cancer**

Enfin, plusieurs études ont montré un rôle des ligands de PPAR γ dans l'inhibition de la prolifération, la différenciation et l'induction de l'apoptose, présentant un intérêt dans le traitement des cancers du sein, de la prostate, de l'estomac et du côlon (Sarraf et *al.*, 1998; Mueller et *al.*, 2000; Takahashi et *al.*, 1999; Blanquicett et *al.*, 2008).

IV. Le ligand PPAR γ

1. Les ligands naturels

Différents acides gras insaturés tels que les acides arachidonique, linoléique et linoléique sont capables de se lier et d'activer les 3 types de PPAR à des concentrations de l'ordre du micromolaire et proches des concentrations en acides gras non estérifiés circulant dans le sérum humain. Ceci a permis d'établir que les acides gras peuvent activer les PPAR *in vivo*. Les dérivés métaboliques des acides arachidonique et linoléique sont aussi des ligands naturels de PPAR γ (Xu et *al.*, 1999; Auwerx, 1999). L'acide linoléique est 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

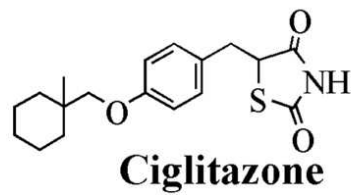
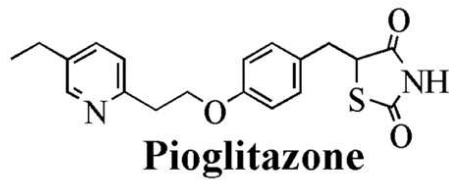
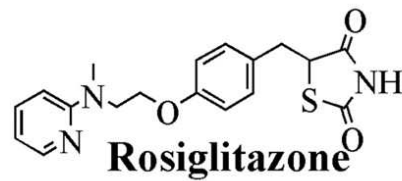
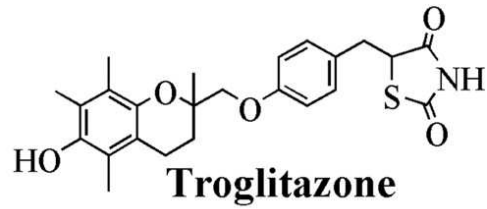


Figure 11 : Formules chimiques de 4 Thiazolidinediones (Troglitazone, Rosiglitazone, Pioglitazone et Ciglitazone). Elles possèdent un cycle thiazolidinedione, cycle à 5 liaisons avec un atome de soufre et un atome d'azote, substitué par 2 cétones. Ce cycle est aussi appelé cycle glitazone (Yang et al., 2006).

dégradation sont des ligands de PPAR γ . Parmi eux, le dérivé des prostaglandines de la série D, le 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 (15d-PGJ2) est l'activateur naturel le plus puissant de PPAR γ avec un Kd situé entre 325 nM et 2.5 μ M (Forman et *al.*, 1995).

2. Les ligands synthétiques

2.1. Les ligands de la famille des thiazolidinediones

Les thiazolidinediones (TZD) ont été développées à l'origine pour leurs effets antidiabétiques, sans aucune connaissance de leur sélectivité pour PPAR γ (Ferre, 2004). Cette classe de molécules a vu le jour dans les années 80 au sein de la société Takeda et a été nommée glitazone (Sohda et *al.*, 1982). La première glitazone synthétisée, la ciglitazone, possède un effet antihyperglycémiant et est capable de réduire les concentrations circulantes de triglycérides (Fujita et *al.*, 1983). De nouveaux membres de la famille des glitazones, plus efficaces, ont ensuite été développés. Trois types de TZD ont reçu l'autorisation pour être utilisées aux USA et au Japon puis en Europe: la troglitazone (Rezulin®), la rosiglitazone (Avandia®) et la pioglitazone (Actos®) (**figure 11**). Ces molécules ont en général des effets assez semblables sur l'insulino-sensibilité (Oakes et *al.*, 1994; Nolan et *al.*, 1994). La troglitazone, a du être retirée du marché en 2000 en raison d'une toxicité hépatique. La rosiglitazone a aussi été retirée du marché en 2010 en raison de l'augmentation du risque cardiovasculaire. La pioglitazone est toujours utilisée pour le traitement du diabète de type II mais toujours en association avec la Metformine (biguanide) ou un sulfamide hypoglycémiant (sulfonylurées) (Boccaro et Cohen, 2004). Plusieurs arguments suggèrent que l'effet antidiabétique des TZD s'exerce via PPAR γ . D'une part, les TZD se lient à PPAR γ avec une grande affinité (40-200 nM) et il existe une excellente corrélation entre les capacités de liaison *in vitro* et l'effet hypoglycémiant *in vivo*. D'autre part, des mutations de PPAR γ ont été associées au développement de la résistance à l'insuline et au diabète (Lehmann et *al.*, 1995; Barroso et *al.*, 1999; Willson et *al.*, 2000).

2.2. Les ligands synthétiques non TZD

➤ Agonistes mixtes ou co-agonistes PPAR α / γ

Il était tentant de développer des agonistes mixtes PPAR α / γ , visant à obtenir les effets hypoglycémisants de PPAR γ sur le plan métabolique, éventuellement en les associant aux effets bénéfiques hypolipémiants des agonistes de PPAR α , tout en minimisant les effets indésirables des thiazolidinediones. De nombreuses molécules ont fait l'objet d'études précliniques et plusieurs d'entre elles, les « glitazars », sont en développement clinique. Parmi les glitazars, citons le ragaglitazar, le tesaglitazar, le muraglitazar et la liste des autres agonistes mixtes est très longue : MK-0767 (KRP-297), JTT-501, LY-465608, LY-510929, LY-519818, TZD-18, E3030, DRF 2655, EML-4156, TY-51501, TAK-559...

Toutes ces molécules ont une affinité plus faible pour PPAR γ que la rosiglitazone (35 nM) : de l'ordre de 90 à 150 nM pour les glitazars et très variable pour les autres (34 nM pour E3030, mais plus généralement de 280 à 550 nM). Leur affinité pour PPAR α est, en revanche, très supérieure à celle des fibrates (ligand de PPAR α) (Pegorier, 2005).

➤ Agonistes complets PPAR α / β (δ)/ γ

Un agoniste complet est capable d'activer les 3 types de récepteurs PPAR α , β (δ) et γ . Il n'en existe actuellement qu'un seul en développement, PPARpanTM, qui a été étudié chez des souris AKR recevant un régime hyperlipidique et traitées pendant 4 semaines par PPARpanTM ainsi que chez le singe Rhésus obèse pré-diabétique traité pendant 5 semaines (Harrington et al., 2007; Ortmeyer et al., 1993). PPARpanTM possède une activité antidiabétique chez ces modèles animaux sans la prise de poids associée à l'utilisation d'un agoniste sélectif de PPAR γ .

➤ SPPARM γ (Modulateurs Sélectifs de PPAR γ)

Chaque TZD a une affinité différente pour le site de liaison aux ligands de PPAR γ , ce qui peut entraîner une conformation tridimensionnelle du complexe PPAR γ -TZD variable selon chaque molécule. Ces différentes conformations peuvent aboutir au recrutement de cofacteurs distincts et, par conséquent, entraîner une régulation transcriptionnelle particulière pour

chaque complexe. Ainsi, divers ligands peuvent, via un même récepteur nucléaire, induire des réponses biologiques différentes. Ce phénomène est à la base du concept de modulateur sélectif de PPAR, ou SPPARM (Selective PPAR Modulator). Les SPARM γ sont donc des ligands qui, fixés sur PPAR γ , induisent un changement spécifique de la conformation du récepteur et induisent la transcription d'un panel spécifique de gènes cibles. Ils ont pour objectif de dissocier l'effet sur la différenciation adipocytaire de l'effet sur le métabolisme de glucose. Ainsi, le LG100641 est un ligand de PPAR γ capable d'augmenter la sensibilité à l'insuline mais, contrairement aux TZD, il ne déclenche pas l'adipogénèse ce qui n'aboutit pas à la prise de poids habituellement observée avec des molécules de type TZD (Mukherjee et *al.*, 2000). GW 7845, GW 0207, MCC-555, GW0072, AMG-131, FK614, nTZDpa, S26948 sont d'autres SPPARMs testés en essais thérapeutiques (Fujimura et *al.*, 2006; Shearer et Billin, 2007).

➤ **Composés anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs)**

Plusieurs composés NSAIDs, inhibiteurs non sélectifs de la cyclooxygénase (COX), constituent une approche clinique classique pour le traitement de certaines inflammations. L'action des NSAIDs ne se limite pas à l'inhibition de la COX mais aussi à l'activation de PPAR γ . L'indométhacine, l'ibuprofène, le fénopofène ou l'acide flufénamique sont des NSAIDs, ligands et activateurs de PPAR γ (ainsi que de PPAR α). Les concentrations requises pour activer PPAR γ sont de l'ordre du micromolaire (Lehmann et *al.*, 1997).

2.3. Les antagonistes de PPAR γ

Le "BADGE" (bisphenol A diglycidyl ether) est un antagoniste de PPAR γ , utilisé en premier lieu pour inhiber la différenciation adipocytaire (Wright et *al.*, 2000). BADGE inhibe d'environ 70% l'activité de PPAR γ (Yamauchi et *al.*, 2001). Il en est de même pour l'antagoniste SR-202, dérivé de l'acide para-chlorobenzyle, qui bloque la transcription de certains gènes et la différenciation adipocytaire induites par les TZD dans les cellules 3T3-L1 (Rieusset et *al.*, 2002). Le traitement par BADGE et SR-202 prévient l'insulino-résistance induite par un régime hyperlipidique et améliore le profil lipidique chez la souris. De plus, il diminue l'adiposité de souris sauvages ayant un régime normal ou hyperlipidique. On constate également, chez les souris traitées par ces antagonistes, des concentrations d'adipokines,

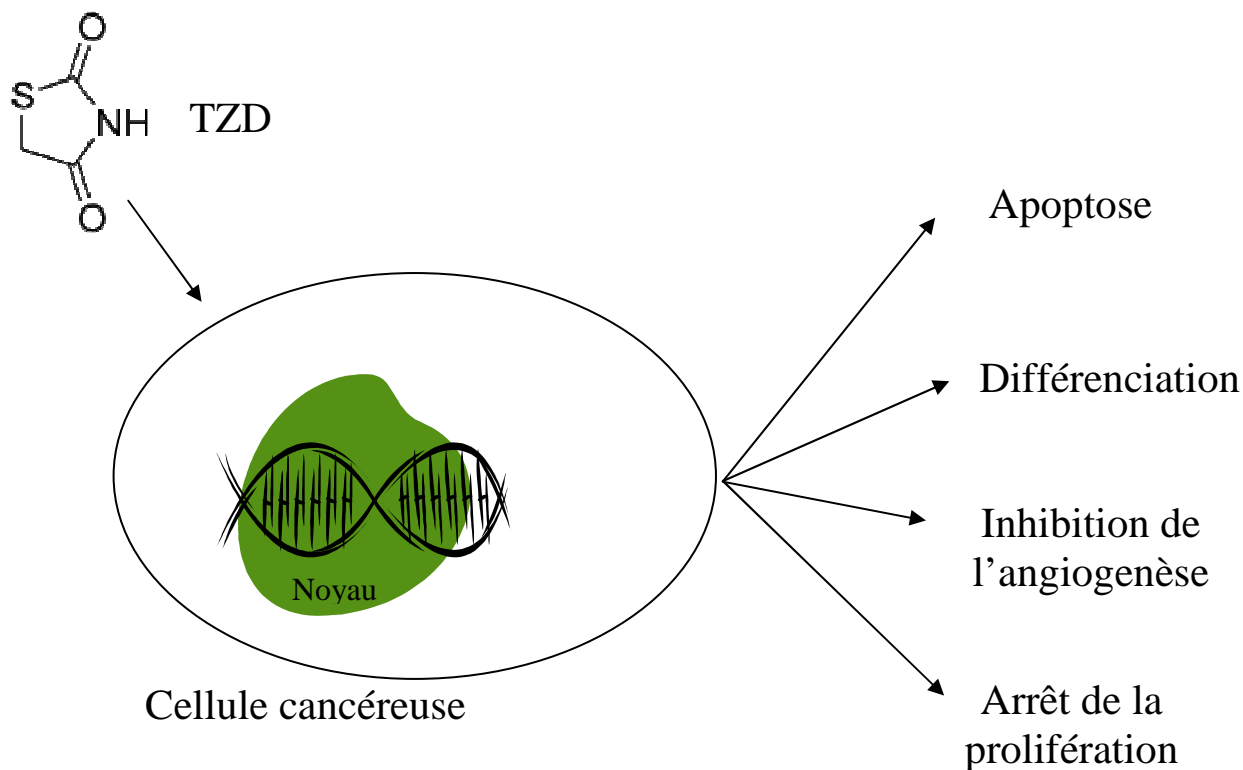


Figure 12 : L'activation de PPAR γ par les thiazolidinediones (TZD) induit l'apoptose, l'arrêt de la prolifération et la différenciation des cellules cancéreuses (adapté d'après Blanquicett et al., 2008).

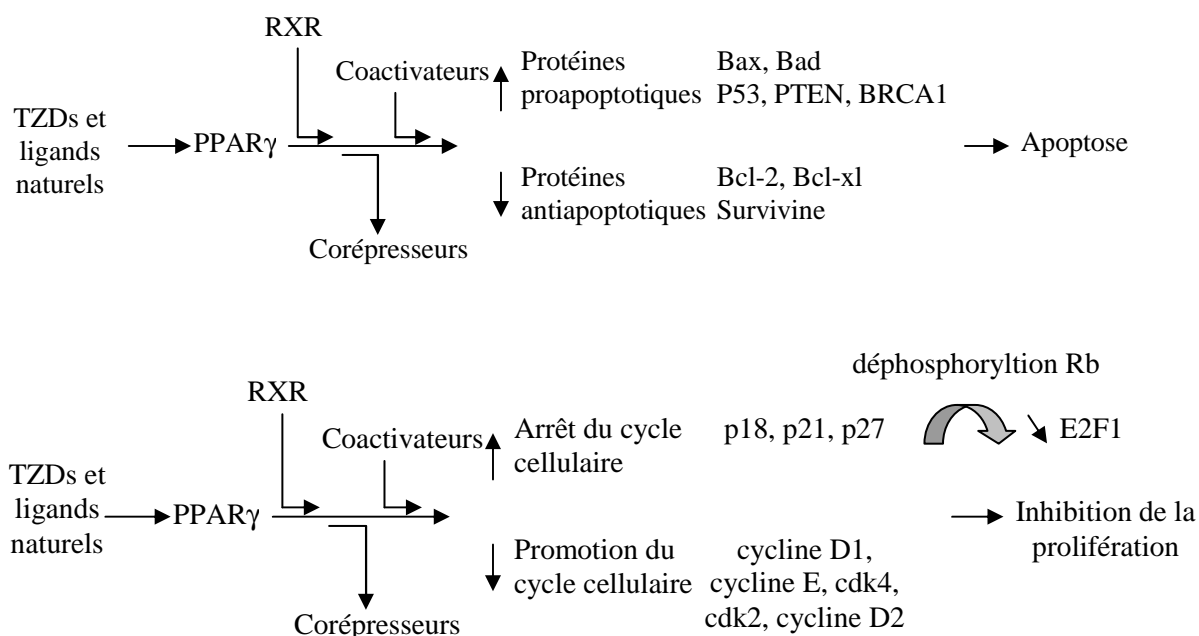


Figure 13 : Mécanismes moléculaires impliqués dans les effets anti-prolifératifs et apoptotiques des ligands de PPAR γ dans les cellules cancéreuses (adapté d'après Blanquicett et al., 2008).

leptine et TNF α diminuées, ce qui est cohérent avec la diminution de taille des adipocytes. Ce phénomène pourrait participer à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Yamauchi et *al.*, 2001; Rieusset et *al.*, 2002). D'autres antagonistes sont utilisés tels que GW9662, T0070907, PD068235 (Leesnitzer et *al.*, 2002; Lee et *al.*, 2002a; Camp et *al.*, 2001). Une étude a montré que l'antagoniste irréversible de PPAR γ , GW9662, inhibe la croissance et induit l'apoptose dans différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires humaines (Seargent et *al.*, 2004).

V. Les effets anticancéreux des TZD

1. Les mécanismes cellulaires cibles des ligands de PPAR γ

1.1. Mécanismes proapoptotiques

L'un des principaux mécanismes d'action des TZD en tant qu'agents anticancéreux implique l'induction de l'apoptose (**figure 12, figure 13**). Dans le cancer des poumons, la TGZ induit une apoptose PPAR γ - et ERK1/2-dépendante (Li et *al.*, 2006b). La TGZ réduit le taux de la protéine antiapoptotique Bcl-2 et induit une accumulation nucléaire et une colocalisation de PPAR γ et ERK. Cependant, le mécanisme par lequel l'apoptose est induite n'est pas défini. D'autre part, la 15d-PGJ₂ et la RGZ augmentent le taux de la protéine BRCA1 dans les cellules MCF7 (Pignatelli et *al.*, 2003). La protéine BRCA1 joue un rôle dans les processus de réparation de l'ADN et son activation augmente l'expression p53-dépendante ou -indépendante des gènes GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage) et p21^{Cip1/Waf1}, tous deux impliqués dans les processus d'apoptose et d'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Fan et *al.*, 2002; Harkin et *al.*, 1999). *In vivo*, la TGZ induit l'inhibition de croissance et l'apoptose des cellules MCF7 implantées chez des souris immunodéficientes (Elstner et *al.*, 1998). *In vitro*, l'exposition des cellules cancéreuses mammaires à la TGZ entraîne une diminution du taux de Bcl-2. Un effet similaire est observé dans des cultures issues de biopsies mammaires cancéreuses, contrairement aux cultures réalisées à partir de tissu sain (Elstner et *al.*, 1998). Elstner et *al.* ont montré que la TGZ et l'acide 9-cis-rétinoïque induisent l'apoptose dans les cellules cancéreuses mammaires, particulièrement dans les cellules qui expriment fortement Bcl-2 (Elstner et *al.*, 2002). La RGZ augmente aussi le taux de la protéine PTEN, capable d'induire l'apoptose en régulant négativement la voie PI3K/Akt activée de façon constitutive dans de nombreux cancers (Chen et *al.*, 2005). Une autre étude a

montrée que les TZD induisent aussi une augmentation du taux de la protéine proapoptotique Bax (Yang et *al.*, 2005). De plus, les TZD réduisent le taux de la protéine antiapoptotique survivine, induisent l'activation des caspases et sensibilisent les cellules cancéreuses mammaires à l'apoptose induite par TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) (Lu et *al.*, 2005). La RGZ sensibilise aussi les cellules MDA-MB-231 au ligand TNF α et à l'anticorps CH11 (qui forment un trimère avec le récepteur Fas) (Mody et *al.*, 2007). La RGZ est aussi capable d'induire l'apoptose par le système Fas/FasL en augmentant l'expression de Fas Ligand (FasL). PPAR γ active directement le promoteur du gène FasL et induit l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires MCF7, MDA-MB-231 et BT20 (Bonofiglio et *al.*, 2009).

Ceci suggère l'existence de plusieurs voies alternatives conduisant à l'apoptose induite par les ligands de PPAR γ .

1.2. Mécanismes antiprolifératifs

Parallèlement à l'induction de l'apoptose, les ligands de PPAR γ peuvent réduire le développement tumoral par un arrêt de la prolifération de différentes lignées de cellules cancéreuses (Weng et *al.*, 2006) (**figure 13**). L'un des mécanismes antiprolifératifs est l'arrêt du cycle cellulaire. Les cyclines s'associent aux sous-unités catalytiques de kinases spécifiques du cycle cellulaire appelées cyclin-dependent kinases (cdk), dont l'activation régule la progression dans le cycle cellulaire. Les cyclines sont donc potentiellement oncogéniques ; en effet, la surexpression de la cycline D1 caractérise de nombreux cancers humains (Musgrove et *al.*, 1994; Chen et Harrison, 2005).

24h d'exposition aux TZD induisent un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 des cellules cancéreuses rénales (Yang et *al.*, 2005). Les TZD induisent une diminution du taux de cycline D1 mais aussi de pRb et Cdk4 et augmentent le taux des inhibiteurs de cdk p21^{Cip1} et p27^{Kip1} de manière dose-dépendante (Yang et *al.*, 2005). p21 et p27 induisent un arrêt du cycle cellulaire en inhibant Cdk2/4 et Cdk2, respectivement. Ces inhibiteurs bloquent la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb) empêchant la cellule d'entrer en phase S. L'augmentation d'expression de p21 est due à l'activation transcriptionnelle de Sp1 (Han et *al.*, 2004), en interaction directe avec PPAR γ (Krey et *al.*, 1995). Des événements moléculaires similaires sont observés dans les cellules cancéreuses mammaires (Samid et *al.*, 2000 ; Yin et *al.*, 2001). L'expression des inhibiteurs de cdk, p21 et p27 est également

observée pour les cellules métastatiques de la lignée MDA-MB-231 traitées à la 15d-PGJ₂ (Clay *et al.*, 1999, 2001). Il a aussi été montré que PPAR γ régule p18^{lnk4c} (Morrison et Farmer, 1999). Ces données sont en accord avec les résultats d'autres études qui montrent que les TZD diminuent les taux des cyclines E et D2, et de Cdk2 dans des lignées cellulaires de leucémie myéloïde chronique (Zang *et al.*, 2006). Il a aussi été montré que les TZD réduisent le taux de la cycline D3 dans des lignées de cellules cancéreuses mammaires (Lu *et al.*, 2005). Inversement, la CGZ induit une augmentation de l'expression de p27 et une réduction de sa dégradation dans les cellules cancéreuses de côlon (Chen et Harrison, 2005). De plus, la CGZ inhibe la prolifération des cellules épithéliales pulmonaires humaines A549 et diminue l'expression de la cycline D1 chez les souris. Il semblerait que la CGZ induise une différenciation associée à l'arrêt du cycle cellulaire (Zhang *et al.*, 2006).

1.3 Mécanismes de différenciation cellulaire

Puisque les ligands de PPAR γ 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*. *In vitro*, l'activation de PPAR γ induit la différenciation des cellules primaires de liposarcome humain qui est potentialisée en présence de ligands de RXR. Des premiers essais cliniques ont été réalisés sur des patients atteints de liposarcomes de grade intermédiaire ou de haut grade qui, traités à la TGZ, ont montré une différenciation adipocytaire des cellules tumorales (Demetri *et al.*, 1999).

Plus largement, il a été montré que les ligands de PPAR γ induisent la différenciation des tumeurs solides *in vitro* et *in vivo* (Kawamata *et al.*, 2006). Les TZD inhibent significativement la croissance des cellules cancéreuses pancréatiques via une induction PPAR γ -dépendante de la différenciation du canal pancréatique sans augmenter l'apoptose, caractérisée par une augmentation de plusieurs marqueurs de différenciation tels que l'E-cadhérine et la phosphatase alcaline (Grommes *et al.*, 2004 ; Ceni *et al.*, 2005). Dans les cellules de cancer colorectal HT-29, les TZD induisent la différenciation et inhibent la croissance et les métastases (Yoshizumi *et al.*, 2004). Le traitement à la RGZ des cellules cancéreuses de côlon, en association avec un agoniste RXR, induit une augmentation du marqueur de différenciation CEA, alors qu'il diminue l'expression de la cyclooxygénase-2 (Cox-2) et la synthèse de la prostaglandine E2 (PGE2) (Cesario *et al.*, 2006). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* sur des modèles de souris xénotreffées. Dans les cellules cancéreuses

mammaires, les ligands de PPAR γ induisent une accumulation lipidique et une modification de l'expression des gènes associés à un état plus différencié, moins malin mais aussi une réduction de la croissance et de la capacité clonale (Mueller et *al.*, 1998).

1.4. Inhibition de l'angiogenèse et de la migration cellulaire

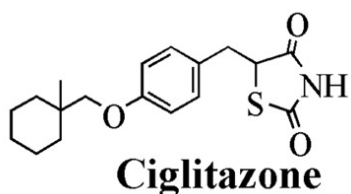
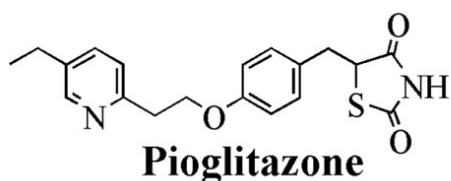
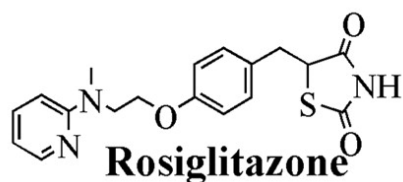
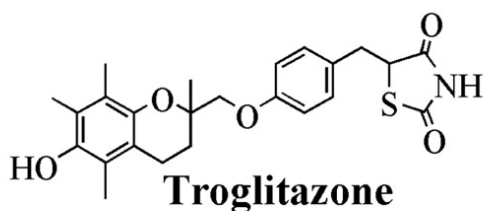
Les ligands de PPAR γ jouent un rôle important dans l'angiogenèse, processus décrivant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants. C'est un processus physiologique normal mais aussi pathologique induisant la croissance des tumeurs malignes et le développement de métastases. *In vitro*, l'activation de PPAR γ par ses agonistes, RGZ, TGZ et 15d-PGJ₂ limite l'angiogenèse notamment par l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales et la libération de facteurs de la famille des VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Fenner et Elstner, 2005). Il a été montré que les ligands PPAR γ inhibent l'angiogenèse tumorale et l'invasion dans le cancer du sein (Fenner et Elstner, 2005). *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 protéolytique des MMP-9 (Magenta et *al.*, 2008). Parallèlement à l'inhibition de la sécrétion/activation des MMP, il a été montré une augmentation des inhibiteurs physiologiques TIMP (Tissue Inhibitors of metalloproteinases). *In vitro*, la migration des cellules MDA-MB-231 est inhibée par la 15d-PGJ₂ (Liu et *al.*, 2003b). Les TZD induisent une diminution du taux de l'activateur de plasminogène, surexprimé dans les cellules cancéreuses invasives, activé en plasmine et qui active à son tour les métalloprotéases MMP (Sawai et *al.*, 2006).

2. Effets PPAR γ -indépendants

Les effets des ligands de PPAR γ ont longtemps été associés à l'activation du récepteur nucléaire. Cependant, de nombreux travaux ont montré que certains effets, et notamment les effets anticancéreux des TZD, peuvent aussi être indépendants de l'activation de PPAR γ . Plusieurs arguments sont en faveur de cette hypothèse :

- Les concentrations nécessaires à l'action des TZD sont supérieures aux valeurs EC₅₀ (concentration produisant 50% de l'effet maximal).
- Les effets des TZD sont rapides (quelques minutes à quelques heures).

Thiazolidinediones



Analogues inactifs

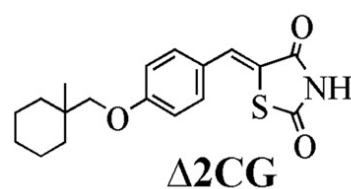
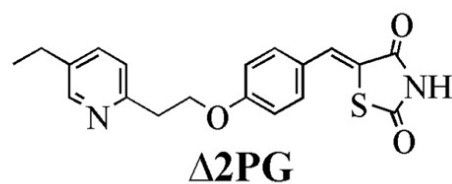
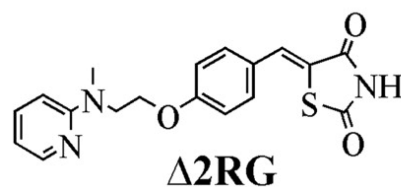
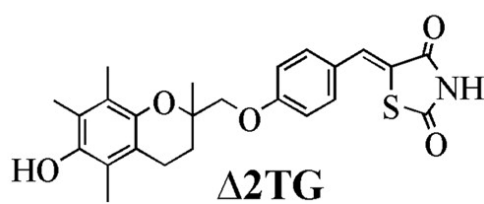


Figure 14 : Structure chimique des analogues inactifs de quatre thiazolidinediones. Par rapport à la molécule de base, ces analogues possèdent une double liaison près du noyau thiazolidine-2,4-dione (Yang et al., 2006).

- L'effet antitumoral des TZD (TGZ ≥ CGZ > PGZ > RGZ) est inverse par rapport à leur affinité de fixation et leur puissance d'activation de PPAR γ (RGZ > PGZ > TGZ ≥ CGZ).
- Les antagonistes PPAR γ ou l'expression d'un dominant négatif PPAR γ ne bloquent pas les effets des TZD.
- Les effets se produisent en l'absence d'expression de PPAR γ ou d'élément de réponse aux PPAR (PPRE) sur les promoteurs de gènes cibles.
- Des analogues inactifs des TZD, appelés $\Delta 2$ inhibent la prolifération des cellules cancéreuses sans activer PPAR γ .
- Des cibles non spécifiques de PPAR γ sont impliquées dans les effets antiprolifératifs des TZD dans différents systèmes.

Plus précisément, les cellules de cancer du sein MCF7 et de prostate LNCaP qui présentent respectivement un faible taux ou sont déficientes en PPAR γ sont plus sensibles aux effets antiprolifératifs de la TGZ et la CGZ que leurs équivalents MDA-MB-231 et PC-3 qui surexpriment PPAR γ . Un ARN interférent ciblant PPAR γ dans les cellules PC-3 n'affecte pas la capacité de la TGZ à induire la mort cellulaire (Shiau et *al.*, 2005; Huang et *al.*, 2005). La TGZ et la CGZ inhibent la prolifération cellulaire à la fois des cellules souches embryonnaires de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ (Palakurthi et *al.*, 2001). Dans les cellules leucémiques humaines HL-60, la TGZ induit un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose associés à une diminution de l'expression de c-myc, c-myb et cycline D2. Puisque ces gènes ne possèdent pas de PPRE au niveau de leurs promoteurs, cet effet ne peut donc pas être médié par PPAR γ (Abe et *al.*, 2002).

Afin de dissocier les effets PPAR γ -indépendants de ceux liés à PPAR γ , une nouvelle classe d'analogues des TZD a été développée. L'introduction d'une double liaison adjacente au cycle terminal thiazolidine-2,4-dione inhibe les potentialités d'activation de PPAR γ . Par exemple, $\Delta 2$ -TG, $\Delta 2$ -CG, $\Delta 2$ -RG et $\Delta 2$ -PG (analogues inactifs de la TGZ, CGZ, RGZ et PGZ, respectivement) sont dépourvus de pouvoir agoniste de PPAR γ , ce qui peut être dû à la rigidité structurale attribuée à l'introduction de la double liaison (**figure 14**). L'inactivation de PPAR γ par les dérivés $\Delta 2$ a été vérifiée en utilisant un kit Elisa pour la détection non radioactive de l'activité de fixation des protéines à l'ADN, dans lequel un oligonucléotide contenant un PPRE a été immobilisé dans des plaques 96 puits. Seules les protéines PPAR γ activées des extraits nucléaires de cellules PC-3 témoins et traitées sont capables de se fixer

sur cet oligonucléotide et sont détectées par un anticorps dirigé contre PPAR γ . L'ajout d'un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (HRP), en présence de son substrat, fournit une réaction colorimétrique. L'absorption mesurée à 450 nm est proportionnelle à la quantité de PPAR γ fixée au PPRE (Shiau et *al.*, 2005). L'inactivation de PPAR γ par les dérivés $\Delta 2$ a aussi été vérifiée en transfectant les cellules cancéreuses de prostate DU-145 avec un plasmide contenant un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur contenant un PPRE (Yang et *al.*, 2006). Aucun des dérivés $\Delta 2$ n'est capable d'induire la transactivation de PPAR γ . Par ailleurs, la TGZ a été utilisée comme point de départ pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Par exemple, la $\Delta 2$ TG-6 est un analogue structural qui a une meilleure efficacité que la TGZ et la $\Delta 2$ TG dans l'induction de la protéolyse de la cycline D1 et l'inhibition de la prolifération des cellules MCF7 (IC₅₀ 8 vs 55 μ M) (Huang et *al.*, 2005). STG28 est un autre agent antitumoral qui a une plus grande capacité à induire la protéolyse de la cycline D1 dans les cellules de cancer de prostate par rapport à la TGZ et la $\Delta 2$ TG. De plus, les cellules épithéliales normales de prostate sont résistantes aux effets de STG28 (Yang et *al.*, 2007). Cette différence d'effet entre cellules tumorales et cellules saines souligne le potentiel translationnel de cette nouvelle classe d'agents antitumoraux.

Les principales cibles non spécifiques de PPAR γ , impliquées dans les effets antiprolifératifs des TZD sont présentées et illustrées par des exemples :

- Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7, l'apoptose induite par la TGZ dépend de l'expression de GADD45. La TGZ induit la transcription de GADD45 par la voie des MAPK où GADD45 est régulé positivement par JNK et négativement par ERK1/2 et p38. Par contre, la RGZ et la PGZ n'induisent pas l'expression de GADD45 suggérant que la TGZ a une action PPAR γ -indépendante (Yin et *al.*, 2004). La TGZ induit également l'apoptose des cellules musculaires lisses de vaisseaux en activant la voie p53-GADD45 (Okura et *al.*, 2000).
- L'activité proapoptotique de la TGZ dans les cellules de cancer du côlon HCT-116 dépend de l'expression du gène suppresseur de tumeur EGR1. L'induction d'EGR1 par la TGZ se fait via la voie des ERK1/2. Il a aussi été montré que les autres ligands de PPAR γ ne peuvent pas induire l'expression d'EGR1 et que ERK1/2 diminue l'expression de PPAR γ . Ces données suggèrent un effet PPAR γ -indépendant de la TGZ dans les cellules HCT-116 (Baek et *al.*,

2003). L'activation de ERK médie l'activité antiproliférative de la TGZ dans la lignée de cellules cancéreuses de colon HCT-15, où la phosphorylation rapide de ERK (15 min) suggère une action directe de la TGZ, suivie par l'induction de p21 (Kim et *al.*, 2002).

- Les TZD activent la voie EGFR-ERK1/2 de manière PPAR γ -indépendante. L'incubation de manière prolongée avec la TGZ inhibe la prolifération cellulaire en atténuant la signalisation EGFR et en induisant son internalisation et sa dégradation par la machinerie endolysosomale. De plus, les agonistes de PPAR γ sont capables d'inhiber la phosphorylation d'Akt dans plusieurs types cellulaires. L'inhibition de la phosphorylation d'Akt semble être un important mécanisme antitumoral par lequel la TGZ inhibe la signalisation aberrante d'EGFR dans les cellules cancéreuses (Li et *al.*, 2009).

- Les TZD bloquent le passage G1/S en inhibant l'initiation de la transcription dans les cellules souches embryonnaires ES. Ceci est la conséquence d'une déplétion des réservoirs de calcium intracellulaire, induisant l'activation de la kinase PKR (protein kinase dsRNA dependent) qui phosphoryle le facteur d'initiation de la transcription eIF2 α , le rendant inactif (Palakurthi et *al.*, 2001).

- La TGZ induit une diminution de la phosphorylation de STAT3 en activant la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) dans les cellules de gliomes humains (Akasaki et *al.*, 2006).

- La TGZ inhibe la croissance cellulaire en ciblant directement les fonctions respiratoires mitochondriales (Feinstein et *al.*, 2005) ou en inhibant les fonctions de survie de Bcl-2/Bcl-x1 dans les cellules cancéreuses de prostate LNCaP déficientes en PPAR γ (Shiau et *al.*, 2005).

- Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7 et MDA-MB-231, la TGZ induit une acidose (diminution de pH) par inhibition du transporteur Na⁺/H⁺. Ceci a pour conséquence une inhibition de la synthèse d'ADN et de la prolifération cellulaire. Cet effet qui n'est pas inhibé par l'antagoniste de PPAR γ , GW9662, est aussi décrit dans les cellules NIH3T3 PPAR γ ^{-/-} (Turturro et *al.*, 2004).

- La β -caténine est un facteur de transcription permettant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération (cycline D, c-myc) et dans la migration (fibronectine). La TGZ facilite la

dégradation de la β -caténine via un mécanisme PPAR γ -dépendant ou indépendant selon le type cellulaire (Moldes et *al.*, 2003; Wei et *al.*, 2007).

- La TGZ et la CGZ inhibent l'expression de PSA (Prostate-specific antigen) en empêchant le recrutement de AR (Androgen Receptor) au niveau de son promoteur et non en réduisant l'expression de AR. Ces TZD répriment la transcription du gène AR en induisant la dégradation du facteur de transcription Sp1 par le protéasome dans les cellules LNCaP (Yang et *al.*, 2007). PSA est utilisé en tant que biomarqueur pour le diagnostic et la progression du cancer de prostate (Polascik et *al.*, 1999).

La TGZ et la CGZ induisent la dégradation de ER α par le protéasome dans les cellules MCF7 (Qin et *al.*, 2003). De plus, la capacité de ces TZD à induire la dégradation de Sp1 peut justifier les effets de la TGZ sur l'inhibition de l'expression de cibles du facteur de transcription Sp1 dont EGFR (Yang et *al.*, 2007), la survivine (Schultze et *al.*, 2006), les molécules d'adhésion cellulaire ICAM-1 et VCAM-1 (Sasaki et *al.*, 2005) et la protéine Skp2 (Wei et *al.*, 2007).

- La TGZ induit une inhibition de prolifération des cellules hépatiques HepG2 en augmentant le taux de p53, p21 et p27, parallèlement à la diminution du taux de cycline D1 et de cdk2-cycline A. Dans ces cellules, la RGZ n'affecte pas le taux des régulateurs du cycle cellulaire, la TGZ induit donc l'inhibition de croissance via un mécanisme PPAR γ -indépendant (Bae et *al.*, 2003). La protéine p27, un inhibiteur de CDK, régule la transition G1/S du cycle en interagissant avec les complexes CDK2-cycline E ou CDK2-cycline A. Un des mécanismes responsables des concentrations très faibles de p27 retrouvées dans certaines tumeurs est l'activation anormale de sa dégradation. L'ubiquitinylation de p27 est sous la dépendance d'une E3 ligase de la famille SCF dont le composant Skp2, une protéine à boîte F, reconnaît la protéine substrat. La quantité de Skp2 est anormalement élevée dans plusieurs types de tumeurs et sa concentration est inversement corrélée aux quantités de p27 et au pronostic des tumeurs (Bloom et Pagano, 2003).

- Les ligands de PPAR γ sensibilisent diverses cellules cancéreuses mammaires (ER-positives, ER-négatives et p53-déficientes) à l'apoptose induite par TRAIL via un mécanisme PPAR γ -indépendant, en réduisant le taux d'ARNm de la cycline D3 et en induisant la dégradation de

protéine cycline D3 par le protéasome. Ceci induit un arrêt du cycle cellulaire et une réduction du taux de survivine, une protéine antiapoptotique (Lu et *al.*, 2005).

D'autre part, la TGZ et la CGZ induisent la dégradation de la protéine antiapoptotique FLIP (FLICE (FADD-like IL-1-converting enzyme) inhibitory protein) qui bloque la signalisation des récepteurs de mort, permettant de sensibiliser les cellules gliales à TRAIL (Kim et *al.*, 2002; Schultze et *al.*, 2006).

- La TGZ et la CGZ inhibent l'activité globale histone déacétylase (HDAC) induisant une augmentation de l'acétylation de résidus lysine au niveau des histones. Cette acétylation est corrélée à la mort des cellules MCF7 et MDA-MB-231 (Davies et *al.*, 2010).

- L'induction de la mort cellulaire par les espèces réactives de l'oxygène ROS (Reactive Oxygen Species) générées par certains ligands de PPAR γ dépend du type cellulaire. Dans les cellules épithéliales rénales OK, la CGZ induit une mort cellulaire PPAR γ -indépendante. Elle génère des ROS et induit une augmentation du calcium intracellulaire en activant la voie p38 et la translocation nucléaire du facteur apoptogène AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Kwon et *al.*, 2009).

- La 15d-PGJ₂ et la TGZ induisent des effets anti-inflammatoires dans les cellules β -pancréatiques dont l'inhibition d'expression du gène iNOS et la production de NO stimulée par IFN γ et IL-1. Le prétraitement des cellules RiNmSF induit une inhibition de la dégradation de I κ B stimulée par IL-1 et la phosphorylation de STAT1 stimulée par IFN γ . De plus, la surexpression d'un dominant négatif PPAR γ ou le traitement à l'antagoniste GW-9662 ne modulent pas les effets inhibiteurs de la 15d-PGJ₂ au niveau du signal cytokine dans les cellules RiNm5F (Weber et *al.*, 2004b). Les effets inhibiteurs de la 15d-PGJ₂ sur la signalisation des cytokines semblent être corrélés à l'activation du stress du réticulum (réponse UPR) dans les cellules β -pancréatiques en augmentant l'expression de HSP70, caspase 3 ainsi que la phosphorylation du facteur d'initiation de la transcription eIF2 α induisant un ralentissement de la transcription (Chambers et *al.*, 2007). Ces effets ne sont pas spécifiques à la 15d-PGJ₂ puisque les thiazolidinediones TGZ, CGZ, MCC-555 et la RGZ sont aussi capables d'induire les gènes régulés par la réponse UPR : Hsp70, BiP, CHOP, ATF4 dans les cellules RiNm5F (Weber et *al.*, 2004a).

Stimulation (↑)	Inhibition (↓)
GADD45	Bcl2/Bcl-x1
EGR1	PH
Ca ²⁺	Synthèse d'ADN
p53	β-caténine
p21	PSA
p27	AR
TRAIL	Sp1
ROS	Survivine
	EGFR
	ERα
	ICAM-1, VCAM-1
	Skp2
	Cyclin D1-cdk
	FLIP
	HDAC

Tableau 5: Tableau récapitulatif des principaux acteurs des effets anticancéreux PPARγ-indépendants des TZD.

Ces différentes cibles non spécifiques de PPAR γ , impliquées dans les effets antiprolifératifs des TZD sont présentées dans le **tableau 5**.

3. Essais cliniques des ligands de PPAR γ sur différents types de cancer

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 pré-clinique 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 antiprolifératifs 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 de grade intermédiaire ou de haut grade qui, traités à la TGZ, ont montré une différenciation adipocytaire des cellules tumorales (Demetri et *al.*, 1999).

Dans une étude clinique de phase II, des patients atteints de cancer de prostate avancé, histologiquement confirmé, n'ayant pas de symptômes de maladie métastatique, ont été traités avec la TGZ (800 mg/jour) par voie orale (Grommes et *al.*, 2004). Ils ont montré une stabilisation des concentrations du marqueur PSA (Prostate-Specific Antigen), indiquant une stabilisation de la maladie.

Concernant le cancer du sein, une étude utilisant les TZD en monothérapie a été suspendue après 5 mois puisque la TGZ a été retirée du marché en 2000 suite à un rapport de la FDA (Food and Drug Administration (USA)) qui établit que la TGZ provoque de sérieux dysfonctionnements hépatiques. Cet essai a été réalisé sur 22 patientes d'une moyenne d'âge

de 53 ans, atteintes d'un cancer du sein réfractaire à au moins une thérapie anticancéreuse classique, pour lequel aucune réponse objective n'a été observée. Une autre tentative de monothérapie utilisant des TZD englobait 38 femmes atteintes d'un cancer du sein ganglion lymphatique-négatif. Cette intervention était courte (2-6 semaines) puisque l'administration de la RGZ (8 mg/jour) s'est faite entre la période de la biopsie diagnostique et l'opération. La RGZ, utilisée dans le cadre du traitement du diabète de type II a été retirée du marché en 2010. Aucun effet significatif sur la prolifération des cellules tumorales n'a été observé en analysant l'expression du marqueur Ki67 (protéine nucléaire exprimée dans les cellules en prolifération) (Baranova, 2008; Blanquicett et *al.*, 2008).

Ces premiers essais cliniques ont eu des résultats contradictoires. Certains essais ont montré des effets bénéfiques, alors que d'autres n'ont montré aucun effet anticancéreux significatif des ligands de PPAR γ . Ces données ambivalentes pourraient être dues à la sélection de cancers prétraités réfractaires, qui ne répondent plus aux thérapies anticancéreuses. Par ailleurs, une concentration suffisante des ligands de PPAR γ ne devrait pas être atteinte dans les études où l'administration était faite par voie orale.

Plusieurs études sur les TZD ont conclu à des effets récepteur-indépendants à cause des concentrations élevées (jusqu'à 100 μ M) nécessaires pour observer des effets. Ceci a soulevé la question de la dose à utiliser en thérapeutique afin d'activer des voies PPAR γ -indépendantes. Chez l'homme, la concentration sérique maximale après une dose unique de 30 mg de PGZ est d'environ 900 ng/ml (\approx 2,2 μ M) ; pour la TGZ, la concentration sérique maximale peut atteindre 7-8 μ M. Dans les études chez l'animal, des taux plus élevés ont été atteints, avec un niveau sérique en PGZ entre 18 et 145 μ M. Les valeurs AUC (Area Under the Curve ; index d'exposition totale à la molécule) peuvent atteindre 20 μ M pour la PGZ et 55 μ M pour la TGZ. Les valeurs AUC donnent une mesure de la quantité de molécules et du temps où elles restent dans le corps. Ceci met l'accent sur le fait qu'une longue exposition à de faibles concentrations pourrait avoir un meilleur effet qu'une courte exposition à de fortes concentrations. Par conséquent, il est probable que des concentrations sériques maximales de TZD puissent être atteintes après une administration de doses approuvées actuellement (Feinstein et *al.*, 2005).

Le cancer est une maladie multifactorielle complexe qui nécessiterait indubitablement une combinaison d'agents afin de fournir une efficacité clinique. La recherche de combinaisons de molécules utilisées à faible concentration représente une stratégie prometteuse comme le suggère la potentialisation du gefetinib (inhibiteur de l'EGFR) co-administré avec la RGZ

(Blanquicett et *al.*, 2008). Le nombre d'études cliniques reste limité. De plus, des études plus longues sont nécessaires pour déterminer si les résultats prometteurs des études *in vitro* et précliniques peuvent être extrapolés à l'homme (Grommes et *al.*, 2004; Blanquicett et *al.*, 2008).

PARTIE III : EGR1 et cancer

I. Les gènes précoces immédiats (IEGs)

1. Définition des gènes précoces immédiats

Les gènes précoces immédiats (immediate-early response genes, IEGs) sont des gènes transcrits de manière rapide et transitoire, en réponse à des stimuli extracellulaires. Leur induction est indépendante de la néo-synthèse de protéines. Certains gènes précoces codent des facteurs de transcription, régulant la transcription d'une deuxième vague de gènes exprimés plus tardivement. Ainsi, les gènes précoces représentent des intermédiaires entre une stimulation brève de la cellule et son adaptation à long terme en réponse à cette stimulation.

2. Historique et terminologie

Les IEGs ont été caractérisés pour la première fois dans les années 80, lors d'études visant à identifier des gènes répondant à des facteurs de croissance pouvant contrôler la reprise du cycle cellulaire de cellules quiescentes (Cochran *et al.*, 1983). Ces travaux ont permis d'isoler des gènes dont la transcription s'élève dans les minutes qui suivent l'addition de facteurs de croissance même en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique (tels que le cycloheximide). L'appellation IEG a été empruntée à la virologie, ce terme faisant référence à des gènes viraux qui sont exprimés de manière précoce au début de l'infection virale (avant la réplication du virus), et immédiate (indépendamment de la synthèse de protéines). *c-fos* et *c-myc*, homologues cellulaires d'oncogènes rétroviraux furent parmi les premiers IEGs découverts (Kelly *et al.*, 1983; Greenberg et Ziff, 1984). Il s'agit de proto-oncogènes; c'est à dire de gènes qui peuvent, lorsqu'ils sont mutés ou que leur expression est dérégulée, devenir oncogènes et induire la formation de tumeurs (Bishop, 1985). En plus de son implication dans le cancer, l'expression des IEGs a pu être associée à de nombreux autres phénomènes biologiques tels que la mémorisation et le développement embryonnaire.

A l'exemple de *c-fos* et *c-myc*, beaucoup d'IEGs découverts par la suite codent majoritairement des facteurs de transcription (NUR77, JUN, EGR, MYB, NGFI-C, SRF). D'autres codent des protéines sécrétées telles que des cytokines et des chimioattractants (JE, N51/KC, Fic) ou encore des enzymes cytoplasmiques (phosphatases 3CH134/MKP-1/Erp et

cyclooxygénase Cox-2) (Herdegen et *al.*, 1993). Pour notre part, nous nous sommes intéressés particulièrement à l'expression de gènes de la famille EGR.

II. Les gènes de la famille EGR

Parmi l'ensemble des gènes précoces immédiats, le gène EGR1 (Early Growth Response gene 1) est le principal membre d'une famille de gènes à réponse précoce, comprenant aussi EGR2, EGR3 et EGR4. EGR1 (ou Zif268/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK/ pAT225), EGR2 (ou Krox-20/ pAT591) et EGR3 (ou PILOT), codent des facteurs de transcription, alors qu'EGR4 (ou NGFI-C/pAT133) code un répresseur transcriptionnel (Zipfel et *al.*, 1997). WT1 (Wilm's Tumor 1) est un membre apparenté à cette famille, essentiel au développement normal du système urogénital et muté chez les patients développant des tumeurs de Wilms (néphroblastomes).

1. Le gène EGR1

Le gène EGR1 humain est localisé sur le chromosome 5 au locus q23-31 (Sukhatme et *al.*, 1988), région très souvent délétée chez les patients atteints de leucémies myéloïdes (del(5q)). Le gène EGR1 a été découvert en tant que gène induit, soit par des agents mitogènes (d'où son nom) (Sukhatme et *al.*, 1987), soit par l'ester de phorbol TPA (12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate), un activateur de la PKC. Il a été nommé dans ce cas TIS8 (TPA Inducible Sequence 8) (Lim et *al.*, 1987). Le facteur de différenciation cellulaire NGF induit également sa transcription dans les cellules PC12 de rat, d'où l'appellation NGFI-A (Nerve Growth Factor Induced Gene A) (Milbrandt, 1987). Un rôle dans la neurogénèse post-natale lui a valu le nom de Krox-24 (boîte de Krüppel) (Lemaire et *al.*, 1988). Il est nommé également Zif268 (zinc finger cDNA) car il a été découvert en tant que protéine possédant des motifs en doigt de zinc (Christy et *al.*, 1988). Enfin, le nom de ZENK (acronyme de l'orthologue aviaire des gènes de mammifères Zif-268, Egr1, Ngfi-a et Krox-24) lui a été attribué pour son rôle dans le chant des oiseaux (Mello et *al.*, 1992).

L'expression d'EGR1 est induite rapidement et de manière transitoire en réponse à une grande variété de signaux extracellulaires : facteurs de croissance, cytokines, hormones, esters de phorbol, irradiation et stress de différentes sortes. L'expression d'EGR1 est liée à la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Thiel et Cibelli, 2002), et sert par conséquent de lien entre les signaux extracellulaires et les réponses à long-terme en induisant la transcription

de gènes cibles. Le gène EGR1 peut subir des régulations à plusieurs niveaux, au niveau chromatinien et au niveau post-transcriptionnel.

1.1. Méthylation

La méthylation de l'ADN au niveau d'une séquence GC joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression génique dans les cellules normales et cancéreuses. Elle est impliquée dans de nombreux processus biologiques dont l'inactivation génique. Chez les vertébrés, la méthylation de l'ADN se produit au niveau du carbone en position 5 du résidu cytosine dans le dinucléotide 5'-GC-3' (appelé CpG, et CpG méthylé sera noté m⁵CpG). Comme cela est observé pour de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs, la méthylation pourrait être le mécanisme responsable de l'inactivation d'EGR1 dans les tissus cancéreux mammaires (Liu *et al.*, 2007). Dans la lignée cellulaire murine B immature, les cellules WEHI 231, l'expression endogène d'EGR1 est bloquée par la méthylation de ce gène (Seyfert *et al.*, 1990).

1.2. Polyadénylation

La polyadénylation ou l'addition d'un segment poly(A) (plus de 100 résidus adénosine) à l'extrémité 3' de l'ARNm permet sa maturation. D'autre part la polyadénylation est impliquée dans la régulation de l'expression de certains gènes en facilitant leur passage du noyau vers le cytoplasme et/ou en augmentant leur stabilité.

EGR1 est régulé au niveau transcriptionnel par une polyadénylation alternative. Dans la rétine, deux variants d'ARNm EGR1 sont produits, dont une version longue avec 293 paires de bases supplémentaires à la fin de la région 3'UTR (Simon *et al.*, 2004). La polyadénylation est impliquée dans la translocation d'EGR1 suite à un stimulus lumineux (Mittelbronn *et al.*, 2009).

1.3. Eléments de réponse

Les gènes EGR1 murin (3,8 kb) et humain (3,6 kb) possèdent deux exons et un intron d'environ 700 paires de base (Sakamoto *et al.*, 1991; Tsai-Morris *et al.*, 1988). Le promoteur d'EGR1 est très complexe et contient des sites de fixation de nombreux facteurs de transcription (Tsai-Morris *et al.*, 1988). Les éléments régulateurs du promoteur du gène EGR1

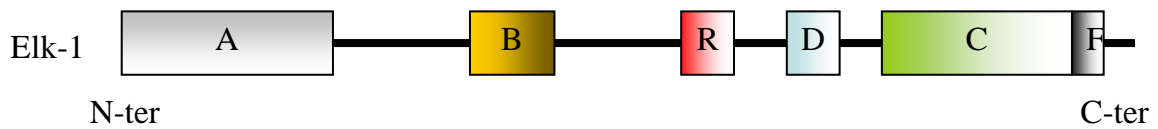


Figure 15 : Structure du facteur Elk-1. La A-box est le domaine de fixation à l'ADN. La B-box est le domaine d'interaction avec SRF. La C-box est responsable de l'activation transcriptionnelle contenant des sites de phosphorylation par les MAPK. Les D-box et F-box sont les sites de fixation des MAPK. La R-box est un domaine de répression (d'après Buchwalter et al., 2004).

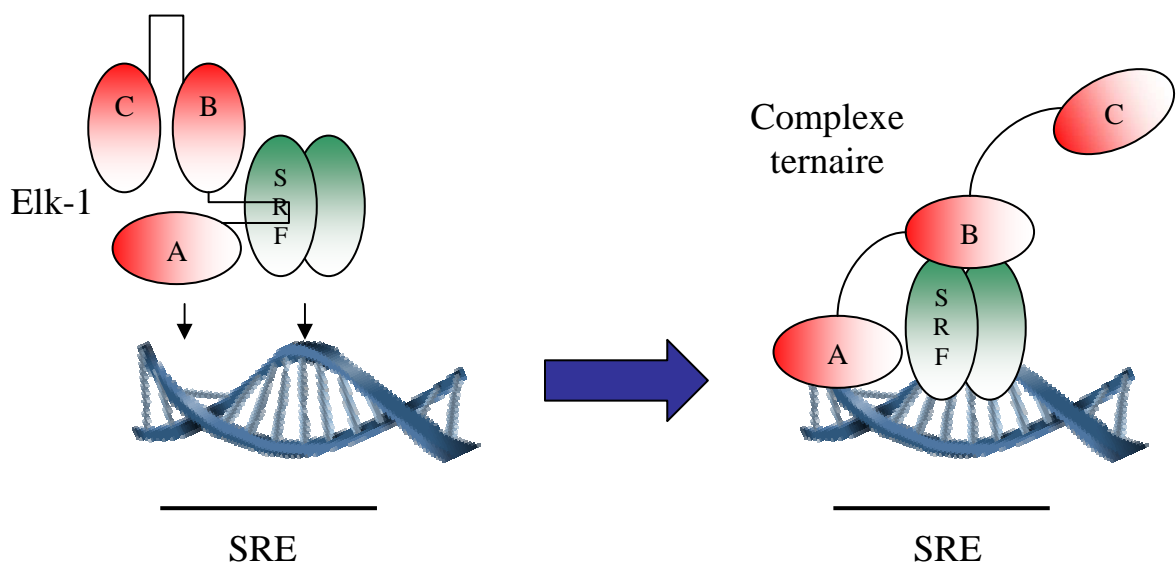


Figure 16 : Représentation schématique de la formation du complexe ternaire. Le dimère SRF ainsi que la A-box de Elk-1 interagissent avec la séquence SRE ; la B-box interagit avec le dimère SRF (d'après Buchwalter et al., 2004).

ont été conservés au cours de l'évolution (Sakamoto et *al.*, 1991). En effet, dans l'ensemble des promoteurs étudiés, on trouve les sites régulateurs suivants : 5 sites SRE (Serum Responsive Element), 2 sites CRE (cAMP Responsive Element), 1 site TRE (TPA Responsive Element), 2 sites Sp1 (Specificity Protein 1), 1 site AP-1 (Activating Protein 1), 1 site EBS (EGR1 Binding Site), ce dernier étant reconnu par la protéine EGR1 elle-même, ce qui permet de diminuer sa propre expression (Sakamoto et *al.*, 1991; Cao et *al.*, 1990; Christy et Nathans, 1989a; Tsai-Morris et *al.*, 1988; Schwachtgen et *al.*, 2000).

Parmi les cinq sites SRE présents dans le promoteur d'EGR1 (un groupe distal de 3 et un groupe proximal de 2), seuls deux sont fonctionnels (Duan et *al.*, 2002; McMahon et Monroe, 1995). Cependant, en 2000, l'équipe de Schwachtgen a montré que chez l'homme, les 5 SREs sont fonctionnellement actifs (Schwachtgen et *al.*, 2000). Il est démontré que la séquence SRE CC(A/T)6GG (CArGbox, CC-A-rich GG) du gène murin est responsable de la transcription d'EGR1 en réponse au sérum, au PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), au FGF (Fibroblast Growth Factor), au NGF (Nerve Growth Factor), à l'IGF (Insulin-like Growth Factor) et à l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Christy et Nathans, 1989b). Cette séquence est aussi impliquée dans l'induction d'EGR1 par des oncogènes (ras, raf, src...), des cytokines et par un ensemble de stimuli qui activent les voies des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) ERK, JNK et p38 kinase (Treisman, 1992). L'élément SRE est reconnu par la phosphoprotéine nucléaire SRF (Serum Responsive Factor). Toutefois, la liaison d'un dimère SRF à la séquence SRE nécessite le recrutement d'un facteur de la famille TCF (Ternary Complex Factor), dont le plus connu est le facteur Elk-1 (Ets-like transcription factor) (Dalton et Treisman, 1992; McMahon et Monroe, 1995; Thiel et Cibelli, 2002). Ce membre de la famille Ets possède 1) une région A-box de fixation à l'ADN en position N-terminale, 2) un domaine nommé B-box nécessaire à l'interaction protéine-protéine avec SRF, 3) une région régulatrice près de l'extrémité C-terminale nommée C-box responsable de l'activation transcriptionnelle contenant des sites de phosphorylation par les MAPK, 4) les domaines D-box et F-box sont des sites de fixation des MAPK et 5) un domaine R de répression (**figure 15**). Après avoir été activé par phosphorylation par l'ensemble des MAPK, Elk-1 se fixe sous forme monomérique sur le complexe SRF/SRE afin de former un complexe ternaire (**figure 16**) (Gille et *al.*, 1992; Whitmarsh et *al.*, 1995). Puisque la séquence SRE est occupée de façon constitutive (Treisman, 1992), l'activation par phosphorylation d'Elk-1 représente le mécanisme le plus probable par lequel les MAPK induisent l'expression du gène EGR1 (Kaufmann et *al.*, 2001; Yang et *al.*, 1998).

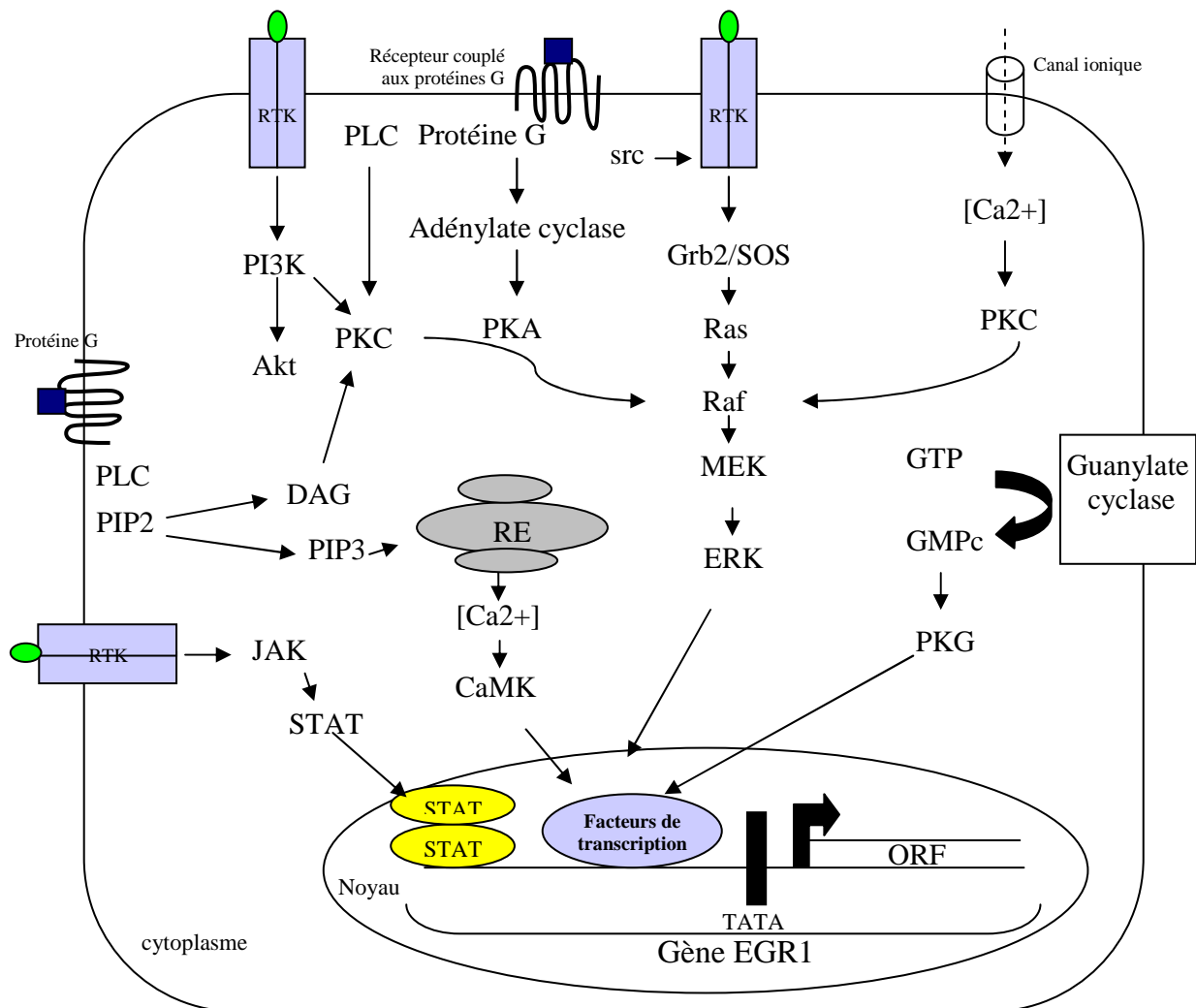


Figure 17 : Représentation schématique des différentes voies de signalisation impliquées dans l'activation de la transcription du gène EGR1.

La séquence CRE (cAMP Responsive Element) sert de relais aux seconds messagers Ca^{2+} et AMPc, qui activent respectivement une protéine kinase dépendant du complexe Ca^{2+} /Calmoduline (CaMK), et la protéine kinase dépendant de l'AMPc (PKA). Ces mécanismes assurent la transcription d'EGR1, en réponse aux hormones utilisant le Ca^{2+} ou l'AMPc comme second messenger (Sheng et *al.*, 1994). L'homodimère CREB (cAMP Responsive Element Binding) est lié au motif CRE et c'est sa phosphorylation sur le résidu sérine 133 par la PKA ou la CamKII, qui conduit à l'activation de la transcription en recrutant le co-activateur CBP (CREB-Binding Protein) qui présente une activité histone acétyltransférase (Lee et *al.*, 1995). Ce site est déphosphorylé par la protéine phosphatase de type 2A (PP2A), qui représente un élément supplémentaire régulant l'expression d'EGR1 par la protéine CREB (Wadzinski et *al.*, 1993). CREB est aussi capable de former des dimères (homodimères ou hétérodimères), et en fonction de leur nature, il peut activer ou inhiber la transcription. Par exemple, associé à la protéine CREM (CRE Modulator), il agit comme un répresseur transcriptionnel, alors qu'en interaction avec ATF2 ou une autre molécule CREB il agit comme activateur transcriptionnel. Cette modification post-traductionnelle permet à CREB de recruter le coactivateur CBP (CREB Binding Protein) qui possède une activité histone acétyltransférase lui permettant d'interagir avec la machinerie transcriptionnelle (Foulkes et *al.*, 1991; Carlezon et *al.*, 2005). En plus, tous ces facteurs de transcription peuvent être modifiés par acétylation ou phosphorylation permettant de modifier et de contrôler leur activité et leur capacité de fixation.

L'élément TRE (TPA Responsive Element) est responsable de la transcription d'EGR1 par le TPA (Christy et Nathans, 1989b). Ce site est également le site de fixation du facteur de transcription AP1 (Sakamoto et *al.*, 1991). La transcription d'EGR1 peut être régulée par les protéines Jun et Fos, via les sites AP1 (Dragunow et *al.*, 1994). La fixation du facteur NF κ B-like sert de régulateur négatif de la transcription d'EGR1 dans les fibroblastes (Aicher et *al.*, 1999) alors que Sp1 active la transcription du gène EGR1 (Cao et *al.*, 1993). La protéine EGR1 peut se fixer au niveau de la région EBS 5'-CGCCCCCGC-3' et réprimer la transcription de son propre gène (Cao et *al.*, 1990).

1.4. Voies de signalisation contrôlant la transcription d'EGR1

Nous ne décrivons ici que les principales voies de signalisation connues pour être impliquées dans le contrôle de la transcription d'EGR1. Ces différentes voies sont illustrées dans la **figure 17**.

1.4.1. Récepteurs membranaires

Beaucoup de signaux chimiques extracellulaires n'ont pas la possibilité de franchir les membranes cellulaires. C'est le cas par exemple des hormones hydrophiles, des neurotransmetteurs, ou des cytokines. Ces molécules agissent par liaison à des récepteurs situés à la surface des cellules. Il existe différentes classes de récepteurs avec des structures et des fonctionnements différents. On distingue en particulier les récepteurs métabotropes et les récepteurs ionotropes. L'activité des premiers est liée à une activité de type métabolique. Cette catégorie comprend les récepteurs tyrosine kinase, les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs guanylyl cyclase. L'activité des seconds est liée à des flux ioniques.

1.4.1.1. Les récepteurs métabotropes

a) Les récepteurs tyrosine kinase

Les récepteurs tyrosine kinase (RTK) forment des dimères suite à la liaison de leur ligand, permettant leur autophosphorylation sur des résidus tyrosines. Dans certains cas, la phosphorylation du récepteur lui permet également de phosphoryler directement des facteurs de transcription, comme dans le cas du module JAK/STAT (Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription). Dans d'autres cas, la phosphorylation du récepteur permet le recrutement de protéines servant à l'activation de diverses voies de signalisation intracellulaire.

Par exemple, EGR1 peut être activé via la voie JAK/STAT dans les cellules lymphoïdes murines BA/F3 traitées par un facteur humain stimulant les colonies de granulocytes macrophages (hGM-CSF) (Watanabe et *al.*, 1997). Les radiations ionisantes peuvent causer un stress qui induit l'activation du récepteur IGF-1R (Insulin-like growth factor 1 receptor) à activité tyrosine kinase suivie de l'activation de la signalisation Src-Mek-Erk-EGR1 qui régule une voie de survie, importante à la résistance aux radiations dans les thérapies cancéreuses (Criswell et *al.*, 2005). Dans les cellules d'hépatome de rat H4IIE, l'insuline est capable de se fixer au niveau du récepteur à l'insuline à activité tyrosine kinase, d'activer plusieurs voies, PI3K, ERK1/2 et P38 induisant de manière coordonnée la transcription du gène EGR1 (Keeton et *al.*, 2003). L'EGF et le PDGF induisent l'expression d'EGR1 via la signalisation EGFR/ERK1/2 dans les lignées cellulaires issues de gliomes humains U343MG-a et U-118MG (Kaufmann et *al.*, 2001). L'irradiation UV active EGFR, induisant l'expression

d'EGR1 via la voie ERK1/2 et l'apoptose des cellules tumorales de prostate M12 (Arora et *al.*, 2008). Une autre étude a montré que l'EGFR muté constitutivement actif induit une augmentation de l'expression d'EGR1 via la voie ERK1/2 dans les cellules rénales embryonnaires humaines HEK293 transfectées (Maegawa et *al.*, 2009).

b) Les récepteurs couplés aux protéines G

Par exemple, dans les cellules fibroblastiques 39M1-81, la thrombine stimule un récepteur de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, nommé PARs (protease-activated receptors). Grâce à son activité protéasique, la thrombine clive au niveau d'un site spécifique la partie NH₂-terminale du récepteur. La nouvelle extrémité produite joue alors le rôle de ligand. Celui-ci induit l'activation de la phospholipase C (PLC) et la synthèse d'IP₃ conduisant à la libération de calcium dans le cytosol à partir du réticulum endoplasmique. L'augmentation de calcium peut induire l'activation de la PKC et réguler directement ou indirectement l'activité Raf suivie de l'activation des ERK1/2. ERK1/2 phosphorylées activent Elk-1 induisant la transcription d'EGR1 (Rossler et Thiel, 2009).

c) Les récepteurs guanylyl cyclase

La voie GMPc/PKG est également impliquée dans le contrôle de la transcription du gène EGR1, mais dans une moindre mesure. Une étude a montré que la voie GMPc/PKG est capable d'inhiber l'expression d'EGR1 induite par la cocaïne au niveau du noyau accumbens du système limbique (Jouvert et *al.*, 2004).

1.4.1.2. Les récepteurs ionotropes

Les récepteurs ionotropes sont des canaux ioniques contrôlés par des ligands. La liaison d'un ligand spécifique produit des changements conformationnels et l'ouverture du canal intrinsèque au récepteur, permettant de convertir un signal chimique en un flux ionique au travers de la membrane.

Une étude a montré que l'induction d'EGR1 est médiée en partie par un récepteur ionotropique, le NMDA au niveau du striatum chez le rat (Wang, 1998). De même, la stimulation du récepteur ionotropique P2X₇ entraînant un influx de Ca²⁺ intracellulaire dans le cytoplasme induit la biosynthèse de la protéine EGR1 (Stefano et *al.*, 2007).

1.4.2. Voie des MAPK

Les voies des MAP kinases (MAPKs) constituent un système de transduction des signaux très conservé au cours de l'évolution chez les eucaryotes, et l'un des plus étudié. Chez les mammifères, cinq modules distincts ont été définis. Tout d'abord, les cascades ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 et 2) et ERK5 (Big MAP kinase, Bmk1), qui régulent principalement la croissance et la différenciation cellulaire. Ensuite, les cascades JNK/SAPK (c-Jun N-terminal Kinase/Stress Activated Protein Kinase) et p38, qui sont impliquées généralement dans les réponses au stress comme l'inflammation ou l'apoptose. Finalement, la voie ERK3/4, dont les fonctions sont moins bien connues mais qui semble être associée au contrôle de la prolifération cellulaire. MAPKs vont phosphoryler plusieurs types de facteurs de transcription.

Plusieurs études menées sur différentes lignées cellulaires ont montré que l'induction rapide d'EGR1 par différents stimuli est médiée par les ERK1/2. Dans les cardiomyocytes, les œstrogènes induisent une augmentation du taux d'ARNm EGR1 par activation des ERK1/2 (de Jager et *al.*, 2001). Dans les monocytes humains, l'induction d'EGR1 par les lipopolysaccharides dépend de la voie Ras/Raf-1/MEK/ERK (Guha et *al.*, 2001). Dans les cellules érythroleucémiques, l'érythropoïétine induit l'expression d'EGR1 par la voie des ERK1/2 (Schaefer et *al.*, 2004). Dans les cellules T, l'activation des ERK1/2 est nécessaire pour l'induction de l'activité du promoteur EGR1 par le TCR (Xi et Kersh, 2003). Dans les cellules B, l'induction d'EGR1 en réponse aux signaux BCR est aussi médiée par la voie Ras/Raf-1/MAPK (McMahon et Monroe, 1995). Dans les cellules de muscle lisse vasculaire (VSMC), l'insuline et le stress oxydant induisent l'expression d'EGR1 par les voies ERK1/2 et ERK5/p38 respectivement (Wang et *al.*, 2006a). L'induction de l'expression d'EGR1 par la TGZ, ligand de PPAR γ , se fait par la voie de phosphorylation des ERK (Baek et *al.*, 2003, 2004). Les voies des ERK et JNK régulent l'expression d'EGR1 en réponse à un traitement H₂O₂ dans les cellules cardiaques H9c2 (Aggeli et *al.*, 2009).

1.4.3. Messagers secondaires

Les messagers secondaires sont des substances chimiques impliquées dans la transduction des signaux. Les messagers secondaires sont formés ou mobilisés de manière réversible en amont de nombreuses réponses cellulaires à des stimuli extracellulaires, comprenant les processus de régulation de la transcription des gènes et en particulier des IEGs. Les paragraphes suivants

passeront en revue les voies les mieux connues qui lient les principaux messagers secondaires à la régulation de la transcription d'EGR1.

