

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	viii
 CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer du sein	1
1.1.1 Statistiques.....	1
1.1.2 Facteurs de risque et prévention	1
1.1.3 Types de tumeurs du sein.....	5
1.1.4 La métastase du cancer du sein.....	13
1.1.5 Le traitement du cancer du sein	17
1.2 Les gènes PAX	20
1.2.1 Structure.....	20
1.2.2 Expression et activité.....	21
1.2.3 PAX2	23
1.3 Le facteur EGF	26
1.3.1 Description générale de l'EGF et sa famille de ligands.....	26
1.3.2 L'EGF dans le sein normal et cancéreux	28
1.4 L'hypoxie et son impact sur les tumeurs mammaires	30
1.4.1 Description de la condition hypoxique	30
1.4.2 L'impact de l'hypoxie sur les tumeurs mammaires.....	32
1.5 Hypothèse et objectifs.....	32
1.5.1 Modèles cellulaires	34
 CHAPITRE II	
ARTICLE SCIENTIFIQUE	36
2.1 Contribution des auteurs.....	36
2.2 Résumé	36

2.3	Article scientifique.....	38
	Abstract.....	39
	Background.....	40
	Results	41
	Discussion.....	44
	Conclusion.....	46
	Methods	47
	Cell lines and reagents	47
	Cell treatments	47
	Western blots analysis	48
	Immunofluorescence analysis.....	48
	RT-PCR analysis of PAX2 expression	48
	Subcellular fractionation.....	49
	Matrigel invasion assay	49
	Transfection with vectors encoding PAX2 shRNAs or cDNA.....	50
	MTT proliferation assay	50
	Determination of apoptosis using Hoechst nuclear staining.....	51
	Statistical analyses	51
	List of Abbreviations	51
	Acknowledgements.....	52
	Authors' contributions.....	52
	Competing interests	52
	References.....	53
	Figure legends.....	57

CHAPITRE III

RÉGULATION DE PAX2 PAR L'EGF ET L'HYPOXIE DANS LES CELLULES DU CANCER DU SEIN LUMINALES

66

3.1	L'influence de l'exposition à l'EGF sur l'expression et l'activité de PAX2 dans les cellules cancéreuses luminales.....	66
3.2	La régulation de PAX2 dans des conditions qui miment l'hypoxie	67

CHAPITRE IV	
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	74
4.1 Survol des principaux résultats de ma recherche et de leur signification.....	74
4.2 Régulation négative de l'invasivité des cellules du cancer du sein luminal par PAX2	77
4.3 La régulation de l'expression et de l'activité de PAX2 dans les cellules luminales : l'effet de l'œstrogène	79
4.4 La régulation de l'expression et de l'activité de PAX2 dans les cellules luminales : l'effet de l'EGF	81
4.5 La régulation de l'expression et de l'activité de PAX2 dans les cellules luminales : l'effet de l'hypoxie.....	82
4.6 Conclusion et perspectives	83
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	85

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure	Page
1.1	Localisation des régions fonctionnelles d'un récepteur aux œstrogènes 8
1.2	Récepteur de la famille erbB..... 9
1.3	ErbB2 active la voie de la PI3K et la voie des MAPKs..... 11
1.4	Structure moléculaire des membres de la famille PAX..... 21
1.5	Huit types de cancers qui peuvent exprimer PAX2 chez l'humain 24
1.6	Signalisation par les ligands de la famille EGF 27
1.7	Rôle des récepteurs EGFR/ErbB et de leurs ligands durant le développement normal de la glande mammaire et la maturation 29
1.8	Impact des conditions hypoxiques..... 30
1.9	Régulation et rôle de HIF-1 en réponse à l'oxygène 31
3.1	PAX2 n'est pas activée dans les cellules du cancer du sein MCF-7 en réponse à un court traitement avec l'EGF..... 69
3.2	Un traitement de plus longue durée avec l'EGF augmente la quantité totale de la protéine PAX2 et diminue l'expression du gène que PAX2 réprime 70
3.3	La voie de ERK est activée en réponse à un court traitement à l'EGF..... 71
3.4	Détermination de la concentration optimale de chlorure de cobalt à utiliser pour mimer l'hypoxie dans les cellules MCF-7..... 72
3.5	L'hypoxie dans les cellules du cancer du sein MCF-7 73
4.1	Voies de signalisation génomique et non génomique de l'estradiol 79
Tableau	
1.1	Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et leurs récepteurs..... 28

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADH	Acide docosaénoïque
ADN	Acide désoxyribonucléique
AEP	Acide eicosapentaénoïque
Als	Inhibiteur de l'aromatase
AKT	Protéine kinase B
ARNm	Acide ribonucléique messenger
β	Bêta
BAD	Bcl-2 antagonist of cell death
BRCA	Breast cancer gene
EBCTG	Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group
E ₂	17 β -estradiol
ECM	Matrice extracellulaire
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
ER α / β	Récepteur à l'œstrogène alpha/bêta
erbB	Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog (protein)
ERBB	Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog (gene)
ERE	Élément de réponse à l'œstrogène
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
hBD1	Human beta-defensin-1
HER2	Human epidermal growth factor receptor-2
HIF-1	Facteur inductible à l'hypoxie-1
IGF-1	Insulin-like growth factor-1

MAPk	Mitogen-activated protein kinase
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MEK	Mitogen-activated protein kinase or extracellular signal-regulated kinase kinase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
P53	Protéine 53
PAX	Paired box gene
PI3K	Phosphatidyl inositol 3-kinase
PR	Récepteur progestérone
Prétrait.	Prétraitement
pVHL	Protéine Von Hippel-Lindau
SERM	Modulateurs sélectifs des récepteurs œstrogéniques
siRNA	Petit ARN interférant
T-47D	Human ductal breast epithelial tumor cell line
Trait.	Traitement

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer du sein

1.1.1 Statistiques

Selon la Société canadienne du cancer, en 2013 seront enregistrés 187 600 nouveaux cas de cancer et 75 500 décès seront causés par la maladie au Canada¹. Le risque d'être atteint d'un cancer au cours de sa vie est maintenant estimé à 40 % chez les femmes et à 45 % chez les hommes¹. Ce sont donc plus de deux Canadiens sur cinq qui souffriront un jour d'un cancer.

Parmi tous les types de cancer, le cancer du sein est le plus répandu chez les femmes et ce, au Canada comme à travers le monde¹⁻³. Actuellement, il représente près du tiers (28 %) des cas de cancer chez la femme³. La Société canadienne du cancer estime qu'en 2013, 23 800 canadiennes recevront un diagnostic de cancer du sein¹. En moyenne, c'est donc une femme sur neuf qui risque d'avoir un cancer du sein au cours de sa vie. Le cancer du sein est associé au plus haut taux de mortalité, après le cancer du poumon¹ : chaque jour, environ 14 Canadiennes (5000 femmes par année) meurent des suites de la maladie¹. Sachant que cette maladie affecte la qualité de vie des patientes et menace leur survie et que les traitements disponibles actuellement présentent des limitations majeures (qui seront décrites plus loin), le cancer du sein est ciblé comme une problématique en santé de premier plan au pays.

1.1.2 Facteurs de risque et prévention

Plusieurs éléments sont impliqués dans le processus du développement du cancer du sein, car celui-ci est multifactoriel; ainsi, seule une petite proportion de ces cancers

est associée à une cause génétique unique (5 à 10 % de tous les cas de cancers⁴⁻⁶). Parmi ceux-ci, les femmes ayant des antécédents familiaux de cancer du sein, en particulier chez un parent au premier degré (mère, sœur, fille, père ou frère), sont plus prédisposées que d'autres à développer un carcinome mammaire^{4,5}. Les mutations héréditaires dans les cellules du sein sont souvent retrouvées dans les gènes BRCA1 et BRCA2, qui sont des gènes de maintien impliqués dans la réparation de l'ADN^{4,5}. Certaines mutations dans l'un de ces deux gènes entraîne une augmentation de 10 à 20 fois du risque relatif de développer un cancer du sein; ce qui mène à un risque de 70 à 80 % de développer un cancer du sein à l'âge de 70 ans⁴. Présenter l'une parmi les mutations héréditaires identifiées dans le gène BRCA1 par exemple, augmente les risques de développer un cancer du sein au cours de sa vie de 80 %⁷. Le dépistage des différentes mutations dans les gènes BRCA est donc important pour les personnes ayant des antécédents familiaux de cancer du sein⁴. Toutefois, il est à noter qu'outre les mutations transmises par hérédité, des mutations spontanées dans les gènes BRCA1 et/ou BRCA2 peuvent également induire un cancer du sein⁶.

Plusieurs études soulignent l'importance d'un mode de vie sain et équilibré pour diminuer la susceptibilité de développer plusieurs types de cancers⁸⁻¹⁰. De nombreux facteurs de risque environnementaux (ou non-génétiques) ont en effet été identifiés, sur lesquels les gens peuvent avoir une certaine emprise. Ces éléments sont les suivants : le tabac, la prise de poids et la nutrition¹¹⁻²³. Chez les femmes, des risques supplémentaires sont associés tels une ménarche précoce, une ménopause tardive et l'absence de grossesse¹¹⁻²³.

L'usage du tabac est le premier agent causal en importance pour le développement du cancer du sein¹¹. Les femmes fumeuses présentent un risque accru de développer un cancer du sein et la fumée secondaire peut aussi induire une tumeur mammaire¹¹. De plus, les données publiées par Warren et ses collaborateurs suggèrent que le tabagisme peut accroître le risque de cancer du sein en particulier chez les patientes préménopausées¹¹. La fumée de cigarette contient au moins 80 des cancérogènes connus, y compris l'arsenic, le cadmium, l'ammoniac, le formaldéhyde et le benzopyrène⁸.

Chacun a un mécanisme distinct pour causer le cancer. La fumée de cigarette est un cancérigène puissant et aussi une source de stress oxydatif. Cependant, l'interaction avec d'autres facteurs environnementaux peut influencer leur potentiel carcinogénique. Ainsi, par comparaison avec les non-fumeurs, les fumeurs actifs ont de plus faibles concentrations circulantes de plusieurs micronutriments antioxydants⁸. Par ailleurs, selon une étude de Fung et ses collaborateurs, un modèle alimentaire occidental peut augmenter le risque de cancer du sein chez les fumeurs²¹.

L'âge des premiers cycles menstruels chez les femmes et le nombre de grossesses sont également à considérer en ce qui concerne le cancer du sein. Une ménarche précoce, une ménopause tardive et la nulliparité, c'est-à-dire l'absence de grossesse, augmentent toutes le risque de développer un carcinome mammaire^{8,15,19,24}. En effet, l'exposition aux œstrogènes pendant une plus longue période dans ces circonstances augmente le risque et peut être considérée comme une cause du développement du cancer du sein chez les femmes. L'inverse s'appliquant également, une réduction de l'exposition aux œstrogènes en raison de la ménarche tardive, une ménopause précoce, et le fait de porter des enfants peut réduire le risque de cancers hormono-dépendants (les plus fréquents)^{8,19}. Enfin, l'allaitement maternel est protecteur pour la mère ainsi que pour l'enfant : il prévient le cancer du sein chez les mères et aide à prévenir le surpoids et l'obésité chez les enfants⁸. Un allaitement de longue durée est ainsi associé à une réduction du risque de cancer du sein de 40 %¹⁵.

La sédentarité a aussi été identifiée comme un facteur de risque comportemental prédominant pour le cancer du sein. Des études ont montré que trente minutes d'activité par jour suffisent pour diminuer de moitié l'incidence des récurrences du cancer du sein et le risque de décès associé à ce carcinome^{10,20}. Les changements hormonaux induits pendant l'exercice, comme la synthèse d'œstrogènes, ou l'abaissement de la tension artérielle ou de la concentration du facteur de croissance à l'insuline-1 (IGF-1) ainsi qu'une réduction du nombre et de la taille des cellules graisseuses, pourraient expliquer la relation entre l'activité physique et la survie chez les patientes atteintes d'un cancer du sein¹⁰. Ainsi, avoir une concentration plasmatique plus élevée en œstrogène et en IGF-1

est associée à un risque plus élevé de développer un cancer du sein et, chez les patientes déjà atteintes, à un risque accru de récurrence²³.

Chez la femme ménopausée, une prise de poids augmente le risque de développer un cancer du sein^{8,12,14,17-19}. Les habitudes alimentaires sont un paramètre important, qui peuvent être modifiées, et qui sont impliquées dans le développement de certains cancers incluant le cancer du sein. Il est recommandé de limiter la consommation de restauration rapide et de breuvages sucrés⁸. Ces derniers favorisent la prise de poids, car ils fournissent de l'énergie, mais ne semblent pas induire la sensation de satiété ou combler un besoin énergétique suffisant, ce qui favorise la surconsommation de calories et le gain de poids⁸. De plus, la consommation d'acides gras saturés peut influencer l'évolution d'un cancer du sein par l'élévation du taux d'œstrogènes circulants^{19,23}. À l'inverse, une étude faite par Patterson et ses collaborateurs stipule que les acides gras oméga-3 d'origine marine (AEP et ADH) sont associés à un faible risque de récurrence après un diagnostic d'un cancer du sein¹⁶. En effet, d'après cette étude, les femmes ayant eu des apports élevés en AEP et en ADH à partir d'aliments marins ont 25 % moins de risque de récurrence du cancer du sein¹⁶. Les rôles importants de ces acides gras sont l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses du sein *in vitro* et la réduction de l'initiation et de la progression des tumeurs mammaires *in vivo* dans les modèles animaux¹⁶.

Le lien entre la consommation de fruits et légumes, des aliments d'origine végétale, et le cancer a déjà fait l'objet de nombreuses observations et études. D'abord, la plupart des régimes qui protègent contre le cancer sont principalement constitués d'aliments d'origine végétale qui sont riches en éléments nutritifs et en fibres alimentaires et pauvres en réserve de polysaccharides²⁰. Ensuite, il a été prouvé qu'une concentration plasmatique élevée en β -carotène, en vitamine C et une alimentation riche en légumes et en fruits est associée à une réduction du risque de récurrence et une augmentation du temps de survie après le diagnostic initial du cancer du sein^{9,12,25,26}. De plus, la consommation de légumes et de fruits peut être associée à un faible risque de développer un second cancer primaire chez les femmes qui ont déjà été traitées pour un

cancer du sein²⁵. Les caroténoïdes présentent plusieurs activités biologiques qui pourraient empêcher ou ralentir la progression du cancer tels que l'inhibition de la croissance et la transformation maligne des cellules et l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses²⁷. Enfin, plusieurs études ont montré l'importance du soja alimentaire en lien avec le cancer du sein : une réduction significative des récurrences a été rapportée chez les patientes ayant un apport élevé en isoflavones (les principaux phytoestrogènes du soja) par rapport à celles avec un faible approvisionnement²⁸. De plus, les habitudes alimentaires caractérisées par un apport plus élevé de protéines végétales et d'isoflavones ainsi qu'une baisse de consommation de protéines animales peuvent contribuer à un risque global plus faible de cancer du sein²⁴. Les propriétés médicinales des isoflavones du soja s'avèrent d'ailleurs positives dans plusieurs cancers en plus de celui du sein²⁹. L'isoflavone est un puissant antioxydant qui peut diminuer la production d'œstrogènes, donc inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du sein²⁹⁻³². Une étude a rapporté qu'également la consommation de lignanes est associée à une réduction du risque de développement ou de récurrence du cancer du sein³³. Les lignanes, une autre classe de phytoestrogènes du soja, sont elles aussi impliquées dans l'inhibition de la prolifération cellulaire des cellules mammaires présentant ou non le récepteur aux œstrogènes et elles réduisent la croissance tumorale et les métastases dans des modèles animaux³³.

1.1.3 Types de tumeurs du sein

Il existe plusieurs types de cancers du sein, chacun ayant son évolution propre. Parmi les différents carcinomes mammaires, certains sont hormono-dépendants, c'est-à-dire que les cellules cancéreuses qui forment la tumeur expriment le récepteur alpha à l'œstrogène (elles sont symbolisées par ER α + ou ER+) et elles ont besoin des signaux intracellulaires activés par l'œstrogène pour induire leur prolifération^{34,35}. Ces tumeurs hormono-dépendantes sont les plus fréquentes parmi tous les types de tumeurs du sein³⁴.

1.1.3.1 Classification histologique des tumeurs du sein

Anciennement, l'identification des cancers du sein était de nature histologique et basée sur la taille de la tumeur, le grade (défini par la rapidité de croissance et le niveau de différenciation des cellules cancéreuses), l'envahissement des ganglions de l'aisselle, l'expression de marqueurs précis telle que celle du proto-oncogène *erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (ERBB2)* et des récepteurs hormonaux (à l'œstrogène et à la progestérone)³⁶⁻³⁸. Ces derniers (*ERBB2* et récepteurs hormonaux) sont décrits ci-après.

L'œstrogène et la progestérone sont des hormones stéroïdiennes féminines dérivées du cholestérol³⁹. La progestérone est principalement sécrétée par le corps jaune des ovaires et impliquée dans le cycle menstruel, la grossesse et l'embryogenèse, tandis que les œstrogènes sont produits en premier lieu par les follicules ovariens, le corps jaune et le placenta^{39,40}. Certains œstrogènes sont également produits en petites quantités par d'autres tissus tels le foie, la surrénale, les seins et le tissu adipeux³⁹. On retrouve une quantité d'œstrogène significativement plus importante chez les femmes que chez les hommes. Cette hormone favorise le développement des caractères sexuels secondaires comme les seins et elle est également impliquée dans le contrôle du cycle menstruel^{39,41,42}. Le taux de production d'œstrogènes varie durant le cycle menstruel et augmente furtivement pendant la phase pré-ovulatoire³⁹. Lors de la pré-ménopause, il y a un épuisement des follicules ovariens, ce qui entraîne une baisse significative de production d'œstrogènes et mène à la ménopause³⁹. Durant cette dernière, les cellules mésenchymateuses du tissu adipeux deviennent la principale source d'œstrogènes¹⁴.

Les principaux récepteurs des œstrogènes sont des protéines appartenant à la famille des récepteurs nucléaires; le récepteur alpha ($ER\alpha$) et le récepteur bêta ($ER\beta$)⁴³. Ces deux isoformes du récepteur aux œstrogènes sont normalement présents dans la glande mammaire⁴³. Toutefois, leur niveau d'expression varie dans le contexte de la carcinogenèse. Par exemple, une petite proportion des tumeurs du sein sont dites hormono-indépendantes et en effet, elles n'expriment pas $ER\alpha$ ³⁴.

Les récepteurs aux œstrogènes ont plusieurs domaines fonctionnels (Figure 1.1). Le domaine N-terminal est la partie la plus variable et comprend une partie de trans-activation qui peut interagir directement avec des facteurs transcriptionnels⁴⁴⁻⁴⁶. Le domaine de liaison à l'ADN contient deux doigts de zinc et joue un rôle dans la dimérisation et la fixation du récepteur aux œstrogènes à l'ADN⁴⁴. La région charnière (hinge) contient différents acides aminés qui se lient à des ligands distincts et avec des protéines de corégulation⁴⁴. Enfin, la partie C-terminale contient le domaine de la liaison au ligand et contribue à la trans-activation et à la dimérisation du récepteur^{44,45}. À l'état inactif, les récepteurs aux œstrogènes sont liés à différentes protéines qui les stabilisent (chaperonnes, protéines de choc thermique)⁴⁷. Puis, lorsque l'hormone œstrogène se lie à son récepteur, ce dernier se dissocie des protéines stabilisantes et s'ensuit une dimérisation du récepteur⁴⁴. Enfin, le complexe hormone-récepteur peut se lier directement à des séquences d'ADN consensus appelées *œstrogen responsive element* (ERE), présentes au niveau du promoteur de différents gènes cibles, et agissent comme des régulateurs de leur transcription^{39,45}. Néanmoins, le complexe hormone-récepteur s'associe régulièrement à d'autres protéines pour former un complexe transcriptionnel : ces dernières consistant principalement en des co-activateurs, co-répresseurs ou co-intégrateurs. Plusieurs co-activateurs ont ainsi été identifiés, incluant les Steroid Receptor Coactivators 1 (SRC-1), 2 (SRC-2) et 3 (SRC-3). Les principaux co-répresseurs connus sont le Nuclear Receptor CoRepressor (NCoR) et le Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor (SMRT)⁴⁸. Enfin, l'interaction des co-intégrateurs p300 et CREB-binding protein (CBP) (des histones acétyltransférases) avec le complexe œstrogène/ER α est bien documentée. Les co-activateurs peuvent interagir sélectivement avec ER α ou ER β : par exemple, SRC-3 augmente l'activité transcriptionnelle de ER α , mais diminue celle de ER β ⁴⁹.

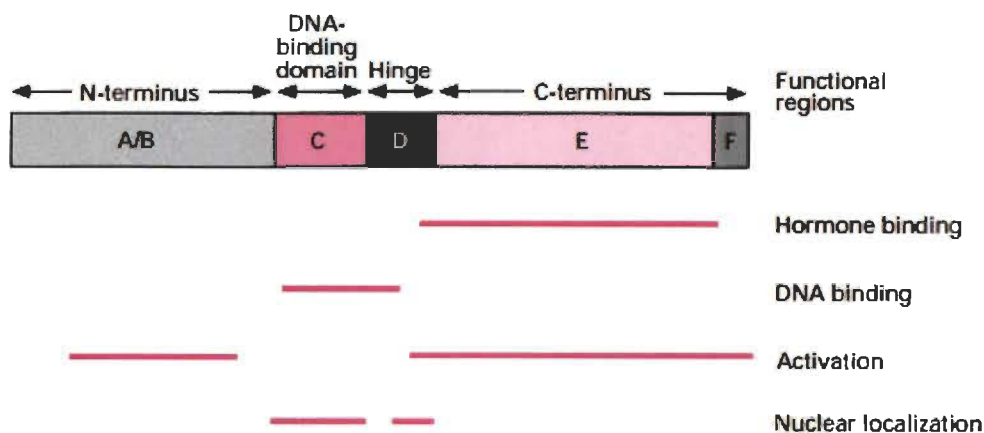


Figure 1.1 Localisation des régions fonctionnelles d'un récepteur aux œstrogènes.

Les cinq domaines fonctionnels du récepteur aux œstrogènes sont répartis sur quatre régions. Le domaine A/B qui est dans la partie N-terminal, le domaine C dans la partie de liaison à l'ADN, le domaine D dans la partie charnière, et les domaines E et F qui font partie de la région C-terminal du récepteur. Tiré de ⁴⁴.