1.4.3.1. AMP cyclique

Peu d'études ont montré l'implication de ce second messenger dans le contrôle de la transcription du gène EGR1. Néanmoins, une étude a montré que l'induction d'EGR1 par l'influx calcique nécessite l'activation de la PKA dans les cellules PC12 (Ginty et *al.*, 1991).

1.4.3.2. Ca²⁺

La régulation de la transcription dépendante de la concentration de Ca²⁺ est le plus souvent relayée par des protéines effectrices associées à la molécule senseur calmoduline (CaM). Le complexe Ca²⁺-CaM peut réguler de nombreuses kinases (CaMKI, II et IV et la CaMKK) et phosphatases. Ces deux types de protéines effectrices régulent à leur tour différents facteurs de transcription. Une autre protéine sensible au Ca²⁺, la PKC. Cette voie agit souvent par communication avec d'autres voies de signalisation, telles que les voies MAPK, PI3K ou AMPc/PKA. La phosphorylation du facteur de transcription CREB est un événement clé modifiant ses propriétés de transactivation et peut être catalysée par les différentes CaMKs. De plus, le co-activateur CBP peut être phosphorylé par la CaMK IV en réponse à des signaux calciques nucléaires.

Par exemple, dans les cellules pancréatiques MIN6, le glucose stimule la transcription d'EGR1 où l'ion Ca²⁺, la PKC et les ERK1/2 sont les principaux acteurs, selon la signalisation : influx de Ca²⁺ par les canaux membranaires de type L → PKC → ERK1/2. Le facteur Elk-1 et CREB connectent la voie de signalisation au gène EGR1 (Mayer et Thiel, 2009).

1.4.4. Voie de la PI3K/AKT

La PKB/Akt phosphoryle différents facteurs de transcription, notamment EGR1. Dans les cellules d'hépatome de rat H4IIE, l'insuline diminue la transcription du gène EGR1 en augmentant l'activité Akt via la PI3K (Keeton et *al.*, 2003).

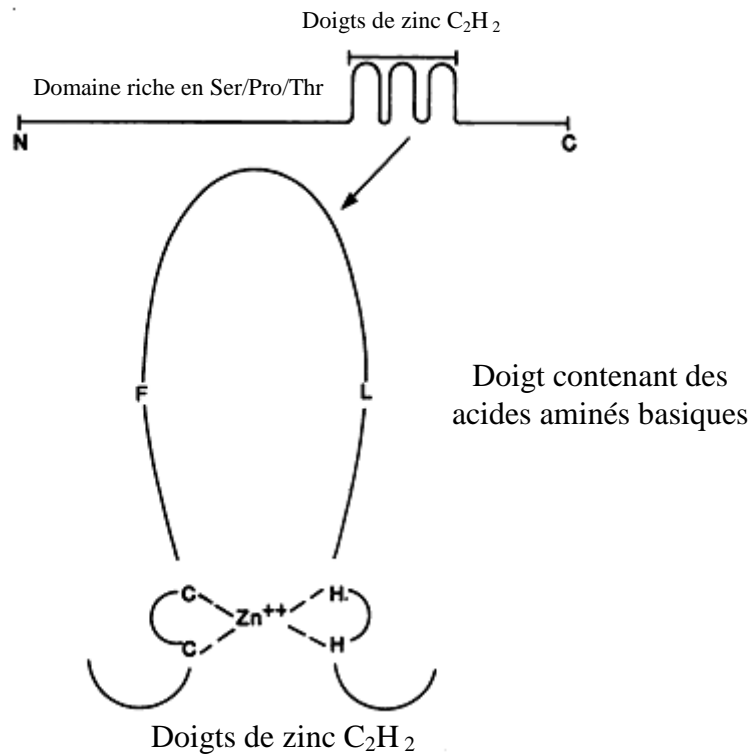


Figure 18 : Structure de la protéine EGR1 et des doigts de zinc (d'après Sukhatme, 1990).

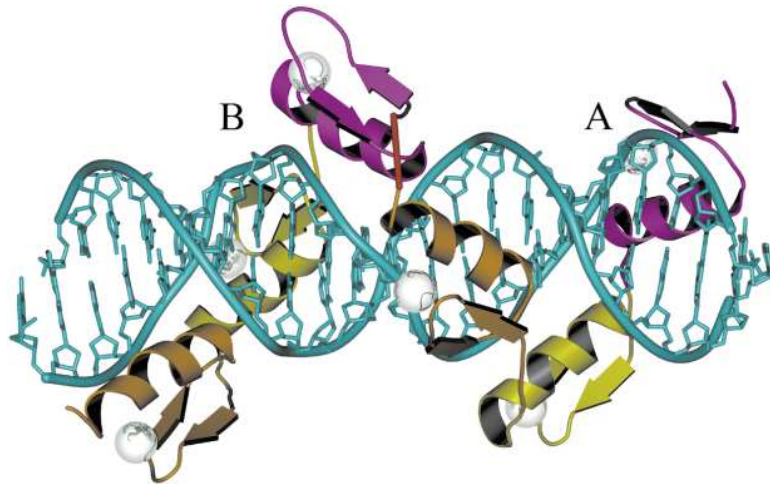


Figure 19 : Modèle de fixation à l'ADN de deux facteurs de transcription EGR1 (A et B). Les doigts de zinc 1-3 sont fixés de droite à gauche. Les doigts de zinc 1, 2, 3 sont colorés en violet, jaune et marron, respectivement (d'après Peisach et Pabo, 2003).

2. Le gène EGR2

Le gène EGR2 est localisé sur le chromosome 10 humain au locus q21-22 (Joseph et *al.*, 1988). Le promoteur d'EGR2 possède différents éléments régulateurs, dont 2 sites SRE, 2 sites CRE, 3 sites TRE, 2 sites Sp1 et 3 sites AP1 (Chavrier et *al.*, 1989; Angel et *al.*, 1987; Lee et *al.*, 1987; Montminy et Bilezikjian, 1987; Rangnekar et *al.*, 1990). Le gène EGR2 humain (4,3 kb) possède un intron et deux exons. Le site d'initiation de la transcription est localisé à 28 pb en amont de la TATA box.

3. Le gène EGR3

Le gène EGR3 contient un intron et deux exons. Il est localisé sur le chromosome 8 humain au locus p21-23 (Patwardhan et *al.*, 1991). A ce jour, aucune étude n'a porté sur les éléments régulateurs du promoteur d'EGR3.

4. Le gène EGR4

Localisé au niveau du chromosome 2p13 humain, le gène EGR4 contient 2 exons. Le promoteur EGR4 inclut les éléments régulateurs responsables de l'induction du gène par le sérum et PHA/PMA (Phyto-Hemagglutinin-A/Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) (Holst et *al.*, 1993; Zipfel et *al.*, 1997). A ce jour, peu d'étude ont porté sur les éléments régulateurs du promoteur d'EGR4.

III. Les protéines EGR

Les facteurs de transcription de la famille EGR se lient à l'ADN sur une séquence consensus riche en GC (5'-GCGT/GGGGCG-3') nommée EBS (Christy et Nathans, 1989b; Cao et *al.*, 1990; Crosby et *al.*, 1991; Patwardhan et *al.*, 1991). Ces protéines contiennent toutes un domaine de liaison à l'ADN, composé de trois boucles appelées motifs en doigts de zinc, caractérisés par la répétition d'une séquence de 25 à 30 acides aminés contenant deux résidus cystéine et deux résidus histidine conservés (**figure 18**). Ces quatre résidus coordonnent un ion zinc suivant un motif Cys₂His₂ (C₂H₂), et le repliement de la protéine facilite l'interaction avec le grand sillon de l'ADN, via les résidus basiques des boucles (**figure 19**). Dans ce domaine de liaison à l'ADN, les protéines EGR présentent plus de 90% d'homologie de

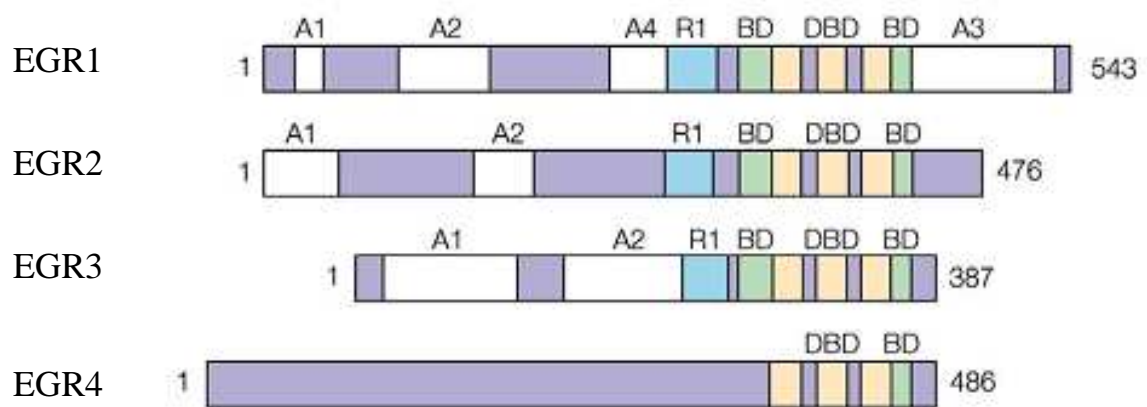


Figure 20 : Représentation schématique des 4 membres de la famille EGR (d'après Poirier et al., 2008).

A : domaine d'activation, R1 : domaine d'interaction avec les corépresseurs NAB, DBD : domaine de fixation à l'ADN contenant les doigts de zinc, BD : domaine basique.

séquence et 40% d'homologie avec les protéines Sp1, TFIIIA et Krüppel (Sukhatme et *al.*, 1988). En revanche, on ne retrouve qu'une très faible homologie dans les autres domaines ce qui leur confère des fonctions biologiques différentes. Le domaine de liaison à l'ADN contient également un site NLS (Nuclear Localisation Signal), indispensable au passage des facteurs de transcription dans le noyau (Matheny et *al.*, 1994).

Les protéines EGR1, EGR2 et EGR3 contiennent des domaines d'activation mal caractérisés (domaine A) et un domaine inhibiteur de 34 acides aminés du côté N-terminal des doigts de zinc, appelé R1 (**figure 20**). Ce domaine interagit avec deux protéines nommées NAB1 et NAB2 (NGFI-A Binding Protein). La liaison d'une protéine NAB sur le domaine R1 inhibe l'activité trans-activatrice des protéines EGR (Russo et *al.*, 1995; Svaren et *al.*, 1996). EGR4 ne contient pas ce domaine de répression. Cependant, un autre inhibiteur, Ddx20/DP103/Gemin3 (ARN hélicase à boîte DEAD), a été identifié récemment et se comporte comme un inhibiteur des 4 membres de la famille EGR. Le mécanisme de cette inhibition reste mal connu. L'inhibiteur Ddx20 et les corépresseurs NAB1 et NAB2 agissent de manière indépendante (Gillian et Svaren, 2004).

1. La protéine EGR1

1.1 Structure

EGR1 est une phosphoprotéine (Cao et *al.*, 1990; Lemaire et *al.*, 1990; Waters et *al.*, 1990) d'environ 80 kDa qui code un facteur de transcription modulaire (Sukhatme et *al.*, 1988; Baron et *al.*, 2006). Elle possède trois différents domaines: une région activatrice, un domaine inhibiteur R1 et un domaine de fixation à l'ADN contenant trois doigts de zinc (de type C₂H₂) (**figure 18**) (Sukhatme et *al.*, 1988; Russo et *al.*, 1995). Sa structure est proche de celle des facteurs de transcription TFIIIA (Brown et *al.*, 1985) et Sp1 (Kadonaga et *al.*, 1988). La protéine possède un motif NLS bipartite, situé dans le domaine des trois doigts de zinc. Ce motif bipartite est composé de deux acides aminés acides, d'une région espace d'environ dix acides aminés, suivi d'un ensemble d'acides aminés basiques (Gashler et *al.*, 1993). Deux formes d'EGR1 coexistent : une première est localisée dans le noyau (82 kDa) et l'autre est cytoplasmique (54 kDa). La forme cytoplasmique est tronquée en avant du domaine contenant les doigts de zinc. De ce fait, elle ne possède plus le motif NLS, lui permettant de migrer dans le noyau (Matheny et *al.*, 1994).

1.2. Mécanisme d'action

EGR1 se fixe au niveau d'une séquence d'ADN riche en GC comme 5'-GCG(G/C)GGGCG-3' (Swirnoff et Milbrandt, 1995; Lemaire et *al.*, 1990; Cao et *al.*, 1990) de manière zinc-dépendante et induit la synthèse d'autres protéines. Ce site de fixation est très similaire au site de fixation de Sp1 et il a été suggéré que les deux facteurs de transcription puissent être en compétition pour un même site de fixation (Huang et *al.*, 1997), comme c'est le cas pour le promoteur du gène codant PDGF A (Platelet-Derived Growth Factor A). Dans ce cas particulier, Sp1 est déplacé du site de fixation quand EGR1 est synthétisé après stimulation des cellules par des esters de phorbol (Khachigian et *al.*, 1995). Au contraire, une autre équipe propose qu'EGR1 possède plusieurs séquences de recrutement permettant sa fixation et l'activation de ses gènes cibles. Il ne serait donc pas en compétition avec Sp1 ou Sp3 (Al-Sarraj et *al.*, 2005). Cependant, quand certains gènes possèdent un chevauchement entre les sites de fixation Sp1/EGR1 ou Sp3/EGR1, les taux respectifs de ces derniers déterminent leur fixation.

2. La protéine EGR2

Le gène EGR2 code un facteur de transcription ne possédant qu'une faible homologie de séquence avec EGR1, sauf dans le domaine des trois doigts de zinc où l'homologie est de 92% (Joseph et *al.*, 1988). La protéine EGR2 contient trois domaines particuliers, une région activatrice, un domaine inhibiteur R1 et un domaine contenant les trois doigts de zinc (**figure 18**) (Mack et *al.*, 1992). Comme pour le facteur EGR1, deux formes d'EGR2 ont été décrites, une présente dans le cytoplasme (55 kDa) et l'autre dans le noyau (79 kDa) (Mack et *al.*, 1992; Herdegen et *al.*, 1993).

3. La protéine EGR3

Le gène EGR3 code également un facteur de transcription possédant la même organisation structurale qu'EGR1 et 2 dont un domaine à trois doigts de zinc, permettant sa liaison à l'ADN (**figure 18**). A ce jour, une seule protéine EGR3 (80 kDa) a été décrite, ce qui la différencie des protéines EGR1 et EGR2 (Beckmann et Wilce, 1997).

4. La protéine EGR4

Le gène EGR4 code un facteur de transcription possédant un domaine à trois doigts de zinc et contrairement aux autres membres, EGR4 a perdu le domaine répresseur R1 et ne peut être réprimé par les protéines NAB (**figure 18**). La protéine possède une masse moléculaire de 78 KDa (Zipfel et *al.*, 1997).

IV. Rôles des facteurs de transcription EGR dans les processus biologiques

1. Rôles du facteur de transcription EGR1

L'induction d'EGR1 a été montrée dans de nombreux tissus dont le foie, la glande surrénale, le cœur, le pancréas, les reins, la glande mammaire, l'os, les muscles et le système nerveux. EGR1 joue un rôle dans la différenciation, la prolifération, l'inhibition de croissance et l'apoptose selon le type cellulaire et le stimulus (Sukhatme et *al.*, 1988; Baron et *al.*, 2006).

1.1. EGR1 : « facteur protumoral ou antitumoral »

1.1.1. Facteur protumoral

L'induction d'EGR1 par des stimuli externes est généralement transitoire mais elle est soutenue dans certaines lignées de cellules cancéreuses et des tissus cancéreux de prostate, suggérant qu'EGR1 stimule la croissance tumorale (Abdulkadir et *al.*, 2001; Yang et Abdulkadir, 2003 ; Thigpen et *al.*, 1996; Eid et *al.*, 1998). Un lien avec la prolifération a aussi été observé dans d'autres modèles de cancers humains tels que les cancers de peau (Riggs et *al.*, 2000), de côlon (de Mestre et *al.*, 2005), du sein (de Mestre et *al.*, 2005), de vessie (Egerod et *al.*, 2009) ou des reins (Scharnhorst et *al.*, 2000). L'inhibition expérimentale de l'expression d'EGR1 empêche la transformation des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* (Baron et *al.*, 2003). Chez les souris EGR1^{-/-}, la progression du cancer de prostate est plus lente (Abdulkadir et *al.*, 2001).

Dans le cancer de prostate, EGR1 induit la croissance et inhibe la mort cellulaire en régulant un ensemble de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, la croissance et l'apoptose tels que la cycline D2, IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), PDGFA (Platelet-

derived growth factor-A), PDGFB (Platelet-derived growth factor-B) et VEGF (Vascular endothelial growth factor), P19ink4d et Fas (Virolle et *al.*, 2003; Adamson et *al.*, 2003). Dans les cellules cancéreuses de prostate TRAMP C2, EGR1 confère une résistance aux signaux apoptotiques en inhibant l'expression de CD95 (Fas/APO-1). Ceci induit une insensibilité au CD95L (Virolle et *al.*, 2003). EGR1 est responsable de la surexpression de la cycline D2 dans les cellules tumorales humaines de prostate DU-145 (Virolle et *al.*, 2003). EGR1 participe à la synthèse d'ADN et est associé à l'augmentation de la survie des cellules exposées aux radiations ionisantes, les ROS ou les UV (de Belle et *al.*, 1999; Hallahan et *al.*, 1995). La surexpression d'EGR1 corrélée avec l'absence d'expression du corépresseur transcriptionnel NAB2 contribuent à l'augmentation de l'activité d'EGR1 dans les cancers de prostate. EGR1 est un régulateur direct de nombreux gènes suppresseurs de tumeur dont TGF β , PTEN, p53 et la fibronectine. De plus, dans la majorité des cancers PTEN et/ou p53 sont inactifs, EGR1 devient alors oncogénique via ses effets sur ses gènes cibles, fibronectine et TGF β . Dans le cancer de prostate, la fibronectine et le TGF β ont un effet dans la progression tumorale en induisant des métastases contrairement aux autres tumeurs dans lesquelles ils inhibent la croissance (Baron et *al.*, 2006; Adamson et *al.*, 2003). Le rôle d'EGR1 en tant qu'oncogène ne se limite pas au cancer de prostate. EGR1 est impliqué dans l'invasion et les métastases dans le cancer de la vessie. EGR1 participe à la progression des tumeurs de vessie n'infiltrant pas le muscle contrairement aux tumeurs de vessie infiltrant le muscle. Dans les cancers de prostate et de vessie, EGR1 régule l'expression de l'héparanase (HPA) et la hyaluronidase qui participent à la dégradation de la matrice extracellulaire et sont impliquées dans les métastases des cellules cancéreuses (Egerod et *al.*, 2009). Dans le cancer gastrique humain, l'expression d'EGR1 est aussi associée à l'invasion, aux métastases et à la transcription du gène HPA (Zheng et *al.*, 2010). EGR1 peut induire la transcription du gène HPA dans les lignées de cellules cancéreuses de côlon et du sein (de Mestre et *al.*, 2005). EGR1 joue aussi un rôle dans la progression tumorale via le signal d'hypoxie généré au niveau des tumeurs en croissance. Il active l'angiogenèse et favorise la survie des cellules tumorales (Adamson et Mercola, 2002). Une étude comparative de souris injectées de cellules LLC (Lewis Lung Carcinoma) wt et EGR1^{-/-} montre une diminution de la masse tumorale chez les souris EGR1^{-/-}, probablement due à une réduction de la capacité de réponse aux signaux angiogéniques de la tumeur. Cette diminution de la croissance tumorale est associée à une augmentation du taux local de CXCL9 (MIG), une chimiokine attractante des cellules T et NK (Natural Killer) et qui possède des propriétés anti-angiogéniques (Caso et *al.*, 2009). Quelques données

concernent les cellules cancéreuses mammaires. EGR1 est induit par les œstrogènes dans les cellules MCF7 (Pratt et *al.*, 1998). Des DNazymes ciblant l'ARNm EGR1 inhibent la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires MCF7 et MDA-MB-231 ainsi que la croissance tumorale chez les souris nude xéno-gréffées (Mitchell et *al.*, 2004). Une autre étude a montré qu'EGR1 est considéré comme protumoral dans les cellules SK-BR3 et MCF7 et l'inhibition de son expression par interférence ARN (siRNA EGR1) inhibe la prolifération cellulaire (Parra et Ferreira, 2010). Par ailleurs, le facteur de transcription T-box-2 (TBX2), surexprimé dans les cancers du sein, interagit avec EGR1 pour inhiber le gène suppresseur de tumeur NDRG1 (N-myc downregulated gene 1) induisant la prolifération cellulaire. L'inhibition de l'expression de TBX2 ou EGR1 conduit à la sénescence cellulaire et à l'augmentation des marqueurs apoptotiques (Redmond et *al.*, 2010).

1.1.2. Facteur antitumoral

D'autres études ont montré que l'expression d'EGR1 est souvent absente ou faible au niveau de certaines lignées de cellules tumorales et de néoplasies dont les tumeurs du sein, du cerveau et des poumons (Huang et *al.*, 1997). L'expression d'EGR1 est faible, voire nulle, non seulement dans les lignées de cellules cancéreuses mammaires humaines comparées aux lignées de cellules mammaires normales immortalisées (MCF10A et 184A1N4), mais aussi dans le tissu mammaire cancéreux comparé au tissu sain (Huang et *al.*, 2006; Liu et *al.*, 2007). EGR1 est aussi absent dans les cancers non inflammatoires du sein (Bieche et *al.*, 2004). Par ailleurs, EGR1 est délété dans les carcinomes mammaires humains ER-négatifs (Ronski et *al.*, 2005). Quand EGR1 est ré-exprimé dans les cellules cancéreuses ZR75, il en résulte une inhibition de prolifération et une activité apoptotique (Huang et *al.*, 1995). Le facteur de transcription EGR1 inhibe aussi la croissance des lignées cellulaires des carcinomes hépatocellulaires et d'œsophage (Hao et *al.*, 2002). EGR1 est la cible de composés chimiopréventifs tels que les NSAIDs (Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs), le LY294002 (inhibiteur de la PI3K), les ligands de PPAR γ (Yamaguchi et *al.*, 2006; Baek et *al.*, 2004) et de composés alimentaires comme l'epicatechin gallate (Moon et *al.*, 2007; Cho et *al.*, 2007). De plus, EGR1 induit l'expression de plusieurs protéines proapoptotiques telles que p53, PTEN, ATF3 et GDF15 dans les cellules cancéreuses colorectales humaines (Yamaguchi et *al.*, 2006; Baek et *al.*, 2004; Nair et *al.*, 1997; Virolle et *al.*, 2001). Il a récemment été montré que l'acide tolfénamique est capable d'inhiber la prolifération et d'induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses de côlon en induisant l'accumulation nucléaire du facteur de

Conséquences de la déficience de chaque membre de la famille EGR
<p>EGR1 Stérilité femelle ; réduction de la synthèse de l'hormone lutéinisante (LH) ; défaut de la mémoire à long terme.</p>
<p>EGR2 Développement anormal du cerveau ; déficit de myélinisation des cellules de schwann ; fusion des rhombomères 3 et 5 ; défaut de formation osseuse.</p>
<p>EGR3 Développement anormal du cerveau ; défaut de la mémoire à long terme ; ataxie sensorielle.</p>
<p>EGR4 Infertilité mâle ; arrêt de la spermatogenèse.</p>

Tableau 6 : Anomalies dues à la déficience de chaque membre de la famille EGR (O'Donovan et al., 1999).

transcription épithélial spécifique ETS-1 (ESE-1), membre de la famille Ets, et l'activation de la transcription du gène EGR1. L'expression d'EGR1 induit une apoptose médiée en partie par la protéine proapoptotique GDF15 (Lee et *al.*, 2008a). Il a donc été suggéré que l'accumulation cytoplasmique de ESE-1 pourrait être impliquée dans le développement du cancer de côlon alors que sa translocation vers le noyau induit à la fois l'expression d'EGR1 et l'apoptose. Il a été proposé qu'une thérapie génique impliquant une expression prolongée d'EGR1 pourrait constituer un nouvel outil thérapeutique pour le traitement des cancers, en induisant simultanément un effet, anti-angiogénique, un arrêt de la croissance et l'apoptose (Lucerna et *al.*, 2006).

1.2. Autres rôles

Les souris dont le gène EGR1 a été invalidé (**tableau 6**), sont viables et présentent peu d'anomalies. Aucune expression compensatoire des autres protéines EGR n'a été observée chez ces souris. On a noté, néanmoins, chez les souris femelles, une infertilité et une réduction drastique de la synthèse de l'hormone lutéinisante pituitaire (Lee et *al.*, 1996). EGR1 semble être aussi impliqué dans certains aspects de l'apprentissage et la mémoire (Li et *al.*, 2005, 2007). EGR1 est aussi important pour la production de cytokines telles que l'interleukine-1 β , interleukine 13 et le TNF (Tumor Necrosis Factor) ainsi que des chimiokines (Yan et *al.*, 2000; Li et *al.*, 2006a). Dans les lymphocytes matures normaux, la signalisation via le récepteur des cellules B, BCR (B-cell receptor) induit une expression rapide et transitoire d'EGR1 (McMahon et Monroe, 1996) mais son importance pour l'activation et la prolifération des cellules B reste inconnue. Au contraire, la signalisation BCR dans les lymphocytes B immatures n'induit pas l'expression d'EGR1, et on observe une inhibition de prolifération et leur apoptose (Seyfert et *al.*, 1989). Donc, le fait que BCR puisse induire des signaux positifs vs négatifs est le reflet de l'expression différentielle d'EGR1 (Ke et *al.*, 2006). EGR1 joue un rôle important dans l'initiation de la réponse inflammatoire, qui conduit notamment à une diminution prolongée de la motilité gastro-intestinale après chirurgie intestinale (Schmidt et *al.*, 2008).

2. Rôles du facteur de transcription EGR2

Des souris EGR2^{-/-} (**tableau 6**) meurent 1 à 2 semaines après la naissance et présentent des défauts de développement du cerveau, de la myélinisation du système nerveux périphérique et de la formation osseuse (Schneider-Maunoury et al., 1993; Levi et al., 1996). EGR2 est exprimé dans le rhombo-encéphale. Il est impliqué dans la différenciation des rhombomères 3 et 5 lors du développement en activant des gènes spécifiques aux rhombomères impairs (Schneider-Maunoury et al., 1993). Les souris dont le gène EGR2 a été sélectivement invalidé, présentent une disparition morphologique de ces deux rhombomères et un déficit de myélinisation des cellules de Schwann (nécessaire à la propagation de l'influx nerveux le long de l'axone), dû à une diminution du nombre de protéines myéline zéro (MPZ) et basiques (Voiculescu et al., 2000; Topilko et al., 1994). Notons dans le même ordre d'idées que des mutations dans le gène EGR2 humain ont été détectées chez des patients atteints de myélinopathies sévères (Numakura et al., 2003; Warner et al., 1998), ou du syndrome de Marie-Charcot-Tooth (Bellone et al., 1999; Warner et al., 1999). La majorité de ces patients possèdent des mutations dominantes au niveau du domaine de fixation à l'ADN de la protéine EGR2 (Nagarajan et al., 2001; Warner et al., 1999). Une mutation récessive (I268N) affecte le domaine de fixation des corépresseurs transcriptionnels NAB1 et NAB2, ce qui abolit l'interaction d'EGR2 avec ses corépresseurs et conduit à une augmentation de son activité transcriptionnelle (Venken et al., 2002).

EGR2 est une protéine homologue à EGR1, qui possède un double rôle au niveau de la croissance cellulaire. Elle peut agir soit en tant qu'oncogène (Eid et al., 1998; Abdulkadir et al., 2001) soit comme gène suppresseur de tumeur (Huang et al., 1997). De multiples fonctions pour EGR2 sont donc suspectées. EGR2 joue un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire (Rangnekar et al., 1990). Elle est activée lors de la transition G0/G1 du cycle cellulaire dans les cellules en culture (Chavrier et al., 1988). Il a été suggéré qu'EGR2 puisse jouer un rôle de médiateur de suppresseur de tumeur dans la voie de signalisation apoptotique PTEN (Unoki et Nakamura, 2001). *In vitro*, EGR2 peut induire l'apoptose de plusieurs lignées cellulaires en altérant la perméabilité des membranes mitochondriales, en libérant le cytochrome c et en activant les caspases 3, 8 et 9. EGR2 active directement l'expression de deux protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2, BNIP3L et BAK, localisées au niveau de la mitochondrie (Unoki et Nakamura, 2003). D'autres études ont montré qu'EGR2 est capable de médier l'expression de FasL induite par TCR (T cell receptor) dans les cellules T normales activées et d'induire une surexpression aberrante de ce

gène chez les souris LPR^{-/-} et GLD^{-/-} (perte de fonction de Fas et FasL, respectivement) (Mittelstadt et Ashwell, 1998).

3. Rôles du facteur de transcription EGR3

Morris et *al.*, ont montré qu'EGR3 était le seul gène de la famille EGR à être induit par un stimulus visuel dans le noyau suprachiasmatique, structure impliquée dans le contrôle de l'horloge biologique à la base des rythmes comportementaux (Morris et *al.*, 1998; Porterfield et *al.*, 2007). EGR3 est fortement exprimé dans les cellules musculaires post-synaptiques au cours des premières étapes de la différenciation musculaire chez les souris témoins. Des souris dont le gène EGR3 a été invalidé (**tableau 6**), présentent une ataxie sévère due à l'absence d'innervation des fibres musculaires (Tourtellotte et Milbrandt, 1998), suggérant un rôle essentiel d'EGR3 dans développement du système nerveux périphérique (Tourtellotte et *al.*, 2001). Des études ont montré que des souris KO pour EGR3 présentent un phénotype similaire à celui de l'homme, c'est-à-dire, diverses maladies du système nerveux sympathique voire quelques formes de dysautonomie (Eldredge et *al.*, 2008). EGR3 joue un rôle important dans la LTP (potentialisation à long terme), l'apprentissage et la mémoire. Des souris déficientes en EGR3 présentent des défauts dans les phases précoces et tardives de la LTP hippocampale, ainsi qu'au niveau de l'apprentissage et de la mémoire à long terme dépendant de l'hippocampe et de l'amygdale. Ce rôle est indépendant de celui d'EGR1. EGR3 joue un rôle important au niveau de la physiologie des cellules mammaires normales et cancéreuses (Inoue et *al.*, 2004). EGR3 est induit par l'œstradiol dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses dont les cellules cancéreuses mammaires MCF7. A son tour, EGR3 induit l'expression d'autres gènes cibles des œstrogènes, dont certains ont été identifiés par des analyses de puces à ADN (Inoue et *al.*, 2002). Un variant de la lignée cellulaire MCF7 a été développé, M-ERd3/g8 (forme ER sans exon 3 codant un récepteur des œstrogènes (ER) qui a perdu le second doigt de zinc nécessaire à l'interaction directe avec l'ADN), pour l'analyse des effets du 17- β -œstradiol (E₂) sans interaction directe de l'ER avec l'ADN. Dans ces cellules, EGR3 est induit par l'œstradiol. L'œstradiol semble donc induire EGR3 par un récepteur alternatif au récepteur classique des œstrogènes (Pentecost et *al.*, 2005). Les fonctions biologiques d'EGR3 ont été déterminées dans les carcinomes mammaires en utilisant de l'immunohistologie et des souris nude xénotreffées. Les résultats ont montré qu'EGR3 est un acteur de l'invasion médiée par les œstrogènes et considéré comme un facteur pronostique des cancers du sein (Suzuki et *al.*, 2007). L'expression d'EGR3 peut être

induite par le VEGF dans les cellules endothéliales. L'inhibition d'EGR3 par ARN interférence inhibe la prolifération induite par le VEGF, la migration et la tubulogénèse. Ces résultats indiquent qu'EGR3 a un rôle important dans la signalisation endothéliale du VEGF, induisant l'angiogénèse. Ce rôle peut avoir un intérêt particulier dans les processus angiogéniques adultes dont la réparation vasculaire et les maladies néovasculaires (Liu et *al.*, 2008). Enfin, comme EGR2, EGR3 est capable d'induire l'expression de FasL induite par le TCR (T cell receptor) dans les cellules T activées par les esters de phorbol ou un ionophore calcique (Mittelstadt et Ashwell, 1998).

4. Rôles du facteur de transcription EGR4

EGR4 est un répresseur transcriptionnel. Il est aussi capable d'inhiber sa propre transcription en se fixant sur son promoteur et ce de manière dose-dépendante. Des souris déficientes en EGR4 présentent une infertilité chez les mâles due à l'arrêt de la spermatogénèse (**tableau 6**) (Tourtellotte et *al.*, 1999). EGR1 et EGR4 possèdent des fonctions dimorphiques sexuelles au niveau de la fertilité femelle et mâle respectivement. Les facteurs de transcription EGR sont co-exprimés dans plusieurs tissus, ce qui suggère qu'ils puissent avoir des fonctions redondantes (Tourtellotte et *al.*, 2000). Aucune étude n'a été réalisée concernant le rôle d'EGR4.

V. Régulation post-traductionnelle de l'activité d'EGR1

La protéine produite peut subir des modifications post-traductionnelles qui vont changer sa conformation, sa localisation, sa stabilité ou son activité. La régulation de l'activité transcriptionnelle d'EGR1 est assurée par des mécanismes de phosphorylation, acétylation, glycosylation, oxydoréduction et de SUMOylation. Mais, on trouve également une régulation de l'activité d'EGR1 par les corépresseurs transcriptionnels NAB.

1. Phosphorylation

L'activité de liaison et/ou le turnover de la protéine EGR1 sont régulés par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation (Cao et *al.*, 1990; Lemaire et *al.*, 1990; Huang et Adamson, 1994; Jain et *al.*, 1996). Ainsi l'addition d'inhibiteurs de phosphatases (acide okaidique et calyculin A, inhibiteurs des Sérine/Thréonine phosphatases) conduit à une

hyperphosphorylation de la protéine (Cao et *al.*, 1992). Cette régulation a lieu dans le domaine N-terminal, riche en résidus sérine et thréonine. La phosphorylation d'EGR1 active (Cao et *al.*, 1992 ; Yu et *al.*, 2004) ou inhibe (Jain et *al.*, 1996; Srivastava et *al.*, 1998) sa capacité à fixer l'ADN et induire la transcription directement ou via d'autres facteurs de transcription. EGR1 est phosphorylée par de nombreuses kinases dont la caseine kinase II (CK II) (Jain et *al.*, 1996; Srivastava et *al.*, 1998), la PKC (Srivastava et *al.*, 1998) et AKT1 (Yu et *al.*, 2009). La phosphorylation d'EGR1 induite par CK II est impliquée dans la diminution de l'affinité de fixation de la protéine et dans l'activation de gènes pro-apoptotiques tels que p53 ou p73 (Mora et *al.*, 2005). La forme active de la protéine EGR1 produite suite à une stimulation UV est hyperphosphorylée, contrairement à l'EGR1 induit par le sérum, les facteurs de croissance ou le 12-O-tetra- decanoylphorbol-13-acetate (TPA) (Huang et Adamson, 1994).

2. Acétylation

L'acétylation des résidus lysine de la protéine EGR1 est obtenue après une faible induction d'EGR1, elle permet la stabilisation de la protéine (Yu et *al.*, 2004) et l'expression de gènes de prolifération et de survie. La protéine p300/CBP (CREB binding protein) possède une activité acétylase. Elle se fixe au niveau des facteurs de transcription sur de nombreux domaines riches en cystéine et histidine (C/H) pour former des complexes activateurs transcriptionnels. L'une des possibilités pour la stabilisation de ces complexes est l'acétylation des facteurs de transcription au niveau d'une séquence consensus basique. Il existe un site potentiel d'acétylation (KDKK) au niveau de la protéine EGR1 de souris ou humaine, proche du 3^{ème} doigt de zinc, formant la portion terminale du NLS (Matheny et *al.*, 1994). Ce motif KDKK est très similaire à celui de p53 (KSKK) et celui d'autres facteurs de transcription acétylés par p300/CBP comme Sp1.

3. Ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle découverte au cours des années 80, nécessitant plusieurs étapes pour aboutir à la fixation covalente d'une ou de plusieurs molécules d'ubiquitine sur une ou plusieurs lysines de la protéine substrat. Cette modification biochimique a plusieurs fonctions dont la plus connue est la dégradation de la protéine ubiquitinée par le protéasome.

EGR1 a une demi-vie courte (Waters et *al.*, 1990). Il a été montré que la dégradation de différents facteurs de transcription, comme Jun (Papavassiliou et *al.*, 1992), c-fos (Stancovski et *al.*, 1995), STAT1 (Kim et Maniatis, 1996), p53 (Maki et *al.*, 1996) et c-myc (Salghetti et *al.*, 1999) est médiée par le protéasome, voie principale de dégradation des protéines à demi-vie courte (Varshavsky, 1997). Les résidus lysines de la protéine EGR1 peuvent être modifiés par ubiquitination. La protéine EGR1 multiubiquitinée peut s'associer au composant C8 du protéasome 20S et l'inhibition du protéasome par le MG-132 dans les cellules cancéreuses hépatique humaines HepG2, induit une accumulation de la protéine EGR1 (Bae et *al.*, 2002).

4. Glycosylation

La O-N-acétylglucosamination (O-GlcNAc) est une modification covalente post-traductionnelle dynamique et réversible de nombreuses protéines. Elle est impliquée dans différents processus cellulaires tels que la dégradation protéique et l'expression génique. Le site de glycosylation se situe au niveau du domaine de transactivation en N-terminal de la protéine EGR1, il est donc possible que la O-GlcNAc puisse influencer le potentiel transactivateur d'EGR1 et moduler l'expression des gènes cibles (Khidekel et *al.*, 2007).

5. Oxydoréduction

Les facteurs de transcription eucaryotes sont sensibles aux conditions rédox régnant dans la cellule. Les gènes précoces comme c-Jun, EGR1 ou GADD153 (Guyton et *al.*, 1996) et ceux de détoxification antioxydante, sont stimulés par un stress oxydant (Wasserman et Fahl, 1997). Leur degré de sensibilité est variable. Il dépend de la structure de la protéine et de son aptitude à être modifiée par phosphorylation, glycosylation ou oxydation.

Des mécanismes d'oxydoréduction régulent la liaison du facteur de transcription EGR1 à l'ADN. La liaison d'EGR1 est diminuée par l'altération de l'état d'oxydoréduction du domaine contenant les doigts de zinc (cystéine). En effet, EGR1 sous forme réduite, est douée d'une activité de liaison, alors que la forme oxydée ne l'est pas. Un facteur nucléaire ubiquitaire, Ref-1 (Redox factor-1) semble intervenir dans ce processus (Huang et Adamson, 1993). Notons que ce facteur est lui-même régulé par des réactions d'oxydoréduction. Dans d'autres cas, un léger stress oxydatif (doses non toxiques d'H₂O₂) induit au contraire la transcription du gène EGR1 et l'accumulation des ARNm EGR1 dans les cellules ostéoblastiques de souris, conduisant à l'accumulation de la protéine EGR1 et par conséquent

une augmentation de l'activité de fixation au niveau de la séquence GC (Nose et Ohba, 1996). Au niveau de la muqueuse duodénale de rat, la cystéamine, un aminothiols stable qui produit du peroxyde d'hydrogène, augmente l'expression d'EGR1, sa translocation nucléaire et sa fixation à l'ADN. EGR1 est donc considéré comme un facteur de transcription redox sensible (redox-sensitive transcription factors) (Khomeenko et *al.*, 2003).

6. SUMOylation

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) sur une lysine acceptrice d'une protéine cible. Cette modification a été découverte dans les années 90 par les groupes de Günter Blobel et Frauke Melchior. À ce jour, quatre protéines SUMO ont été caractérisées (SUMO1-4). Le processus de SUMOylation est très proche biochimiquement de celui de l'ubiquitination, notamment en impliquant une cascade similaire d'enzymes. En revanche, alors que l'ubiquitination entraîne principalement la dégradation de la protéine, la SUMOylation régule plutôt ses propriétés biochimiques (trafic intracellulaire, stabilité protéique, activité transcriptionnelle, progression du cycle cellulaire, réponse au stress et apoptose) (Kim et Baek, 2006). De plus, quelques exemples démontrent que la SUMOylation de certaines protéines empêche leur ubiquitination. Les résidus lysine de la protéine EGR1 peuvent être modifiés par SUMOylation. Comme pour l'ubiquitination, la majorité des résidus lysine modifiés par SUMO font partie d'une séquence consensus spécifique (I/V/L/F)KXE (Hay, 2001) et cette modification est catalysée par la même machinerie enzymatique (Melchior, 2000). Le logiciel SUMOsp2.0 permet de prédire les sites de sumoylation au niveau d'une séquence protéique. Il existe 2 sites potentiels de sumoylation pour EGR1 (résidus lysine en position 5 et 34). Enfin, comme l'ubiquitination, la SUMOylation est un processus réversible et dynamique puisqu'il existe des protéases qui clivent la liaison entre SUMO et son substrat. Ces enzymes font partie de la famille SENP (Sentrin-specific protease). La protéine EGR1 sumoylée induit la transcription du gène suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and TENSin homolog) (Yu et *al.*, 2009).

7. Les corépresseurs transcriptionnels NAB

Un premier facteur cellulaire inhibant l'activité de liaison d'EGR1, a été découvert et appelé NAB1 (NGFI-A binding protein 1) (Russo et *al.*, 1995). Puis, un deuxième facteur, le facteur

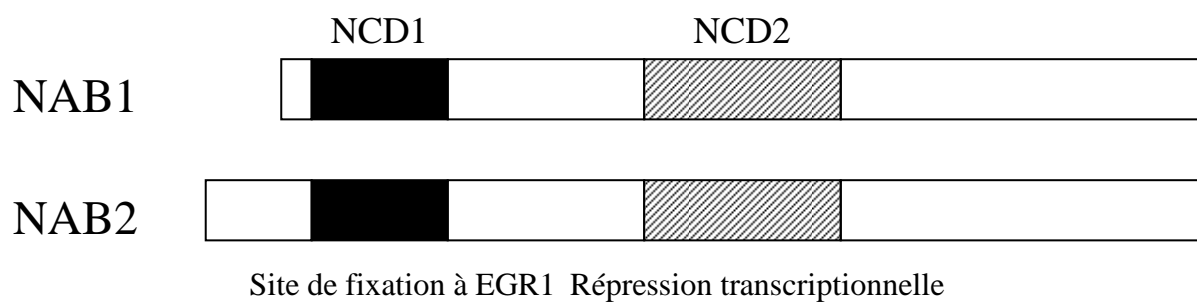


Figure 21 : Représentation schématique de la structure des corépresseurs NAB1 et NAB2 (d'après Svaren et al., 1996).

NCD 1 : NAB Conserved domain 1

NCD 2 : NAB Conserved domain 2

NAB2 a été décrit (Svaren et *al.*, 1996). Les protéines NAB sont des phosphoprotéines nucléaires de 54 kDa, constituées de 570 acides aminés. Elles possèdent deux domaines NCD (NAB Conserved Domain), caractéristiques des protéines NAB et conservés au cours de l'évolution. NCD1 est un site de fixation à EGR1. Le deuxième domaine NCD2 correspond au domaine de répression transcriptionnelle et contient un motif NLS indispensable à leur transfert dans le noyau (**figure 21**) (Swirnoff et *al.*, 1998). La protéine NAB1 est un régulateur transcriptionnel constitutif exprimé de façon ubiquitaire. A l'opposé, l'expression de NAB2 est régulée par les mêmes stimuli que ceux induisant l'expression d'EGR1 (Svaren et *al.*, 1996). La situation est plus complexe puisque les protéines EGR stimulent l'expression des gènes NAB1 et NAB2, régulant ainsi leur propre activité (Mechta-Grigoriou et *al.*, 2000).

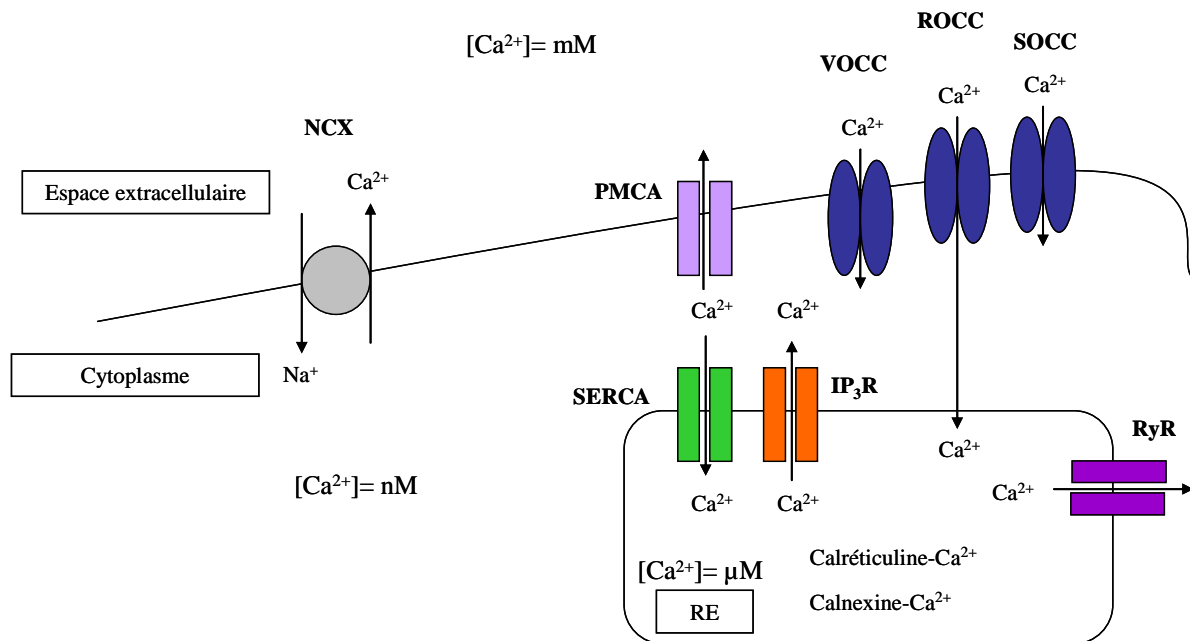


Figure 22: L'homéostasie calcique est maintenue grâce aux différents canaux et échangeurs au niveau de la membrane plasmique (VOCC, ROCC, SOCC, PMCA et NCX) et du RE (SERCA, IP₃R et RyR). Dans le RE, le calcium est tamponné par les chaperonnes calréticuline et calnexine.

PARTIE IV : Stress du réticulum et cancer

I. Réticulum endoplasmique

1. Réticulum endoplasmique et homéostasie calcique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organe intracellulaire de structure complexe qui forme un réseau membranaire s'étendant du noyau à la membrane cellulaire. Le RE constitue un compartiment isolé du cytosol ce qui lui permet de maintenir des conditions pro-oxydantes ainsi qu'une forte concentration en calcium, environnement requis pour ses nombreuses fonctions. Il joue un rôle clé dans plusieurs processus cellulaires tels que stockage et libération du calcium, synthèse lipidique et protéique, repliement et modifications post-traductionnelles.

Les stocks calciques intracellulaires sont la mitochondrie, l'appareil de Golgi, le noyau mais le réticulum endoplasmique reste la plus importante réserve de calcium intracellulaire. Le calcium est un signal ubiquitaire contrôlant de nombreux processus cellulaires : transcription, métabolisme, prolifération, migration, apoptose, fécondation, exocytose ou encore contraction musculaire. Plusieurs études ont montré que l'altération de la signalisation calcique contribue à différents processus : carcinogenèse, prolifération, apoptose, dédifférenciation, métastases et résistance aux thérapies (Bergner et Huber, 2008).

La concentration calcique cytosolique est d'environ 100 nM, alors que la concentration dans le RE est de l'ordre du micromolaire. Dans le milieu extracellulaire, cette concentration atteint le millimolaire. L'augmentation de la $[Ca^{2+}]$ cytosolique résulte d'un influx de Ca^{2+} à partir de l'espace extracellulaire ou d'une libération de Ca^{2+} à partir des réservoirs intracellulaires (**figure 22**).

Les canaux permettant l'influx de calcium à partir de l'espace extracellulaire sont les VOCC (Voltage-Operated-Calcium-Channels), les ROCC (Receptor-Operated-Calcium-Channels) ou les SOCC (Store-Operated-Calcium-Channels) qui sont activés quand les réservoirs de calcium intracellulaires sont vides. La $[Ca^{2+}]$ cytosolique est rétablie par les canaux PMCA (Plasma-Membrane-Calcium-ATPase) et des échangeurs Na^+/Ca^{2+} (NCX, Na^+ -Calcium-Exchanger) qui forcent les ions calcium à sortir contre le gradient de concentration à travers la membrane plasmique vers l'espace extracellulaire.

La libération de calcium à partir du RE fait intervenir l'activation de récepteurs-canaux : le récepteur de l'IP₃ (Inositol-1,4,5-phosphate-receptor) et le récepteur de la Ryanodine (RyR). Les SERCA (Sarco/Endoplasmic-Reticulum-Ca²⁺-ATPases) sont des calcium-ATPases qui pompent le Ca²⁺ contre son gradient de concentration, du cytoplasme vers le RE (Bergner et Huber, 2008).

En plus des pompes et des échangeurs calciques qui permettent de maintenir la concentration calcique cytosolique basse, la présence de nombreuses protéines tampon permet de capter le calcium libre sous forme de calcium lié inactif. Parmi ces protéines tampon, nous pouvons citer les chaperonnes résidentes du RE, la calnexine et la calréticuline (**figure 23**). Cette capacité à tamponner le calcium réticulaire confère à la calnexine et à la calréticuline un rôle de baromètre de la concentration calcique. Ces chaperonnes sont capables de réguler l'activité des canaux IP₃ et Ryanodine. Par ailleurs, dans la lumière du RE, la calréticuline régule l'activité de la SERCA par son extrémité C-terminale. Dès que la [Ca²⁺] du RE atteint un niveau trop bas, la calréticuline ne se lie plus au calcium et se retrouve sous une forme libre qui se fixe au domaine C-terminal de la pompe et l'active. La SERCA assure donc le retour de la concentration calcique du RE à l'état basal en pompant le calcium du cytosol (Michalak et *al.*, 2002).

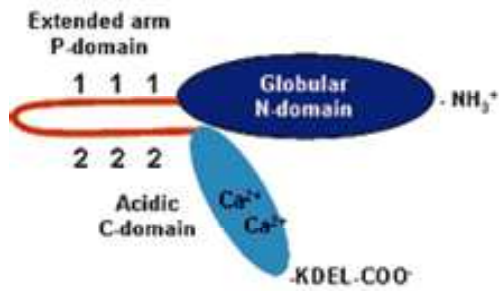
2. Repliement protéique et contrôle qualité

Dans le RE, nombreuses sont les chaperonnes impliquées dans le repliement et le contrôle qualité des protéines. Nous en citerons quelques unes appartenant à diverses familles essentielles.

2.1. Les chaperonnes classiques

Chez les mammifères, la lumière du RE contient un membre de la famille des HSP70 (BiP/GRP78), un membre de la famille des HSP90 (GRP94), des membres de la famille des HSP40 qui sont des co-facteurs de HSP70 (ERdj1-5), des membres de la famille des GRPE-like (GRP170), et un membre de la famille des HSP100 (Torsin A) (Breakefield et *al.*, 2001; Lee, 2001). La protéine chaperonne BiP/GRP78 (Binding Immunoglobulin Protein/Glucose Regulated Protein 78), membre le plus important de la famille des HSP70 (Heat Shock Protein 70) réside dans la lumière du RE. Cette chaperonne de 78 kDa est exprimée lors d'une déprivation en glucose et fut parallèlement découverte dans un autre contexte comme

Calréticuline



Calnexine

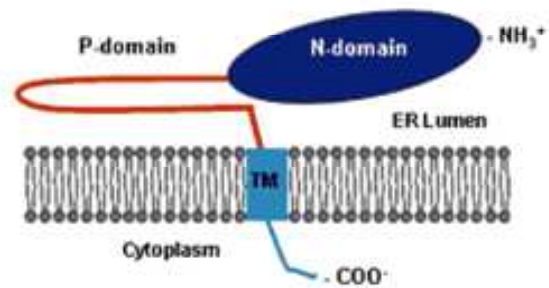


Figure 23 : Structure de la calréticuline et de la calnexine. La calréticuline porte le motif KDEL caractéristique des protéines solubles du RE alors que la calnexine est transmembranaire. Le domaine N permet la fixation du polypeptide. Le domaine P permet l'articulation de la protéines (d'après Michalak et al., 2002).

participant à la maturation des chaînes lourdes des immunoglobulines dans les lymphocytes B. Elle se fixe aux premiers intermédiaires de conformation d'une grande diversité de protéines grâce à sa capacité à se fixer à de courts peptides hydrophobes de 8 à 13 acides aminés exposés en surface (Melnick *et al.*, 1994).

2.2. Les chaperonnes de type lectine

Le RE possède un type particulier de chaperonnes aux propriétés de lectines et qui se fixent sur les glycoprotéines. Deux chaperonnes de ce type sont connues : la calréticuline et la calnexine (**figure 23**) (Williams, 2006). Elles se fixent aux protéines en cours de synthèse dès leur translocation dans le RE et après leur glycosylation. Elles reconnaissent des motifs polysaccharidiques ainsi que certaines séquences protéiques hydrophobes de protéines mal repliées. La calnexine est membranaire tandis que la calréticuline porte un motif KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu), séquence caractéristique de la rétention au sein du RE des protéines solubles. La calnexine et la calréticuline sont deux protéines qui ont été identifiées en premier lieu pour leur capacité à lier le calcium. Cet ion, qui se fixe sur des sites de haute affinité, est primordial pour leur fonctionnement puisqu'en son absence, elles deviennent sensibles aux protéases et perdent leur fonction lectine. D'autres sites de basse affinité pour le calcium sont présents avec pour rôle de tamponner les réserves en Ca^{2+} du RE (Williams, 2006).

2.3. Les foldases

Les chaperonnes de type foldases sont des enzymes qui catalysent les étapes de remodelage protéique. Il en existe différentes sous-classes parmi lesquelles, la PDI (Protein Disulfide Isomerase) et des peptidyl isomérases. On dénombre une vingtaine de membres dans la famille PDI dont les protéines PDI et ERp57 (Maattanen *et al.*, 2006). PDI est une protéine multifonctionnelle puisqu'elle est capable d'agir à la fois comme chaperonne et comme oxydoréductase catalysant l'oxydation des groupements sulfhydryl (SH) libres de la cystéine pour former des ponts disulfures (S-S). ERp57, bien que très similaire à PDI au niveau de l'organisation des domaines, s'en différencie totalement en ce qui concerne les types de polypeptides qui lui sont associés (Maattanen *et al.*, 2006; Jessop *et al.*, 2007). ERp57 lie préférentiellement les glycoprotéines de par son association à la calnexine et à la calréticuline (Maattanen *et al.*, 2006). ERp57 agit sur les polypeptides glycosylés en permettant la formation des ponts disulfures, mais il catalyse aussi de nombreuses réactions

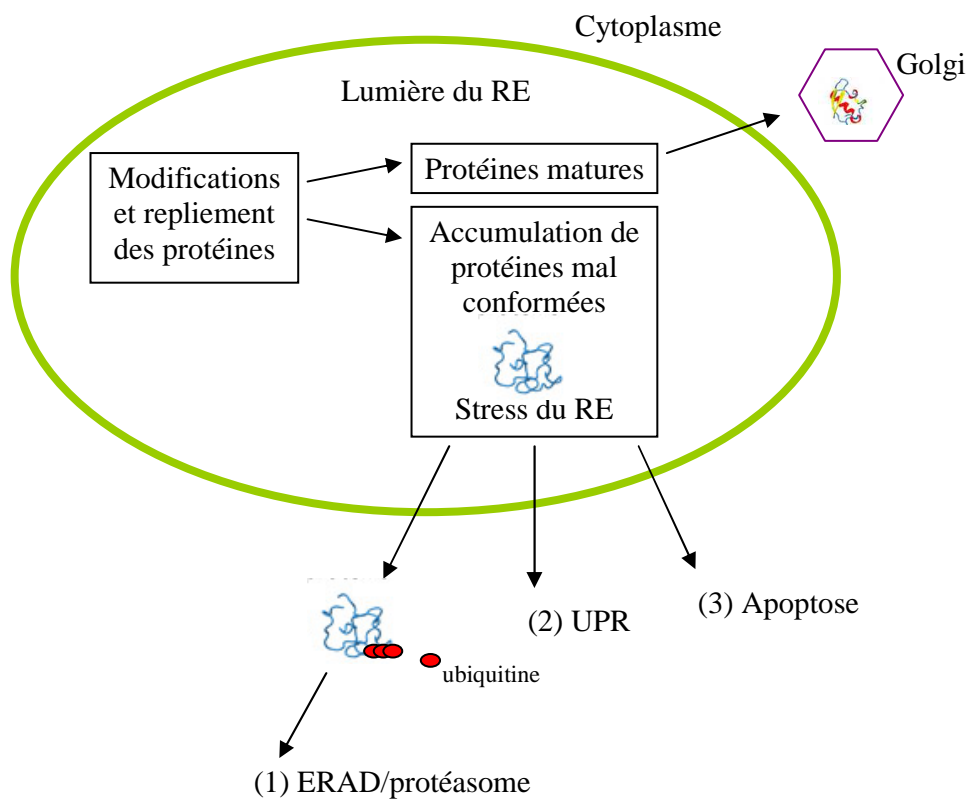


Figure 24 : Représentation schématique du devenir des protéines synthétisées dans le RE.

d'oxydoréduction. Un autre rôle intéressant d'ERp57 est son implication dans l'homéostasie calcique. Lorsque la $[Ca^{2+}]$ du RE est importante, ERp57, lié à la calreticuline, se fixe à la protéine SERCA du côté luminal, peut-être pour y former des ponts disulfures qui inhibent son fonctionnement. Certaines protéines en repliement nécessitent une isomérisation cis/trans des liens peptidyl-prolyl (Xaa-Pro ; Xaa=acide aminé variable) ce qui représente une étape limitante dans le processus de repliement des protéines (Lu et *al.*, 2007). Les membres de la famille des PPIs (Peptidyl-prolyl cis-trans isomérase) sont des enzymes catalysant l'isomérisation de ces liens peptidyl-prolyl, favorisant ainsi une accélération du processus de repliement (Lu et *al.*, 2007). De plus, les chaperonnes du RE sont capables d'une grande efficacité de remodelage des protéines en fonctionnant de façon synergique.

3. La voie ERAD (ER-Associated Degradation)

Le RE possède une machinerie contrôlant très strictement la qualité des protéines synthétisées ; elle discrimine les protéines correctement repliées des protéines mal conformées et permet à ces dernières d'acquiescer une conformation ou d'être dégradées (**figure 24**). Le système ERAD (ER-Associated protein Degradation) est un processus par lequel les protéines mal repliées sont détectées et arrêtées dans leur cheminement dans la voie sécrétrice, par les chaperonnes résidentes du réticulum. Elles sont alors dirigées pour être retransloquées dans le cytosol, où elles subissent une dégradation dépendante du système ubiquitine/protéasome (Schroder et Kaufman, 2005). D'une part, BiP et GRP94 se fixent sur les protéines mal conformées et participent à leur dégradation (Melnick et *al.*, 1994; Schroder et Kaufman, 2005). D'autre part, la calnexine et la calréticuline se fixent sur toutes les protéines néo-synthétisées N-glycosylées ce qui permet aux protéines non conformées de résider plus longtemps dans le RE et d'être prises en charge par la machinerie de conformation des protéines (Helenius et Aebi, 2004). Une succession de réactions enzymatiques de digestion et d'ajout de sucres sur ces chaînes hydrocarbonées permet un contrôle de la conformation de ces protéines. Les glycoprotéines correctement repliées sont transportées vers l'appareil de Golgi. Si la structure correcte de la glycoprotéine ne peut pas être obtenue et maintenue, cette protéine est reconnue par la protéine membranaire EDEM (ER degradation-enhancing-mannosidase-like protein) et expulsée vers le cytosol où elle est poly-ubiquitinylée et dégradée par le protéasome (Spiro, 2004). Il a été montré qu'une autre protéine membranaire du RE, HERP (homocysteine responsive protein) est impliquée dans l'ERAD. En effet, la présence de deux domaines cytoplasmiques d'ubiquitination de type 2 dans sa partie N-

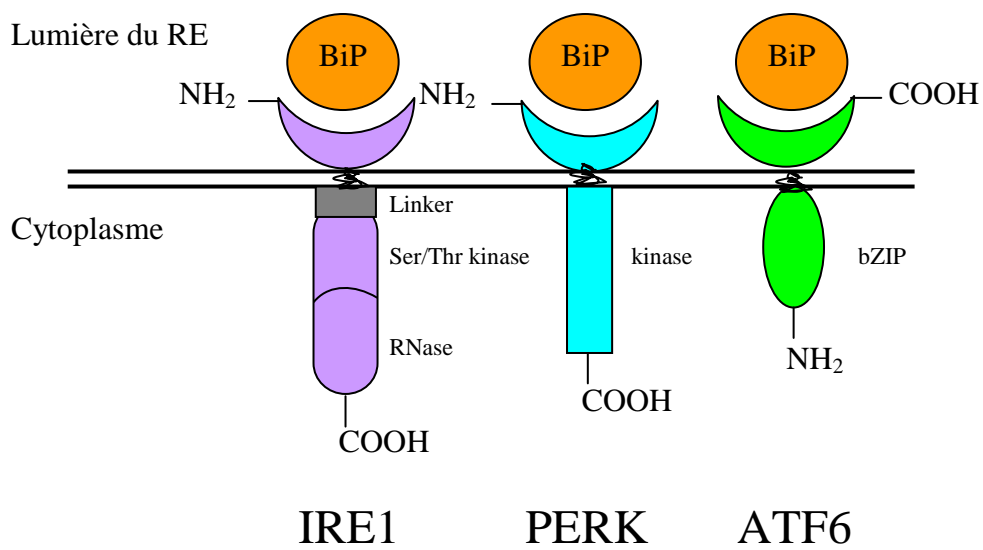


Figure 25 : Représentation schématique des trois senseurs UPR : IRE1, PERK, ATF6 et leur association avec BiP dans la lumière du RE (adapté de Zhang et Kaufman, 2004).

terminale laisse penser que HERP a un rôle dans la dégradation des protéines et notamment dans le recrutement de la sous unité 26S du protéasome au niveau de la membrane du RE (van Laar et *al.*, 2001). Les ponts disulfures doivent être préalablement réduits pour faciliter le transport des protéines vers le cytoplasme à travers le complexe protéique Sec61 (Menetret et *al.*, 2000). La dégradation protéasomale des protéines mal repliées est une protection contre l'activation de la réponse UPR (Unfolded Protein Response). L'inhibition du protéasome est suffisante pour activer la voie UPR qui peut en retour induire la transcription de gènes codant plusieurs composants de la voie ERAD. Cependant, la réponse UPR n'est pas requise pour l'expression basale des protéines du système ERAD. L'activité ERAD basale est suffisante pour éliminer les protéines mal repliées dans des conditions normales. Quand le stress est déclenché, la réponse UPR est requise pour augmenter l'activité ERAD (Schroder et Kaufman, 2005).

II. La réponse au stress du réticulum ou réponse UPR

L'accumulation de protéines mal conformées dans le RE peut induire la transduction du signal UPR (Schroder et Kaufman, 2005; Malhotra et Kaufman, 2007). A ce stade, des signaux sont émis de manière à : 1- ralentir la synthèse protéique pour empêcher l'arrivée d'autres protéines dans la lumière du réticulum, 2- augmenter la quantité de protéines chaperonnes pour stimuler les processus de repliement favorisant l'assemblage correct des protéines, 3- entraîner la dégradation des protéines mal assemblées dans le cytosol par le protéasome et 4- empêcher la mort cellulaire par apoptose ou la déclencher quand les processus précédents ont échoué (**figure 24**). Ces signaux ont pour fonction de stimuler l'expression d'ARNm et de protéines nécessaires pour réparer ces dysfonctionnements. Ils sont émis par trois protéines localisées dans la membrane du RE : la glycoprotéine IRE1 (inositol requiring ER-to-nucleus signal kinase 1 ; inositol requiring kinase 1), la protéine kinase PERK (double-stranded RNA-activated kinase (PKR)-like ER kinase) et le facteur de transcription ATF6 (Activating Transcription Factor) (**figure 25**). La protéine kinase transmembranaire IRE1 a d'abord été caractérisée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* au début des années 90. IRE1 est essentielle pour l'initiation de la signalisation UPR et pour la survie cellulaire lors d'un stress du RE (Cox et *al.*, 1993; Mori, 2000). Il a ensuite été montré que toutes les cellules eucaryotes ont conservé cette propriété de transduction du signal UPR par l'intermédiaire de IRE1 mais que deux transducteurs supplémentaires permettent de générer une diversité de réponses liées à ce stress : PERK et ATF6 (Schroder et Kaufman, 2005). Une caractéristique commune aux

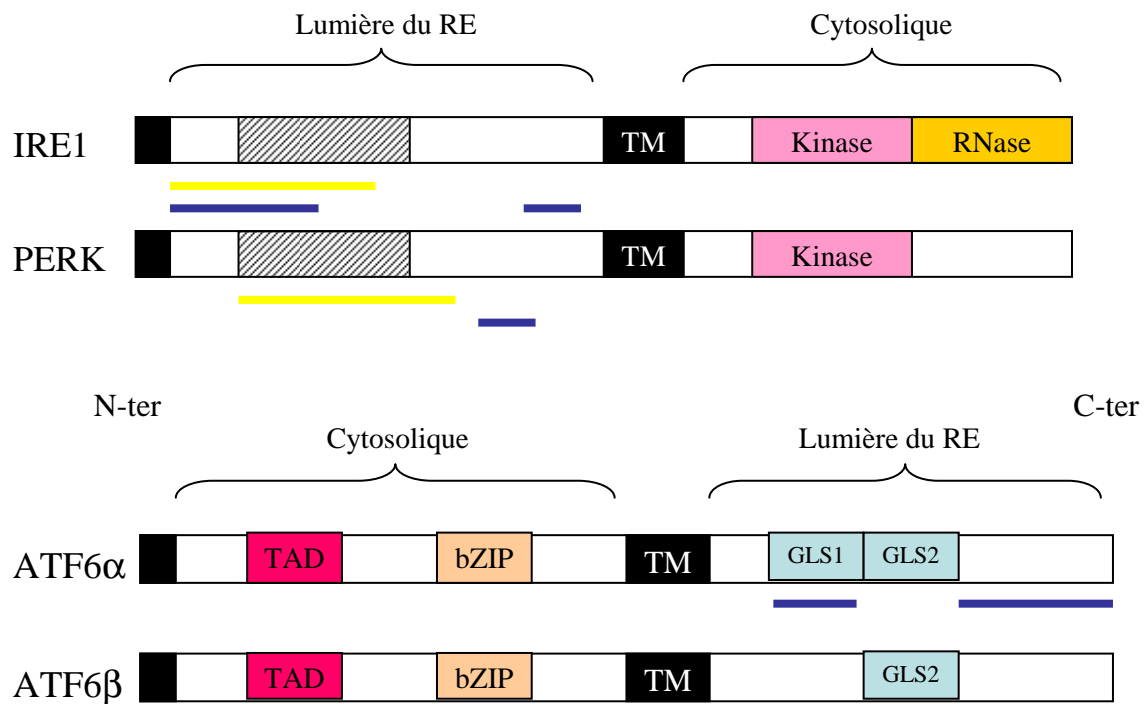


Figure 26 : Représentation schématique des senseurs du stress IRE1, PERK et ATF6. La localisation cellulaire des différents domaines ainsi que la présence de domaines transmembranaires sont indiquées. La boîte noire représente le peptide signal de localisation dans le RE. La boîte hachurée représente une région d'homologie entre IRE1 et PERK. La barre bleue représente la région de fixation à BiP. La barre jaune représente les régions de transduction du signal et d'oligomérisation (adapté de Schroder et Kaufman, 2005).
 bZIP : basic leucine zipper, GLS1 et GLS2 : séquence de localisation golgienne 1 et 2, TAD : domaine d'activation transcriptionnelle, TM : domaine transmembranaire.

protéines IRE1, PERK et ATF6 est leur liaison au ligand soluble BiP qui les maintient dans un état inactif (Malhotra et Kaufman, 2007).

1. Structure des transducteurs de la réponse UPR

1.1. IRE1

Cette protéine est activée en réponse à une baisse de la concentration en inositol. Cela conduit à la transcription de gènes impliqués dans la biosynthèse de ce lipide comme l'inositol-1-phosphate synthase (INO1) (Nikawa et Yamashita, 1992). IRE1 est une protéine transmembranaire de type I de 110 KDa ou 977 acides aminés (chez l'Homme), située au niveau de la membrane du RE, à activité sérine/thréonine kinase et endoribonucléase, analogue à la région catalytique de la RNase L dans son domaine cytoplasmique (Cox et *al.*, 1993). Dans sa partie N-terminale luminale, elle possède un peptide signal d'adressage au RE, un domaine de dimérisation et un domaine de liaison à la chaperonne BiP (Liu et *al.*, 2000) (**figure 26**). Il a été proposé que la liaison de BiP à IRE1 inhibe l'homodimérisation de cette dernière. Chez les mammifères, contrairement à la levure, il existe deux isoformes (α et β) de la protéine IRE1. Ces deux isoformes ne sont pas codées par le même gène. Chez l'homme, le gène codant IRE1 α est situé sur le chromosome 17 (17q24.2) alors que le gène codant IRE1 β est situé sur le chromosome 16 (16q12.2). IRE1 α est exprimée de manière ubiquitaire alors que IRE1 β est spécifique de l'épithélium digestif (Tirasophon et *al.*, 1998; Wang et *al.*, 1998).

1.2. PERK

PERK est une protéine transmembranaire du RE, de 125 kDa, contenant dans sa partie N-terminale luminale une séquence signal de localisation dans le RE, un domaine de dimérisation et un domaine de liaison à la chaperonne BiP. La partie cytoplasmique C-terminale présente un domaine protéine kinase capable de phosphoryler le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (Shi et *al.*, 1999) (**figure 26**). Les domaines luminaux de PERK et d'IRE1 montrent un certain degré d'homologie, conféré entre autre par la présence de domaines d'homodimérisation et de liaison à BiP. Cette homologie de séquences rend ces domaines luminaux interchangeable (Liu et *al.*, 2000). La protéine PERK partage plusieurs caractéristiques communes à la protéine IRE1, bien que, contrairement à IRE1, elle n'ait été identifiée que chez les mammifères. Un orthologue de la protéine PERK est présent chez les

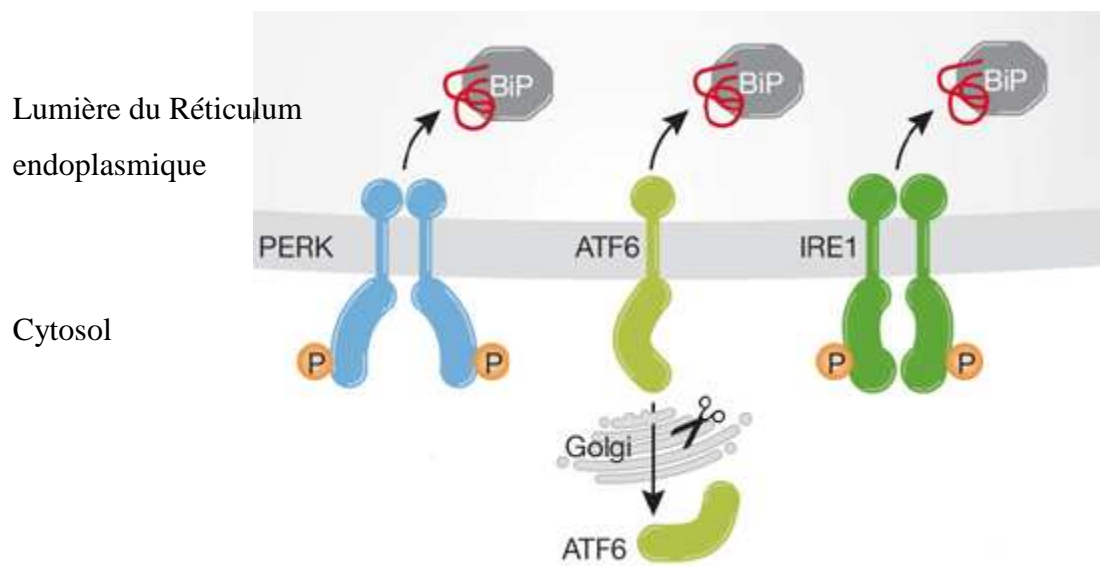


Figure 27 : Activation des 3 senseurs du stress du RE après dissociation de la chaperonne BiP (adapté de Cyr et Hebert, 2009).

levures en la protéine Gcn2p ; cette kinase est impliquée dans la régulation de la traduction via la phosphorylation de eIF2 α , mais son implication réelle dans la réponse au stress du RE reste à déterminer (Patil *et al.*, 2004).