Dans un contexte physiologique, les récepteurs à l'œstrogène régulent l'expression de gènes impliqués dans la différenciation tissulaire et la prolifération cellulaire principalement³⁹. Dans le contexte de la carcinogenèse mammaire, cette fonction est maintenue³⁹. Récemment, une étude faite par Hurtado et ses collaborateurs a montré que la signalisation de l'œstrogène via ER α dans les cellules du cancer du sein hormono-dépendantes diminue l'expression de *ERBB2* (aussi appelé *HER2* (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*))⁵⁰, un autre marqueur utilisé dans l'analyse histologique des tumeurs du sein. *ERBB2* est un proto-oncogène^{51,52} qui fait partie de la famille de gènes *ERBB* dont quatre membres ont été identifiés : *ERBB1*, *ERBB2*, *ERBB3* et *ERBB4*⁵¹⁻⁵³. Les membres de cette sous-famille de récepteurs de facteurs de croissance épidermiques (EGFR) sont impliqués dans les mécanismes de signalisation intracellulaire contrôlant la croissance, la survie, l'adhésion, la migration ainsi que la différenciation de la cellule^{53,54}. Dans les cellules saines, la glycoprotéine transmembranaire *ERBB2* joue un rôle important dans l'organogenèse normale et dans la différenciation cellulaire^{51,53,55}. Sa contrepartie mutée, l'oncogène *ERBB2*, est douée

d'une activité tyrosine kinase intrinsèque (constitutive)^{52,56-58}. Comme les autres membres de la famille de récepteurs ERBB, la protéine ERBB2 comporte un domaine de liaison extracellulaire contenant quatre sections, dont deux riches en cystéines^{53,59}. Le domaine transmembranaire, quant à lui, ancre le récepteur dans la membrane de la cellule⁵³. Enfin, le domaine intracellulaire qui est juxtamembranaire contient la tyrosine kinase et le domaine de la région régulatrice, incluant la kinase autophosphorylée à l'origine de l'activité intrinsèque de la protéine⁵³. La figure 1.2 montre la structure type d'un récepteur de la famille ERBB.

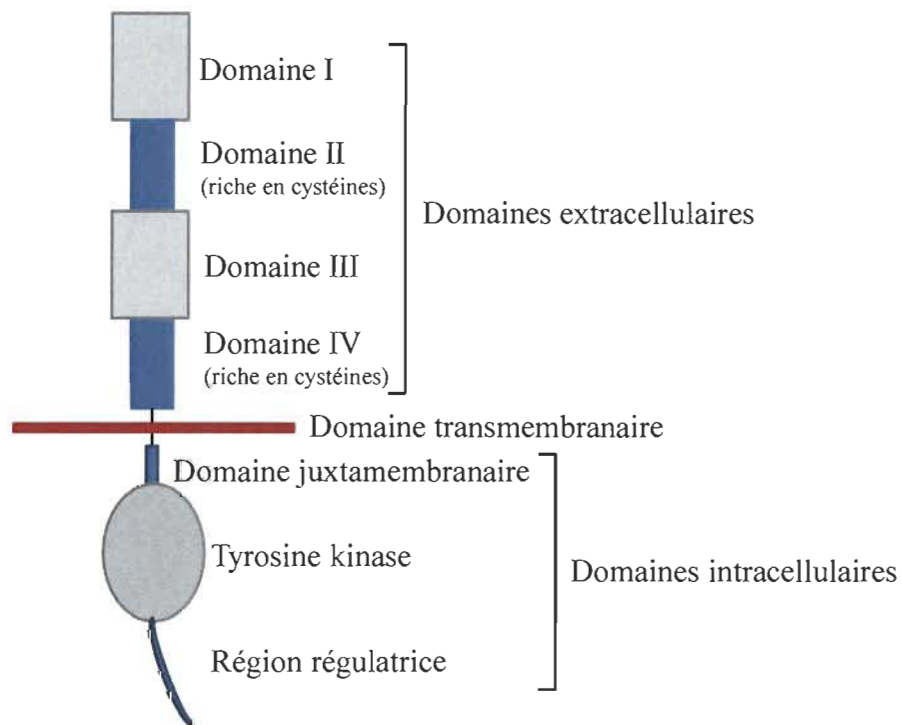


Figure 1.2 Récepteur de la famille ERBB.

Récepteur de la famille ERBB présentant un domaine extracellulaire, composé de quatre domaines, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire regroupant le domaine juxtamembranaire, la tyrosine kinase ainsi que la région régulatrice.

La partie extracellulaire des récepteurs ERBB se lie à une variété de ligands connus, dont l'Epidermal Growth Factor (EGF) et des neurégulines (NRG)⁵¹. ERBB3 a la particularité de contenir une tyrosine kinase défectueuse, qui nécessite obligatoirement le recrutement de deux composantes de signalisation pour initier son

activation, soit un co-récepteur tel ERBB2 et un ligand⁵¹. Les ligands pour EGFR sont l'EGF, le TGF- α , l'Amphiréguline (AR), la β -celluline (BTC), le HB-EGF (Heparin Binding EGF-like growth factor) et l'épiréguline^{60,61}. De son côté, le récepteur ERBB2 ne lie directement aucun ligand connu^{51,53,59} : il s'agit d'un récepteur orphelin. ERBB3 a comme ligands plusieurs neurégulines^{60,61}. Les ligands connus pour ERBB4 sont les suivants: quelques neurégulines, la β -celluline et le HB-EGF^{60,61}. Tous les ligands des erbB peuvent néanmoins activer RBB2, à condition qu'il soit associé avec un co-récepteur⁵¹. Ainsi, en présence d'un co-récepteur, ERBB2 et ERBB3 engendrent tous les deux de solides signalisations intracellulaires⁵¹.

Afin que le récepteur ERBB2 soit activé et induise une signalisation intracellulaire, il doit nécessairement subir une dimérisation^{51,56,59} à la suite de quoi, la kinase s'autophosphoryle^{51,53,55,59}. La liaison entre les deux monomères amène de puissants signaux dans la cellule, qui est la même que celle induite par les autres membres de la famille ERBB (Figure 1.3). Les principales voies activées en aval de ERBB2 sont celles de la PI3K et des MAPks⁶². De manière générale, l'activation de ces voies entraîne la traduction des protéines et de l'expression génique respectivement. De manière plus spécifique, *ERBB2* contrôle la prolifération cellulaire⁵¹ autant dans les cellules mammaires normales que cancéreuses, et favorise la chimiorésistance⁵¹ et l'invasivité⁶³ des cellules cancéreuses.

Chez les patientes atteintes du cancer du sein, le gène codant la protéine ERBB2 est surexprimé par les cellules cancéreuses chez 20 à 30 % des cas^{51,53,64}. Cette amplification de la transcription est due à certaines mutations. Celles-ci peuvent être causées par une délétion d'un acide aminé dans la région transmembranaire du récepteur⁵⁶. Il est aussi possible d'observer dans les cas de mutations une altération qui aura comme conséquence la perte du domaine extracellulaire, qui est normalement la partie du récepteur liée par un ligand⁵⁶. Ces mutations ont comme impact de causer une dimérisation même en absence de ligand et ainsi de provoquer une activation constitutive de l'activité de la kinase^{56,65}. Ces changements mènent à une augmentation du nombre de récepteurs à la surface de la cellule étant donné qu'il y a eu une

surexpression de l'ARNm. Plusieurs études ont démontré l'existence d'une corrélation positive entre l'amplification du gène *ERBB2* et le taux de mortalité chez les patients atteints d'un cancer du sein^{52,56,65}. Ainsi, la régulation de son expression a une influence dominante sur la progression des cancers du sein et la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents est primordiale.

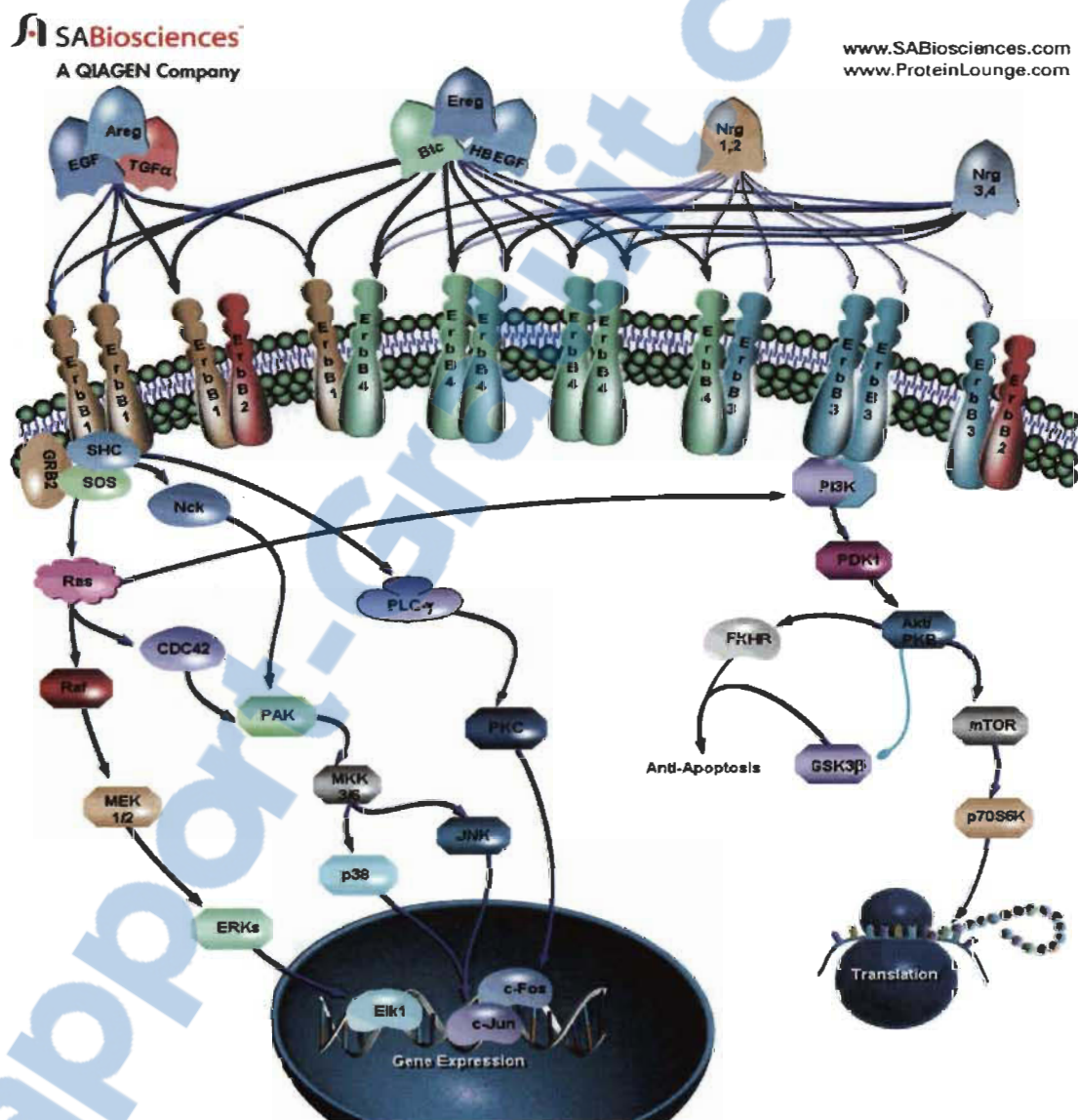


Figure 1.3 ERBB2 active la voie de la PI3K et la voie des MAPKs. Elles sont impliquées dans la traduction des protéines et de l'expression génique respectivement. Tiré de ⁶².

1.1.3.2 Classification moléculaire des tumeurs du sein

Récemment, une nouvelle classification des cancers du sein dite moléculaire est apparue^{36,66}. Ce modèle est fondé sur le transcriptome de la tumeur et son principal intérêt pour l'avenir réside dans son traitement à l'aide d'outils bio-informatiques performants capables de dériver avec justesse le risque de récurrence ou de métastase des patients pris individuellement^{36,38}. Cette classification moléculaire est toutefois utilisée systématiquement en conjonction avec l'analyse histopathologique traditionnelle⁶⁷, et les classes moléculaires sont même définies en fonction des marqueurs histologiques qui leur sont associés. Il existe ainsi cinq sous-groupes moléculaires de tumeurs mammaires: luminal A, luminal B, *ERBB2* élevé, basal et de type normal^{66,68-70}. Ces cinq classes sont décrites ci-après.

Les tumeurs de type luminal (combinaison des tumeurs lumineuses A et B) sont les seules qui expriment le récepteur ER α et elles sont associées au taux de survie le plus long des patientes^{66,71}. De plus, les cellules cancéreuses lumineuses sont les plus différenciées^{34,71,72} et n'expriment le proto-oncogène *ERBB2* que faiblement⁶⁶. Parmi les tumeurs lumineuses, celles de la catégorie A se distinguent de celles de la catégorie B à trois niveaux : elles expriment plus fortement ER α ^{71,73}, les cellules cancéreuses qui les composent prolifèrent beaucoup moins rapidement⁷³⁻⁷⁶ et le délai avant l'apparition des métastases est plus long^{77,78}. Ainsi, la présence des récepteurs aux œstrogènes dans les tumeurs est associée à un pronostic favorable sur le plan clinique^{77,78}. L'explication moléculaire de cette dernière observation n'a pas encore été complètement révélée, mais au moment d'entreprendre les travaux de recherche dont les résultats sont regroupés dans le chapitre 2, des indications indirectes suggéraient que la signalisation en aval de ER α dans les cellules du cancer du sein lumineuses A pourrait jouer un rôle protecteur anti-invasion/métastase.

Puis, le sous-type de tumeurs du sein appelé *ERBB2* élevé, en plus de la surexpression du proto-oncogène *ERBB2*, exprime de plus faibles niveaux des récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone que les tumeurs lumineuses, est défini par une

prolifération cellulaire élevée et est associé à un mauvais pronostic^{71,75}. Ensuite, les tumeurs appartenant au sous-type basal expriment un niveau basal de cytokératines épithéliales (8 et 18), n'expriment pas les récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone et ont un index de prolifération élevé⁷⁴. Des mutations dans le gène BRCA1, un facteur de risque bien établi pour certains cancers du sein, prédisposent à avoir une tumeur de ce sous-type^{7,73,78}. C'est au sein de ce sous-groupe que sont classées les tumeurs appelées triple-négatives, c'est-à-dire ER-, PR- et avec faible ou nulle expression de *ERBB2*^{7,69}. Le diagnostic de tumeurs du sein de type triple-négatif, à l'instar de l'ensemble des tumeurs basales, est associé à un mauvais pronostic pour deux principales raisons : 1) la grande agressivité des tumeurs (rapidité de prolifération cellulaire et propension marquée pour l'invasion et la métastase); 2) l'absence de cibles thérapeutiques efficaces, telles que les récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone permettant les thérapies endocrines ou encore l'oncogène *ERBB2* qui permettrait le recours au traitement avec l'anticorps anti-*ERBB2* Herceptin⁶⁹. Enfin, les tumeurs du sous-type normal se distinguent par la forte expression de gènes caractéristiques du tissu adipeux et d'autres types de cellules non-épithéliales, et n'expriment pas les cytokératines⁷⁰. Environ la moitié d'entre elles expriment l'un ou l'autre des récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone et toutes expriment un faible niveau d'*ERBB2*⁷⁴. Globalement, leur pronostic est intermédiaire parmi ceux des autres sous-types de tumeurs, à l'image du niveau de prolifération des cellules cancéreuses qui les composent⁷⁴.

1.1.4 La métastase du cancer du sein

1.1.4.1 Description du processus général de métastase

Dans les premières étapes de la carcinogenèse mammaire, des cellules épithéliales du sein subissent des mutations de l'ADN qui activent le cycle cellulaire^{19,79-81}. Ensuite, il y a des gènes réparateurs d'ADN et des gènes suppresseurs de tumeurs qui doivent entrer en jeu pour les éliminer, car leur fonction est de contrôler l'activité cellulaire normale^{19,82}. Si ces processus ne sont pas complétés, il s'ensuit une prolifération anormale de certaines cellules. L'accumulation de mutations par ces cellules au fil des

divisions successives serait ensuite à l'origine de tumeurs¹⁹. Plus tard, à la suite de la croissance incontrôlée des cellules cancéreuses et la formation d'une tumeur primaire située dans le sein, les cellules peuvent s'en détacher et s'étendre localement pour atteindre les ganglions axillaires via les vaisseaux lymphatiques ou migrer vers des organes distants comme les os, le foie, les poumons, le cerveau ou dans les ganglions; c'est ce que l'on appelle le processus de la métastase^{83,84}. Ainsi, le phénomène de métastase est une série complexe d'étapes au cours desquelles des cellules cancéreuses quittent la tumeur primaire et migrent vers d'autres parties du corps en utilisant le système lymphatique et/ou le système sanguin. Pour ce faire, des cellules malignes se séparent de la tumeur primaire et s'attachent aux protéines qui composent la matrice extracellulaire (ECM), laquelle sépare la tumeur des tissus voisins^{85,86}. En dégradant ces protéines, les cellules cancéreuses sont capables de briser l'ECM et de s'évader. Pour détenir un potentiel métastatique les cellules doivent posséder la capacité de proliférer, d'avoir acquis la mobilité et la perte de l'adhésion cellulaire^{72,85,86}. Un autre événement qui est critique est l'enclenchement du processus appelé angiogenèse^{87,88}. L'angiogenèse tumorale est la prolifération d'un réseau de vaisseaux sanguins qui pénètrent dans les tumeurs, fournissant des substances nutritives et de l'oxygène et enlevant les déchets^{88,89}. Cela promeut la croissance tumorale et facilite une éventuelle métastase.

1.1.4.2 La problématique de la métastase du cancer du sein

C'est le développement des métastases dans des organes vitaux des patients qui est la principale cause de décès associée au cancer du sein⁹⁰. Il y a plus de 25 % des patientes diagnostiquées avec un cancer du sein qui finiront par développer des métastases⁹¹, le plus souvent dans des organes vitaux, dont le foie, les os, les poumons et le cerveau^{84,92}. À partir du moment où des métastases sont détectées, le pronostic est défavorable, avec un taux de survie sur cinq ans de seulement 25 %⁹³ et ce, malgré que plus d'un type de traitement soit disponible et indiqué (section 1.1.5, Traitements). Toutefois, on sait maintenant que tous les types de tumeurs du sein ne sont pas également métastatiques : les tumeurs de type triple-négatif/basal sont associées à un risque significativement accru de la formation de métastases⁹¹, alors que les tumeurs

luminales A sont associées au plus faible risque⁷⁵. Le fait que les tumeurs luminales A soient les seules à exprimer un niveau élevé de ER α soulève la possibilité d'un rôle pour l'œstrogène dans la régulation de la progression métastatique des tumeurs du sein.

L'estradiol (E₂)⁹⁴, l'une des trois formes actives de l'œstrogène, jouerait en effet un rôle clé dans le sein, normal et cancéreux, au niveau du développement de la glande mammaire^{42,79}. Ainsi, vers la puberté et pendant la maturité sexuelle, le développement des seins est stimulé par l'E₂, qui est l'hormone stéroïdienne prédominante en circulation et celle qui est la plus active⁷⁹. À la ménopause, le niveau plasmatique de l'E₂ est diminué de 90 %⁷⁹. Toutefois, en dépit des niveaux différents d'œstrogènes circulants chez les femmes pré- et post-ménopausées, les concentrations de l'E₂ dans les tissus du cancer du sein ne diffèrent pas entre ces deux groupes de femmes⁷⁹. Cela indique que son absorption à partir de la circulation pourrait ne pas contribuer de manière significative au contenu total de cette hormone dans les tumeurs du sein, mais plutôt que la synthèse locale d'estradiol par l'aromatisation des androgènes (le principal étant la testostérone) joue un rôle plus important⁹⁴. C'est d'ailleurs principalement au niveau des tumeurs mammaires que l'E₂ a un impact sur la prolifération cellulaire, car : 1) les cellules du sein normal sont principalement ER α -négatives et seulement environ 10 % des cellules des canaux galactophores expriment ER α ^{34,95} ; 2) dans les glandes mammaires normales des femmes, les cellules ER α -positives ne sont normalement pas prolifératives, mais cette propriété est perdue quand ces cellules deviennent cancéreuses^{34,42,78,95}. Par contre, tôt dans le processus de carcinogenèse, l'expression de ER α est régulée à la hausse, de sorte que près de 70 % des cancers du sein expriment éventuellement ce récepteur et sont hormono-dépendants^{95,96}.

Ensuite, l'exposition prolongée des cellules mammaires aux œstrogènes peut être à l'origine d'une carcinogenèse liée aux œstrogènes. Le principal mécanisme sous-jacent est la liaison de l'estradiol à ER α , pour exercer un puissant stimulus sur la prolifération des cellules mammaires de manière directe, et/ou indirecte via la production de facteurs de croissance^{42,79}. En effet, les cellules du sein prolifèrent en réponse aux œstrogènes et la présence simultanée de progestérones augmente le taux de la division cellulaire⁸². La

mitose cellulaire accrue augmente le risque d'accumuler des mutations causées par des hormones, des médicaments, des agents infectieux, des produits chimiques ou d'autres expositions environnementales, et d'engendrer la transformation néoplasique⁸². Mentionnons toutefois que les œstrogènes peuvent causer le cancer du sein de façon génotoxique, sans l'implication du récepteur ER α ^{79,81}. Par exemple, une étude a démontré que des souris dont l'expression de ER α a été supprimée par technologie du *knockout*, mais exprimant l'oncogène Wnt-1, développent tout de même des tumeurs mammaires en réponse à l'estradiol⁷⁹. C'est d'autres récepteurs de l'œstrogène qui sont responsables de ce phénomène, soit ER β et GPR1.

Enfin, des données récentes soulèvent l'hypothèse que l'estradiol pourrait être un régulateur important de la métastase du cancer du sein, en contrôlant l'expression d'*ERBB2* par les cellules cancéreuses. Ainsi, l'oncogène *ERBB2* est bien connu pour promouvoir la métastase, notamment en induisant la prolifération cellulaire, la motilité, l'angiogenèse, la transcription de gènes pro-métastatiques et l'invasion^{52-54,97}. Les mécanismes cellulaires impliqués sont d'ailleurs partiellement élucidés. Ainsi, dans les cancers du sein surexprimant *ERBB2*, celui-ci active souvent la voie de PI3K/AKT, qui est connue pour réguler la prolifération cellulaire et la survie cellulaire en inhibant entre autres la protéine anti-apoptotique Bad^{52,54,65}. Des données récentes suggèrent également que l'activité d'AKT favorise la métastase^{98,99}. La voie de Ras/Raf/MEK/ERK, elle aussi est généralement activée à la suite de l'amplification du gène *ERBB2*, ce qui aboutit la plupart du temps à l'activation de gènes nucléaires, dont plusieurs sont pro-métastatiques^{52,59,65,100,101}. La surexpression ou la suractivation de *ERBB2* dans les cellules du cancer du sein est associée à un mauvais pronostic clinique, d'une part parce qu'il est pro-invasif et pro-métastatique, et d'autre part parce qu'il est directement impliqué dans le phénotype de résistance aux thérapies^{52,54,65,102,103}. Donc, la régulation à la baisse de l'expression de *ERBB2* par l'estradiol dans les cellules du cancer du sein luminales⁵⁰ pourrait non seulement contrer la chimiorésistance, mais également freiner la métastase des tumeurs luminales A et être à l'origine de la survie globale plus élevée observée chez les patientes présentant ce type de tumeur.

1.1.5 Le traitement du cancer du sein

De nos jours, plusieurs traitements sont disponibles pour les carcinomes mammaires dont la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie. La chirurgie est le traitement local le plus utilisé pour le cancer du sein^{104,105}. Elle consiste à retirer complètement la tumeur du sein et souvent on enlèvera aussi les ganglions lymphatiques axillaires du côté de la tumeur^{104,105}. Il existe deux types de chirurgie mammaire qui dépendent de l'emplacement de la tumeur et de sa taille : la chirurgie conservatrice, la lumpectomie, qui est le sectionnement d'une partie du sein et la mastectomie, qui est l'ablation complète du sein¹⁰⁵. La chirurgie peut être combinée à d'autres traitements comme la radiothérapie ou la chimiothérapie. De plus, la chimiothérapie adjuvante peut être donnée avant l'intervention chirurgicale afin de réduire la taille de la tumeur¹⁰⁶. La radiothérapie consiste à détruire les cellules cancéreuses dans une région spécifique, localisée, en utilisant de fortes doses de radiation à répétition. Les cellules cancéreuses finissent par mourir, car elles n'ont pas le temps de se régénérer entre les séances quotidiennes. L'irradiation a pour but de détruire toutes les cellules tumorales tout en épargnant les tissus sains périphériques¹⁰⁷. En effet, il s'agit d'un mécanisme intracellulaire qui induit l'apoptose des cellules. Évidemment, les doses de radiation nécessaires sont différentes d'une tumeur à l'autre¹⁰⁷. La radiothérapie peut également être utilisée après une chirurgie pour ôter les dépôts de cellules cancéreuses qui pourraient rester autour de la zone antérieurement tumorale¹⁰⁸. En effet, chez les patientes qui auront subi un sectionnement d'une partie du sein, 41 % auront des cellules cancéreuses persistantes près de la lésion¹⁰⁹. Parmi celles-ci, celles qui n'auront pas recours à la radiothérapie courent un risque d'avoir une tumeur récurrente évaluée à 39 %, comparativement à 14 % pour celles qui auront reçu le traitement de radiation¹⁰⁹. La chimiothérapie, quant à elle, est utilisée quand la métastase est soupçonnée ou diagnostiquée^{90,110}. Ce traitement consiste à injecter des médicaments de façon systémique pour détruire des cellules cancéreuses dissimulées ou inaccessibles par radiothérapie. La plupart des médicaments chimiothérapeutiques sont administrés par voie intraveineuse à l'hôpital. La chimiothérapie provoque des altérations dans les cellules à prolifération rapide : les cellules cancéreuses, mais aussi

plusieurs types de cellules saines sont affectées¹¹¹. C'est ce qui provoque les effets secondaires associés à cette approche, notamment la fatigue, la perte des cheveux et les vomissements¹. Les effets secondaires de la chimiothérapie sont différents, en termes de nature et d'intensité, d'une personne à l'autre et dépendent entre autres de la dose et de la nature des agents utilisés. Une étude faite par le groupe Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTG) indique que la chimiothérapie diminue le risque de récurrence du cancer du sein de 30 % et de mortalité d'environ 20 %¹¹². Les personnes ayant un cancer ER-négatif sont plus sensibles à la chimiothérapie, probablement parce que ces cellules se divisent plus rapidement que les cellules hormono-dépendantes/ER-positives; malgré cela, le taux de survie des patientes demeure faible¹¹³.

Outre la chirurgie, l'hormonothérapie à l'aide des anti-œstrogènes est un traitement de choix pour les patients atteints d'un cancer du sein hormono-dépendant afin de guérir et pour prévenir la récurrence de la maladie^{64,114,115}. Certains anti-œstrogènes sont appelés SERM, pour modulateurs sélectifs des récepteurs œstrogéniques^{35,64}. Le tamoxifène, qui en fait partie, peut aussi être utilisé pour la prévention chez les femmes à haut risque de développer un cancer du sein^{114,116}. Ce médicament est pris par voie orale sous forme de comprimé et son dosage varie d'un patient à l'autre¹¹⁷. Dans les cellules du cancer du sein, le tamoxifène agit comme un antagoniste du récepteur aux œstrogènes en se liant au ER et en induisant un changement de conformation qui bloque l'interaction du ER avec les protéines co-activatrices de la glande mammaire^{116,117}. Il réduit ainsi le nombre de récepteurs disponibles pour la liaison avec des œstrogènes endogènes, ce qui diminue la croissance de la tumeur en réponse à l'œstrogène^{117,118}. À l'inverse, le tamoxifène montre des effets œstrogéniques dans d'autres tissus et c'est pourquoi il n'est pas un antagoniste pur du ER, mais plutôt un SERM. L'action œstrogénique du tamoxifène entraîne des effets bénéfiques sur les os et le système cardio-vasculaire chez les femmes ménopausées, mais l'utilisation du tamoxifène a été associée à une incidence accrue de cancer de l'endomètre^{116,117}. L'explication moléculaire de cet agoniste partiel des récepteurs œstrogéniques dans l'endomètre par le tamoxifène n'est pas complète, mais il a été suggéré qu'il induit des changements dans l'expression des gènes dans les

cellules épithéliales endométriales, notamment des gènes impliqués dans le métabolisme des œstrogènes¹¹⁹.

Les inhibiteurs de l'aromatase (AIs) peuvent également être prescrits pour traiter le cancer du sein chez les femmes ménopausées ayant un cancer hormono-dépendant^{118,120}. L'aromatase, une enzyme présente dans le foie, est impliquée dans les dernières étapes de la biosynthèse des androgènes par le cytochrome P450 et est responsable de la production des œstrogènes¹²¹. Chez ces femmes, l'aromatase est principalement exprimée dans le tissu adipeux et non pas dans les gonades¹¹⁸. Les AIs empêchent la production d'œstrogènes par les tissus gras et par les glandes surrénales⁶⁴; l'inhibition de l'aromatase permet de réduire la croissance des cancers du sein hormono-dépendants stimulés par l'œstrogène. Habituellement, le traitement des AIs est donné aux patients quand les anti-œstrogènes n'ont pas été efficaces ou lorsque les cellules ont développé une résistance au tamoxifène^{118,122}. Le traitement aux AIs peut aussi être combiné avec le tamoxifène¹¹⁸.

Un autre médicament, plus médiatisé, est le trastuzumab ou Herceptin, qui bloque spécifiquement l'action de l'oncogène *ERBB2*^{55,58,123}. Le trastuzumab est un anticorps monoclonal humanisé recombinant dirigé contre le domaine extracellulaire de la protéine ERBB2 et il s'administre par injection intraveineuse^{55,58,123,124}. Ce traitement est destiné aux gens atteints d'un cancer du sein infiltrant, où les cellules cancéreuses surexpriment le gène *ERBB2*^{58,123}. Le trastuzumab vise à inhiber la division et la croissance des cellules cancéreuses du sein initiées par *ERBB2*. La liaison du médicament à ERBB2 déclenche sa dégradation⁵⁵. Le trastuzumab combiné à la chimiothérapie rend les cellules plus sensibles aux traitements et augmente les chances de survie de la patiente^{90,123-125}.

Malgré l'efficacité relative de ces traitements, plusieurs patientes voient éventuellement leur cancer récidiver, et/ou la maladie évoluer vers le stade métastatique¹¹⁴. La résistance aux traitements est une autre problématique clinique importante avec laquelle doivent composer médecins et patientes. Environ un tiers des

femmes atteintes d'un cancer du sein vont éventuellement développer des tumeurs récurrentes qui sont résistantes au tamoxifène¹¹⁴. Les cellules résistantes au tamoxifène n'ont pas perdu leur statut ER+, cependant, dans ces cellules le tamoxifène interagit avec les voies des facteurs de croissance, ce qui favorise leur prolifération cellulaire¹²⁶. Les tumeurs du sein résistantes au tamoxifène sont souvent caractérisées par un niveau élevé du gène *ERBB2*^{50,57}. Environ 40 % des patients ayant des tumeurs métastatiques vont développer une résistance au tamoxifène¹²⁶. Pour leur part, la plupart des tumeurs qui sont résistantes au trastuzumab le deviennent en moins de douze mois de thérapie^{127,128}. Les patients résistants au trastuzumab peuvent présenter une mutation dans le domaine extracellulaire de la protéine ERBB2, qui provoque une phosphorylation constitutive du domaine kinase du récepteur et une activation constitutive de voies intracellulaires oncogéniques telles que celles du récepteur à l'EGF⁵⁵.

Les traitements disponibles actuellement qui sont décrits ci-haut ont non seulement une efficacité limitée pour traiter les tumeurs primaires du sein, mais aussi sont-ils peu efficaces en général pour contrer la métastase, avec pour principale conséquence un pronostic défavorable pour les tumeurs métastatiques. Par conséquent, il est crucial d'investiguer en profondeur les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent le processus : c'est de cette façon que seront obtenues les connaissances nécessaires au développement d'une nouvelle génération d'agents anti-métastatiques efficaces. Parmi les candidats moléculaires potentiellement impliqués dans le contrôle de la métastase figurent des facteurs de la famille PAX; ceux-ci sont au cœur du programme de recherche sur la métastase du cancer du sein du Dre Van Themsche.

1.2 Les gènes PAX

1.2.1 Structure

La famille des gènes PAX encode des protéines qui sont des facteurs de transcription¹²⁹⁻¹³¹. Cette famille comprend neuf membres qui sont divisés en quatre groupes selon leurs domaines structuraux : PAX1/9, PAX2/5/8, PAX3/7 et PAX4/6

(Figure 1.4)^{129,131,132}. Les PAX tirent leur nom d'un motif protéique de liaison de l'ADN appelée *paired box*, un domaine conservé chez tous les membres de la famille PAX, d'une longueur de 128 acides aminés et qui est situé dans la partie amino-terminale de la protéine^{130,131,133,134}. Les protéines PAX diffèrent par contre par la présence ou l'absence d'un second domaine appelé octapeptide, qui contribue à l'activité transcriptionnelle de ces protéines^{129,131,134,135}. De plus, certaines PAX possèdent un autre domaine de liaison à l'ADN, complet ou partiel, appelé homéodomaine^{129,131,134,135}.

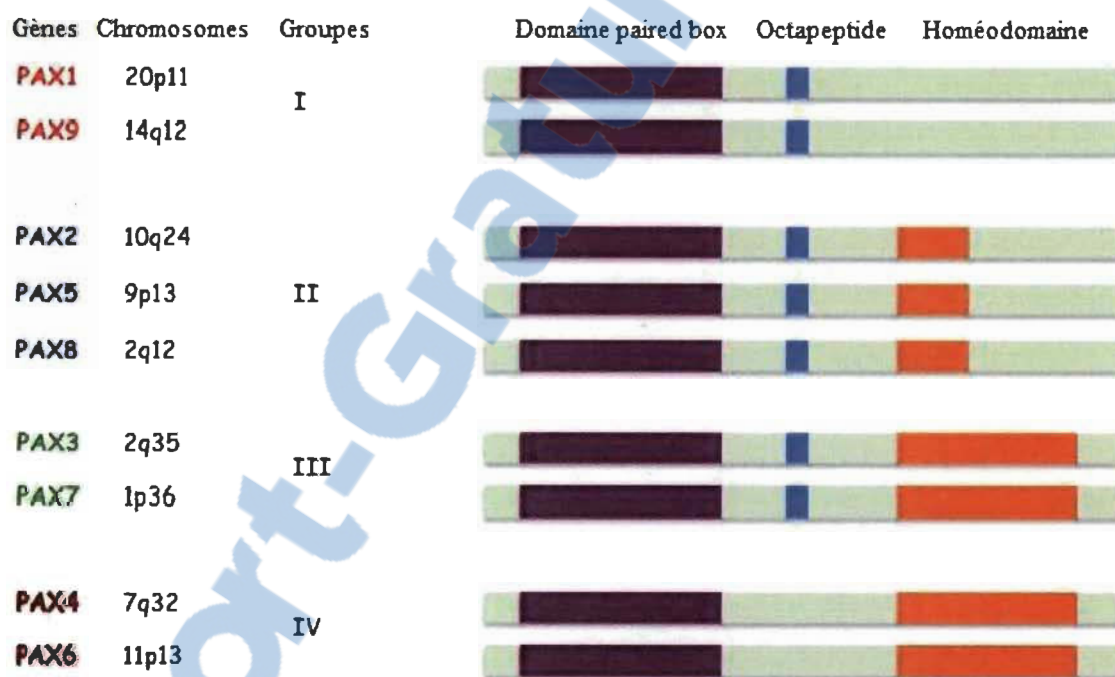


Figure 1.4 Structure moléculaire des membres de la famille PAX.

La famille PAX comprend neuf membres qui sont divisés en quatre groupes selon leurs domaines structuraux : PAX1/9, PAX2/5/8, PAX3/7 et PAX4/6. Ils possèdent tous le domaine paired-box qui lie un site consensus à l'ADN et ils diffèrent par la présence ou l'absence d'une séquence octapeptide ou d'un homéodomaine complet ou partiel. Adapté de ¹³⁶.

1.2.2 Expression et activité

Classiquement, les gènes PAX sont exprimés pendant le développement fœtal, y compris pendant l'organogenèse^{131,135,137,138}. Ils sont des régulateurs du développement

tissulaire et cellulaire dans les embryons et sont généralement réprimés lors de la différenciation terminale des cellules^{129,135,139,140}. L'expression des gènes PAX est relativement rare dans les tissus adultes; il a cependant été observé que certains PAX peuvent persister ou être ré-exprimés dans des tissus particuliers chez l'adulte, où leur profil d'expression est souvent différent de celui dans l'embryogenèse^{133,139}.

Certaines études laissent également supposer que l'expression des gènes PAX pourrait être dérégulée lors d'un cancer^{134,137,138}. Un rôle intéressant des gènes PAX qui pourrait les impliquer dans le développement d'un cancer est leur capacité de contrôler l'auto-renouveau des cellules souches, à la fois pendant le développement fœtal et chez l'adulte^{135,139}. Cette caractéristique est importante dans la régénération et la réparation des tissus, et est particulièrement pertinente dans le contexte de la formation des tumeurs, où des cellules souches pré-cancéreuses peuvent procéder à l'auto-renouveau pour ensuite proliférer pour générer une masse cancéreuse¹³⁹. Toutefois, les gènes PAX ne seraient pour la plupart pas oncogéniques, car la surexpression de gènes PAX *in vivo* dans des souris transgéniques ne mène pas nécessairement à l'apparition de tumeurs, excepté pour PAX6¹³⁹. Néanmoins, l'un ou l'autre des gènes PAX est souvent exprimé dans les cellules de divers cancers, et est parfois nécessaire pour la croissance et la survie des cellules cancéreuses^{129,135}. Ainsi, les altérations génétiques de certains membres de la famille PAX interviennent directement dans les réseaux transcriptionnels menant à l'oncogenèse en régulant la survie des cellules tumorales, la prolifération et la migration^{129,135}. De plus, des modifications dans l'expression de certains gènes PAX des sous-groupes II (PAX 2-5-8) et III (PAX 3-7) sont souvent associées à un pronostic peu favorable^{129,139}. Les gènes de ces deux sous-groupes sont exprimés dans une grande variété de tumeurs et peuvent être utilisés comme marqueurs tumoraux¹³⁹. Également, la répression de leur expression entraîne la mort des cellules tumorales, ce qui représente une cible potentielle intéressante pour combattre le cancer¹³⁹. À l'inverse, les gènes PAX des sous-groupes I (PAX 1-9) et IV (PAX 4-6) ont rarement été impliqués dans la tumorigenèse^{129,139}.

Dans les cellules du cancer du sein, ce ne sont évidemment pas tous les gènes PAX qui sont exprimés. Dans le cadre de ma maîtrise, j'ai concentré mes efforts de recherche sur un seul membre, PAX2. La section qui suit décrit PAX2 et la rationnelle de son étude dans les cellules du cancer du sein.

1.2.3 PAX2

Le gène PAX2, qui code pour une protéine unique dont la masse moléculaire est de 42kDa, fait partie du sous-groupe II et possède la séquence octapeptide ainsi qu'un homéodomaine tronqué^{135,136,141}. Chez l'humain, le gène qui code pour cette protéine est situé sur le chromosome dix et se compose de douze exons¹³³. Les quatre premiers exons codent le domaine *paired box*, tandis que le cinquième exon code pour la séquence octapeptide¹³³. La partie carboxy-terminale de la protéine PAX2, codée par les exons sept à douze, est requise pour la régulation transcriptionnelle des gènes cibles de la protéine¹³³.

Le premier rôle qui a été attribué à PAX2, et celui qui est encore le mieux connu aujourd'hui, est son implication dans le développement du mésoderme intermédiaire du rein^{131,137,142}. Dans des conditions normales, PAX2 a une fonction anti-apoptotique dans les cellules rénales embryonnaires¹²⁹. Au cours du développement embryonnaire du rein, l'expression de PAX2 est transitoire et réprimée lors de la différenciation terminale, alors que son expression devient constitutive dans les tumeurs du rein associées à la maladie de Wilms^{131,143}. Chez la souris, la perte de la fonction du gène PAX2 (*knockout*) résulte en de multiples anomalies du développement, y compris une agénésie rénale (développement insuffisant du rein durant l'embryogenèse) et des défauts du nerf optique et du système nerveux central. Ces anomalies sont telles que les souris dont le gène PAX2 est complètement inactivé par mutation meurent quelques jours après la naissance¹³³.

La figure 1.5 montre les principales tumeurs où PAX2 a été détecté chez l'humain¹²⁹. Le rôle de PAX2 dans ces tumeurs commence à peine à être investigué.

Dans les cellules du cancer de la prostate, par exemple, des données suggèrent que PAX2 supprimerait une composante du système immunitaire impliquée dans la reconnaissance des cellules cancéreuses et leur destruction¹⁴⁰. PAX2 favoriserait également la survie des cellules cancéreuses de la prostate, en inhibant le suppresseur de tumeur hBD1¹⁴⁰. Ces données font de PAX2 une cible thérapeutique potentielle supplémentaire dans le cas du cancer de la prostate. PAX2 a également été détecté dans certaines tumeurs de l'endomètre, où son expression est induite par l'œstrogène et par le tamoxifène^{116,137,142}. Ce phénomène s'explique par le fait que dans l'utérus, les récepteurs à l'estrogène sont exprimés dans des proportions différentes; de plus, leurs co-récepteurs peuvent être différents. Dans le cancer du sein, le tamoxifène agit comme un antagoniste du récepteur à l'œstrogène tandis que dans les tissus de l'endomètre, il agit à titre d'agoniste du récepteur l'œstrogène¹⁴⁴. Cette induction est associée à une hypométhylation du promoteur de PAX2, démontrant la régulation épigénétique de l'expression de PAX2 dans ces cellules. De plus, il a été montré que l'induction de l'expression de PAX2 engendrait une forte prolifération cellulaire^{116,137,142}, ce qui suggère que PAX2 est réprimé dans les cellules endométriales non-cancéreuses afin d'en contrôler la prolifération.

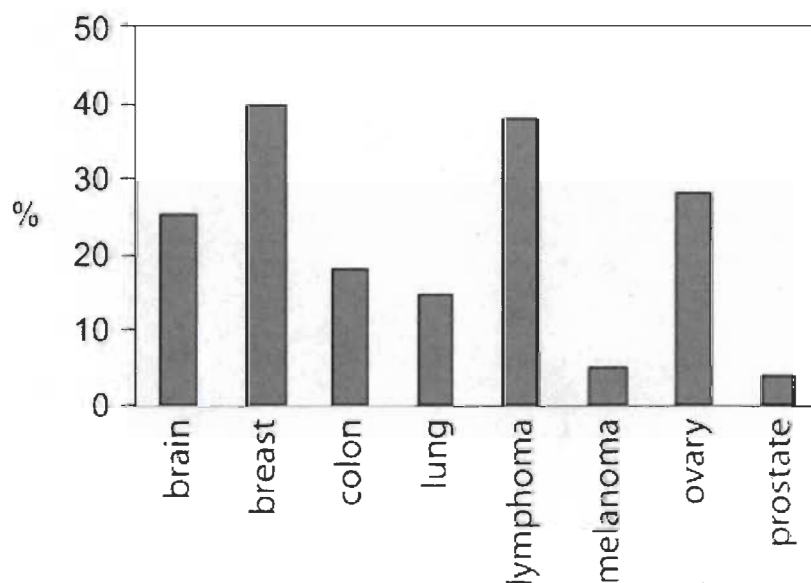


Figure 1.5 Huit types de cancers qui peuvent exprimer PAX2 chez l'humain. Les pourcentages des tumeurs qui expriment la protéine PAX2 chez huit types de cancers parmi les plus fréquents chez l'humain, tel que déterminé par immunohistochimie, sont présentés ici. Tiré de ¹²⁹.

Enfin, PAX2 a été détecté dans diverses tumeurs du sein^{129,137,139,140}. Il ne peut être utilisé comme marqueur spécifique du tissu mammaire cancéreux, puisqu'une étude faite par Silberstein et ses collaborateurs montre la présence du facteur de transcription PAX2 dans plusieurs tissus du sein normaux; pendant le développement, PAX2 est nécessaire à la croissance des conduits canaux latéraux du sein¹⁴³.