1.3. ATF6

ATF6 est une protéine transmembranaire de type II, située au niveau de la membrane du RE (Haze *et al.*, 1999) et orientée de manière opposée à IRE1 et PERK. La partie luminale, C-terminale, présente deux séquences de localisation golgienne (GLS) agissant indépendamment du stress du RE ainsi qu'un domaine de fixation à la protéine BiP (Shen *et al.*, 2002). Il n'existe aucune homologie de séquence entre le domaine luminal d'ATF6 et ceux de IRE1 et PERK. Aucun homologue de cette protéine n'a été découvert chez les levures, ce qui restreint les études effectuées sur cette protéine aux cellules de mammifères comme c'est le cas pour PERK. Il existe deux isoformes, ATF6 α (90 kDa) et ATF6 β /CREB-RP (cAMP-response-element-binding protein (CREB)-related protein) (110 kDa) (Haze *et al.*, 1999, 2001) qui diffèrent notamment par le nombre de séquences GLS (GLS1 et GLS2 pour ATF6 α ; GLS2 pour ATF6 β). La partie N-terminale cytoplasmique de la protéine comprend un domaine d'activation de la transcription (TAD) et un motif leucine-zipper (bZIP). ATF6 possède également deux sites sensibles aux protéases S1P (Site-1 Protease) et S2P (Site-2 Protease) localisés à proximité immédiate du domaine transmembranaire du côté luminal et cytoplasmique, respectivement. En condition de stress, l'action de S2P au niveau de l'appareil de Golgi, permet le clivage intramembranaire et la libération de la partie cytosolique de 50 kDa agissant ensuite comme facteur de transcription (Haze *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000) (**figure 26**).

2. Transduction du signal UPR

Dans la lumière du RE, les protéines mal repliées forment des agrégats et induisent un signal UPR dont la transduction cytoplasmique se réalise par l'activation des protéines PERK, ATF6 et IRE1. L'activation de ce signal multiple nécessite la détection des protéines mal conformées. La chaperonne BiP, ligand des trois protéines de transduction, assure ce signal par un système d'échange à l'équilibre entre les protéines dénaturées et les protéines PERK, ATF6 et IRE1 (Schroder et Kaufman, 2005) (**figure 27**).

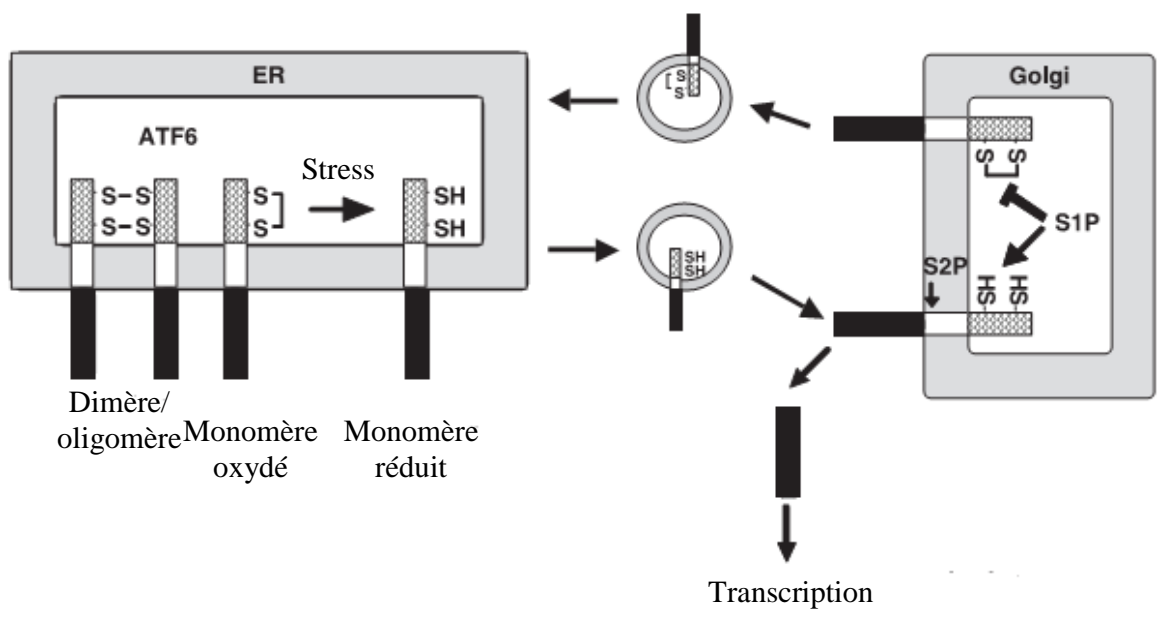


Figure 28 : Modèle de régulation de l'activation de ATF6 basé sur la réduction des ponts disulfures (adapté de Nakanaka et al., 2006).

A l'état inactif, les protéines IRE1 et PERK sont associées à BiP au niveau de leurs domaines luminaux (Okamura *et al.*, 2000). A la suite d'un stress du RE, la quantité de protéines mal conformées augmente et la fixation compétitive de BiP sur ces protéines induit la dissociation de cette chaperonne de PERK/IRE1, l'homodimérisation et l'activation par auto-phosphorylation de ces deux dimères (Malhotra et Kaufman, 2007). Lorsque la quantité de protéines mal conformées diminue dans le RE, BiP s'associe alors à nouveau avec PERK/IRE1 en bloquant leurs activités. Cet état d'échange à l'équilibre permet une réponse cellulaire dont l'intensité est adaptée à celle du stress subi. Dans la protéine IRE1, les domaines de dimérisation et de liaison à BiP se recouvrent (Liu *et al.*, 2003a). Ainsi, BiP maintient cette protéine inactive en empêchant son homodimérisation en absence de stress du RE. La protéine PERK possède des domaines de dimérisation et de liaison à BiP distincts (Ma *et al.*, 2002). BiP bloque donc indirectement la dimérisation par encombrement stérique ou en provoquant un changement de conformation de la partie luminale de PERK.

L'activation d'ATF6 en réponse à un stress du RE est un processus régulé par plusieurs mécanismes. De la même façon que les deux autres senseurs de stress, l'activation d'ATF6 est également régulée par la chaperonne BiP. En condition normale, la protéine BiP est associée à ATF6 au niveau des séquences GLS et la séquestre dans le RE. ATF6 est également retenue dans cet organite par interaction entre ses résidus glycosylés et la calréticuline (Hong *et al.*, 2004). En condition de stress, la dissociation de BiP des séquences GLS conduit à la translocation d'ATF6 au niveau de l'appareil de Golgi et à son activation par les protéases S1P et S2P (Chen *et al.*, 2002). Les protéines ATF6 néo-synthétisées en condition de stress du RE sont anormalement glycosylées ce qui empêche leur interaction avec la calréticuline et conduit à leur transfert vers le Golgi. Une protéine ATF6 mutée ne pouvant plus être glycosylée constitue un « meilleur » activateur transcriptionnel que la protéine sauvage (Hong *et al.*, 2004). Ceci met en évidence l'intervention du cycle de la calréticuline dans l'activation de ce transducteur du signal UPR. Plus récemment, un autre mécanisme de régulation de l'activation a été décrit et semble impliquer les ponts disulfures. Ainsi, à l'état basal, ATF6 forme des complexes homodimériques ou homo-oligomériques via la formation de ponts disulfures au niveau de son domaine luminal. En réponse à un stress, les ponts disulfures sont réduits ce qui conduit à l'augmentation de formes monomères réduites qui vont être transportées jusqu' à l'appareil de Golgi. De plus, il a été montré que la forme monomérique réduite d'ATF6 est un meilleur substrat pour l'enzyme S1P. Ainsi, en absence de stress, si des monomères oxydés d'ATF6 sont transportés jusqu' à l'appareil de Golgi, ils ne seront pas

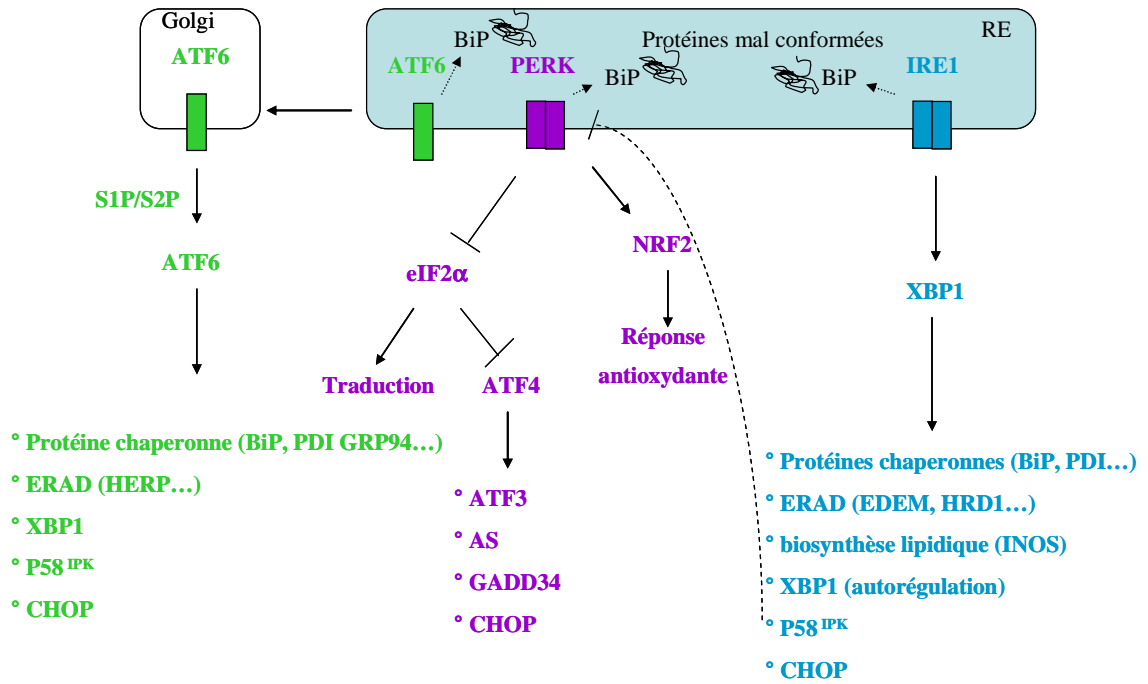


Figure 29: Schéma récapitulatif des différents gènes induits par les senseurs de la réponse UPR (IRE1, PERK et ATF6) suite à un stress du RE.

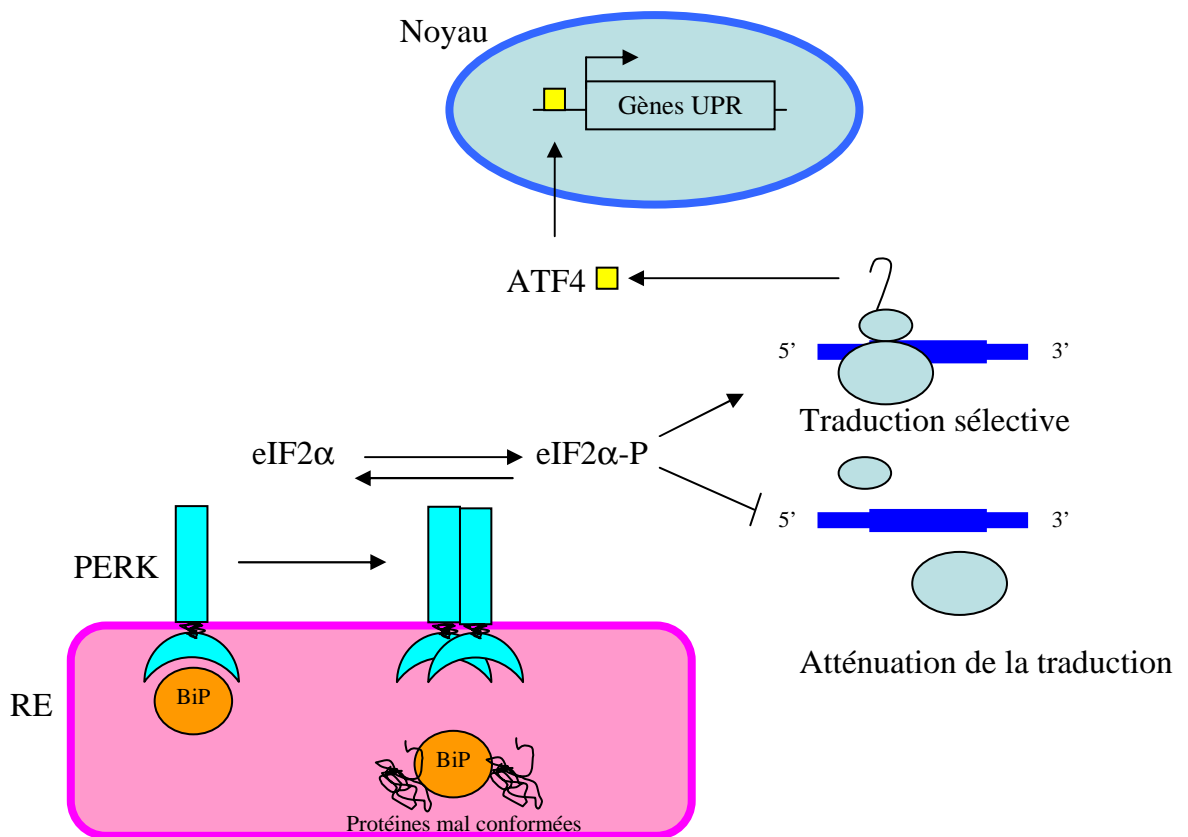


Figure 30 : La voie traductionnelle PERK (adapté de Zhang et Kaufman, 2004).

clivés par la S1P et seront renvoyés au RE par transport rétrograde (**figure 28**) (Yoshida et *al.*, 2006; Nakanaka et *al.*, 2006).

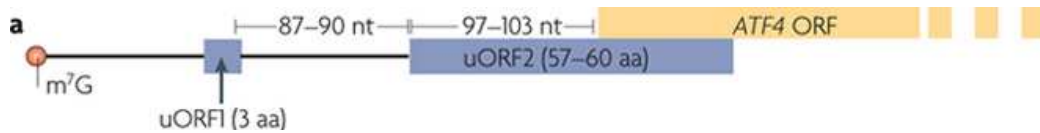
L'augmentation de la complexité moléculaire dans le déclenchement de la signalisation UPR entre la levure (IRE1) et les mammifères (IRE1 α et β , ATF6 et PERK) a permis d'affiner et de générer une diversité de réponses liées au stress du RE. De plus, les différences observées dans les mécanismes d'activation de IRE1, ATF6 et PERK suggèrent qu'il existe des réponses UPR distinctes selon l'état de conformation des protéines du RE et en fonction du stress subi (Yoshida et *al.*, 2003).

3. Voies de signalisation UPR

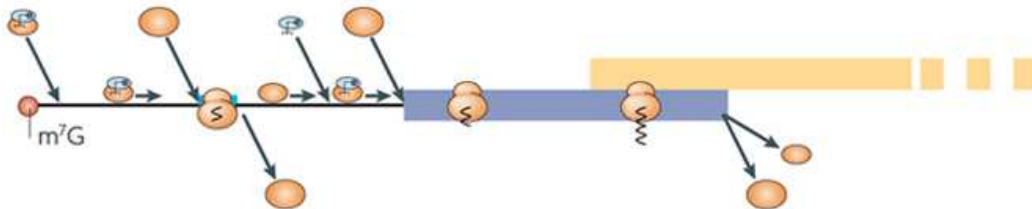
Les protéines ATF6, IRE1 et PERK contrôlent les deux phases de régulation transcriptionnelle et traductionnelle de l'UPR (Kaufman, 1999). La première phase est l'atténuation de la traduction par PERK qui a pour but de limiter l'ajout de nouvelles protéines à l'intérieur du RE déjà saturé. Dans la deuxième phase, les protéines IRE1 et ATF6 déclenchent l'activation transcriptionnelle de gènes codant des chaperonnes et des enzymes résidentes du RE ainsi que des gènes codant des composants des voies d'exportation et de dégradation protéique. La réponse UPR ne permet pas seulement à la cellule de répondre immédiatement à la présence de protéines mal conformées, mais elle prépare également la cellule à subir de nouveaux stress du RE en modifiant à long terme ses programmes transcriptionnels (Mengesdorf et *al.*, 2001). Enfin, les cellules subissant des dommages trop sévères seront éliminées par apoptose sous l'effet de PERK, IRE1 et ATF6 (**figure 29**).

3.1. La voie traductionnelle : activation de PERK

La dissociation de BiP favorise l'homodimérisation de PERK et l'activité kinase de son domaine cytosolique (Ma et *al.*, 2002) (**figure 30**). Les domaines d'homodimérisation et de liaison à BiP ne se chevauchent pas du côté luminal de la protéine PERK (Ma et *al.*, 2002). Il est donc suggéré que la liaison de BiP à PERK induirait une conformation inhibitrice de l'oligomérisation. L'activation de la fonction kinase contenue dans le domaine cytosolique de PERK a deux conséquences majeures : la phosphorylation de la sous-unité alpha du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor 2) sur la Sérine en position 51 (Ser⁵¹) et la phosphorylation du facteur de transcription bZIP Cap 'n' Collar Nrf2 (NF-E2 related factor 2) (Cullinan et *al.*, 2003). eIF2 α catalyse l'étape d'ancrage de l'ARN de



Conditions normales: taux élevé de eIF2-GTP-Met-ARNt (complexe ternaire)



Conditions de stress: faible taux de eIF2-GTP-Met-ARNt (complexe ternaire)

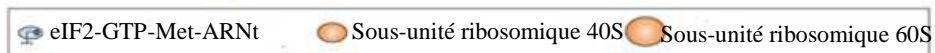
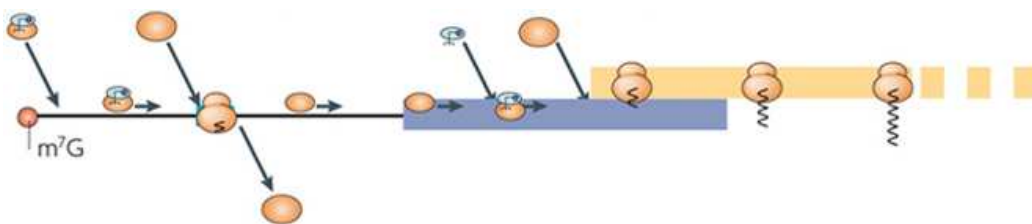


Figure 31 : Régulation de la traduction de l'ARNm ATF4 en réponse au stress (Jackson et al., 2010).

transfert sur la sous-unité 40S du ribosome. Il s'agit d'un hétérotrimère composé de trois sous-unités α , β et γ , associé au GDP à l'état basal. L'intervention du facteur eIF2B catalyse l'échange du GDP contre un GTP au niveau de la sous-unité α d'eIF2, et permet le recrutement de l'ARN de transfert. Or la phosphorylation de eIF2 α par de nombreuses kinases bloque l'échange GDP/GTP (**figure 31**), empêche la formation du complexe de pré-initiation de la traduction et donc l'interaction des ARNm avec la sous-unité 40S du ribosome (Harding et al., 1999). En effet, des cellules de mammifères déficientes en PERK (PERK^{-/-}) montrent une sensibilité accrue aux stress du RE et voient leur sensibilité partiellement restaurée par l'ajout d'inhibiteurs de la traduction comme la cycloheximide (Scheuner et al., 2001; Harding et al., 2000). Curieusement, malgré le blocage de la synthèse protéique, la traduction de certains ARNm est augmentée lors de l'activation de la voie PERK/eIF2 α . D'une part, certains ARNm peuvent initier leur traduction de manière indépendante de la coiffe grâce à la présence de structures particulières dans leur région 5'UTR nommées IRES (Internal Ribosome Entry Site) qui recrutent directement les ribosomes. Ces éléments, initialement décrits chez les picornavirus, sont fréquents dans les ARN viraux mais se retrouvent également dans certains ARNm eucaryotes (3 à 5% des ARNm chez les vertébrés) (Johannes et al., 1999). C'est une longue séquence organisée en nombreuses structures secondaires avec une courte région pyrimidique située à une trentaine de bases avant le codon d'initiation. La présence d'IRES est défavorable à la traduction dépendante de la coiffe dans des conditions normales de croissance. Cependant, en réponse à un stress ou dans des conditions particulières, ces structures permettent à certains ARNm d'échapper à une inhibition globale de la traduction. La plupart de ces transcrits possédant des IRES codent des protéines impliquées dans la croissance, la différenciation mais aussi la réponse au stress. D'autre part, le niveau de phosphorylation du facteur eIF2 α influence également la traduction de certains gènes via l'activation de la traduction de petits cadres de lecture en amont de certains ORFs codant (uORFs, upstream open reading frame) (Kozak, 2002) dans leur partie 5' non traduite. Cela leur permet d'être exprimé lors d'une inhibition de la synthèse protéique (Harding et al., 2000). Ce mécanisme de contrôle a été observé chez les levures et chez les mammifères bien qu'aucun homologue de PERK n'ait été identifié à ce jour chez les levures. Les ARNm régulés de cette manière identifiés jusqu'à maintenant sont GCN4 chez la levure *S. cerevisiae* et ATF4 et Cat-1 (cationic amino acid transporter-1 gene) chez les mammifères (Harding et al., 2000; Scheuner et al., 2001). GCN4 est un facteur de transcription clé impliqué entre autre dans la régulation de la réponse cellulaire associée au métabolisme des acides aminés (Hinnebusch, 2005). L'homologue de GCN4 chez les mammifères, ATF4, est de plus

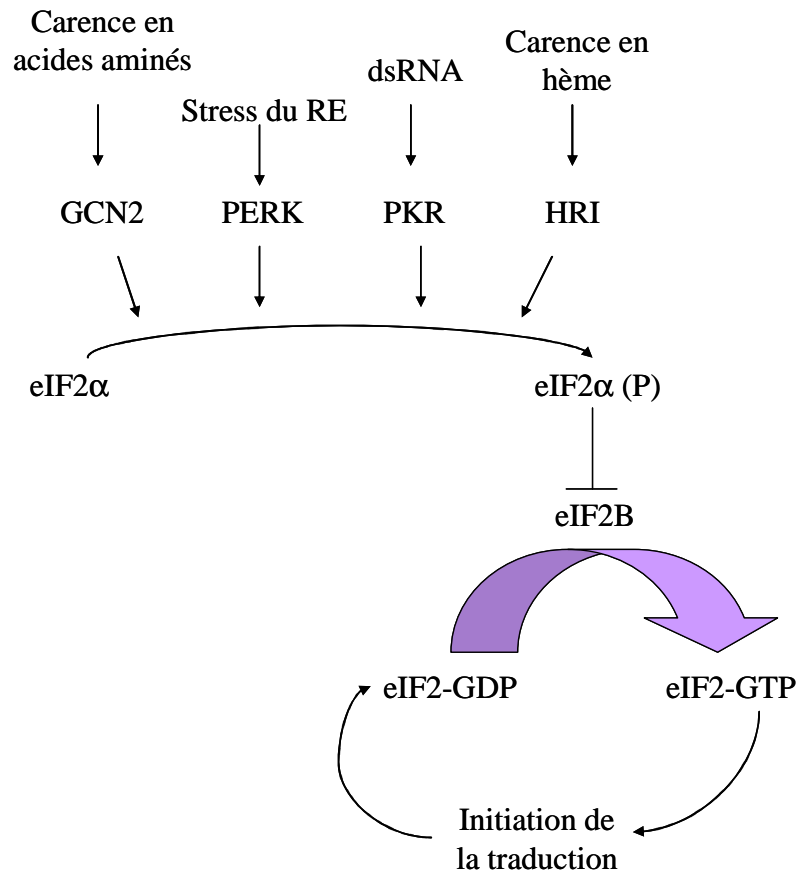


Figure 32 : Régulation de la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α . La phosphorylation est médiée par quatre kinases (GCN2, PERK, PKR et HRI) régulées par divers stress cellulaires. eIF2 α phosphorylé inhibe le facteur eIF2B induisant un arrêt de la traduction.

impliqué dans la régulation de la réponse antioxydante et l'apoptose (Harding et *al.*, 2000; Scheuner et *al.*, 2001). ATF4 est impliqué dans l'activation de la voie apoptotique en induisant l'expression de la protéine CHOP (C/EBP homologous protein). L'ARNm Cat-1 code un transporteur des acides aminés arginine et lysine, transporteur activé également en situation de stress nutritionnel (Yaman et *al.*, 2003). Ce mécanisme de régulation implique la capacité des ribosomes à scanner les ARNm et à ré-initier la traduction. En effet, l'ARN messenger d'ATF4 est constitué de deux micro ORF qui précèdent, dans le sens 5'→3', la région codante pour ATF4. La première μ ORF est située en amont à une distance telle qu'elle permet une réinitiation de la traduction de la seconde μ ORF. Par contre, la distance entre la μ ORF2 et la région codant pour ATF4 est trop petite pour permettre une réinitiation de la traduction. Alors que la μ ORF1 recrute les ribosomes sur le messenger, la μ ORF2 inhibe la traduction de la région codante pour ATF4. En effet, en conditions normales, il y a peu de eIF2 α phosphorylé, et donc une grande disponibilité du complexe ternaire et donc après avoir traduit la μ ORF1, la sous-unité 40S du ribosome rescanne le messenger et l'initiation s'effectue rapidement c'est-à-dire au niveau de la μ ORF2. Par contre, en conditions de stress, eIF2 α est phosphorylé, il y a peu de complexes ternaires disponibles, la réinitiation prend plus de temps, ce qui permet à la sous-unité 40S ribosomale de passer la μ ORF2, et l'initiation se fait alors au niveau de la phase codant pour ATF4. La traduction de GCN4 est régulée par un mécanisme semblable sauf que le messenger comporte quatre μ ORF (**figure 10**) (Vattem et Wek, 2004). Il est important de noter que plusieurs kinases sont capables, en réponse à des stress cellulaires variés, de phosphoryler le facteur eIF2 α et donc d'induire l'expression du facteur de transcription ATF4. Ce sont les kinases GCN2 (General Control of Nitrogen metabolism), PKR (Protein Kinase dsRNA dependent) et HRI (Heme-Regulated Inhibitor) qui sont respectivement induites par la carence en acides aminés, lors d'une infection virale par l'ARN double brin (dsRNA), ou par la carence en hème (**figure 32**). L'activation de PERK induit également l'activation du facteur de transcription NRF2 (Cullinan et *al.*, 2003). Dans le cytoplasme, NRF2 est maintenu inactif par son interaction avec Keap1 (kelch-like-Ech-associated protein 1). Lorsque survient un stress du RE, une fois PERK activée, celle-ci phosphoryle NRF2 et provoque sa dissociation de Keap1. Cela permet la translocation du facteur NRF2 dans le noyau et la transcription de gènes contenant l'élément de réponse ARE (Antioxidant Response Element) (Cullinan et *al.*, 2003). Ce mécanisme explique le phénotype observé chez les cellules déficientes en PERK (PERK^{-/-}) qui accumulent des espèces réactives de l'oxygène ROS (Reactive Oxygen Species) sous stress du RE et chez les cellules NRF2^{-/-} qui ont une sensibilité accrue au stress du RE par leur incapacité à palier un stress oxydant

(Cullinan et *al.*, 2003; Itoh et *al.*, 1999; He et *al.*, 2001). L'activation de PERK en cas de stress du RE est réversible et très rapide. En effet, dans les minutes suivant un retour à la normale de l'homéostasie présente dans le RE, PERK est rapidement déphosphorylée. Le mécanisme de déphosphorylation de PERK est inconnu ainsi que les phosphatases impliquées.

Environ un tiers des gènes dont l'expression est induite par la réponse UPR requièrent la phosphorylation du facteur eIF2 α , suggérant que la voie de signalisation dépendante de PERK intervient également à un niveau transcriptionnel dans la réponse au stress du RE (Scheuner et *al.*, 2001). La traduction préférentielle du facteur de transcription ATF4, à travers la phosphorylation de eIF2 α par PERK, aboutit à la transcription des gènes CHOP (C/EBP homologous protein) et ATF3 (Harding et *al.*, 2000; Scheuner et *al.*, 2001).

L'expression de CHOP est bloquée dans des cellules PERK^{-/-} ou des cellules dont le facteur eIF2 α n'est pas fonctionnel. Cependant, la surexpression d'ATF4 dans des cellules PERK^{-/-} ne suffit pas pour restaurer l'expression de CHOP, ce qui suggère qu'ATF4 est nécessaire mais non suffisant pour l'induction de ce gène. Une autre cible de la voie PERK/eIF2 α pourrait donc être nécessaire pour réguler l'expression de CHOP (Ma et *al.*, 2002). Cette expression peut également être induite par les facteurs de transcription ATF6 et XBP1 à travers la présence d'une séquence ERSE (ER stress-response element) comme motif minimum CCAAT(N9)CCACG au sein du promoteur de CHOP (Ma et *al.*, 2002). CHOP est phosphorylée par la kinase de stress p38 ce qui a pour effet d'augmenter son activité (Wang et Ron, 1996).

ATF3 est un facteur de transcription faiblement exprimé dans des cellules en condition normale et rapidement induit en réponse à divers stress cellulaires. Les transcrits multiples de ce facteur résultent d'un épissage alternatif (Pan et *al.*, 2003). Les effets de ces différentes formes peuvent être antagonistes ou synergiques avec ceux d'ATF4. ATF3 induit avec ATF4 l'expression de gènes comme GADD34 (Growth Arrest DNA Damage 34) ou l'asparagine synthase (AS) en réponse à un stress du RE (Jiang et *al.*, 2003). ATF3 a également été décrit comme étant, avec ATF4, nécessaire à l'induction de CHOP lors d'une carence en acides aminés (Jiang et *al.*, 2004).

Le facteur de transcription sensible à l'oxydoréduction NF- κ B est également activé par la voie PERK/eIF2 en réponse à un stress du RE (Pahl et Baeuerle, 1995; Jiang et *al.*, 2003). L'activation d'ATF4 n'est pas suffisante pour induire l'expression de gènes spécifiques de

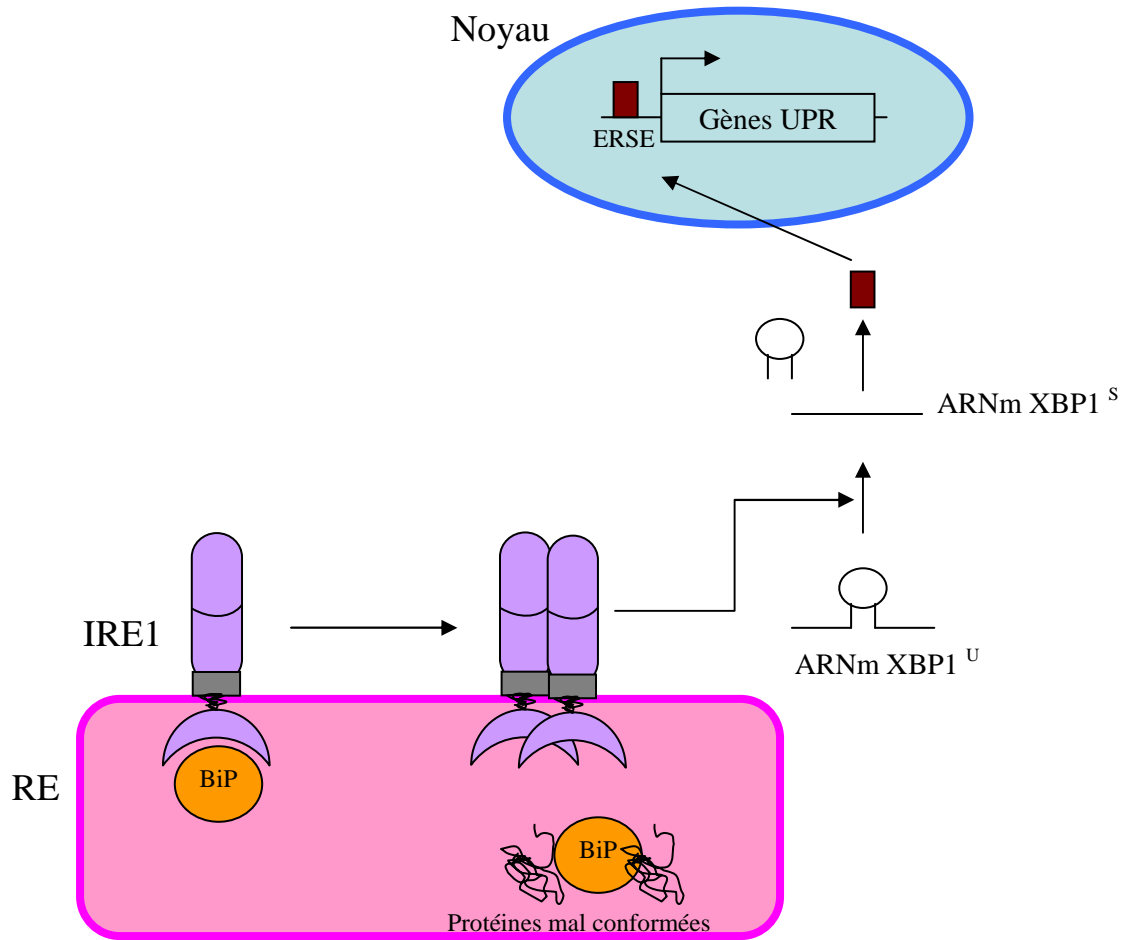


Figure 33 : La voie transcriptionnelle IRE1 (adapté de Zhang et Kaufman, 2004).

XBP1^S : X-Box Binding Protein spliced; XBP1^U : X-Box Binding Protein unspliced; ERSE: ER stress-response element.

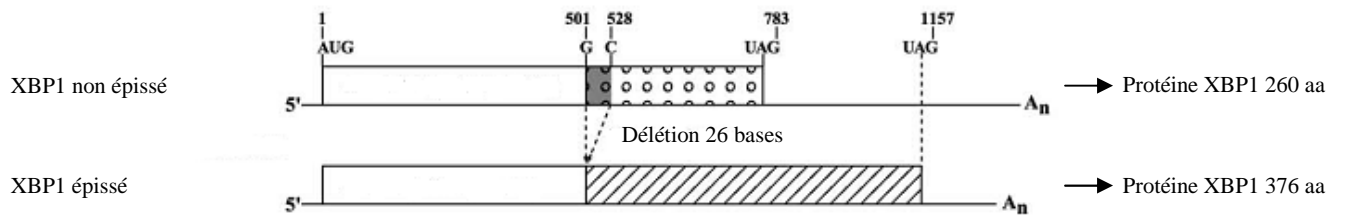


Figure 34 : Représentation schématique des formes épissée et non épissée de l'ARNm XBP1 chez l'Homme (adapté de Back et al., 2005).

l'UPR et d'autres facteurs induits en condition de stress du RE doivent intervenir et agir avec ATF4 (Harding et *al.*, 2000).

La réponse UPR nécessite un système de contrôle permettant d'éviter qu'elle ne devienne hyperactive. Il existe deux boucles de rétrocontrôle de l'inhibition traductionnelle liée à la réponse UPR. D'une part, la protéine GADD34 (Growth Arrest DNA Damage 34) se fixe sur la sous-unité catalytique de la protéine phosphatase 1 (PP1) et induit la déphosphorylation de eIF2 α . Les ARNm de GADD34 sont très faiblement exprimés dans les cellules non stressées mais leur expression est fortement induite lors de stress du RE, grâce à la présence d'uORFs comme au niveau d'ATF4. La surexpression de GADD34 bloque à la fois les voies de signalisation traductionnelle et transcriptionnelle induites par PERK/eIF2 α (Schroder et Kaufman, 2005). D'autre part, PERK est inhibé par la fixation sur son domaine kinase de la protéine P58^{IPK}, dont l'expression est sous la dépendance de IRE1 (Yan et *al.*, 2002).

3.2. La voie transcriptionnelle : activation de IRE1 et ATF6

➤ Voie dépendante de IRE1

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'accumulation de protéines mal repliées causée par un stress du RE entraîne la dissociation du complexe BiP/IRE1, permettant d'une part la prise en charge des protéines mal conformées par BiP et d'autre part l'homodimérisation d'IRE1 et l'activation des activités enzymatiques (endoribonucléase et kinase) de son domaine cytosolique. IRE1 a la capacité de s'autophosphoryler, ce qui a pour conséquence d'activer son domaine RNase (**figure 27 ; figure 33**). Le domaine RNase de IRE1 a une très forte homologie avec la RNase L et des expériences biochimiques et fonctionnelles ont permis de conclure à la nécessité de la dimérisation des domaines RNase pour favoriser cette action (Tirasophon et *al.*, 2000). Le substrat de IRE1 est l'ARN messager codant le facteur de transcription bZIP Hac1 chez les levures et XBP1 (X-Box Binding Protein), son homologue chez les mammifères (Yoshida et *al.*, 2001). Il se produit un épissage non conventionnel de 26 nt (chez l'Homme) de l'intron de l'ARNm de XBP1 et la ligation des fragments produits (**figure 34**). Cet épissage conduit à un changement de cadre de lecture permettant la traduction d'une protéine différente (Lee et *al.*, 2002b).

XBP1 est un facteur de transcription appartenant à la famille ATF/CREB et possède dans la région C-terminale un domaine leucine zipper qui lui permet de se fixer sur les promoteurs des gènes possédant une séquence ERSE ou UPRE. L'activation de l'axe de signalisation

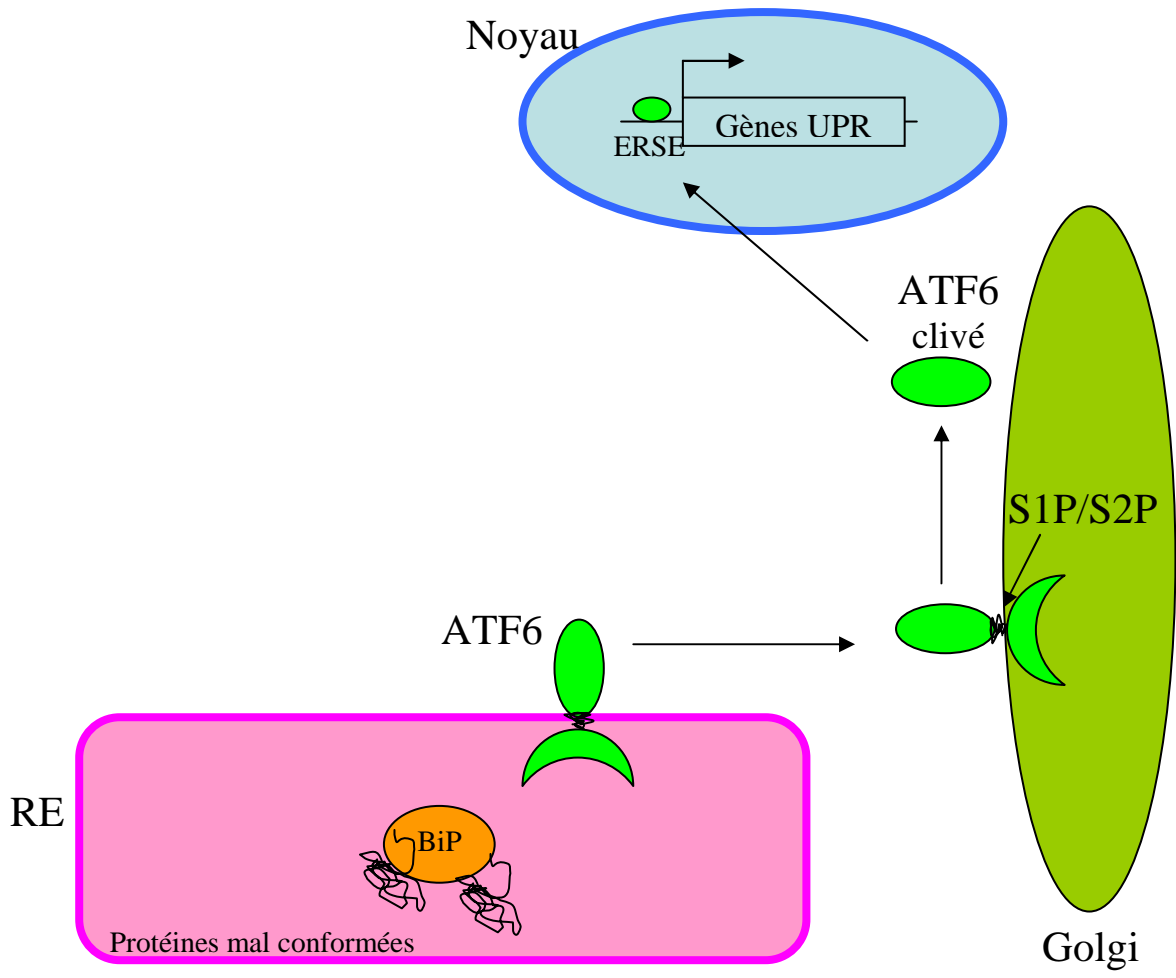


Figure 35 : La voie transcriptionnelle ATF6 (adapté de Zhang et Kaufman, 2004).

S1P: Site-1 Protease; S2P: Site-2 Protease; ERSE: ER stress-response element.

IRE1/XBP1 induit l'expression d'un certain nombre de gènes cibles de l'UPR comme des gènes codant des protéines de la voie ERAD (EDE1, HRD1) ou des chaperonnes (BiP) (Yoshida et *al.*, 2003) (**Figure 29**). Les formes épissées et non épissées des ARN de XBP1 sont traduites. La protéine XBP1 produite à partir de l'ARNm non épissé inhibe la réponse UPR en se fixant sur la protéine produite à partir de l'ARNm XBP1 épissé. Ce complexe est alors dégradé par le protéasome. La protéine produite à partir de l'ARNm non épissé de XBP1 représente donc un régulateur négatif de la réponse UPR (Yoshida et *al.*, 2006). Le promoteur du gène XBP1 contient des éléments de régulation reconnus par XBP1 lui-même, permettant une autorégulation positive (Lee et *al.*, 2002b; Yoshida et *al.*, 2001). En effet, la protéine XBP1 peut activer sa propre transcription ce qui permet de maintenir les voies de signalisation de IRE1 actives après la répression de celles d'ATF6 et PERK.

➤ Voie dépendante d'ATF6

Le mécanisme d'activation d'ATF6 est bien caractérisé. Lorsqu'un stress du RE survient, la dissociation de BiP d'ATF6 permet la translocation de ce dernier vers l'appareil de Golgi où il sera pris en charge immédiatement par la protéase à sérine S1P (Site-1 protease) qui clivera ATF6 dans son domaine luminal (Haze et *al.*, 1999; Chen et *al.*, 2002; Shen et *al.*, 2002; Hong et *al.*, 2004). La métalloprotéase S2P (Site-2 protease) prend ensuite en charge ATF6 afin de cliver la partie N-terminale ancrée à la membrane. L'action des deux protéases permet la libération du domaine cytosolique amino-terminal d'ATF6 de 50 KDa possédant l'activité bZIP (fonction de facteur de transcription), qui est ensuite transloqué dans le noyau (Wang et *al.*, 2000; Yoshida et *al.*, 2001) (**figure 35**). La translocation d'ATF6 dans le noyau permet sa liaison, seul ou en partenariat, aux éléments de réponse de type ERSE. Ces séquences sont présentes dans les promoteurs de certains gènes codant des protéines majeures du RE comme les chaperonnes BiP, GRP94 et la protéine PDI (Wang et *al.*, 2000; Yoshida et *al.*, 1998). L'activation d'ATF6 permet ainsi d'accroître les capacités de repliement des protéines dans le RE. La fixation d'ATF6 sur ERSE nécessite la présence des facteurs CBF ou NF-Y (Yoshida et *al.*, 2001). La phosphorylation d'ATF6 par la protéine kinase de stress p38 permet d'augmenter son activité (Luo et Lee, 2002). ATF6 induit aussi la transcription de XBP1. Le facteur de transcription ATF6 se fixe préférentiellement sur les séquences ERSE, alors que XBP1 se fixe aussi bien sur les séquences ERSE qu'UPRE (Unfolded Protein Response Element). Ceci suggère que la cellule induit ATF6 et la transcription de gènes cibles à travers la séquence ERSE immédiatement en réponse à un stress du réticulum, et active plus

tardivement XBP1 pour la transcription de gènes cibles non seulement à travers les séquences ERSE, mais également à travers les séquences UPR.

4. Interaction des différentes voies UPR

Il existe une coordination entre les différents senseurs du stress UPR. L'exemple le plus représentatif est celui de l'activation d'ATF6 qui se lie au promoteur de XBP1 pour activer sa transcription. Le facteur de transcription ATF6, activé à l'issue d'une protéolyse, est rapidement produit, tandis que XBP1 actif nécessite une étape de transcription et l'épissage de l'ARN par IRE1. En revanche XBP1 devrait fonctionner plus longtemps qu'ATF6 puisqu'il active son propre promoteur. De plus, des travaux ont montré que les protéines ATF6 et XBP1 co-immunoprécipitent, ce qui suggère que ces deux facteurs de transcription peuvent former un hétérodimère *in vivo* (Yamamoto et al., 2007).

5. La voie apoptotique activée à partir du RE

Dans le cas où les signaux émis échouent à régénérer la fonction du RE, la réponse UPR conduit à l'apoptose de la cellule. Les signaux émis par PERK, IRE1 et ATF6 peuvent être proapoptotiques lorsque le stress subi est trop fort ou trop long. Diverses formes de stress du RE induisent différents programmes d'apoptose, ce qui suggère que le déclenchement de l'apoptose dépend de la nature des stimuli et du type cellulaire (Scorrano et al., 2003). Les signaux apoptotiques sont produits par trois mécanismes.

Le premier mécanisme implique la protéine CHOP (C/EBP-homologous protein)/GADD153 (Growth arrest and DNA-damage-inducible protein 153)/DDIT3 (DNA-damage-inducible transcript 3). La surexpression du facteur de transcription CHOP lors d'un stress provoque l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Gotoh et al., 2002). Des cellules CHOP^{-/-} sont partiellement résistantes à une apoptose initiée par un stress du RE (Zinszner et al., 1998; McCullough et al., 2001). CHOP forme des hétérodimères stables avec les facteurs de transcription de la famille C/EBP et contrôle ainsi l'expression de nombreux gènes induits en condition de stress et qui interviennent dans des phénomènes d'apoptose (Zinszner et al., 1998). Il active également l'expression d'un certain nombre de gènes appelés DOCs (Downstream of CHOP) en se liant à ATF3 ou au complexe AP-1 (Ubeda et al., 1999; Chen et al., 1996). Des études ont montré que GADD34 et ERO1 α (Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1- α) sont des cibles de CHOP et que leur activation peut entraîner l'apoptose

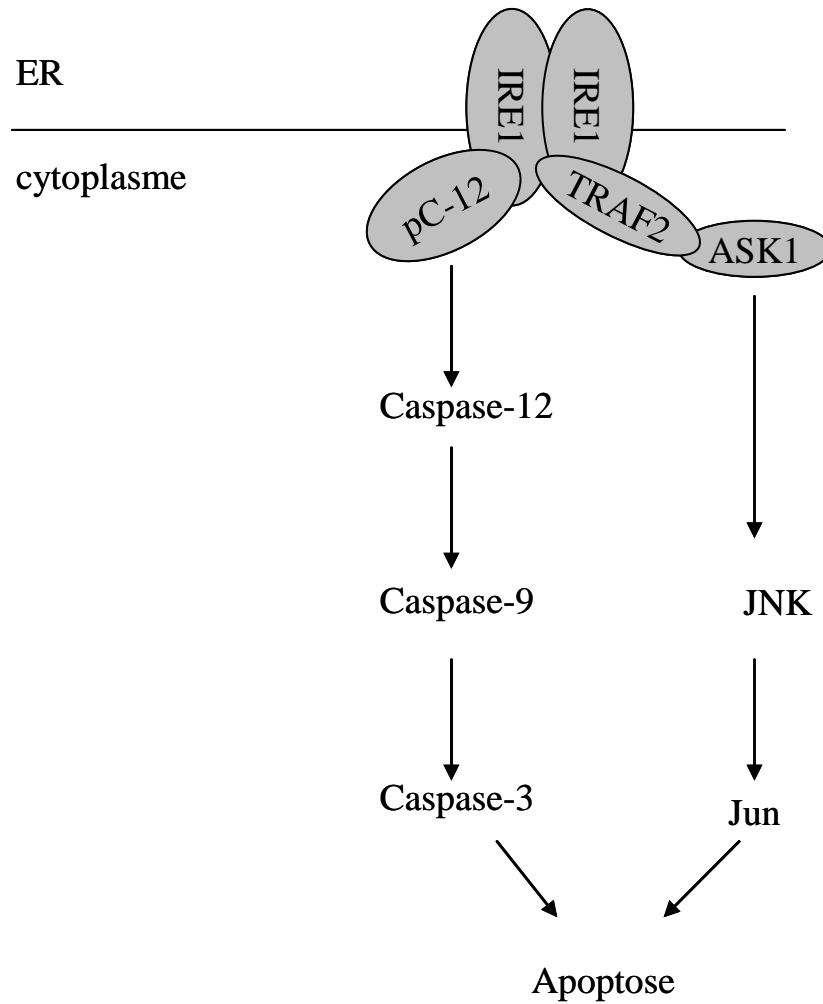


Figure 36 : IRE1 et apoptose. Suite un stress du RE prolongé, IRE1 active les voies TRAF2/JNK et la voie des caspases, menant à l'apoptose. procaspase-12 (pC12).

en condition de stress (Lai et al., 2007). Ils provoquent respectivement une augmentation de la charge en protéines du RE par déphosphorylation de eIF2 α et une augmentation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de protéines mal conformées contribuant ainsi à un maintien du stress du réticulum (McCullough et al., 2001; Marciniak et al., 2004). La transcription de l'anhydrase carbonique VI qui active l'apoptose à travers l'augmentation de la concentration intracellulaire en protons, fait également partie des gènes de réponse à CHOP (Sok et al., 1999). De plus, CHOP peut inhiber la transcription de Bcl-2 (McCullough et al., 2001) et donc supprimer ses effets anti-apoptotiques. La surexpression de Bcl-2 bloque à la fois la dépolarisation de la membrane interne des mitochondries en réponse à un stress du RE et la libération de calcium initiée au niveau de la membrane du RE par les protéines Bad et Bax (Breckenridge et al., 2003).

En réponse à un stress du RE prolongé, hormis son activité endoribonucléasique, IRE1 participe à un second mécanisme en s'associant à de nombreux partenaires par l'intermédiaire de son domaine cytosolique pour induire différentes voies de signalisation impliquant des protéines kinases. TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor), une protéine adaptatrice, recrutée au niveau de la membrane du RE, s'associe au domaine kinase d'IRE1. Ce recrutement est régulé par JIK (c-Jun NH₂-terminal Inhibitory Kinase) dont la surexpression facilite l'interaction entre IRE1 α et TRAF2. Le complexe IRE1/TRAF2 interagit alors avec ASK1 (Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1) pour activer JNK (c-Jun N-terminal Kinase 1), ce qui induit la mort cellulaire par apoptose. Cette signalisation ASK1/JNK semble spécifique du stress du RE (Lai et al., 2007). De plus, une fois liée à IRE1, TRAF2 pourrait également interagir avec la procaspase-12. Cela permet son homodimérisation et son clivage. La caspase 12 active pourrait alors actionner une cascade protéolytique impliquant la caspase 9 et la caspase 3 (Yoneda et al., 2001; Nakagawa et Yuan, 2000) (**figure 36**). Cependant, bien que la caspase 12 soit activée lors du stress du RE et que sa capacité à activer caspase 9 ait été montrée (Rao et al., 2002), son implication dans l'apoptose reste controversée. Les premières études ont montré que les souris caspase 12^{-/-} et les cellules MEF (Mouse embryonic fibroblast) résistent à l'apoptose en réponse au stress du RE. Au contraire, une étude récente a montré que les souris caspase 12^{-/-} ne sont pas protégées de la mort cellulaire induite par le stress (Saleh et al., 2006). La caspase 12 n'étant pas fonctionnelle chez l'Homme à cause d'une mutation qui induit un décalage de cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré, ses fonctions pourraient être assurées par son homologue la caspase 4 (Lai et al., 2007). Enfin, le troisième mécanisme implique les protéines de la famille Bcl-2, pro-apoptotiques comme Bax et Bak et antiapoptotique Bcl-2 qui sont étroitement liées au

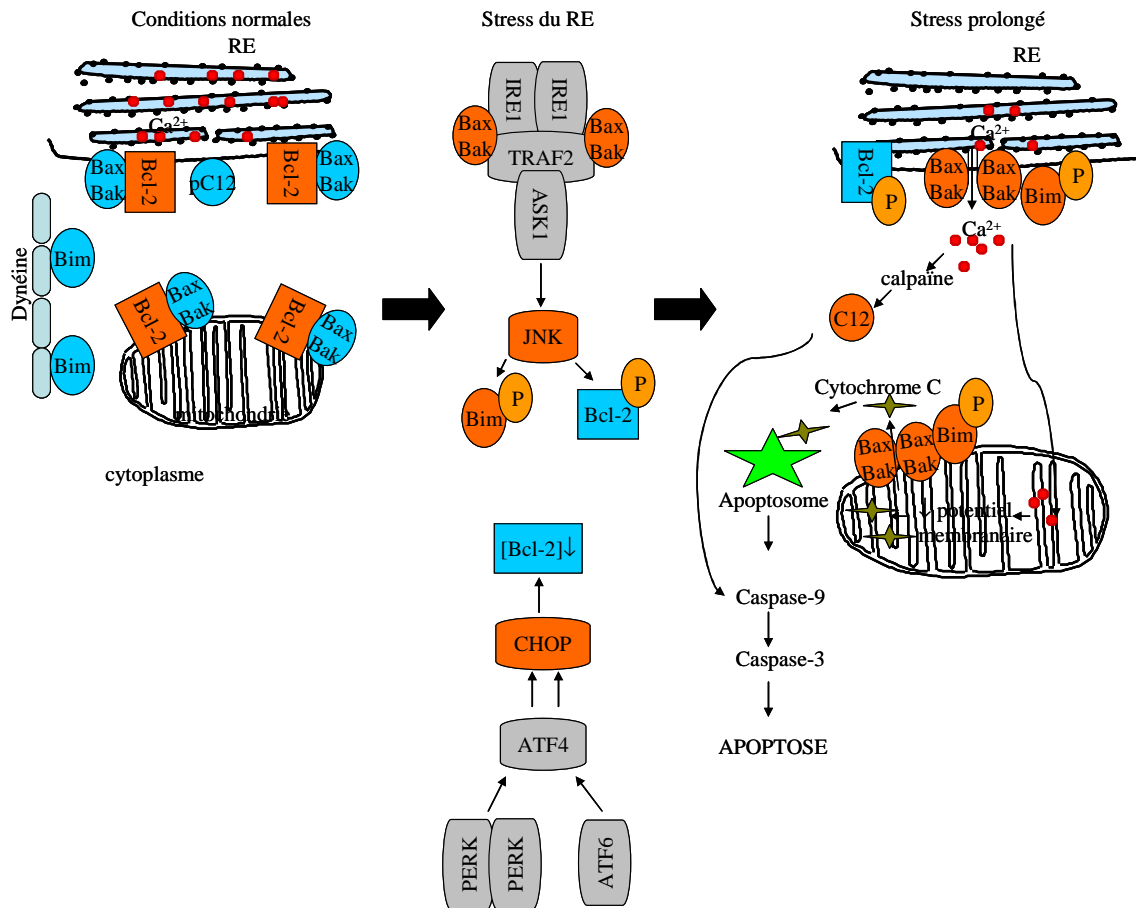


Figure 37 : La voie apoptotique dépendante du stress du RE (adapté de Szegezdi et al., 2006). pC12 : Procaspase-12, C12 : caspase-12. Les molécules inactives sont représentées en bleu alors que les molécules actives sont en orange.

maintien du pool calcique du RE (Breckenridge et *al.*, 2003). En réponse à un stress du RE prolongé, Bax/Bak interagissent avec le domaine cytosolique de IRE1. Cette interaction peut conduire à l'induction de l'apoptose et semble nécessaire à l'activité de IRE1. De plus, les protéines Bak et Bax pourraient promouvoir l'apoptose en induisant un efflux de calcium dans le cytoplasme à l'issue d'un changement conformationnel et oligomérisation au niveau des canaux calciques de la membrane du RE, ce mécanisme étant contrôlé par Bcl-2 (Zong et *al.*, 2003). Cette fuite de calcium induit l'activation de la caspase 12 par clivage via la m-calpaïne, une protéase dépendante du Ca^{2+} qui induit l'activation de la voie des caspases (caspase 9/caspase 3) (Malhotra et Kaufman, 2007). En outre, une absorption du Ca^{2+} cytosolique par la mitochondrie provoque la dépolarisation de la membrane mitochondriale interne et la libération de cytochrome C. Ceci a pour conséquence la formation de l'apoptosome, suivie de l'activation des caspase 9 puis 3 (Breckenridge et *al.*, 2003). Au contraire, la surexpression des protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL inhibe l'apoptose (Hacki et *al.*, 2000). La suppression de l'effet antiapoptotique de Bcl-2 met en jeu deux mécanismes. D'une part, l'induction de CHOP qui a été montrée comme étant un régulateur négatif de Bcl-2 et d'autre part, l'activation de JNK via IRE α /TRAF2/ASK1 qui pourrait provoquer la phosphorylation de Bcl-2. Dans ce cas, Bcl-2 phosphorylée perd sa fonctionnalité permettant de se lier et de séquestrer les protéines proapoptotiques Bax et Bid ce qui entraîne l'efflux de Ca^{2+} du RE vers la mitochondrie (Bassik et *al.*, 2004). JNK peut également phosphoryler la protéine à BH3 isolé Bim, normalement séquestrée par fixation à la dynéine. Une fois libérée, Bim se fixe et active Bax et Bak au niveau du RE et de la mitochondrie (Lei et Davis, 2003) (**figure 37**).

III. Les inducteurs du stress du RE

Plusieurs données ont montré que les variations de la concentration calcique au sein du RE altèrent ses fonctions et créent un stress du RE. Les événements susceptibles de provoquer un stress du RE ne se résument pas à une perturbation de l'homéostasie calcique et sont au contraire très nombreux. Plusieurs stress environnementaux (physiques ou physiologiques) dont le stress osmotique, thermique et oxydatif ainsi que le stress dûs aux radiations ionisantes, métaux lourds, hypoxie/ischémie, carences nutritives, infections virales et agents chimiques génotoxiques, peuvent causer des changements délétères dans la conformation des protéines (Kültz, 2003).

Des molécules pharmacologiques telles que la thapsigargine, la tunicamycine et le dithiothréitol (DTT) sont largement utilisées pour induire expérimentalement un stress du RE. La thapsigargine est un inhibiteur spécifique des pompes Ca^{2+} -ATPase du RE, qui permet de dépléter les stocks calciques de ce compartiment. La tunicamycine est un inhibiteur de la N-glycosylation des protéines en cours de synthèse dans le RE. Le DTT rompt les ponts disulfures des protéines. Les protéines dénaturées s'accumulent alors dans le RE. D'autres inducteurs du stress tels que la Bréfeldine A (qui bloque le transport des protéines du RE vers l'appareil de Golgi), l'ionophore calcique A23187 ou l'ionomycine qui augmentent le taux de calcium intracellulaire et l'EGTA, chélateur de calcium, sont aussi utilisés.

Plusieurs études ont montré que les ligands de PPAR γ peuvent activer et induire une réponse au stress. Ainsi, dans les cellules HeLa, le ligand Δ^{12} -prostaglandine J2 (Δ^{12} -PGJ₂) est localisé au niveau du RE et induit l'expression de BiP et PDI (Odani *et al.*, 1996ab). Dans les cellules β -pancréatiques, les ligands de PPAR γ peuvent activer le stress du réticulum. Dans la lignée de cellules β de rat RiNm5F et les îlots pancréatiques humains, les ligands 15d-PGJ₂ (15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2), TGZ (Troglitazone), MCC-555 et CGZ (Ciglitazone) induisent l'expression des gènes associés à la réponse UPR : HSP70, BiP, CHOP et ATF4. Un traitement à la 15d-PGJ₂ des îlots pancréatiques chez le rat, induit une inhibition de la synthèse protéique due à l'état phosphorylé de eIF2 α (Weber *et al.*, 2004a). La 15d-PGJ₂ induit l'activation prolongée de la réponse UPR et de la caspase 3, conduisant à l'apoptose des cellules RiNm5F (Chambers *et al.*, 2007). Par ailleurs, suite à un stress du RE, la 15d-PGJ₂ induit des dilatations des citernes du RE dans les cellules cancéreuses de côlon HCT-116 et augmente l'expression des marqueurs CHOP et BiP ainsi que l'ubiquitination de protéines (Kar *et al.*, 2009). Dans les cellules hépatiques HepG2, la TGZ induit l'apoptose en augmentant la transition de perméabilité mitochondriale et l'expression des protéines apoptotiques Bad et Bax et des chaperonnes BiP et PDI, la diminution de l'expression de la protéine antiapoptotique Bcl-2 ainsi que l'activation des voies MAPK, JNK et p38 (Maniratanachote *et al.*, 2005). Dans les cellules épithéliales de foie de rat GN4, la CGZ et la TGZ sont capables d'induire la phosphorylation de p38 suite à l'augmentation du Ca^{2+} et la phosphorylation du facteur eIF2 α par la PKR (Protein kinase activated by dsRNA). L'utilisation de l'antagoniste de PPAR γ , GW9662 et les analogues inactifs Δ^2 -CGZ et Δ^2 -TGZ a montré que la phosphorylation de p38 par les TZDs se fait via un mécanisme PPAR γ -indépendant (Gardner *et al.*, 2005). Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7 et MDA-MB-231, il a aussi été montré que TZD18, ligand de PPAR α/γ , induit l'activation de la

Augmentation de la prolifération	+	+	+	+
Résistance à l'apoptose	+			
Angiogenèse	+	+	+	
Métastases	+			
Chimiorésistance	+	+	+	
	BiP	IRE1/XBP1	PERK/eIF2 α /ATF4	PDI

Tableau 7 : Médiateurs de la réponse UPR impliqués dans divers aspects de la progression tumorale (adapté de Healy et al., 2009).

réponse UPR, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. TZD18 induit une augmentation de l'expression des marqueurs spécifiques du stress du RE (CHOP, GRP78, ATF4, BiP, ATF6) ainsi que la phosphorylation de PERK/eIF2 α . TZD18 induit aussi l'augmentation des marqueurs de la mort cellulaire induite par le stress du RE, CHOP, GADD34, Bax et Bak. Ce ligand est aussi capable d'activer les voies MAPK, p38, ERK et JNK conduisant à une inhibition de la prolifération (Zang et *al.*, 2009).

Par ailleurs, des effets protecteurs de la RGZ et la PGZ (Pioglitazone) ont été montrés. La RGZ protège les cellules β -pancréatiques de rat de la mort cellulaire induite par la cyclosporine en partie grâce à son rôle dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. La cyclosporine est un immunosuppresseur puissant qui empêche le rejet de greffes mais qui cause un diabète sucré post-transplantation (PTDM, post-transplant diabetes mellitus). La RGZ inhibe l'augmentation des marqueurs du stress du RE (CHOP et XBP1) dans les cellules β traitées à la cyclosporine et pourrait donc constituer un traitement préventif des PTDM (Kim et *al.*, 2009). Une autre étude a montré que la PGZ réduit aussi le stress du RE dans le foie de rats rendus diabétiques grâce à ses effets pharmacologiques, en réduisant la résistance à l'insuline (Yoshiuchi et *al.*, 2009). La RGZ et la PGZ sont donc capables de moduler la réponse au stress du RE permettant l'adaptation et la survie des cellules β -pancréatiques.

IV. Le stress du réticulum : une cible thérapeutique

L'une des caractéristiques du microenvironnement tumoral est l'apport insuffisant en oxygène et en nutriments comme le glucose. Ces dernières années, les voies de la réponse UPR ont été décrites pour jouer des rôles importants dans la tumorigénèse. En effet, les fonctions du RE sont altérées à différents niveaux dans de nombreux types de cancer du fait notamment de la carence en oxygène et/ou nutritive à laquelle les cellules tumorales sont exposées. Dans ces conditions, l'activation des voies de stress du RE confère un avantage sélectif crucial aux cellules tumorales. Différents médiateurs de l'UPR sont impliqués dans différents aspects de la survie et de la progression tumorale (**tableau 7**). La réponse UPR est activée dans la majorité des cancers et confère une résistance à la chimiothérapie. L'activation d'au moins une branche de l'UPR a été décrite dans de nombreux cancers. En effet, l'augmentation d'expression des composants de l'UPR, dont XBP1, ATF6, CHOP, ainsi que les chaperonnes BIP et GRP94 s'expriment dans les cancers du sein, les carcinomes hépatocellulaires, les tumeurs gastriques et les adénocarcinomes œsophagiques (Wang et *al.*, 2010). Pour exemple,

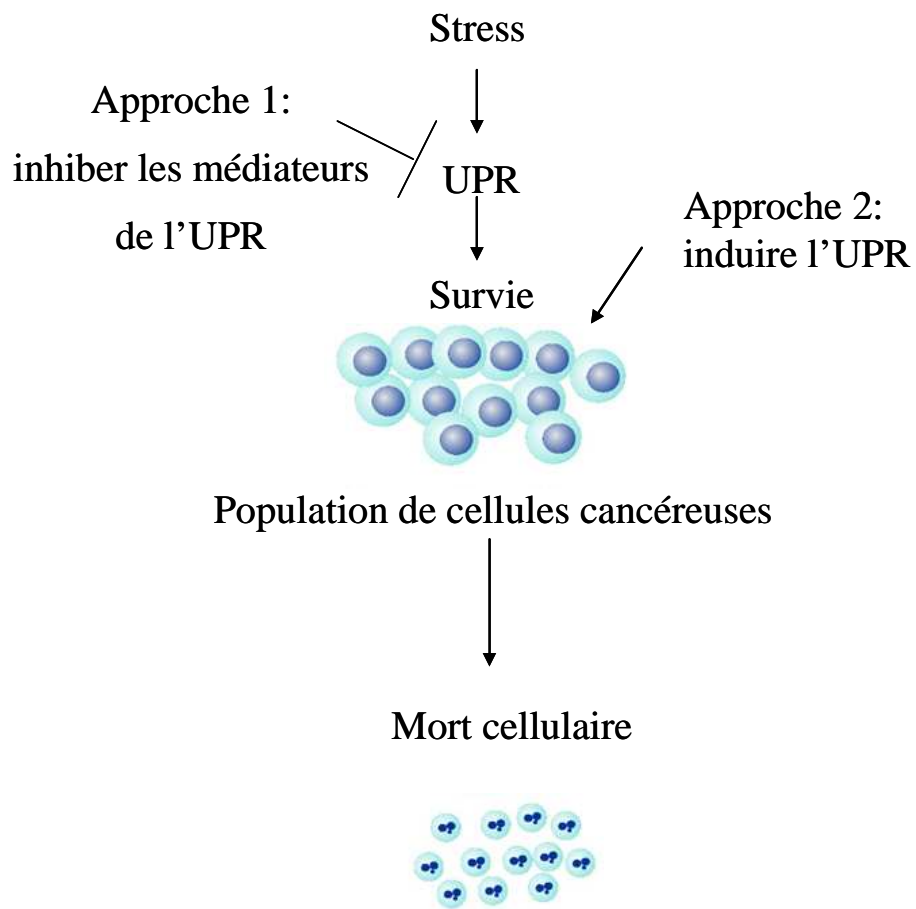


Figure 38 : Représentation schématique des deux approches de la stratégie anticancéreuse ciblant la réponse UPR (adapté de Healy et al., 2009).

l'activation de PERK semble apporter un avantage prolifératif aux cellules tumorales en permettant leur adaptation à des stress ischémiques, comme l'hypoxie, en induisant notamment une réponse angiogénique via l'induction d'un facteur pro-angiogénique la protéine VCIP (Vascular Endothelial Growth Factor and type I collagen Inducible Protein) (Bi et *al.*, 2005). Inversement, les tumeurs dont la voie PERK-eIF2 α -ATF4 est inactive, sont de petite taille et incapables de transcrire les ARNm impliqués dans l'angiogénèse et la survie tumorale. D'autre part, il a été mis en évidence que l'inactivation de la voie IRE1-XBP1 par expression d'un dominant négatif IRE1 ou par perte d'expression de la protéine XBP1 augmente la sensibilité des cellules transformées à des stress hypoxiques et entraîne une diminution importante de la croissance tumorale (Aridor, 2007). Le rôle de l'UPR dans les différentes formes de cancer n'est pas bien caractérisé. Une récente étude suggère que l'UPR est inhibée dans les modèles de cancer de prostate chez la souris (So et *al.*, 2009). Ceci montre que le rôle du stress du RE dans le cancer est bien plus complexe (Healy et *al.*, 2009). Il est donc nécessaire de comprendre la réponse UPR dans les différents types cellulaires avant de la cibler par stratégies anticancéreuses. Ces stratégies ciblant la réponse UPR tentent de détourner les cellules de la voie de survie vers la voie de mort cellulaire. La 1^{ère} approche permettrait de cibler les tumeurs qui ont activé la réponse UPR à des fins de survie en inhibant les médiateurs du stress du RE. Les cellules vont probablement mourir puisqu'elles ne supporteraient plus le stress environnant. La 2^{ème} approche permettrait d'induire artificiellement la réponse UPR dans les cellules tumorales. Ceci induirait un stress conduisant à la mort cellulaire. Cependant, l'idéal serait de combiner les deux approches permettant théoriquement de diminuer la voie de survie et d'augmenter la voie de mort cellulaire (Healy et *al.*, 2009) (**figure 38**). Les kinases PERK et IRE1 ainsi que les médiateurs de la réponse UPR à activité enzymatique (chaperonnes du RE à activité ATPase : GRP78, HSP90, GRP94 ; PDI) peuvent constituer des cibles thérapeutiques. Plusieurs molécules en développement affectent une ou plusieurs branches de la réponse UPR dont certaines activent le stress du RE et d'autres inhibent la réponse au stress (Healy et *al.*, 2009).

Par ailleurs, le salubrinal a été découvert en 2005 par l'équipe de Boyce, par un screening de petites molécules qui protègent les cellules contre le stress. Cette équipe a montré que le salubrinal a un effet cytoprotecteur, non seulement contre les inducteurs du stress du RE mais aussi contre les infections par l'Herpes simplex virus 1 qui code une phosphatase spécifique d'eIF2 α . Celle-ci déphosphoryle eIF2 α afin de réduire la réponse de l'hôte à l'infection virale. Le salubrinal est un inhibiteur du complexe PP1-GADD34. Il maintient eIF2 α

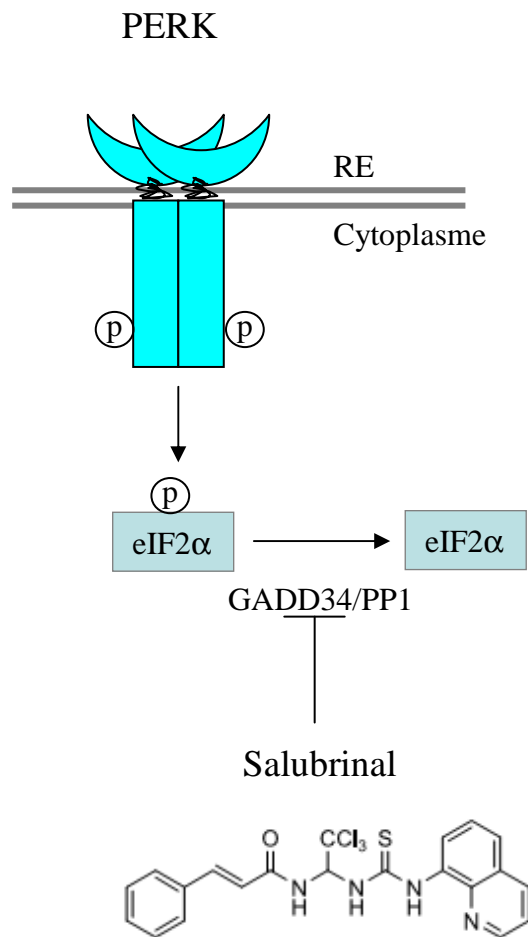


Figure 39 : Structure chimique et rôle du salubrinal dans la signalisation PERK/eIF2 α . Le salubrinal est un inhibiteur du complexe PP1-GADD34 permettant de maintenir le facteur eIF2 α phosphorylé.

phosphorylé, pérennisant ainsi la voie de blocage de la traduction (**figure 39**). Le mécanisme d'inhibition n'est pas clair : le salubrinal pourrait se fixer directement à ce complexe ou agir de manière indirecte en impliquant une voie de signalisation (Boyce et *al.*, 2005). Le salubrinal est capable de protéger la protéine antiapoptotique Bcl-2 des effets proapoptotiques de HA14-1 (inhibiteur de Bcl-2) et du porphycene (CPO), après irradiation des cellules leucémiques murines L1210. Ces effets ne semblent pas impliquer la phosphorylation d'eIF2 α par le salubrinal mais peuvent s'expliquer par un changement conformationnel de la protéine Bcl-2 ou par une association avec le salubrinal, ce qui réduirait la fixation de HA14-1 et du CPO (Kessel, 2006). A des concentrations allant de 10 à 75 μ M, le salubrinal est capable de protéger la lignée cellulaire PC-12 contre l'apoptose induite par les inducteurs du stress du RE tels que la tunicamycine, la thapsigargine, la brefeldine A et l'acide cyclopiazonique (Boyce et *al.*, 2005; Cnop et *al.*, 2007). Ce résultat a été confirmé par de nombreuses publications. Le salubrinal empêche l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de croissance induits par le resveratrol dans la lignée de cellules leucémiques K562 (Liu et *al.*, 2010). Le salubrinal peut inhiber la croissance tumorale des cancers de la tête et du cou (Hep3), de colon (SW620) et de nombreux myélomes (RPMI8226 et U266B1) (Ranganathan et *al.*, 2008; Schewe et Guirre-Ghiso, 2009). Le salubrinal bloque la cytotoxicité induite par le paraquat (herbicide) dans les cellules de neuroblastome SY5Y ; il inhibe l'augmentation du taux des protéines GRP78, EDEM et CHOP, l'activité de calpaïne, l'activation de la cascade IRE1/ASK1/JNK et de la caspase 3 ainsi que l'inhibition de la fragmentation de l'ADN (Yang et *al.*, 2009a). D'autres équipes ont montré des éléments contradictoires où le salubrinal n'est pas considéré comme une molécule protectrice. Dans les cellules β pancréatiques, le maintien de eIF2 α phosphorylé par le salubrinal est proapoptotique et potentialise les effets délétères des acides gras libres (FFA) oléate et palmitate (Cnop et *al.*, 2007). Le salubrinal ne protège donc pas les cellules β pancréatiques contre le stress du RE et ceci doit être pris en considération lors des approches pharmacologiques qui tendent à moduler la réponse UPR des cellules β dans le diabète de type 2. Le salubrinal augmente la mort cellulaire par apoptose en synergie avec différents inhibiteurs du protéasome dans différentes lignées de cellules leucémiques (K562, HL60, Jurkat) où il n'a aucun effet sur le statut d'eIF2 α . Ces observations montrent que le salubrinal médie ses effets indépendamment de l'inducteur du stress mais semble dus aux différences intrinsèques des mécanismes de signalisation du stress du RE entre les cellules leucémiques et les cellules PC-12 (Drexler, 2009).