PAX2 a été trouvé comme étant un répresseur transcriptionnel du proto-oncogène *ERBB2* dans les cellules du cancer du sein ER+^{50,114}. Parce que *ERBB2* est un important facteur pro-invasif et pro-métastatique dans les cellules du cancer du sein, cela suggère que PAX2 pourrait agir comme un régulateur négatif de l'invasivité et de la métastase dans ces cellules^{50,102,103}. Peu de facteurs capables d'une telle fonction protectrice contre la progression du cancer du sein ont été identifiés à ce jour et par conséquent, un rôle possible pour PAX2 en ce sens, ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régulent son expression et son activité, sont particulièrement intéressants.

Très peu de choses sont connues quant aux mécanismes moléculaires qui régulent l'expression ainsi que l'activité de PAX2 dans les cellules du cancer du sein ER+. Dans certains types cellulaires, la quantité d'ARNm de PAX2 est augmentée après une stimulation par l'EGF (le facteur de croissance épidermique)¹⁴²; l'impact de l'EGF sur PAX2 dans les cellules du cancer du sein ER+ demeure à investiguer. En parallèle, puisque des conditions environnementales hypoxiques qui règnent au sein de tumeurs solides comme celles du sein influencent l'expression de nombreuses molécules liées à la capacité invasive et métastatique de ces dernières, il est possible que l'expression du facteur PAX2, qui régule l'expression du gène pro-invasif et pro-métastatique *ERBB2* dans les cellules du cancer du sein luminales⁵⁰, soit différente dans des conditions normoxiques et hypoxiques. Les sections 1.3 et 1.4 du présent mémoire sont dédiées à l'introduction de ces deux régulateurs potentiels de PAX2 (EGF et hypoxie respectivement) dans les cellules du cancer du sein luminales.

1.3 Le facteur EGF

1.3.1 Description générale de l'EGF et sa famille de ligands

Les membres de la famille de l'EGF sont synthétisés sous forme de précurseurs transmembranaires à la surface cellulaire¹⁴⁵. À la suite de leur activation, ils peuvent lier divers récepteurs dont ceux de la famille erBb. Chez l'humain, on retrouve quatre récepteurs homologues à EGF, pour lesquels 11 ligands ont été identifiés (Figure 1.6 et Tableau 1.1). Dépendamment du type de ligand et du récepteur activé, le résultat final sera différent, chaque récepteur et chaque ligand remplissant des rôles distincts. Ils sont impliqués dans la prolifération, la survie, l'angiogenèse, l'adhésion, la migration/invasion et dans la différenciation cellulaire⁶¹.

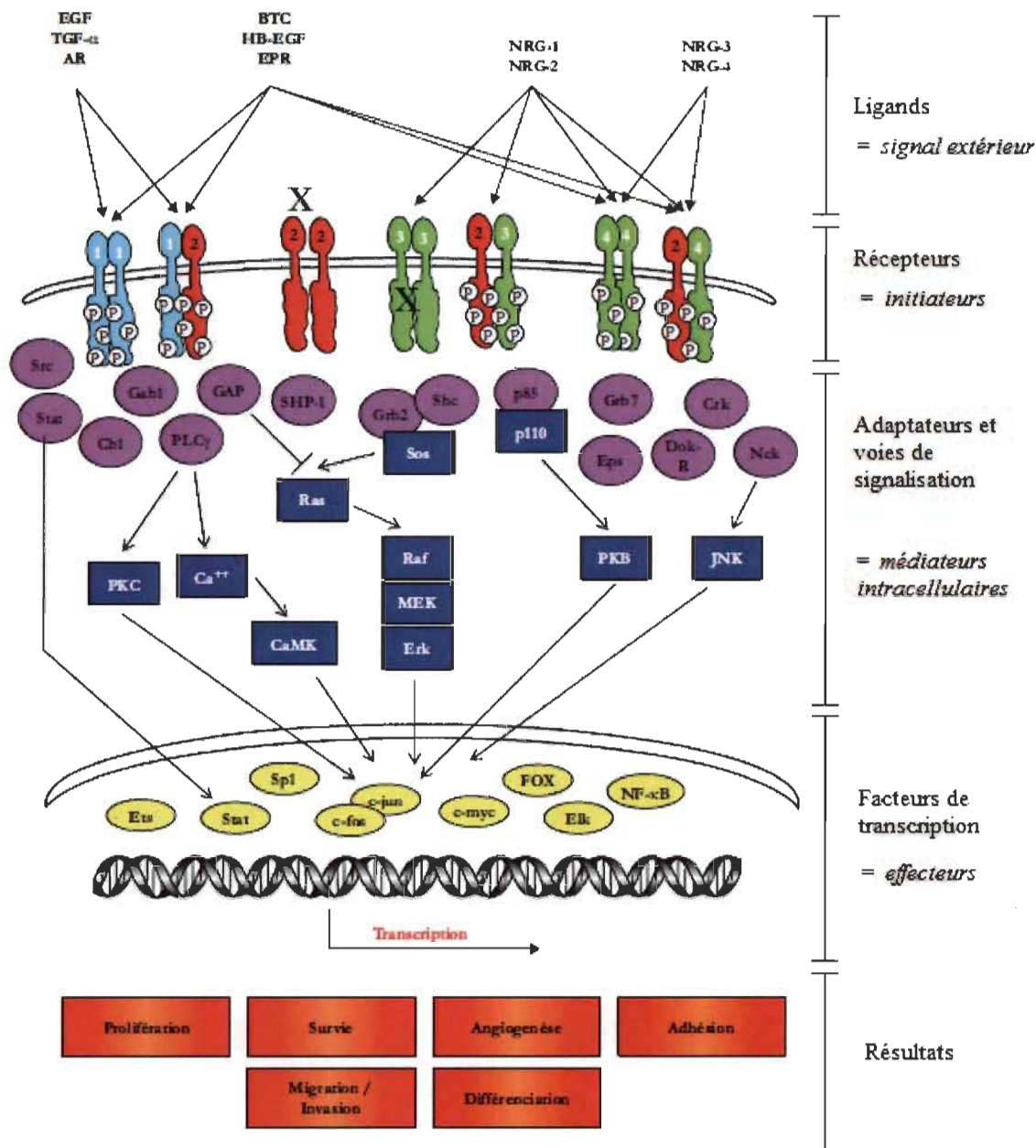


Figure 1.6 Signalisation par les ligands de la famille EGF. Lorsque les récepteurs sont activés par un ligand, ils dimérisent et sont phosphorylés, puis des molécules adaptatrices sont recrutées et des voies de signalisation cellulaire sont activées, ce qui mène à l'activation de plusieurs facteurs de transcription régulant diverses fonctions biologiques. Adapté de ⁶¹.

Le facteur EGF (epidermal growth factor) est une petite molécule soluble composée de 53 acides aminés qui est impliquée dans la croissance normale de plusieurs organes. Lorsqu'il lie son récepteur à la surface des cellules (EGFR; epidermal growth

factor receptor), EGF active une intense signalisation cellulaire en aval, dont l'une des principales conséquences est l'augmentation très rapide de l'activité mitotique. Les principales voies de signalisation impliquées sont celles des MAP kinases et de la PI3 kinase. La structure tridimensionnelle de la protéine EGF est dictée par six résidus cystéines qui forment trois ponts disulfures : le domaine NH₂-terminal contient deux ponts disulfures et le domaine COOH-terminal, seulement qu'un¹⁴⁶.

Tableau 1.1

Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et leurs récepteurs. Tiré de ⁶¹.

Facteurs de croissance	Récepteurs reconnus	Année de découverte
EGF (<i>epidermal growth factor</i> ; = urogastrone)	EGFR	1962
Amphiréguline (AR)	EGFR	1988
TGF- α (<i>transforming growth factor α</i>)	EGFR	1982
Épigène (EPG)	EGFR	2001
Bétacelluline (BTC)	EGFR, ErbB4	1993
HB-EGF (<i>heparin-binding EGF</i>)	EGFR, ErbB4	1991
Epiréguline (EPR)	EGFR, ErbB4	1995
Neurégulines (NRG, 4 gènes, nombreuses isoformes)	ErbB3, ErbB4	1992
Récepteurs de facteurs de croissance	Ligands reconnus	Année de découverte
EGFR (<i>EGF receptor</i>) = ErbB1, HER1	Tous sauf NRG	1978, cloné en 1984
ErbB2 ou HER2, neu (oncogène de rat)	Aucun	cloné en 1985
ErbB3 ou HER3	NRG1 et 2	cloné en 1989
ErbB4 ou HER4	BTC, HB-EGF, EPR, NRG1 à 4	cloné en 1993

1.3.2 L'EGF dans le sein normal et cancéreux

L'EGF a un rôle important dans le développement normal de la glande mammaire. Au cours de la puberté, de la maturation, de la grossesse et de la lactation, les hormones stéroïdiennes vont réguler la production de plusieurs facteurs de croissance dans le sein, y compris l'EGF. Selon les récepteurs qu'il activera, diverses fonctions biologiques seront engagées (Figure 1.7)¹⁴⁷. Le facteur EGF a également un rôle clé dans la

carcinogénèse mammaire. Les récepteurs à l'EGF sont surexprimés dans 16 à 48 % des cancers du sein humains et cette surexpression est corrélée positivement avec un mauvais pronostic⁵³. Ainsi, lorsqu'il est surexprimé dans les cancers du sein triples négatifs, EGFR confère une plus grande prolifération des cellules cancéreuses et favorise la métastase⁵³ ainsi qu'une résistance à la chimiothérapie⁵⁴.

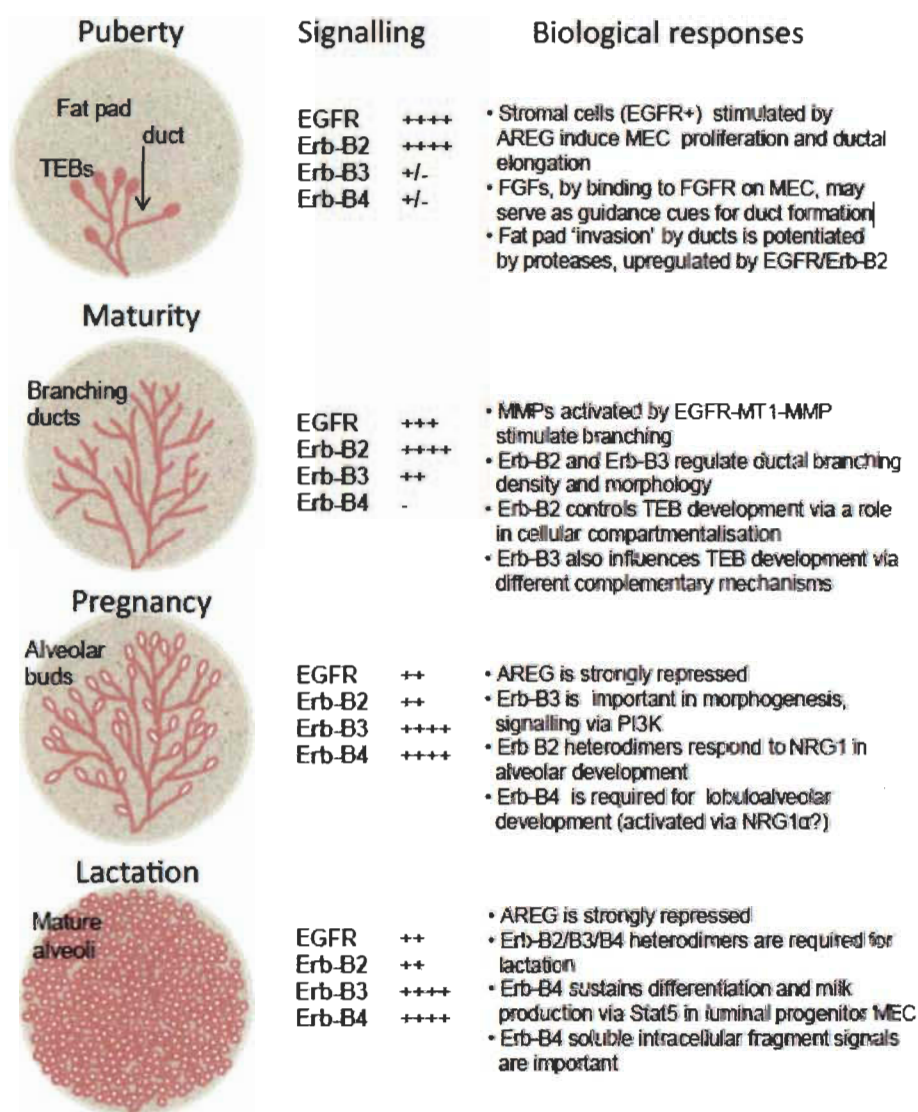


Figure 1.7 Rôle des récepteurs EGFR/ErbB et de leurs ligands durant le développement normal de la glande mammaire et la maturation. Les récepteurs à l'EGF et leurs ligands sont impliqués dans diverses réponses biologiques durant la puberté, la maturation, la grossesse et la lactation. Tiré de ¹⁴⁷.

1.4 L'hypoxie et son impact sur les tumeurs mammaires

1.4.1 Description de la condition hypoxique

L'hypoxie, au cours de laquelle la quantité d'oxygène perfusant un tissu est restreinte pour différentes raisons, est un état dynamique caractérisant de nombreux types de tumeurs solides. Ceci engendre de nombreux changements intracellulaires, autant dans les voies de signalisation que dans l'expression génique en aval. Dans les cellules humaines, l'adaptation aux conditions hypoxiques est réalisée par deux facteurs de transcription : HIF-1 et HIF-2 (facteurs inductibles à l'hypoxie-1 et -2). Les deux protéines sont composées d'une sous-unité α de 120 kDa et d'une sous-unité β de 91-94 kDa¹⁴⁸. Dans des conditions normoxiques, les protéines HIF ont une très courte demi-vie. En réponse à l'oxygène environnant, leur sous-unité α est hydroxylée par une prolyl-hydroxylase puis ubiquitinée par la protéine pVHL (von Hippel Lindau protein), un suppresseur de tumeurs (Figure 1.8). HIF-1 et HIF-2 sont ensuite dégradées dans le protéasome en quelques minutes^{149,150}.

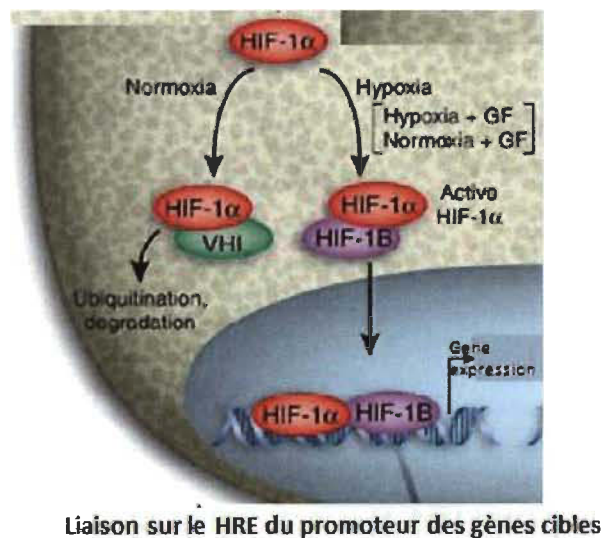


Figure 1.8 Impact des conditions hypoxiques. En conditions normoxiques, le facteur HIF-1 α est ubiquitiné et dégradé, tandis qu'en hypoxie, il est stabilisé. HIF-1 se lie sur le HRE du promoteur des gènes cibles. Adapté de ¹⁵¹.

En conditions hypoxiques à l'opposé, la sous-unité α de HIF-1 et de HIF-2 est stabilisée et s'associe à la sous-unité HIF-1 β , qui elle, est exprimée constitutivement¹⁵²; les deux protéines HIF-1 et HIF-2 s'accumulent donc¹⁵³ et leur activité transcriptionnelle est augmentée (Figure 1.8). Le rôle de HIF-1 dans la réponse tumorale à l'hypoxie est beaucoup mieux caractérisé que celui de HIF-2. Ainsi, en conditions hypoxiques, la liaison de HIF-1 à l'ADN module l'activité transcriptionnelle d'une variété de gènes cibles¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ (Figure 1.9).

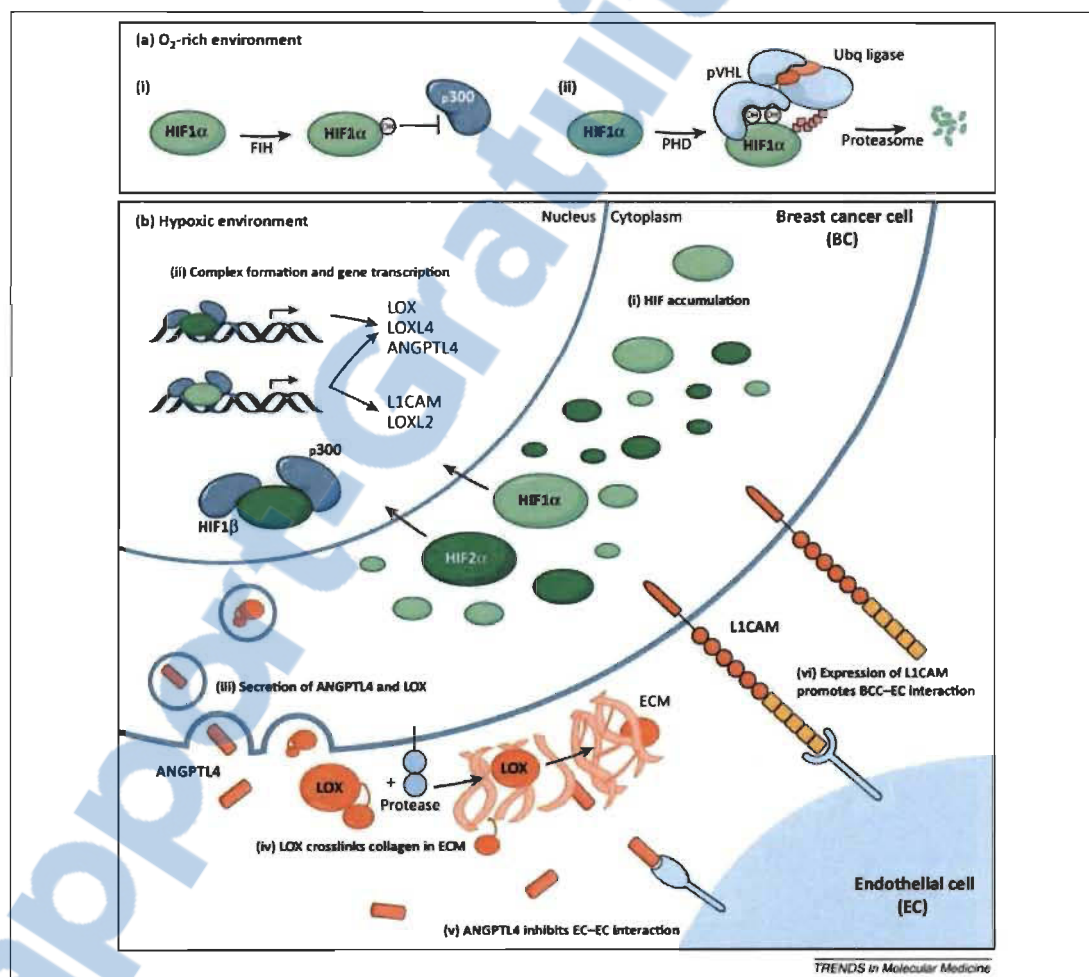


Figure 1.9 Régulation et rôle de HIF-1 en réponse à l'oxygène.

En conditions normoxiques, la protéine HIF-1 est instable et rapidement dégradée dans le protéasome. B) En conditions hypoxiques, HIF-1 stabilisée régule à la hausse l'expression de plusieurs gènes cibles incluant L1 cell adhesion molecule (L1CAM), angiopoietin-like 4 (ANGPTL4), lysyl oxidase (LOX), and LOX-like proteins 2 and 4 (LOXL2, LOXL4). Tiré de¹⁵⁷.

1.4.2 L'impact de l'hypoxie sur les tumeurs mammaires

Des régions hypoxiques sont observables dans les tumeurs mammaires à tous les stades de la progression du cancer, soit autant dans les carcinomes *in situ* que les carcinomes ductals et lobulaires hautement invasifs¹⁵⁸. À l'image de plusieurs autres types de cancer, l'hypoxie pourrait augmenter l'invasion et la métastase des cellules du cancer du sein¹⁵⁹; de plus, l'hypoxie empêcherait la différenciation des cellules souches mammaires en cellules épithéliales¹⁶⁰ et un tel maintien d'une niche favorable aux cellules souches augmenterait la résistance aux agents chimiothérapeutiques¹⁶¹. Enfin, des conditions hypoxiques diminuent l'expression de ER α et conséquemment, la réponse des cellules cancéreuses au Tamoxifen¹⁶².

1.5 Hypothèses et objectifs

L'équipe du Dre Van Themsche caractérise le rôle et la régulation du facteur de transcription PAX2 dans les cellules du cancer du sein luminales/ER α +. Des études immunohistochimiques suggèrent l'existence d'une corrélation positive entre l'activation de PAX2 et le phénotype luminal des tumeurs du sein¹⁴³; de plus, il a précédemment été démontré que sous le contrôle de l'estradiol, PAX2 contrôle négativement l'expression du gène *ERBB2* dans ces cellules, en réprimant l'expression d'*ERBB2*¹⁶³. Ensemble, ces observations soulèvent l'hypothèse selon laquelle PAX2 serait un élément central dont l'activité est finement régulée dans les tumeurs du sein, de façon à lui permettre de dicter l'évolution des cancers du sein de type luminal spécifiquement. Il importe donc d'élucider la régulation de PAX2 dans ces cellules afin de déterminer quels sont les axes cellulaires qui peuvent être activés pour augmenter l'activité anti-métastatique de PAX2 dans les tumeurs des patientes.

Une étude antérieure a démontré qu'en réponse à l'oestradiol, PAX2 régule l'expression de *ERBB2* dans les cellules du cancer du sein luminales⁵⁰. Ceci suggère donc que l'oestradiol est capable d'augmenter l'expression et ou l'activité de PAX2 dans ces cellules; toutefois, cette question est demeurée sans réponse jusqu'à aujourd'hui. Puisque l'activité de PAX2 est augmentée lorsqu'il est phosphorylé sur sérine-393¹⁶⁴, nous avons émis l'hypothèse qu'en réponse à l'oestradiol, la sérine-393 de la protéine PAX2 était phosphorylée dans les cellules du cancer du sein luminales. De plus, nous avons envisagé que la phosphorylation de la protéine PAX2, de même que sa translocation vers le noyau (un autre marqueur de son état d'activation), pouvaient être augmentées en réponse à l'estradiol dans les cellules du cancer du sein luminales exclusivement.

En parallèle, nous suspectons que l'IGF-1 et de l'EGF, deux facteurs solubles capables de réguler l'expression de *ERBB2* l'invasivité des cellules du cancer du sein, mais ayant précédemment été identifiés comme des antagonistes de l'oestradiol^{24-26,53} dans le sein cancéreux, puissent également réguler l'activité de PAX2 dans les cellules du cancer du sein luminales. Enfin, puisque PAX2 régule dans les cellules du cancer du sein l'expression d'un gène largement impliqué dans le contrôle du phénotype invasif et métastique, *ERBB2*⁵⁰, et sachant que dans des conditions réelles ou mimant l'hypoxie, l'expression de certains gènes PAX, incluant celui codant pour PAX2^{165,166}, est régulée à la hausse, l'expression de PAX2 est susceptible d'être régulée différemment dans des conditions normoxiques versus hypoxiques dans les cellules du cancer du sein. Il est à noter toutefois que l'hypoxie a augmenté l'expression de PAX2 dans des cellules rénales, celles-là même où il joue un rôle oncogénique¹⁶⁷. Nous avons donc émis l'hypothèse que puisque dans les cellules du cancer du sein luminales PAX2 jouerait plutôt un rôle protecteur contre l'invasivité cellulaire en régulant à la baisse l'expression de *ERBB2*¹⁶³, l'hypoxie pourrait y réguler différemment l'expression de PAX2 comparé aux cellules rénales.

Ainsi, dans le cadre de ma maîtrise, j'ai étudié de quelle façon des facteurs environnementaux précis régulent l'expression et la quantité de PAX2 dans ces cellules.

Mes objectifs spécifiques étaient ainsi de déterminer comment l'exposition à l'estradiol, à l'EGF et à un stimulant mimant l'hypoxie influençaient 1) l'expression et 2) l'activité de PAX2. Une partie des résultats a déjà fait l'objet d'une publication (insérée dans le chapitre II) : le reste est présenté au troisième chapitre et constitue le point de départ d'autres études actuellement poursuivies par de nouveaux étudiants dans l'équipe du Dre Van Themsche.

1.5.1 Modèles cellulaires

Une collection de lignées de cellules du cancer du sein dérivées d'échantillons tumoraux provenant de patientes humaines sont disponibles pour l'étude de ce cancer et sont couramment utilisées dans plusieurs laboratoires à travers le monde depuis des décennies. En effet, parmi les lignées tumorales mammaires établies dans les années 1970, trois sont mentionnées dans les deux tiers des articles scientifiques recensés sur le site *PubMed* au sujet du cancer du sein, soit les lignées MCF-7, T-47D et MDA-MB-231¹⁶⁸. La lignée cellulaire humaine de cancer du sein épithélial *Michigan Cancer Foundation-7*, surnommée MCF-7, a été établie en culture à partir d'un épanchement pleural prélevé chez une patiente de 69 ans atteinte d'un cancer du sein métastatique, décédée en 1970^{83,169}. C'est en grande partie grâce à cette lignée cellulaire que les recherches sur le cancer du sein hormono-dépendant ont grandement évoluées ces dernières années. C'est cette lignée que j'ai moi-même utilisée pour modèle d'étude *in vitro*. Cette lignée MCF-7 est très bien caractérisée. Elle a été associée au sous-type moléculaire luminal A, exprimant ER α et PR^{83,168,170}. Ainsi, elle est très représentative des tumeurs observées en clinique : chez les femmes nord-américaines atteintes d'un cancer du sein, ce sont les tumeurs lumorales/ER+ qui sont les plus fréquentes^{34,96}. Fidèles à leur classification lumorale, les cellules MCF-7 sont très différenciées et expriment faiblement *ERBB2*^{65,72}. Leur phénotype faiblement invasif et très peu métastatique^{72,86} est également très cohérent avec leur statut lumorale. Cette lignée représente un modèle de premier choix pour l'étude de la régulation de PAX2, parce qu'il y est exprimé et actif⁵⁰; de plus, c'est dans cette lignée qu'a été découvert le rôle de PAX2 comme régulateur négatif de l'expression de *ERBB2* en réponse à l'estradiol⁵⁰.

Néanmoins, les résultats obtenus dans ce modèle cellulaire devront éventuellement être confirmés dans d'autres modèles/lignées *in vitro*, ainsi que dans des modèles *in vivo*.

CHAPITRE II

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Ce chapitre est présenté sous forme d'article, en anglais, et a été publié dans le journal *Molecular Cancer* sous la référence : Beauchemin et al. *Molecular Cancer* 2011, 10:148.

2.1 Contribution des auteurs

J'ai réalisé plusieurs des immunobuvardages présentés (Figures 1-4). J'ai également aidé l'auteur principal David Beauchemin à réaliser les expérimentations de la figure 3 (traitements des cellules, lyse des cellules traitées, dosage des protéines totales de ces lyses). Tout ceci, toujours pour plus de trois expériences indépendantes.

2.2 Résumé

Contexte : La métastase est la principale cause de décès chez les patients atteints de cancer du sein. Identifier les principaux facteurs cellulaires contrôlant l'invasion et la métastase des cellules cancéreuses du sein devrait mener vers de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces interférant avec le processus métastatique. Le facteur de transcription PAX2 (paired box 2) est exprimé par les cellules cancéreuses du sein *in vivo* et, plus récemment, il a été montré à réguler négativement l'expression de *ERBB2* (*erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*, *HER-2/neu*), un gène pro-invasif et pro-métastatique, dans les cellules cancéreuses du sein luminal/ERalpha positif (ER α +). L'objectif de la présente étude est d'investiguer sur le rôle de la protéine PAX2 dans le contrôle de l'invasion des cellules du cancer du sein luminal et de caractériser la régulation de son expression et de son activation

Résultats : La forme active (phosphorylée) de PAX2 est plus élevée dans les lignées cellulaires lumineales par rapport aux sous-types non-luminaux, et l'activation de PAX2 par l'estradiol a été réalisée de manière sélective dans les lignées cellulaires du cancer du sein du sous-type luminal. Ce processus a été bloqué par du ICI 182780 et peut être inhibé par l'IGF-1. Un knockdown de PAX2 dans les cellules lumineales MCF-7 a complètement annulé la régulation négative induite par l'estradiol sur *ERBB2* et la diminution de l'invasion des cellules, alors que la surexpression de PAX2 dans ces cellules a amélioré l'effet de l'estradiol au niveau de l'expression de *ERBB2* et de l'invasion cellulaire.

Conclusions : L'étude démontre que l'activation de PAX2 par l'estradiol est sélective dans les cellules du cancer du sein du sous-type luminal, via $ER\alpha$, et que l'IGF-1 est un régulateur négatif de l'activité de PAX2 dans ces cellules. En outre, l'étude révèle un nouveau rôle pour PAX2 dans le maintien d'un phénotype faiblement invasif dans les cellules du cancer du sein lumineales lors de l'exposition à l'estradiol, et montre que la surexpression et l'activation de PAX2 dans ces cellules sont suffisantes pour réduire une capacité invasive.

2.3 Article scientifique

PAX2 is activated by estradiol in breast cancer cells of the luminal subgroup selectively, to confer a low invasive phenotype

David Beauchemin, Catherine Lacombe, Céline Van Themsche*

Mol Cancer, 2011. **10**: p. 148.

Research Group in Molecular Oncology and Endocrinology, Department of Chemistry and Biology, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

David Beauchemin: david.beauchemin@uqtr.ca

Catherine Lacombe: catherine.lacombe@uqtr.ca

Céline Van Themsche: celine.vanthemsche@uqtr.ca

*Corresponding author: Céline Van Themsche, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 Boulevard des Forges, Casier Postal 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Email: celine.vanthemsche@uqtr.ca

Abstract

Background: Metastasis is the leading cause of death among breast cancer patients. Identifying key cellular factors controlling invasion and metastasis of breast cancer cells should pave the way to new therapeutic strategies efficiently interfering with the metastatic process. PAX2 (paired box 2) transcription factor is expressed by breast cancer cells *in vivo* and recently, it was shown to negatively regulate the expression of ERBB2 (erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, HER-2/neu), a well-documented pro-invasive and pro-metastatic gene, in luminal/ERalpha-positive (ER α +) breast cancer cells. The objective of the present study was to investigate a putative role for PAX2 in the control of luminal breast cancer cells invasion, and to begin to characterize its regulation.

Results: PAX2 activity was higher in cell lines from luminal compared to non-luminal subtype, and activation of PAX2 by estradiol was selectively achieved in breast cancer cell lines of the luminal subtype. This process was blocked by ICI 182780 and could be antagonized by IGF-1. Knockdown of PAX2 in luminal MCF-7 cells completely abrogated estradiol-induced downregulation of ERBB2 and decrease of cell invasion, whereas overexpression of PAX2 in these cells enhanced estradiol effects on ERBB2 levels and cell invasion.

Conclusions: The study demonstrates that PAX2 activation by estradiol is selectively achieved in breast cancer cells of the luminal subtype, via ER α , and identifies IGF-1 as a negative regulator of PAX2 activity in these cells. Further, it reveals a new role for PAX2 in the maintenance of a low invasive behavior in luminal breast cancer cells upon exposure to estradiol, and shows that overexpression and activation of PAX2 in these cells is sufficient to reduce their invasive ability.

Keywords: PAX2, estradiol, breast cancer, invasion, ERBB2, estrogen receptor alpha, luminal, MCF-7

Background

The heterogeneous nature of breast cancer is well established. Based on their expression profile, breast tumours are classified in five molecular subgroups (luminal A and B, basal, ERBB2-overexpressing, and normal-like) [1-3]; each is associated with distinct histological markers and clinical parameters. Only tumours of the luminal subgroups express the receptor alpha to estrogen (ER α); however, luminal A tumours express higher levels of ER α than luminal B tumours [1-3] and they are associated with less aggressive metastatic disease and longer disease-free survival [2]. In accordance, they express low levels of ERBB2 (erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, HER-2/neu) *in vivo* [1], the expression and activity of which confer invasive and metastatic ability to breast cancer cells [4-7]. *In vitro*, ER α ⁺ lines such as MCF-7 and ZR-75-1, which were derived from ER α ⁺/luminal A tumours, retain a molecular profile characteristic of luminal A tumours, including low expression of ERBB2 [8]; they also display poor invasive and metastatic ability [3,8,9]. These cell lines thus represent a good model to investigate the cellular and molecular mechanisms underlying the poor invasive and metastatic phenotype of luminal A tumours.

PAX2 (paired box 2) is a member of the PAX family of transcription factors, best known for their role in terminal differentiation during organogenesis, at the time of embryo development [10]. PAX2 is involved in kidney and breast development [11,12], and although its expression was initially thought to be silenced at the end of the process [13], expression of PAX2 has been found in adult, differentiated breast cells [14]. PAX2 expression was also detected in breast tumours: although a relatively small number of samples have been analyzed to date, PAX2 expression can equally be found in different types of tumours [12,14-16]. On the other hand, a differential regulation of PAX2 activation has been evidenced between breast tumour subtypes: nuclear localization of PAX2 is frequent in luminal tumours and infrequent in non-luminal tumours [14,15]. Considering that luminal tumours are associated with longest disease-free survival [2], and also that increased nuclear localization of PAX2 in tumour cells negatively correlates with tumour recurrence [15], preferential activation of PAX2 in poorly metastatic luminal breast cancer cells suggests that PAX2 activity confers protection

against metastasis in these tumours. Supporting this hypothesis, a recent study has revealed that PAX2 negatively regulates the expression of a well-established pro-invasion and pro-metastatic gene, ERBB2 [5,6], in estradiol-treated luminal breast cancer cell lines [17]. A putative role for PAX2 as a negative regulator of invasion and metastasis in breast cancer cells, however, has not been pursued to this day.

In the present study, we have characterized the regulation of PAX2 expression and activation in luminal and non-luminal breast cancer cells; we also examined how the modulation of PAX2 expression affects the invasiveness of estradiol-treated luminal breast cancer cells. Our results show that in response to estradiol, PAX2 is phosphorylated and activated in breast cancer cells of the luminal subtype selectively, via ER α ; further, modulation of PAX2 expression in these cells directly impacts their invasive ability, in an ER α -dependent manner.

Results

To characterize PAX2 regulation in breast cancer cells, we first compared basal expression and activation of PAX2 between luminal and non-luminal cell lines. PAX2 protein levels were similar in all tested cell lines when cultivated in standard medium containing steroid hormones and estradiol-mimicking molecules (Figure 1a), indicating that PAX2 expression does not differ between the two cell subtypes. However, PAX2 phosphorylation on serine 393 residue, a marker of its activation [18], was higher in luminal/ER α + cell lines (MCF-7 and ZR-75-1 cells [8]) compared to non-luminal/ER α - cell lines (MDA-MB-231 and HS578T [8]) (Figure 1a,b), showing preferential activation of PAX2 in luminal breast cancer cells *in vitro*, as observed *in vivo* [14,15]. The highest levels of phosphorylated PAX2 protein were detected in the least invasive cell lines (luminal cell lines MCF-7 and ZR-75-1 [8], Figure 1b), and negatively correlated with protein levels of ERBB2 (Figure 1b), a major player in breast cancer cell invasion and metastasis [5,6,19]: these results support the hypothesis that PAX2 activation in luminal breast cancer cells maintains a mild invasive and metastatic behavior.

We have then determined the impact of estradiol exposure on the activation status of PAX2, in luminal and non-luminal breast cancer cell lines. To this aim, breast cancer cells were cultivated in a steroid- and serum-depleted growth medium, before they were treated with exogenous estradiol at concentrations known to activate estrogen-responsive genes in luminal breast cancer cell lines such as MCF-7 cells (100 nM or less) [20]. A 30-min treatment with estradiol increased the levels of phosphorylation of PAX2 protein on serine 393 residue in MCF-7 cells (Figure 2a), and induced the accumulation of PAX2 protein in cell nucleus, as shown by immunofluorescence (Figure 2c) and subcellular fractionation (Figure 2d). In addition, a longer treatment with estradiol (24 hours) led to a reduction of ERBB2 protein levels in MCF-7 cells (Figure 2a), in agreement with a previously described role for PAX2 in the regulation of ERBB2 gene expression in these cells upon treatment with estradiol [17]. Since estradiol treatment had no impact on PAX2 expression, at the protein (Figure 2a) or mRNA (Figure 2b) levels, these results indicate that estradiol specifically regulates the activation of PAX2 protein, but not PAX2 expression, in luminal breast cancer cells. Treatment of non-luminal cell lines HS578T and MDA-MB-231 with exogenous estradiol had no impact on PAX2 phosphorylation and ERBB2 protein content (Figure 2e), showing that estradiol does not regulate PAX2 activity in these cells. Collectively, these results indicate that PAX2 activation in response to estradiol is selectively achieved in breast cancer cells of the luminal subtype.

By downregulating ERBB2 expression in luminal breast cancer cells [17,21], estradiol could negatively regulate their invasiveness; this question, however, had not been directly examined to this day. We found that overall invasion of MCF-7 cells was indeed reduced by estradiol (Figure 3a). ICI 187280 (ICI) efficiently antagonizes ER α in these cells, as shown by long-term downregulation of ER α expression (Figure 3b) [22,23]; in these conditions, MCF-7 cell invasion was increased (Figure 3c), PAX2 phosphorylation was reduced (Figure 3d) and ERBB2 protein levels were increased (Figure 3b), whether the cells were subsequently treated with estradiol or not. Collectively, these results demonstrate a role for ER α in basal and estradiol-induced

PAX2 activation, ERBB2 downregulation and decrease of cell invasion in luminal MCF-7 cells.

To further document a relationship between PAX2 activity and cell invasion, we have examined whether insulin-like growth factor-1 (IGF-1), which positively regulates ERBB2 expression in luminal cells [24] and increases the motility and invasiveness of MCF-7 cells [25,26], regulated PAX2 activation by estradiol in these cells. Treatment of cells with IGF-1 led to a rapid reduction of PAX2 phosphorylation (Figure 4a), contrary to estradiol which increased P-PAX2 levels (Figure 4a). When IGF-1 and estradiol were combined, PAX2 phosphorylation was reduced (Figure 4a), indicating that IGF-1 antagonizes the effect of estradiol on PAX2 phosphorylation. In agreement, treatment of MCF-7 cells with IGF-1, alone or in combination with estradiol, increased ERBB2 protein levels (Figure 4b), as well as cell invasion (Figure 4c). Altogether, these results strengthen the inverse relationship between PAX2 activity and cellular invasion and identify IGF-1 as a negative regulator of PAX2 activity in luminal breast cancer cells. To directly address a putative role for PAX2 in estradiol-induced decrease of cell invasion, we knocked down PAX2 using two different small hairpin RNAs (shRNAs). Both shRNAs efficiently decreased total and phosphorylated PAX2 protein levels in MCF-7 cells (Figure 5a), and completely prevented estradiol from decreasing ERBB2 expression (Figure 5b). They had no impact on estradiol-induced cellular proliferation (Figure 5c), and did not induce cleaved fragments of PARP, a marker of apoptosis (Figure 5d), or increase the number of cells with apoptotic nuclear morphology (Figure 5e). PAX2 knockdown therefore did not impact cellular proliferation and viability; however, it completely abrogated estradiol-induced decrease of cell invasion (Figure 5F). These results reveal for the first time a role for PAX2 in the regulation of cell invasion.

Finally, we determined if overexpression of PAX2 could successfully decrease the invasive ability of luminal cells. Transfection of MCF-7 cells with a plasmid vector containing PAX2 cDNA increased total levels of PAX2 protein (Figure 6a): the exogenous protein was phosphorylated in response to estradiol and ERBB2 protein

content was efficiently decreased (Figure 6a). Over-expression of PAX2 inhibited estradiol induced cellular proliferation (Figure 6b), but did not induce the cleavage of PARP (Figure 6c) or increase the number of cells with apoptotic nuclear morphology (Figure 6d). It enhanced, on the other hand, estradiol-induced decrease of ERBB2 protein content (Figure 6a) and cell invasion (Figure 6e), showing that specific delivery of PAX in luminal cells exposed to estradiol efficiently reduces their invasive ability.

Discussion

Multiple factors influence the metastatic outcome of a cancer, many of them extending beyond intrinsic tumour cell properties. Nonetheless, it is now recognized that as a group, luminal primary breast tumours have a distinct molecular profile and display weak invasive and metastatic behavior [2,3,27,28]. Identifying key molecules and mechanisms, which prevent luminal tumours cells from evolving towards an aggressive metastatic phenotype, should foster the development of new anti-metastatic strategies.

The presence of PAX2 in breast tumours has been described many years ago [14,16], but the role of the transcription factor in these tumours remained unknown until recently, when PAX2 was shown to dictate the response of luminal breast cancer cells to tamoxifen [17]. In the present study, we describe a new role for PAX2 in luminal breast cancer cells, as a negative regulator of cell invasiveness. Because the majority of breast cancer patients bear luminal tumours [29], these new informations have important clinical relevance. Further, we provide proof-of-concept for the efficiency of PAX2 overexpression to decrease cell invasion. We observed that PAX2 overexpression also prevented estradiol from inducing the proliferation of luminal breast cancer cells and therefore, apart from interfering with the metastatic progression of the disease, therapeutic overexpression of PAX2 could induce cytostatic effects in pre-existing primary and metastatic breast tumours. Available clinical data indeed suggests an inverse relationship between PAX2 activity and the proliferation of breast cancer cells *in vivo*: lower PAX2 immunoreactivity can be detected in the nucleus of cells from high grade breast tumours compared to low grade tumours [14].

Considering such a key role for PAX2 in the control of luminal breast cancer cell invasiveness, understanding the mechanisms regulating its activity is primordial. We show here that PAX2 protein is activated by estradiol, in breast cancer cells of the luminal subtype only, in agreement with clinical data showing preferential activation of PAX2 in tumours of the luminal subgroup *in vivo* [14,15]. ER α is required for estradiol to induce PAX2 activation; it is also required for estradiol to decrease ERBB2 expression and cellular invasion, in agreement with previous studies showing that antagonizing ER α increases the invasiveness of MCF-7 cells [30]. It is worth noting that in luminal breast cancer cells, exposure to estradiol has no impact on total PAX2 mRNA and protein levels; in addition, total levels of PAX2 protein are comparable in luminal versus non-luminal breast cancer cells *in vitro*, similar to clinical data showing the presence of PAX2 in luminal as well as non-luminal tumours *in vivo* [14,15]. Therefore, transcription would not be a major level of regulation for PAX2 in breast cancer cells, compared to post-translational modification of the protein. Finally, we have identified a first negative regulator of PAX2 activity in luminal breast cancer cells, IGF-1. The inhibition of anti-invasive factors such as PAX2 may contribute to the pro-invasive and pro-metastatic effects of IGF-1 in breast cancer cells [25].

Results from previous reports indirectly suggested that exposure to estradiol negatively regulates breast cancer cell invasion: overexpression of ER α in non-luminal breast cancer cells decrease their invasive ability [31] and conversely, exposure to anti-oestrogens such as tamoxifen can increase the invasive ability of ER α + breast cancer cells [32]. Indeed, although the main effect attributed to tamoxifen is growth inhibition, it has also been shown to induce an invasive phenotype in breast cancer cells, notably by inducing the expression of matrix metalloproteinases as described in cultivated MCF-7 cells [33]. The results from the present study now directly demonstrate that exposure to estradiol has an opposite effect to tamoxifen and inhibits the invasion of breast cancer cells, at least for those of the luminal subtype. It may appear contradictory that estradiol, which initially promotes the development of luminal (estrogen-responsive) breast tumours by increasing the proliferation of breast epithelial cells [34,35], would later repress the invasion and metastasis of established luminal

tumour cells. However, available clinical data supports this paradigm. It was reported, for example, that women using hormone replacement therapy (HRT) had an increased risk of developing breast cancer, but those who did develop a breast cancer presented with more localized tumours and had a more favorable prognosis than women who did not use HRT [32]. Also, in patients with ER α + breast tumours presenting with metastasis, administration of estradiol pills induced clinical benefits: most patients had longer progression free survival [36]. In the light of the present work, it is likely that PAX2 activation and downregulation of ERBB2 expression directly contributes to these beneficial effects of estradiol.