OBJECTIFS DE THESE

Objectifs de thèse

L'absence de thérapie ciblée pour certaines formes de cancer du sein et l'existence de résistances, limitent la thérapie et justifient de développer de nouveaux agents thérapeutiques. Dans cette optique, notre laboratoire s'intéresse depuis quelques années aux ligands du récepteur nucléaire PPAR γ (15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 et thiazolidinediones) qui ont des potentialités anticancéreuses *in vitro* et *in vivo*. L'implication de PPAR γ dans ces effets anticancéreux n'est pas claire puisque de nombreux effets PPAR γ -indépendants ont été démontrés pour ces molécules. Par exemple, le laboratoire a mis en évidence la dégradation protéasome-dépendante de l'ER α et de la cycline D1 et ce indépendamment de PPAR γ . Nous pensons qu'une meilleure connaissance des effets PPAR γ -indépendants qui sont impliqués dans les effets anticancéreux pourrait être utile au développement d'analogues structuraux de thiazolidinediones qui seraient par ailleurs moins hépatotoxiques. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse qui s'est intéressé aux voies de signalisation activées précocement par les ligands de PPAR γ .

Dans un premier temps, nous avons étudié une voie PPAR γ -indépendante impliquant le facteur de transcription précoce EGR1 dans les lignées de cellules cancéreuses mammaires MCF7 et MDA-MB-231. Nous avons déterminé son importance dans l'action antiproliférative des thiazolidinediones. Les résultats obtenus sont présentés dans un article publié dans *Biochemical Pharmacology* en 2011. Cet article est précédé d'une introduction brève situant les principales données disponibles au moment des travaux, ainsi qu'un résumé des principaux résultats obtenus. Des données complémentaires sont aussi présentées.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique (RE) dans les lignées de cellules cancéreuses mammaires MCF7 et MDA-MB-231, par la Δ^2 -troglitazone, dérivé à action PPAR γ -indépendante. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article non encore soumis et de résultats complémentaires préliminaires.

Enfin, nous avons étudié l'hypothèse d'un lien entre l'expression d'EGR1 et l'induction des voies du stress du RE. Ces résultats ne sont pas présentés sous forme d'article.

RESULTATS

I. Etude du facteur de transcription EGR1 dans l'effet antiprolifératif des ligands de PPAR γ

EGR1 expression: A calcium and ERK1/2 mediated PPAR γ -independent event involved in the antiproliferative effect of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 and thiazolidinediones in breast cancer cells.

Sarra Chbicheb; Xiao Yao; Jean-Luc Rodeau; Stéphane Salamone; Michel Boisbrun; Gerald Thiel; Daniel Spohn; Isabelle Grillier-Vuissoz; Yves Chapleur; Stephane Flament; Sabine Mazerbourg. *Biochemical Pharmacology* 81 (2011) 1087-1097.

1. Introduction

Les ligands de PPAR γ , principalement les thiazolidinediones (TZDs), exercent un effet antiprolifératif sur les cellules cancéreuses mammaires. Certaines études indiquent que les TZDs induisent leur différenciation *in vitro*. D'autres travaux rapportent que l'inhibition de la prolifération est associée à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et à l'apoptose. Pour leurs propriétés antitumorales, les agonistes de PPAR γ ont fait l'objet d'essais cliniques sur des patientes atteintes de cancers mammaires. Un nombre croissant d'études démontrent que les effets anticancéreux des TZDs peuvent être indépendants de l'activation de PPAR γ (Blanquicett et *al.*, 2008).

Dans les cellules de cancer de côlon HCT-116, la TGZ induit de façon PPAR γ -indépendante l'expression du facteur de transcription précoce EGR1 après 3 heures de traitement (Beak et *al.*, 2003). EGR1 possède dans certains contextes un rôle antiprolifératif et/ou proapoptotique. Il est exprimé dans le tissu mammaire sain mais peu voire pas dans le tissu tumoral, ni les lignées de cellules cancéreuses mammaires.

Afin de mieux comprendre le mode d'action des TZD dans les cellules cancéreuses mammaires, notre but est de déterminer si les TZDs peuvent aussi induire dans ces cellules l'expression du facteur de transcription EGR1, de préciser l'implication de PPAR γ dans cet effet, d'identifier la(les) voie(s) de signalisation impliquée(s) et enfin de déterminer le rôle joué par EGR1 dans l'effet antiprolifératif des ligands de PPAR γ . Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé principalement la lignée MCF7, modèle pour les tumeurs mammaires lumineales. Quelques expériences ont aussi été réalisées sur les cellules MDA-MB-231, modèle pour les tumeurs triples-négatives.

2. Résultats

Nos analyses par RT-PCR semi-quantitative ont montré que la TGZ à 25 μM induit une expression transitoire de l'ARNm EGR1 qui débute après 30 minutes de traitement, atteint un maximum après 3 heures et ensuite diminue. Cette augmentation du taux d'ARNm EGR1 s'accompagne d'une augmentation du taux de la protéine EGR1 (montrée par immunoprecipitation et immunocytochimie). La TGZ induit EGR1 de manière dose-dépendante avec une meilleure réponse à 25 μM qu'à 5 μM . Nous avons également analysé l'effet de la TGZ sur l'expression de NAB2, gène cible d'EGR1, afin d'apprécier la fonctionnalité de la protéine EGR1. La TGZ à 25 μM induit une augmentation du taux d'ARNm NAB2 qui apparaît après 6 heures de traitement, atteint un maximum à 9 heures et ensuite diminue.

D'autres ligands de PPAR γ ont été testés, 2 molécules synthétiques de la famille des TZDs (CGZ et RGZ) et un ligand naturel (15d-PGJ₂). La CGZ et la 15d-PGJ₂ à 25 μM sont aussi capables d'induire une expression transitoire de l'ARNm EGR1 avec un pic d'expression après 3 heures de traitement, suivie d'une augmentation du taux d'ARNm NAB2. La CGZ et la 15d-PGJ₂ induisent également une augmentation de la protéine EGR1 contrairement à la RGZ bien que ce composé soit le plus puissant agoniste des ligands de PPAR γ . Ceci suggère que l'induction de l'expression d'EGR1 nécessite un mécanisme PPAR γ -indépendant.

Nous avons confirmé que cet effet est bien indépendant de l'activation de PPAR γ grâce à 1) un antagoniste irréversible de PPAR γ , le GW9662, 2) des ARN interférants ciblant PPAR γ et 3) au dérivé Δ 2-TGZ, synthétisé par des chimistes de l'UHP, qui n'active pas PPAR γ mais stimule toujours l'expression d'EGR1. L'augmentation du taux d'EGR1 observée en présence de 25 μM de TGZ, CGZ et 15d-PGJ₂ est maintenue en présence de 5 ou 25 μM de GW9662. Des cellules MCF7 transfectées par un siRNA ciblant PPAR γ voient le taux d'ARNm PPAR γ diminuer de plus de 80%. Lorsque ces cellules sont traitées pendant 3 heures à la TGZ, nous observons toujours l'augmentation du taux d'ARNm EGR1. La Δ 2-TGZ à 25 μM induit une expression transitoire de l'ARNm EGR1 qui apparaît après 30 minutes de traitement, atteint un maximum après 3 heures et ensuite diminue. Cette augmentation du taux d'ARNm EGR1 s'accompagne d'une augmentation du taux de la protéine EGR1 ainsi que de l'augmentation du taux d'ARNm NAB2 qui apparaît après 6 heures de traitement, atteint un maximum à 9 heures et ensuite diminue.

Divers agents pharmacologiques ont ensuite été utilisés afin d'identifier les voies de signalisation impliquées dans l'induction d'EGR1. Celle-ci est liée à l'activation des MAPK ERK1/2. En effet, la présence de l'inhibiteur des MAPK U0126 (5 μ M) est capable d'inhiber l'induction de l'expression d'EGR1 habituellement observée en réponse à la TGZ, la CGZ ou la 15d-PGJ₂ (25 μ M). U0126 inhibe aussi l'augmentation de la protéine EGR1 induite par la TGZ. En cas de traitement à la Δ 2-TGZ, l'induction de l'ARNm EGR1 est inhibée partiellement en présence de 5 μ M de U0126 et totalement en présence de 25 μ M. De plus, la TGZ, la CGZ et la 15d-PGJ₂ à 25 μ M induisent la phosphorylation des ERK1/2 dès 5 minutes de traitement. L'intensité du signal augmente entre 15 et 45 minutes après traitement et ensuite diminue. En cas d'exposition à la Δ 2-TGZ, la phosphorylation ERK1/2 est détectée après 15 minutes et augmente jusqu'à 75 minutes. Par contre, la RGZ n'induit pas de phosphorylation des ERK1/2.

Afin de déterminer le rôle des autres MAPK dans la régulation de l'expression d'EGR1, les cellules ont été traitées à la Δ 2-TGZ en présence de 10 μ M d'inhibiteurs spécifiques de p38 (SB203580) et JNK (SP600125). Contrairement à U0126 qui abolit complètement l'expression d'EGR1, ni SB20358 ni SP600125 n'affectent la réponse à la Δ 2-TGZ.

Afin de tester l'implication du récepteur à l'EGF dans l'activation PPAR γ -indépendante d'EGR1 dans les cellules MCF7, deux inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR ont été utilisés, PD153035 et AG1478. A 5 μ M, ces composés sont capables d'inhiber la phosphorylation des ERK1/2 dans des cellules MCF7 exposées à 15 nM d'EGF pendant 5 minutes. Nous avons aussi observé qu'après 1 heure de traitement à l'EGF, le taux d'ARNm EGR1 augmente et que cet effet est inhibé en présence des inhibiteurs de l'EGFR. Cependant, utilisés dans les mêmes conditions, PD153035 et AG1478 n'inhibent pas l'augmentation du taux d'ARNm EGR1 ni la phosphorylation des ERK1/2 lors d'un traitement par la Δ 2-TGZ. Ce résultat a été confirmé par l'utilisation d'ARN interférants ciblant EGFR.

Il était important de confirmer ces résultats sur un autre modèle de cellules cancéreuses mammaires. Nous avons observé que la Δ 2-TGZ induit aussi l'expression d'EGR1 dans la lignée de cellules hormono-indépendantes MDA-MB-231. Cette induction est aussi liée à l'activation des MAPK ERK1/2, sans impliquer l'EGFR.

Nous avons ensuite montré que l'induction d'EGR1 par les différents ligands de PPAR γ est inhibée en présence d'un chélateur du calcium (BAPTA-AM). En effet, des

cellules MCF7 prétraitées pendant 30 minutes avec le BAPTA-AM ne montrent plus l'augmentation de l'ARNm EGR1 habituellement observée en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ, la TGZ, la CGZ et la 15d-PGJ₂. Dans ces conditions, la voie ERK1/2 n'est plus activée. Comme ces résultats suggéraient un lien entre calcium et expression d'EGR1, nous avons étudié l'effet de l'ionophore calcique A23187. A 1 μ M, celui-ci induit également l'activation des ERK1/2 (2 minutes) et l'augmentation du taux d'ARNm EGR1 (15 minutes). En présence de U0126, A23187 n'induit plus la phosphorylation des ERK1/2 et l'induction d'EGR1. Toutes ces données suggéraient une augmentation de calcium que nous avons mise en évidence par imagerie grâce à la sonde calcique Fura2. En effet, une fois chargées en Fura2-AM, après 2 minutes d'exposition à 25 μ M de TGZ les cellules MCF7 montrent une augmentation de fluorescence indiquant une augmentation du calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$. Ce signal disparaît dès le passage à un milieu sans TGZ. Après un retour au niveau de base, une nouvelle exposition à la TGZ peut à nouveau induire une augmentation du taux de $[Ca^{2+}]_i$. Cette augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ est un événement PPAR γ -indépendant puisqu'elle est aussi observée après un traitement à 25 μ M de $\Delta 2$ -TGZ. L'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ n'est pas observée en présence du chélateur BAPTA-AM mais elle est toujours présente quand la $\Delta 2$ -TGZ est appliquée dans un milieu sans Ca^{2+} . Ceci suggère une libération de Ca^{2+} à partir des réserves calciques intracellulaires plutôt qu'un influx de Ca^{2+} extracellulaire.

Afin de tester l'importance d'EGR1 dans l'effet antiprolifératif, nous avons réalisé un silencing d'EGR1 par interférence ARN dans les cellules MCF7. Dans cette situation, après 24 heures de traitement à de la $\Delta 2$ -TGZ (15 μ M), on note une inhibition de la prolifération d'environ 15% moins importante par comparaison aux cellules transfectées avec un siRNA témoin (61%/47% par rapport au DMSO).

3. Conclusions

Au cours de cette étude menée principalement sur les cellules cancéreuses mammaires MCF7, nous avons démontré une induction d'EGR1 par certains ligands de PPAR γ (TGZ, CGZ et 15d-PGJ₂). Cet effet est clairement PPAR γ -indépendant. L'induction d'EGR1 est liée à une libération de calcium intracellulaire et à l'activation des ERK1/2. Cet événement joue un rôle partiel dans l'effet antiprolifératif de ces dérivés de TZDs.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

EGR1 expression: A calcium and ERK1/2 mediated PPAR γ -independent event involved in the antiproliferative effect of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J₂ and thiazolidinediones in breast cancer cells[☆]

Sarra Chbicheb^a, Xiao Yao^a, Jean-Luc Rodeau^b, Stéphane Salamone^{c,1}, Michel Boisbrun^c, Gerald Thiel^d, Daniel Spohn^d, Isabelle Grillier-Vuissoz^a, Yves Chapleur^c, Stéphane Flament^a, Sabine Mazerbourg^{a,*}

^a EA 4421 Signalisation, Génomique et Recherche Translationnelle en Oncologie (SIGRETO) Nancy-Université, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

^b Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI) CNRS UPR-3212 67084 Strasbourg, France

^c Groupe S.U.C.R.E.S., UMR 7565 CNRS, Nancy-Université, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

^d Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of Saarland Medical Center, D-66421 Homburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2010

Accepted 11 February 2011

Available online 18 February 2011

Keywords:

Thiazolidinedione

Troglitazone

EGR1

Calcium signaling

Breast cancer

ABSTRACT

Our aim was to get new information about the Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (PPAR γ)-independent pathway involved in the antiproliferative action of PPAR γ ligands in breast cancer cells. We investigated the effects of Troglitazone (TGZ), Ciglitazone (CGZ), Rosiglitazone (RGZ) and, 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) on the hormone-dependent breast cancer cell line MCF7. The early transcription factor *EGR1* (Early Growth Response gene 1) mRNA and protein levels peaked after 3 h of incubation with 25 μ M TGZ, CGZ or 15d-PGJ₂ and then gradually decreased. RGZ, the most potent activator of PPAR γ , did not show this effect. The PPAR γ antagonist GW 9662 did not block *EGR1* mRNA induction which also still occurred in case of PPAR γ silencing as well as in case of treatment with the PPAR γ -inactive compound Δ 2-TGZ. *EGR1* mRNA induction required ERK1/2 phosphorylation which was not blocked by EGF Receptor (EGFR) inhibition. The ERK1/2 pathway was also involved in Δ 2-TGZ-induced *EGR1* mRNA expression in the hormone-independent breast cancer cell line MDA-MB-231. Using the fluorescent dye Fura2, we showed in MCF7 that TGZ or Δ 2-TGZ induced an immediate increase in cytosolic calcium which was required for ERK1/2 phosphorylation and *EGR1* mRNA induction as demonstrated by calcium chelation experiments. Furthermore, in MCF7 transfected with siRNA targeting *EGR1*, Δ 2-TGZ inhibited less efficiently cell proliferation.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are a family of ligand-activated transcription factors belonging to the nuclear receptor superfamily [1]. Three PPAR subtypes encoded by

separate genes have been identified: α , β/δ and γ . Ligands of PPAR γ include 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), oxidative metabolites of polyunsaturated fatty acids and synthetic compounds like thiazolidinediones (troglitazone TGZ, ciglitazone CGZ, rosiglitazone RGZ, etc.), a class of drugs used in the treatment

[☆] This work was supported by grants of the “Université Henri Poincaré (BQR)”, of the “Conseil Régional de Lorraine”, of the “Association pour la Recherche sur le Cancer”, of the “Ligue Contre le Cancer”, of the “CPER” and of “FEDER”. Sarra Chbicheb was recipient of a grant of the “Ministère de l’enseignement supérieur et de la recherche”. Xiao Yao was recipient of a post-doctoral fellowship of the “Université Henri Poincaré and Conseil Régional de Lorraine”.

Abbreviations: PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; EGR1, Early Growth Response gene 1; 15d-PGJ₂, 15-deoxy-(12,14-prostaglandin J₂); TGZ, Troglitazone; CGZ, Ciglitazone; RGZ, Rosiglitazone; EGFR, EGF Receptor; NAB, NGF1-A-binding protein; FCS, fetal calf serum; DMSO, dimethylsulfoxide; DMEM, Dulbecco’s modified Eagle’s medium; dNTP, deoxynucleotide triphosphate; DTT, dithiothreitol; Ig, Immunoglobulin; MAPK, mitogen activated protein kinase; RPLPO, acidic ribosomal phosphoprotein PO.

* Corresponding author at: EA 4421 Signalisation, Génomique et Recherche Translationnelle en Oncologie (SIGRETO), Université Henri Poincaré, Nancy-Université, Faculté des Sciences, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France. Tel.: +33 3 83 68 42 57; fax: +33 3 83 68 40 01.

E-mail addresses: sarra.chbicheb@sbiol.uhp-nancy.fr (S. Chbicheb), dawnyao@yahoo.com (X. Yao), jl@inci-cnrs.unistra.fr (J.-L. Rodeau), stephane.salamone@pasteur.fr (S. Salamone), Michel.Boisbrun@pharma.uhp-nancy.fr (M. Boisbrun), gerald.thiel@uniklinik-saarland.de (G. Thiel), daniel.spohn@uniklinik-saarland.de (D. Spohn), isabelle.grillier-vuissoz@sbiol.uhp-nancy.fr (I. Grillier-Vuissoz), yves.chapleur@sucre.uhp-nancy.fr (Y. Chapleur), stephane.flament@sbiol.uhp-nancy.fr (S. Flament), sabine.mazerbourg@sbiol.uhp-nancy.fr (S. Mazerbourg).

¹ Present address: Unité de Chimie des Biomolécules (URA CNRS 2128), Institut Pasteur, 75724 Paris, France.

of type II diabetes [2]. Various PPAR γ agonists have anti-cancer activities [3,4]. For instance, TGZ and 15d-PGJ₂ inhibit tumor growth of human prostate, colorectal or breast cancer cells in immunodeficient mice [4]. Anticancer effects of such compounds have also been observed *in vitro*. For example, in breast cancer cell lines, they inhibit proliferation, induce differentiation or trigger apoptosis [5,6]. Recently, a nonapoptotic and nonautophagic cytoplasmic vacuolation death was observed in response to 15d-PGJ₂ whereas autophagy was described in response to thiazolidinediones in the same breast cancer cell line MDA-MB-231 [7,8].

Several data suggest that the anticancer effects of PPAR γ ligands could be the result of PPAR γ -independent events [9]. This was deduced from studies using PPAR γ antagonists, transfection of dominant negative PPAR γ isoforms, PPAR γ -targeted RNA interference as well as thiazolidinedione derivatives like Δ 2-TGZ that could not activate PPAR γ . The proteasomal degradation of estrogen receptor alpha and cyclin D1 is an example of such a PPAR γ -independent effect triggered by several PPAR γ ligands which has been well described in breast cancer cells [10–12]. However, in these cells, few data are available on the identity of mediators involved in the PPAR γ -independent pathway activated by thiazolidinediones. Interestingly, in human colon cancer cells, Early Growth Response gene 1 (EGR1) was identified as an early transcription factor induced after a 3-h treatment with TGZ in a PPAR γ -independent manner [13].

EGR is a family of zinc-finger transcription factors (EGR1–4) with an aminoterminal activation domain, a central domain that interacts with the co-repressors NGFI-A-binding proteins 1 and 2 (NAB1 and NAB2) (except for EGR4), and a DNA binding domain consisting of three Cys2-His2 zinc fingers near the carboxy-terminal end of the protein sequence. They are described as early response genes because they are rapidly and transiently induced [14]. EGR proteins bind the consensus nucleotide sequence GCGGGGGCG to regulate expression of target genes [15]. EGR1, (also known as NGF-1A, KROX24, ZIF268, and TIS8) is a nuclear phosphoprotein that has been reported to be rapidly induced by serum, growth factors, ultraviolet light, ionizing radiations, mechanical injury, and stress. Thus, EGR1 is involved in a variety of cell processes including growth, differentiation, angiogenesis, wound healing and apoptosis. In prostate cancer cells and few other models, EGR1 is described as a protumoral factor contributing to regulation of genes which are critical for cell cycle progression and counteracting apoptosis [16]. In contrast, EGR1 expression is absent or very weak not only in several human breast cancer cell lines compared to immortalized normal human mammary cell lines (MCF10A and 184A1N4), but also in breast cancer tissues compared to normal breast tissue [17,18]. Moreover, induced-overexpression of EGR1 negatively regulates the growth of the breast cancer cell line ZR75 [19]. These findings suggest that in breast cancer cells and tissues, reduced expression of EGR1 could enhance tumorigenesis while EGR1 overexpression could be linked to growth inhibition.

In an effort to better understand the intracellular mode of action of thiazolidinediones, the aim of our study was (1) to determine if the potential growth inhibitor EGR1 could be an element of their signaling in breast cancer cells, (2) to evaluate the role of the nuclear receptors PPAR γ in this process and (3) to characterize the cellular and molecular events leading to this response. Our studies performed in the hormone-dependent cell line MCF7 show that TGZ, CGZ and 15d-PGJ₂ induce the early expression of EGR1 in a PPAR γ -independent manner. In contrast, RGZ, the most potent PPAR γ agonist, did not stimulate EGR1 expression. EGR1 induction was associated with ERK activation but the transactivation of EGFR was not involved. Similar results were observed in the hormone-independent breast cancer cell line MDA-MB-231. Furthermore, an early increase in cytosolic calcium

appeared to be a key actor in the signaling pathway leading to EGR1 expression. Finally, siRNA experiments demonstrated that EGR1 was as a mediator of the inhibition of proliferation triggered by Δ 2-TGZ in MCF7 cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and reagents

MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Both cell lines were grown at 37 °C under 5% CO₂ in phenol red Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for MCF-7 and in L-15 medium (Invitrogen) for MDA-MB-231. These media were supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Sigma–Aldrich, Lyon, France) and 2 mM L-glutamine (Invitrogen).

TGZ, AG1478, A23187 ionophore (Sigma–Aldrich), CGZ, RGZ, GW9662, U0126, PD153035, SP600125, SB203580, BAPTA-AM (Calbiochem Merck, Darmstadt, Germany), 15d-PGJ₂ (Interchim, Montluçon, France) were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma–Aldrich). Recombinant human Epidermal Growth Factor (EGF) (Invitrogen) was resuspended in PBS. The synthesis of Δ 2-TGZ was achieved according to slight modifications of known procedures [17,20]. Experimental details will be published elsewhere. The identity and purity of this synthetic derivative were verified by proton nuclear magnetic resonance and elemental analysis. This compound was also dissolved in DMSO.

2.2. Cell treatment

After seeding and 24 h of incubation to allow for cell attachment, cells were washed with PBS and the medium was replaced with phenol red-free DMEM (MCF7) or L-15 medium (MDA-MB-231) supplemented with 1% FCS and 2 mM L-glutamine. After 24 h, cells were washed with PBS and treated with either DMSO, 15d-PGJ₂, thiazolidinediones, EGF, or the calcium ionophore A23187 at the indicated concentrations and times in phenol red-free, FCS-free DMEM for MCF7 or 1% FCS L-15 medium for MDA-MB-231 supplemented with 2 mM L-glutamine. To test the involvement of the MAPK and calcium pathways or the PPAR γ and EGF receptors, cells were treated with different inhibitors for 30 min prior to PPAR γ ligands exposure. Cells were then collected for RNA or protein extraction.

2.3. Semi-quantitative RT-PCR

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 5×10^5 cells/well (MCF7 cells) or 4×10^5 cells/well (MDA-MB-231 cells) in 2 mL of medium with 10% FCS and 2 mM L-glutamine. Cells were treated as previously described. Total RNA was extracted using TRIZOL reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized in 25 μ L volume containing 1 μ g RNA, 12 ng random hexamer primer, 1 \times Invitrogen Buffer, 4 mM DTT, 0.1 mM of each dNTP, 4 U RNase inhibitor and 75 U of MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). The mixture was incubated for 10 min at 25 °C, for 110 min at 37 °C and subsequently for 10 min at 70 °C in order to stop the reaction.

The cDNA were further amplified by PCR. The specific primer sequences are as follows: EGR1 (NM_001964) forward 5'-GGCCACCTCCTCTCTCTCT-3', reverse 5'-TGTTGGCCAATAGACCTTCC-3'; PPAR γ (NM_138712) forward 5'-GACCACTCCACTCCTTT-3', reverse 5'-CGACATCAATTGCCATGAG-3'; EGFR (NM_005228) forward 5'-AAGCTCACGCAGTTGGGCAC-3', reverse 5'-GGTCTGGAAGTCCATC-GAC-3'; NAB2 (NM_005967) forward 5'-GACCTGCAGCCAGACTC-3', reverse 5'-CTTCGATAGTGGTACGGACC-3'; RPLPO (NM_053275)

Table 1

siRNA sequences for PPAR γ , EGF receptors, and EGR1. Sense and antisense oligonucleotides for each receptor gene were designed by Eurogentec (Angers, France). The sense (S) and antisense (AS) sequences for the siRNA duplexes are shown in the right column. TT did not belong to the target sequences and were added as 3' DNA over-hang. Control siRNA encodes random sequences with no homology to any known human genes.

Gene	Accession number		Target sequence (5'-3')	siRNA sequence (5'-3')
PPAR γ	NM_138712	Duplex 1	GTACCAAAGTCAATCAAA	S:GUACCAAAGUGCAAUCAAAATT AS:UUUGAUUGCACUUUGGUACTT
		Duplex 2	CAATCAGATTGAAGCTTAT	S:CAAUCAGAUUGAAGCUUAUUTT AS:AUAAGCUUCAAUUCUGAUUGTT
EGFR	NM_201283	Duplex 1	GCAGTGACTTTCTCAGCAA	S:GCAGUGACUUUCACGAAATT AS:UUGCUGAGAAAGUCACUGCTT
		Duplex 2	GAGGAAATATGTACTACGA	S:GAGGAAAUUGUACUACGATT AS:UCGUAGUACAUUUUCCUUCTT
EGR1	NM_001964.2		GTGACTGTTGGCTTATA	S:GUGACUGUUUGCCUUAUUAATT AS:UUUAUAAGCCAAACAGUCACCTT
Negative control	Eurogentec SR-CL000-005		None	Non available

forward 5'-ACAACCCAGCTCTGGAGAAA-3', reverse 5'-TCGTTTGTACCCGTTGATGA-3'. PCR was carried out in a thermal cycler (Eppendorf, Le Pecq, France) in a final volume of 25 μ L containing 2 μ L cDNA, 1 \times EconoTaqTM Reaction Buffer (-Mg), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of dNTP mix, 0.2 μ M of each primer and 2.5 U EconoTaq. Negative controls were always included. Amplification was carried out under the following conditions: (1) initial denaturation 94 °C for 2 min; (2) 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 45 s. 30 PCR cycles were performed for gene amplification, with the exception of RPLPO amplified with 25 cycles. (3) 10 min extension step at 72 °C. The number of cycles was chosen to realize the analysis in the linear phase of the PCR reaction. 20 μ L of the PCR products were mixed with loading buffer (5 μ L) and submitted to electrophoresis in a 1.2% agarose gel at 90 V for 35 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, France). A software package (Quantity One v.4.3.1, Bio-Rad Laboratories) was used to quantify the PCR products.

2.4. RNA interference

The small-interfering RNA (siRNA) duplexes for targeting PPAR γ , EGR1 and EGFR as well as a scrambled sequence (control siRNA duplex, negative control) were purchased from Eurogentec (Angers, France). The sequences are shown in Table 1. MCF7 cells (1.45×10^5) were plated overnight in 12-well culture plates in DMEM supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine. Cells were transiently transfected with either target gene siRNA (200 nM of the mix duplex 1 and duplex 2 or 200 nM of one duplex) or negative control siRNA-sequence (Table 1) using the OligofectamineTM Reagent (Invitrogen) as described by the manufacturer. The concentration of siRNA used was standardized to get maximum knockdown without affecting the viability of the cells. After 24 h, cells were washed with PBS and the medium was replaced with phenol red-free DMEM supplemented with 1% FCS and 2 mM L-glutamine. 24 h later, cells were treated in phenol red-free and FCS-free DMEM with 2 mM L-glutamine and harvested for further analyses.

2.5. Nuclear protein extracts

At the end of the treatment, cells were washed twice with cold PBS and collected in 1 mL PBS. Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared by detergent lysis. Briefly, after pelleting, the cells were incubated in hypotonic solution (10 mM Hepes-KOH, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.5% Nonidet P40, 2.5 \times Protease inhibitor cocktail tablet, Roche) for 15 min on ice and vortexed each 5 min. Nuclei were collected by centrifugation at 13,000 rpm for 5 min at 4 °C. The nuclei pellet

was then resuspended in a hypertonic buffer (10 mM Hepes-KOH pH 7.9, 25% Glycerol, 420 nM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5% Triton, 2.5 \times Protease inhibitor cocktail tablet, Roche, Fontenay sous Bois, France). Nuclei were incubated for 15 min at 4 °C with shaking. After centrifugation (13,000 rpm, 5 min, 4 °C), the supernatant containing nuclear proteins was stored at -80 °C. Protein concentrations were determined by the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories).

2.6. Western immunoblotting

For EGR1 detection, 30 μ g of nuclear proteins were mixed with 2 \times Laemmli buffer, boiled (100 °C, 5 min) and separated by 10% SDS-PAGE. For other protein analyses, cells were harvested by addition of 150 μ L 2 \times Laemmli buffer and boiled. For each sample, 30 μ L of total proteins were separated by 10% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membrane. The homogeneity of loaded amounts and transfer efficiency were confirmed by Ponceau S staining of nitrocellulose membranes for each experiment. Non specific binding sites were blocked in TNT buffer (5 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, 0.1% Tween 20) with 5% non-fat powder milk and incubated with the primary antibodies diluted in blocking solution overnight at 4 °C. The rabbit monoclonal antibodies anti-EGR1 (SC-189, Santa Cruz Biotechnology, USA) and anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr 202/Tyr 204) (Cell Signaling Technology/Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France) were diluted at 1:1000. Total ERKs were detected using a rabbit monoclonal anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) antibody (Cell Signaling Technology) at 1:5000 in blocking solution. The rabbit monoclonal antibody anti-actin was used diluted at 1:3000.

Next, the membranes were washed 3 times with TNT and incubated for 2 h with a peroxidase-linked secondary antibody (Santa Cruz Technology) at room temperature. After three washings with TNT, the membranes were developed with ECL detection reagent using chemiluminescence (Amersham, Orsay, France). After Phospho-p44/42 MAPK analysis, the blots were stripped and reprobated with anti-p44/42 MAPK antibody.

2.7. Immunocytochemistry

MCF7 cells (1.45×10^5) were seeded on glass coverslips and grown in their medium as described before. Cells were treated with TGZ or DMSO for 3 h in phenol red-free DMEM containing 1% FCS. At the end of treatment, coverslips were washed with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 15 min. After washing in PBS, preparations were permeabilized for 10 min in 0.5% Triton X100. After washing in PBS, non-specific binding was blocked by incubation for 30 min in a blocking solution (4% bovine serum albumin, 0.1% Triton X100 in PBS Buffer). Samples were incubated

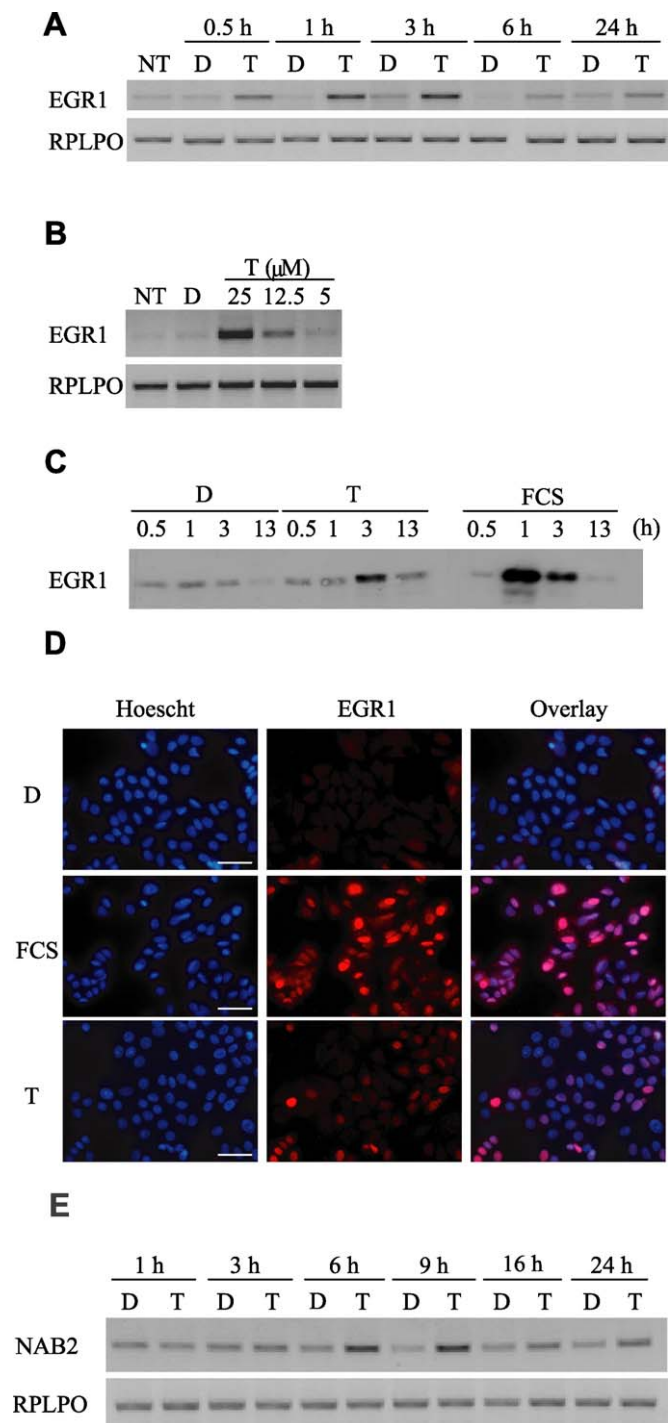


Fig. 1. Troglitazone induces *EGR1* expression. (A) Time-dependent induction of *EGR1* mRNA in MCF7 cells exposed to 25 μ M TGZ (T) for the indicated times. Control cells were treated with 0.05% DMSO (D) or non-treated (NT). *EGR1* and the housekeeping gene *RPLPO* mRNA expression were analyzed by RT-PCR. The amplified products were analyzed by agarose gel electrophoresis. (B) Dose-dependent induction of *EGR1* mRNA in MCF7 cells treated with decreasing doses of TGZ (T) for 3 h. Control cells were treated with 0.05% DMSO (D) or non-treated (NT). *EGR1* mRNA was analyzed by RT-PCR and compared to the housekeeping gene *RPLPO*. The amplified PCR products were detected after agarose gel electrophoresis. (C) Time-dependent induction of *EGR1* protein (80 kDa) in MCF7 cells exposed to 25 μ M TGZ (T), 0.05% DMSO (D) or 20% fetal calf serum (FCS) for the indicated times. 20% FCS treatment was used as positive control. Nuclear extracts were prepared as described under "Materials and methods" and subjected to western blot analysis with anti-*EGR1* antibody. D, Immunodetection of *EGR1* (*EGR1*, middle panels) in MCF7 cells exposed to 25 μ M TGZ (T) or 20% FCS for 3 h. Control cells were treated with 0.05% DMSO (D). The results of the counterstaining with Hoechst dye (left panels) as well as the merged pictures (right panels) are shown for each treatment.

with the anti-*EGR1* antibody (SC-189, Santa Cruz Biotechnology) diluted at 1:400 in the blocking solution for 1 h. They were then washed 3 times in the blocking solution and exposed for 1 h to Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG antibody (Invitrogen) diluted 1:1000 in the blocking solution. Finally, cells were rinsed with PBS 0.1% Triton X100 for 15 min and cells were counterstained with Hoechst dye to visualize nuclei. Fluorescence labelling was observed under an Eclipse 80i microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France). Images were collected using LuciaG software 4.81 (Laboratory imaging/Nikon).

2.8. Intracellular calcium imaging

MCF7 cells were seeded on glass coverslips as described above. The cytoplasmic Ca^{2+} concentration was detected by the ratio-metric fluorescent probe Fura-2. Cells were loaded with 5 μ M of the cell-permeant precursor Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2/AM; Molecular Probes Invitrogen) in presence of pluronic F-127. After 1-h incubation, they were washed three times with the recording saline solution containing (in mM): NaCl, 120; KCl, 5; $CaCl_2$, 2; $MgCl_2$, 2; D-glucose, 10; and Hepes, 20; pH 7.3. Fluorescence measurements were performed on an inverted microscope (Axiovert 35; Zeiss, Germany) with an oil-immersion $\times 40$ Nikon objective (Fluor 40, NA 1.30) and a cooled CCD camera (CoolSnap HQ; Photometrics, USA). The Imaging Workbench 4.0 software (Axon Instruments, USA) was used for image acquisition and analysis. Fluorescence was excited alternately at 350 and 380 nm with a Lambda-10 filter wheel (Sutter Instrument, USA), and emitted light was collected above 520 nm. Pairs of images were acquired every 2 s. Intracellular calcium was expressed throughout as the fluorescence ratio F_{350}/F_{380} , calculated after background subtraction. Experiments were performed at room temperature (25–30 $^{\circ}C$). During calcium measurements, the cells were continuously superfused with saline solution: the whole dish by a bath perfusion of control medium and the recorded field by a single-tip multichannel gravity-fed system, allowing switching between various solutions. All drugs were prepared at the indicated concentrations in saline solution.

2.9. Cell proliferation assay

48 h after siRNA transfection, the medium was replaced by DMEM supplemented with 1% FCS and 2 mM L-glutamine. After 4 h, cells were treated for 24 h with 15 μ M $\Delta 2$ -TGZ in DMEM supplemented with 0% FCS and 2 mM L-glutamine. Control wells received 0.05% DMSO. At the end of the treatment, cells were washed with PBS, trypsinized and counted with the CellTiter-GloTM Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Charbonnières, France). Each treatment was performed five times.

3. Results

3.1. Troglitazone induces early *EGR1* expression in MCF7 breast cancer cells

Exposure of the estrogen-dependent human breast cancer epithelial cell line MCF7 to 25 μ M TGZ induced a transient expression of *EGR1* mRNA which appeared at 30 min, peaked at 3 h and then decreased (Fig. 1A). The vehicle DMSO (0.05%) did not

Bar represents 50 μ m and the magnification is identical for all pictures. (E) Time-dependent induction of *EGR1* target gene *NAB2* in MCF7 cells exposed to 25 μ M TGZ (T) for the indicated times. Control cells were treated with 0.05% DMSO (D). *NAB2* and the housekeeping gene *RPLPO* expressions were analyzed at the mRNA level by RT-PCR. The amplified products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

induce a significant increase in *EGR1* mRNA expression compared to the non-treated sample (Fig. 1A). Furthermore, TGZ stimulated *EGR1* mRNA expression in a dose-dependent manner with a better response observed at 25 μ M than 5 μ M (Fig. 1B). At the protein level, *EGR1* was also stimulated with a maximum in nuclear extracts of cells that had been exposed to 25 μ M TGZ for 3 h (Fig. 1C). Fetal calf serum (FCS) used as a positive control induced a higher and earlier stimulation of *EGR1* (Fig. 1C). Ponceau S protein staining of membranes after transfer confirmed equivalence of loaded samples (not shown). In immunocytochemistry experiments, we observed a nuclear staining with the anti-*EGR1* antibody in cells exposed for 3 h to 25 μ M TGZ. However, all the cells did not display the same staining intensity which varies from faint to intense (Fig. 1D). In MCF7 cells exposed for 3 h to 20% FCS, the nuclear staining intensities were higher, that was in accordance with the results of western blot analyses. Staining intensity was not homogeneous between cells, as previously described.

In order to confirm the activation of the *EGR1* pathway in cells exposed to TGZ, we analyzed the *EGR1* target gene *NAB2*. *NAB2* mRNA was constitutively expressed in MCF7 cells (Fig. 1E). 25 μ M TGZ induced a transient expression of *NAB2* mRNA which appeared at 6 h, peaked at 9 h and then decreased (Fig. 1E). The vehicle DMSO (0.05%) did not induce a significant increase in *NAB2* mRNA expression compared to the non-treated sample (Fig. 1E).

3.2. *EGR1* induction by troglitazone, ciglitazone and 15d-PGJ₂ is PPAR γ -independent

Other PPAR γ ligands were tested. Both CGZ and 15d-PGJ₂ (25 μ M) were able to induce a transient expression of *EGR1* mRNA with a peak of expression observed after 3 h of treatment (Fig. 2A). The transcription of *EGR1* was followed by translation of *EGR1* and by *NAB2* stimulation (Fig. 2B and C). In contrast, these events were not observed after 25 μ M RGZ treatment (Fig. 2A and B). Since RGZ is a more potent PPAR γ agonist than TGZ, CGZ or 15d-PGJ₂, it suggested that the induction of *EGR1* expression required a PPAR γ -independent mechanism.

It was demonstrated by three different complementary approaches. In MCF7 cells co-treated for 3 h with 25 μ M TGZ, CGZ or 15d-PGJ₂ and the irreversible PPAR γ antagonist GW9662 (5 or 25 μ M) *EGR1* mRNA expression was still stimulated (Fig. 3A). When TGZ (25 μ M) was tested on PPAR γ siRNA transfected MCF7 cells (in which PPAR γ mRNA level was decreased by more than 80%), the induction of *EGR1* mRNA expression was still induced after 3 h of treatment (Fig. 3B). Besides, MCF7 cells that were treated for 3 h with 25 μ M Δ 2-TGZ, a TGZ derivative devoid of PPAR γ agonist activity, displayed an increase in *EGR1* and *NAB2* mRNA levels (Fig. 3C). Such a Δ 2-TGZ treatment was also able to induce the expression of *EGR1* protein (Fig. 3D).

3.3. Troglitazone, ciglitazone and 15d-PGJ₂ rapidly activate ERK1/2 pathway

We studied if the extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 pathway could be involved in *EGR1* expression stimulation. TGZ, CGZ and 15d-PGJ₂ (25 μ M) induced ERK1/2 phosphorylation that could be detected as soon as 5 min after stimulation (Fig. 4A). The signal intensity increased between 15 and 45 min following treatment and decreased thereafter (Fig. 4A). In case of Δ 2-TGZ (25 μ M) treatment, ERK1/2 phosphorylation occurred more slowly: it was detected 15 min after stimulation and increased up to 75 min (Fig. 4B). In contrast to these compounds, RGZ induced no change in ERK1/2 phosphorylation (data not shown).

In MCF7 cells that were pretreated for 30 min with the MEK1/2 inhibitor U0126 (5 μ M) and subsequently treated with vehicle or

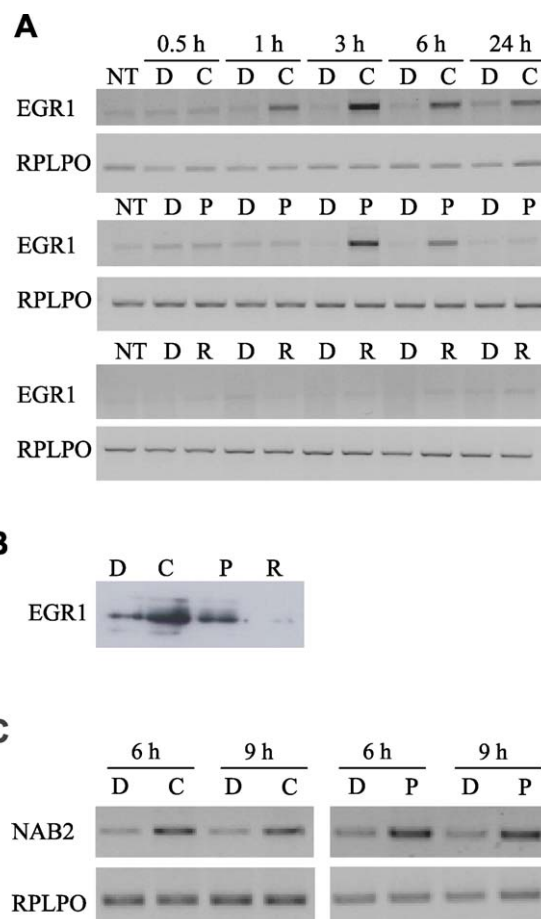


Fig. 2. Ciglitazone and 15d-PGJ₂ also stimulate the expression of *EGR1* and its target gene *NAB2*. (A) Time-dependent induction of *EGR1* mRNA in MCF7 cells exposed to 25 μ M CGZ (C), 15d-PGJ₂ (P) and RGZ (R) for the indicated times. Control cells were treated with 0.05% DMSO (D, vehicle) or non-treated (NT). (B) Induction of *EGR1* protein (80 kDa) in MCF7 cells exposed to 25 μ M CGZ (C), 15d-PGJ₂ (P), RGZ (R) or 0.05% DMSO (D) for 3 h. Nuclear extracts were prepared as described under "Materials and methods" and subjected to western blot analysis using anti-*EGR1* antibody. (C) RT-PCR analysis of the expression of *NAB2* mRNA in MCF7 cells exposed for 6 and 9 h to 25 μ M CGZ (C) and 15d-PGJ₂ (P), or 0.05% DMSO (D). The amplified products were detected after agarose gel electrophoresis and expressed relatively to the housekeeping gene *RPLPO*.

25 μ M TGZ, CGZ, 15d-PGJ₂ (15 min) and Δ 2-TGZ (30 min), no activated ERK1/2 was found (Fig. 4C). At a concentration as low as 5 μ M, U0126 was efficient to inhibit the *EGR1* expression usually induced by TGZ, CGZ, 15d-PGJ₂ (Fig. 4D). In case of Δ 2-TGZ treatment, U0126 inhibited *EGR1* mRNA induction partially at 5 μ M whereas a complete inhibition was observed at 25 μ M (Fig. 4D). The MAPK inhibitor was also able to inhibit the TGZ-induced increase in *EGR1* protein (Fig. 4E).

To determine the role of the other MAP Kinases on the regulation of *EGR1* expression, cells were treated with Δ 2-TGZ in the presence of 10 μ M of a specific inhibitor of p38 MAPK (SB203580) (Fig. 5A) and JNK (SP600125) (Fig. 5B). In contrast to U0126 that completely abolished *EGR1* expression, neither SB203580 nor SP600125 could antagonize this response to Δ 2-TGZ (Fig. 5A and B).

3.4. PPAR γ -independent expression of *EGR1* does not require EGFR activation

We tested the possibility for EGFR to be involved in the PPAR γ -independent activation of *EGR1* in MCF7 cells. For this purpose, we used the EGFR tyrosine kinase inhibitors PD153035 or AG1478. At

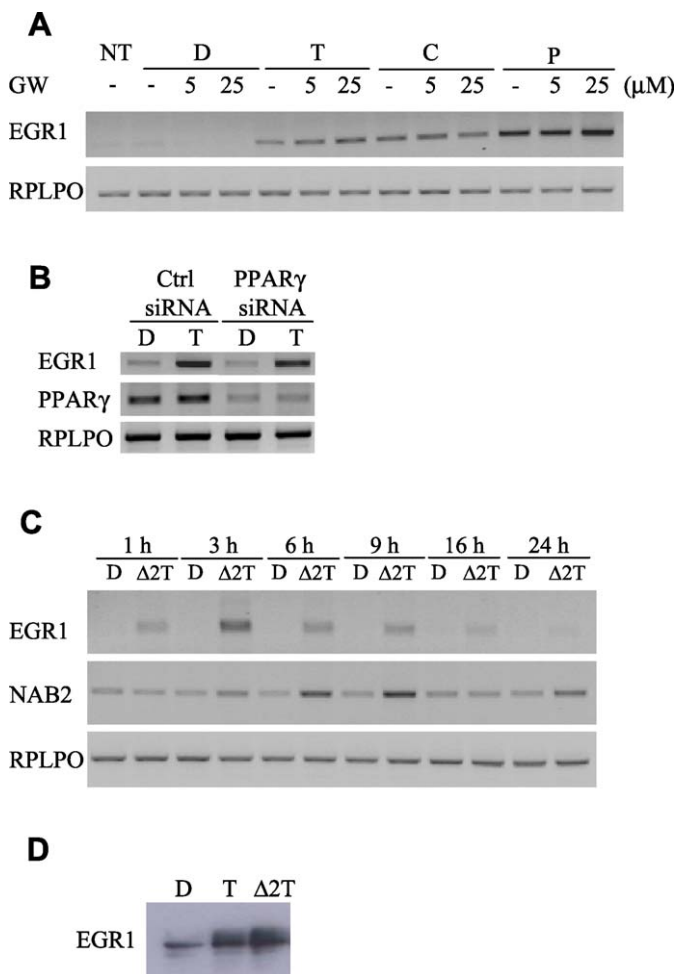


Fig. 3. *EGR1* expression is independent of PPAR γ activation. (A) Absence of inhibition of *EGR1* induction in the presence of the PPAR γ antagonist GW9662. MCF7 cells were pretreated with 5 or 25 μ M GW9662 (GW) for 30 min before treatment with 25 μ M TGZ (T), CGZ (C) or 15d-PGJ $_2$ (P) for 3 h. Control cells were treated with 0.05% DMSO (vehicle, D) or non-treated (NT). mRNA expression was analyzed by RT-PCR. (B) TGZ-induced expression of *EGR1* mRNA after silencing of PPAR γ receptors by RNA interference. MCF7 cells were transiently transfected with double-strand siRNA targeting PPAR γ or control (Ctrl) siRNA. 48 h after transfection, cells were exposed to 25 μ M TGZ (T) or 0.05% DMSO (D) for 3 h. (C) Expression of *EGR1* and its target gene *NAB2* following treatment with the PPAR γ inactive analogue of TGZ, Δ 2-TGZ. Cells were treated with 25 μ M Δ 2-TGZ (Δ 2T) or 0.05% DMSO (D) for the indicated times. mRNA expression was analyzed by RT-PCR. The amplified products were detected after agarose gel electrophoresis and expressed relatively to the housekeeping gene *RPLPO*. (D) Induction of *EGR1* protein (80 kDa) in MCF7 cells exposed to 25 μ M TGZ (T), its inactive analogue, Δ 2-TGZ, (Δ 2T) or 0.05% DMSO (D) for 3 h. Nuclear extracts were prepared as described under "Materials and methods" and subjected to Western blot analysis using anti-*EGR1* antibody.

5 μ M, these compounds totally inhibited ERK1/2 phosphorylation in MCF7 cells exposed to EGF (15 nM for 5 min) (Fig. 6A). We also observed that the exposure to EGF (15 nM) for 1 h could increase *EGR1* mRNA level in MCF7 cells and that this effect did not occur in the presence of the EGFR antagonists (Fig. 6B). However, in our conditions, Δ 2-TGZ-induced *EGR1* mRNA expression was not blocked by the two EGFR tyrosine kinase inhibitors AG1478 and PD153035 (Fig. 6C). Our study performed in MCF7 cells transfected with siRNA targeting EGFR confirmed the absence of a role of EGFR in the induction of *EGR1* mRNA expression and ERK phosphorylation after Δ 2-TGZ treatment (Fig. 6D).

3.5. PPAR γ -independent expression of *EGR1* in MDA-MB-231 cells

In order to determine whether the PPAR γ -independent expression of *EGR1* expression could be observed in other breast

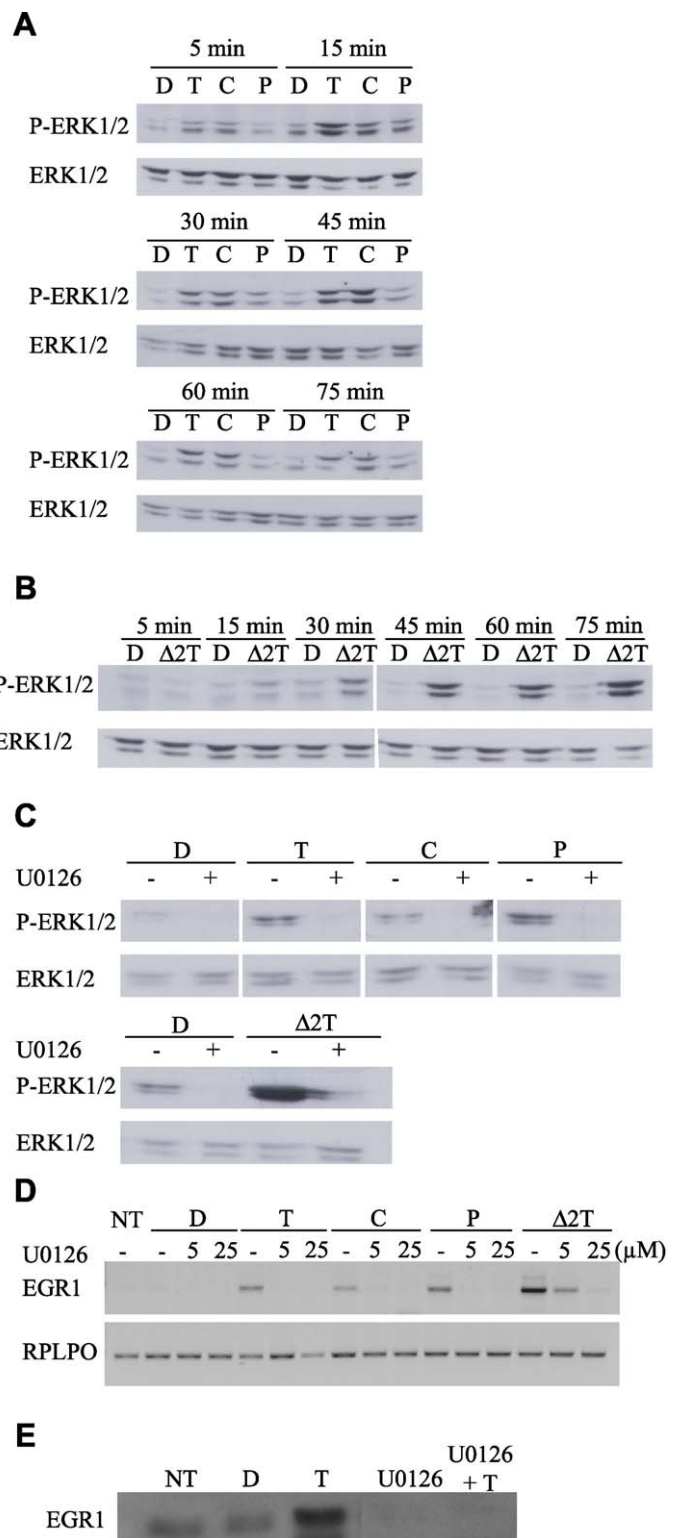


Fig. 4. The induction of *EGR1* expression depends on the activation of the ERK1/2 pathway. (A) Changes in ERK1/2 phosphorylation were assessed in MCF7 cells after 25 μ M TGZ (T), CGZ (C), and 15d-PGJ $_2$ (P) treatment for the indicated times. Cells were harvested in 2 \times Laemmli buffer and total proteins were subjected to western blot analysis using anti-phospho-ERK1/2 antibody (P-ERK1/2). The blots were stripped and reprobed using antibody directed against total ERK1/2 (ERK1/2). (B) A similar experiment was done in MCF7 cells after Δ 2-TGZ (Δ 2T) treatment for the indicated times. (C) MCF7 cells were pretreated with 5 μ M U0126, a specific inhibitor of MEK1/2, for 30 min before treatment with 25 μ M TGZ (T), CGZ (C), 15d-PGJ $_2$ (P) for 15 min and 25 μ M Δ 2-TGZ (Δ 2T) for 30 min. Control cells were treated with 0.05% DMSO (vehicle). Phospho-ERK1/2 and total ERK1/2 were analyzed by western blot. (D) MCF7 cells were pretreated with 5 or 25 μ M U0126, a specific

cancer cells, we studied its expression in the hormone-independent cell line MDA-MB-231. After 3 h of treatment, $\Delta 2$ -TGZ was able to induce *EGR1* mRNA expression (Fig. 7). Then, we investigated whether the ERK1/2 pathway was involved in this event. A pretreatment with the ERK1/2 inhibitor U0126 (5 μ M) abolished *EGR1* mRNA expression induced by $\Delta 2$ -TGZ in MDA-MB-231 cells (Fig. 7). In contrast, the EGFR inhibitor AG1478 had no effect (Fig. 7). Thus, the PPAR γ -independent expression of *EGR1* is not restricted to MCF7 cells.

3.6. PPAR γ -independent expression of *EGR1* is mediated by Ca^{2+}

In order to determine whether calcium signaling could be involved in the PPAR γ -independent ERK1/2-mediated induction of *EGR1* expression, MCF7 cells were pretreated for 30 min with the Ca^{2+} chelator BAPTA-AM before their exposure to PPAR γ ligands (25 μ M). This treatment abolished the usual increase in *EGR1* mRNA level (Fig. 8A). ERK1/2 could not be activated in these conditions (Fig. 8A). Interestingly, we observed that in MCF7 cells, the Ca^{2+} ionophore A23187 also induced *EGR1* mRNA expression but with an earlier response than those usually observed with $\Delta 2$ -TGZ (Fig. 8B). Moreover, A23187 treatment also induced ERK1/2 activation before *EGR1* mRNA expression (2 min versus 15 min, respectively) (Fig. 8C). This A23187-triggered *EGR1* induction was prevented in the presence of the antagonist U0126 which also inhibited ERK1/2 phosphorylation (data not shown).

Then, we studied intracellular Ca^{2+} in MCF7 cells (Fig. 8D). In control cells exposed to DMSO no change in the basal level of Ca^{2+} was observed. In contrast, MCF7 cells exposed for 2 min to 25 μ M TGZ showed a fast increase in intracellular calcium, $[Ca^{2+}]_i$, which disappeared as soon as cells were back in TGZ-free medium (Fig. 8D, upper panel). After recovery to basal level, a new exposure to TGZ induced again a rise in $[Ca^{2+}]_i$. An increase in $[Ca^{2+}]_i$ was also observed in response to 25 μ M $\Delta 2$ -TGZ, showing that the calcium increase observed with TGZ was a PPAR γ -independent event (Fig. 8D, middle panel). However, after elimination of $\Delta 2$ -TGZ, cytosolic calcium decreased more slowly than after TGZ treatment. This rise in $[Ca^{2+}]_i$ did not occur in the presence of BAPTA-AM but it was still observed when $\Delta 2$ -TGZ was applied in a Ca^{2+} -free solution suggesting that a release from intracellular stores was involved, rather than an influx of external Ca^{2+} (Fig. 8D, middle and lower panels).

3.7. *EGR1* is a mediator of $\Delta 2$ -TGZ-induced growth arrest

To test whether *EGR1* is critical for the antiproliferative action of $\Delta 2$ -TGZ, we performed gene silencing in MCF7 cells. The suppression of *EGR1* expression was confirmed by RT-PCR (Fig. 9A). In each experiment, at least 50% of *EGR1* mRNA expression was observed. In MCF7 cells transfected with Ctrl siRNA, after 24 h treatment with 15 μ M $\Delta 2$ -TGZ, the number of viable cells was 47% of those exposed to DMSO. When the cells were transfected with the *EGR1* siRNA, $\Delta 2$ -TGZ affected less efficiently MCF7 cells since viable cells were 61% of those exposed to DMSO (Fig. 9B).

inhibitor of MEK1/2, for 30 min before treatment with 25 μ M TGZ (T), CGZ (C), 15d-PGJ₂ (P) and $\Delta 2$ -TGZ ($\Delta 2$ T) for 3 h. Control cells were treated with 0.05% DMSO (vehicle) or non-treated (NT). *EGR1* mRNA expression was analyzed by RT-PCR. The amplified products were detected after agarose gel electrophoresis and expressed relatively to the housekeeping gene *RPLPO*. (E) Cells were pretreated with 5 μ M U0126 for 30 min before treatment with 25 μ M TGZ (T) for 3 h. Nuclear extracts were prepared as described under "Materials and methods" and subjected to Western blot analysis to detect the 80 kDa *EGR1* protein. Control cells were treated with 0.05% DMSO (D, vehicle) or non-treated (NT).

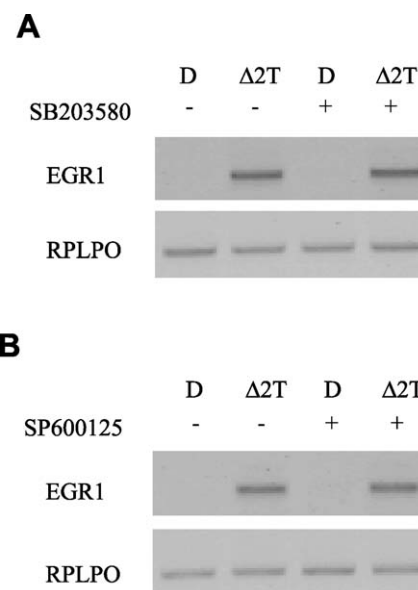


Fig. 5. The induction of *EGR1* expression is independent on the activation of the p38 and JNK pathways. MCF7 cells were pretreated for 30 min with 10 μ M SB203580 (A) or SP600125 (B), specific inhibitors of p38 and JNK MAPK respectively, before treatment with 25 μ M $\Delta 2$ -TGZ ($\Delta 2$ T) for 3 h. Control cells were treated with 0.05% DMSO (vehicle). *EGR1* mRNA expression was analyzed by RT-PCR. The amplified products were detected after agarose gel electrophoresis and expressed relatively to the housekeeping gene *RPLPO*.

4. Discussion

In this study, we show that *EGR1* is an early target gene of TGZ in MCF7 cells with a peak of expression after 3 h of treatment. Such a transient induction of *EGR1* expression was also observed in response to CGZ and 15d-PGJ₂. The expression of *EGR1* protein was confirmed by Western blotting and by the delayed induction of *NAB2*, a well known *EGR1* target gene [21]. *EGR1* could be a mediator of PPAR γ ligand action since a transient stimulation of its expression has also been reported in other cell lines like human colorectal carcinoma cells HCT116 or activated T cells in response to TGZ or 15d-PGJ₂ respectively [10,22].

Our results demonstrate that *EGR1* expression is stimulated in breast cancer cell lines in a PPAR γ -independent manner. This was first suggested by the fact that RGZ was not able to induce *EGR1* expression although it was the most potent PPAR γ agonist tested [10]. We confirmed the PPAR γ -independent mechanism by the use of the PPAR γ antagonist GW9662 and PPAR γ silencing. Furthermore, the TGZ inactive derivative $\Delta 2$ -TGZ was also able to stimulate *EGR1* expression after 3 h of treatment in both hormone-dependent (MCF7) and hormone-independent (MDA-MB-231) breast cancer cells. These results are consistent with data obtained in human colorectal carcinoma cells HCT116 [13]. Thus, *EGR1* expression can be added to the increasing list of PPAR γ -independent effects of thiazolidinediones observed in cancer cell lines [9].

The activation of the MEK/ERK/ELK cascade is the classical pathway essential for enhanced *EGR1* biosynthesis [23]. In MCF7 cells, we clearly demonstrated that a transient phosphorylation of ERK1/2 occurred early after TGZ, CGZ and 15d-PGJ₂ treatment whereas no change in ERK phosphorylation was observed in response to RGZ. A similar effect of TGZ was previously described in MCF7 cells [24,25], in porcine endothelial cells [26], and in the rat liver epithelial cell line GN4 [27,28]. In GN4 cells, the phosphorylation of ERK was also stimulated by CGZ [27]. Consistent with our data, in astrocytes, CGZ and 15d-PGJ₂ stimulated ERK phosphorylation whereas RGZ was inefficient

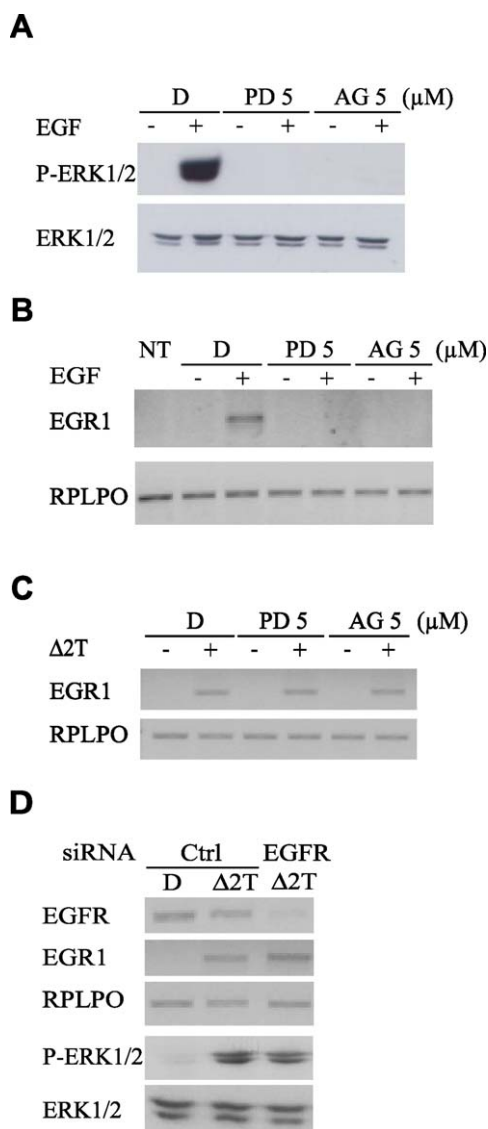


Fig. 6. EGFR is not involved in the PPAR γ -independent expression of EGR1. (A) Phospho-ERK1/2 and total ERK1/2 were analyzed by Western blot. MCF7 cells were pretreated for 30 min with 5 μ M of the EGFR tyrosine kinase inhibitors PD153035 (PD) or AG1478 (AG) before treatment with 15 nM EGF for 5 min. Control cells were treated with 0.05% DMSO (D). (B) *EGR1* mRNA expression induced by EGF and effects of different EGFR inhibitors. MCF7 cells were pretreated for 30 min with 5 μ M of the EGFR tyrosine kinase inhibitors PD153035 (PD) or AG1478 (AG) before treatment with 15 nM EGF for 1 h. Control cells were treated with 0.05% DMSO (D). mRNA expression was analyzed by RT-PCR. The amplified products were detected after agarose gel electrophoresis and expressed relatively to the housekeeping gene *RPLPO*. (C) *EGR1* mRNA expression in presence of different EGFR inhibitors. MCF7 cells were pretreated for 30 min with 5 μ M of the EGFR tyrosine kinase inhibitors PD153035 (PD) or AG1478 (AG) before treatment with 25 μ M Δ 2-TGZ (Δ 2T) for 3 h. Control cells were treated with 0.05% DMSO (D). mRNA expression was analyzed by RT-PCR as described in (B). (D) Δ 2-TGZ-induced expression of *EGR1* mRNA and ERK phosphorylation after silencing of EGFR receptors by RNA interference. MCF7 cells were transiently transfected with double-strand siRNA targeting EGFR or control (Ctrl) siRNA. 48 h after transfection, cells were exposed to 25 μ M Δ 2-TGZ (Δ 2T) or 0.05% DMSO (D). After 3 h treatment, the expressions of *EGFR*, *EGR1* and *RPLPO* were analyzed at the mRNA level by RT-PCR. The amplified products were detected after agarose gel electrophoresis. After 30 min treatment, phospho-ERK1/2 and total ERK1/2 were analyzed by Western blot.

[29]. Interestingly, we found that ERK1/2 phosphorylation was also stimulated by Δ 2-TGZ, demonstrating that it was a PPAR γ -independent event. This was previously reported in astrocytes not only with Δ 2-TGZ but also with Δ 2-CGZ [27]. We further show that this early activation is essential for EGR1 induction in MCF7 and

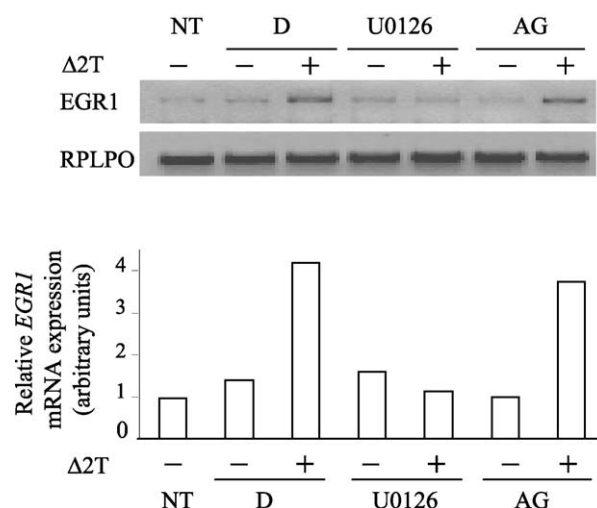


Fig. 7. The PPAR γ -independent activation of *EGR1* expression is also observed in the hormone-independent breast cancer cell line MDA-MB-231. MDA-MB-231 cells were pretreated with 5 μ M U0126 (specific inhibitor of MEK1/2) or 5 μ M AG1478 (AG; EGFR tyrosine kinase inhibitor) for 30 min before treatment with 25 μ M Δ 2-TGZ (Δ 2T) for 3 h. Control cells were treated with 0.05% DMSO (D, vehicle) or non-treated (NT). *EGR1* mRNA expression was analyzed by RT-PCR. The amplified products were detected after agarose gel electrophoresis. The housekeeping gene *RPLPO* was used as an internal control. The band intensities of *EGR1* were evaluated in terms of optical density arbitrary units and normalized with the *RPLPO* signal intensity. Data are presented in the histogram.

MDA-MB-231 cells by the use of the MEK inhibitor U0126, like in HCT116 cells [13].

In parallel to ERK activation, thiazolidinediones are able to induce various MAPKs in different cell models [30]. For instance, in MCF7 cells, TGZ and TZD18 also activate p38 and c-jun N-terminal kinase (JNK) pathways [25,31]. However, concerning the regulation of *EGR1* expression in MCF7 cells exposed to Δ 2-TGZ, p38 and JNK pathways are likely not involved. Indeed, ERK1/2 phosphorylation inhibition is sufficient to completely block *EGR1* synthesis whereas JNK and p38 inhibitors have no effect. Consistent with our data, the p38 MAPK inhibitor PD169316 did not prevent *EGR1* induction by the retinoid AHPN in human lung carcinoma cells [32]. Similarly, in intestinal epithelial cells U0126 was able to block *EGR1* expression induced by sulindac sulfide whereas SP600125 and SB203580 were inefficient [33].

Previous studies suggested a connection between the EGFR and MAPK signaling by PPAR α and PPAR γ ligands [24,34–36]. MCF7 and MDA-MB-231 cells expressed significant levels of EGFR protein [37]. However, in our study, although the EGFR antagonists AG1478 and PD153035 inhibited efficiently EGF-stimulated ERK phosphorylation and *EGR1* expression, they did not affect the stimulation of *EGR1* expression in case of Δ 2-TGZ treatment. Similarly, TGZ did not induce EGFR activation in rat liver epithelial cells GN4 [36].