Conclusion

Identifying PAX2 as a natural barrier against invasion (and possibly, metastasis) in ER α + /luminal breast cancer cells, and showing that overexpression of PAX2, when it is followed by its activation, is sufficient to reduce cellular invasiveness of luminal breast cancer cells, is of clinical relevance considering that the majority of patients with breast cancer present with a luminal tumour and that metastasis is the main cause of death in breast cancer patients. It also has the potential to be extended to non-luminal tumours, even though estrogen signaling is disrupted in ER α -tumour cells. Indeed, the mechanisms underlying ER α downregulation in non-luminal breast cancer cells have already been scrutinized and several promising strategies to restore ER α expression are currently under evaluation (reviewed in [36,37]). Therefore, we can realistically envision future combination therapies, designed to re-express ER α and to overexpress PAX2 at the same time in non-luminal breast cancer cells, capable of efficiently interfering with progression of the disease towards metastasis.

Methods

Cell lines and reagents

Human breast carcinoma cell lines (ER α -positive MCF-7 and ZR-75-1 cells and ER α -negative MDA-MB-231 and HS578T cells) were generously provided by Dr Eric Asselin (University of Quebec in Trois-Rivières, QC, Canada), who had initially purchased the cell lines from ATCC. All cell lines were routinely maintained in RPMI-1640 medium containing 50 μ g/ml gentamycin, and supplemented with bovine growth serum (10% for MCF-7 cells and 5% for MDA-MB-231 and HS578T cells) or fetal bovine serum (10% for ZR-75-1 cells). All antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) except for HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ONT, Canada), ER α (Ab-16 from Neomarkers, Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA), PAX2 (sc-130387 from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and phospho-PAX2 (71-6000 from Invitrogen, Burlington, ONT, Canada) antibodies. Estradiol and recombinant human IGF-1 were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ONT, Canada) and ER α antagonist ICI 182780 was purchased from Cedarlane Laboratories (Burlington, ONT, Canada).

Cell treatments

Before treatments with estradiol, cells were progressively adapted to medium depleted of growth factors, steroid hormones, and estradiol-mimicking molecules such as phenol red. Specifically, cells were seeded in 6-well plates (1×10^6 cells per well for MCF-7 and HS578T cells, and 3×10^6 cells per well for ZR-75-1 and MDA-MB-231 cells) and allowed to adhere and proliferate in standard medium containing serum for 72 h. They were washed twice with PBS and incubated for 24 h in RPMI-1640 without phenol red containing 2% dextran-charcoal treated fetal bovine serum. Finally, cells were washed and incubated for 24 h in RPMI-1640 without phenol red or serum. Then, cells were treated with estradiol (10 nM or as indicated), or with vehicle (dimethylformamide), in RPMI-1640 without phenol red. When needed, they were pre-treated with 1 μ M ICI 282

780 or with vehicle (DMSO) for 1 h before estradiol treatment. In all cases, adherent and floating cells were collected at the end of the treatment.

Western blots analysis

Treated cells were disrupted in cold RIPA buffer containing protease inhibitors (Complete™ from Roche, Laval, Quebec, Canada), followed by three freeze-thaw cycles. Equal amounts of cell lysates were separated onto 10% polyacrylamide gels and then transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The membranes were probed with primary antibody overnight at 4°C and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-body for 45 min. Detection was performed using Super-Signal West Femto substrate (Pierce, Arlington Heights, IL, USA), as described by the manufacturer.

Immunofluorescence analysis

Cells were grown on glass coverslips before they were treated as described above. Treated cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, washed twice in phosphate buffered saline (PBS) and permeabilized for 10 min in citrate solution (0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100 in PBS) at room temperature. They were incubated at room temperature for 1 h with primary antibody (PAX2, #71-6000 from Invitrogen, diluted 1/20 in PBS), then for 30 min at room temperature and in the dark with secondary antibody (Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody, A-21206 from Invitrogen, diluted 1/200 in PBS). Cell nuclei were counterstained with 0.25 mg/mL Hoechst dye (Sigma) for 3 min, before coverslips were added onto cells. Stained cells were visualized under a fluorescence microscope.

RT-PCR analysis of PAX2 expression

Total RNA was isolated from treated MCF-7 cells using Trizol Reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) according to manufacturer's instructions. First strand cDNA

was synthesized from 0.4 µg RNA using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). Primers for PCR amplification of PAX2 were 5'-GTACTACGAGACCGGCAGCATC-3' (sense) and 5'-CGTTTCCTCTTCTCACCATTTGG-3' (antisense) and primers for amplification of GAPDH were 5'-gtcagtgggtggacctgacct-3' (sense) and 5'-tgagcttgacaaagtggctcg-3' (antisense). PCR reactions were conducted in a MJ Research Thermal cycler (model PTC-100), using the following parameters: 30 sec. at 94°C, 30 sec. at 58°C, and 1 min. at 72°C, for 35 cycles (PAX2) or 25 cycles (GAPDH). The reaction mixtures were size-separated on an agarose gel and visualized using SYBR-Safe™ (Invitrogen) staining upon ultraviolet transillumination.

Subcellular fractionation

NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) was used according to the manufacturer's instructions.

Matrigel invasion assay

The invasive properties of treated cells were measured using Matrigel-coated Transwell inserts (Costar, Corning, NY, USA). Briefly, inserts with 8-µm pore size were coated with 2 mg/ml Matrigel (VWR, Mississauga, ON, Canada), and treated cells were collected, washed, and resuspended in respective basal medium without serum or phenol red. The lower chambers were filled with 600 µl of respective culture medium, and 2×10^5 cells were added to the upper chamber inserts. The plates were incubated for 72 h at 37°C. After this incubation period, invasive cells had crossed the porous barrier and reached the lower compartment (as previously reported by others [38,39]). Medium filling the lower chamber was collected, and invasive cells were recovered by centrifugation (1 min at $6,000 \times g$) before they were resuspended in 30 µl of PBS and counted using a hemocytometer. A percentage of cell invasion was calculated from the ratio of total number of cells recovered from the lower compartment to the total number of cells initially loaded in the upper compartment. To obtain the pictures presented in A, Matrigel was removed/ wiped away from the filters after 24 h incubation, and cells

having reached the filters at this time point were fixed with cold methanol and stained with Hoechst 33258 dye (Sigma). Pictures were taken under a fluorescence microscope (magnification: 100×).

Transfection with vectors encoding PAX2 shRNAs or cDNA

MCF-7 cells were seeded in 6-well plates at the required density to reach approximately 60% confluency after 24 h. The day of transfection, PAX2 shRNA constructs or PAX2 cDNA constructs were added to cells using a ratio of 3.6 μ L Fugene:1.2 μ g DNA/well. Transfection reagent alone was also separately added as a control treatment, using the same dilution as described above. After 8 h-transfection, medium was replaced and plates were incubated for 40 additional hours (total: 48 h) at 37°C before cells were used for subsequent treatment with estradiol. PAX2 shRNA constructs were: 5'- GAG-GAAACGTGATGAAGAT-3' for PAX2 shRNA #600; 5'-CCCAGCAGCAGCTGGAA GC-3' for PAX2 shRNA #701; 5'-GCAATGACGCAGGTGACCA-3' for control (Ctl) shRNA (scrambled sequence from PAX2 shRNA #600). All shRNAs were inserted into pSilencer 1.0-U6 vector; the constructs were a kind gift from Dr Yoshiko Takahashi, Nara Institute of Science and Technology, Nara, JAPAN. The PAX2 cDNA constructs were: human PAX2 cDNA in pcDNA3.1 vector, or empty vector as a control. The constructs were a kind gift from Dr Paul Goodyer, McGill University, Montréal, Qc, CANADA.

MTT proliferation assay

Cells were transfected with PAX2 cDNA or shRNA constructs as described above, with the exception that the incubation following 8-h transfection period was 24 h instead of 48 h. They were then trypsinized, counted and plated in 96-well plates at a density of 1×10^4 cells per well, and incubated for an additional 24 h-period at 37°C, after which they reached 80% confluence. Estradiol was added to selected wells at the concentration of 10 nM in 100 μ l culture medium (total time between initial transfection and estradiol treatment: 48 h), and plates were incubated for indicated times at 37°C. MTT reagent

(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl), Sigma) was added to the wells (10 μ l of a 0.5% solution in PBS) 3.5 h before the end of the incubation period, and conversion of yellow tetrazolium salt to blue thiazol crystals by metabolically active cells was stopped by adding 100 μ l of a 10% sodium dodecyl sulfate, 0.1% HCl solution to each well. Plates were incubated overnight at 37°C to allow complete solubilization of thiazol crystals, and intensity of blue emission in each well was measured using FluoStar multiwell plate reader (BMG Laboratories, Durham, NC). Percentage of proliferating cells was calculated as the ratio of optical densities of estradiol-treated to control-treated cells.

Determination of apoptosis using Hoechst nuclear staining

Treated cells were collected, washed twice in PBS, resuspended at an approximate density of 2×10^5 cells/ml in PBS containing 1 μ g/ml Hoechst 33258 (Sigma) and 2% formalin and incubated for 24 h at 4 °C, before blind cell counts of apoptotic cells was carried out under a fluorescence microscope. At least 200 cells were counted for each sample, and a percentage of apoptotic cells was calculated as the ratio of apoptotic cells (with characteristic apoptotic morphology such as nuclear shrinkage and condensation) to total cell count.

Statistical analyses

Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 3.03; GraphPad, San Diego, CA, USA). Differences between cell groups were determined by the Tukey's test. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$.

List of Abbreviations

231: MDA-MB-231; ER: estrogen receptor; ER α : estrogen receptor alpha; ERBB2: erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2; GPR30: G protein-coupled receptor 30; IGF-1: insulin-like growth factor 1; MAPK: mitogen-activated protein

kinase; PARP: poly(ADP-ribose) polymerase; PAX2: paired box 2; PI3-K: phosphatidyl inositol 3-kinase.

Acknowledgements

The authors wish to thank Carine N'Doti-Nembe and Laurie-Anne Déry for their contribution to the realization of experiments during their undergraduate training, Dr Paul Goodyer (McGill University, Montreal, Qc, CANADA) for PAX2 cDNA constructs, Dr Yoshiko Takahashi (Nara Institute of Science and Technology, Nara, JAPAN) for PAX2 shRNA constructs, Dr Carlos Reyes-Moreno for critical evaluation of the manuscript, and Canada Foundation for Innovation and University of Quebec in Trois-Rivières for their financial support. C. Van Themsche is a member of the Centre de Recherche BioMed.

Authors' contributions

DB and CL carried out the western blot analyses; CVT conducted the invasion, MTT and Hoescht dye staining experiments. DB participated in the statistical analyses and prepared the first draft of the manuscript. CVT conceived the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 23 August 2011 Accepted: 14 December 2011

Published: 14 December 2011

References

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, et al: **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, **406**:747-752.
2. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, et al: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:10869-10874.
3. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, et al: **Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:8418-8423.
4. Moody SE, Sarkisian CJ, Hahn KT, Gunther EJ, Pickup S, Dugan KD, Innocent N, Cardiff RD, Schnall MD, Chodosh LA: **Conditional activation of Neu in the mammary epithelium of transgenic mice results in reversible pulmonary metastasis.** *Cancer Cell* 2002, **2**:451-461.
5. Palmieri D, Bronder JL, Herring JM, Yoneda T, Weil RJ, Stark AM, Kurek R, Vega-Valle E, Feigenbaum L, Halverson D, et al: **Her-2 overexpression increases the metastatic outgrowth of breast cancer cells in the brain.** *Cancer Res* 2007, **67**:4190-4198.
6. Tan M, Yao J, Yu D: **Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities.** *Cancer Res* 1997, **57**:1199-1205.
7. Ueda Y, Wang S, Dumont N, Yi JY, Koh Y, Arteaga CL: **Overexpression of HER2 (erbB2) in human breast epithelial cells unmasks transforming growth factor beta-induced cell motility.** *J Biol Chem* 2004, **279**:24505-24513.
8. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, et al: **A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes.** *Cancer Cell* 2006, **10**:515-527.
9. Platet N, Prevostel C, Derocq D, Joubert D, Rochefort H, Garcia M: **Breast cancer cell invasiveness: correlation with protein kinase C activity and differential regulation by phorbol ester in estrogen receptor-positive and -negative cells.** *Int J Cancer* 1998, **75**:750-756.

10. Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA: **PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer.** *Biochem Pharmacol* 2007,**73**:1-14.
11. Eccles MR, He S, Legge M, Kumar R, Fox J, Zhou C, French M, Tsai RW: **PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development.** *Int J Dev Biol* 2002, **46**:535-544.
12. Silberstein GB, Van Horn K, Hrabeta-Robinson E, Compton J: **Estrogen-triggered delays in mammary gland gene expression during the estrous cycle: evidence for a novel timing system.** *J Endocrinol* 2006, **190**:225-239.
13. Rothenpieler UW, Dressler GR: **Pax-2 is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development.** *Development* 1993,**119**:711-720.
14. Silberstein GB, Dressler GR, Van Horn K: **Expression of the PAX2 oncogene in human breast cancer and its role in progesterone-dependent mammary growth.** *Oncogene* 2002, **21**:1009-1016.
15. Liu Q, Li JG, Zheng XY, Jin F, Dong HT: **Expression of CD133, PAX2, ESA, and GPR30 in invasive ductal breast carcinomas.** *Chin Med J (Engl)* 2009, **122**:2763-2769.
16. Muratovska A, Zhou C, He S, Goodyer P, Eccles MR: **Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival.** *Oncogene* 2003, **22**:7989-7997.
17. Hurtado A, Holmes KA, Geistlinger TR, Hutcheson IR, Nicholson RI, Brown M, Jiang J, Howat WJ, Ali S, Carroll JS: **Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen.** *Nature* 2008, **456**:663-666.
18. Cai Y, Lechner MS, Nihalani D, Prindle MJ, Holzman LB, Dressler GR: **Phosphorylation of Pax2 by the c-Jun N-terminal kinase and enhanced Pax2-dependent transcription activation.** *J Biol Chem* 2002, **277**:1217-1222, Epub 2001 Nov 1217.
19. D'Souza B, Taylor-Papadimitriou J: **Overexpression of ERBB2 in human mammary epithelial cells signals inhibition of transcription of the E-cadherin gene.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**:7202-7206.
20. Van Themsche C, Parent S, Leblanc V, Descoteaux C, Simard AM, Berube G, Asselin E: **VP-128, a novel estradiol-platinum(II) hybrid with selective antitumour activity towards hormone-dependent breast cancer cells in vivo.** *Endocr Relat Cancer* 2009, **6**:6.

21. Paredes J, Stove C, Stove V, Milanezi F, Van Marck V, Derycke L, Mareel M, Bracke M, Schmitt F: **P-cadherin is up-regulated by the antiestrogen ICI 182,780 and promotes invasion of human breast cancer cells.** *Cancer Res* 2004, **64**:8309-8317.
22. Rhodes LV, Short SP, Neel NF, Salvo VA, Zhu Y, Elliott S, Wei Y, Yu D, Sun M, Muir SE, et al: **Cytokine receptor CXCR4 mediates estrogen-independent tumorigenesis, metastasis, and resistance to endocrine therapy in human breast cancer.** *Cancer* 2010, **71**:603-613.
23. Sui M, Huang Y, Park BH, Davidson NE, Fan W: **Estrogen receptor alpha mediates breast cancer cell resistance to paclitaxel through inhibition of apoptotic cell death.** *Cancer Res* 2007, **67**:5337-5344.
24. Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M: **Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin).** *J Natl Cancer Inst* 2001, **93**:1852-1857.
25. Larsen SS, Egeblad M, Jaattela M, Lykkesfeldt AE: **Acquired antiestrogen resistance in MCF-7 human breast cancer sublines is not accomplished by altered expression of receptors in the ErbB-family.** *Breast Cancer Res Treat* 1999, **58**:41-56.
26. Ellis MJ, Gao F, Dehdashti F, Jeffe DB, Marcom PK, Carey LA, Dickler MN, Silverman P, Fleming GF, Kommareddy A, et al: **Lower-dose vs high-dose oral estradiol therapy of hormone receptor-positive, aromatase inhibitor-resistant advanced breast cancer: a phase 2 randomized study.** *Jama* 2009, **302**:774-780.
27. Solomayer EF, Diel IJ, Meyberg GC, Gollan C, Bastert G: **Metastatic breast cancer: clinical course, prognosis and therapy related to the first site of metastasis.** *Breast Cancer Res Treat* 2000, **59**:271-278.
28. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, Nordgren H, Farmer P, Praz V, Haibe-Kains B, et al: **Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis.** *J Natl Cancer Inst* 2006, **98**:262-272.
29. Ali S, Coombes RC: **Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:101-112.
30. Santen RJ, Fan P, Zhang Z, Bao Y, Song RX, Yue W: **Estrogen signals via an extra-nuclear pathway involving IGF-1R and EGFR in tamoxifen-sensitive and -resistant breast cancer cells.** *Steroids* 2009, **74**:586-594, Epub 2008 Dec 2007.

31. Platet N, Cunat S, Chalbos D, Rochefort H, Garcia M: **Unliganded and liganded estrogen receptors protect against cancer invasion via different mechanisms.** *Mol Endocrinol* 2000, **14**:999-1009.
32. Borley AC, Hiscox S, Gee J, Smith C, Shaw V, Barrett-Lee P, Nicholson RI: **Anti-oestrogens but not oestrogen deprivation promote cellular invasion in intercellular adhesion-deficient breast cancer cells.** *Breast Cancer Res* 2008, **10**:R103, Epub 2008 Dec 2004.
33. Castoria G, Barone MV, Di Domenico M, Bilancio A, Ametrano D, Migliaccio A, Auricchio F: **Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis.** *Embo J* 1999, **18**:2500-2510.
34. Marsden J, Sacks NP: **Hormone replacement therapy and breast cancer.** *Endocr relat cancer* 1996, **3**:81-97.
35. Collabor: **Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer.** *Lancet* 1997, **350**:1047-1059.
36. Saxena NK, Sharma D: **Epigenetic Reactivation of Estrogen Receptor: Promising Tools for Restoring Response to Endocrine Therapy.** *Mol Cell Pharmacol* 2010, **2**:191-202.
37. Brinkman JA, El-Ashry D: **ER re-expression and re-sensitization to endocrine therapies in ER-negative breast cancers.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009, **14**:67-78.
38. Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C: **Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway.** *J Biol Chem* 2000, **275**:18447-18453.
39. Miller TW, Perez-Torres M, Narasanna A, Guix M, Stal O, Perez-Tenorio G, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy BT, Mills GB, Kennedy JP, et al: **Loss of Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10 engages ErbB3 and insulin-like growth factor-I receptor signaling to promote antiestrogen resistance in breast cancer.** *Cancer Res* 2009, **69**:4192-4201, Epub 2009 May 4112.

Figure legends

Figure 1. PAX2 is activated in breast cancer cell lines of the luminal subtype selectively. Breast cancer cell lines of the luminal subtype (MCF-7 and ZR75-1) and the basal subtype (MDA-MB-231 (231) and HS578T) were cultivated in their standard growth medium, containing growth factors, steroid hormones and estradiol-mimicking molecules such as phenol red. A) Total levels of PAX2 protein, the extent of phosphorylation of PAX2 on ser393 residue, and ERBB2 protein content were determined using western blot. GAPDH was used as a control to normalize for protein content. Results are representative of three independent experiments. B) Densitometric analysis of the results presented in A. Values are mean \pm SD of three independent experiments. Different subscript letters indicate statistically significant difference.

Figure 2. PAX2 is activated by estradiol in breast cancer cells of the luminal subtype selectively. Breast cancer cells were cultivated in a steroid- and serum-depleted growth medium, before they were treated with estradiol. A) MCF-7 cells were treated for the indicated time periods with 10 nM estradiol and total levels of PAX2 protein, the extent of phosphorylation of PAX2 on ser393 residue, and ERBB2 protein levels were determined using western blot. GAPDH was used as a control to normalize for protein content. B) MCF-7 cells were treated with 10 nM estradiol for 1h and subcellular localization of PAX2 was determined using immunofluorescence. Hoescht dye was used to visualize cell nuclei. Magnification: 400X. C) MCF-7 cells were treated with 10 nM estradiol for 1 h and subcellular fractionation was performed, followed by western blot analysis of PAX2 protein. ER α was used as a positive control for estradiol-induced nuclear import, PARP was used as a marker of nuclear fraction (N) purity, and GAPDH was used as a marker of cytosolic fraction (C) purity. D) Non-luminal breast cancer cell lines MDA-MB-231 (231) and HS578T were treated with the indicated doses of estradiol. Following 30 min-treatment with estradiol, the extent of phosphorylation of PAX2 on ser393 residue and total levels of PAX2 protein were determined, whereas following 24 h-treatment with estradiol, total levels of ERBB2 protein were determined, using western blot. GAPDH was used as a control to normalize for protein content. All results are representative of three independent experiments.

Figure 3. Estradiol negatively regulates PAX2 activity and invasion in an ER α -dependent manner in MCF-7 cells. A) MCF-7 cells were cultivated in a steroid- and serum-depleted growth medium and treated with 10 nM estradiol for 24 h before they were subjected to Matrigel invasion assay. Results are mean \pm -SD of three independent experiments. *statistically significant difference. B-D) MCF-7 cells were cultivated in a steroid- and serum-depleted growth medium and pretreated with ER α antagonist ICI 182780 (1 μ M) for 1h before they were treated with 10 nM estradiol. (B) Following 24 h treatment with estradiol, total protein content of ERBB2, and of ER α as a marker of ICI 182780 efficiency, were determined using western blot. GAPDH was used as a control to normalize for protein content. Results are representative of three independent experiments. (C) Following 30 min-treatment with estradiol, the extent of phosphorylation of PAX2 on ser393 residue and total levels of PAX2 protein were determined, using western blot. GAPDH was used as a control to normalize for protein content. Results are representative of three independent experiments. (D) Following 24 h treatment with estradiol, cell invasion was determined using Matrigel invasion assay. Results are mean \pm -SD of three independent experiments. Different subscript letters indicate statistically significant difference. E) Based on data presented in C, the ratio of the invasion of estradiol-treated to vehicle-treated cells was compared between cells pretreated with ICI 182780 and vehicle pre-treated cells. *statistically significant difference.

Figure 4. IGF-1 antagonizes estradiol-induced activation of PAX2 in luminal breast cancer cells. MCF-7 cells were cultivated in a steroid- and serum-depleted growth medium and treated with 10 nM estradiol and/or 30 ng/mL IGF-1, as indicated. A) Following 30 min-treatment with estradiol and/or IGF-1, the extent of phosphorylation of PAX2 on ser393 residue and total levels of PAX2 protein were determined using western blot. GAPDH was used as a control to normalize for protein content. Results are representative of three independent experiments. B) Following 24 h-treatment with estradiol and/or IGF-1, total levels of ERBB2 protein were determined, using western blot. GAPDH was used as a control to normalize for protein content. Results are representative of three independent experiments. C) Following

24 h-treatment with estradiol and/or IGF-1, cells were subjected to Matrigel invasion assay. Values are mean \pm SD of three independent experiments. Different subscript letters indicate statistically significant difference.

Figure 5. Knockdown of PAX2 abrogates estradiol-induced decrease of cell invasion in luminal breast cancer cells. MCF-7 cells were cultivated in a steroid- and serum depleted growth medium, transfected with PAX2 shRNAs, control shRNA (Ctl: scrambled sequence from PAX2 shRNA #600) or transfection reagent only (None) for 24 h and then treated with 10 nM estradiol. A) Following 30 min-treatment with estradiol, the extent of phosphorylation of PAX2 on ser393 residue and total levels of PAX2 protein were determined using western blot. GAPDH was used as a control to normalize for protein content. Results are representative of three independent experiments. B) following 24 h-treatment with estradiol, total levels of ERBB2 protein were determined, using western blot. GAPDH was used as a control to normalize for protein content. Results are representative of three independent experiments. C) Following treatment with estradiol for the indicated times, cell proliferation was determined, using MTT assay. Results are mean \pm SD of four independent experiments. Different subscript letters indicate statistically significant difference. D) Following treatment with estradiol for the indicated times, the presence of cleaved fragments of PARP was assessed using western blot. Positive control for PARP cleavage was MCF-7 cells treated with 10 μ M cisplatin for 24 h. Results are representative of three independent experiments. E) Following 24 h-treatment with estradiol, cell nuclei were stained with Hoechst dye and number of apoptotic cells was determined under a fluorescent microscope. Results are mean \pm SD of three independent experiments. F) Following 24 h-treatment with estradiol, cells were subjected to Matrigel invasion assay. Values are mean \pm SD of three independent experiments. Different subscript letters indicate statistically significant difference.

Figure 6. Overexpression of PAX2 enhances estradiol-induced decrease of cell invasion in luminal breast cancer cells. MCF-7 cells were cultivated in a steroid- and serum-depleted growth medium, transfected with PAX2 cDNA or empty vector and then treated with 10 nM estradiol. A) Following 30 min-treatment with estradiol, the extent of phosphorylation of PAX2 on ser393 residue and total levels of PAX2 protein were determined (se: short exposition time, to ensure comparable levels of exogenous PAX2 protein between PAX2-transfected cells treated with estradiol or not; le: long exposure time, to detect endogenous PAX2 protein in empty vector-transfected cells), whereas following 24 h-treatment with estradiol, total levels of ERBB2 protein were determined, using western blot. GAPDH was used as a control to normalize for protein content. Results are representative of three independent experiments. B) Following treatment with estradiol for the indicated times, cell proliferation was determined, using MTT assay. Results are mean \pm SD of four independent experiments. *statistically significant difference. C) Following treatment with estradiol for the indicated times, the presence of cleaved fragments of PARP was assessed using western blot. Positive control for PARP cleavage was MCF-7 cells treated with 10 μ M cisplatin for 24 h. Results are representative of three independent experiments. D) Following 24 h-treatment with estradiol, cell nuclei were stained with Hoechst dye and number of apoptotic cells was determined under a fluorescent microscope. Results are mean \pm SD of three independent experiments. E) Following 24 h-treatment with estradiol, cells were subjected to Matrigel invasion assay. Values are mean \pm SD of three independent experiments. *statistically significant difference.

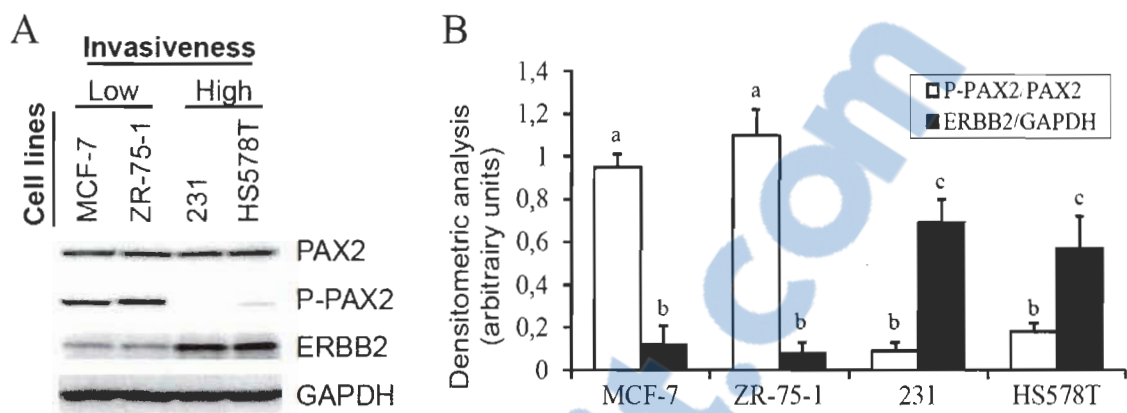


Figure 1

Beauchemin et al. Figure 1

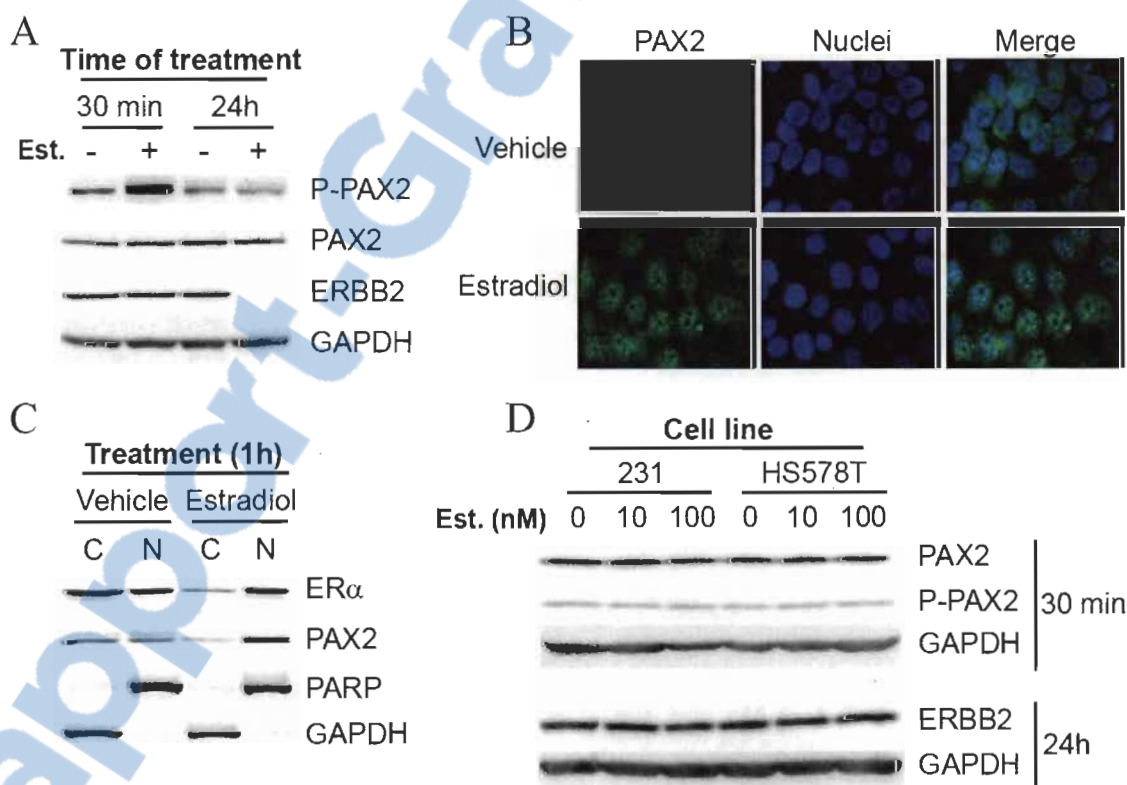


Figure 2

Beauchemin et al. Figure 2

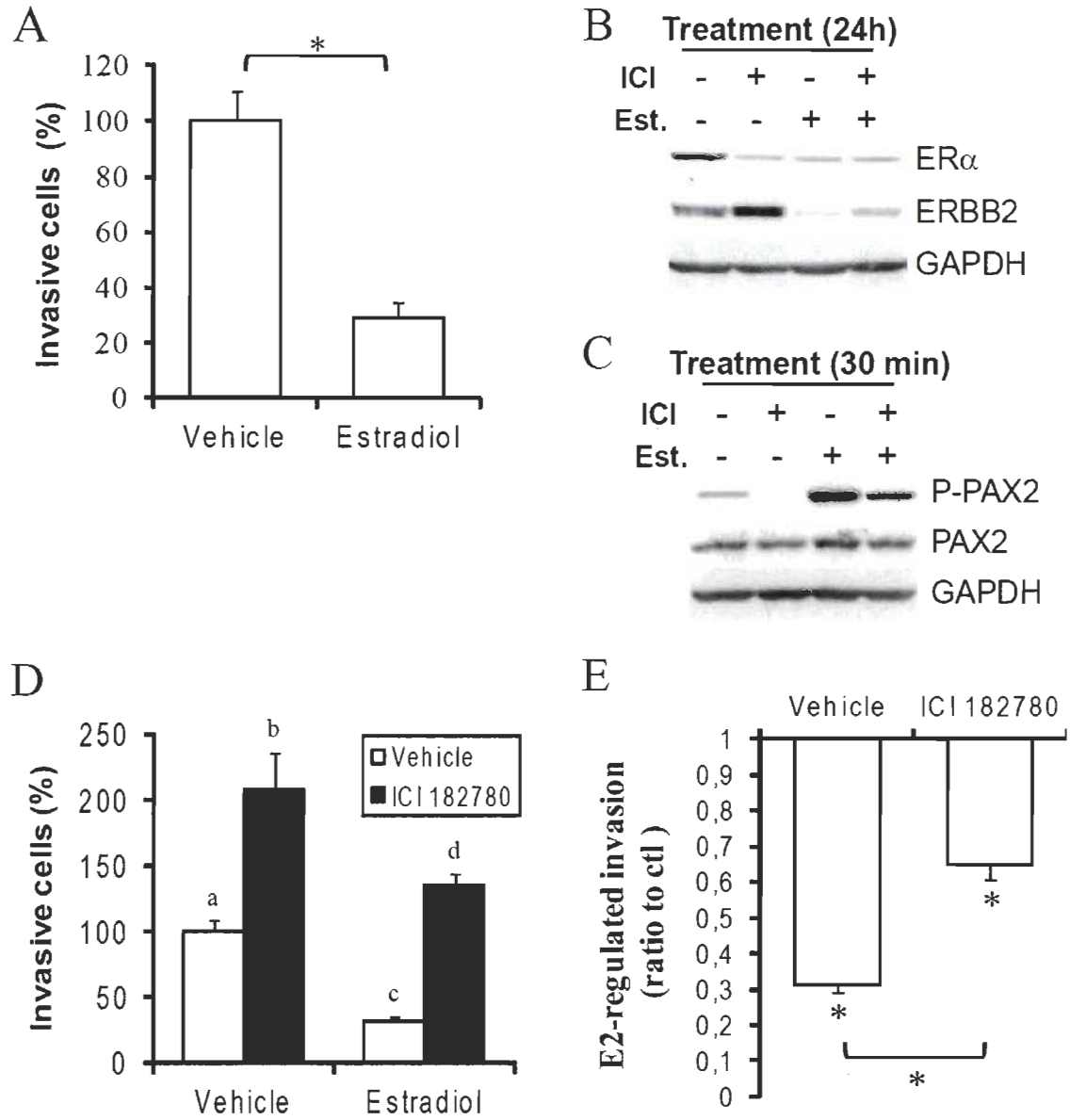


Figure 3

Beauchemin et al. Figure 3

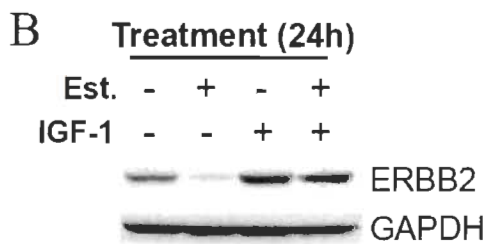
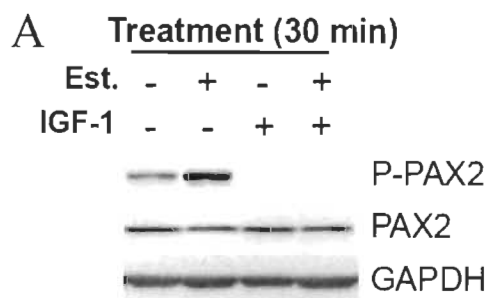
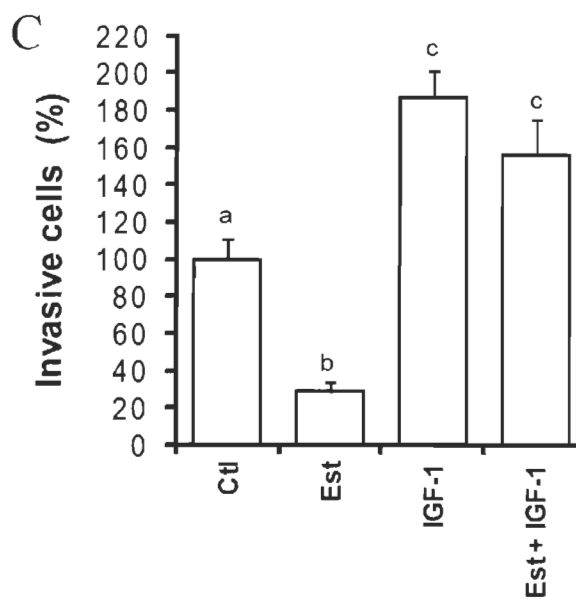


Figure 4



Beauchemin et al. Figure 4

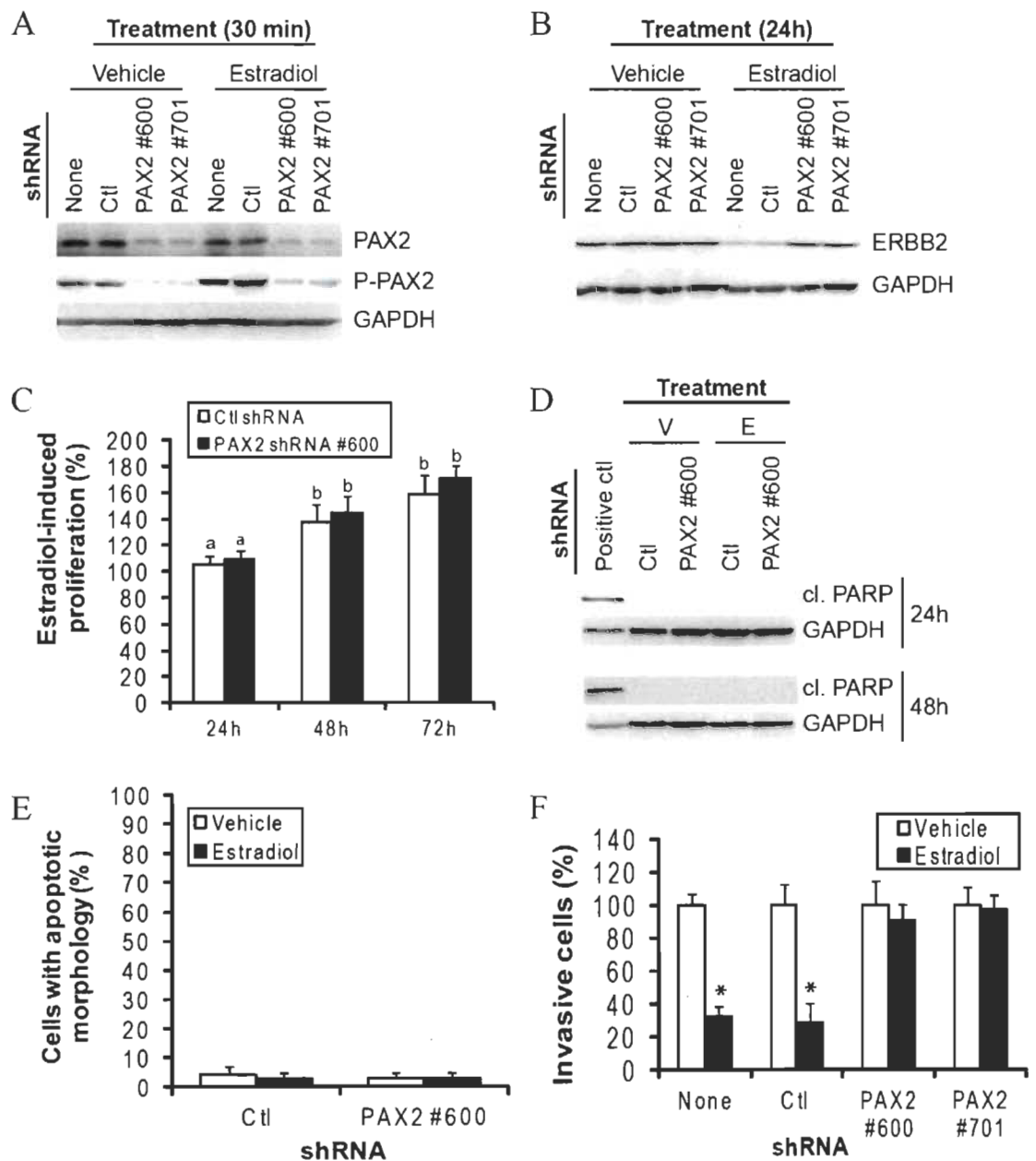


Figure 5

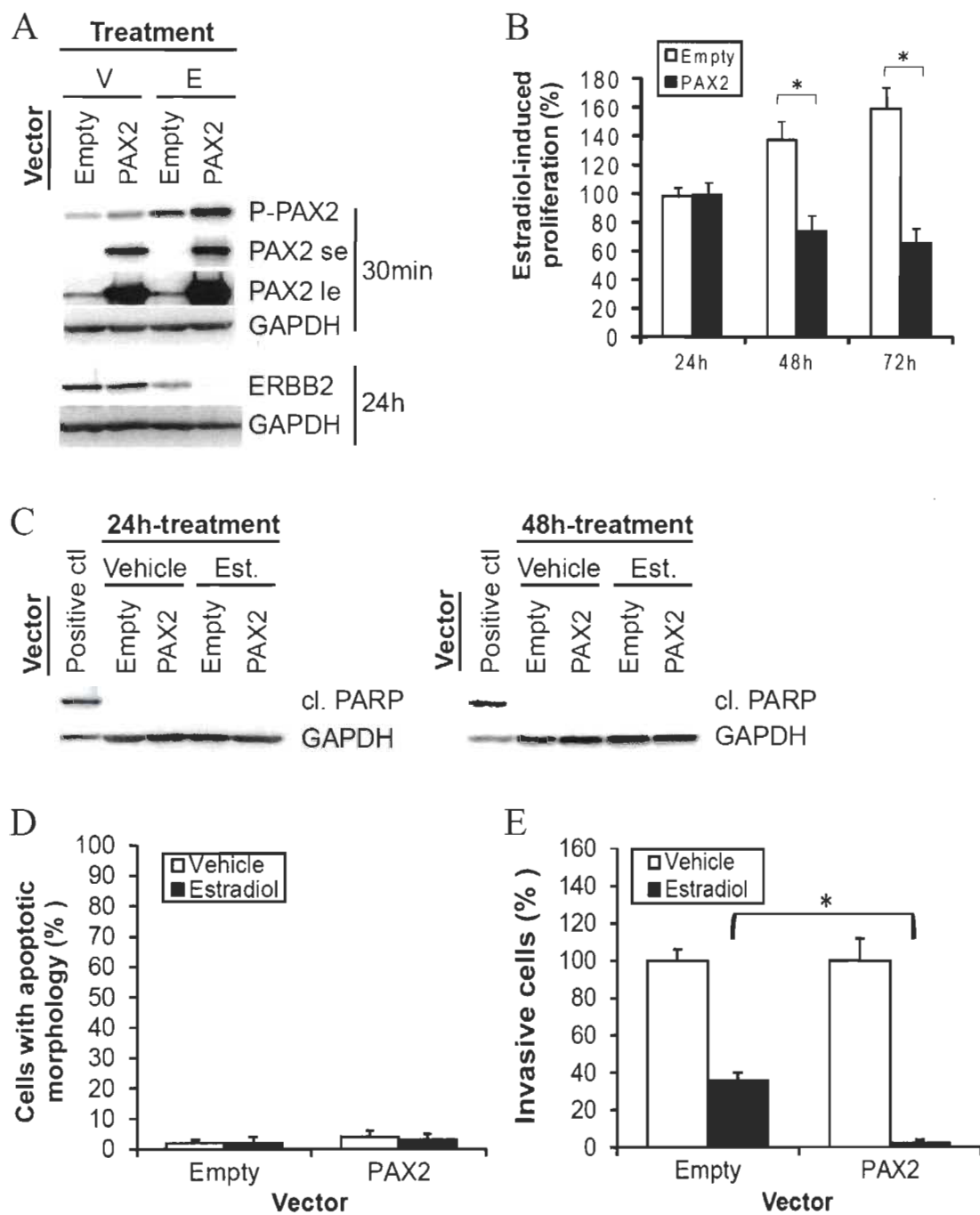


Figure 6

CHAPITRE III

RÉGULATION DE PAX2 PAR L'EGF ET L'HYPOXIE DANS LES CELLULES DU CANCER DU SEIN LUMINALES

3.1 L'influence de l'exposition à l'EGF sur l'expression et l'activité de PAX2 dans les cellules cancéreuses luminales

Nous avons d'abord vérifié si comme l'estradiol, l'EGF pouvait rapidement moduler l'état d'activation de PAX2, en mesurant le niveau de phosphorylation de PAX2 sur sérine 393 après de courtes expositions des cellules MCF-7 à l'EGF. Les résultats présentés à la figure 3.1 montrent que la phosphorylation de PAX2 est demeurée inchangée lorsque normalisée sur la quantité totale de la protéine PAX2 (Figure 3.1A), ce qui indique que l'EGF n'affecte pas directement la phosphorylation/activation de PAX2 dans ces cellules. Par ailleurs, nous avons observé que la quantité totale de la protéine PAX2, lorsque normalisée sur un gène de référence tel que la β -tubuline, diminuait significativement en réponse à un court traitement de 30 minutes d'EGF (Figure 3.1B).