MAPK phosphorylation is also often associated with an increase in $[Ca^{2+}]_i$. The Ca^{2+} -regulated protein kinase C can activate ERK through a RAF-dependent mechanism. Interestingly, TGZ and CGZ were shown to increase $[Ca^{2+}]_i$ in mouse ES cells, in rat liver epithelial cells GN4 as well as in normal urothelial cells [28,38,39]. In MCF7 cells, we show that TGZ triggers an immediate increase in cytosolic Ca^{2+} and that this event is also obtained in response to the PPAR γ -inactive compound Δ 2-TGZ. This result is in accordance with the fact that both TGZ and CGZ trigger an increase in $[Ca^{2+}]_i$ not only in PPAR $\gamma^{+/+}$ but also in PPAR $\gamma^{-/-}$ mouse ES cells [38]. Moreover, we show for the first time that Ca^{2+} is essential for the activation of ERK1/2 and the expression of *EGR1* by Δ 2-TGZ, TGZ, CGZ, or 15d-PG $_2$ in MCF7 cells and MDA-MB-231. Interestingly, biosynthesis of *EGR1* in MIN6 insulinoma cells treated with glucose, tolbutamide or KCl requires an elevation of Ca^{2+} [40].

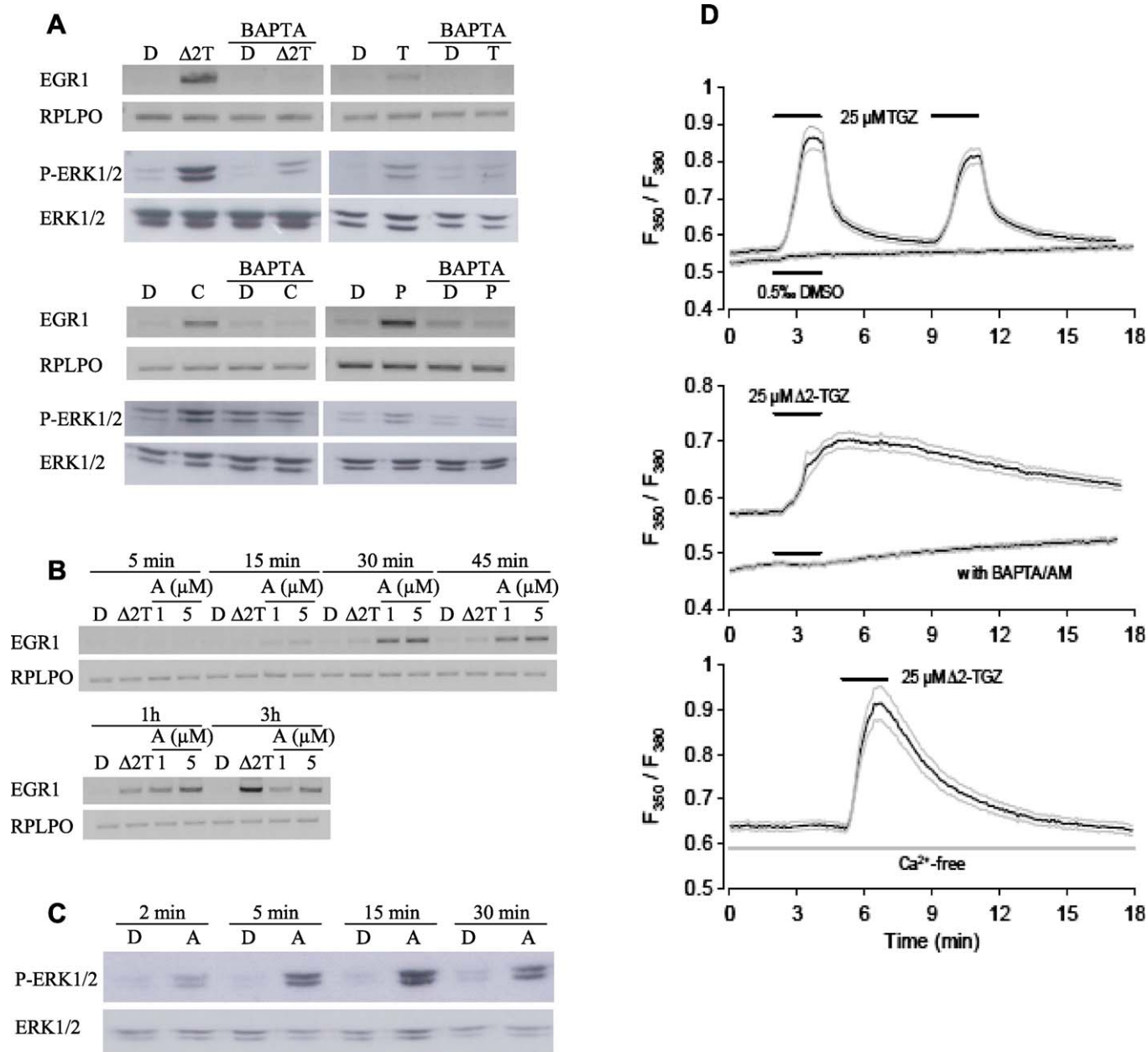


Fig. 8. *EGR1* expression and ERK1/2 phosphorylation depend on calcium mobilization. (A) Inhibition of *EGR1* mRNA expression and ERK1/2 phosphorylation in presence of the calcium chelator BAPTA-AM. MCF7 cells were pretreated with 50 μM BAPTA-AM for 30 min before treatment with 25 μM Δ2-TGZ (Δ2T), TGZ (T), CGZ (C) or 15d-PGJ2 (P) for 3 h for *EGR1* expression detection. For ERK1/2 phosphorylation experiments, cells were treated with TGZ (T), CGZ (C) or 15d-PGJ2 (P) for 15 and 30 min with Δ2-TGZ (Δ2T). Control cells were treated with 0.05% DMSO (D). *EGR1* mRNA expression was analyzed by RT-PCR. The amplified products were detected after agarose gel electrophoresis and expressed relatively to the housekeeping gene *RPLPO*. To detect changes in ERK1/2 phosphorylation status, cells were harvested in 2× Laemmli buffer and total proteins were subjected to western blot analysis using anti-phospho-ERK1/2 antibody (P-ERK1/2). The blots were stripped and reprobed using antibody directed against total ERK1/2 (ERK1/2). (B) Comparative study of *EGR1* mRNA expression induced by Δ2-TGZ and the A23187 ionophore in MCF7 cells. Cells were treated with 25 μM Δ2-TGZ (Δ2T) and 1 or 5 μM A23187 ionophore for the indicated times. Control cells were treated with 0.05% DMSO (D). *EGR1* mRNA expression was analyzed by RT-PCR. The amplified products were detected after agarose gel electrophoresis and expressed relatively to the housekeeping gene *RPLPO*. (C) Kinetic of ERK1/2 phosphorylation induced by the A23187 ionophore in MCF7 cells. Cells were treated with 1 μM A23187 ionophore (A) for the indicated time and total proteins were subjected to western blot analysis as previously described. Control cells were treated with 0.05% DMSO (D). (D) Cytoplasmic Ca²⁺ concentration was detected by the ratiometric fluorescent probe Fura-2. MCF7 cells were superfused with a saline solution and exposed during the indicated time to 0.05% DMSO (upper panel), 25 μM TGZ (upper panel) or 25 μM Δ2-TGZ (middle and lower panels). The effect of Δ2-TGZ was also studied in MCF7 cells pretreated with 50 μM of the calcium chelator BAPTA-AM (middle panel) as well as in calcium-free conditions (lower panel). The results are expressed as mean (black lines) ± S.E.M. (grey lines) of several measurements.

We further observed that the increase in cytosolic Ca²⁺ occurred even when MCF7 cells were superfused in a Ca²⁺-free solution containing EGTA, demonstrating liberation from intracellular stores rather than an influx from extracellular medium. This is in accordance with the effects described previously for TGZ and CGZ in mouse ES cells [38].

The roles of *EGR1* in cancer development and response to therapies are ambiguous since *EGR1* may either inhibit or stimulate cell growth depending on the stimulus and the cellular context. Many observations support the notion that *EGR1* contributes to prostate cancer progression. The *EGR1* mRNA is highly expressed in prostate adenocarcinoma, compared with

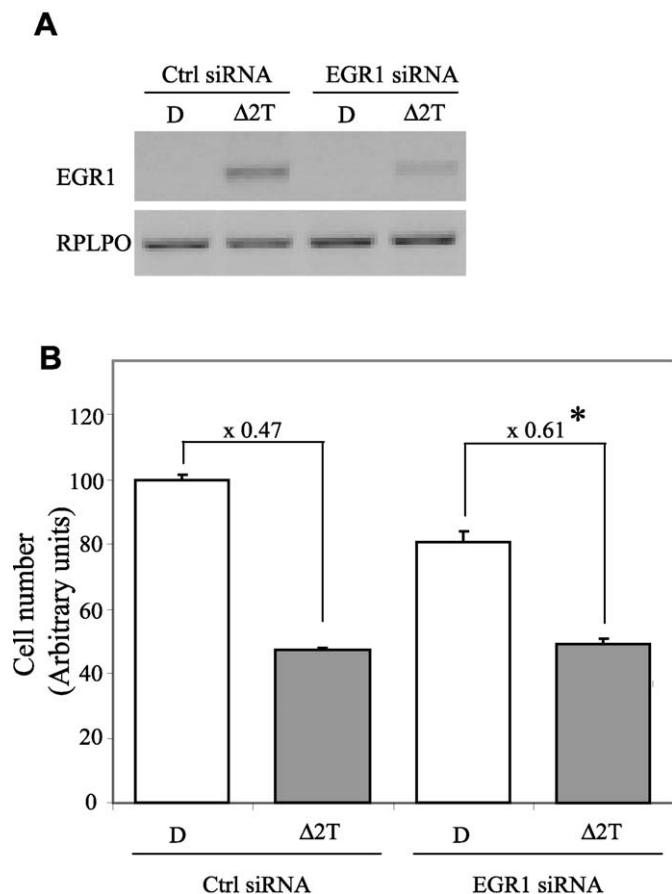


Fig. 9. EGR1 plays a part in the antiproliferative action of $\Delta 2$ -TGZ. (A) MCF7 cells were transiently transfected with double-strand siRNA targeting *EGR1* or control (Ctrl) siRNA. 48 h after transfection, cells were exposed to 15 μ M $\Delta 2$ -TGZ ($\Delta 2$ T) or 0.05% DMSO (D) for 3 h. mRNA expression for *EGR1* and *RPLPO* was analyzed by RT-PCR. The amplified products were detected after agarose gel electrophoresis. (B) 28 h after control (Ctrl) and *EGR1* siRNA transfection, cells were exposed to 15 μ M $\Delta 2$ -TGZ ($\Delta 2$ T) or 0.05% DMSO (D) for 24 h. The number of viable cells was measured using the CellTiter-GloTM Luminescent Cell Viability Assay. Results are given as mean \pm S.E.M. of cell number (arbitrary units) ($n = 5$).

*Significantly different from Ctrl siRNA ($p < 0.01$) using the unpaired t -test.

normal tissues [41]. In contrast, *EGR1* expression is absent or very weak in several human breast cancer cell lines and tissues compared to normal cells or tissues [17,18]. We confirmed these data in the two breast cancer cell lines MCF7 and MDA-MB-231. We further show that induction of *EGR1* expression is partly involved in the anti-proliferative action of the thiazolidinedione $\Delta 2$ -TGZ. Indeed, *EGR1* depletion reduced by 14% the antiproliferative activity of $\Delta 2$ -TGZ on MCF7 cells. Similarly to our results, cellular sensibility to different therapeutic agents is modified after *EGR1* interference. For example, *EGR1* siRNA decreases the tolfenamic acid-induced apoptosis in the colorectal carcinoma cell line HCT-116 [42]. *EGR1* siRNA lowers by 15% cell death-induced by etoposide in osteosarcoma cells U2OS [43].

Concerning the events downstream of *EGR1*, it might be interesting to address the involvement of HSP70 and NF- κ B. Indeed, in lung fibroblasts, cigarette smoke water extracts induce an *EGR1*-dependent expression of HSP70 [44]. The latter can block the activation of the transcription factor NF- κ B which is antiproliferative [45]. Moreover, the suppression of NF- κ B is involved in TGZ-induced inhibition of colon cancer cell growth [46].

Besides, *EGR1* induction was reported to occur in mouse embryonic fibroblasts exposed to the endoplasmic reticulum (ER)-stress inducer thapsigargin [47]. *EGR1* was also shown to play a

role in thapsigargin-induced apoptosis in the melanoma cell line A375-C6 [48]. Since some PPAR γ ligands are known to trigger ER stress in breast cancer cell lines, the involvement of *EGR1* in the ER stress in breast cancer cells could be considered [31].

In summary, we provide evidence that TGZ, CGZ and 15d-PG $_2$ stimulate an early expression of *EGR1* in breast cancer cells in a PPAR γ -independent manner. This event requires a rise in $[Ca^{2+}]_i$, and the subsequent activation of ERK1/2 signaling pathway. We also show that *EGR1* participates in the PPAR γ -independent antiproliferative action. It will be interesting to determine if thiazolidinediones also activate the Ca^{2+} /ERK/*EGR1* pathway in non cancerous mammary epithelial cells or if this event is restricted to cancer cells.

Acknowledgments

We would like to thank SANOFI-AVENTIS for a studentship to Stéphane Salamone. We acknowledge Martine Chillet, Alexandra Kleinclauss, Brigitte Fernet, Sandrine Adach and François Dupire for technical assistance.

References

- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2006;58:726–41.
- Cheatham WW. Peroxisome proliferator-activated receptor translational research and clinical experience. *Am J Clin Nutr* 2010;91:262S–6S.
- Blanquicett C, Roman J, Hart CM. Thiazolidinediones as anti-cancer agents. *Cancer Ther* 2008;6:25–34.
- Koeffler HP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin Cancer Res* 2003;9:1–9.
- Fenner MH, Elstner E. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands for the treatment of breast cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2005;14:557–68.
- Kim KY, Kim SS, Cheon HG. Differential anti-proliferative actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2006;72:530–40.
- Kar R, Singha PK, Venkatachalam MA, Saikumar P. A novel role for MAP1 LC3 in nonautophagic cytoplasmic vacuolation induction of cancer cells. *Oncogene* 2009;28:2556–68.
- Zhou J, Zhang W, Liang B, Casimiro MC, Whitaker-Menezes D, Wang M, et al. PPARgamma activation induces autophagy in breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:2334–42.
- Wei S, Yang J, Lee SL, Kulp SK, Chen CS. PPARgamma-independent antitumor effects of thiazolidinediones. *Cancer Lett* 2009;276:119–24.
- Lecomte J, Flament S, Salamone S, Boisbrun M, Mazerbourg S, Chapleur Y, et al. Disruption of ERalpha signalling pathway by PPARgamma agonists: evidences of PPARgamma-independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2008;112:437–51.
- Huang JW, Shiau CW, Yang YT, Kulp SK, Chen KF, Brueggemeier RW, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent ablation of cyclin D1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 2005;67:1342–8.
- Colin C, Salamone S, Grillier-Vuissoz I, Boisbrun M, Kuntz S, Lecomte J, et al. New troglitazone derivatives devoid of PPARgamma agonist activity display an increased antiproliferative effect in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2010;124:101–10.
- Baek SJ, Wilson LC, Hsi LC, Eling TE. 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* 2003;278:5845–53.
- Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira PC, et al. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 1988;53:37–43.
- Swirnoff AH, Milbrandt J. DNA-binding specificity of NGFI-A and related zinc finger transcription factors. *Mol Cell Biol* 1995;15:2275–87.
- Baron V, De Gregorio G, Krones-Herzig A, Virolette T, Calogero A, Urcis R, et al. Inhibition of Egr-1 expression reverses transformation of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Oncogene* 2003;22:4194–204.
- Huang JW, Shiau CW, Yang J, Wang DS, Chiu HC, Chen CY, et al. Development of small-molecule cyclin D1-ablative agents. *J Med Chem* 2006;49:4684–9.
- Liu J, Liu YG, Huang R, Yao C, Li S, Yang W, et al. Concurrent down-regulation of Egr-1 and gelsolin in the majority of human breast cancer cells. *Cancer Genomics Proteomics* 2007;4:377–85.
- Huang RP, Liu C, Fan Y, Mercola D, Adamson ED. Egr-1 negatively regulates human tumor cell growth via the DNA-binding domain. *Cancer Res* 1995;55:5054–62.

- [20] Boschi D, Tron GC, Lazzarato L, Chegaev K, Cena C, Di Stilo A, et al. NO-donor phenols: a new class of products endowed with antioxidant and vasodilator properties. *J Med Chem* 2006;49:2886–97.
- [21] Kumbrink J, Gerlinger M, Johnson JP. Egr-1 induces the expression of its corepressor nab2 by activation of the nab2 promoter thereby establishing a negative feedback loop. *J Biol Chem* 2005;280:42785–93.
- [22] Cippitelli M, Fionda C, Di Bona D, Lupo A, Piccoli M, Frati L, et al. The cyclopentenone-type prostaglandin 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits CD95 ligand gene expression in T lymphocytes: interference with promoter activation via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanisms. *J Immunol* 2003;170:4578–92.
- [23] Thiel G, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol* 2002;193:287–92.
- [24] Friday E, Oliver III R, Welbourne T, Turturro F. Role of epidermal growth factor receptor (EGFR)-signaling versus cellular acidosis via Na⁺/H⁺ exchanger1(NHE1)-inhibition in troglitazone-induced growth arrest of breast cancer-derived cells MCF-7. *Cell Physiol Biochem* 2007;20:751–62.
- [25] Yin F, Bruemmer D, Blaschke F, Hsueh WA, Law RE, Herle AJ. Signaling pathways involved in induction of GADD45 gene expression and apoptosis by troglitazone in human MCF-7 breast carcinoma cells. *Oncogene* 2004;23:4614–23.
- [26] Li X, Yang X, Xu Y, Jiang X, Nan F, Tang H. Troglitazone inhibits cell proliferation by attenuation of epidermal growth factor receptor signaling independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cell Res* 2009;19:720–32.
- [27] Gardner OS, Shiau CW, Chen CS, Graves LM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent activation of p38 MAPK by thiazolidinediones involves calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase R: correlation with endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2005;280:10109–18.
- [28] Dewar BJ, Gardner OS, Chen CS, Earp HS, Samet JM, Graves LM. Capacitative calcium entry contributes to the differential transactivation of the epidermal growth factor receptor in response to thiazolidinediones. *Mol Pharmacol* 2007;72:1146–56.
- [29] Lennon AM, Ramauge M, Dessouroux A, Pierre M. MAP kinase cascades are activated in astrocytes and preadipocytes by 15-deoxy-Delta(12-14)-prostaglandin J(2) and the thiazolidinedione ciglitazone through peroxisome proliferator activator receptor gamma-independent mechanisms involving reactive oxygenated species. *J Biol Chem* 2002;277:29681–5.
- [30] Gardner OS, Dewar BJ, Graves LM. Activation of mitogen-activated protein kinases by peroxisome proliferator-activated receptor ligands: an example of nongenomic signaling. *Mol Pharmacol* 2005;68:933–41.
- [31] Zang C, Liu H, Bertz J, Possinger K, Koeffler HP, Elstner E, et al. Induction of endoplasmic reticulum stress response by TZD18, a novel dual ligand for peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2009;8:2296–307.
- [32] Sakae M, Adachi H, Dawson M, Jetten AM. Induction of Egr-1 expression by the retinoid AHPN in human lung carcinoma cells is dependent on activated ERK1/2. *Cell Death Differ* 2001;8:411–24.
- [33] Moon Y, Yang H, Kim YB. Up-regulation of early growth response gene 1 (EGR-1) via ERK1/2 signals attenuates sulindac sulfide-mediated cytotoxicity in the human intestinal epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;223:155–63.
- [34] Orellana A, Holuigue L, Hidalgo PC, Faundez V, Gonzalez A, Bronfman M. Ciprofibrate, a carcinogenic peroxisome proliferator, increases the phosphorylation of epidermal-growth-factor receptor in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1993;215:903–6.
- [35] Pauley CJ, Ledwith BJ, Kaplanski C. Peroxisome proliferators activate growth regulatory pathways largely via peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent mechanisms. *Cell Signal* 2002;14:351–8.
- [36] Gardner OS, Dewar BJ, Earp HS, Samet JM, Graves LM. Dependence of peroxisome proliferator-activated receptor ligand-induced mitogen-activated protein kinase signaling on epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* 2003;278:46261–9.
- [37] Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, et al. The expression patterns of eR, Pr, HeR2, cK5/6, eGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell Lines. *Breast Cancer Basic and Clinical Research* 2010;4:35–41.
- [38] Palakurthi SS, Aktas H, Grubisich LM, Mortensen RM, Halperin JA. Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res* 2001;61:6213–8.
- [39] Chopra B, Georgopoulos NT, Nicholl A, Hinley J, Oleksiewicz MB, Southgate J. Structurally diverse peroxisome proliferator-activated receptor agonists induce apoptosis in human uro-epithelial cells by a receptor-independent mechanism involving store-operated calcium channels. *Cell Prolif* 2009;42:688–700.
- [40] Mayer SI, Thiel G. Calcium influx into MIN6 insulinoma cells induces expression of Egr-1 involving extracellular signal-regulated protein kinase and the transcription factors Elk-1 and CREB. *Eur J Cell Biol* 2009;88:19–33.
- [41] Gitenay D, Baron VT. Is EGR1 a potential target for prostate cancer therapy? *Future Oncol* 2009;5:993–1003.
- [42] Lee SH, Bahn JH, Choi CK, Whitlock NC, English AE, Safe S, et al. ESE-1/EGR-1 pathway plays a role in tofenamic acid-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2008;7:3739–50.
- [43] Yu J, Baron V, Mercola D, Mustelin T, Adamson ED. A network of p73, p53 and Egr1 is required for efficient apoptosis in tumor cells. *Cell Death Differ* 2007;14:436–46.
- [44] Li CJ, Ning W, Matthey MA, Feghali-Bostwick CA, Choi AM. MAPK pathway mediates EGR-1-HSP70-dependent cigarette smoke-induced chemokine production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L1297–303.
- [45] Gutierrez LL, Maslinkiewicz A, Curi R, de Bittencourt Jr PI. Atherosclerosis: a redox-sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins. *Biochem Pharmacol* 2008;75:2245–62.
- [46] Ban JO, Kwak DH, Oh JH, Park EJ, Cho MC, Song HS, et al. Suppression of NF-kappaB and GSK-3beta is involved in colon cancer cell growth inhibition by the PPAR agonist troglitazone. *Chem Biol Interact* 2010;188:75–85.
- [47] Liang SH, Zhang W, McGrath BC, Zhang P, Cavener DR. PERK (eIF2alpha kinase) is required to activate the stress-activated MAPKs and induce the expression of immediate-early genes upon disruption of ER calcium homeostasis. *Biochem J* 2006;393:201–9.
- [48] Muthukkumar S, Nair P, Sells SF, Maddiwar NG, Jacob RJ, Rangnekar VM. Role of EGR-1 in thapsigargin-inducible apoptosis in the melanoma cell line A375-C6. *Mol Cell Biol* 1995;15:6262–72.

4. Résultats complémentaires

Nous avons aussi étudié les autres membres de la famille des EGR dans les cellules MCF7 exposées à la $\Delta 2$ -TGZ.

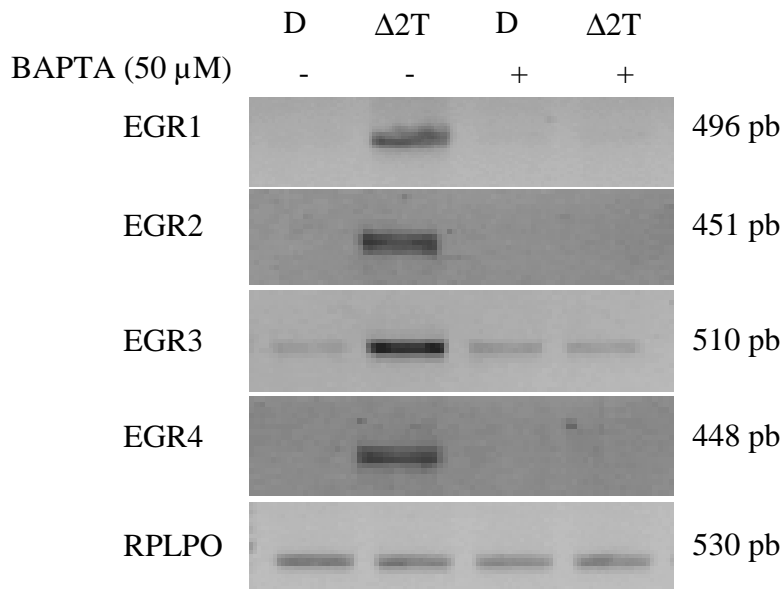


Figure 40 : L'expression des quatre EGR est stimulée en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ mais pas en présence de BAPTA-AM. Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes EGR1, EGR2, EGR3 et EGR4 dans les cellules MCF7 traitées à la $\Delta 2$ -TGZ ($\Delta 2T$, 25 μ M, 3 heures) seule ou après 30 minutes de prétraitement avec l'inhibiteur BAPTA-AM (chélateur de calcium ; 50 μ M).

D : DMSO 0,05%.

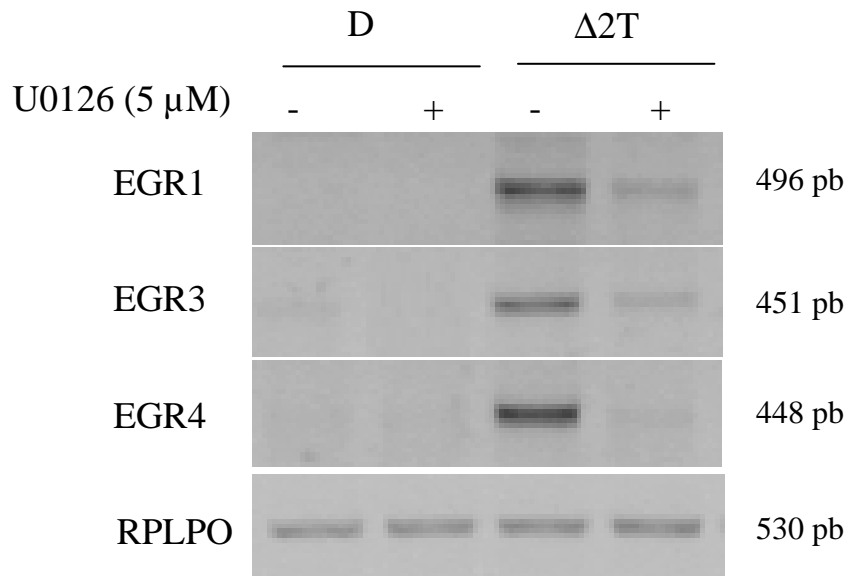


Figure 41 : L'induction par la Δ 2-TGZ des EGR 1, 3 et 4 est inhibée en présence de U0126. Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes EGR1, EGR3 et EGR4 dans les cellules MCF7 traitées à la Δ 2-TGZ (Δ 2T, 25 μ M, 3 heures) seule ou après 30 minutes de prétraitement avec l'inhibiteur U0126 (inhibiteur de la voie ERK1/2 ; 5 μ M).
D : DMSO 0,05%.

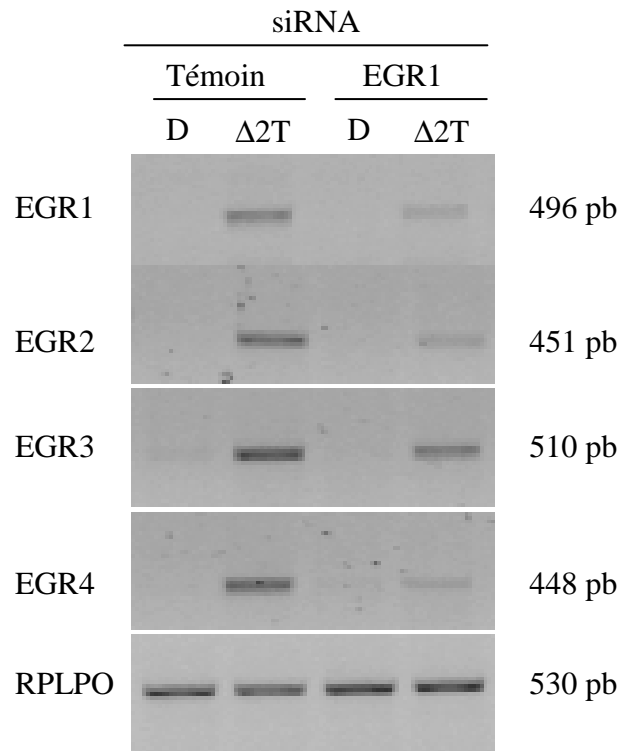


Figure 42 : L'inhibition de l'expression d'EGR1 par siRNA inhibe l'expression des autres EGR. Les cellules MCF7 sont transfectées de manière transitoire avec un ARN interférent ciblant EGR1 ou un siRNA témoin. 48 heures après la transfection, les cellules sont traitées à la Δ 2-TGZ (Δ 2T, 25 μ M, 3 heures). Les niveaux d'expression des ARNm EGR1, EGR2, EGR3, EGR4 et RPLPO sont analysés par RT-PCR. RPLPO est utilisé comme témoin interne.

D : DMSO 0,05%.

Ces résultats seront discutés dans la dernière partie intitulée « Discussion et perspectives ».

II. Induction PPAR γ -indépendante du stress du réticulum endoplasmique

$\Delta 2$ -troglitazone triggers endoplasmic reticulum stress in breast cancer cells.

Xiao Yao, Sarra Chbicheb, Sabine Mazerbourg, Sandra Kuntz, Michel Boisbrun, Yves Chapleur, Isabelle Grillier-Vuissoz, Stephane Flament.

Article à soumettre.

1. Introduction

L'absence de thérapie ciblée pour traiter des patientes montrant des tumeurs mammaires triples-négatives (ER⁻/PR⁻/HER2⁻) d'une part, et les problèmes de résistances aux traitements existants (anti-EGFR ou anti-œstrogènes) développés par d'autres patientes atteintes de cancer du sein d'autre part, justifient de développer de nouveaux agents thérapeutiques. Dans ce contexte, les ligands de PPAR γ , principalement les thiazolidinediones (TZDs) sont étudiés en tant qu'agents anticancéreux. Les ligands de PPAR γ peuvent inhiber la prolifération et induire la différenciation des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* et *in vivo*. Plusieurs de ces composés induisent des effets PPAR γ -indépendants et l'implication de PPAR γ dans l'effet anticancéreux n'est pas très claire. Les effets PPAR γ -indépendants sont montrés grâce à l'utilisation d'antagonistes de PPAR γ , d'analogues inactifs des TZDs telle que la $\Delta 2$ -TGZ ou par la transfection d'un dominant négatif PPAR γ ou d'ARN interférant ciblant PPAR γ . Nos précédentes études réalisées sur des lignées de cellules cancéreuses mammaires ont montré que la $\Delta 2$ -TGZ induit des effets antiprolifératifs associés à la dégradation par le protéasome de protéines clés telles que le récepteur des œstrogènes ER α et la cycline D1. Cependant, les mécanismes impliqués dans les effets anticancéreux de la $\Delta 2$ -TGZ restent à déterminer.

De récentes études ont montré que les TZDs peuvent induire un stress du réticulum endoplasmique (RE) dans les cellules cancéreuses. Le RE est le site de synthèse, de modifications post-traductionnelles et de repliement des protéines. Le stress du RE est induit lorsque les protéines sont non repliées ou mal conformées et s'accumulent dans la lumière du RE. La réponse UPR (Unfolded Protein Response), activée après un stress du RE, est médiée par trois récepteurs transmembranaires : PERK, IRE1 et ATF6. Ces trois protéines senseurs initient des cascades de signalisation permettant le repliement protéique via l'augmentation de l'expression des protéines chaperonnes du RE (comme BiP), en réduisant l'accumulation des

protéines malconformées et en inhibant la traduction. L'UPR est une réponse de protection des cellules contre de nombreux stress. Cependant, si le stress persiste, l'UPR bascule des signaux de survie vers les signaux apoptotiques. L'un des principaux médiateurs des signaux proapoptotiques est le facteur de transcription CHOP. Une étude a montré que TZD18, ligand de PPAR α/γ , induit, indépendamment de ces récepteurs, l'activation de la réponse UPR, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7 et MDA-MB-231. TZD18 induit une augmentation de l'expression des marqueurs spécifiques du stress du RE (CHOP, GRP78, GADD34, ATF4, BiP, ATF6), des marqueurs apoptotiques (Bax et Bak) ainsi que la phosphorylation de PERK/eIF2 α (Zang et *al.*, 2009). Récemment, il a été montré que STG28, un dérivé de Δ 2-TGZ induit aussi un stress du RE dans les cellules de cancer de prostate LNCaP (Wei et *al.*, 2010).

Dans les cellules MCF7, nous avons montré une augmentation de calcium intracellulaire dès 2 minutes de traitement à la Δ 2-TGZ. Cette augmentation a lieu en absence de calcium extracellulaire, ce qui suggère une libération de calcium à partir du RE plutôt qu'un influx de calcium d'origine extracellulaire (Chbicheb et *al.*, 2011). Toutes ces données suggèrent fortement que la Δ 2-TGZ pourrait induire un stress du RE dans les cellules cancéreuses mammaires.

Afin de mieux comprendre le mode d'action des thiazolidinediones dans les cellules cancéreuses mammaires, le but de cette étude est de déterminer si la Δ 2-TGZ, agoniste inactif de PPAR γ , est capable d'induire un stress du RE et si cet évènement est crucial dans l'effet antiprolifératif. Nous avons utilisé une lignée de cellules hormono-dépendantes MCF7 et une lignée de cellules hormono-indépendantes MDA-MB-231. Nos résultats montrent qu'un stress du RE se produit de manière précoce suite à un traitement à la Δ 2-TGZ.

2. Résultats

La Δ 2-TGZ induit l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le stress du RE.

Des analyses par puce à ADN ont été réalisées afin de déterminer le profil d'expression des gènes induits après une cinétique de traitement des cellules MCF7 à la Δ 2-TGZ à 25 μ M. Dans les cellules MCF7, 351 gènes sur 28869 gènes présentent une augmentation d'expression d'au moins 2 fois après 12 heures de traitement avec 25 μ M de Δ 2-TGZ. Parmi

les 351 gènes, 19 gènes sont impliqués dans le stress du RE dont les gènes CHOP/GADD153/DDIT3, CHAC1 (ChaC, cation transport regulator homolog 1), DNAJB9 (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9/MDG1/ERdj4), PPP1R15A (protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A/GADD34), ERN1 (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1/IRE1), HERPUD1 (homocysteine-inducible, ER stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1/HERP), GADD45A (growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha/DDIT1), la chaperonne BiP aussi appelée GRP78 (glucose-regulated protein, 78 kDa) ou HSPA5, et les facteurs de transcription ATF3 et ATF4 (activating transcription factor 3 et 4). Parmi ces 19 gènes, 7 voient leur expression stimulée plus de 2 fois après 3 heures de traitement.

La Δ 2-TGZ induit un stress du RE dans les cellules MCF7.

Afin de confirmer les données des puces à ADN, nous avons examiné l'expression de plusieurs gènes du stress par immunoempreintes et RT-PCR sur une cinétique de traitement de cellules MCF7 à la Δ 2-TGZ (25 μ M). Après 1,5 heure de traitement, la Δ 2-TGZ induit la phosphorylation de PERK (PKR-like ER kinase), attestée par la modification de sa mobilité électrophorétique (« mobility shift »), ainsi que la phosphorylation du facteur eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α) au niveau de la sérine 51. Cet évènement conduit à l'atténuation de la traduction et donc limite la synthèse protéique. Par ailleurs, l'activation de IRE1 α est montrée par la présence de la forme épissée de l'ARNm XBP1 codant un facteur de transcription, observée dès 3 heures de traitement à la Δ 2-TGZ. Nous pouvons noter qu'un taux important d'ARNm XBP1 reste non-épissé même après 12 heures de traitement. L'activation de l'axe de signalisation IRE1 α /XBP1 induit l'expression d'un certain nombre de gènes cibles de l'UPR comme des gènes codant des protéines chaperonnes. Dans les cellules MCF7, la protéine chaperonne BiP/GRP78 est induite après 6h de traitement à la Δ 2-TGZ.

Quand les processus de protection des cellules et de restauration de la fonction du RE par la réponse UPR échouent, l'apoptose est déclenchée. Les signaux pro-apoptotiques sont principalement médiés par l'induction de CHOP qui est régulée par de nombreux facteurs de transcription dont ATF3. Dans les cellules MCF7 traitées avec 25 μ M de Δ 2-TGZ, l'augmentation de l'ARNm ATF3 est observée dès 3 heures de traitement et la protéine CHOP après 6 heures. Après traduction, CHOP est transloquée dans le noyau des cellules

MCF7 exposées pendant 12 heures à la $\Delta 2$ -TGZ comme le montrent les observations au microscope à fluorescence.

Aucun de ces changements associés au stress du RE n'est observé dans les cellules témoins traitées au DMSO.

La $\Delta 2$ -TGZ induit un stress du RE dans les cellules MDA-MB-231.

La $\Delta 2$ -TGZ est capable d'induire une inhibition de prolifération des cellules hormono-indépendantes MDA-MB-231 (Colin et *al.*, 2010). Nous avons donc également étudié la capacité de la $\Delta 2$ -TGZ à induire un stress du RE dans ces cellules. Des travaux antérieurs ont montré que les cellules MDA-MB-231 sont plus sensibles à la $\Delta 2$ -TGZ (Colin et *al.*, 2010). Nous avons donc utilisé ce composé à 15 μ M au lieu de 25 μ M. Nos résultats montrent qu'en présence de 1% de sérum de veau foetal (SVF), les cellules non-traitées (DMSO) présentent déjà un ralentissement de mobilité électrophorétique de PERK et une phosphorylation (sur la sérine 51) de eIF2 α . Le traitement à la $\Delta 2$ -TGZ ne modifie pas ce profil protéique. Par contre, dans les cellules MDA-MB-231 cultivées en présence de 10% de SVF, PERK et eIF2 α sont sous forme inactive. La diminution de la concentration en SVF suffit donc à activer cette voie du stress du réticulum. Par contre, dans les cellules MDA-MB-231 traitées au DMSO dans un milieu contenant 1% de SVF, nous n'observons pas d'épissage de l'ARNm XBP1. Cette composante du stress du réticulum n'est donc pas activée par l'appauvrissement en sérum. Dans ces conditions de culture, lors d'un traitement à la $\Delta 2$ -TGZ, cet épissage est clairement observé dès 1,5 heure. Il est beaucoup plus important dans les cellules MDA-MB-231 que dans les cellules MCF7.

La protéine BiP, dont l'expression dépend de l'axe IRE1 α /XBP1, n'est pas induite dans les cellules témoins mais elle l'est après 12 heures de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ. Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de l'ARNm ATF3 a lieu dès 1,5 heure de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ suivie de l'expression de la protéine CHOP nettement induite après 6 heures. Les analyses par immunoempreintes sont confirmées par les observations au microscope à fluorescence qui montrent en plus une accumulation nucléaire de la protéine CHOP dans les cellules MDA-MB-231 exposées pendant 12 heures à la $\Delta 2$ -TGZ.

3. Conclusion

Les précédentes études menées au laboratoire avaient montré que la $\Delta 2$ -TGZ inhibait la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF7 et MDA-MB-231. Cependant, le mécanisme par lequel la $\Delta 2$ -TGZ inhibe la prolifération cellulaire n'est pas totalement élucidé. L'analyse par puce à ADN a permis de mettre en évidence que la $\Delta 2$ -TGZ induit l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans la réponse au stress du RE dont GRP78, XBP1, CHOP, ATF6, ATF3, ATF4 et CHAC1. Les immunoempreintes et RT-PCR ont ensuite confirmé que la $\Delta 2$ -TGZ induit un stress du RE en activant la protéine senseur PERK et son effecteur eIF2 α dans les cellules MCF7. L'augmentation de l'activité d'IRE1 α , mesurée par l'épissage de son substrat, l'ARNm XBP1 est aussi induite par la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules MCF7 et MDA-MB-231. Dans les deux lignées cellulaires, la $\Delta 2$ -TGZ induit une augmentation plus tardive de la protéine chaperonne BiP et de la protéine pro-apoptotique CHOP. L'augmentation de calcium intracellulaire très rapide consécutive au traitement à la $\Delta 2$ -TGZ révélée dans la première partie de ce travail de thèse pourrait donc être en relation avec le stress du RE montré dans cette deuxième partie. Cependant, le rôle du stress du RE dans l'effet antiprolifératif de la $\Delta 2$ -TGZ reste à déterminer.

Δ 2-troglitazone triggers endoplasmic reticulum stress in breast cancer cells

**Xiao Yao^a, Sarra Chbicheb^a, Sabine Mazerbourg^a, Sandra Kuntz^a, Michel Boisbrun^b,
Yves Chapleur^b, Isabelle Grillier-Vuissoz^a, Stephane Flament^a**

^aEA 4421 Signalisation, Génomique et Recherche Translationnelle en Oncologie (SIGRETO) Nancy-
Université, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

^bGroupe S.U.C.R.E.S., UMR 7565 CNRS, Nancy-Université, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Corresponding author: Stéphane Flament, EA 4421 Signalisation, Génomique et Recherche
Translationnelle en Oncologie (SIGRETO), Université Henri Poincaré, Nancy-Université, Faculté des
Sciences, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy; Cedex France. Tél : 011 33(0) 3 83 68 42 52, Fax :
011 33(0) 3 83 68 40 01; E-mail: stephane.flament@sbiol.uhp-nancy.fr

Abstract

It is now well established that PPAR γ -independent pathways play an important part in the anti-cancer effects of the PPAR γ -ligands such as thiazolidinediones (TZDs). The aim of this study was to provide additional information in order to refine our knowledge on the mechanism of action of such compounds in breast cancer cells. A microarray study indicated that many genes involved in endoplasmic reticulum (ER) stress were up-regulated following treatment of MCF7 cells (hormone-dependent) with 25 μ M Δ 2-TGZ, a TZD derivative devoid of PPAR γ agonist activity. The changes were detected after 3 hours and were more important after 12 hours. Δ 2-TGZ treatment induced a rapid increase in ATF3 mRNA level and the splicing of a small amount of XBP1 both detected using RT-PCR in samples collected after 3 hours. The phosphorylation of PERK and its target eIF2 α were observed on western blots as soon as 1.5 hour of treatment. An accumulation of BiP and CHOP were also seen at 6 hours. Immunofluorescence microscopy indicated that CHOP was localized into the nucleus of treated cells. In comparison, none of these changes appeared in DMSO-treated cells. In MDA-MB-231 cells (hormone-independent), PERK and eIF2 α were already in their phosphorylated form in our control culture conditions. Nevertheless, overexpression of ATF3, splicing of XBP1, accumulation of BiP and CHOP were observed following Δ 2-TGZ treatment like in MCF7 cells. Taken together, these results clearly demonstrate that ER stress is an early response of different types of breast cancer cells exposed to the PPAR γ inactive TZD Δ 2-TGZ.

Introduction

The ER is the primary site of synthesis, posttranslational modification, and folding of secreted and membrane-bound proteins. This organelle also co-ordinates lipid biosynthesis and Ca^{2+} storage and release. Protein folding in the ER is impaired under various physiological and pathological conditions, collectively called ER stress [1]. For instance, this can be provoked by perturbations in Ca^{2+} homeostasis, glucose/energy deprivation or redox changes. Cancer cells exhibit elevated glucose metabolism and are often exposed to tumor hypoxia, resulting in ER stress [2]. ER stress activates a set of signaling pathways known as the unfolded protein response (UPR) [3]. UPR is a cellular protective response against various stresses. UPR is mediated by three transmembrane receptors: Pancreatic endoplasmic reticulum kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK), Activating Transcription Factor 6 (ATF6) and Inositol Requiring Enzyme 1 (IRE1). These three “sensor” proteins each initiate signaling cascades that promote protein folding via up-regulation of ER protein chaperones and reduce the accumulation of unfolded proteins via inhibition of general protein translation. The ER chaperone BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein) also called GRP78 (glucose-regulated protein, 78 kDa) is a major protective player of the UPR. Overexpression of BiP has been reported in various cancer types, and could be attributed to glucose deprivation stress or anoxia in poorly vascularized tumors [2]. Besides, it seems that BiP also protects cells from chemotherapeutic agents [4], and could be a predictive factor of resistance. For instance, in breast cancer, BiP expression level is predictive of patient’s responsiveness to adriamycin-based chemotherapy [5]. The protective response of UPR can switch to a proapoptotic signaling if the unfolded protein accumulation is persistent and the stress cannot be relieved [6, 7]. One of the major mediators of the proapoptotic signaling of ER stress is the transcriptional factor CHOP (also known as GADD153), which initiates apoptotic pathways [8]. Then, ER stress has been suggested as a potential interesting target for anticancer drugs [2]. One approach could be to inhibit UPR components whereas another approach could be to increase ER stress or to induce a high level of ER stress [2].

Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ($\text{PPAR}\gamma$), mainly thiazolidinediones (TZDs), have been proposed as anticancer agents and tested in clinical trials for breast cancer [9, 10]. $\text{PPAR}\gamma$ ligands can inhibit proliferation and induce differentiation of breast cancer cell lines *in vitro* and *in vivo* [11-14]. Nevertheless, many of these compounds also induce $\text{PPAR}\gamma$ -independent effects and the involvement of $\text{PPAR}\gamma$ in the anticancer action is not clear [15, 16]. The $\text{PPAR}\gamma$ independent events were shown using $\text{PPAR}\gamma$ antagonists, transfection of dominant negative $\text{PPAR}\gamma$ isoforms, $\text{PPAR}\gamma$ -targeted

RNA interference as well as PPAR γ inactive TZD analogs like $\Delta 2$ -TGZ [17-19]. The $\Delta 2$ -derivatives possess a double bond adjoining the terminal thiazolidine-2,4-dione ring which abolished agonist activity, presumably due to the increased structural rigidity surrounding the heterocyclic system [20]. Our previous studies performed in breast cancer cell lines have demonstrated the antiproliferative action of $\Delta 2$ -TGZ which is associated with proteasomal degradation of key proteins such as ER α and cyclinD1 [19, 21]. However, the mechanisms involved in the anticancer effects of $\Delta 2$ -TGZ have still to be elucidated.

Interestingly, a few studies indicate that TZDs including derivatives of the $\Delta 2$ series could induce endoplasmic reticulum (ER) stress in various cell types. In ES cells conventional TZDs like CGZ and TGZ were shown to promote calcium release from the endoplasmic reticulum (ER) leading to PKR-dependent phosphorylation of eIF2 α [22]. This occurred even in PPAR γ ^{-/-} ES cells, suggesting it was a PPAR γ -independent event. In rat liver epithelial cells, CGZ and TGZ could induce PERK and eIF2 α phosphorylation, suggesting endoplasmic reticulum (ER) stress [23]. The co-treatment with a CamKII inhibitor blunted PERK and eIF2 α phosphorylation. Surprisingly, $\Delta 2$ -CGZ and $\Delta 2$ -TGZ were less effective in inducing PERK and eIF2 α phosphorylation than their parent TZDs. In breast cancer cells, mainly MCF-7 and MDA-MB-231, the dual ligand for PPAR α/γ TZD18, was more precisely demonstrated to induce of an ER stress response by microarray study and molecular analyses showing not only the phosphorylation of PERK and eIF2 α , but also the activation of ATF6, the splicing of XBP1 and the upregulation of BiP [24], This compound also increases ER stress-related cell death-regulators such as CHOP. Very recently, STG28, a $\Delta 2$ -TGZ derivative, was also shown to induce ER stress in prostate cancer cells [25].

We have recently reported that in MCF-7 cells, $\Delta 2$ -TGZ could trigger an increase in cytosolic calcium as soon as 2 minutes after the beginning of the treatment [26]. This calcium increase occurred even in the absence of extracellular calcium, indicating a release from endoplasmic reticulum. In addition to the results obtained with TZD derivatives in other cell types described above, this result strongly suggests that $\Delta 2$ -TGZ could trigger ER stress in breast cancer cells. In order to better understand the mode of action of thiazolidinediones in breast cancer cells, the aim of our study was to determine if the PPAR γ inactive compound $\Delta 2$ -TGZ could trigger ER stress and if this process took an important part in the antiproliferative effect. To address this issue, we used MCF7 that is a hormone-dependent cell line and MDA-MB-231 that is a hormone-independent one. Our results clearly show that ER stress occurs early after exposure to $\Delta 2$ -TGZ.

Materials and methods

Cell culture and treatment

The human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). MCF7 cells were cultured at 37°C under 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) containing phenol red and supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Sigma–Aldrich, Lyon, France). MDA-MB-231 cells were cultured at 37°C without CO₂ in L-15 medium (Invitrogen) containing phenol red and supplemented with 10% FCS. 24 hours after plating, medium was replaced by the appropriate medium containing 1% FCS and treatments with Δ 2-TGZ or DMSO (Sigma-Aldrich) were performed 24 hours later.

The synthesis of Δ 2-TGZ was achieved according to slight modifications of known procedures [27, 28]. Experimental details will be published elsewhere. The identity and purity of this synthetic derivative were verified by proton nuclear magnetic resonance and elemental analysis. Δ 2-TGZ was dissolved at 50 mM in DMSO and stock solution was stored at -20°C and further diluted to appropriate concentrations with medium before use.

Microarray analysis

MCF7 cells were cultured in 6-well culture plates for 0, 3 or 12 hours in presence of Δ 2-TGZ (25 μ M) or the vehicle DMSO (0.05%). Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and then processed at the “Biopuces” Core Facility of IGBMC (Strasbourg, France). Total RNA was reverse transcribed into cDNA by using a T7 promoter-dT primer, amplified, and biotinylated in an *in vitro* transcription reaction by using T7 RNA polymerase before hybridization to the GeneChip Human Gene 1.0 ST Array (containing 764,885 distinct probes including 28,869 well-annotated genes) according to the manufacturer's protocol (Affymetrix, Santa Clara, USA). The Expression Console™ software (EC) was used to scan, quantify and normalize the gene chips under default scan settings. Data were further analysed using Significance Analysis of Microarrays.

Genes differentially expressed between the cells treated with Δ 2-TGZ and the cells without treatment were selected with a threshold t test p value < 0.05, False Discovery Rate (FDR) < 10%, fold change > 2.0. Genes involved in ER stress were identified by a combination of Gene Ontology analysis; analysis was performed using the publicly available web-based tool DAVID [29]. Genomatix BiblioSphere Pathway Edition analysis (<http://www.genomatix.de/>) was performed to identify networks of genes and their biological connections.

Western immunoblotting

At the end of treatment for the times indicated in the text, cells were rinsed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). The cells were then scraped into ice-cold RIPA buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton-X100, 1% sodium deoxycholate) with freshly added 200 μ M Na_3VO_4 , 250 μ M phenylmethanesulfonyl fluoride, 5 μ g/mL leupeptin. The cell lysates were clarified by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min at 4°C. Protein concentration was determined using the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France).

For Bip and CHOP analysis, cell lysate was resuspended in Laemmli sample buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue) and heated at 95°C for 5 min to denature proteins.

To analyze PERK and eIF2 α phosphorylation, cell lysis was performed directly in ice-cold Laemmli sample buffer.

For each sample, total proteins samples were separated by 10% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membrane. Non specific binding sites were blocked in TNT buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) with 5% non-fat powder milk and membranes were then incubated with the primary antibodies diluted in blocking solution overnight at 4°C. The anti-CHOP mouse monoclonal antibody (SC-7351, Santa Cruz Biotechnology), the rabbit monoclonal antibodies raised against PERK (C33E10, Cell Signaling Technology, Danvers, USA), Bip (B1770, United States Biological, Swampscott, USA) and the rabbit polyclonal anti-phospho eIF2 α (11279-1, Signalway Antibody, Pearland, USA) were diluted at 1:1000. The rabbit polyclonal antibody anti-actin (SC-1615-R, Santa Cruz Biotechnology) was used diluted at 1:3000.

Once washed 3 times with TNT, membranes were probed with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 hour at room temperature. After 3 washes in TNT, the membranes were developed with ECL detection reagent using chemiluminescence (Thermo Fisher Scientific, Brebières France) according to the manufacturer's instructions and observed using a GelDoc 2000 imaging system (Bio-Rad Laboratories).

Immunofluorescence

MCF7 and MDA-MB-231 cells were seeded on glass coverslips and grown in their respective medium as described above. After exposure to Δ 2-TGZ or DMSO, coverslips were washed

with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 15 min. After washing with PBS, cells were permeabilized for 10 min in 0.5% Triton X100, washed with PBS and incubated for 30 minutes in a blocking solution (4% bovine serum albumin, 0.1% Triton X100 in PBS buffer) to reduce non specific binding of the antibodies. Then, coverslips were incubated with anti-CHOP monoclonal antibody diluted at 1:250 in the blocking solution for 1 hour. They were then washed 3 times in the blocking solution and exposed for 1 hour to Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG antibody (Invitrogen) diluted 1:1000 in the blocking solution. Finally, cells were rinsed with PBS 0.1% Triton X100 for 15 min and counterstained with Hoechst dye to stain nuclei. Fluorescence labeling was observed under an Eclipse 80i microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France). Images were collected using LuciaG software 4.81 (Laboratory imaging/Nikon).

Semi-quantitative RT-PCR

Cells were seeded in 6-well plates at a density of $5 \cdot 10^5$ cells/well. Cells were treated as previously described. Total RNA was extracted using TRIzol[®] reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized in 20 μ L volume containing 1 μ g RNA, 15 ng random hexamer primer, 1X Invitrogen buffer, 10 mM DTT, 0.5 mM of each dNTP, 1 U RNase inhibitor and 5 U of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). The mixture was incubated for 10 min at 25°C, for 110 min at 37°C and subsequently for 10 min at 70°C in order to stop the reaction.

The cDNA were further amplified by PCR. The specific primers are shown in Table 1. PCR was carried out in a thermal cycler (Eppendorf, Le Pecq, France) in a final volume of 25 μ L containing 2 μ L cDNA, 1X EconoTaq[™] Reaction buffer (-Mg), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of dNTP mix, 0.2 μ M of each primer and 2.5 U EconoTaq. Negative controls were always included. Amplification was carried out under the following conditions: (1) initial denaturation 94°C for 2 min ; (2) 94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec and 72°C for 45 sec ; (3) 10 min extension step at 72°C. The number of cycles was chosen to realize the analysis in the linear phase of the PCR reaction. 20 μ L of the PCR products were mixed with loading buffer (5 μ L) and submitted to electrophoresis in a 1.2% agarose gel (3% in case of XBP1 analysis) at 90 V for 35 min at room temperature. The gel was stained with ethidium bromide, viewed and photographed on a UV-transilluminator (GelDoc 2000, Bio-Rad Laboratories).

Results

The expression of ER stress-related genes is increased following $\Delta 2$ -TGZ exposure

The microarray analysis of MCF7 cells exposed to $\Delta 2$ -TGZ first reveals the induction of ER stress. When gene expression profiles were generated during a time course exposure to $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M), microarray analyses revealed that signals from 351 genes of 33297 probe sets on the human genechip were specifically increased ≥ 2 -fold after 12 hours in $\Delta 2$ -TGZ-treated MCF7 cells. Of the 351 genes, 19 genes were annotated as genes involved in ER stress (Table 2). These included the gene encoding C/EBP homologous protein *CHOP/GADD153/DDIT3*, the UPR-inducible gene *CHAC1* (ChaC, cation transport regulator homolog 1), *DNAJB9* (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9, also called *MDG1* or *ERdj4*), *PPP1R15A* (protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A, also called *GADD34*), *ERN1* (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1, also called *IRE1*), *HERPUD1* (homocysteine-inducible, ER stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1, also called *HERP*), *GADD45A* (growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha, also called *DDIT1*), the chaperone encoding gene *BiP* also called *GRP78* (glucose-regulated protein, 78 kDa) or *HSPA5*, and genes encoding the transcription factors *ATF3* and *ATF4* (activating transcription factor 3 and 4). Among these 19 genes, 7 were already stimulated more than 2-fold after 3 hours of treatment (Table 2).

$\Delta 2$ -TGZ triggers ER stress in MCF7 cells

In order to confirm the ER stress suggested by the microarray data, we examined several UPR-associated effectors by western blot during a time course exposure of MCF7 cells to $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M).

As soon as 1.5 hour after exposure to $\Delta 2$ -TGZ, MCF7 cells showed an enhanced phosphorylation of PERK attested by a mobility shift and of its downstream target eIF2 α shown by a phospho-dependent antibody (Ser 51) (Fig. 1A). These events are required to realise translational attenuation during UPR. The activation of IRE1 was shown by the presence of a cleaved form of *XBPI* mRNA which was observed as early as 3 hours after addition of $\Delta 2$ -TGZ to MCF7 cells (Fig. 1B). Nevertheless, an important amount of *XBPI* mRNA was not affected by the cleavage even after 12 hours of MCF7 exposure to $\Delta 2$ -TGZ. The processing of *XBPI* leads to the synthesis of a highly active transcription factor that stimulates the transcription of chaperone genes such as BiP/GRP78.

On western blots, BiP showed an up-regulation which started 6 hours after the addition of $\Delta 2$ -TGZ (Fig. 1A). When cell protective changes mediated by the UPR fail to restore ER function, apoptosis is triggered. The proapoptotic signaling is mainly mediated by induction of CHOP that is upregulated by several factors including ATF3. Using RT-PCR, we observed that $\Delta 2$ -TGZ triggered an increase in ATF3 mRNA as soon as 3 hours after the exposure to $\Delta 2$ -TGZ (Fig. 1B). Besides, $\Delta 2$ -TGZ treatment induced CHOP expression which was detected on western blots after 6 hours (Fig. 1A). After translation, CHOP was translocated in the nucleus as shown by the high nuclear staining intensity of MCF7 cells exposed during 12 hours to $\Delta 2$ -TGZ (Fig. 2). None of these changes associated with ER stress were observed in control cells exposed to DMSO (Figs 1 and 2).

$\Delta 2$ -TGZ also triggers ER stress in MDA-MB-231 cells

Since $\Delta 2$ -TGZ treatment is known to inhibit proliferation not only of hormone-dependent but also of hormone-independent cells, we studied its capacity to induce ER stress in the MDA-MB-231 cell line. The latter is more sensitive to $\Delta 2$ -TGZ and consequently, we used 15 μ M instead of 25 μ M in MCF7 cells.

First, when we analyzed PERK activation, we did not detect any shift on the western blots whatever the time of exposure to $\Delta 2$ -TGZ (Fig. 3A). We also failed to detect any increase in the intensity of phosphorylated eIF2 α (Fig. 3A). Both immunodetection profiles were similar to those observed in control cells treated with DMSO (Fig. 3A). However, when we analysed MDA-MB-231 cells that were grown in 10% FCS containing medium, we observed that both proteins were inactive: PERK appeared under its fast migrating form and eIF2 α was not highly phosphorylated (faint staining with the phospho specific antibody) (Fig. 3A). So, in control MDA-MB-231 cells exposed to DMSO, due to the presence of 1% SVF in the culture medium, PERK and eIF2 α are already activated and the treatment with $\Delta 2$ -TGZ did not modify the immunodetection profile. Regarding XBP1 mRNA, no splicing was observed in control cells exposed to DMSO whereas a splicing was clearly detected as early as 1.5 hour after the addition of $\Delta 2$ -TGZ (Fig 3B). This splicing was more important than in MCF7 cells (compare with Fig. 1B). BiP showed an up-regulation only after 12 hours of $\Delta 2$ -TGZ treatment (Fig. 3A). In addition, an increase in ATF3 mRNA expression occurred as soon as 1.5 hour after $\Delta 2$ -TGZ treatment (Fig. 3B). CHOP was clearly up-regulated 6 hours after the addition of $\Delta 2$ -TGZ (Fig. 3A).

The induction of CHOP expression by $\Delta 2$ -TGZ treatment observed on western blots was confirmed by our analysis of CHOP subcellular distribution after 12 hours which also revealed a nuclear localisation (Fig. 4).

Discussion

In our previous studies, we have shown that $\Delta 2$ -TGZ could inhibit the proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells [21]. The potency to inhibit cell proliferation was correlated with the induction of the proteasomal degradation of two proteins: ER α in MCF7 and cyclin D1 in both MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines [19, 21]. Very recently, we reported that a rapid increase in intracellular calcium was observed in MCF7 cells exposed to $\Delta 2$ -TGZ and that this was due to the release of calcium from ER [26]. Since other TZD have been described as ER stress inducers in various cell types, it was interesting to determine if $\Delta 2$ -TGZ affected breast cancer cells in a similar way.

Our results including data from microarrays, RT-PCR, western immunoblotting and immunofluorescent microscopy clearly demonstrate that $\Delta 2$ -TGZ triggers ER stress in MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. Since $\Delta 2$ -TGZ is devoid of PPAR γ agonist activity, ER stress is induced in a PPAR γ -independent manner [19]. These results are consistent with the fact that TGZ (and CGZ) triggers an increase in $[Ca^{2+}]_i$ and an eIF2 α phosphorylation (at Ser 51)-related inhibition of translation in PPAR γ ^{-/-} embryonic stem cells [22]. Our findings are also similar to those obtained in MCF7 and MDA-MB-231 cells exposed to TZD18, a dual ligand for PPAR α/γ [24]. Indeed, TZD18 induced ER stress (attested by microarray analysis and various ER stress markers) in both cell lines and this compound induced this response even in absence of PPAR α or γ . Our results are also in agreement with the fact that OSU-CG12, a PPAR γ inactive derivative of CGZ, triggers eIF2 α phosphorylation in LNCaP prostate cancer cells [25]. Moreover, OSU-CG12 and STG28, a PPAR γ inactive derivative of TGZ, both trigger the accumulation of BIP and CHOP in these cells [25].

How the ER stress response of breast cancer cells reported in our study could be involved in the antiproliferative effect of $\Delta 2$ -TGZ? First, one might suggest that the activation of PERK and the phosphorylation of eIF2 α could be responsible for the decrease in cyclin D1 levels observed following $\Delta 2$ -TGZ treatment [21]. Indeed, it has been reported in mouse NIH3T3 fibroblasts treated with the ER stress inducer tunicamycin, that the translation of cyclin D1 was inhibited as deduced from ³⁵S incorporation in the protein [30]. In mouse embryonic fibroblasts, it was also shown that activation of the eIF2 α kinases PKR and PERK led to a

decrease in cyclin D1 levels [31]. However, this was not due to an effect on cyclin D1 translation but on cyclin D1 degradation which was dependent upon eIF2 α phosphorylation. In our study, we observed that in our culture conditions (1% FCS containing medium), MDA-MB-231 displayed activated PERK and Ser51-phosphorylated eIF2 α at the beginning of the treatment. However, our previous work indicates that cyclin D1 was still detected at this time and disappeared only in response to TGZ or Δ 2-TGZ treatment [21]. This could suggest that ER stress and especially the PERK-eIF2 α pathway are not responsible for the decrease in cyclin D1 observed following exposure to Δ 2-TGZ. In prostate cancer cells, it was reported that STG28 and OSU-CG12 triggered cyclin D1 proteasomal degradation by a new mechanism requiring the F-box protein β -TrCP (β -transducin repeat-containing protein which is a E3 ubiquitin ligase) [25, 32]. Although these compounds are also ER stress inducers, these authors associate cyclin D1 proteolysis to β -TrCP rather than to the PERK-eIF2 α component of ER stress [25]. A similar situation could be observed in response to Δ 2-TGZ in breast cancer cells and this might be tested.

In addition to the activation of the PERK/eIF2 α pathway, we observed another major difference between MCF7 and MDA-MB-231: the latter displays a higher amount of spliced XBP1 mRNA than MCF7. Splicing of XBP1 mRNA has been reported to depend on the activation of the RNase activity of IRE1 and to result in the synthesis of a potent XBP1 transcription factor [33]. This does not mean that this pathway is inactive in MCF7 cells since we could observe it in response to ER stress inducers like thapsigargin (data not shown). XBP1 stimulates the transcription of chaperone genes such as BiP. Despite the very low amount of spliced XBP1 mRNA occurring in MCF7 cells exposed to Δ 2-TGZ, we could observe the accumulation of BiP. This suggests that BiP accumulation could be the result of either ATF6 or PERK-eIF2 α [34, 35]. Interestingly, a similar difference in XBP1 mRNA splicing was observed between MCF7 and MDA-MB-231 cell lines in response to the dual PPAR α/γ agonist TZD18 [24]. In addition to the changes in the phosphorylation status of PERK and eIF2 α , the highest amount of spliced XBP1 mRNA observed in MDA-MB-231 suggests that these cells are more sensitive to stress inducing agents. If ER stress is involved in the antiproliferative effect of Δ 2-TGZ, it could therefore explain why MDA-MB-231 proliferation is inhibited at lower doses of ER stress inducing agents such as Δ 2-TGZ (after 24 hours of treatment in 1% FCS containing medium IC₅₀ = 29.7 μ M for MCF7 versus 16.6 μ M for MDA-MB-231) [21]. A higher sensitivity of MDA-MB-231 cell proliferation was also observed in response to TZD18 [24]. However, in LNCaP prostate cancer cells, the

transfection with CHOP siRNA did not modify the antiproliferative effect of OSU-CG12 [25]. In this study, the authors link OSU-CG12-induced apoptosis to the pathway leading to the proteasomal degradation of cyclin D1 rather than to ER stress [25].

To conclude, our results clearly show that $\Delta 2$ -TGZ triggers ER stress in both MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. Due to the occurrence of similar events (namely proteasomal degradation of cyclin D1 and induction of ER stress), it might be interesting to determine now if $\Delta 2$ -TGZ acts in breast cancer cells like STG28 or OSU-CG12 do in prostate cancer cells by inducing early energy restriction and what is the role played by ER stress in the antiproliferative effect of $\Delta 2$ -TGZ [25].

References

- [1] Naidoo N. The endoplasmic reticulum stress response and aging. *Rev Neurosci* 2009;20(1):23-37.
- [2] Healy SJ, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *Eur J Pharmacol* 2009;625(1-3):234-46.
- [3] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:519-29.
- [4] Li J, Lee AS. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med* 2006;6(1):45-54.
- [5] Lee E, Nichols P, Spicer D, Groshen S, Yu MC, Lee AS. GRP78 as a novel predictor of responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Cancer Res.* 2006;66(16):7849-53.
- [6] Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* 2006;11:5-13.
- [7] Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006;7:880-5.
- [8] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2004;11(4):381-9.
- [9] Burstein HJ, Demetri GD, Mueller E, Sarraf P, Spiegelman BM, Winer EP. 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* 2003;79:391-7.
- [10] Yee LD, Williams N, Wen P, Young DC, Lester J, Johnson MV, Farrar WB, Walker MJ, Povoski SP, Suster S, Eng C. Pilot study of rosiglitazone therapy in women with breast cancer: effects of short-term therapy on tumor tissue and serum markers. *Clin Cancer Res* 2007;13:246-52.
- [11] Kim KY, Kim SS, Cheon HG. Differential anti-proliferative actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2006;72:530-40.
- [12] Elstner E, Muller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Shintaku P, Said JW, Heber D, Koeffler HP. Ligands for peroxisome proliferator-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 U S A* 1998;95:8806-11.
- [13] Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, Fletcher C, Singer

- S, Spiegelman BM. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell* 1998;1:465-70.
- [14] Mehta RG, Williamson E, Patel MK, Koeffler HP. A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, retinoids, and prevention of preneoplastic mammary lesions. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:418-23.
- [15] Blanquicett C, Roman J, Hart CM. Thiazolidinediones as anti-cancer agents. *Cancer Ther* 2008;6:25-34.
- [16] Wei S, Yang J, Lee SL, Kulp SK, Chen CS. PPARgamma-independent antitumor effects of thiazolidinediones. *Cancer Lett* 2009;276:119-24.
- [17] Clay CE, Monjazebe A, Thorburn J, Chilton FH, High KP. 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis does not require PPAR gamma in breast cancer cells. *J Lipid Res* 2002;43:1818-28.
- [18] Shiau CW, Yang CC, Kulp SK, Chen KF, Chen CS, Huang JW. Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma. *Cancer Res* 2005;65:1561-9.
- [19] Lecomte J, Flament S, Salamone S, Boisbrun M, Mazerbourg S, Chapleur Y, Grillier-Vuissoz I. Disruption of ERalpha signalling pathway by PPAR gamma agonists: evidences of PPARgamma-independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2008;112:437-51.
- [20] Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995;83:803-12.
- [21] Colin C, Salamone S, Grillier-Vuissoz I, Boisbrun M, Kuntz S, Lecomte J, Chapleur Y, Flament S. New troglitazone derivatives devoid of PPARgamma agonist activity display an increased antiproliferative effect in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*.
- [22] Palakurthi SS, Aktas H, Grubissich LM, Mortensen RM, Halperin JA. Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res* 2001;61(16):6213-8.
- [23] Gardner OS, Shiau CW, Chen CS, Graves LM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent activation of p38 MAPK by thiazolidinediones involves calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase R: correlation with endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2005;280(11):10109-18.

- [24] Zang C, Liu H, Bertz J, Possinger K, Koeffler HP, Elstner E, Eucker J. Induction of endoplasmic reticulum stress response by TZD18, a novel dual ligand for peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2009;8(8):2296-307.
- [25] Wei S, Kulp SK, Chen CS. Energy restriction as an antitumor target of thiazolidinediones. *J Biol Chem* 2010;285(13):9780-91.
- [26] Chbicheb S, Yao X, Rodeau JL, Salamone S, Boisbrun M, Thiel G, Spohn D, Grillier-Vuissoz I, Chapleur Y, Flament S, Mazerbourg S. EGR1 expression: A calcium and ERK1/2 mediated PPAR(γ)-independent event involved in the antiproliferative effect of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones in breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2011; 81(9):1087-97.
- [27] Boschi D, Tron GC, Lazzarato L, Chegaev K, Cena C, Di Stilo A, Giorgis M, Bertinaria M, Fruttero R, Gasco A. NO-donor phenols: a new class of products endowed with antioxidant and vasodilator properties. *J Med Chem* 2006;49:2886-97.
- [28] Huang JW, Shiau CW, Yang J, Wang DS, Chiu HC, Chen CY, Chen CS. Development of small-molecule cyclin D1-ablative agents. *J Med Chem* 2006;49:4684-9.
- [29] Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003;4:P3.
- [30] Brewer JW, Hendershot LM, Sherr CJ, Diehl JA. Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(15):8505-10
- [31] Raven JF, Baltzis D, Wang S, Mounir Z, Papadakis AI, Gao HQ, Koromilas AE. PKR and PKR-like endoplasmic reticulum kinase induce the proteasome-dependent degradation of cyclin D1 via a mechanism requiring eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *J Biol Chem* 2008;283(6):3097-108
- [32] Wei S, Yang HC, Chuang HC, Yang J, Kulp SK, Lu PJ, Lai MD, Chen CS. A novel mechanism by which thiazolidinediones facilitate the proteasomal degradation of cyclin D1 in cancer cells. *J Biol Chem* 2008;283(39):26759-70
- [33] Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001;107(7):881-91

- [34] Thuerauf DJ, Marcinko M, Belmont PJ, Glembotski CC. Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability. *J Biol Chem* 2007;282(31):22865-78
- [35] Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 2000;6(5):1099-108

Table legends

Table 1: Primers for RT-PCR analyses. Primers sequences and PCR products length for the different genes tested are presented.

Table 2: List of genes related to ER stress and induced by $\Delta 2$ -TGZ treatment in MCF7 cells.

Figure legends

Figure 1: Various ER stress players are activated in MCF7 cells following $\Delta 2$ -TGZ treatment. A) Western blot analysis. MCF7 cells were treated with 25 μ M $\Delta 2$ -TGZ or DMSO (0.05%). At the indicated time-points, cells were harvested and lysed for protein analysis. After electrophoresis (SDS-PAGE), proteins were transferred on a nitrocellulose membrane for the study of PERK, eIF2 α , BiP and CHOP. Actin was used as a control. * indicates changes in the immunodetection profiles. B) RT-PCR analysis. MCF7 cells were treated with 25 μ M $\Delta 2$ -TGZ or DMSO (0.05%) and at the indicated time-points, they were harvested and lysed for mRNA analysis. *XBPI* and *ATF3* were studied using specific primers and the PCR products were observed after agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. *RPLPO* was used as a control. * indicates changes in the expression profiles.

Figure 2: CHOP is localised in the nucleus of MCF7 cells treated with $\Delta 2$ -TGZ. Cells were grown on coverslips and exposed to $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M) or DMSO (0.05%). After 12 hours, they were fixed and subjected to CHOP immunodetection and hoechst counterstaining. The merge picture clearly shows the nuclear localisation of CHOP in $\Delta 2$ -TGZ-treated cells. Bars represent 30 μ m.

Figure 3: Various ER stress players are activated in MDA-MB-231 cells following $\Delta 2$ -TGZ treatment. A) Western blot analysis. MDA-MB-231 cells were treated with 15 μ M $\Delta 2$ -TGZ or DMSO (0.05%). At the indicated time-points, cells were harvested and lysed for protein analysis. A sample of cells that were grown in 10% FCS containing medium was also included. After electrophoresis (SDS-PAGE), proteins were transferred on a nitrocellulose membrane for the study of PERK, eIF2 α , BiP and CHOP. Actin was used as a control. * indicates changes in the immunodetection profiles. B) RT-PCR analysis. MDA-MB-231 cells were treated with 15 μ M $\Delta 2$ -TGZ or DMSO (0.05%) and at the indicated time-points, they were harvested and lysed for mRNA analysis. *XBPI* and *ATF3* were studied using specific

primers and the PCR products were observed after agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. *RPLPO* was used as a control. * indicates changes in the expression profiles.

Figure 4: CHOP is localised in the nucleus of MDA-MB-231 cells treated with $\Delta 2$ -TGZ. Cells were grown on coverslips and exposed to $\Delta 2$ -TGZ (15 μ M) or DMSO (0.05%). After 12 hours, they were fixed and subjected to CHOP immunodetection and hoechst counterstaining. The merge picture clearly shows the nuclear localisation of CHOP in $\Delta 2$ -TGZ-treated cells. Bars represent 30 μ m.

Gene	Accession number	Primers	PCR product length (bp)
ATF3	NM_001040619	5'-ATGATGCTTCAACACCCAGGC-3' 5' CTCCTTGTAACGTCTCGATT-3'	546
XBP1	NM_005080	5'-TTACGAGAGAAAACATGGC-3' 5'-GGGTCCAAGTTGTCCAGAATGC-3'	282/256
RPLPO	NM_053275	5'-ACAACCCAGCTCTGGAGAAA-3' 5'-TCGTTTGTACCCGTTGATGA-3'	530

Table 1

Gene name	Genbank	Description	Fold induction	
			3h	12h
DDIT3/CHOP	NM_004083	DNA-damage-inducible transcript 3	8,48	13,77
FAM129A	NM_052966	Family with sequence similarity 129, member A	1,05	8,17
CHAC1	NM_024111	ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli)	4,18	8,16
DNAJB9	NM_012328	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	2,22	5,59
PPP1R15A	NM_014330	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	2,82	4,55
DDIT4	NM_019058	DNA-damage-inducible transcript 4	2,96	3,95
TNFRSF21	NM_014452	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	1,63	3,87
ATF3	NM_001040619	Activating transcription factor 3	3,15	3,66
GDF15	NM_004864	Growth differentiation factor 15	2,25	3,57
ERN1	NM_001433	Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1	1,20	3,47
HERPUD1	NM_014685	Homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	1,36	3,24
GADD45A	NM_001924	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	1,34	3,13
TRIB3	NM_021158	Tribbles homolog 3 (Drosophila)	1,37	3,06
TNFRSF10B	NM_003842	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	1,16	2,82
CDKN1A	NM_078467	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1,50	2,71
HSPA5/BiP	NM_005347	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	1,18	2,33
ATF4	NM_001675	Activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	1,70	2,32
SELS	NM_203472	Selenoprotein S	1,21	2,22
AARS	NM_001605	Alanyl-tRNA synthetase	1,14	2,04

Table 2

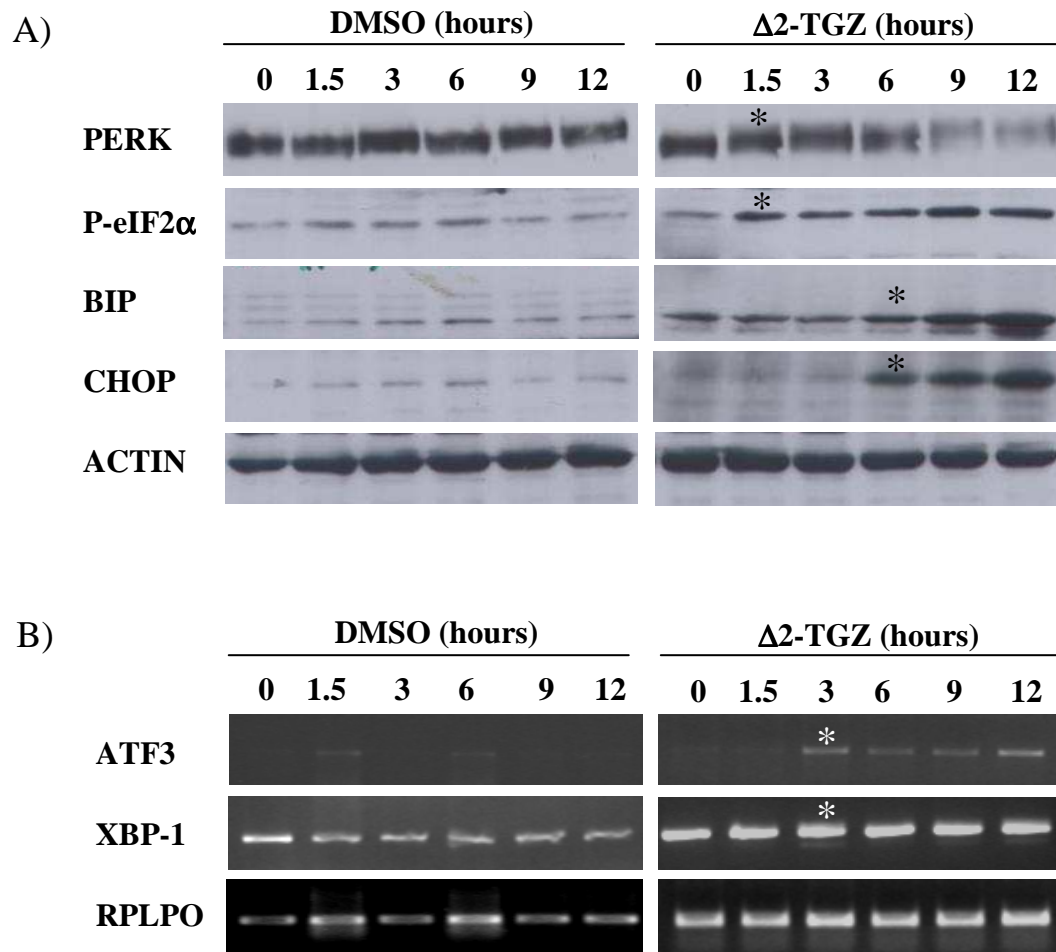


Figure 1

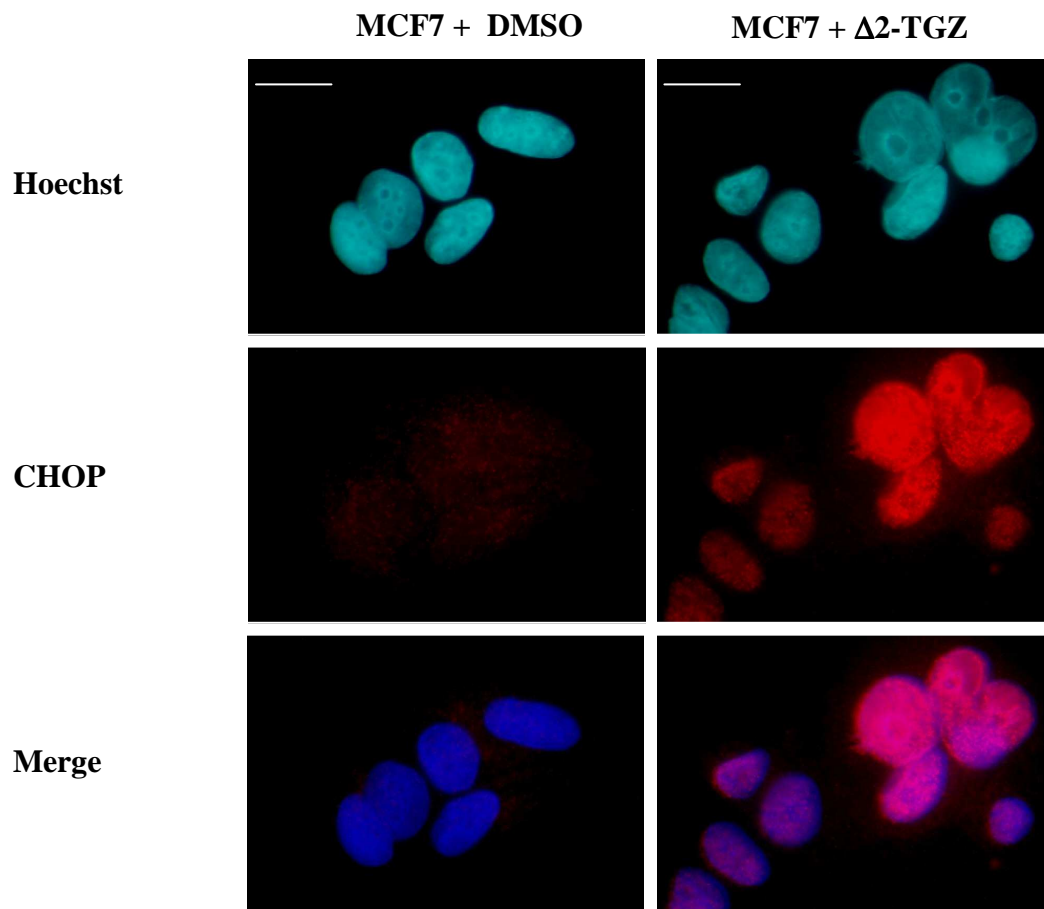


Figure 2

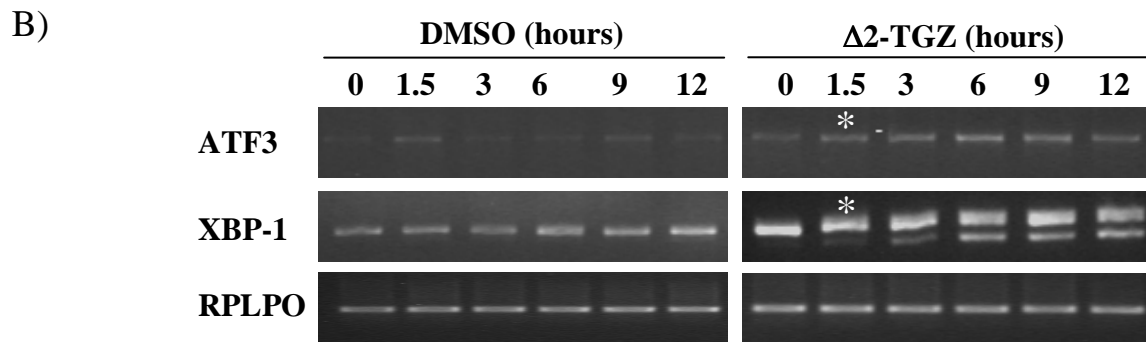
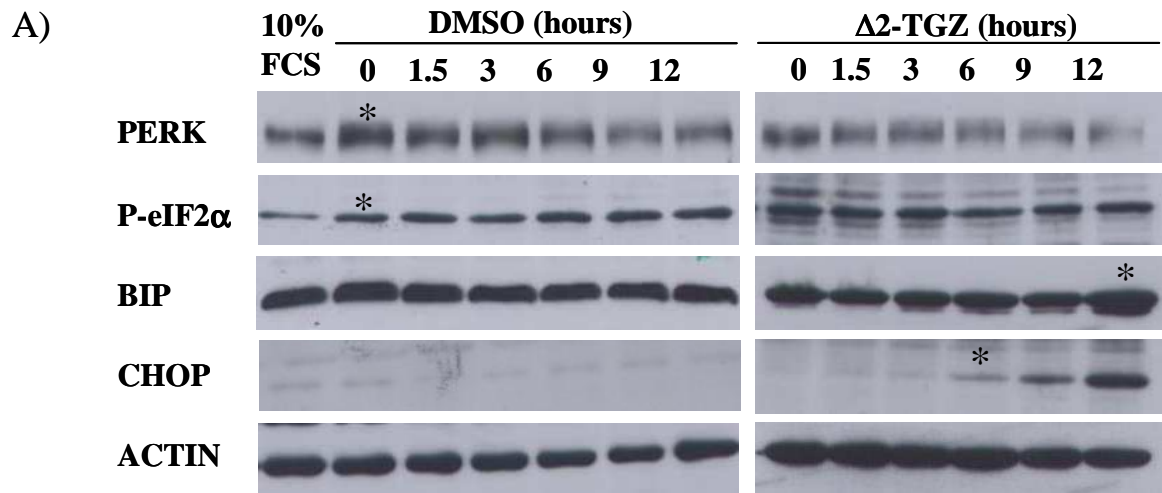


Figure 3

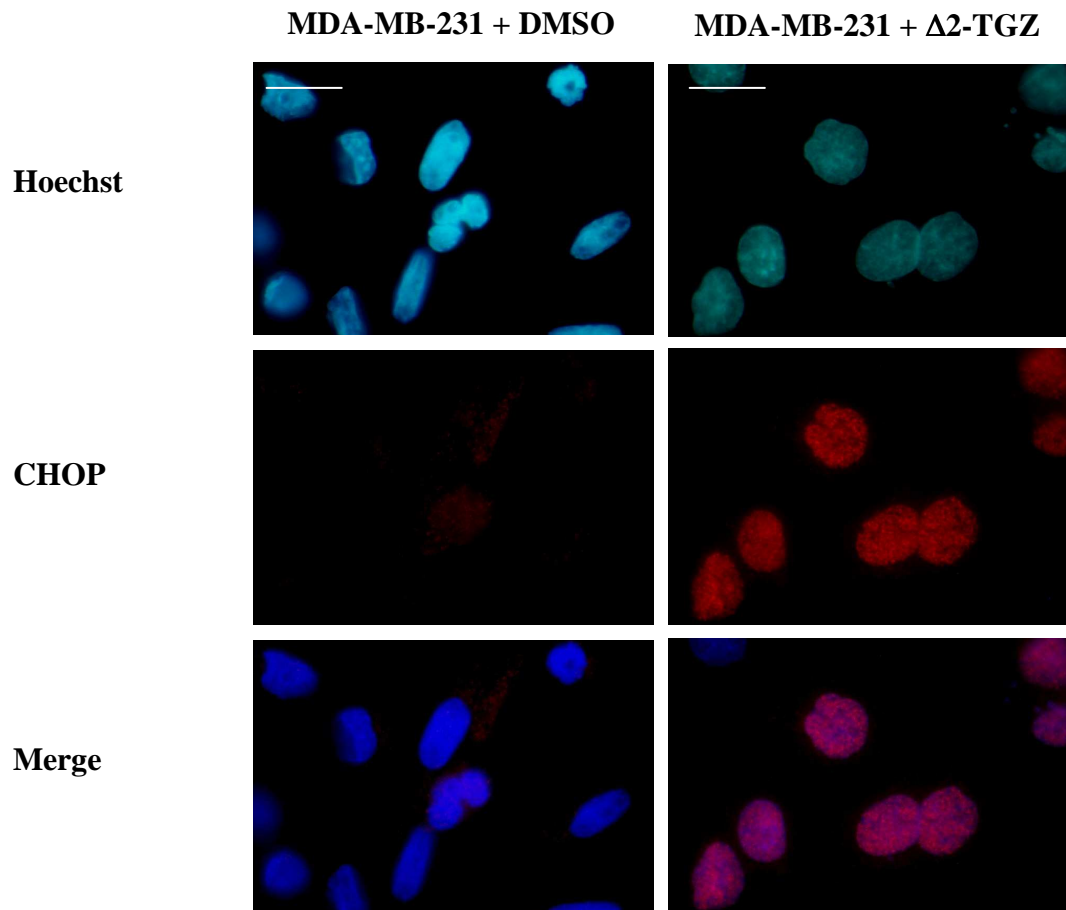


Figure 4

Résultats complémentaires préliminaires

CHOP/GADD153 est l'un des composants majeurs du stress du RE impliqué dans l'apoptose. Afin de tester l'implication potentielle de CHOP dans l'effet antiprolifératif, nous avons inhibé son expression par interférence ARN dans les cellules MCF7.

Dans les cellules transfectées avec un siRNA témoin, après 24 heures de traitement à de la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M), nous observons toujours une augmentation de la transcription de CHOP. Par contre, dans les cellules MCF7 transfectées avec un siRNA ciblant CHOP, l'augmentation du taux de l'ARNm CHOP n'a plus lieu. Afin d'évaluer l'effet sur la prolifération cellulaire, nous avons mesuré le nombre de cellules vivantes par le test « Cell titer Glo » dans ces deux conditions pour des cellules exposées pendant 24 heures au DMSO ou à la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M). L'inhibition de la prolifération cellulaire en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ est identique dans les cellules dont l'expression de CHOP a été inhibée et dans celles transfectées avec un siRNA témoin (**figure 43**).

Ce résultat préliminaire doit être confirmé dans les cellules MCF7 et la même expérience sera réalisée sur les cellules MDA-MB-231. Cet aspect viendra compléter l'article avant de le soumettre. En effet, il sera important de savoir si le stress du RE est un événement important pour l'effet anti-prolifératif de la $\Delta 2$ -TGZ et des thiazolidinediones. Ce résultat préliminaire suggère qu'il n'en est rien.

Le même résultat est obtenu dans les cellules de cancer de prostate LNCaP traitées avec OSU-CG12 qui est un dérivé de la CGZ n'activant pas PPAR γ . En effet, l'interférence ARN ciblant CHOP/GADD153 n'affecte ni l'inhibition de la prolifération ni le clivage du marqueur apoptotique PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase), observés en présence de OSU-CG12 (Wei et *al.*, 2010). Les auteurs de ce travail rattachent l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques à la voie menant à la dégradation de cycline D1 ou du récepteur des androgènes plutôt qu'à celle du stress du RE. Dans cette étude, l'effet antiprolifératif du composé OSU-CG12 est affecté lorsque l'on affecte la voie de l'autophagie. Il est cependant à noter que d'autres auteurs obtiennent par cette même approche (siRNA CHOP) une inhibition partielle de l'effet antiprolifératif d'un autre composé, TZD18, qui est un agoniste PPAR α/γ agissant sur les cellules cancéreuses mammaires de façon PPAR-indépendante (Zang et *al.*, 2009).

Matériel et méthodes : ARN interférence/test de prolifération/RT-PCR

Un duplexe de siRNA ciblant CHOP ainsi qu'un duplexe siRNA contrôle négatif sont achetés chez Eurogentec (Angers, France). Des plaques 6 puits sontensemencées à $1,5 \cdot 10^5$ cellules MCF7 par puits dans 2 ml de DMEM avec rouge phénol, additionné de 10% de SVF et de 2mM de L-glutamine, puis les cellules sont incubées 24 heures à 37°C pour permettre leur adhésion. Les cellules sont transfectées avec le siRNA CHOP (200 nM) ou le siRNA témoin (**tableau 8**) en utilisant un agent transfectant, Oligofectamine™ (Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur. La concentration de siRNA utilisée est mise au point pour une meilleure inhibition sans affecter la viabilité cellulaire. Après 24 heures, les cellules sont rincées au PBS puis le milieu est remplacé par du DMEM, additionné de 1% de SVF et 2 mM de L-Glutamine. Après 4 heures, les cellules sont incubées avec le DMSO (0,05%) ou la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M) pendant 24 heures dans du DMEM sans rouge phénol, 1% SVF et contenant 2 mM de L-Glutamine. A l'issue du traitement, un test de prolifération est réalisé. Les cellules sont rincées au PBS, trypsinisées et comptées à l'aide du kit Cell Titer-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega Charbonnières, France). Parallèlement, l'inhibition du taux d'ARNm CHOP est vérifiée après extraction d'ARN par RT-PCR semi-quantitative (**tableau 9**).

Gènes	Numéro d'accèsion	Séquence cible (5'-3')	Séquences siRNA (5'-3')
CHOP	NM_004083	GCTGAGTCATTGCCTTCT	Sens : GCUGAGUCAUUGCCUUUCUTT Antisens : AGAAAGGCAAUGACUCAGCTT
Témoin négatif	Eurogentec SR-CL000-005	-	-

Tableau 8 : Séquences des siRNA. Le siRNA témoin ne possède aucune homologie de séquences avec un gène humain connu.

Gènes	Numéro d'accèsion	Amorces Sens (5'-3')	Amorces antisens (5'-3')	Cycles d'amplification	bp
CHOP	NM_004083	CCACACTACCCACCTTTC	TTGTCTACTCCAAGCCTTCC	30	107
RPLPO	NM_053275	ACAACCCAGCTCTGGAGAAA	TCGTTTGTACCCGTTGATGA	25	530

Tableau 9 : Liste des amorces utilisées pour la PCR semi-quantitative.

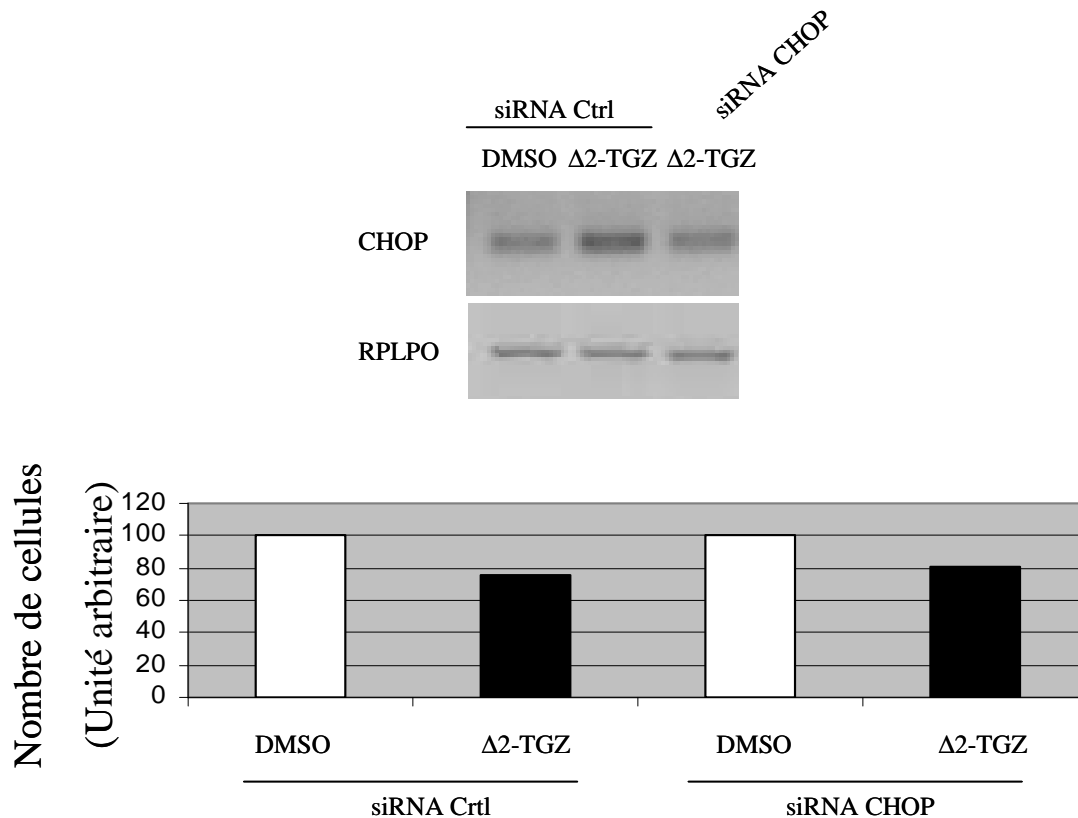


Figure 43 : **A**, Les cellules MCF7 sont transfectées de manière transitoire avec un ARN interférent ciblant CHOP (CHOP siRNA) ou un témoin (Ctrl siRNA). 28 heures après la transfection, les cellules sont traitées à la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M, 24 heures). Le niveau d'expression de l'ARNm CHOP est analysé par RT-PCR semi-quantitative. RPLPO est utilisé comme contrôle interne. **B**, Les cellules transfectées sont traitées pendant 24 heures par 25 μ M de $\Delta 2$ -TGZ. Le nombre de cellules vivantes est mesuré à l'aide du kit Cell Titer-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay.

D : DMSO 0,05%.

III. EGR1 et induction PPAR γ -indépendante du stress du réticulum endoplasmique

1. Introduction

Au cours de notre première étude, menée principalement sur les cellules cancéreuses mammaires MCF7, nous avons observé une induction précoce et transitoire du facteur de transcription EGR1 lors de traitements par certains ligands de PPAR γ (TGZ, CGZ et 15d-PGJ₂). L'induction d'EGR1 est un événement PPAR γ -indépendant lié à une libération de calcium intracellulaire et à l'activation des ERK1/2. Notre deuxième étude a montré clairement qu'un stress du réticulum endoplasmique (RE) se produit de manière précoce suite à un traitement à la Δ 2-TGZ dans les cellules MCF7.

Des molécules pharmacologiques telles que la thapsigargine, la tunicamycine et le dithiothréitol (DTT) sont largement utilisées pour induire expérimentalement un stress du RE. La thapsigargine est un inhibiteur spécifique des pompes Ca²⁺-ATPases du RE, qui permet de dépléter les stocks calciques de ce compartiment. La tunicamycine est un inhibiteur de la N-glycosylation des protéines en cours de synthèse dans le RE. Le DTT rompt les ponts disulfures des protéines. EGR1 est induit dans les fibroblastes embryonnaires de souris exposés à divers inducteurs du stress du RE tels que la thapsigargine, la tunicamycine et le DTT où PERK semble être nécessaire à l'induction initiale de l'expression d'EGR1 ou au maintien de son état d'activation (Liang et *al.*, 2006). Une autre étude par puce à ADN a montré que le facteur de transcription EGR1 est induit suite à un stress du RE par la tunicamycine dans les cellules de neuroblastome SH-SY5Y (Reimertz et *al.*, 2003). Il a aussi été montré qu'EGR1 joue un rôle dans l'induction de l'apoptose par la thapsigargine dans les cellules de mélanome A375-C6 (Muthukkumar et *al.*, 1995). De plus en plus d'études assimilent EGR1 à un gène du stress puisqu'il est activé suite à divers stress (Einbond et *al.*, 2010; Magun et Rodland, 1995; Scheuner et *al.*, 2001). EGR1 pourrait donc être impliqué dans le mécanisme du stress du RE en général et dans celui induit par les ligands de PPAR γ en particulier.

Le but de cette troisième étude est de déterminer s'il existe un lien entre EGR1 et le stress du RE dans les cellules MCF7 traitées avec des TZDs (Δ 2-TGZ, TGZ et CGZ).

2. Matériel et méthodes

2.1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire MCF7 (adénocarcinome humain mammaire de type luminal) a été obtenue à l'ATCC (Rockville, MD, USA). Les cellules sont cultivées en monocouche dans des flacons de 75 cm² placés dans un incubateur à 37°C en atmosphère à 5% de CO₂ et 90% d'humidité. La culture a lieu dans du milieu DMEM avec rouge phénol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Sigma-Aldrich, Lyon, France) et contenant 2 mM de L-Glutamine (Invitrogen).

2.2. Ensemencement et traitement

A partir d'un flacon de 75 cm² à 80% de confluence, les cellules sont trypsinisées (1 minute, 37°C) et comptées grâce à une cellule de Neubauer. Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 ou 12 puits à raison de 1 ou 2 mL de DMEM avec rouge phénol respectivement, contenant 10% de SVF et 2 mM de L-glutamine, puis les cellules sont cultivées 24 heures à 37°C pour permettre l'adhésion. Les cellules sont ensuite rincées au PBS puis incubées 24 heures dans du DMEM sans rouge phénol, contenant 1% de SVF et 2 mM de L-Glutamine. Le milieu est éliminé, le tapis cellulaire est rincé au PBS puis les cellules sont incubées pendant différents temps dans du DMEM dépourvu de rouge phénol et de SVF, contenant 2 mM de L-Glutamine ainsi que les différentes molécules à tester. Afin d'étudier l'implication des voies MAPK (ERK1/2, p38 et JNK) et du calcium, les cellules sont traitées avec les différents inhibiteurs ou le chélateur BAPTA-AM pendant 30 minutes avant l'exposition à la Δ^2 -TGZ.

2.3. Microscopie électronique

Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits à raison de $4,5 \cdot 10^5$ cellules par puits dans 2 mL de DMEM avec rouge phénol, contenant 10% de SVF et 2 mM de L-glutamine. A l'issue du traitement, les cellules sont rincées au PBS, grattées et centrifugées à 1500g pendant 5 minutes. Les culots de cellules traitées au DMSO (0,05% 3 heures) ou à la Δ^2 -TGZ (25 μ M, 3 heures) sont fixés avec 2,5% de glutaraldéhyde dans du tampon de cacodylate de sodium 0,1M puis incubées pendant 1 heure à 4°C en présence de tétroxyde d'osmium (OsO₄)

puis pendant la nuit à 4°C dans l'acétate d'uranyle (1%). L'observation et l'analyse sont réalisées au service commun de microscopie électronique de l'UHP.

2.4. Extraction des ARN totaux

Des cellules sontensemencées dans des plaques 12 puits à raison de $1,5 \cdot 10^5$ cellules par puits dans 1 mL de DMEM avec rouge phénol, contenant 10% de SVF et 2 mM de L-glutamine. En fin de traitement, le milieu est éliminé et les cellules de chaque puits sont reprises dans 1 mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen, France) qui permet d'extraire les ARN. L'extraction démarre par l'ajout de 0,2 mL de chloroforme par tube. Les tubes sont agités, incubés pendant 5 minutes à température ambiante puis centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Après centrifugation, l'échantillon présente 3 phases : une phase organique, un précipité protéique et une phase aqueuse. Seule la phase aqueuse contenant les ARN est récupérée et additionnée de 0,5 mL d'isopropanol afin de précipiter les ARN. Après centrifugation à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C, le culot contenant les ARN est lavé par de l'éthanol à 75% puis les ARN sont dissous dans 30 µL d'eau traitée au DEPC (DiEthylPyroCarbonate). La concentration des ARN est déterminée par spectrophotométrie. L'absorption se définit par l'unité de densité optique (DO) mesurée à 260 nm. Une unité de DO à 260 nm correspond à l'absorption d'une solution d'ARN à la concentration de 40 µg/mL. La pureté est contrôlée en calculant le rapport de la DO à 260 nm sur la DO à 280 nm.

2.5. Transcription inverse (RT)

Après extraction et quantification, les ARN sont transcrits en ADNc par la technique de transcription inverse. 1 µg d'ARN est préalablement chauffé pendant 5 minutes à 65°C. L'ADNc est synthétisé dans un volume final de 25 µL contenant 1 µg d'ARN, 12 ng d'amorces aléatoires, du tampon (Invitrogen), 4 mM de DTT, 0,1 mM de chaque dNTP, 4 U d'inhibiteur de RNases et 75 U d'enzyme MMLV-RT (Invitrogen). Les tubes sont incubés 10 minutes à 25°C, 110 minutes à 37°C puis 10 minutes à 70°C pour dénaturer l'enzyme.

2.6. PCR semi-quantitative

La PCR permet d'amplifier de manière exponentielle un segment d'ADN en utilisant deux amorces complémentaires de deux régions flanquant l'ADN à amplifier.

Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) sont réalisées avec 2 µL de la solution d'ADNc pour un volume final de 25 µL contenant du tampon EconoTaq™ (-Mg), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM du mix dNTP, 0,2 µM de chaque amorce et 2,5 U d'enzyme EconoTaq™ (Euromedex). Plusieurs gènes ont été étudiés : EGR1, ATF3, XBP1. Le gène codant la protéine ribosomale acide eucaryote RPLPO a été choisi comme référence. Les amorces sens et antisens utilisées pour ces gènes ainsi que la taille des fragments amplifiés sont présentées dans le **tableau 10**. Les programmes d'amplification sont les suivants : (1) dénaturation 94°C 2 minutes ; (2) 94°C 30 secondes, 60°C 30 secondes et 72°C 45 secondes. Le nombre de cycles d'amplification est variable selon le gène à amplifier (**tableau 10**). Les produits obtenus après PCR sont analysés après électrophorèse en gel d'agarose à 1,2% (3% pour l'analyse de XBP1), dans le tampon TAE (Tris Acétate EDTA), à 100V pendant 35 minutes.

2.7. Immunoempreinte

Des cellules sont ensemencées dans des plaques 12 puits à raison de $1,5 \cdot 10^5$ cellules par puits dans 1 mL de DMEM avec rouge phénol, contenant 10% de SVF et de 2 mM de L-glutamine. En fin de traitement, les cellules sont récupérées après ajout de 150 µL de tampon de Laemmli (0,1 M Tris-HCL pH 6,8, 4% SDS, 20% glycérol, 0,02% bleu de bromophénol, 10% 2-mercaptoéthanol) et soniquées. Les protéines sont dénaturées par chauffage pendant 10 minutes au bain-marie avant d'être séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10% ou 7,5% en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). La migration s'effectue durant environ 2 heures à 100 V dans du tampon de migration (24,7 mM Tris, 0,191 M glycine, 1% SDS, pH 8). Après la migration, le gel est incubé pendant 10 minutes à température ambiante dans du tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol, pH 8,3). Un transfert humide est réalisé sur une membrane de nitrocellulose Hybond™ ECL™ durant 30 minutes à 100 V.

La membrane est saturée pendant 1 heure sous agitation dans du tampon TNT (Tris-HCL 5 mM pH 7,4, NaCl 15 mM, Tween 20 0,1%) contenant 5% de lait écrémé en poudre. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire. L'anticorps anti-actine est dilué au 1/3000^{ème}

(SC-1615R, Santa Cruz Biotechnology), tandis que les anti-PERK (C33E10, Cell Signaling Technology, Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), anti-eIF2 α phosphorylé (11279-1, Signalway Antibody, Pearland, USA), anti-BiP (B1770, United States Biological, Swampscott, USA) et anti-CHOP (SC-7351, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) sont dilués 1/1000^{ème} dans la solution de saturation pendant la nuit à 4°C. 3 lavages successifs de 5 minutes sous agitation avec du TNT permettent d'éliminer les anticorps non fixés. La membrane est ensuite incubée en présence d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase durant 2 heures à température ambiante (Santa Cruz Technology) (anticorps anti-immunoglobuline de lapin dilué au 1/10000^{ème} pour les anticorps primaires anti-actine, anti-PERK, anti-eIF2 α phosphorylé, anti-BiP ; anticorps anti-immunoglobuline de souris dilué au 1/2000^{ème} pour l'anticorps anti-CHOP). Après 3 lavages successifs sous agitation avec du TNT, l'activité de la peroxydase est révélée par une réaction chimioluminescente (Kit ECL Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France) détectée grâce à un film photographique (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). Les signaux sont photographiés grâce au Gel doc 2000 (Bio-Rad).

2.8. ARN interférence

Des cellules sont ensemencées dans des plaques 12 puits à raison de $1,5 \cdot 10^5$ cellules par puits dans 1 mL de DMEM avec rouge phénol, contenant 10% de SVF et 2 mM de L-glutamine, puis les cellules sont incubées 24 heures à 37°C pour permettre l'adhésion. Les cellules sont transfectées avec le siRNA EGR1 (200 nM) ou le siRNA témoin (Eurogentec (Angers, France) ; **tableau 11**) en utilisant un agent transfectant, OligofectamineTM (Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur. La concentration de siRNA utilisée est mise au point pour une inhibition efficace qui n'affecte pas la viabilité cellulaire. Après 24 heures, les cellules sont rincées au PBS puis le milieu est remplacé par du DMEM, contenant 1% de SVF et 2 mM de L-Glutamine. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées avec le DMSO (0,05%) ou la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M, 3 heures) dans du DMEM sans rouge phénol, dépourvu de SVF et contenant 2 mM de L-Glutamine.

Gènes	Numéro d'accèsion	Amorces Sens (5'-3')	Amorces antisens (5'-3')	Cycles d'amplification	pb
EGR1	NM_001964	GGCCACCTCCTCTCTCTT	TGTTGGCCAATAGACCTTCC	30	496
ATF3	NM_001040619	ATGATGCTTCAACACCCAGGC	CTTCCTTGTAACGTCTCGATT	30	546
XBP1	NM_005080	TTACGAGAGAAAACATGGC	GGGTCCAAGTTGTCCAGAATGC	30	282/256
RPLPO	NM_053275	ACAACCCAGCTCTGGAGAAA	TCGTTTGTACCCGTTGATGA	25	530

Tableau 10 : Liste des amorces utilisées pour la PCR semi-quantitative.

Gènes	Numéro d'accèsion	Séquence cible (5'-3')	Séquences siRNA (5'-3')
EGR1	NM_001964	GTGACTGTTTGGCTTATA	Sens :GUGACUGUUUGGCUUAUATT Antisens :UUAUAAGCCAAACAUCACTT
Témoin négatif	Eurogentec SR-CL000-005	-	-

Tableau 11 : Séquences siRNA ciblant EGR1. Le siRNA témoin ne possède aucune homologie de séquence avec un gène humain connu.

3. Résultats

3.1. Effet des TZDs

Les études menées dans la partie 1 ont été réalisées dans du milieu DMEM dépourvu de SVF puisque le sérum était connu pour être un inducteur du facteur de transcription précoce EGR1. Par contre les études réalisées dans la partie 2 montrant l'induction d'un stress du RE dans les cellules exposées à la $\Delta 2$ -TGZ ont été effectuées dans le milieu DMEM contenant 1% de SVF. Dans cette troisième partie visant à déterminer s'il existait un lien entre EGR1 et stress du RE, nous avons choisi de mener les expériences dans un milieu dépourvu de SVF. Il nous a d'abord fallu déterminer que dans ces conditions les cellules MCF7 témoins exposées au DMSO ne montraient pas de stress du RE et réaliser de nouvelles cinétiques d'exposition à la $\Delta 2$ -TGZ pour préciser les moments où s'activent les différentes voies du stress du RE par rapport à l'expression d'EGR1.

Contrairement aux cellules exposées au DMSO, les cellules MCF7 traitées à la $\Delta 2$ -TGZ à 25 μM présentent des vacuoles autour du noyau qui sont aisément observables au microscope inversé après 3 heures de traitement (**figure 44A**). Ces vacuoles nombreuses et de petite taille à ce stade semblent fusionner progressivement pour parfois générer un grand espace clair entourant le noyau.

L'observation en microscopie électronique à transmission de cellules fixées après 3 heures de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ (25 μM) montre que ces vacuoles sont claires. L'absence de matériel cytoplasmique indique que ce ne sont pas des vacuoles autophagiques. De plus, la membrane des vacuoles est en continuité avec la membrane externe de l'enveloppe nucléaire, ce qui laisse penser que ces vacuoles correspondent aux citernes dilatées du RE (**figure 44B**). Ces observations pourraient être en relation avec le stress du RE mis en évidence par les analyses moléculaires dans la partie 2.

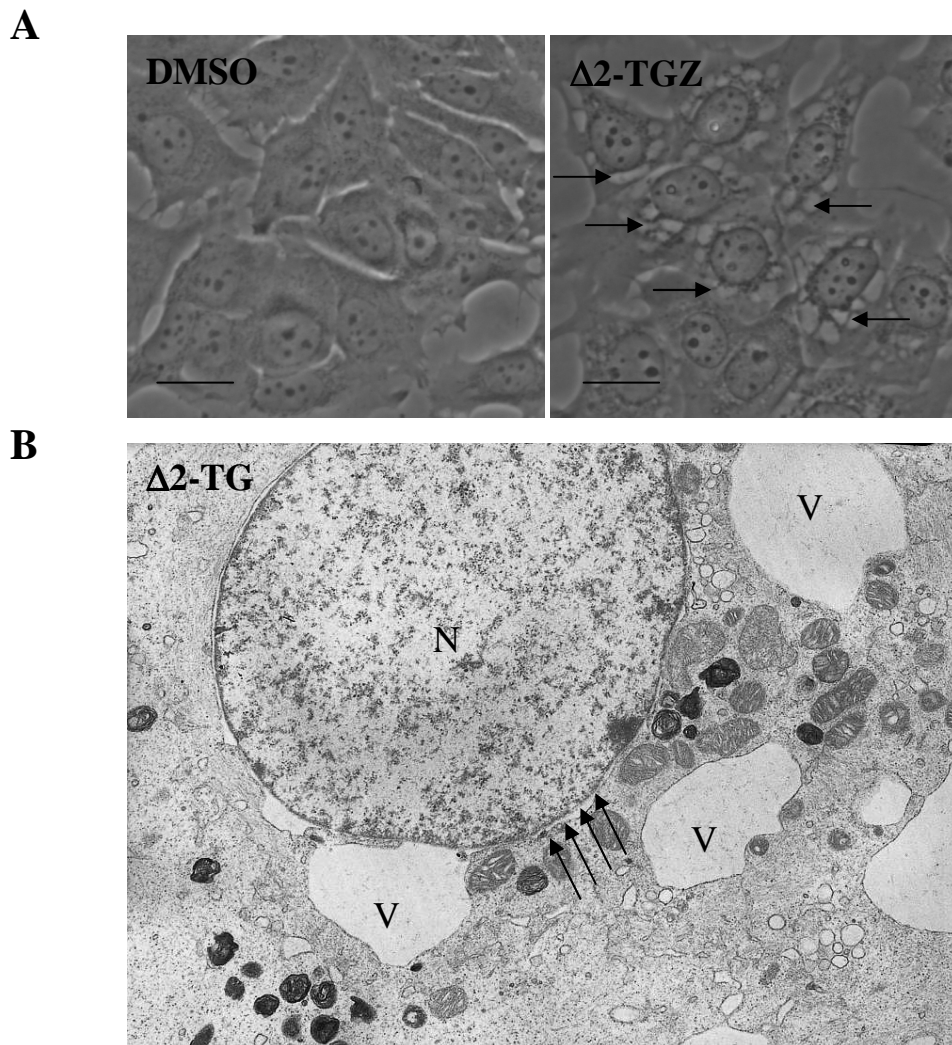


Figure 44 : **A**, Observation en contraste de phase de cellules MCF7 traitées au DMSO (0,05%, 3 heures) ou à la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M, 3 heures). Les cellules exposées à la $\Delta 2$ -TGZ présentent de nombreuses vacuoles (flèches) (la barre représente 25 μ m). **B**, Observation en microscopie électronique à transmission de cellules MCF7 traitées à la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M, 3 heures) montrant de larges vacuoles (V) autour du noyau (N). Les membranes de ces vacuoles sont en continuité avec la membrane nucléaire externe (flèches) correspondant probablement à des citernes dilatées du RE (x 6300).

Nous avons ensuite examiné l'activation de plusieurs voies de la réponse UPR et l'expression d'EGR1. Dans les cellules MCF7 traitées à la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M), nous observons une augmentation du taux d'ARNm EGR1 dès 1 heure de traitement (**figures 45A**). Celle-ci est maximale après 3 heures puis diminue. A partir de 1 heure de traitement, la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M) induit la phosphorylation de PERK attestée par la modification de sa mobilité électrophorétique (« mobility shift »). La forme phosphorylée est maintenue jusqu'à 24 heures de traitement. PERK induit à son tour la phosphorylation du facteur eIF2 α au niveau de la sérine 51 qui s'observe dès 1 heure d'exposition à la $\Delta 2$ -TGZ et se maintient jusqu'à 24 heures (**figure 45B**). Cet événement conduit à l'atténuation de la traduction et donc la synthèse protéique. Par ailleurs, l'activation d'IRE1 α est montrée par la présence de la forme épissée de l'ARNm XBP1 codant un facteur de transcription actif : l'épissage est partiel après 3 heures de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ et il est quasi total après 6 heures (**figure 45A**). L'activation de l'axe de signalisation IRE1 α /XBP1 induit l'expression d'un certain nombre de gènes cibles de l'UPR tels que des gènes codant des protéines chaperonnes comme BiP. Ainsi, une cinétique de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M) montre une augmentation du taux de la protéine BiP qui débute à 6 heures et est plus nette entre 9 heures et 24 heures (**figure 45B**). Quand les processus de protection des cellules et de restauration de la fonction de RE par la réponse UPR échouent, l'apoptose est déclenchée. Les signaux pro-apoptotiques sont principalement médiés par l'induction de CHOP qui est régulé par de nombreux facteurs de transcription dont ATF3. Les analyses par RT-PCR semi-quantitative montrent une augmentation de l'ARNm ATF3 dès 3 heures de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M) (**figure 45A**). Cette élévation persiste jusqu'à 24 heures. De plus, la $\Delta 2$ -TGZ induit l'expression de CHOP qui est faiblement détectée dès 6 heures de traitement mais plus fortement détectée après 16 heures et 24 heures (**figure 45B**).

Une cinétique d'exposition au DMSO (0,05% ; 1-24 heures) a aussi été réalisée : aucune voie du stress du RE n'est activée (données non montrées).

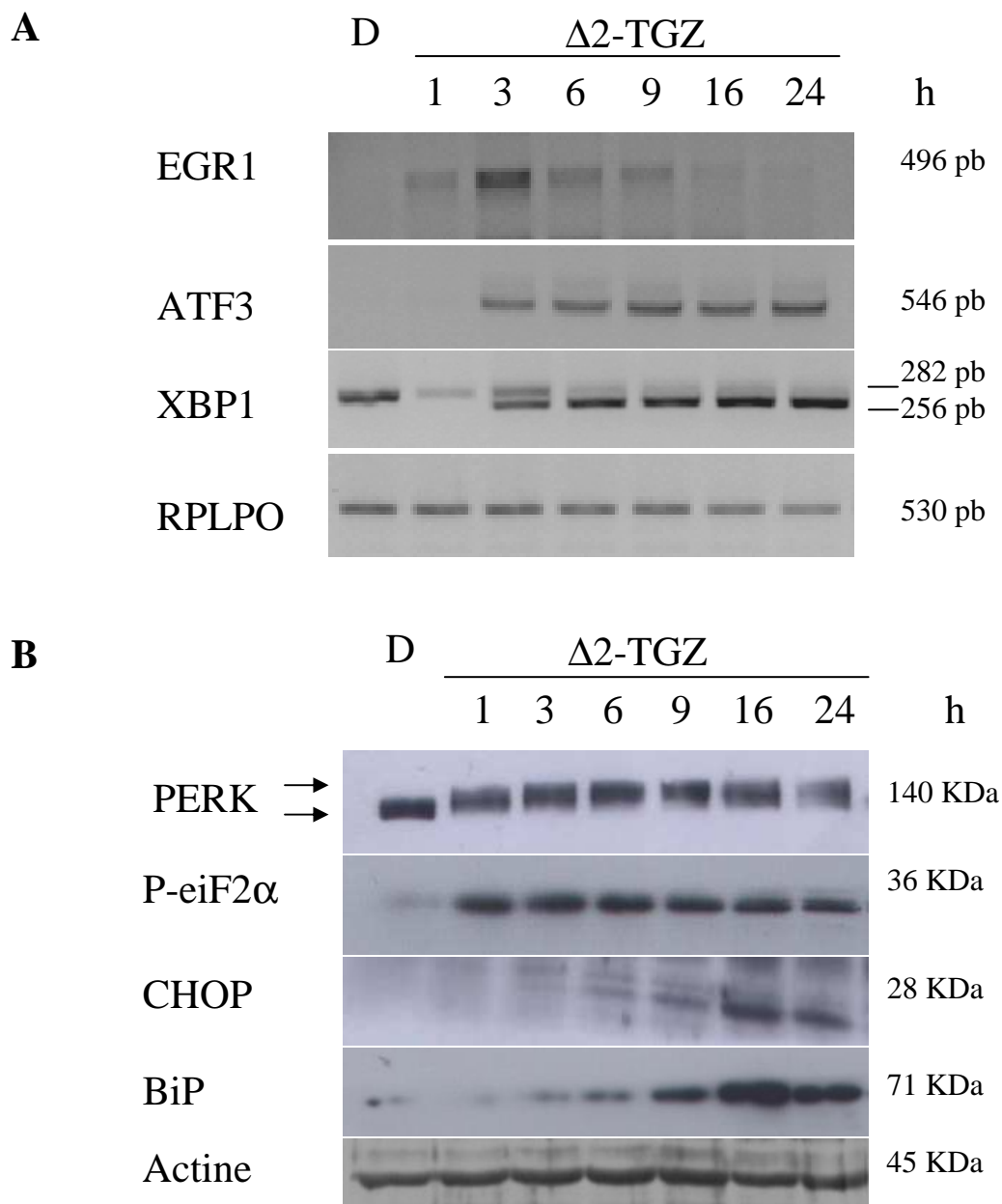


Figure 45 : Cinétique de traitement des cellules MCF7 avec 25 μ M de $\Delta 2$ -TGZ montrant l'expression d'EGR1 et des différents acteurs du stress du RE. **A**, RT-PCR montrant l'expression des ARNm d'EGR1, ATF3 et XBP1. Deux formes de XBP1 sont observées : une forme non épissée de 282 pb et une forme épissée de 256 pb. RPLPO est utilisé comme témoin interne. **B**, Immunoempreintes montrant PERK (changement de mobilité électrophorétique), eiF2 α phosphorylé, CHOP et BiP. L'actine est utilisée comme protéine de référence et témoin de charge des puits.

D : DMSO 0,05%.

Les mêmes analyses ont été réalisées sur des cellules MCF7 traitées par 25 μ M de TGZ et CGZ (**figure 46**).

La TGZ induit une augmentation du taux de l'ARNm EGR1 dès 1 heure de traitement. Celle-ci est maximale après 3 heures puis diminue (Chbicheb et *al.*, 2011). Le ralentissement de la mobilité électrophorétique de PERK s'observe dès 1 heure et se maintient jusqu'à 24 heures (**figure 46B**). Contrairement à la Δ 2-TGZ, la TGZ n'induit à aucun moment l'épissage de XBP1 (**figure 46A**). L'augmentation du taux de la protéine BiP se manifeste entre 9 heures et 24 heures (**figure 46B**). L'induction de CHOP s'observe entre 6 heures et 24 heures (**figure 46B**).

La CGZ induit une augmentation du taux de l'ARNm EGR1 dès 1 heure de traitement. Elle est maximale après 3 heures puis diminue mais semble se maintenir jusqu'à 16 heures, c'est à dire plus longtemps qu'avec la Δ 2-TGZ (**figure 46A**). Le ralentissement de la mobilité électrophorétique de PERK s'observe aussi dans les cellules traitées à la CGZ : il apparaît dès 1 heure mais semble disparaître à 16 heures et 24 heures (**figure 46B**). La CGZ induit plus précocement (1 heure) l'épissage de XBP1 que la Δ 2-TGZ mais celui-ci reste partiel et n'atteint pas le niveau observé avec la Δ 2-TGZ (**figure 46A**). Une faible expression de BiP est observée à 6 heures, augmente fortement à 9 heures et se maintient jusqu'à 24 heures (**figure 46B**). L'induction de CHOP s'observe entre 6 heures et 24 heures (**figure 46B**).

Ces différents dérivés de TZD ont donc des mécanismes d'action partiellement différents.

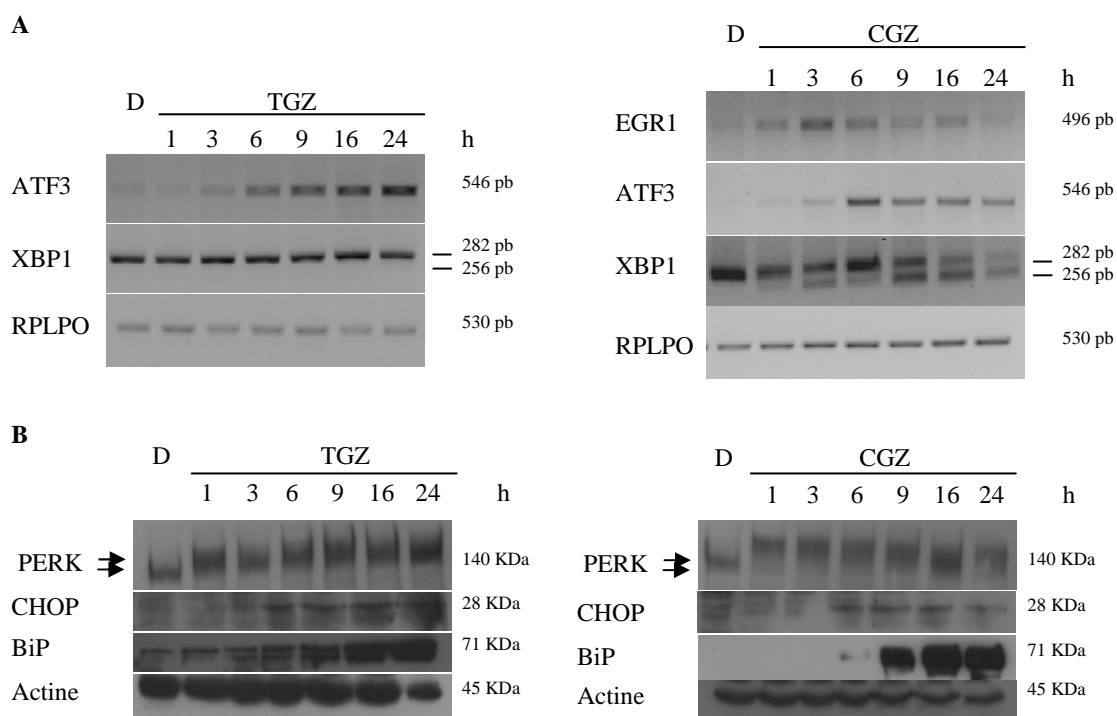


Figure 46 : Cinétique de traitement des cellules MCF7 avec 25 μ M de TGZ ou CGZ montrant l'expression d'EGR1 et des différents acteurs du stress du RE. **A**, RT-PCR montrant l'expression des ARNm d'EGR1, ATF3 et XBP1. RPLPO est utilisé comme témoin interne. **B**, Immunoempreintes montrant PERK (changement de mobilité électrophorétique), CHOP et BiP. L'actine est utilisée comme protéine de référence et témoin de charge des puits. D : DMSO 0,05%.

3.2. Effet d'inducteurs de stress du RE

La thapsigargine (Tg) et l'ionophore calcique A23187 sont des inducteurs connus du stress du RE. Nous les avons utilisés comme témoins positifs afin de savoir si l'induction de l'expression d'EGR1 avait aussi lieu dans ces conditions.

Dans les cellules MCF7, la Tg (2 μ M) induit après 1 heure de traitement une augmentation du taux d'ARNm EGR1 qui semble plus importante au temps 3 heures (**figure 47A**). La Tg induit aussi la phosphorylation de PERK dès 1 heure de traitement (**figure 47B**). L'épissage de l'ARNm XBP1 est aussi observé après 1 heure d'exposition à la Tg mais il est partiel et n'augmente pas à 3 heures (**figure 47A**). L'expression d'ATF3 semble suivre la même évolution que celle d'EGR1. L'augmentation du taux des protéines BiP et CHOP se fait quant à elle après 6 heures de traitement (**figure 47B**).

Dans les cellules MCF7 traitées à l'ionophore calcique A23187 (1 μ M), nous observons une augmentation de l'ARNm EGR1 dès 30 minutes de traitement (**figure 47C**). Le taux de messagers semble diminuer à 60 et 180 minutes. L'ionophore A23187 conduit également à l'augmentation du taux de l'ARNm ATF3 qui débute à 30 minutes puis augmente (**figure 47C**). L'épissage de l'ARNm XBP1 débute après 45 minutes et il est encore partiel à 180 minutes (**figure 47C**).

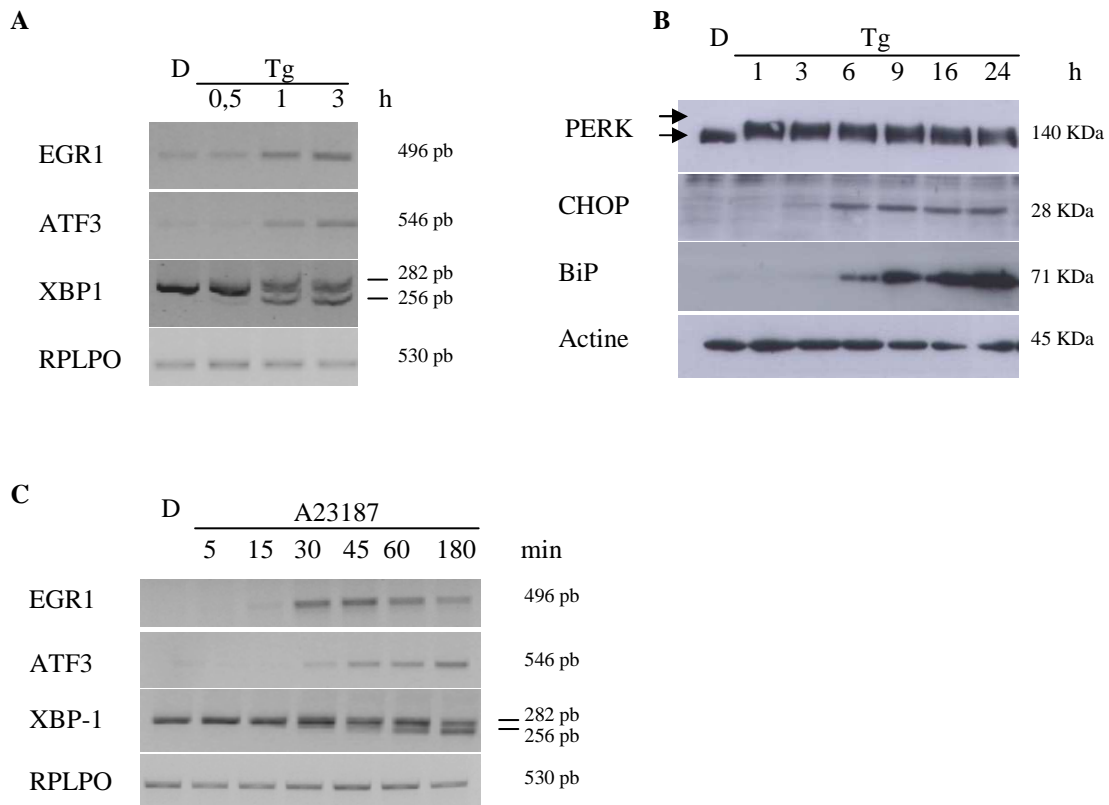


Figure 47 : Cinétique de traitement des cellules MCF7 avec la thapsigargine ou l'ionophore calcique A23187, montrant l'expression d'EGR1 et des différents acteurs du stress du RE. **A**, RT-PCR montrant l'expression des ARNm EGR1, ATF3 et XBP1 dans les cellules exposées à la Thapsigargine (Tg ; 2 μ M). RPLPO est utilisé comme témoin interne. **B**, Immunoempreintes montrant PERK (changement de mobilité électrophorétique), CHOP et BiP dans les cellules exposées à la Thapsigargine (Tg ; 2 μ M). L'actine est utilisée comme protéine de référence et témoin de charge des puits. **C**, RT-PCR montrant l'expression des ARNm EGR1, ATF3 et XBP1. RPLPO est utilisé comme témoin interne.

D : DMSO 0,05%.

3.3. Calcium, MAPK et stress du RE

Notre objectif étant de tester s'il existe un lien entre l'expression d'EGR1 et l'activation des voies du stress du RE qui sont concomitantes après traitement à la $\Delta 2$ -TGZ, nous avons étudié les acteurs du stress dans des conditions connues pour inhiber l'expression d'EGR1.

Tout d'abord, les cellules MCF7 ont été traitées pendant 3 heures à la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M) en présence de 5 μ M de l'inhibiteur des ERK1/2 (U0126). La présence de U0126 abolit complètement l'expression de l'ARNm EGR1 (**figure 48A**). Dans ces conditions, l'expression d'ATF3 est atténuée mais nous observons toujours l'épissage de XBP1 (**figure 48A**).

Des cellules MCF7 ont aussi été traitées avec d'autres inhibiteurs des MAPK : un inhibiteur spécifique de p38 (SB203580) et un inhibiteur de JNK (SP600125). Contrairement à U0126, ni SB20358 ni SP600125 (utilisés à de 10 μ M) n'antagonisent l'expression de l'ARNm EGR1 (**figure 48B, C**). SP600125 inhibe partiellement l'augmentation du taux d'ARNm ATF3. Aucune altération de l'épissage de XBP1 n'est observée en présence de ces inhibiteurs.

En présence du chélateur de calcium BAPTA-AM (50 μ M), l'induction d'EGR1 habituellement observée en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ n'a plus lieu (**figure 48D**). Dans ces conditions, l'épissage de l'ARNm XBP1 a toujours lieu mais une inhibition partielle de l'augmentation de l'ARNm ATF3 est observée (**figure 48D**).

Enfin, l'inhibition de la PKC par GF 109203X (20 μ M) bloque l'augmentation du taux d'ARNm EGR1 et ATF3 habituellement observée en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M), mais cela n'affecte pas l'épissage de XBP1 (**figure 48E**).

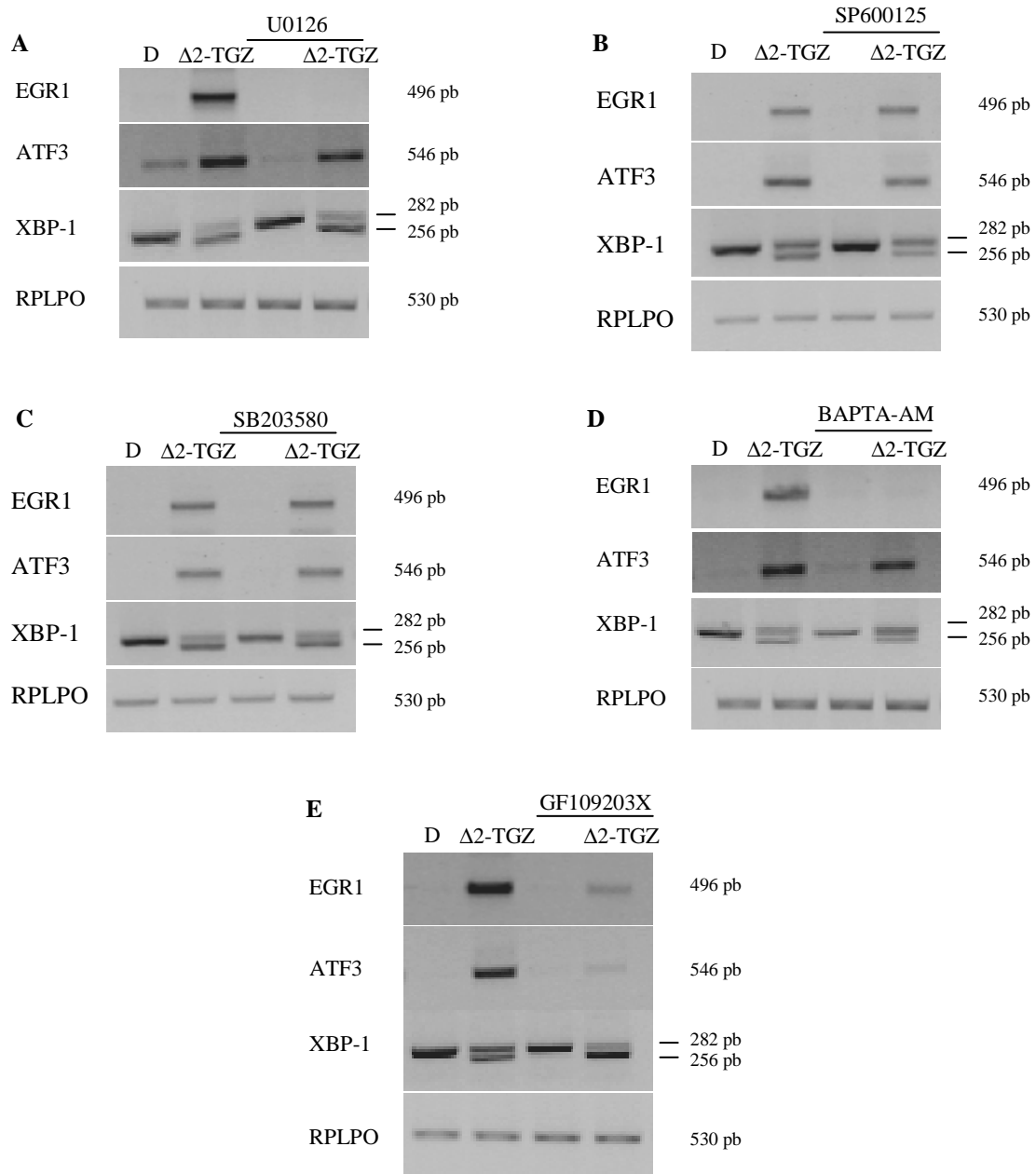


Figure 48 : Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes EGR1, ATF3 et XBP1 dans les cellules MCF7 traitées à la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M, 3 heures) seule ou après 30 minutes de prétraitement avec : **A)** les inhibiteurs U0126 (inhibiteur de la voie ERK1/2 ; 5 μ M) **B)** SP600125 (inhibiteur de JNK ; 10 μ M), **C)** SB203580 (inhibiteur de p38 ; 10 μ M), **D)** BAPTA-AM (chélateur de calcium ; 50 μ M), **E)** GF109203X (inhibiteur de PKC ; 20 μ M). D : DMSO 0,05%.

3.4. EGR1 et stress du RE

Afin de déterminer le rôle d'EGR1 dans la réponse au stress du RE, les cellules MCF7 ont été transfectées avec un ARN interférent ciblant EGR1. Dans ces cellules traitées pendant 3 heures à la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M), l'augmentation du taux d'ARNm EGR1 n'atteint pas le niveau des cellules transfectées avec un siRNA témoin, ce qui atteste de l'efficacité de l'interférence (**figure 49**). Dans ces conditions, l'expression d'ATF3 est aussi moins importante mais l'épissage de XBP1 n'est pas affecté (**figure 49**).

En résumé, malgré la concomitance entre l'expression d'EGR1 et l'activation des voies du stress du RE, EGR1 ne semble pas participer à l'activation de la voie IRE1 α /XBP1. En effet, l'inhibition totale ou partielle de l'expression d'EGR1 par des inhibiteurs ou par ARN interférence ne s'accompagne pas d'une réduction de l'épissage de XBP1. Néanmoins, EGR1 pourrait contribuer à l'expression d'ATF3.

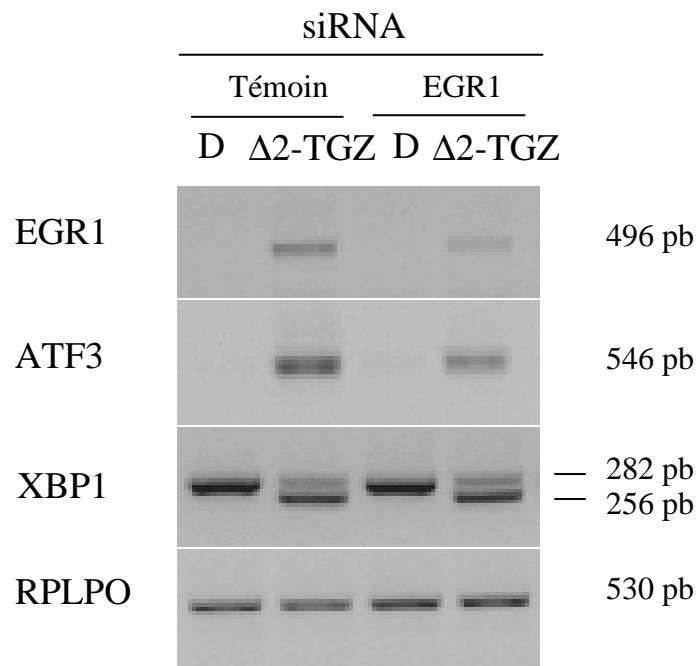


Figure 49 : Les cellules MCF7 sont transfectées de manière transitoire avec un ARN interférent ciblant EGR1 ou un siRNA témoin. 48 heures après la transfection, les cellules sont traitées à la Δ 2-TGZ (25 μ M, 3 heures). Les niveaux d'expression des ARNm EGR1, ATF3, XBP1 et RPLPO sont analysés par RT-PCR. L'épissage de XBP1 donne lieu à deux formes, une forme non épissée de 282 pb et une forme épissée de 256 pb. RPLPO est utilisé comme témoin interne.

D : DMSO 0,05%.

4. Conclusions/Discussion

4.1. Conditions de culture

Cette étude montre que dans un milieu dépourvu de sérum de veau fœtal (SVF), condition dans laquelle nous avons étudié l'expression d'EGR1 en réponse aux ligands de PPAR γ (partie 1), la Δ 2-TGZ induit également un stress du RE dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7, stress que nous avons étudié en cultivant les cellules dans un milieu contenant 1% de SVF (partie 2). Dans ce milieu particulier que nous avons choisi en raison de la sensibilité de l'expression d'EGR1 au SVF, dans les cellules témoins (DMSO 0.05%), aucune voie du stress du RE n'est activée. Dans les cellules exposées à la Δ 2-TGZ, nous montrons l'activation de différentes voies du stress du RE illustrées par la phosphorylation de PERK/eIF2 α , l'épissage de XBP1 ainsi que l'augmentation de l'expression d'ATF3, BiP et CHOP. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédemment décrits, obtenus en cultivant les cellules dans un milieu contenant 1% de SVF (Yao et *al.*, à soumettre).

Néanmoins, quelques différences sont à souligner.

Tout d'abord, l'apparition de vacuoles cytoplasmiques qui sont des dilatations des citernes du réticulum endoplasmique. Ces vacuoles ne sont pas visibles lors d'un traitement de 3 heures à la Δ 2-TGZ (25 μ M) dans un milieu contenant 1% de SVF mais elles s'observent à des concentrations plus élevées dès 35 μ M (résultat non montré). De tels changements morphologiques ont également été observés dans des cellules de fibrosarcome murin après traitement au TNF α ou à la tunicamycine qui induisent la réponse UPR (Xue et *al.*, 2005).

Une seconde différence concerne l'épissage de XBP1 qui est total dans les cellules exposées pendant 3 heures à la Δ 2-TGZ (25 μ M) en absence de SVF alors qu'il n'est que partiel en présence de SVF (1%).

Nous émettons 2 hypothèses pour expliquer ces différences entre les deux conditions de culture : une interaction avec des éléments du sérum (adsorption) pourrait diminuer la concentration effective de Δ 2-TGZ biodisponible, ou alors l'absence de SVF potentialise l'induction du stress du RE induite par la Δ 2-TGZ, ce qui se manifeste notamment au niveau de l'épissage de XBP1.

4.2. Effets différentiels des thiazolidinediones

Par ailleurs, nos travaux montrent que la TGZ et la CGZ (25 μ M) induisent également un stress du RE. Il est cependant à noter que la TGZ n'induit pas l'épissage de XBP1 et ne semble donc pas activer la voie IRE1 α /XBP1 tandis que la CGZ induit ces phénomènes.

Il est peut-être intéressant de signaler que la formation de vacuoles est aussi observée dans les cellules MCF7 exposées pendant 3 heures à la CGZ (25 μ M) mais pas dans celles exposées à une même concentration de TGZ. Ainsi, la formation de vacuoles ne semble pas être un marqueur systématique du stress du RE car la TGZ n'induit pas de vacuoles alors qu'elle induit la phosphorylation de PERK, l'expression d'ATF3, de BiP et de CHOP.

Un stress du RE accompagné d'une absence d'épissage de XBP1 est également rapportée dans des cellules MCF7 traitées avec un autre dérivé de thiazolidinediones, TZD18, qui est un agoniste de PPAR α et de PPAR γ (Zang et *al.*, 2009).

4.3. EGR1 et stress du RE

Parallèlement à l'induction des marqueurs du stress du RE dans les cellules MCF7 traitées à la Δ 2-TGZ, nous avons confirmé l'expression de l'ARNm EGR1, qui débute dès 1 heure de traitement, avec un maximum à 3 heures. Nous avons préalablement montré que l'expression de la protéine suit la même cinétique (Chbicheb et *al.*, 2011).

Cette réponse est plus tardive que l'activation de la voie PERK/eIF2 α , suggérant que PERK pourrait participer au contrôle de l'expression d'EGR1. En effet, PERK semble être nécessaire à l'induction initiale de l'expression d'EGR1 ou au maintien de son état d'activation dans les fibroblastes embryonnaires de souris exposées à la thapsigargine, la tunicamycine et le DTT (Liang et *al.*, 2006).

Par ailleurs, l'activation d'EGR1 survient au même moment que l'activation de la voie IRE1 α /XBP1 et l'expression de l'ARNm ATF3. Elle précède toujours l'expression des protéines BiP et CHOP. EGR1 pourrait donc être un intermédiaire dans l'activation des acteurs de la réponse UPR. Ainsi, il a été montré qu'une augmentation du taux d'ARNm EGR1 est suivie de celle d'ATF4 suite à une lésion de cellules vasculaires de muscle lisse. Le promoteur d'ATF4 contient des sites de fixation pour le facteur de transcription EGR1, ce qui suggère que l'expression d'ATF4 puisse être contrôlée par EGR1 (Malabanan et *al.*, 2008).

De la même manière, le promoteur d'ATF3 contient plusieurs sites de fixation pour EGR1. EGR1 est capable de transactiver le gène ATF3 dans les cellules gonadotropes stimulées par GnRH (Gonadotrophin-releasing hormone) (Mayer *et al.*, 2008). Par ailleurs, la TGZ régule la transcription d'ATF3 via EGR1 dans les cellules cancéreuses colorectales humaines HCT-116 (Bottone *et al.*, 2005).

ATF3 est un facteur de transcription faiblement exprimé dans des cellules en condition normale et il est rapidement induit en réponse à divers stress cellulaires. Les transcrits multiples de ce facteur résultent d'un épissage alternatif (Pan *et al.*, 2003). Les effets de ces différentes formes peuvent être antagonistes ou synergiques avec ceux d'ATF4. ATF3 induit avec ATF4 l'expression de gènes comme GADD34 (Growth Arrest DNA Damage 34) ou l'asparagine synthase (AS) en réponse à un stress du RE (Jiang *et al.*, 2003). ATF3 a également été décrit comme étant, avec ATF4, nécessaire à l'induction de CHOP lors d'une carence en acides aminés (Jiang *et al.*, 2004).

De nombreux exemples montrent que l'induction d'ATF3 pourrait participer au mécanisme de mort cellulaire décrit dans les cellules cancéreuses pancréatiques MIAPaCa-2 où la 15d-PGJ₂ inhibe l'expression de hTERT (human telomerase reverse transcriptase). L'inhibition de hTERT par siRNA induit l'expression des gènes EGR1, ATF3 et GDF15 ainsi que l'apoptose de ces cellules (Kraemer *et al.*, 2006). Par ailleurs, la troglitazone (20 µM, 24 heures) réduit l'expression de l'ARNm hTERT et l'activité télomérase dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 de manière PPARγ-indépendante (Rashid-Kolvear *et al.*, 2010).

Concernant la régulation transcriptionnelle du gène ATF3, elle apparaît être spécifique du type cellulaire et du stimulus. Nos résultats montrent que l'interférence ARN ciblant EGR1 n'inhibe que partiellement l'expression de l'ARNm ATF3 induit par la Δ2-TGZ. Ces données montrent d'une part le rôle d'EGR1 dans la régulation d'ATF3 et d'autre part, suggèrent l'implication de plusieurs voies de régulation induites par la Δ2-TGZ. Ces résultats sont conformes avec les données sur la régulation d'ATF3 par la TGZ dans les cellules cancéreuses colorectales humaines HCT-116 (Bottone *et al.*, 2005).

Par ailleurs, dans les cellules MCF7, l'induction de l'expression de l'ARNm ATF3 par la Δ2-TGZ dépend des voies ERK1/2 et JNK mais pas de la voie p38 alors que la Δ2-TGZ induit la phosphorylation de ERK1/2, JNK et p38 (données non montrées). Un autre inducteur de stress du RE, la thapsigargine, induit l'expression d'ATF3 via JNK dans les kératinocytes HaCaT

(Spohn et *al.*, 2010). Dans d'autres modèles cellulaires, les trois kinases participent à la régulation de l'expression d'ATF3 par la vasopressine (Sandnes et *al.*, 2010).

4.4. Calcium et stress du RE

La $\Delta 2$ -TGZ et la TGZ induisent très rapidement (dès 2 minutes) une libération de calcium à partir des réserves calciques des cellules MCF7 (Chbicheb et *al.*, 2011). Cette augmentation de calcium intracellulaire induit l'augmentation de l'expression d'EGR1. L'idée qu'une perturbation de l'homéostasie calcique puisse être à l'origine du stress du RE induite par la $\Delta 2$ -TGZ est confortée par le fait que la thapsigargine et l'ionophore calcique A23187 induisent à la fois l'augmentation du taux d'ARNm EGR1 et l'activation de la réponse UPR. Cependant, dans les cellules MCF7, le chélateur de calcium et l'inhibiteur de PKC/calcium-dépendante n'inhibent pas l'épissage de XBP1 habituellement induit par la $\Delta 2$ -TGZ, suggérant que la régulation de la voie IRE1 α /XBP1 n'implique pas le calcium. Cette hypothèse est confortée par l'absence d'épissage de XBP1 en présence de 25 μ M de TGZ, composé qui induit pourtant un pic calcique (Chbicheb et *al.*, 2011).

L'importance du calcium dans la régulation de l'expression d'ATF3 reste à éclaircir puisque le BAPTA/AM n'inhibe que partiellement l'expression de ce gène. D'autre part, nous avons montré que GF109203X, inhibiteur de PKC, inhibe totalement l'expression d'EGR1 et ATF3. Cet inhibiteur empêche aussi l'activation des ERK dans les cellules MCF7 exposées à la $\Delta 2$ -TGZ (résultat non montré). Le composé GF109203X inhibe toutes les cPKC (calcium et diacylglycérol (DAG)-dépendantes) et une partie des nPKC (indépendantes du calcium). L'activation des cPKC et des nPKC par le traitement à la $\Delta 2$ -TGZ pourrait expliquer la dépendance partielle de la régulation de l'expression d'ATF3 vis-à-vis du calcium dans les cellules MCF7.

Ces données suggèrent donc l'activation d'au moins deux voies de régulation :

- 1) Calcium/DAG \rightarrow cPKC \rightarrow ERK \rightarrow EGR1 \rightarrow ATF3
- 2) DAG \rightarrow nPKC \rightarrow autres IEGs \rightarrow ATF3

En conclusion, nos résultats suggèrent qu'EGR1 pourrait intervenir dans le stress du RE en régulant en complément d'autres acteurs l'expression d'ATF3.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

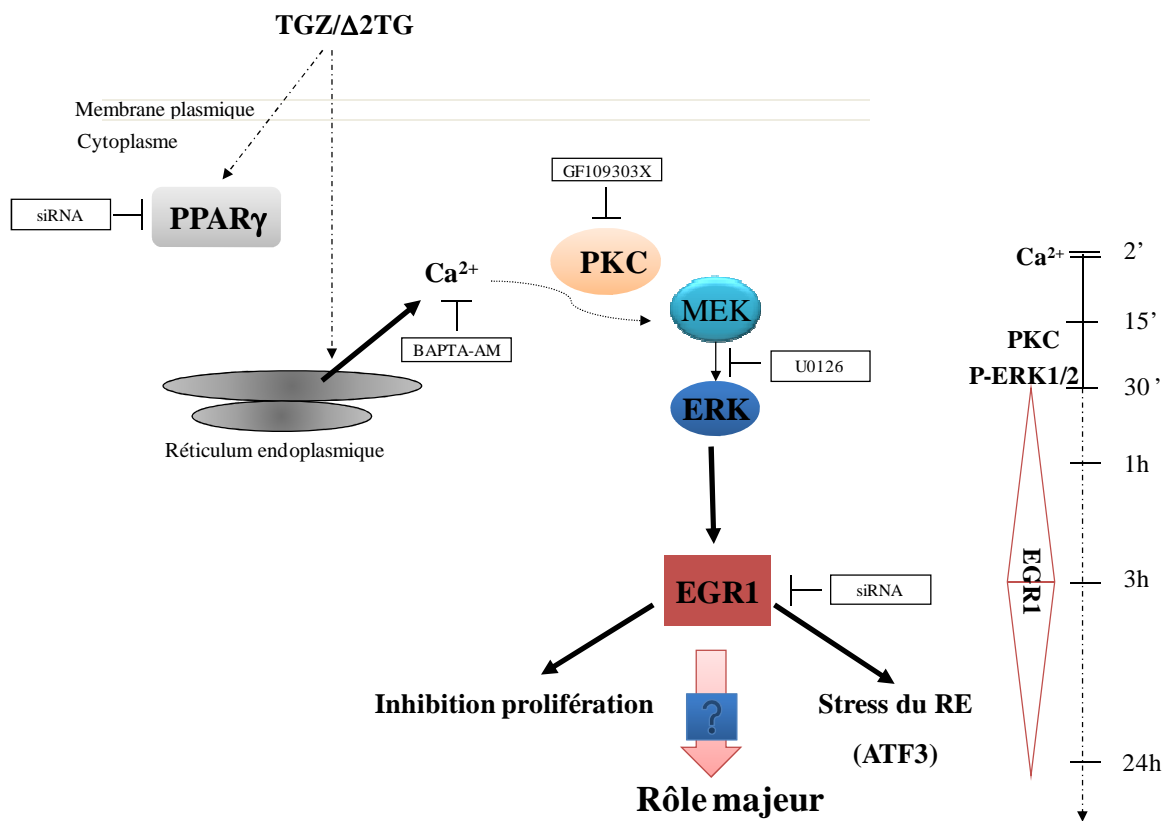


Figure 40 : Représentation schématique des effets des thiazolidinediones et des rôles du facteur de transcription EGR1 dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7.

Discussion et perspectives

Les effets des thiazolidinediones et les rôles du facteur de transcription EGR1 dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7 sont résumés **figure 40**. La majorité des résultats obtenus ont été discutés dans chacune des trois parties « Résultats » précédentes. Dans cette discussion générale, nous avons choisi de ne débattre que de certains aspects plutôt que d'être exhaustifs.

Comment est initiée la cascade de signalisation cellulaire menant à l'expression d'EGR1 ?

EGR1 est un facteur de transcription induit par divers facteurs de croissance, hormones, neurotransmetteurs, agents de chimioprévention, indiquant qu'il est un point de convergence de différentes cascades de signalisation intracellulaires. Les voies de signalisation Ras>Raf>MEK>ERK1/2, PKC, PKA et PI3K/AKT peuvent être impliquées selon le type cellulaire et le stimulus (Guha et *al.*, 2001 ; Mayer et Thiel, 2009 ; Ginty et *al.*, 1991 ; Keeton et *al.*, 2003). Dans notre étude sur les cellules cancéreuses mammaires MCF7, l'induction d'EGR1 par la $\Delta 2$ -TGZ est liée à l'activation des MAPK ERK1/2 mais pas des kinases p38 ou JNK. Cet événement ne requiert pas la transactivation du récepteur de l'EGF (EGFR), mais nécessite une augmentation de calcium intracellulaire. Par ailleurs, l'utilisation d'un inhibiteur de la PKC, protéine kinase calcium-dépendante, réprime l'induction de l'ARNm EGR1 et la phosphorylation des ERK1/2. Une voie de signalisation Calcium \rightarrow PKC \rightarrow ERK1/2 \rightarrow EGR1 semble donc être activée dans les cellules MCF7 traitées à la $\Delta 2$ -TGZ.

Pour mieux connaître le mode d'action de la troglitazone et de ses dérivés et le point de départ de cette cascade de signalisation, M. Boisbrun, membre de l'équipe du Dr Y. Chapleur (UMR CNRS 7565, UHP) est en train de réaliser plusieurs types de molécules dérivées. D'une part, pour confirmer l'absence d'action nucléaire, la $\Delta 2$ -TGZ est couplée à un dendrimère de type PAMAM (polymère de poly(amidoamine)) afin d'obtenir des macromolécules $\Delta 2$ -TGZ-PAMAM incapables d'entrer dans le noyau de la cellule. Les dendrimères PAMAM sont souvent utilisés en nano-médecine pour la délivrance des médicaments et la transfection de siRNA afin d'inhiber l'expression d'un gène cible (Pan et *al.*, 2007). Une étude préliminaire montre que les cellules MCF7 exposées pendant 3h à 25 μ M de $\Delta 2$ -TGZ-PAMAM présentent

une augmentation du taux d'ARNm EGR1. Ce résultat confirme l'induction PPAR γ -indépendante d'EGR1, montrée précédemment par l'utilisation de la Δ 2-TGZ, de l'antagoniste irréversible de PPAR γ et de l'interférence ARN ciblant PPAR γ . Il est décrit dans la littérature que le PAMAM ne peut pas entrer dans le noyau mais il serait néanmoins intéressant de le vérifier (Ma *et al.*, 2009). Ainsi, après la synthèse d'une molécule TGZ-PAMAM, des expériences de transfection d'un plasmide contenant un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur contenant un élément de réponse aux proliférateurs de peroxyosomes (PPRE) seront réalisées. Le pouvoir transactivateur des récepteurs PPAR γ de la TGZ sera alors comparé à celui de la TGZ-PAMAM. Par ailleurs, un conjugué PAMAM- Δ 2-TGZ auquel sera couplé un fluorochrome sera synthétisé (Harrington *et al.*, 2006). En effet, des molécules fluorescentes telles que la fluorescéine, la rhodamine, la cyanine ou l'Alexa Fluor permettraient de vérifier l'absence de localisation nucléaire de la molécule et de suivre la localisation cellulaire du conjugué PAMAM- Δ 2-TGZ.

D'autre part, compte tenu de l'augmentation rapide du taux de calcium intracellulaire (2 minutes d'exposition à la TGZ) et de la phosphorylation des ERK1/2 (5 minutes) après traitement par les TZDs (TGZ et CGZ) et la 15d-PGJ₂, nous allons tester l'hypothèse de l'activation d'un récepteur membranaire. Ces molécules lipophiles pourraient se comporter comme les hormones stéroïdes qui ont des effets non génomiques rapides médiés par un récepteur membranaire. La mise en évidence d'un tel mode d'action pour les stéroïdes peut être réalisée à l'aide d'un couplage à l'albumine (BSA). Les composés E2-BSA, testostérone-BSA ou progestérone-BSA (commercialisés), incapables de traverser la membrane plasmique, ont une localisation exclusivement membranaire (fluorochrome/microscopie confocale) et initient un signal à ce niveau (Takeda *et al.*, 2001). Afin de déterminer la présence de récepteurs membranaires pour les agonistes PPAR γ , des conjugués Δ 2-TGZ-BSA seront synthétisés. Ils permettront de suspecter une fixation potentielle de la Δ 2-TGZ au niveau d'un récepteur membranaire des cellules MCF7. Des expériences d'interaction ligand/récepteur par la méthode du « Binding » pourraient être réalisées. Cette méthode consiste à mettre en contact les sites de liaison que l'on veut étudier (fraction membranaire des cellules MCF7) et un ligand marqué susceptible de s'y fixer (Δ 2-TGZ radioactive ou couplée à la biotine). Le récepteur pourrait être un récepteur des prostaglandines de type DP, capable d'induire l'augmentation de calcium intracellulaire (Scher et Pillinger, 2005).

Une interrelation possible entre les différents membres de la famille EGR ?

Nous avons mis en évidence que la TGZ, la CGZ et la 15d-PGJ₂ induisent aussi une augmentation de l'expression des autres membres de la famille des EGRs (EGR2, EGR3 et EGR4) dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7. La voie d'activation de l'expression des EGR2, 3 et 4 ressemble à celle d'EGR1. Ainsi, dans des cellules MCF7 transfectées avec un ARN interférant ciblant PPAR γ , l'expression des ARNm EGR2, 3 et 4 est induite après un traitement de 3 h à la TGZ. La Δ 2-TGZ (25 μ M) induit une expression transitoire des ARNms EGR2 et EGR3 qui apparaît après 30 min de traitement, atteint un maximum après 3h et ensuite diminue. Les profils d'expression d'EGR2 et EGR3 sont donc similaires à celui d'EGR1. Par contre, l'expression de l'ARNm EGR4 semble différente. En effet le taux d'ARNm EGR4 est induit après traitement à la Δ 2-TGZ, avec un maximum entre 6 et 9h puis diminue après 16h. Ceci est probablement dû au fait que, contrairement aux autres membres, EGR4 ne peut pas être réprimé par les protéines NAB. Des résultats préliminaires suggèrent que le calcium et les ERK1/2 sont également impliqués dans l'induction des EGR2, 3, et 4.

L'expression simultanée de cette famille de facteurs de transcription pourrait être due à la présence de boucles de rétrocontrôle. Dans les cellules cancéreuses de côlon Colo 320DM, l'expression ectopique d'EGR2 et EGR3 n'a aucun effet sur le taux d'EGR1. Par contre, la transfection d'EGR1 induit une légère augmentation d'EGR2 et une forte augmentation d'EGR3. Aucun changement de l'expression d'EGR3 n'est observé après transfection d'EGR2, alors que l'expression ectopique d'EGR3 induit une augmentation du taux d'EGR2. Ces résultats montrent qu'EGR1 régule la transcription d'EGR2 et EGR3 ; EGR2 est probablement une cible d'EGR3. La transfection d'un dominant négatif NAB2 dans des cellules MCF7 induit une augmentation de l'expression d'EGR1, EGR2 et EGR3. NAB2 inhibe non seulement l'activité mais aussi l'autorégulation d'expression des différents membres de la famille EGR (Kumbrink et *al.*, 2005 ; 2010). Ces données montrent une coopération entre les différents EGR, un membre pouvant réguler la transcription des autres membres. Lors de nos expériences réalisées sur les cellules MCF7, l'inhibition de l'expression d'EGR1, EGR2, EGR3 ou EGR4 par ARN interférence, en ne ciblant qu'un seul gène à la fois, montre une induction plus faible des autres EGR en réponse à la Δ 2-TGZ. Dans ce contexte cellulaire, les différents EGRs semblent donc aussi s'inter-réguler et il ne semble pas y avoir de « master gene ». Néanmoins, des expériences de surexpression de chacun des EGR doivent être réalisées afin de confirmer les résultats obtenus. Il existe probablement un

réseau coopératif physique et/ou fonctionnel complexe. Dans nos expériences d'ARN interférence ciblant EGR1, nous avons observé une inhibition partielle de la mort cellulaire induite par la $\Delta 2$ -TGZ. Cela suggère que les quatre EGRs peuvent contribuer à cet effet et/ou qu'il existe par ailleurs un mécanisme supplémentaire EGR-indépendant. Il serait intéressant de valider cette hypothèse en réalisant une interférence ARN pour chaque EGR ou pour les quatre facteurs de transcription simultanément. Il est probable qu'ils aient des fonctions complémentaires et participent de manière coordonnée à l'effet antiprolifératif de la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules MCF7.

EGR1, est-il un facteur protumoral ou antitumoral ?

Dans notre étude, le niveau basal d'expression d'EGR1 dans les cellules MCF7 et MDA-MB-231 est faible. L'expression augmente en réponse à certains ligands de PPAR γ (TGZ, CGZ et 15d-PGJ₂) et cela joue un rôle de facteur antiprolifératif. Néanmoins, en l'absence de traitement (cellules témoins exposées au DMSO), l'interférence ARN ciblant EGR1 induit à elle seule une diminution de la prolifération des cellules MCF7 (Chbicheb et al, 2011), suggérant aussi un effet en faveur de la prolifération. Cette ambiguïté concernant le rôle d'EGR1 dans notre système d'étude reflète les données de la littérature. Par exemple, il a été montré qu'EGR1 stimule la croissance cellulaire dans plusieurs modèles de cancers du sein (de Mestre et al., 2005). Des DNazymes ciblant l'ARNm EGR1 inhibent la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires MCF7 et MDA-MB-231 ainsi que la croissance tumorale chez les souris « nude » xénogreffées (Mitchell et al., 2004). Une autre étude a montré qu'EGR1 est considéré comme protumoral dans les cellules SK-BR3 et MCF7 et l'inhibition de son expression par ARN interférence (siRNA EGR1) inhibe la prolifération cellulaire (Parra et Ferreira, 2010). Au contraire, d'autres travaux montrent que lorsqu'EGR1 est ré-exprimé dans les cellules cancéreuses ZR75, il en résulte une inhibition de prolifération et une activité apoptotique (Huang et al., 1995). Par ailleurs, des travaux suggèrent que les cellules mammaires immortalisées non transformées MCF10A ont un niveau d'expression basal d'EGR1 élevé suggérant un rôle antiprolifératif (Huang et al., 2006; Liu et al., 2007) et éventuellement une réponse limitée aux thiazolidinediones. Cependant, le niveau basal de l'expression de l'ARNm EGR1 dans les cellules MCF10A cultivées au laboratoire n'est pas différent de celui des cellules cancéreuses mammaires MCF7. Ces différences entre la littérature et nos données pourraient s'expliquer par des différences dans le mode de culture des cellules (sérum de cheval, EGF) et leur évolution au

cours des différents passages. Il serait intéressant de vérifier le niveau d'expression de base d'EGR1 dans d'autres cellules mammaires « normales » comme celles de la lignée hTERT (human telomerase reverse transcriptase) ou mieux, des cellules épithéliales mammaires humaines en culture primaire HMEC (human mammary epithelial cells). L'étude de ces cellules pourrait nous permettre de déterminer la spécificité de la voie $\Delta 2$ -TGZ/EGR1 entre cellules normales et cellules cancéreuses mammaires. Pour l'instant, nous avons montré que les cellules MCF10A expriment également l'ARNm EGR1 après 3h de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ suggérant que cette voie n'est pas exclusive des cellules cancéreuses.

Pour mieux caractériser le rôle d'EGR1 dans les cellules MCF7, nous sommes en train d'établir des lignées cellulaires surexprimant de façon stable soit EGR1, soit un ARN interférant ciblant EGR1 (shRNA). Cela nous permettra d'obtenir une population homogène de cellules sur lesquelles nous pourrions analyser la prolifération cellulaire et la réponse aux thiazolidinediones.

En parallèle, ces lignées modifiées pourront nous renseigner sur les gènes cibles d'EGR1. Ces gènes varient selon le modèle et le contexte cellulaire. Parmi eux, nous avons identifié un candidat potentiel, ATF3 dans les cellules MCF7 traitées avec la $\Delta 2$ -TGZ. Nos résultats montrent que l'interférence ARN ciblant EGR1 inhibe partiellement l'expression de l'ARNm ATF3 induit par la $\Delta 2$ -TGZ. La TGZ régule également la transcription d'ATF3 via EGR1 dans les cellules cancéreuses colorectales humaines HCT-116 (Bottone et *al.*, 2005). Dans cette lignée, le gène antitumoral et/ou proapoptotique GDF15 est induit par la TGZ. Nos résultats obtenus à partir de l'analyse de puces à ADN réalisées sur des cellules MCF7 traitées à la $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M, 3 heures et 12 heures) montrent que GDF15 est induit et pourrait être une cible directe d'EGR1. Pour mieux cerner le rôle d'EGR1, d'autres gènes cibles sont à identifier. Ces résultats pourraient provenir de l'analyse croisée des données transcriptomiques issues de puces à ADN utilisant les ARNm de cellules MCF7 normales, surexprimant EGR1 ou n'exprimant plus EGR1 (shRNA) et traitées ou non à la $\Delta 2$ -TGZ.

Comment est induite la mort cellulaire par les TZDs ?

D'après la littérature, la mort cellulaire induite par les TZDs relève de plusieurs mécanismes dont l'apoptose, l'autophagie et le stress du réticulum.

Il a été montré que les TZDs peuvent induire l'apoptose des cellules MCF7 et MDA-MB-231, mise en évidence par l'activation des caspases et le clivage de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP). Nous avons montré que les TZDs peuvent également induire le stress du réticulum avec l'implication partielle du facteur de transcription EGR1 susceptible de réguler l'expression d'ATF3. Cette étude doit se poursuivre pour comprendre l'importance de la voie du stress du réticulum dans l'action anti-proliférative des TZDs. Nous avons débuté une étude de la viabilité cellulaire après ARN interférence ciblant CHOP, protéine à l'origine de la voie apoptotique consécutive à un stress prolongé du réticulum endoplasmique. Il serait également intéressant de cibler PERK par ARN interférence pour déterminer son importance dans l'induction de l'expression d'EGR1 après traitement par la $\Delta 2$ -TGZ. Nous avons en effet montré que la kinase PERK est activée avant l'induction de l'expression d'EGR1 et ces deux voies pourraient être imbriquées, comme le suggèrent Liang et al. (2006).

Les TZDs induisent aussi l'autophagie. Cela peut résulter d'effets PPAR γ -dépendants ou indépendants. Les TZDs (TGZ, RGZ) induisent l'autophagie des cellules MDA-MB-231 via un mécanisme PPAR γ -dépendant (Zhou et al., 2009). La TGZ stimule l'autophagie des cellules PAE (Porcine Aortic Endothelial), indépendamment de l'activation de l'EGFR et de PPAR γ , en augmentant la phosphorylation de la kinase AMPK (AMP-activated protein kinase) (Yan et al., 2010). L'activation de cette enzyme inhibe la signalisation dépendante de m-TOR et induit l'autophagie.

Le rôle de l'autophagie est assez controversé. Des études ont montré que l'autophagie peut induire la survie et la croissance tumorale en conditions de déprivation en nutriments et d'hypoxie des tumeurs solides. Elle peut aussi protéger les tumeurs de la mort cellulaire en réponse à un traitement avec des agents anticancéreux. D'autres études ont montré que l'induction de l'autophagie inhibe la formation tumorale et peut donc être utile pour prévenir l'initiation de la tumeur, limiter la progression tumorale et augmenter l'efficacité des traitements anticancéreux particulièrement dans les cellules cancéreuses où la mort cellulaire par apoptose est déficiente. Un déficit en autophagie est impliqué dans le développement de nombreux cancers, dont le cancer du sein. Sous certaines conditions, l'activation prolongée du programme d'autophagie peut éventuellement conduire à une mort cellulaire indépendante de l'apoptose (Zhou et al., 2009). Plusieurs agents thérapeutiques, tels que la rapamycine, le tamoxifène, le resveratrol et les HDAC'i (Histone deacetylase inhibitor) induisent la mort cellulaire par autophagie (Hwang et al., 2010). Le tamoxifène induit une augmentation de vacuoles autophagiques et du marqueur LC-3-II (microtubule-associated protein light chain

3), ainsi que la mort des cellules MCF7 (ER⁺) et SKBR3 (ER⁻) par autophagie (Hwang et al., 2010). Dans les cellules MCF7 traitées à la $\Delta 2$ -TGZ, aucune vacuole autophagique n'a été mise en évidence lors de nos analyses en microscopie électronique. Néanmoins cette voie reste à explorer. Les thiazolidinediones pourraient se comporter comme la taurolidine (TRD, dérivé de l'acide aminosulfonique taurine) qui induit une inhibition de la prolifération et l'apoptose de plusieurs lignées de cellules cancéreuses [*HT29 (côlon)*, *Chang Liver (tissu de foie normal contaminé par des cellules cancéreuses HeLa du col de l'utérus)*, *HT1080 (fibrosarcome)*, *AsPC-1 (pancréas)* and *BxPC-3 (pancréas)*] en activant de nombreuses voies de transduction menant à divers mécanismes de mort cellulaire. La TRD induit une augmentation de l'expression de gènes codant les facteurs EGR1 et ATF3 ainsi que les gènes impliqués dans la réponse au stress (PPP1R15A/GADD34) et la voie apoptotique mitochondriale (PMAIP1). L'induction de l'expression d'EGR1 et ATF3 dans plusieurs lignées cellulaires indique que l'activation de l'axe de signalisation EGR1/ATF3 est important pour médier les effets antiprolifératifs et proapoptotiques de la TRD (Chromik et al., 2010). EGR1 pourrait également participer à la régulation de l'expression de LC-3, protéine associée aux autophagosomes car le promoteur de LC-3 possède plusieurs sites de fixation pour ce facteur de transcription (Chen et al., 2008).

L'autophagie peut aussi être une conséquence du stress du réticulum endoplasmique et les voies IRE1/XBP1, IRE1-JNK et PERK-eIF2 α semblent être indispensables à l'induction de l'autophagie par le stress du RE (He & Klionsky, 2009). Le laboratoire a récemment débuté des études sur l'autophagie. Ceci permettra de déterminer l'importance de l'autophagie dans les cellules cancéreuses mammaires exposées aux TZDs, ainsi que son lien avec EGR1 et les autres mécanismes de mort cellulaire.

Il semble que la perturbation du métabolisme du glucose et la restriction énergétique puisse être à l'origine de l'activation des différentes voies de l'inhibition de prolifération, du stress du réticulum, de l'autophagie et de l'apoptose observée après traitement par les TZDs. Il a été montré que les TZDs, STG28 et OSU-CG12 (deux analogues inactifs de la TGZ et la CGZ) agissent en tant que mimétiques de la restriction calorique, indépendamment de PPAR γ , dans les cellules MCF7 et LNCaP (Wei et al., 2010). Dans ces cellules, parallèlement à la diminution du taux glycolytique et la production de NADH, trois réponses cellulaires caractéristiques de la restriction calorique sont induites par ces composés :

1) ils induisent l'augmentation de l'expression de la protéine déacétylase NAD⁺-dépendante Sirt1 (silent information regulator) qui active la protéine β -TrCP. Cette dernière est une

protéine F-box qui fonctionne comme une sous-unité réceptrice de l'ubiquitine ligase SCF- β -TrCP. Cette protéine s'associe spécifiquement à plusieurs protéines phosphorylées, telles que Sp1, β -caténine, cycline D1, NF- κ B ainsi qu'à des gènes cibles de Sp1, AR, ER α et EGFR. Cette interaction conduit à la dégradation du substrat par le protéasome et à la mort cellulaire par apoptose.

2) ils activent AMPK (AMP-activated protein kinase), qui déphosphoryle deux effecteurs de la prolifération cellulaire, mTOR et p70S6K, conduisant à la mort des cellules par autophagie

3) ils induisent un stress du RE en augmentant l'activité de IRE1 α et l'expression de GRP78 et GADD153/CHOP.

Si l'effet des thiazolidinediones sur le métabolisme du glucose se confirme dans les cellules cancéreuses mammaires, elles pourraient s'opposer à l'effet Warburg, caractéristique des cellules cancéreuses. En effet, les cellules cancéreuses peuvent se fournir en énergie en dégradant le glucose de façon anaérobie sans utiliser l'oxygène de la respiration cellulaire. Cet aspect sera prochainement développé au laboratoire.

Intérêt thérapeutique des TZDs et leurs dérivés ?

La recherche de nouvelles molécules anticancéreuses a toujours été confrontée au problème de la spécificité vis à vis des cellules cancéreuses et à la toxicité pour les tissus sains. Il a été montré que les cellules mammaires immortalisées non transformées MCF10A sont résistantes au stress du RE induit par la TZD18 car aucun marqueur du stress n'est induit après traitement (Zang et *al.*, 2009). Par contre, nous avons observé que la Δ 2-TGZ induit les marqueurs du stress du RE dans les cellules MCF10A (donnée non montrée) comme dans les cellules MCF7.

La biotinylation a été proposée comme un mécanisme capable de cibler les cellules tumorales. Dans les cellules cancéreuses il y a souvent une surexpression des récepteurs spécifiques à la biotine à la surface cellulaire. La présence de la biotine permettrait une meilleure internalisation de la Δ 2-TGZ par le biais de ce récepteur (Russell-Jones et *al.*, 2004 ; Yang et *al.*, 2009). Dans cette optique, un dérivé biotinylé de la Δ 2-TGZ a été synthétisé. Une étude réalisée au laboratoire a montré que ce composé avait des propriétés accrues en termes d'induction de protéolyse d'ER α et de la cycline D1 ainsi que d'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires, par rapport au composé d'origine (Colin et *al.*, 2010). Par contre, l'induction de l'ARNm EGR1 par le dérivé biotinylé n'est pas supérieure à celle

observée en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ. Il s'est avéré que les effets antiprolifératifs ne sont pas dus à la biotine elle-même mais à la fonctionnalisation du groupe hydroxyl terminal de la $\Delta 2$ -TGZ (Colin et *al.*, 2010).

Afin de pallier le problème de cytotoxicité de la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules normales, il serait intéressant d'utiliser un système d'adressage enzymatique en couplant la $\Delta 2$ -TGZ à un peptide cible permettant de produire une prodrogue inactive qui peut être sélectivement activée au niveau des sites cancéreux. Par exemple, un concept développé à cet effet est l'utilisation de peptides activés spécifiquement par la sérine protéase PSA (prostate-specific antigen) de l'environnement pericellulaire des cancers prostatiques. Ces peptides, non toxiques dans le sang circulant, sont activés au contact de la tumeur où ils délivrent spécifiquement la drogue (la thapsigargine par exemple) (Healy et *al.*, 2009).

Une autre stratégie est de synthétiser de nouvelles molécules dérivées de la $\Delta 2$ -TGZ, plus efficaces et moins toxiques que le composé d'origine. Parmi elles, une nouvelle molécule dérivée de la $\Delta 2$ -TGZ, nommée MB152, a été synthétisée par l'équipe du Dr Yves Chapleur. Cette molécule induit une inhibition sélective de la viabilité des cellules avec une valeur d'IC₅₀ de 4,4 μ M pour les MDA-MB-231 (modèle de tumeurs triples-négatives ER⁻, PR⁻, HER⁻) et supérieure à 50 μ M pour les MCF7 (ER⁺, PR⁺, HER2) (résultats communiqués par C. Colin). Ce composé est capable d'induire une augmentation du taux de l'ARNm EGR1 de manière significative à partir de 50 μ M. Des études *in vitro* sur d'autres types de lignées de cellules cancéreuses mammaires sont prévues pour confirmer cet effet sélectif et le caractériser. D'autre part, une collaboration avec un laboratoire de toxicologie cellulaire à Besançon a permis de déterminer le potentiel cytotoxique de cette molécule sur des hépatocytes humains. Les tests ont montré que MB152 présente une cytotoxicité très faible (IC₅₀ > 200 μ M) en comparaison à la troglitazone (résultats communiqués par M. Boisbrun). Compte tenu de sa faible toxicité et de son inhibition préférentielle de la prolifération des cellules MDA-MB-231, cette molécule a été choisie pour réaliser des études *in vivo* sur des souris xénotreffées, porteuses de tumeurs dérivées de cancers mammaires ayant des caractéristiques génétiques différentes. Puisqu'il n'existe pas actuellement de thérapie ciblée pour les formes triples-négatives de tumeurs mammaires qui sont très agressives, le composé MB152 présente un intérêt très important.

Un autre aspect de l'utilisation à visée thérapeutique est la mise à profit du synergisme des molécules utilisées à faible doses. *In vitro*, les tests sont réalisés avec des concentrations en TZD de l'ordre du μM . En thérapie, les concentrations des composés utilisés doivent être de l'ordre du nanomolaire. Il serait intéressant de déterminer si les effets de molécules de type TZDs ne pourraient pas s'ajouter à ceux d'autres composés tels que les inhibiteurs d'histone déacétylase (HDACi's). En effet, une étude a montré que la TGZ et les HDACi's (Trichostatin A, Sodium butyrate ou DXD101) induisent la mort des cellules MCF7 et MDA-MB-231 (Davies et *al.*, 2010). Une autre étude a montré qu'un co-traitement avec la 15d-PGJ₂ et les HDACi's (acide valproïque (VPA) et acide suberoylanilide hydroxamique) induisent de manière synergique la mort des cellules de cancer de côlon DLD-1 (Koyama et *al.*, 2010). D'autre part, de nombreuses combinaisons d'agonistes PPAR γ et d'agents anticancéreux ont été testées sur différents types de tumeurs. Les mécanismes sont PPAR γ -dépendants et/ou – indépendants et font intervenir de nombreux médiateurs de l'apoptose (Elrod & Sun, 2008). Ainsi, l'association du tamoxifène avec la troglitazone stimule l'effet antiprolifératif du tamoxifène sur les cellules MCF-7 (Yu et *al.*, 2008). Un co-traitement CGZ et inhibiteur de Cox-2 (acide niflumique) induit un stress du RE conduisant à l'apoptose des cellules de cancer de poumon. Les effets proapoptotiques de ce traitement combiné sont Cox-2- et PPAR γ -indépendants (Kim et *al.*, 2010). La TGZ utilisée en association avec l'aspirine (inhibiteur non sélectif de Cox-2) induit un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules de cancer du poumon CL1-0 et A549. La TGZ en association avec la doxorubicine (utilisée en chimiothérapie) est plus efficace sur les cellules leucémiques humaines K562 résistantes qu'en monothérapie (Davies et *al.*, 2010). Ces études de combinaisons entre agonistes PPAR γ et agents anticancéreux, devraient être poursuivies et approfondies dans l'espoir d'indiquer une nouvelle voie thérapeutique des cancers.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdulkadir, S.A., Z. Qu, E. Garabedian, S.K. Song, T.J. Peters, J. Svaren, J.M. Carbone, C.K. Naughton, W.J. Catalona, J.J. Ackerman, J.I. Gordon, P.A. Humphrey, et J. Milbrandt. 2001. Impaired prostate tumorigenesis in Egr1-deficient mice. *Nat.Med.* 7:101-107.
- Abe, A., Y. Kiriya, M. Hirano, T. Miura, H. Kamiya, H. Harashima, et Y. Tokumitsu. 2002. Troglitazone suppresses cell growth of KU812 cells independently of PPARgamma. *Eur.J.Pharmacol.* 436:7-13.
- Adamson, E., B. de, S. Mittal, Y. Wang, J. Hayakawa, K. Korkmaz, D. O'Hagan, M. McClelland, et D. Mercola. 2003. Egr1 signaling in prostate cancer. *Cancer Biol.Ther.* 2:617-622.
- Adamson, E.D., et D. Mercola. 2002. Egr1 transcription factor: multiple roles in prostate tumor cell growth and survival. *Tumour.Biol.* 23:93-102.
- Aggeli, I.K., I. Beis, et C. Gaitanaki. 2009. ERKs and JNKs mediate hydrogen peroxide-induced Egr-1 expression and nuclear accumulation in H9c2 cells. *Physiol Res.*
- Aicher, W.K., K.M. Sakamoto, A. Hack, et H. Eibel. 1999. Analysis of functional elements in the human Egr-1 gene promoter. *Rheumatol.Int.* 18:207-214.
- Akasaki, Y., G. Liu, H.H. Matundan, H. Ng, X. Yuan, Z. Zeng, K.L. Black, et J.S. Yu. 2006. A peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, troglitazone, facilitates caspase-8 and -9 activities by increasing the enzymatic activity of protein-tyrosine phosphatase-1B on human glioma cells. *J.Biol.Chem.* 281:6165-6174.
- Alland, L., R. Muhle, H. Hou, J. Potes, L. Chin, N. Schreiber-Agus, et R.A. DePinho. 1997. Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature.* 387:49-55.
- Al-Sarraj, A., R.M. Day, et G. Thiel. 2005. Specificity of transcriptional regulation by the zinc finger transcription factors Sp1, Sp3, and Egr-1. *J.Cell Biochem.* 94:153-167.
- Andre, T., E. Chastre, L. Kotelevets, J.C. Vaillant, C. Louvet, J. Balosso, G.E. Le, S. Prevot, et C. Gespach. 1998. [Tumoral angiogenesis: physiopathology, prognostic value and therapeutic perspectives]. *Rev.Med.Interne.* 19:904-913.
- Angel, P., M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R.J. Imbra, H.J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich, et M. Karin. 1987. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell.* 49:729-739.
- Aranda, A., et A. Pascual. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 81:1269-1304.
- Aridor, M. 2007. Visiting the ER: the endoplasmic reticulum as a target for therapeutics in traffic related diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59:759-781.
- Arner, P. 2003. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol.Metab.* 14:137-145.
- Arora, S., Y. Wang, Z. Jia, S. Vardar-Sengul, A. Munawar, K.S. Doctor, M. Birrer, M. McClelland, E. Adamson, et D. Mercola. 2008. Egr1 regulates the coordinated expression of numerous EGF receptor target genes as identified by ChIP-on-chip. *Genome Biol.* 9:R166.
- Auwerx, J. 1999. PPARgamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia.* 42:1033-1049.
- Back, S.H., M. Schroder, K. Lee, K. Zhang, et R.J. Kaufman. 2005. ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods.* 35:395-416.
- Bae, M.A., H. Rhee, et B.J. Song. 2003. Troglitazone but not rosiglitazone induces G1 cell cycle arrest and apoptosis in human and rat hepatoma cell lines. *Toxicol.Lett.* 139:67-75.
- Bae, M.H., C.H. Jeong, S.H. Kim, M.K. Bae, J.W. Jeong, M.Y. Ahn, S.K. Bae, N.D. Kim, C.W. Kim, K.R. Kim, et K.W. Kim. 2002. Regulation of Egr-1 by association with the proteasome component C8. *Biochim.Biophys.Acta.* 1592:163-167.

- Baek, S.J., J.S. Kim, J.B. Nixon, R.P. DiAugustine, et T.E. Eling. 2004. Expression of NAG-1, a transforming growth factor-beta superfamily member, by troglitazone requires the early growth response gene EGR-1. *J.Biol.Chem.* 279:6883-6892.
- Baek, S.J., L.C. Wilson, L.C. Hsi, et T.E. Eling. 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.* 278:5845-5853.
- Barak, Y., M.C. Nelson, E.S. Ong, Y.Z. Jones, P. Ruiz-Lozano, K.R. Chien, A. Koder, et R.M. Evans. 1999. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol.Cell.* 4:585-595.
- Baranova, A. 2008. PPAR Ligands as Potential Modifiers of Breast Carcinoma Outcomes. *PPAR.Res.* 2008:230893.
- Baron, V., E.D. Adamson, A. Calogero, G. Ragona, et D. Mercola. 2006. The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGFbeta1, PTEN, p53, and fibronectin. *Cancer Gene Ther.* 13:115-124.
- Baron, V., G.G. De, A. Krones-Herzig, T. Virolle, A. Calogero, R. Urcis, et D. Mercola. 2003. Inhibition of Egr-1 expression reverses transformation of prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene.* 22:4194-4204.
- Barroso, I., M. Gurnell, V.E. Crowley, M. Agostini, J.W. Schwabe, M.A. Soos, G.L. Maslen, T.D. Williams, H. Lewis, A.J. Schafer, V.K. Chatterjee, et S. O'Rahilly. 1999. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature.* 402:880-883.
- Bassik, M.C., L. Scorrano, S.A. Oakes, T. Pozzan, et S.J. Korsmeyer. 2004. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *EMBO J.* 23:1207-1216.
- Beckmann, A.M., et P.A. Wilce. 1997. Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem.Int.* 31:477-510.
- de Belle, I., R.P. Huang, Y. Fan, C. Liu, D. Mercola, et E.D. Adamson. 1999. p53 and Egr-1 additively suppress transformed growth in HT1080 cells but Egr-1 counteracts p53-dependent apoptosis. *Oncogene.* 18:3633-3642.
- Bellone, E., M.E. Di, S. Soriani, A. Varese, L.L. Doria, F. Ajmar, et P. Mandich. 1999. A novel mutation (D305V) in the early growth response 2 gene is associated with severe Charcot-Marie-Tooth type 1 disease. *Hum.Mutat.* 14:353-354.
- Benghiat, A., S.A. Cassidy, H.E. Davidson, F.S. Mancero, J.G. Pickard, et C.J. Tyrrell. 1986. Megestrol acetate in the treatment of advanced post-menopausal breast cancer. *Eur.J.Surg.Oncol.* 12:43-45.
- Bergner, A., et R.M. Huber. 2008. Regulation of the endoplasmic reticulum Ca(2+)-store in cancer. *Anticancer Agents Med.Chem.* 8:705-709.
- Bi, M., C. Naczki, M. Koritzinsky, D. Fels, J. Blais, N. Hu, H. Harding, I. Novoa, M. Varia, J. Raleigh, D. Scheuner, R.J. Kaufman, J. Bell, D. Ron, B.G. Wouters, et C. Koumenis. 2005. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J.* 24:3470-3481.
- Bieche, I., F. Lerebours, S. Tozlu, M. Espie, M. Marty, et R. Lidereau. 2004. Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature. *Clin.Cancer Res.* 10:6789-6795.
- Bishop, J.M. 1985. Viral oncogenes. *Cell.* 42:23-38.
- Blanquicett, C., J. Roman, et C.M. Hart. 2008. Thiazolidinediones as anti-cancer agents. *Cancer Ther.* 6:25-34.

- Bloom, J., et M. Pagano. 2003. Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin.Cancer Biol.* 13:41-47.
- Boccaro, F., et A. Cohen. 2004. Interplay of diabetes and coronary heart disease on cardiovascular mortality. *Heart.* 90:1371-1373.
- Bonofiglio, D., S. Gabriele, S. Aquila, H. Qi, M. Belmonte, S. Catalano, et S. Ando. 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activates fas ligand gene promoter inducing apoptosis in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.Treat.* 113:423-434.
- Bottone, F.G., Jr, Y. Moon, B. Alston-Mills, et T.E. Eling. 2005. Transcriptional regulation of activating transcription factor 3 involves the early growth response-1 gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315:668-677.
- Boudreau, N., et C. Myers. 2003. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res.* 5:140-146.
- Boyce, M., K.F. Bryant, C. Jousse, K. Long, H.P. Harding, D. Scheuner, R.J. Kaufman, D. Ma, D.M. Coen, D. Ron, et J. Yuan. 2005. A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science.* 307:935-939.
- Brain, E.G., J.L. Misset, et J. Rouess. 1999. Primary chemotherapy or hormonotherapy for patients with breast cancer. *Cancer Treat.Rev.* 25:187-197.
- Braissant, O., F. Foufelle, C. Scotto, M. Dauca, et W. Wahli. 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 137:354-366.
- Breakefield, X.O., C. Kamm, et P.I. Hanson. 2001. TorsinA: movement at many levels. *Neuron.* 31:9-12.
- Breckenridge, D.G., M. Germain, J.P. Mathai, M. Nguyen, et G.C. Shore. 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene.* 22:8608-8618.
- Brennan, M., N. Wilcken, J. French, O. Ung, et J. Boyages. 2005. Management of early breast cancer-the current approach. *Aust.Fam.Physician.* 34:755-760.
- Brown, R.S., C. Sander, et P. Argos. 1985. The primary structure of transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats. *FEBS Lett.* 186:271-274.
- Buchwalter, G., C. Gross, et B. Waslylyk. 2004. Ets ternary complex transcription factors. *Gene.* 324:1-14.
- Bundred, N.J. 2001. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat.Rev.* 27:137-142.
- Camp, H.S., A. Chaudhry, et T. Leff. 2001. A novel potent antagonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks adipocyte differentiation but does not revert the phenotype of terminally differentiated adipocytes. *Endocrinology.* 142:3207-3213.
- Campagnoli, C., C. Abba, S. Ambroggio, et C. Peris. 2005. Pregnancy, progesterone and progestins in relation to breast cancer risk. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 97:441-450.
- Cao, X., R. Mahendran, G.R. Guy, et Y.H. Tan. 1992. Protein phosphatase inhibitors induce the sustained expression of the Egr-1 gene and the hyperphosphorylation of its gene product. *J.Biol.Chem.* 267:12991-12997.
- Cao, X., R. Mahendran, G.R. Guy, et Y.H. Tan. 1993. Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *J.Biol.Chem.* 268:16949-16957.
- Cao, X.M., R.A. Koski, A. Gashler, M. McKiernan, C.F. Morris, R. Gaffney, R.V. Hay, et V.P. Sukhatme. 1990. Identification and characterization of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals. *Mol.Cell Biol.* 10:1931-1939.
- Carlezon, W.A., R.S. Duman, et E.J. Nestler. 2005. The many faces of CREB. *Trends Neurosci.* 28:436-445.

- Carmichael, A.R., et T. Bates. 2004. Obesity and breast cancer: a review of the literature. *Breast*. 13:85-92.
- Caso, G., C. Barry, et G. Patejunas. 2009. Dysregulation of CXCL9 and reduced tumor growth in Egr-1 deficient mice. *J.Hematol.Oncol.* 2:7.
- Ceni, E., T. Mello, M. Tarocchi, D.W. Crabb, A. Caldini, P. Invernizzi, C. Surrenti, S. Milani, et A. Galli. 2005. Antidiabetic thiazolidinediones induce ductal differentiation but not apoptosis in pancreatic cancer cells. *World J.Gastroenterol.* 11:1122-1130.
- Cesario, R.M., J. Stone, W.C. Yen, R.P. Bissonnette, et W.W. Lamph. 2006. Differentiation and growth inhibition mediated via the RXR:PPARgamma heterodimer in colon cancer. *Cancer Lett.* 240:225-233.
- Chambers, K.T., S.M. Weber, et J.A. Corbett. 2007a. PGJ2-stimulated beta-cell apoptosis is associated with prolonged UPR activation. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* 292:E1052-E1061.
- Chavrier, P., U. Janssen-Timmen, M.G. Mattei, M. Zerial, R. Bravo, et P. Charnay. 1989. Structure, chromosome location, and expression of the mouse zinc finger gene Krox-20: multiple gene products and coregulation with the proto-oncogene c-fos. *Mol.Cell Biol.* 9:787-797.
- Chavrier, P., M. Zerial, P. Lemaire, J. Almendral, R. Bravo, et P. Charnay. 1988. A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells. *EMBO J.* 7:29-35.
- Chbicheb, S., X. Yao, J.-L. Rodeau, S. Salamone, M. Boisbrun, G. Thiel, D. Spohn, I. Grillier-Vuissoz, Y. Chapleur, S. Flament, et S. Mazerbourg. 2011. EGR1 expression: A calcium and ERK1/2 mediated PPAR(γ)-independent event involved in the antiproliferative effect of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 81:1087-1097.
- Chen, B.P., C.D. Wolfgang, et T. Hai. 1996. Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10. *Mol.Cell Biol.* 16:1157-1168.
- Chen, F., et L.E. Harrison. 2005. Ciglitazone-induced cellular anti-proliferation increases p27kip1 protein levels through both increased transcriptional activity and inhibition of proteasome degradation. *Cell Signal.* 17:809-816.
- Chen, J.D., et R.M. Evans. 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature.* 377:454-457.
- Chen, S. 1998. Aromatase and breast cancer. *Front. Biosci.* 3:d922-933.
- Chen, W.C., M.S. Lin, et X. Bai. 2005. Induction of apoptosis in colorectal cancer cells by peroxisome proliferators-activated receptor gamma activation up-regulating PTEN and inhibiting PI3K activity. *Chin Med.J.(Engl.)*. 118:1477-1481.
- Chen, X., J. Shen, et R. Prywes. 2002. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J.Biol.Chem.* 277:13045-13052.
- Chen, Z.-H., H.P. Kim, F.C. Scirba, S.-J. Lee, C. Feghali-Bostwick, D.B. Stolz, R. Dhir, R.J. Landreneau, M.J. Schuchert, S.A. Yousem, K. Nakahira, J.M. Pilewski, J.S. Lee, Y. Zhang, S.W. Ryter, et A.M.K. Choi. 2008. Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS ONE.* 3:e3316.
- Cho, K.N., M. Sukhthankar, S.H. Lee, J.H. Yoon, et S.J. Baek. 2007. Green tea catechin (-)-epicatechin gallate induces tumour suppressor protein ATF3 via EGR-1 activation. *Eur.J.Cancer.* 43:2404-2412.
- Chow, L.W., W.T. Loo, et M. Toi. 2005. Current directions for COX-2 inhibition in breast cancer. *Biomed.Pharmacother.* 59 Suppl 2:S281-S284.
- Christy, B., et D. Nathans. 1989a. Functional serum response elements upstream of the growth factor-inducible gene zif268. *Mol.Cell Biol.* 9:4889-4895.

- Christy, B., et D. Nathans. 1989b. DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:8737-8741.
- Christy, B.A., L.F. Lau, et D. Nathans. 1988. A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with « zinc finger » sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85:7857-7861.
- Chromik, A.M., S.A. Hahn, A. Daigeler, A. Flier, D. Bulut, C. May, K. Harati, J. Roschinsky, D. Sülberg, D. Weyhe, U. Mittelkötter, et W. Uhl. 2010. Gene expression analysis of cell death induction by taurolidine in different malignant cell lines. *BMC Cancer.* 10:595.
- Cianfrocca, M., et L.J. Goldstein. 2004. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist.* 9:606-616.
- Clay, C.E., G.I. Atsumi, K.P. High, et F.H. Chilton. 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.* 276:47131-47135.
- Clay, C.E., A.M. Namen, G. Atsumi, M.C. Willingham, K.P. High, T.E. Kute, A.J. Trimboli, A.N. Fonteh, P.A. Dawson, et F.H. Chilton. 1999. Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 20:1905-1911.
- Cnop, M., L. Ladriere, P. Hekerman, F. Ortis, A.K. Cardozo, Z. Dogusan, D. Flamez, M. Boyce, J. Yuan, et D.L. Eizirik. 2007. Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic beta-cell dysfunction and apoptosis. *J.Biol.Chem.* 282:3989-3997.
- Cochran, B.H., A.C. Reffel, et C.D. Stiles. 1983. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell.* 33:939-947.
- Colin, C., S. Salamone, I. Grillier-Vuissoz, M. Boisbrun, S. Kuntz, J. Lecomte, Y. Chapleur, et S. Flament. 2010. New troglitazone derivatives devoid of PPAR γ agonist activity display an increased antiproliferative effect in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* 124:101-110.
- Cowin, P., T.M. Rowlands, et S.J. Hatsell. 2005. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr.Opin.Cell Biol.* 17:499-508.
- Cox, J.S., C.E. Shamu, et P. Walter. 1993. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell.* 73:1197-1206.
- Coyle, Y.M. 2004. The effect of environment on breast cancer risk. *Breast Cancer Res.Treat.* 84:273-288.
- Criswell, T., M. Beman, S. Araki, K. Leskov, E. Cataldo, L.D. Mayo, et D.A. Boothman. 2005. Delayed activation of insulin-like growth factor-1 receptor/Src/MAPK/Egr-1 signaling regulates clusterin expression, a pro-survival factor. *J.Biol.Chem.* 280:14212-14221.
- Crosby, S.D., J.J. Puetz, K.S. Simburger, T.J. Fahrner, et J. Milbrandt. 1991. The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element-binding protein family. *Mol.Cell Biol.* 11:3835-3841.
- Cui, Y., K. Miyoshi, E. Claudio, U.K. Siebenlist, F.J. Gonzalez, J. Flaws, K.U. Wagner, et L. Hennighausen. 2002. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPAR γ) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J.Biol.Chem.* 277:17830-17835.
- Cullinan, S.B., D. Zhang, M. Hannink, E. Arvisais, R.J. Kaufman, et J.A. Diehl. 2003. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol.Cell Biol.* 23:7198-7209.
- Cyr, D.M., et D.N. Hebert. 2009. Protein quality control--linking the unfolded protein response to disease. Conference on « From Unfolded Proteins in the Endoplasmic Reticulum to Disease ». *EMBO Rep.* 10:1206-1210.

- Dalton, S., et R. Treisman. 1992. Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell*. 68:597-612.
- Daly, P.A. 2005. Genetic counselling in breast and colorectal cancer. *Ann.Oncol.* 16 Suppl 2:ii163-ii169.
- Davies, G.F., A.R. Ross, T.G. Arnason, B.H. Juurlink, et T.A. Harkness. 2010. Troglitazone inhibits histone deacetylase activity in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 288:236-250.
- Delozier, T. 2010. Hormonothérapie du cancer du sein. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction.* 39:F71-F78.
- Demetri, G.D., C.D. Fletcher, E. Mueller, P. Sarraf, R. Naujoks, N. Campbell, B.M. Spiegelman, et S. Singer. 1999. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:3951-3956.
- Desvergne, B., et W. Wahli. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr.Rev.* 20:649-688.
- Donegan, W.L. 1997. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J.Clin.* 47:28-51.
- Dragunow, M., C. Tse, M. Glass, et P. Lawlor. 1994. c-fos antisense reduces expression of Krox 24 in rat caudate and neocortex. *Cell Mol.Neurobiol.* 14:395-405.
- Drexler, H.C. 2009. Synergistic apoptosis induction in leukemic cells by the phosphatase inhibitor salubrinal and proteasome inhibitors. *PLoS.One.* 4:e4161.
- Dreyer, C., G. Krey, H. Keller, F. Givel, G. Helftenbein, et W. Wahli. 1992. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell.* 68:879-887.
- Duan, S.Z., C.Y. Ivashchenko, M.G. Usher, et R.M. Mortensen. 2008. PPAR-gamma in the Cardiovascular System. *PPAR.Res.* 2008:745804.
- Duan, W.R., M. Ito, Y. Park, E.T. Maizels, M. Hunzicker-Dunn, et J.L. Jameson. 2002. GnRH regulates early growth response protein 1 transcription through multiple promoter elements. *Mol.Endocrinol.* 16:221-233.
- Duffy, M.J., T.M. Maguire, A. Hill, E. McDermott, et N. O'Higgins. 2000. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.* 2:252-257.
- Dumitrescu, R.G., et I. Cotarla. 2005. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J.Cell Mol.Med.* 9:208-221.
- Egerod, F.L., A. Bartels, N. Fristrup, M. Borre, T.F. Orntoft, M.B. Oleksiewicz, N. Brunner, et L. Dyrskjot. 2009. High frequency of tumor cells with nuclear Egr-1 protein expression in human bladder cancer is associated with disease progression. *BMC.Cancer.* 9:385.
- Eid, M.A., M.V. Kumar, K.A. Iczkowski, D.G. Bostwick, et D.J. Tindall. 1998. Expression of early growth response genes in human prostate cancer. *Cancer Res.* 58:2461-2468.
- Einbond, L.S., H.-A. Wu, T. Su, T. Chang, M. Panjikaran, X. Wang, et S. Goldsberry. 2010. Digitoxin activates EGR1 and synergizes with paclitaxel on human breast cancer cells. *J Carcinog.* 9:10.
- Eldredge, L.C., X.M. Gao, D.H. Quach, L. Li, X. Han, J. Lomasney, et W.G. Tourtellotte. 2008. Abnormal sympathetic nervous system development and physiological dysautonomia in Egr3-deficient mice. *Development.* 135:2949-2957.
- Elrod, H.A., et S.-Y. Sun. 2008. PPARgamma and Apoptosis in Cancer. *PPAR Res.* 2008:704165.
- Elstner, E., C. Muller, K. Koshizuka, E.A. Williamson, D. Park, H. Asou, P. Shintaku, J.W. Said, D. Heber, et H.P. Koeffler. 1998. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells *in vitro* and in BXN mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95:8806-8811.

- Elstner, E., E.A. Williamson, C. Zang, J. Fritz, D. Heber, M. Fenner, K. Possinger, et H.P. Koeffler. 2002. Novel therapeutic approach: ligands for PPARgamma and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.Treat.* 74:155-165.
- Escher, P., et W. Wahli. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat.Res.* 448:121-138.
- Fajas, L., D. Auboeuf, E. Raspe, K. Schoonjans, A.M. Lefebvre, R. Saladin, J. Najib, M. Laville, J.C. Fruchart, S. Deeb, A. Vidal-Puig, J. Flier, M.R. Briggs, B. Staels, H. Vidal, et J. Auwerx. 1997. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J.Biol.Chem.* 272:18779-18789.
- Fajas, L., J.C. Fruchart, et J. Auwerx. 1998. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 438:55-60.
- Fan, W., S. Jin, T. Tong, H. Zhao, F. Fan, M.J. Antinore, B. Rajasekaran, M. Wu, et Q. Zhan. 2002. BRCA1 regulates GADD45 through its interactions with the OCT-1 and CAAT motifs. *J.Biol.Chem.* 277:8061-8067.
- Fattal, E., et G. Barratt. 2009. Nanotechnologies and controlled release systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA. *Br. J. Pharmacol.* 157:179-194.
- Feige, J.N., L. Gelman, C. Tudor, Y. Engelborghs, W. Wahli, et B. Desvergne. 2005. Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J.Biol.Chem.* 280:17880-17890.
- Feigelson, H.S., et B.E. Henderson. 1996. Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis.* 17:2279-2284.
- Feinstein, D.L., A. Spagnolo, C. Akar, G. Weinberg, P. Murphy, V. Gavriilyuk, et R.C. Dello. 2005. Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: is mitochondrial function the key? *Biochem.Pharmacol.* 70:177-188.
- Fenner, M.H., et E. Elstner. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands for the treatment of breast cancer. *Expert.Opin.Investig.Drugs.* 14:557-568.
- Ferre, P. 2004. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes.* 53 Suppl 1:S43-S50.
- Floyd, Z.E., et J.M. Stephens. 2004. Control of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 stability and activity by SUMOylation. *Obes.Res.* 12:921-928.
- Forman, B.M., P. Tontonoz, J. Chen, R.P. Brun, B.M. Spiegelman, et R.M. Evans. 1995. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 83:803-812.
- Foulkes, N.S., E. Borrelli, et P. Sassone-Corsi. 1991. CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell.* 64:739-749.
- Fournier, A., F. Berrino, E. Riboli, V. Avenel, et F. Clavel-Chapelon. 2005. Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. *Int.J.Cancer.* 114:448-454.
- Fujimura, T., C. Kimura, T. Oe, Y. Takata, H. Sakuma, I. Aramori, et S. Mutoh. 2006. A selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator with distinct fat cell regulation properties. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 318:863-871.
- Fujita, T., Y. Sugiyama, S. Taketomi, T. Sohda, Y. Kawamatsu, H. Iwatsuka, et Z. Suzuoki. 1983. Reduction of 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.* 32:804-810.
- Gardner, O.S., C.W. Shiau, C.S. Chen, et L.M. Graves. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent activation of p38 MAPK by thiazolidinediones involves

calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase R: correlation with endoplasmic reticulum stress. *J.Biol.Chem.* 280:10109-10118.

Gashler, A.L., S. Swaminathan, et V.P. Sukhatme. 1993. A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor Egr-1. *Mol.Cell Biol.* 13:4556-4571.

Gatza, M.L., J.E. Lucas, W.T. Barry, J.W. Kim, Q. Wang, M.D. Crawford, M.B. Datto, M. Kelley, B. Mathey-Prevot, A. Potti, et J.R. Nevins. 2010. A pathway-based classification of human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:6994-6999.

Gille, H., A.D. Sharrocks, et P.E. Shaw. 1992. Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature.* 358:414-417.

Gillian, A.L., et J. Svaren. 2004. The Ddx20/DP103 dead box protein represses transcriptional activation by Egr2/Krox-20. *J.Biol.Chem.* 279:9056-9063.

Ginestier, C., H. Korkaya, G. Dontu, D. Birnbaum, M.S. Wicha, et E. Charafe-Jauffret. 2007. [The cancer stem cell: the breast cancer driver]. *Med.Sci.(Paris).* 23:1133-1139.

Ginty, D.D., D. Glowacka, D.S. Bader, H. Hidaka, et J.A. Wagner. 1991. Induction of immediate early genes by Ca²⁺ influx requires cAMP-dependent protein kinase in PC12 cells. *J.Biol.Chem.* 266:17454-17458.

Gotoh, T., S. Oyadomari, K. Mori, et M. Mori. 2002. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP. *J.Biol.Chem.* 277:12343-12350.

Greenberg, M.E., et E.B. Ziff. 1984. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature.* 311:433-438.

Greene, M.E., B. Blumberg, O.W. McBride, H.F. Yi, K. Kronquist, K. Kwan, L. Hsieh, G. Greene, et S.D. Nimer. 1995. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr.* 4:281-299.

Grommes, C., G.E. Landreth, et M.T. Heneka. 2004. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol.* 5:419-429.

Grossman, S.R., M.E. Deato, C. Brignone, H.M. Chan, A.L. Kung, H. Tagami, Y. Nakatani, et D.M. Livingston. 2003. Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science.* 300:342-344.

Guan, H.P., T. Ishizuka, P.C. Chui, M. Lehrke, et M.A. Lazar. 2005. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev.* 19:453-461.

Guha, M., M.A. O'Connell, R. Pawlinski, A. Hollis, P. McGovern, S.F. Yan, D. Stern, et N. Mackman. 2001. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood.* 98:1429-1439.

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

Guyton, K.Z., Q. Xu, et N.J. Holbrook. 1996. Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by oxidative stress: role of AP-1 element. *Biochem.J.* 314 (Pt 2):547-554.

Hacki, J., L. Egger, L. Monney, S. Conus, T. Rosse, I. Fellay, et C. Borner. 2000. Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene.* 19:2286-2295.

Hallahan, D.E., E. Dunphy, S. Virudachalam, V.P. Sukhatme, D.W. Kufe, et R.R. Weichselbaum. 1995. C-jun and Egr-1 participate in DNA synthesis and cell survival in response to ionizing radiation exposure. *J.Biol.Chem.* 270:30303-30309.

- Hamrita, B., H. Ben Nasr, K. Chahed, et L. Chouchane. 2010. L'apport de l'approche immunoprotéomique SERPA dans les cancers mammaires. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 25:140-146.
- Han, S., N. Sidell, P.B. Fisher, et J. Roman. 2004. Up-regulation of p21 gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human lung carcinoma cells. *Clin.Cancer Res*. 10:1911-1919.
- Hanahan, D., et R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100:57-70.
- Hao, M.W., Y.R. Liang, Y.F. Liu, L. Liu, M.Y. Wu, et H.X. Yang. 2002. Transcription factor EGR-1 inhibits growth of hepatocellular carcinoma and esophageal carcinoma cell lines. *World J.Gastroenterol*. 8:203-207.
- Harding, H.P., Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, et D. Ron. 2000. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol.Cell*. 5:897-904.
- Harding, H.P., Y. Zhang, et D. Ron. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 397:271-274.
- Harkin, D.P., J.M. Bean, D. Miklos, Y.H. Song, V.B. Truong, C. Englert, F.C. Christians, L.W. Ellisen, S. Maheswaran, J.D. Oliner, et D.A. Haber. 1999. Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell*. 97:575-586.
- Harrington, W.W., S. Britt, G. Wilson, O. Milliken, G. Binz, C. Lobe, R. Oliver, C. Lewis, et M. Ignar. 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.
- Harrington, W.R., S.H. Kim, C.C. Funk, Z. Madak-Erdogan, R. Schiff, J.A. Katzenellenbogen, et B.S. Katzenellenbogen. 2006. Estrogen dendrimer conjugates that preferentially activate extranuclear, nongenomic versus genomic pathways of estrogen action. *Mol. Endocrinol*. 20:491-502.
- Hauser, S., G. Adelmant, P. Sarraf, H.M. Wright, E. Mueller, et B.M. Spiegelman. 2000. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J.Biol.Chem*. 275:18527-18533.
- Hay, R.T. 2001. Protein modification by SUMO. *Trends Biochem.Sci*. 26:332-333.
- Haze, K., T. Okada, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi, et K. Mori. 2001. Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem.J*. 355:19-28.
- Haze, K., H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, et K. Mori. 1999. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol.Biol.Cell*. 10:3787-3799.
- He, C.H., P. Gong, B. Hu, D. Stewart, M.E. Choi, A.M. Choi, et J. Alam. 2001. Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J.Biol.Chem*. 276:20858-20865.
- He, C., et D.J. Klionsky. 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet*. 43:67-93.
- Healy, S.J., A.M. Gorman, P. Mousavi-Shafaei, S. Gupta, et A. Samali. 2009. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *Eur.J.Pharmacol*. 625:234-246.
- Heimann, R., et S. Hellman. 2000. Individual characterisation of the metastatic capacity of human breast carcinoma. *Eur.J.Cancer*. 36:1631-1639.
- Heinlein, C.A., H.J. Ting, S. Yeh, et C. Chang. 1999. Identification of ARA70 as a ligand-enhanced coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J.Biol.Chem*. 274:16147-16152.

- Helenius, A., et M. Aebi. 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 73:1019-1049.
- Henderson, B.E., et H.S. Feigelson. 2000. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 21:427-433.
- Herdegen, T., M. Kiessling, S. Bele, R. Bravo, M. Zimmermann, et P. Gass. 1993. The KROX-20 transcription factor in the rat central and peripheral nervous systems: novel expression pattern of an immediate early gene-encoded protein. *Neuroscience.* 57:41-52.
- Hinnebusch, A.G. 2005. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu.Rev.Microbiol.* 59:407-450.
- Holst, C., C. Skerka, P. Lichter, A. Bialonski, et P.F. Zipfel. 1993. Genomic organization, chromosomal localization and promoter function of the human zinc-finger gene pAT133. *Hum.Mol.Genet.* 2:367-372.
- Hondermarck, H. 2006. Protéomique du cancer du sein : des potentialités aux difficultés. *Pathologie Biologie.* 54:194-198.
- Hong, M., S. Luo, P. Baumeister, J.M. Huang, R.K. Gogia, M. Li, et A.S. Lee. 2004. Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. *J.Biol.Chem.* 279:11354-11363.
- Horlein, A.J., A.M. Naar, T. Heinzl, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Soderstrom, C.K. Glass, et . 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature.* 377:397-404.
- Houssami, N., J. Cuzick, et J.M. Dixon. 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., et M. Dowsett. 2004. Endocrinology and hormone therapy in breast cancer: aromatase inhibitors versus antioestrogens. *Breast Cancer Res.* 6:269-274.
- Hu, E., J.B. Kim, P. Sarraf, et B.M. Spiegelman. 1996. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science.* 274:2100-2103.
- Huang, J.W., C.W. Shiau, J. Yang, D.S. Wang, H.C. Chiu, C.Y. Chen, et C.S. Chen. 2006. Development of small-molecule cyclin D1-ablative agents. *J.Med.Chem.* 49:4684-4689.
- Huang, J.W., C.W. Shiau, Y.T. Yang, S.K. Kulp, K.F. Chen, R.W. Bruggemeier, C.L. Shapiro, et C.S. Chen. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent ablation of cyclin D1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells. *Mol.Pharmacol.* 67:1342-1348.
- Huang, R.P., et E.D. Adamson. 1993. Characterization of the DNA-binding properties of the early growth response-1 (Egr-1) transcription factor: evidence for modulation by a redox mechanism. *DNA Cell Biol.* 12:265-273.
- Huang, R.P., et E.D. Adamson. 1994. The phosphorylated forms of the transcription factor, Egr-1, bind to DNA more efficiently than non-phosphorylated. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 200:1271-1276.
- Huang, R.P., Y. Fan, B. de, C. Niemeyer, M.M. Gottardis, D. Mercola, et E.D. Adamson. 1997. Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *Int.J.Cancer.* 72:102-109.
- Huang, R.P., C. Liu, Y. Fan, D. Mercola, et E.D. Adamson. 1995. Egr-1 negatively regulates human tumor cell growth via the DNA-binding domain. *Cancer Res.* 55:5054-5062.
- Hwang, J.J., H.N. Kim, J. Kim, D.-H. Cho, M.J. Kim, Y.-S. Kim, Y. Kim, S.-J. Park, et J.-Y. Koh. 2010. Zinc(II) ion mediates tamoxifen-induced autophagy and cell death in MCF-7 breast cancer cell line. *Biometals.* 23:997-1013.

- Ijpenberg, A., E. Jeannin, W. Wahli, et B. Desvergne. 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.* 272:20108-20117.
- Ijpenberg, A., N.S. Tan, L. Gelman, S. Kersten, J. Seydoux, J. Xu, D. Metzger, L. Canaple, P. Chambon, W. Wahli, et B. Desvergne. 2004. *In vivo* activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J.* 23:2083-2091.
- Inoue, A., Y. Omoto, Y. Yamaguchi, R. Kiyama, et S.I. Hayashi. 2004. Transcription factor EGR3 is involved in the estrogen-signaling pathway in breast cancer cells. *J.Mol.Endocrinol.* 32:649-661.
- Inoue, A., N. Yoshida, Y. Omoto, S. Oguchi, T. Yamori, R. Kiyama, et S. Hayashi. 2002. Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J.Mol.Endocrinol.* 29:175-192.
- Issemann, I., et S. Green. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 347:645-650.
- Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J.D. Engel, et M. Yamamoto. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13:76-86.
- Jackson, R.J., C.U.T. Hellen, et T.V. Pestova. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:113-127.
- Jacobsen, B.M., J.K. Richer, S.A. Schittone, et K.B. Horwitz. 2002. New human breast cancer cells to study progesterone receptor isoform ratio effects and ligand-independent gene regulation. *J.Biol.Chem.* 277:27793-27800.
- de Jager, T., T. Pelzer, S. Müller-Botz, A. Imam, J. Muck, et L. Neyses. 2001. Mechanisms of estrogen receptor action in the myocardium. Rapid gene activation via the ERK1/2 pathway and serum response elements. *J. Biol. Chem.* 276:27873-27880.
- Jain, N., R. Mahendran, R. Philp, G.R. Guy, Y.H. Tan, et X. Cao. 1996. Casein kinase II associates with Egr-1 and acts as a negative modulator of its DNA binding and transcription activities in NIH 3T3 cells. *J.Biol.Chem.* 271:13530-13536.
- Jessop, C.E., S. Chakravarthi, N. Garbi, G.J. Hammerling, S. Lovell, et N.J. Bulleid. 2007. ERp57 is essential for efficient folding of glycoproteins sharing common structural domains. *EMBO J.* 26:28-40.
- Jiang, C., A.T. Ting, et B. Seed. 1998. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 391:82-86.
- Jiang, H.Y., S.A. Wek, B.C. McGrath, D. Lu, T. Hai, H.P. Harding, X. Wang, D. Ron, D.R. Cavener, et R.C. Wek. 2004. Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol.Cell Biol.* 24:1365-1377.
- Jiang, H.Y., S.A. Wek, B.C. McGrath, D. Scheuner, R.J. Kaufman, D.R. Cavener, et R.C. Wek. 2003. Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. *Mol.Cell Biol.* 23:5651-5663.
- Johannes, G., M.S. Carter, M.B. Eisen, P.O. Brown, et P. Sarnow. 1999. Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:13118-13123.
- Johnson, K.C., J. Hu, et Y. Mao. 2000. Passive and active smoking and breast cancer risk in Canada, 1994-97. *Cancer Causes Control.* 11:211-221.
- Joseph, L.J., M.M. Le Beau, G.A. Jamieson, S. Acharya, T.B. Shows, J.D. Rowley, et V.P. Sukhatme. 1988. Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with « zinc-binding finger » structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85:7164-7168.

- Jouvert, P., M.O. Revel, A. Lazaris, D. Aunis, K. Langley, et J. Zwiller. 2004. Activation of the cGMP pathway in dopaminergic structures reduces cocaine-induced EGR-1 expression and locomotor activity. *J.Neurosci.* 24:10716-10725.
- Juge-Aubry, C.E., E. Hammar, C. Siegrist-Kaiser, A. Pernin, A. Takeshita, W.W. Chin, A.G. Burger, et C.A. Meier. 1999. Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J.Biol.Chem.* 274:10505-10510.
- Kadonaga, J.T., A.J. Courey, J. Ladika, et R. Tjian. 1988. Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science.* 242:1566-1570.
- Kar, R., P.K. Singha, M.A. Venkatachalam, et P. Saikumar. 2009. A novel role for MAP1 LC3 in nonautophagic cytoplasmic vacuolation death of cancer cells. *Oncogene.* 28:2556-2568.
- Kaufman, R.J. 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 13:1211-1233.
- Kaufmann, K., K. Bach, et G. Thiel. 2001. The extracellular signal-regulated protein kinases Erk1/Erk2 stimulate expression and biological activity of the transcriptional regulator Egr-1. *Biol.Chem.* 382:1077-1081.
- Kaufmann, M., W. Jonat, U. Kleeberg, W. Eiermann, F. Janicke, J. Hilfrich, R. Kreienberg, M. Albrecht, H.K. Weitzel, H. Schmid, et . 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.
- Kawamata, H., M. Tachibana, T. Fujimori, et Y. Imai. 2006. Differentiation-inducing therapy for solid tumors. *Curr.Pharm.Des.* 12:379-385.
- Ke, J., M. Gururajan, A. Kumar, A. Simmons, L. Turcios, R.L. Chelvarajan, D.M. Cohen, D.L. Wiest, J.G. Monroe, et S. Bondada. 2006. The role of MAPKs in B cell receptor-induced down-regulation of Egr-1 in immature B lymphoma cells. *J.Biol.Chem.* 281:39806-39818.
- Keeton, A.B., K.D. Bortoff, W.L. Bennett, J.L. Franklin, D.Y. Venable, et J.L. Messina. 2003. Insulin-regulated expression of Egr-1 and Krox20: dependence on ERK1/2 and interaction with p38 and PI3-kinase pathways. *Endocrinology.* 144:5402-5410.
- Kelly, K., B.H. Cochran, C.D. Stiles, et P. Leder. 1983. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell.* 35:603-610.
- Kessel, D. 2006. Protection of Bcl-2 by salubrinal. dhkessel@med.wayne.edu. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 346:1320-1323.
- Key, T., P. Appleby, I. Barnes, et G. Reeves. 2002. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J.Natl.Cancer Inst.* 94:606-616.
- Khachigian, L.M., A.J. Williams, et T. Collins. 1995. Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 270:27679-27686.
- Khidekel, N., S.B. Ficarro, P.M. Clark, M.C. Bryan, D.L. Swaney, J.E. Rexach, Y.E. Sun, J.J. Coon, E.C. Peters, et L.C. Hsieh-Wilson. 2007. Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nat.Chem.Biol.* 3:339-348.
- Khomenko, T., X. Deng, M.R. Jadus, et S. Szabo. 2003. Effect of cysteamine on redox-sensitive thiol-containing proteins in the duodenal mucosa. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 309:910-916.
- Kim, B.M., K. Maeng, K.-H. Lee, et S.H. Hong. 2011. Combined treatment with the Cox-2 inhibitor niflumic acid and PPAR γ ligand ciglitazone induces ER stress/caspase-8-mediated apoptosis in human lung cancer cells. *Cancer Lett.* 300:134-144.

- Kim, J.A., K.S. Park, H.I. Kim, S.Y. Oh, Y. Ahn, J.W. Oh, et K.Y. Choi. 2002. Troglitazone activates p21Cip/WAF1 through the ERK pathway in HCT15 human colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* 179:185-195.
- Kim, J.W., J.H. Yang, H.S. Park, C. Sun, S.H. Lee, J.H. Cho, C.W. Yang, et K.H. Yoon. 2009. Rosiglitazone protects the pancreatic beta-cell death induced by cyclosporine A. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 390:763-768.
- Kim, K.I., et S.H. Baek. 2006. SUMOylation code in cancer development and metastasis. *Mol.Cells.* 22:247-253.
- Kim, K.J., B. Li, J. Winer, M. Armanini, N. Gillett, H.S. Phillips, et N. Ferrara. 1993. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature.* 362:841-844.
- Kim, T.K., et T. Maniatis. 1996. Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science.* 273:1717-1719.
- Kliwer, S.A., K. Umesono, D.J. Mangelsdorf, et R.M. Evans. 1992. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature.* 355:446-449.
- Kodera, Y., K. Takeyama, A. Murayama, M. Suzawa, Y. Masuhiro, et S. Kato. 2000. Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J.Biol.Chem.* 275:33201-33204.
- Komar, C.M., O. Braissant, W. Wahli, et T.E. Curry. 2001. Expression and localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period. *Endocrinology.* 142:4831-4838.
- Koyama, M., Y. Izutani, A.E. Goda, T.-aki Matsui, M. Horinaka, M. Tomosugi, J. Fujiwara, Y. Nakamura, M. Wakada, S. Yogosawa, Y. Sowa, et T. Sakai. 2010. Histone deacetylase inhibitors and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 synergistically induce apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 16:2320-2332.
- Kozak, M. 2002. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene.* 299:1-34.
- Kraemer, K., U. Schmidt, S. Fuessel, A. Herr, M.P. Wirth, et A. Meye. 2006. Microarray analyses in bladder cancer cells: inhibition of hTERT expression down-regulates EGFR. *Int. J. Cancer.* 119:1276-1284.
- Krey, G., A. Mahfoudi, et W. Wahli. 1995. Functional interactions of peroxisome proliferator-activated receptor, retinoid-X receptor, and Sp1 in the transcriptional regulation of the acyl-coenzyme-A oxidase promoter. *Mol.Endocrinol.* 9:219-231.
- Kültz, D. 2003. Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *J. Exp. Biol.* 206:3119-3124.
- Kumbrink, J., M. Gerlinger, et J.P. Johnson. 2005. Egr-1 induces the expression of its corepressor nab2 by activation of the nab2 promoter thereby establishing a negative feedback loop. *J. Biol. Chem.* 280:42785-42793.
- Kumbrink, J., K.H. Kirsch, et J.P. Johnson. 2010. EGR1, EGR2, and EGR3 activate the expression of their coregulator NAB2 establishing a negative feedback loop in cells of neuroectodermal and epithelial origin. *J. Cell. Biochem.* 111:207-217.
- Kwon, C.H., J.Y. Park, T.H. Kim, J.S. Woo, et Y.K. Kim. 2009. Ciglitazone induces apoptosis via activation of p38 MAPK and AIF nuclear translocation mediated by reactive oxygen species and Ca(2+) in opossum kidney cells. *Toxicology.* 257:1-9.
- van Laar, T., A.J. van der Eb, et C. Terleth. 2001. Mif1: a missing link between the unfolded protein response pathway and ER-associated protein degradation? *Curr. Protein Pept. Sci.* 2:169-190.

- Lai, E., T. Teodoro, et A. Volchuk. 2007. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology.(Bethesda.)*. 22:193-201.
- Lamote, I., E. Meyer, A.M. Massart-Leen, et C. Burvenich. 2004. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids*. 69:145-159.
- Lamy, P.-J., G. Romieu, P. Rouanet, et W. Jacot. 2010. Classification moléculaire des cancers du sein: utilité en clinique. *Médecine Nucléaire*. 34:32-43.
- Larsen, T.M., S. Toubro, et A. Astrup. 2003. PPARgamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy? *Int.J.Obes.Relat Metab Disord*. 27:147-161.
- Lascombe, I., D. Beffa, U. Ruegg, J. Tarradellas, et W. Wahli. 2000. Estrogenic activity assessment of environmental chemicals using *in vitro* assays: identification of two new estrogenic compounds. *Environ.Health Perspect*. 108:621-629.
- Laudet, V., C. Hanni, J. Coll, F. Catzeflis, et D. Stehelin. 1992. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J*. 11:1003-1013.
- Lee, A.S. 2001. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem.Sci*. 26:504-510.
- Lee, G., F. Elwood, J. McNally, J. Weiszmann, M. Lindstrom, K. Amaral, M. Nakamura, S. Miao, P. Cao, R.M. Learned, J.L. Chen, et Y. Li. 2002a. T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J.Biol.Chem*. 277:19649-19657.
- Lee, H.J., R.C. Mignacca, et K.M. Sakamoto. 1995. Transcriptional activation of egr-1 by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor but not interleukin 3 requires phosphorylation of cAMP response element-binding protein (CREB) on serine 133. *J.Biol.Chem*. 270:15979-15983.
- Lee, K., W. Tirasophon, X. Shen, M. Michalak, R. Prywes, T. Okada, H. Yoshida, K. Mori, et R.J. Kaufman. 2002b. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev*. 16:452-466.
- Lee, S.H., J.H. Bahn, C.K. Choi, N.C. Whitlock, A.E. English, S. Safe, et S.J. Baek. 2008a. ESE-1/EGR-1 pathway plays a role in tolfenamic acid-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Mol.Cancer Ther*. 7:3739-3750.
- Lee, S.L., Y. Sadovsky, A.H. Swirnoff, J.A. Polish, P. Goda, G. Gavrilina, et J. Milbrandt. 1996. Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science*. 273:1219-1221.
- Lee, W., P. Mitchell, et R. Tjian. 1987. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell*. 49:741-752.
- Lee, W.L., M.H. Cheng, H.T. Chao, et P.H. Wang. 2008b. The role of selective estrogen receptor modulators on breast cancer: from tamoxifen to raloxifene. *Taiwan.J.Obstet.Gynecol*. 47:24-31.
- Leesnitzer, L.M., D.J. Parks, R.K. Bledsoe, J.E. Cobb, J.L. Collins, T.G. Consler, R.G. Davis, E.A. Hull-Ryde, J.M. Lenhard, L. Patel, K.D. Plunket, J.L. Shenk, J.B. Stimmel, C. Therapontos, T.M. Willson, et S.G. Blanchard. 2002. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry*. 41:6640-6650.
- Lehmann, J.M., J.M. Lenhard, B.B. Oliver, G.M. Ringold, et S.A. Kliewer. 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.
- Lehmann, J.M., L.B. Moore, T.A. Smith-Oliver, W.O. Wilkison, T.M. Willson, et S.A. Kliewer. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J.Biol.Chem*. 270:12953-12956.

- Lei, K., et R.J. Davis. 2003. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100:2432-2437.
- Lemaire, P., O. Revelant, R. Bravo, et P. Charnay. 1988. Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85:4691-4695.
- Lemaire, P., C. Vesque, J. Schmitt, H. Stunnenberg, R. Frank, et P. Charnay. 1990. The serum-inducible mouse gene Krox-24 encodes a sequence-specific transcriptional activator. *Mol.Cell Biol.* 10:3456-3467.
- Levi, G., P. Topilko, S. Schneider-Maunoury, M. Lasagna, S. Mantero, R. Cancedda, et P. Charnay. 1996. Defective bone formation in Krox-20 mutant mice. *Development.* 122:113-120.
- Li, B., M.R. Power, et T.J. Lin. 2006a. De novo synthesis of early growth response factor-1 is required for the full responsiveness of mast cells to produce TNF and IL-13 by IgE and antigen stimulation. *Blood.* 107:2814-2820.
- Li, L., J. Carter, X. Gao, J. Whitehead, et W.G. Tourtellotte. 2005. The neuroplasticity-associated arc gene is a direct transcriptional target of early growth response (Egr) transcription factors. *Mol.Cell Biol.* 25:10286-10300.
- Li, L., S.H. Yun, J. Keblesh, B.L. Trommer, H. Xiong, J. Radulovic, et W.G. Tourtellotte. 2007. Egr3, a synaptic activity regulated transcription factor that is essential for learning and memory. *Mol.Cell Neurosci.* 35:76-88.
- Li, M., T.W. Lee, A.P. Yim, T.S. Mok, et G.G. Chen. 2006b. Apoptosis induced by troglitazone is both peroxisome proliferator-activated receptor-gamma- and ERK-dependent in human non-small lung cancer cells. *J.Cell Physiol.* 209:428-438.
- Li, X., X. Yang, Y. Xu, X. Jiang, X. Li, F. Nan, et H. Tang. 2009. Troglitazone inhibits cell proliferation by attenuation of epidermal growth factor receptor signaling independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cell Res.* 19:720-732.
- Liang, S.-H., W. Zhang, B.C. McGrath, P. Zhang, et D.R. Cavener. 2006. PERK (eIF2alpha kinase) is required to activate the stress-activated MAPKs and induce the expression of immediate-early genes upon disruption of ER calcium homeostasis. *Biochem. J.* 393:201-209.
- Lim, R.W., B.C. Varnum, et H.R. Herschman. 1987. Cloning of tetradecanoyl phorbol ester-induced « primary response » sequences and their expression in density-arrested Swiss 3T3 cells and a TPA non-proliferative variant. *Oncogene.* 1:263-270.
- Liu, B.Q., Y.Y. Gao, X.F. Niu, J.S. Xie, X. Meng, Y. Guan, et H.Q. Wang. 2010. Implication of unfolded protein response in resveratrol-induced inhibition of K562 cell proliferation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 391:778-782.
- Liu, C.Y., M. Schroder, et R.J. Kaufman. 2000. Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 275:24881-24885.
- Liu, C.Y., Z. Xu, et R.J. Kaufman. 2003a. Structure and intermolecular interactions of the luminal dimerization domain of human IRE1alpha. *J.Biol.Chem.* 278:17680-17687.
- Liu, D., I. Evans, G. Britton, et I. Zachary. 2008. The zinc-finger transcription factor, early growth response 3, mediates VEGF-induced angiogenesis. *Oncogene.* 27:2989-2998.
- Liu, H., C. Zang, M.H. Fenner, K. Possinger, et E. Elstner. 2003b. PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells *in vitro*. *Breast Cancer Res.Treat.* 79:63-74.
- Liu, J., Y.G. Liu, R. Huang, C. Yao, S. Li, W. Yang, D. Yang, et R.P. Huang. 2007. Concurrent down-regulation of Egr-1 and gelsolin in the majority of human breast cancer cells. *Cancer Genomics Proteomics.* 4:377-385.

- Lu, K.P., G. Finn, T.H. Lee, et L.K. Nicholson. 2007. Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nat.Chem.Biol.* 3:619-629.
- Lu, M., T. Kwan, C. Yu, F. Chen, B. Freedman, J.M. Schafer, E.J. Lee, J.L. Jameson, V.C. Jordan, et V.L. Cryns. 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.* 280:6742-6751.
- Lucchi-Angellier, E. 2001. [Hormone therapy and breast cancer: a review]. *Rev.Med.Interne.* 22:1213-1224.
- Lucerna, M., J. Pomyje, D. Mechtcheriakova, A. Kadl, F. Gruber, M. Bilban, Y. Sobanov, G. Schabbauer, J. Breuss, O. Wagner, M. Bischoff, M. Clauss, B.R. Binder, et E. Hofer. 2006. Sustained expression of early growth response protein-1 blocks angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res.* 66:6708-6713.
- Luo, S., et A.S. Lee. 2002. Requirement of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway for the induction of the 78 kDa glucose-regulated protein/immunoglobulin heavy-chain binding protein by azetidine stress: activating transcription factor 6 as a target for stress-induced phosphorylation. *Biochem.J.* 366:787-795.
- Ma, K., K.M. Vattem, et R.C. Wek. 2002. Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J.Biol.Chem.* 277:18728-18735.
- Ma, K., M.-X. Hu, Y. Qi, J.-H. Zou, L.-Y. Qiu, Y. Jin, X.-Y. Ying, et H.-Y. Sun. 2009. PAMAM-triamcinolone acetonide conjugate as a nucleus-targeting gene carrier for enhanced transfer activity. *Biomaterials.* 30:6109-6118.
- Maattanen, P., G. Kozlov, K. Gehring, et D.Y. Thomas. 2006. ERp57 and PDI: multifunctional protein disulfide isomerases with similar domain architectures but differing substrate-partner associations. *Biochem.Cell Biol.* 84:881-889.
- Mack, K.J., J. Cortner, P. Mack, et P.J. Farnham. 1992. krox 20 messenger RNA and protein expression in the adult central nervous system. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 14:117-123.
- Maegawa, M., T. Arao, H. Yokote, K. Matsumoto, K. Kudo, K. Tanaka, H. Kaneda, Y. Fujita, F. Ito, et K. Nishio. 2009. EGFR mutation up-regulates EGR1 expression through the ERK pathway. *Anticancer Res.* 29:1111-1117.
- Magenta, G., X. Borenstein, R. Rolando, et M.A. Jasnis. 2008. Rosiglitazone inhibits metastasis development of a murine mammary tumor cell line LMM3. *BMC.Cancer.* 8:47.
- Magun, B.E., et K.D. Rodland. 1995. Transient inhibition of protein synthesis induces the immediate early gene VL30: alternative mechanism for thapsigargin-induced gene expression. *Cell Growth Differ.* 6:891-897.
- Maki, C.G., J.M. Huibregtse, et P.M. Howley. 1996. *In vivo* ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res.* 56:2649-2654.
- Malabanan, K.P., P. Kanellakis, A. Bobik, et L.M. Khachigian. 2008. Activation transcription factor-4 induced by fibroblast growth factor-2 regulates vascular endothelial growth factor-A transcription in vascular smooth muscle cells and mediates intimal thickening in rat arteries following balloon injury. *Circ. Res.* 103:378-387.
- Malhotra, J.D., et R.J. Kaufman. 2007. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin.Cell Dev.Biol.* 18:716-731.
- Maniratanachote, R., K. Minami, M. Katoh, M. Nakajima, et T. Yokoi. 2005. Chaperone proteins involved in troglitazone-induced toxicity in human hepatoma cell lines. *Toxicol.Sci.* 83:293-302.

- Marciniak, S.J., C.Y. Yun, S. Oyadomari, I. Novoa, Y. Zhang, R. Jungreis, K. Nagata, H.P. Harding, et D. Ron. 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 18:3066-3077.
- Maruti, S.S., W.C. Willett, D. Feskanich, B. Rosner, et G.A. Colditz. 2008. A prospective study of age-specific physical activity and premenopausal breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 100:728-737.
- Marx, N., U. Schonbeck, M.A. Lazar, P. Libby, et J. Plutzky. 1998. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 83:1097-1103.
- Mathelin, C., C. Tomasetto, A. Cromer, et M.-C. Rio. 2006. [Proteomics and breast cancer]. *Gynecol Obstet Fertil.* 34:1161-1169.
- Matheny, C., M.L. Day, et J. Milbrandt. 1994. The nuclear localization signal of NGFI-A is located within the zinc finger DNA binding domain. *J.Biol.Chem.* 269:8176-8181.
- Mayer, S.I., et G. Thiel. 2009. Calcium influx into MIN6 insulinoma cells induces expression of Egr-1 involving extracellular signal-regulated protein kinase and the transcription factors Elk-1 and CREB. *Eur.J.Cell Biol.* 88:19-33.
- Mayer, S.I., V. Dexheimer, E. Nishida, S. Kitajima, et G. Thiel. 2008. Expression of the transcriptional repressor ATF3 in gonadotrophs is regulated by Egr-1, CREB, and ATF2 after gonadotropin-releasing hormone receptor stimulation. *Endocrinology.* 149:6311-6325.
- McCullough, K.D., J.L. Martindale, L.O. Klotz, T.Y. Aw, et N.J. Holbrook. 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol.Cell Biol.* 21:1249-1259.
- McMahon, S.B., et J.G. Monroe. 1995. A ternary complex factor-dependent mechanism mediates induction of egr-1 through selective serum response elements following antigen receptor cross-linking in B lymphocytes. *Mol.Cell Biol.* 15:1086-1093.
- McMahon, S.B., et J.G. Monroe. 1996. The role of early growth response gene 1 (egr-1) in regulation of the immune response. *J.Leukoc.Biol.* 60:159-166.
- Mechta-Grigoriou, F., S. Garel, et P. Charnay. 2000. Nab proteins mediate a negative feedback loop controlling Krox-20 activity in the developing hindbrain. *Development.* 127:119-128.
- Melchior, F. 2000. SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 16:591-626.
- Mello, C.V., D.S. Vicario, et D.F. Clayton. 1992. Song presentation induces gene expression in the songbird forebrain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:6818-6822.
- Melnick, J., J.L. Dul, et Y. Argon. 1994. Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature.* 370:373-375.
- Menetret, J.F., A. Neuhof, D.G. Morgan, K. Plath, M. Radermacher, T.A. Rapoport, et C.W. Akey. 2000. The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation. *Mol.Cell.* 6:1219-1232.
- Mengesdorf, T., S. Althausen, I. Oberndorfer, et W. Paschen. 2001. Response of neurons to an irreversible inhibition of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase: relationship between global protein synthesis and expression and translation of individual genes. *Biochem.J.* 356:805-812.
- de Mestre, A.M., S. Rao, J.R. Hornby, T. Soe-Htwe, L.M. Khachigian, et M.D. Hulett. 2005. Early growth response gene 1 (EGR1) regulates heparanase gene transcription in tumor cells. *J.Biol.Chem.* 280:35136-35147.
- Michalak, M., J.M. Robert Parker, et M. Opas. 2002. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* 32:269-278.
- Michalik, L., et W. Wahli. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr.Opin.Biotechnol.* 10:564-570.

- Milbrandt, J. 1987. A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science*. 238:797-799.
- Miller, K.D. 2002. Issues and challenges for antiangiogenic therapies. *Breast Cancer Res. Treat.* 75 Suppl 1:S45-50; discussion S57-58.
- Mitchell, A., C.R. Dass, L.Q. Sun, et L.M. Khachigian. 2004. Inhibition of human breast carcinoma proliferation, migration, chemoinvasion and solid tumour growth by DNazymes targeting the zinc finger transcription factor EGR-1. *Nucleic Acids Res.* 32:3065-3069.
- Mittelbronn, M., P. Harter, A. Warth, A. Lupescu, K. Schilbach, H. Vollmann, D. Capper, B. Goeppert, K. Frei, H. Bertalanffy, M. Weller, R. Meyermann, F. Lang, et P. Simon. 2009. EGR-1 is regulated by N-methyl-D-aspartate-receptor stimulation and associated with patient survival in human high grade astrocytomas. *Brain Pathol.* 19:195-204.
- Mittelstadt, P.R., et J.D. Ashwell. 1998. Cyclosporin A-sensitive transcription factor Egr-3 regulates Fas ligand expression. *Mol.Cell Biol.* 18:3744-3751.
- Mody, M., N. Dharker, M. Bloomston, P.S. Wang, F.S. Chou, T.S. Glickman, T. McCaffrey, Z. Yang, A. Pumfery, D. Lee, M.D. Ringel, et J.J. Pinzone. 2007. Rosiglitazone sensitizes MDA-MB-231 breast cancer cells to anti-tumour effects of tumour necrosis factor-alpha, CH11 and CYC202. *Endocr.Relat Cancer.* 14:305-315.
- Mohan, M., J.R. Malayer, R.D. Geisert, et G.L. Morgan. 2002. Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferator activated receptor gamma in bovine preattachment embryos. *Biol.Reprod.* 66:692-700.
- Moldes, M., Y. Zuo, R.F. Morrison, D. Silva, B.H. Park, J. Liu, et S.R. Farmer. 2003. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *Biochem.J.* 376:607-613.
- Montminy, M.R., et L.M. Bilezikjian. 1987. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature.* 328:175-178.
- Moon, Y., M. Lee, et H. Yang. 2007. Involvement of early growth response gene 1 in the modulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 by epigallocatechin gallate in A549 human pulmonary epithelial cells. *Biochem.Pharmacol.* 73:125-135.
- Mora, G.R., K.R. Olivier, R.F. Mitchell, R.B. Jenkins, et D.J. Tindall. 2005. Regulation of expression of the early growth response gene-1 (EGR-1) in malignant and benign cells of the prostate. *Prostate.* 63:198-207.
- Morabia, A., M. Bernstein, S. Heritier, et N. Khachatryan. 1996. Relation of breast cancer with passive and active exposure to tobacco smoke. *Am.J.Epidemiol.* 143:918-928.
- Mori, K. 2000. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell.* 101:451-454.
- Morris, M.E., N. Viswanathan, S. Kuhlman, F.C. Davis, et C.J. Weitz. 1998. A screen for genes induced in the suprachiasmatic nucleus by light. *Science.* 279:1544-1547.
- Morrison, R.F., et S.R. Farmer. 1999. Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J.Biol.Chem.* 274:17088-17097.
- Mouihate, A., L. Boisse, et Q.J. Pittman. 2004. A novel antipyretic action of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in the rat brain. *J.Neurosci.* 24:1312-1318.
- Mueller, E., P. Sarraf, P. Tontonoz, R.M. Evans, K.J. Martin, M. Zhang, C. Fletcher, S. Singer, et B.M. Spiegelman. 1998. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol.Cell.* 1:465-470.
- Mueller, E., M. Smith, P. Sarraf, T. Kroll, A. Aiyer, D.S. Kaufman, W. Oh, G. Demetri, W.D. Figg, X.P. Zhou, C. Eng, B.M. Spiegelman, et P.W. Kantoff. 2000. Effects of ligand activation of

peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97:10990-10995.

Mukherjee, R., P.A. Hoener, L. Jow, J. Bilakovics, K. Klausning, D.E. Mais, A. Faulkner, G.E. Croston, et J.R. Paterniti. 2000. A selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) modulator blocks adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol.Endocrinol.* 14:1425-1433.

Murata, T., S. He, M. Hangai, T. Ishibashi, X.P. Xi, S. Kim, W.A. Hsueh, S.J. Ryan, R.E. Law, et D.R. Hinton. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 41:2309-2317.

Musgrove, E.A., C.S. Lee, M.F. Buckley, et R.L. Sutherland. 1994. Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell cycle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:8022-8026.

Muthukkumar, S., P. Nair, S.F. Sells, N.G. Maddiwar, R.J. Jacob, et V.M. Rangnekar. 1995. Role of EGR-1 in thapsigargin-inducible apoptosis in the melanoma cell line A375-C6. *Mol. Cell. Biol.* 15:6262-6272.

Nadanaka, S., H. Yoshida, et K. Mori. 2006. Reduction of disulfide bridges in the luminal domain of ATF6 in response to glucose starvation. *Cell Struct. Funct.* 31:127-134.

Nagarajan, R., J. Svaren, N. Le, T. Araki, M. Watson, et J. Milbrandt. 2001. EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron.* 30:355-368.

Nagy, L., H.Y. Kao, D. Chakravarti, R.J. Lin, C.A. Hassig, D.E. Ayer, S.L. Schreiber, et R.M. Evans. 1997. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell.* 89:373-380.

Nair, P., S. Muthukkumar, S.F. Sells, S.S. Han, V.P. Sukhatme, et V.M. Rangnekar. 1997. Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53. *J.Biol.Chem.* 272:20131-20138.

Nakagawa, T., et J. Yuan. 2000. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J.Cell Biol.* 150:887-894.

Nicholson, R.I., I.R. Hutcheson, D. Britton, J.M. Knowlden, H.E. Jones, M.E. Harper, S.E. Hiscox, D. Barrow, et J.M. Gee. 2005. Growth factor signalling networks in breast cancer and resistance to endocrine agents: new therapeutic strategies. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 93:257-262.

Nikawa, J., et S. Yamashita. 1992. IRE1 encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* 6:1441-1446.

Nolan, J.J., B. Ludvik, P. Beerdsen, M. Joyce, et J. Olefsky. 1994. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N.Engl.J.Med.* 331:1188-1193.

Nose, K., et M. Ohba. 1996. Functional activation of the egr-1 (early growth response-1) gene by hydrogen peroxide. *Biochem.J.* 316 (Pt 2):381-383.

Numakura, C., E. Shirahata, S. Yamashita, M. Kanai, K. Kijima, T. Matsuki, et K. Hayasaka. 2003. Screening of the early growth response 2 gene in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *J.Neurol.Sci.* 210:61-64.

O'Donovan, K.J., W.G. Tourtellotte, J. Millbrandt, et J.M. Baraban. 1999. The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends Neurosci.* 22:167-173.

Oakes, N.D., C.J. Kennedy, A.B. Jenkins, D.R. Laybutt, D.J. Chisholm, et E.W. Kraegen. 1994. A new antidiabetic agent, BRL 49653, reduces lipid availability and improves insulin action and glucoregulation in the rat. *Diabetes.* 43:1203-1210.

Odani, N., M. Negishi, S. Takahashi, et A. Ichikawa. 1996a. Induction of protein disulfide isomerase mRNA by delta 12-prostaglandin J2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 220:264-268.

- Odani, N., M. Negishi, S. Takahashi, Y. Kitano, Y. Kozutsumi, et A. Ichikawa. 1996b. Regulation of BiP gene expression by cyclopentenone prostaglandins through unfolded protein response element. *J.Biol.Chem.* 271:16609-16613.
- Ohshima, T., H. Koga, et K. Shimotohno. 2004. Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *J.Biol.Chem.* 279:29551-29557.
- Okamura, K., Y. Kimata, H. Higashio, A. Tsuru, et K. Kohno. 2000. Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 279:445-450.
- Okura, T., M. Nakamura, Y. Takata, S. Watanabe, Y. Kitami, et K. Hiwada. 2000. Troglitazone induces apoptosis via the p53 and Gadd45 pathway in vascular smooth muscle cells. *Eur.J.Pharmacol.* 407:227-235.
- Ortmeyer, H.K., N.L. Bodkin, et B.C. Hansen. 1993. Adipose tissue glycogen synthase activation by *in vivo* insulin in spontaneously insulin-resistant and type 2 (non-insulin-dependent) diabetic rhesus monkeys. *Diabetologia.* 36:200-206.
- Osborne, C., P. Wilson, et D. Tripathy. 2004. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist.* 9:361-377.
- Pahl, H.L., et P.A. Baeuerle. 1995. A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J.* 14:2580-2588.
- Palakurthi, S.S., H. Aktas, L.M. Grubisich, R.M. Mortensen, et J.A. Halperin. 2001. Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res.* 61:6213-6218.
- Pan, Y., H. Chen, F. Siu, et M.S. Kilberg. 2003. Amino acid deprivation and endoplasmic reticulum stress induce expression of multiple activating transcription factor-3 mRNA species that, when overexpressed in HepG2 cells, modulate transcription by the human asparagine synthetase promoter. *J. Biol. Chem.* 278:38402-38412.
- Papavassiliou, A.G., M. Treier, C. Chavrier, et D. Bohmann. 1992. Targeted degradation of c-Fos, but not v-Fos, by a phosphorylation-dependent signal on c-Jun. *Science.* 258:1941-1944.
- Parra, E., et J. Ferreira. 2010. The effect of siRNA-Egr-1 and camptothecin on growth and chemosensitivity of breast cancer cell lines. *Oncol.Rep.* 23:1159-1165.
- Patil, C.K., H. Li, et P. Walter. 2004. Gcn4p and novel upstream activating sequences regulate targets of the unfolded protein response. *PLoS.Biol.* 2:E246.
- Patwardhan, S., A. Gashler, M.G. Siegel, L.C. Chang, L.J. Joseph, T.B. Shows, M.M. Le Beau, et V.P. Sukhatme. 1991. EGR3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene.* 6:917-928.
- Pegorier, J.P. 2005. [PPAR receptors and insulin sensitivity: new agonists in development]. *Ann.Endocrinol.(Paris).* 66:1S10-1S17.
- Peisach, E., et C.O. Pabo. 2003. Constraints for zinc finger linker design as inferred from X-ray crystal structure of tandem Zif268-DNA complexes. *J.Mol.Biol.* 330:1-7.
- Pentecost, B.T., L.M. Bradley, J.F. Gierthy, Y. Ding, et M.J. Fasco. 2005. Gene regulation in an MCF-7 cell line that naturally expresses an estrogen receptor unable to directly bind DNA. *Mol.Cell Endocrinol.* 238:9-25.
- Perou, C.M., T. Sørlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lønning, A.L. Børresen-Dale, P.O. Brown, et D. Botstein. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 406:747-752.
- Picard, F., et J. Auwerx. 2002. PPAR(gamma) and glucose homeostasis. *Annu.Rev.Nutr.* 22:167-197.

- Pignatelli, M., C. Cocca, A. Santos, et A. Perez-Castillo. 2003. Enhancement of BRCA1 gene expression by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in the MCF-7 breast cancer cell line. *Oncogene*. 22:5446-5450.
- Platet, N., A.M. Cathiard, M. Gleizes, et M. Garcia. 2004. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev.Oncol.Hematol*. 51:55-67.
- Poirier, R., H. Cheval, C. Mailhes, S. Garel, P. Charnay, S. Davis, et S. Laroche. 2008. Distinct functions of egr gene family members in cognitive processes. *Front Neurosci*. 2:47-55.
- Polascik, T.J., Z.P. Wang, M. Shue, S. Di, R.T. Gurganus, S.C. Hortopan, P.O. Ts'o, et A.W. Partin. 1999. Influence of sextant prostate needle biopsy or surgery on the detection and harvest of intact circulating prostate cancer cells. *J.Urol*. 162:749-752.
- Polyak, K. 2001. On the birth of breast cancer. *Biochim.Biophys.Acta*. 1552:1-13.
- Porterfield, V.M., H. Piontkivska, et E.M. Mintz. 2007. Identification of novel light-induced genes in the suprachiasmatic nucleus. *BMC.Neurosci*. 8:98.
- Pratt, M.A., A. Satkunarathnam, et D.M. Novosad. 1998. Estrogen activates raf-1 kinase and induces expression of Egr-1 in MCF-7 breast cancer cells. *Mol.Cell Biochem*. 189:119-125.
- Puigserver, P., Z. Wu, C.W. Park, R. Graves, M. Wright, et B.M. Spiegelman. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 92:829-839.
- Qin, C., R. Burghardt, R. Smith, M. Wormke, J. Stewart, et S. Safe. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists induce proteasome-dependent degradation of cyclin D1 and estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res*. 63:958-964.
- Ranganathan, A.C., S. Ojha, A. Kourtidis, D.S. Conklin, et J.A. guirre-Ghiso. 2008. Dual function of pancreatic endoplasmic reticulum kinase in tumor cell growth arrest and survival. *Cancer Res*. 68:3260-3268.
- Rangnekar, V.M., A.C. Aplin, et V.P. Sukhatme. 1990. The serum and TPA responsive promoter and intron-exon structure of EGR2, a human early growth response gene encoding a zinc finger protein. *Nucleic Acids Res*. 18:2749-2757.
- Rao, R.V., S. Castro-Obregon, H. Frankowski, M. Schuler, V. Stoka, R.G. del, D.E. Bredesen, et H.M. Ellerby. 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J.Biol.Chem*. 277:21836-21842.
- Rashid-Kolvear, F., M.A.S. Taboski, J. Nguyen, D.-Y. Wang, L.A. Harrington, et S.J. Done. 2010. Troglitazone suppresses telomerase activity independently of PPARgamma in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *BMC Cancer*. 10:390.
- Redmond, K.L., N.T. Crawford, H. Farmer, Z.C. D'Costa, G.J. O'Brien, N.E. Buckley, R.D. Kennedy, P.G. Johnston, D.P. Harkin, et P.B. Mullan. 2010. T-box 2 represses NDRG1 through an EGR1-dependent mechanism to drive the proliferation of breast cancer cells. *Oncogene*.
- Reimertz, C., D. Kögel, A. Rami, T. Chittenden, et J.H.M. Prehn. 2003. Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J. Cell Biol*. 162:587-597.
- Ricote, M., A.C. Li, T.M. Willson, C.J. Kelly, et C.K. Glass. 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 391:79-82.
- Rieusset, J., F. Touri, L. Michalik, P. Escher, B. Desvergne, E. Niesor, et W. Wahli. 2002. A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol.Endocrinol*. 16:2628-2644.
- Riggs, P.K., O. Rho, et J. DiGiovanni. 2000. Alteration of Egr-1 mRNA during multistage carcinogenesis in mouse skin. *Mol.Carcinog*. 27:247-251.

- Roby, D., A.P. Wolffe, et W. Wahli. 2000. Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol.Endocrinol.* 14:329-347.
- Roeder, R.G. 2005. Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett.* 579:909-915.
- Ronckers, C.M., C.A. Erdmann, et C.E. Land. 2005. Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res.* 7:21-32.
- Ronski, K., M. Sanders, J.A. Bursleson, V. Moyo, P. Benn, et M. Fang. 2005. Early growth response gene 1 (EGR1) is deleted in estrogen receptor-negative human breast carcinoma. *Cancer.* 104:925-930.
- Rosen, E.D., P. Sarraf, A.E. Troy, G. Bradwin, K. Moore, D.S. Milstone, B.M. Spiegelman, et R.M. Mortensen. 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol.Cell.* 4:611-617.
- Rosler, O.G., et G. Thiel. 2009. Thrombin induces Egr-1 expression in fibroblasts involving elevation of the intracellular Ca²⁺ concentration, phosphorylation of ERK and activation of ternary complex factor. *BMC.Mol.Biol.* 10:40.
- Russell-Jones, G., K. McTavish, J. McEwan, J. Rice, et D. Nowotnik. 2004. Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours. *J. Inorg. Biochem.* 98:1625-1633.
- Russo, I.H., et J. Russo. 1998. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 3:49-61.
- Russo, J., et I.H. Russo. 2004. Development of the human breast. *Maturitas.* 49:2-15.
- Russo, M.W., B.R. Sevetson, et J. Milbrandt. 1995. Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:6873-6877.
- Sakamoto, K.M., C. Bardeleben, K.E. Yates, M.A. Raines, D.W. Golde, et J.C. Gasson. 1991. 5' upstream sequence and genomic structure of the human primary response gene, EGR-1/TIS8. *Oncogene.* 6:867-871.
- Sakorafas, G.H., E. Krespis, et G. Pavlakis. 2002. Risk estimation for breast cancer development; a clinical perspective. *Surg.Oncol.* 10:183-192.
- Saleh, M., J.C. Mathison, M.K. Wolinski, S.J. Bensinger, P. Fitzgerald, N. Droin, R.J. Ulevitch, D.R. Green, et D.W. Nicholson. 2006. Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature.* 440:1064-1068.
- Salghetti, S.E., S.Y. Kim, et W.P. Tansey. 1999. Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *EMBO J.* 18:717-726.
- Samid, D., M. Wells, M.E. Greene, W. Shen, C.N. Palmer, et A. Thibault. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a novel target in cancer therapy: binding and activation by an aromatic fatty acid with clinical antitumor activity. *Clin.Cancer Res.* 6:933-941.
- Sandnes, D., K.M. Müller, K. Akhtar, E.J. Johansen, T. Christoffersen, et G.H. Thoresen. 2010. Induction of LRF-1/ATF3 by vasopressin in hepatocytes: role of MAP kinases. *Cell. Physiol. Biochem.* 25:523-532.
- Sarraf, P., E. Mueller, D. Jones, F.J. King, D.J. DeAngelo, J.B. Partridge, S.A. Holden, L.B. Chen, S. Singer, C. Fletcher, et B.M. Spiegelman. 1998. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat.Med.* 4:1046-1052.
- Sasaki, M., P. Jordan, T. Welbourne, A. Minagar, T. Joh, M. Itoh, J.W. Elrod, et J.S. Alexander. 2005. Troglitazone, a PPAR-gamma activator prevents endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion mediated by TNF-alpha. *BMC.Physiol.* 5:3.

- Sawai, H., J. Liu, H.A. Reber, O.J. Hines, et G. Eibl. 2006. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma decreases pancreatic cancer cell invasion through modulation of the plasminogen activator system. *Mol.Cancer Res.* 4:159-167.
- Schaefer, A., F. Kosa, T. Bittorf, M. Magocsi, A. Rosche, Y. Ramirez-Chavez, S. Marotzki, et H. Marquardt. 2004. Opposite effects of inhibitors of mitogen-activated protein kinase pathways on the egr-1 and beta-globin expression in erythropoietin-responsive murine erythroleukemia cells. *Cell Signal.* 16:223-234.
- Scharnhorst, V., A.L. Menke, J. Attema, J.K. Haneveld, N. Riteco, G.J. van Steenbrugge, A.J. van der Eb, et A.G. Jochemsen. 2000. EGR-1 enhances tumor growth and modulates the effect of the Wilms' tumor 1 gene products on tumorigenicity. *Oncogene.* 19:791-800.
- Scher, J.U., et M.H. Pillinger. 2005. 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin. Immunol.* 114:100-109.
- Scheuner, D., B. Song, E. McEwen, C. Liu, R. Laybutt, P. Gillespie, T. Saunders, S. Bonner-Weir, et R.J. Kaufman. 2001. Translational control is required for the unfolded protein response and *in vivo* glucose homeostasis. *Mol.Cell.* 7:1165-1176.
- Schewe, D.M., et J.A. guirre-Ghiso. 2009. Inhibition of eIF2alpha dephosphorylation maximizes bortezomib efficiency and eliminates quiescent multiple myeloma cells surviving proteasome inhibitor therapy. *Cancer Res.* 69:1545-1552.
- Schmidt, J., B. Stoffels, B.A. Moore, R.S. Chanthaphavong, A.R. Mazie, B.M. Buchholz, et A.J. Bauer. 2008. Proinflammatory role of leukocyte-derived Egr-1 in the development of murine postoperative ileus. *Gastroenterology.* 135:926-36, 936.
- Schneider-Maunoury, S., P. Topilko, T. Seitandou, G. Levi, M. Cohen-Tannoudji, S. Pournin, C. Babinet, et P. Charnay. 1993. Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell.* 75:1199-1214.
- Schoonjans, K., J. Peinado-Onsurbe, A.M. Lefebvre, R.A. Heyman, M. Briggs, S. Deeb, B. Staels, et J. Auwerx. 1996. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15:5336-5348.
- Schroder, M., et R.J. Kaufman. 2005. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat.Res.* 569:29-63.
- Schultze, K., B. Bock, A. Eckert, L. Oevermann, D. Ramacher, O. Wiestler, et W. Roth. 2006. Troglitazone sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis via down-regulation of FLIP and Survivin. *Apoptosis.* 11:1503-1512.
- Schwachtgen, J.L., C.J. Campbell, et M. Braddock. 2000. Full promoter sequence of human early growth response factor-1 (Egr-1): demonstration of a fifth functional serum response element. *DNA Seq.* 10:429-432.
- Scorrano, L., S.A. Oakes, J.T. Opferman, E.H. Cheng, M.D. Sorcinelli, T. Pozzan, et S.J. Korsmeyer. 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science.* 300:135-139.
- Seargent, J.M., E.A. Yates, et J.H. Gill. 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.
- Seeler, J.S., et A. Dejean. 2003. Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 4:690-699.
- Seyfert, V.L., S.B. McMahon, W.D. Glenn, A.J. Yellen, V.P. Sukhatme, X.M. Cao, et J.G. Monroe. 1990. Methylation of an immediate-early inducible gene as a mechanism for B cell tolerance induction. *Science.* 250:797-800.

- Seyfert, V.L., V.P. Sukhatme, et J.G. Monroe. 1989. Differential expression of a zinc finger-encoding gene in response to positive versus negative signaling through receptor immunoglobulin in murine B lymphocytes. *Mol.Cell Biol.* 9:2083-2088.
- Shao, D., S.M. Rangwala, S.T. Bailey, S.L. Krakow, M.J. Reginato, et M.A. Lazar. 1998. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature.* 396:377-380.
- Shearer, B.G., et A.N. Billin. 2007. The next generation of PPAR drugs: do we have the tools to find them? *Biochim.Biophys.Acta.* 1771:1082-1093.
- Shen, J., X. Chen, L. Hendershot, et R. Prywes. 2002. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev.Cell.* 3:99-111.
- Sheng, Z.H., H. Zhang, R.L. Barchi, et R.G. Kallen. 1994. Molecular cloning and functional analysis of the promoter of rat skeletal muscle voltage-sensitive sodium channel subtype 2 (rSkM2): evidence for muscle-specific nuclear protein binding to the core promoter. *DNA Cell Biol.* 13:9-23.
- Sher, T., H.F. Yi, O.W. McBride, et F.J. Gonzalez. 1993. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry.* 32:5598-5604.
- Shi, Y., J. An, J. Liang, S.E. Hayes, G.E. Sandusky, L.E. Stramm, et N.N. Yang. 1999. Characterization of a mutant pancreatic eIF-2alpha kinase, PEK, and co-localization with somatostatin in islet delta cells. *J.Biol.Chem.* 274:5723-5730.
- Shiau, C.W., C.C. Yang, S.K. Kulp, K.F. Chen, C.S. Chen, J.W. Huang, et C.S. Chen. 2005. Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma. *Cancer Res.* 65:1561-1569.
- Shimizu, M., D. Yamashita, T. Yamaguchi, F. Hirose, et T. Osumi. 2006. Aspects of the regulatory mechanisms of PPAR functions: analysis of a bidirectional response element and regulation by sumoylation. *Mol.Cell Biochem.* 286:33-42.
- Simon, P., K. Schott, R.W. Williams, et F. Schaeffel. 2004. Posttranscriptional regulation of the immediate-early gene EGR1 by light in the mouse retina. *Eur.J.Neurosci.* 20:3371-3377.
- So, A.Y., F.E. de la, P. Walter, M. Shuman, et S. Bernales. 2009. The unfolded protein response during prostate cancer development. *Cancer Metastasis Rev.* 28:219-223.
- Sohda, T., K. Mizuno, E. Imamiya, Y. Sugiyama, T. Fujita, et Y. Kawamatsu. 1982. Studies on antidiabetic agents. II. Synthesis of 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)-benzyl]thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878) and its derivatives. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo).* 30:3580-3600.
- Sok, J., X.Z. Wang, N. Batchvarova, M. Kuroda, H. Harding, et D. Ron. 1999. CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. *Mol.Cell Biol.* 19:495-504.
- Soto, A.M., C. Sonnenschein, K.L. Chung, M.F. Fernandez, N. Olea, et F.O. Serrano. 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.
- Spiegelman, B.M. 1998. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes.* 47:507-514.
- Spiro, R.G. 2004. Role of N-linked polymannose oligosaccharides in targeting glycoproteins for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* 61:1025-1041.
- Spohn, D., O.G. Rössler, S.E. Philipp, M. Raubuch, S. Kitajima, D. Griesemer, M. Hoth, et G. Thiel. 2010. Thapsigargin induces expression of activating transcription factor 3 in human keratinocytes involving Ca²⁺ ions and c-Jun N-terminal protein kinase. *Mol. Pharmacol.* 78:865-876.
- Srivastava, S., M.N. Weitzmann, R.B. Kimble, M. Rizzo, M. Zahner, J. Milbrandt, F.P. Ross, et R. Pacifici. 1998. Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. *J.Clin.Invest.* 102:1850-1859.

- Stancovski, I., H. Gonen, A. Orian, A.L. Schwartz, et A. Ciechanover. 1995. Degradation of the proto-oncogene product c-Fos by the ubiquitin proteolytic system *in vivo* and *in vitro*: identification and characterization of the conjugating enzymes. *Mol.Cell Biol.* 15:7106-7116.
- Stears, A.J., et C.D. Byrne. 2001. Adipocyte metabolism and the metabolic syndrome. *Diabetes Obes.Metab.* 3:129-142.
- Stefano, L., O.G. Rossler, D. Griesemer, M. Hoth, et G. Thiel. 2007. P2X(7) receptor stimulation upregulates Egr-1 biosynthesis involving a cytosolic Ca(2+) rise, transactivation of the EGF receptor and phosphorylation of ERK and Elk-1. *J.Cell Physiol.* 213:36-44.
- Stull, M.A., A.M. Rowzee, A.V. Loladze, et T.L. Wood. 2004. Growth factor regulation of cell cycle progression in mammary epithelial cells. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 9:15-26.
- Sukhatme, V.P. 1990. Early transcriptional events in cell growth: the Egr family. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1:859-866.
- Sukhatme, V.P., X.M. Cao, L.C. Chang, C.H. Tsai-Morris, D. Stamenkovich, P.C. Ferreira, D.R. Cohen, S.A. Edwards, T.B. Shows, T. Curran, et . 1988. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell.* 53:37-43.
- Sukhatme, V.P., S. Kartha, F.G. Toback, R. Taub, R.G. Hoover, et C.H. Tsai-Morris. 1987. A novel early growth response gene rapidly induced by fibroblast, epithelial cell and lymphocyte mitogens. *Oncogene Res.* 1:343-355.
- Sundvold, H., et S. Lien. 2001. Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma promoter in man and transactivation by the nuclear receptor RORalpha. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 287:383-390.
- Suzuki, T., A. Inoue, Y. Miki, T. Moriya, J. Akahira, T. Ishida, H. Hirakawa, Y. Yamaguchi, S. Hayashi, et H. Sasano. 2007. Early growth responsive gene 3 in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor. *Endocr.Relat Cancer.* 14:279-292.
- Svaren, J., B.R. Sevetson, E.D. Apel, D.B. Zimonjic, N.C. Popescu, et J. Milbrandt. 1996. NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol.Cell Biol.* 16:3545-3553.
- Swirnoff, A.H., E.D. Apel, J. Svaren, B.R. Sevetson, D.B. Zimonjic, N.C. Popescu, et J. Milbrandt. 1998. Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. *Mol.Cell Biol.* 18:512-524.
- Swirnoff, A.H., et J. Milbrandt. 1995. DNA-binding specificity of NGFI-A and related zinc finger transcription factors. *Mol.Cell Biol.* 15:2275-2287.
- Szegezdi, E., S.E. Logue, A.M. Gorman, et A. Samali. 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 7:880-885.
- Takahashi, H., H. Mitomi, M. Igarashi, T. Katsumata, et I. Okayasu. 1999. Markedly elevated cell turnover is characteristic of small, deeply invasive carcinomas of the colorectum. *Cancer.* 85:796-802.
- Takeda, K., T. Ichiki, T. Tokunou, N. Iino, et A. Takeshita. 2001. 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones activate the MEK/ERK pathway through phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 276:48950-48955.
- Tarrade, A., K. Schoonjans, L. Pavan, J. Auwerx, C. Rochette-Egly, D. Evain-Brion, et T. Fournier. 2001. PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 86:5017-5024.
- Teboul, L., D. Gaillard, L. Staccini, H. Inadera, E.Z. Amri, et P.A. Grimaldi. 1995. Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells. *J.Biol.Chem.* 270:28183-28187.
- Thiel, G., et G. Cibelli. 2002. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J.Cell Physiol.* 193:287-292.

- Thigpen, A.E., K.M. Cala, J.M. Guileyardo, K.H. Molberg, J.D. McConnell, et D.W. Russell. 1996. Increased expression of early growth response-1 messenger ribonucleic acid in prostatic adenocarcinoma. *J.Urol.* 155:975-981.
- Thygesen, L.C., L.S. Morch, N. Keiding, C. Johansen, et M. Gronbaek. 2008. Use of baseline and updated information on alcohol intake on risk for breast cancer: importance of latency. *Int.J.Epidemiol.* 37:669-677.
- Tirasophon, W., K. Lee, B. Callaghan, A. Welihinda, et R.J. Kaufman. 2000. The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes Dev.* 14:2725-2736.
- Tirasophon, W., A.A. Welihinda, et R.J. Kaufman. 1998. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* 12:1812-1824.
- Tontonoz, P., E. Hu, R.A. Graves, A.I. Budavari, et B.M. Spiegelman. 1994a. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8:1224-1234.
- Tontonoz, P., E. Hu, et B.M. Spiegelman. 1994b. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 79:1147-1156.
- Topilko, P., S. Schneider-Maunoury, G. Levi, E.A. Baron-Van, A.B. Chennoufi, T. Seitanidou, C. Babinet, et P. Charnay. 1994. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature.* 371:796-799.
- Tourtellotte, W.G., C. Keller-Peck, J. Milbrandt, et J. Kucera. 2001. The transcription factor Egr3 modulates sensory axon-myotube interactions during muscle spindle morphogenesis. *Dev.Biol.* 232:388-399.
- Tourtellotte, W.G., et J. Milbrandt. 1998. Sensory ataxia and muscle spindle agenesis in mice lacking the transcription factor Egr3. *Nat.Genet.* 20:87-91.
- Tourtellotte, W.G., R. Nagarajan, A. Auyeung, C. Mueller, et J. Milbrandt. 1999. Infertility associated with incomplete spermatogenic arrest and oligozoospermia in Egr4-deficient mice. *Development.* 126:5061-5071.
- Tourtellotte, W.G., R. Nagarajan, A. Bartke, et J. Milbrandt. 2000. Functional compensation by Egr4 in Egr1-dependent luteinizing hormone regulation and Leydig cell steroidogenesis. *Mol.Cell Biol.* 20:5261-5268.
- Treisman, R. 1992. The serum response element. *Trends Biochem.Sci.* 17:423-426.
- Treuter, E., T. Albrektsen, L. Johansson, J. Leers, et J.A. Gustafsson. 1998. A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation. *Mol.Endocrinol.* 12:864-881.
- 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.
- Tsai-Morris, C.H., X.M. Cao, et V.P. Sukhatme. 1988. 5' flanking sequence and genomic structure of Egr-1, a murine mitogen inducible zinc finger encoding gene. *Nucleic Acids Res.* 16:8835-8846.
- Turturro, F., E. Friday, R. Fowler, D. Surie, et T. Welbourne. 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.* 10:7022-7030.
- Ubeda, M., M. Vallejo, et J.F. Habener. 1999. CHOP enhancement of gene transcription by interactions with Jun/Fos AP-1 complex proteins. *Mol.Cell Biol.* 19:7589-7599.
- Unoki, M., et Y. Nakamura. 2001. Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene.* 20:4457-4465.
- Unoki, M., et Y. Nakamura. 2003. EGR2 induces apoptosis in various cancer cell lines by direct transactivation of BNIP3L and BAK. *Oncogene.* 22:2172-2185.

- Uppenberg, J., C. Svensson, M. Jaki, G. Bertilsson, L. Jendeberg, et A. Berkenstam. 1998. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma. *J.Biol.Chem.* 273:31108-31112.
- Varshavsky, A. 1997. The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells.* 2:13-28.
- Vattem, K.M., et R.C. Wek. 2004. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:11269-11274.
- Venken, K., M.E. Di, E. Bellone, P. Balestra, D. Cassandrini, P. Mandich, J.P. De, V. Timmerman, et J. Svaren. 2002. Search for mutations in the EGR2 corepressor proteins, NAB1 and NAB2, in human peripheral neuropathies. *Neurogenetics.* 4:37-41.
- Virolle, T., E.D. Adamson, V. Baron, D. Birle, D. Mercola, T. Mustelin, et B. de. 2001. The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat.Cell Biol.* 3:1124-1128.
- Virolle, T., A. Krones-Herzig, V. Baron, G.G. De, E.D. Adamson, et D. Mercola. 2003. Egr1 promotes growth and survival of prostate cancer cells. Identification of novel Egr1 target genes. *J.Biol.Chem.* 278:11802-11810.
- Voiculescu, O., P. Charnay, et S. Schneider-Maunoury. 2000. Expression pattern of a Krox-20/Cre knock-in allele in the developing hindbrain, bones, and peripheral nervous system. *Genesis.* 26:123-126.
- Wadzinski, B.E., W.H. Wheat, S. Jaspers, L.F. Peruski, R.L. Lickteig, G.L. Johnson, et D.J. Klemm. 1993. Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol.Cell Biol.* 13:2822-2834.
- Wang, C.C., G. Sharma, et B. Draznin. 2006a. Early growth response gene-1 expression in vascular smooth muscle cells effects of insulin and oxidant stress. *Am.J.Hypertens.* 19:366-372.
- Wang, G., Z.-Q. Yang, et K. Zhang. 2010. Endoplasmic reticulum stress response in cancer: molecular mechanism and therapeutic potential. *Am J Transl Res.* 2:65-74.
- Wang, J., E.M. John, P.L. Horn-Ross, et S.A. Ingles. 2008. Dietary fat, cooking fat, and breast cancer risk in a multiethnic population. *Nutr.Cancer.* 60:492-504.
- Wang, J.Q. 1998. Regulation of immediate early gene c-fos and zif/268 mRNA expression in rat striatum by metabotropic glutamate receptor. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 57:46-53.
- Wang, T., J. Xu, X. Yu, R. Yang, et Z.C. Han. 2006b. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 58:1-14.
- Wang, X.Z., H.P. Harding, Y. Zhang, E.M. Jolicoeur, M. Kuroda, et D. Ron. 1998. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* 17:5708-5717.
- Wang, X.Z., et D. Ron. 1996. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science.* 272:1347-1349.
- Wang, Y., J. Shen, N. Arenzana, W. Tirasophon, R.J. Kaufman, et R. Prywes. 2000. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J.Biol.Chem.* 275:27013-27020.
- Warner, L.E., P. Mancias, I.J. Butler, C.M. McDonald, L. Keppen, K.G. Koob, et J.R. Lupski. 1998. Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat.Genet.* 18:382-384.
- Warner, L.E., J. Svaren, J. Milbrandt, et J.R. Lupski. 1999. Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Hum.Mol.Genet.* 8:1245-1251.
- Wasserman, W.W., et W.E. Fahl. 1997. Functional antioxidant responsive elements. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:5361-5366.

- Watanabe, S., H. Kubota, K.M. Sakamoto, et K. Arai. 1997. Characterization of cis-acting sequences and trans-acting signals regulating early growth response 1 and c-fos promoters through the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor in BA/F3 cells. *Blood*. 89:1197-1206.
- Waters, C.M., D.C. Hancock, et G.I. Evan. 1990. Identification and characterisation of the egr-1 gene product as an inducible, short-lived, nuclear phosphoprotein. *Oncogene*. 5:669-674.
- Wazer, D.E., et V. Band. 1999. Molecular and anatomic considerations in the pathogenesis of breast cancer. *Radiat.Oncol.Investig*. 7:1-12.
- Weber, S.M., K.T. Chambers, K.G. Bensch, A.L. Scarim, et J.A. Corbett. 2004a. PPARgamma ligands induce ER stress in pancreatic beta-cells: ER stress activation results in attenuation of cytokine signaling. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*. 287:E1171-E1177.
- Weber, S.M., A.L. Scarim, et J.A. Corbett. 2004b. PPARgamma is not required for the inhibitory actions of PGJ2 on cytokine signaling in pancreatic beta-cells. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*. 286:E329-E336.
- Wei, S., L.F. Lin, C.C. Yang, Y.C. Wang, G.D. Chang, H. Chen, et C.S. Chen. 2007. Thiazolidinediones modulate the expression of beta-catenin and other cell-cycle regulatory proteins by targeting the F-box proteins of Skp1-Cul1-F-box protein E3 ubiquitin ligase independently of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol.Pharmacol*. 72:725-733.
- Wei, S., S.K. Kulp, et C.-S. Chen. 2010. Energy restriction as an antitumor target of thiazolidinediones. *J. Biol. Chem*. 285:9780-9791.
- Weng, J.R., C.Y. Chen, J.J. Pinzone, M.D. Ringel, et C.S. Chen. 2006. Beyond peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling: the multi-facets of the antitumor effect of thiazolidinediones. *Endocr.Relat Cancer*. 13:401-413.
- Whitmarsh, A.J., P. Shore, A.D. Sharrocks, et R.J. Davis. 1995. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science*. 269:403-407.
- Williams, D.B. 2006. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J.Cell Sci*. 119:615-623.
- Willson, T.M., P.J. Brown, D.D. Sternbach, et B.R. Henke. 2000. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J.Med.Chem*. 43:527-550.
- Witmer, A.N., G.F. Vrensen, C.J. Van Noorden, et R.O. Schlingemann. 2003. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog.Retin.Eye Res*. 22:1-29.
- Wright, H.M., C.B. Clish, T. Mikami, S. Hauser, K. Yanagi, R. Hiramatsu, C.N. Serhan, et B.M. Spiegelman. 2000. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J.Biol.Chem*. 275:1873-1877.
- Wu, W., A. Koike, T. Takeshita, et T. Ohta. 2008. The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions. *Cell Div*. 3:1.
- Xi, H., et G.J. Kersh. 2003. Induction of the early growth response gene 1 promoter by TCR agonists and partial agonists: ligand potency is related to sustained phosphorylation of extracellular signal-related kinase substrates. *J.Immunol*. 170:315-324.
- Xin, X., S. Yang, J. Kowalski, et M.E. Gerritsen. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *J.Biol.Chem*. 274:9116-9121.
- Xu, H.E., M.H. Lambert, V.G. Montana, D.J. Parks, S.G. Blanchard, P.J. Brown, D.D. Sternbach, J.M. Lehmann, G.B. Wisely, T.M. Willson, S.A. Kliewer, et M.V. Milburn. 1999. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol.Cell*. 3:397-403.
- Xue, X., J.-H. Piao, A. Nakajima, S. Sakon-Komazawa, Y. Kojima, K. Mori, H. Yagita, K. Okumura, H. Harding, et H. Nakano. 2005. Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. *J. Biol. Chem*. 280:33917-33925.

- Yamaguchi, K., S.H. Lee, J.S. Kim, J. Wimalasena, S. Kitajima, et S.J. Baek. 2006. Activating transcription factor 3 and early growth response 1 are the novel targets of LY294002 in a phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway. *Cancer Res.* 66:2376-2384.
- Yamamoto, K., T. Sato, T. Matsui, M. Sato, T. Okada, H. Yoshida, A. Harada, et K. Mori. 2007. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev.Cell.* 13:365-376.
- Yaman, I., J. Fernandez, H. Liu, M. Caprara, A.A. Komar, A.E. Koromilas, L. Zhou, M.D. Snider, D. Scheuner, R.J. Kaufman, et M. Hatzoglou. 2003. The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell.* 113:519-531.
- Yamashita, D., T. Yamaguchi, M. Shimizu, N. Nakata, F. Hirose, et T. Osumi. 2004. The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain. *Genes Cells.* 9:1017-1029.
- Yamauchi, T., H. Waki, J. Kamon, K. Murakami, K. Motojima, K. Komeda, H. Miki, N. Kubota, Y. Terauchi, A. Tsuchida, N. Tsuboyama-Kasaoka, N. Yamauchi, T. Ide, W. Hori, S. Kato, M. Fukayama, Y. Akanuma, O. Ezaki, A. Itai, R. Nagai, S. Kimura, K. Tobe, H. Kagechika, K. Shudo, et T. Kadowaki. 2001. Inhibition of RXR and PPARgamma ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J.Clin.Invest.* 108:1001-1013.
- Yan, J., H. Yang, G. Wang, L. Sun, Y. Zhou, Y. Guo, Z. Xi, et X. Jiang. 2010. Autophagy augmented by troglitazone is independent of EGFR transactivation and correlated with AMP-activated protein kinase signaling. *Autophagy.* 6:67-73.
- Yan, S.F., T. Fujita, J. Lu, K. Okada, Z.Y. Shan, N. Mackman, D.J. Pinsky, et D.M. Stern. 2000. Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat.Med.* 6:1355-1361.
- Yan, W., C.L. Frank, M.J. Korth, B.L. Sopher, I. Novoa, D. Ron, et M.G. Katze. 2002. Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99:15920-15925.
- Yang, C.C., C.Y. Ku, S. Wei, C.W. Shiau, C.S. Chen, J.J. Pinzone, M.D. Ringel, et C.S. Chen. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent repression of prostate-specific antigen expression by thiazolidinediones in prostate cancer cells. *Mol.Pharmacol.* 69:1564-1570.
- Yang, C.C., Y.C. Wang, S. Wei, L.F. Lin, C.S. Chen, C.C. Lee, C.C. Lin, et C.S. Chen. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent suppression of androgen receptor expression by troglitazone mechanism and pharmacologic exploitation. *Cancer Res.* 67:3229-3238.
- Yang, F.G., Z.W. Zhang, D.Q. Xin, C.J. Shi, J.P. Wu, Y.L. Guo, et Y.F. Guan. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce cell cycle arrest and apoptosis in human renal carcinoma cell lines. *Acta Pharmacol.Sin.* 26:753-761.
- Yang, S.H., A.J. Whitmarsh, R.J. Davis, et A.D. Sharrocks. 1998. Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J.* 17:1740-1749.
- Yang, S.Z., et S.A. Abdulkadir. 2003. Early growth response gene 1 modulates androgen receptor signaling in prostate carcinoma cells. *J.Biol.Chem.* 278:39906-39911.
- Yang, W., E. Tiffany-Castiglioni, H.C. Koh, et I.H. Son. 2009a. Paraquat activates the IRE1/ASK1/JNK cascade associated with apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol.Lett.* 191:203-210.
- Yang, W., Y. Cheng, T. Xu, X. Wang, et L.-P. Wen. 2009b. Targeting cancer cells with biotin-dendrimer conjugates. *Eur J Med Chem.* 44:862-868.
- Yin, F., D. Bruemmer, F. Blaschke, W.A. Hsueh, R.E. Law, et A.J. Herle. 2004. Signaling pathways involved in induction of GADD45 gene expression and apoptosis by troglitazone in human MCF-7 breast carcinoma cells. *Oncogene.* 23:4614-4623.

- Yin, F., S. Wakino, Z. Liu, S. Kim, W.A. Hsueh, A.R. Collins, A.J. Van Herle, et R.E. Law. 2001. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 286:916-922.
- Yoneda, T., K. Imaizumi, K. Oono, D. Yui, F. Gomi, T. Katayama, et M. Tohyama. 2001. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J.Biol.Chem.* 276:13935-13940.
- Yoshida, H., K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, et K. Mori. 1998. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J.Biol.Chem.* 273:33741-33749.
- Yoshida, H., T. Matsui, N. Hosokawa, R.J. Kaufman, K. Nagata, et K. Mori. 2003. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev.Cell.* 4:265-271.
- Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, et K. Mori. 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 107:881-891.
- Yoshida, H., T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi, et K. Mori. 2000. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol.Cell Biol.* 20:6755-6767.
- Yoshida, H., M. Oku, M. Suzuki, et K. Mori. 2006. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J.Cell Biol.* 172:565-575.
- Yoshikawa, T., Z. Brkanac, B.R. Dupont, G.Q. Xing, R.J. Leach, et S.D. Tera-Wadleigh. 1996. Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics.* 35:637-638.
- Yoshiuchi, K., H. Kaneto, T.A. Matsuoka, R. Kasami, K. Kohno, T. Iwawaki, Y. Nakatani, Y. Yamasaki, I. Shimomura, et M. Matsuhisa. 2009. Pioglitazone reduces ER stress in the liver: direct monitoring of *in vivo* ER stress using ER stress-activated indicator transgenic mice. *Endocr.J.* 56:1103-1111.
- Yoshizumi, T., T. Ohta, I. Ninomiya, I. Terada, S. Fushida, T. Fujimura, G. Nishimura, K. Shimizu, S. Yi, et K. Miwa. 2004. Thiazolidinedione, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, inhibits growth and metastasis of HT-29 human colon cancer cells through differentiation-promoting effects. *Int.J.Oncol.* 25:631-639.
- Yu, H.-N., E.-M. Noh, Y.-R. Lee, S.-G. Roh, E.-K. Song, M.-K. Han, Y.-C. Lee, I.K. Shim, S.J. Lee, S.H. Jung, J.-S. Kim, et H.J. Youn. 2008. Troglitazone enhances tamoxifen-induced growth inhibitory activity of MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377:242-247.
- Yu, J., B. de, H. Liang, et E.D. Adamson. 2004. Coactivating factors p300 and CBP are transcriptionally crossregulated by Egr1 in prostate cells, leading to divergent responses. *Mol.Cell.* 15:83-94.
- Yu, J., S.S. Zhang, K. Saito, S. Williams, Y. Arimura, Y. Ma, Y. Ke, V. Baron, D. Mercola, G.S. Feng, E. Adamson, et T. Mustelin. 2009. PTEN regulation by Akt-EGR1-ARF-PTEN axis. *EMBO J.* 28:21-33.
- Yue, W., J.P. Wang, Y. Li, W.P. Bocchinfuso, K.S. Korach, P.D. Devanesan, E. Rogan, E. Cavalieri, et R.J. Santen. 2005. Tamoxifen versus aromatase inhibitors for breast cancer prevention. *Clin.Cancer Res.* 11:925s-930s.
- Zang, C., H. Liu, J. Bertz, K. Possinger, H.P. Koeffler, E. Elstner, et J. Eucker. 2009. Induction of endoplasmic reticulum stress response by TZD18, a novel dual ligand for peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma, in human breast cancer cells. *Mol.Cancer Ther.* 8:2296-2307.

- Zang, C., H. Liu, M. Waechter, J. Eucker, J. Bertz, K. Possinger, H.P. Koeffler, et E. Elstner. 2006. Dual PPARalpha/gamma ligand TZD18 either alone or in combination with imatinib inhibits proliferation and induces apoptosis of human CML cell lines. *Cell Cycle*. 5:2237-2243.
- Zhang, K., et R.J. Kaufman. 2004. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 279:25935-25938.
- Zhang, W., H. Zhang, et L. Xing. 2006. Influence of ciglitazone on A549 cells growth *in vitro* and *in vivo* and mechanism. *J.Huazhong.Univ.Sci.Technolog.Med.Sci.* 26:36-39.
- Zheng, L., J. Pu, G. Jiang, M. Weng, J. He, H. Mei, X. Hou, et Q. Tong. 2010. Abnormal expression of early growth response 1 in gastric cancer: association with tumor invasion, metastasis and heparanase transcription. *Pathol.Int.* 60:268-277.
- Zhou, J., W. Zhang, B. Liang, M.C. Casimiro, D. Whitaker-Menezes, M. Wang, M.P. Lisanti, S. Lanza-Jacoby, R.G. Pestell, et C. Wang. 2009. PPARgamma activation induces autophagy in breast cancer cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41:2334-2342.
- Zhu, Y., C. Qi, C. Calandra, M.S. Rao, et J.K. Reddy. 1996. Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Gene Expr.* 6:185-195.
- Zhu, Y., C. Qi, S. Jain, M.S. Rao, et J.K. Reddy. 1997. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J.Biol.Chem.* 272:25500-25506.
- Zhu, Y., C. Qi, J.R. Korenberg, X.N. Chen, D. Noya, M.S. Rao, et J.K. Reddy. 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.* 92:7921-7925.
- Zinszner, H., M. Kuroda, X. Wang, N. Batchvarova, R.T. Lightfoot, H. Remotti, J.L. Stevens, et D. Ron. 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 12:982-995.
- Zipfel, P.F., E.L. Decker, C. Holst, et C. Skerka. 1997. The human zinc finger protein EGR-4 acts as autoregulatory transcriptional repressor. *Biochim.Biophys.Acta.* 1354:134-144.
- Zong, W.X., C. Li, G. Hatzivassiliou, T. Lindsten, Q.C. Yu, J. Yuan, et C.B. Thompson. 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J.Cell Biol.* 162:59-69.

Etude du facteur de transcription précoce EGR1 dans l'effet antiprolifératif des ligands de PPAR γ sur les cellules cancéreuses mammaires

Résumé

Les ligands des récepteurs nucléaires PPAR γ (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandine J2 (15d-PGJ₂) et les thiazolidinediones (TZDs) : troglitazone (TGZ), ciglitazone (CGZ)) exercent un effet antiprolifératif sur les lignées cancéreuses mammaires. Plusieurs études suggèrent que les effets anticancéreux sont liés à des effets PPAR γ -indépendants. Notre travail s'inscrit dans la compréhension de tels mécanismes d'action.

Notre étude a montré une induction du facteur de transcription EGR1 (Early Growth Response gene 1) par certains ligands de PPAR γ (TGZ, CGZ, 15d-PGJ₂ et Δ^2 -TGZ (agoniste inactif de PPAR γ)) dans les cellules cancéreuses mammaires hormono-dépendantes MCF7. Cet effet est précoce et PPAR γ -indépendant. Il est lié à une libération quasi immédiate de calcium intracellulaire suivie de l'activation des ERK1/2. L'induction d'EGR1 a aussi lieu dans les cellules hormono-indépendantes MDA-MB-231 exposées à la Δ^2 -TGZ. Cependant, l'induction d'EGR1 ne joue qu'un rôle partiel dans l'effet antiprolifératif.

Les données d'une analyse par puce à ADN ont suggéré l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique (RE) dans les cellules MCF7 exposées à la Δ^2 -TGZ. Des analyses complémentaires ont confirmé que la Δ^2 -TGZ induit un tel stress dans les cellules MCF7 et MDA-MB-231. Cependant, le rôle du stress du RE dans l'effet antiprolifératif de la Δ^2 -TGZ reste à déterminer.

Nous avons enfin testé l'hypothèse d'un lien entre EGR1 et stress du RE. En effet, EGR1 est aussi induit précocement par d'autres inducteurs de stress du RE. Les diverses situations où l'induction d'EGR1 est inhibée suggèrent une régulation possible de l'expression du facteur de transcription ATF3 par EGR1.

Mots clés : Cancer du sein, Thiazolidinediones, Troglitazone, PPAR γ , EGR1, Calcium, Stress du réticulum endoplasmique

Study of the early transcription factor EGR1 in the antiproliferative effect of PPAR γ ligands in breast cancer cells

Abstract

The ligands of PPAR γ nuclear receptors (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 (15d-PGJ₂) and thiazolidinediones (TZDs) : troglitazone (TGZ), ciglitazone (CGZ)) show antiproliferative effects on breast cancer cell lines. Several studies suggest that the anti-cancer effects are PPAR γ -independent. Our work is focused on the comprehension of such mechanisms of action.

Our study has shown the induction of the transcription factor EGR1 (Early Growth Response gene 1) by some PPAR γ ligands (TGZ, CGZ, 15d-PGJ₂, and Δ^2 -TGZ (PPAR γ inactive agonist)) in the hormone-dependent breast cancer cells MCF7. This early effect is PPAR γ -independent. It is associated with the almost immediate release of intracellular calcium followed by the activation of ERK1/2. EGR1 induction also occurs in the hormone-independent breast cancer cells MDA-MB-231 treated with Δ^2 -TGZ. However, EGR1 induction plays only a partial role in the antiproliferative effect.

Data analysis of DNA array has suggested the induction of an endoplasmic reticulum stress (ER) in MCF7 cells treated with Δ^2 -TGZ. Complementary data have confirmed this result in MCF7 cells and in MDA-MB-231 cells. However, the role of ER stress in the antiproliferative effect is still to be determined.

Finally, we have tested the hypothesis of a link between EGR1 and ER stress. Indeed, EGR1 is also early induced by other ER stress inductors. Diverse conditions where EGR1 is inhibited suggest a possible regulation of ATF3 expression by EGR1.

Key words: Breast cancer, Thiazolidinediones, Troglitazone, PPAR γ , EGR1, Calcium, Endoplasmic reticulum stress