Par la suite, nous avons investigué l'impact d'une plus longue exposition à l'estradiol sur la quantité de PAX2 et son activité dans les cellules MCF-7. Nos résultats montrent qu'une exposition de 24h à l'EGF augmente significativement la quantité totale de la protéine PAX2 dans ces cellules (Figure 3.2A); de plus, la quantité totale d'ERBB2, dont PAX2 réprime l'expression dans les MCF-7, diminue significativement dans ces conditions, ce qui suggère fortement que l'augmentation de la quantité totale de PAX2 est accompagnée d'une augmentation de son activité.

Afin d'identifier quelle(s) voie(s) de signalisation activée(s) par l'EGF étaient impliquées dans la régulation à la hausse de la quantité de PAX2 dans les cellules MCF-7, nous avons d'abord investigué le niveau d'activation des principales voies

intracellulaires en réponse à un court traitement avec l'EGF dans ces cellules. Nos résultats montrent que la phosphorylation de ERK, lorsque normalisée sur la quantité totale de protéine ERK dans la cellule, est significativement augmentée dès cinq minutes de traitement avec l'EGF (Figure 3.3A), ce qui indique que la voie de ERK est rapidement activée par l'EGF dans nos conditions expérimentales. À l'inverse, l'exposition à l'EGF ne modifie pas significativement la phosphorylation de JNK (Figure 3.3B) ou d'AKT (Figure 3.3C), ce qui indique que ces deux voies ne sont pas directement activées par l'EGF dans notre modèle de travail. Enfin, nous avons effectué une expérience préliminaire où l'impact de l'EGF sur l'activation de la voie de la PKA a été mesuré : lors de cette tentative unique, la phosphorylation de CREB, un marqueur de cette voie de signalisation, semblait diminuée lorsque normalisée sur le gène de référence β -tubuline (Figure 3.3D). Bien entendu cette expérience devra être répétée et la normalisation effectuée sur la quantité totale de CREB avant qu'une conclusion puisse être tirée. Collectivement, ces résultats indiquent que dans les cellules luminales MCF-7, une courte exposition à l'EGF est suffisante pour activer la voie de ERK, mais pas celles de JNK et d'AKT. Ainsi, la voie de ERK est la meilleure candidate pour entreprendre une future investigation des voies de signalisation médiant l'effet de l'EGF dans notre modèle expérimental.

3.2 La régulation de PAX2 dans des conditions qui miment l'hypoxie

Nous avons également étudié la régulation de l'expression de PAX2 dans des conditions mimant l'hypoxie c'est-à-dire, après traitement des cellules avec un agent capable d'induire des conditions intracellulaires mimant l'hypoxie, le chlorure de cobalt (CoCl_2). Ce dernier induit l'accumulation de HIF-1 α caractéristique de l'hypoxie, selon un modèle déjà bien établi¹⁷¹. Dans les conditions normoxiques, HIF-1 α est ubiquitiné et dégradé¹⁷². Par contre, lorsque qu'il y a présence de stabilisateur de HIF-1 α comme ROS (stress oxydatif par des facteurs exogènes habituellement UV), HIF-1 α est stabilisé et s'accumule, ce qui créer un environnement pauvre en oxygène. D'abord, une dose-réponse nous a permis de déterminer que la concentration suffisante de CoCl_2 pour induire une accumulation détectable de HIF-1 α était de 100 μM (Figure 3.4). Nous

avons observé que la dose de 300 μM induisait une accumulation de HIF-1 α encore supérieure à celle obtenue à la dose de 100 μM (Figure 3.4). Toutefois, à cette concentration le CoCl_2 induisait une perte de la morphologie et de l'adhésion cellulaire dans les puits de culture et c'est donc la dose de 100 μM qui a été choisie pour le reste de notre travail.

Ensuite, nous avons mesuré l'impact de cette condition hypoxique sur l'expression de PAX2 et son activité dans les cellules cancéreuses MCF-7. Les résultats présentés à la figure 3.5 montrent qu'en réponse à un traitement de 24h avec du CoCl_2 induisant efficacement l'accumulation de HIF-1 α (Figure 3.5A), la quantité totale de la protéine PAX2 a diminué significativement (Figure 3.5A et B) et celle de ERBB2, dont elle régule négativement l'expression, a augmenté significativement (Figure 3.5A et C). Ces résultats indiquent que des variations dans la signalisation intracellulaire mimant celles associées à l'induction de l'hypoxie modulent la quantité de PAX2 ainsi que son activité dans les cellules MCF-7 : ceci suggère fortement que l'induction de l'hypoxie régule l'expression de PAX2 dans les cellules du cancer du sein luminales, mais de façon à réduire son activité et non l'augmenter. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle PAX2 jouerait dans les cellules du cancer du sein luminales un rôle pro-tumorigénique ou pro-métastatique est très peu probable.

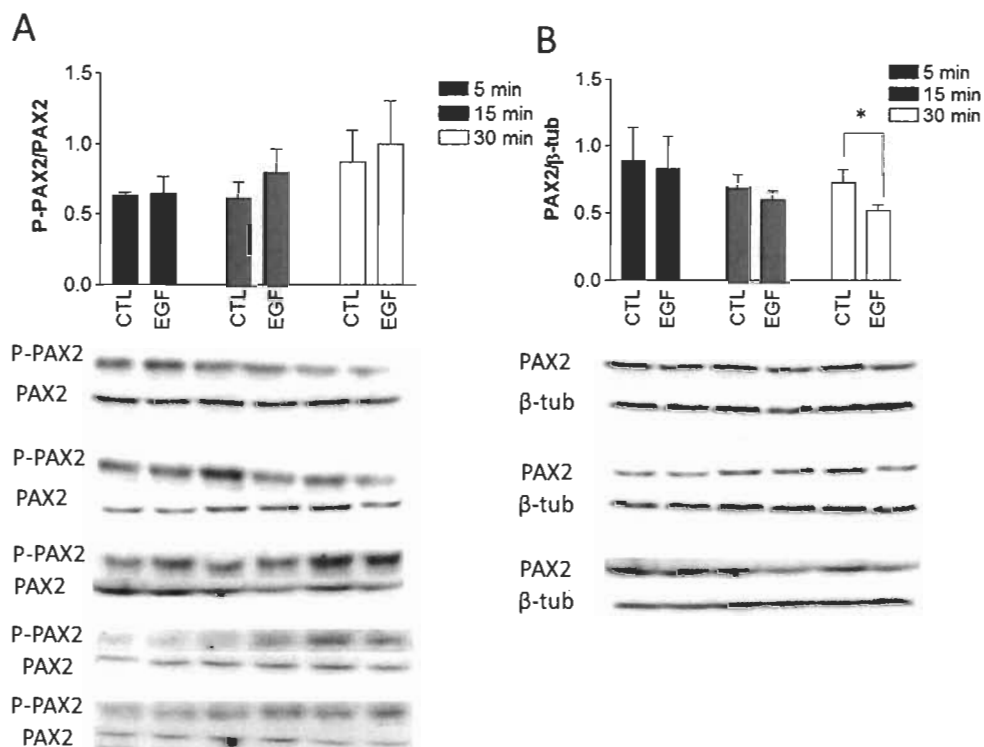


Figure 3.1 PAX2 n'est pas activée dans les cellules du cancer du sein MCF-7 en réponse à un court traitement avec l'EGF.

Les cellules du cancer du sein luminales MCF-7 étaient d'abord maintenues dans du milieu contenant du rouge de phénol (ce dernier entraîne des effets oestrogéniques, car il lie le récepteur alpha à l'oestrogène et l'active^{173,174}) ainsi que du sérum avec ses multiples facteurs de croissance. Avant qu'elles ne soient traitées avec le facteur de croissance EGF (50 ng/ml), ce milieu de culture a été remplacé par un autre milieu, sans rouge de phénol ni sérum, pendant 48h. Enfin, de l'EGF a été ajouté au milieu pour les durées indiquées (5, 15 ou 30 min). Des tests d'immunobuvardage de type Western ont été effectués avec un anticorps reconnaissant spécifiquement PAX2, un autre reconnaissant seulement la forme de la protéine qui est phosphorylée sur sérine-393 (la forme active de PAX2) ou encore, un dernier reconnaissant la protéine β-tubuline (β-tub) pour fin de contrôle de chargement. A) La phosphorylation de PAX2 sur ser393 a été mesurée et normalisée sur la protéine totale. Les résultats sont une moyenne plus écart-type de cinq expériences indépendantes. B) Les concentrations totales de la protéine PAX2 ont été mesurées et la β-tubuline a été utilisée comme contrôle pour normaliser la teneur en protéines. Les résultats sont une moyenne plus écart-type de trois expériences indépendantes.

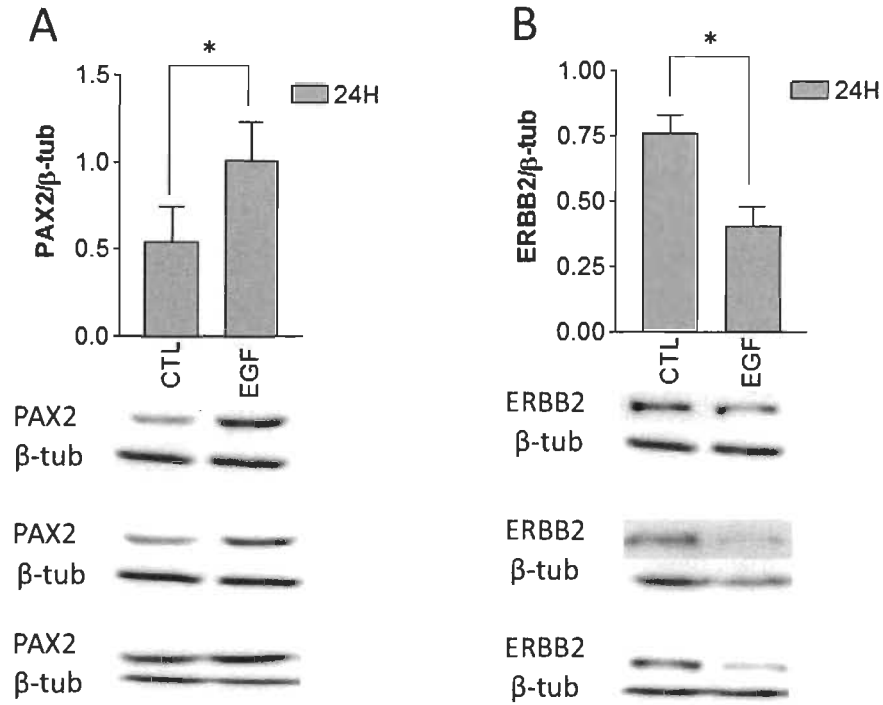


Figure 3.2 Un traitement de plus longue durée avec l'EGF augmente la quantité totale de la protéine PAX2 et diminue l'expression du gène que PAX2 réprime.

Les cellules MCF-7 ont été préparées puis traitées avec l'EGF de la même manière qu'en 3.1, puis traitées avec l'EGF (50 ng/ml) pour une plus longue période (24 h). Des tests d'immunobuvardage de type Western ont été effectués. A) La quantité de la protéine PAX2 a été mesurée et la β-tubuline a été utilisée comme contrôle pour normaliser la teneur en protéines. B) La quantité de la protéine ERBB2 (dont l'expression est réprimée par PAX2 dans ces cellules) a été mesurée et la β-tubuline a été utilisée comme contrôle pour normaliser la teneur en protéines. Les résultats sont une moyenne plus écart-type de trois expériences indépendantes.

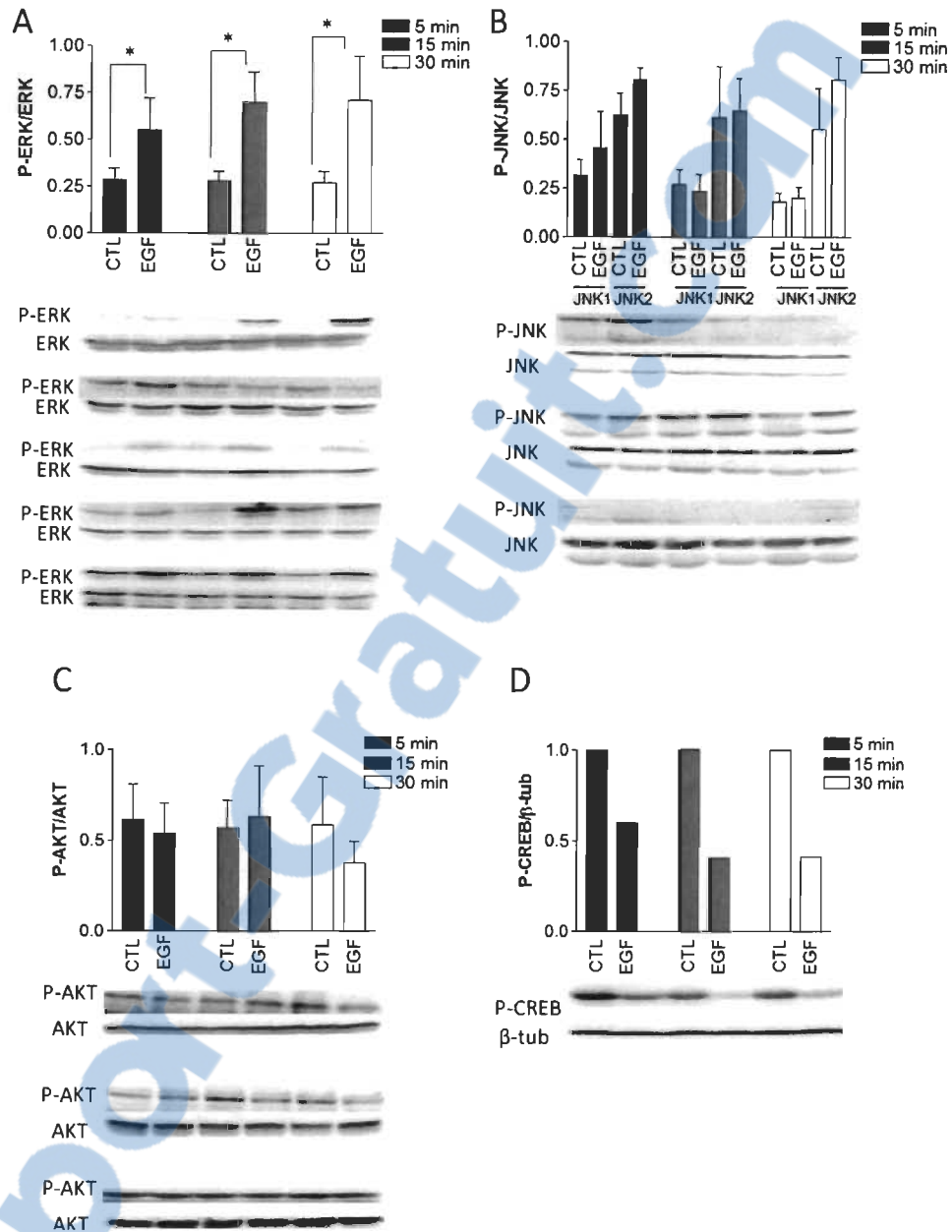


Figure 3.3 La voie de ERK est activée en réponse à un court traitement à l'EGF. Les cellules MCF-7 ont été préparées puis traitées avec l'EGF de la même manière qu'en 3.1. A) La phosphorylation de ERK a été mesurée et normalisée sur la quantité totale de la protéine. Les résultats sont une moyenne plus écart-type de cinq expériences indépendantes. B) La phosphorylation de JNK a été mesurée et normalisée sur la quantité totale de la protéine. Les résultats sont une moyenne plus écart-type de trois expériences indépendantes. C) La phosphorylation d'AKT a été mesurée et normalisée sur la quantité totale de la protéine. Les résultats sont une moyenne plus écart-type de trois expériences indépendantes. D) La phosphorylation de CREB a été mesurée et normalisée sur la β -tubuline. Cette expérience n'a été effectuée qu'une seule fois.

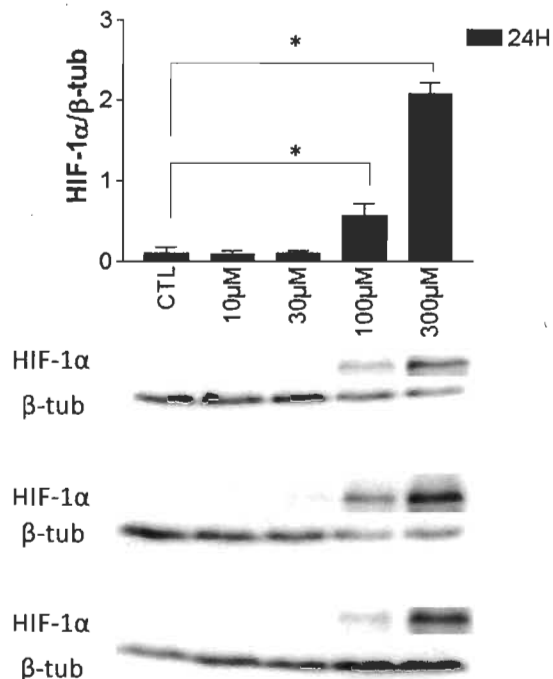


Figure 3.4 Détermination de la concentration optimale de chlorure de cobalt à utiliser pour mimer l'hypoxie dans les cellules MCF-7.

Les cellules MCF-7 ont été préparées comme à la figure 3.1, puis traitées avec des concentrations croissantes de chlorure de cobalt (CoCl_2) ou d' H_2O pendant 24h. Des immunobuvardages de type Western ont été effectués pour déterminer quelle concentration de CoCl_2 était optimale pour induire l'accumulation de HIF-1 α dans les cellules, cette accumulation étant un marqueur de la modification des cellules en réponse à l'hypoxie. La β -tubuline a été utilisée comme contrôle pour normaliser la teneur en protéines. Les résultats sont une moyenne avec écart-type de trois expériences indépendantes.

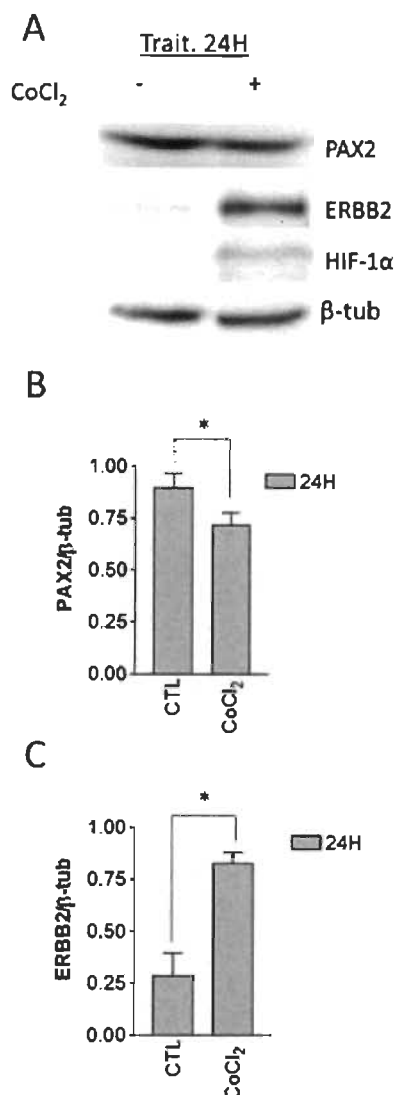


Figure 3.5 L'hypoxie dans les cellules du cancer du sein MCF-7.

Les cellules du cancer du sein luminales MCF-7 ont été préparées comme en 3.1. A) Les cellules ont été traitées avec 100μM de CoCl₂ ou un traitement contrôle (H₂O) pendant 24H. L'expression de PAX2 et de *ERBB2* a été mesurée et celles de HIF-1α et de β-tubuline ont été utilisées comme contrôle pour valider le modèle hypoxique et pour normaliser la teneur en protéines, respectivement. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. B) Analyse densitométrique de la protéine PAX2 dans les immunobuvardages liés à l'expérience présentée en A. La β-tubuline a été utilisée comme contrôle pour normaliser la teneur en protéines. Les résultats sont une moyenne plus écart-type de trois expériences indépendantes. C) Analyse densitométrique de la protéine ERBB2 dans les immunobuvardages liés à l'expérience présentée en A. La β-tubuline a été utilisée comme contrôle pour normaliser la teneur en protéines. Les résultats sont une moyenne plus écart-type de trois expériences indépendantes.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 Survol des principaux résultats de ma recherche et de leur signification

Le rôle des facteurs de transcription PAX dans la pathologie du cancer demeure peu connu pour l'instant, mais des indications émergentes suggèrent que certains d'entre eux pourraient avoir une fonction centrale dans ce processus. L'intérêt marqué pour les PAX réside dans deux concepts clés : 1) ceux qui sont reliés au processus cancéreux ne le sont pas de la même façon selon le site du cancer; 2) le rôle qu'un facteur PAX donné peut jouer dans le processus d'initiation d'un cancer peut différer de celui qu'il joue dans la progression de la maladie par la suite. Puisque les facteurs PAX sont soupçonnés de jouer des rôles aussi variés et importants dans le processus cancéreux, il importe d'étudier en profondeur la régulation de leur fonction et de leur activité dans les différents types de tumeurs. Les travaux de ma maîtrise ont été dédiés à l'étude de la régulation de l'expression et de l'activité de PAX2 spécifiquement, dans les cellules du cancer du sein.

J'ai ainsi participé à l'investigation de la régulation de l'expression et de l'activité de PAX2 en réponse à l'estradiol (E_2) et à l'EGF, deux facteurs solubles qui sont déjà bien connus pour leur rôle dans le développement des tissus mammaires sains, mais aussi de certains types de cancers du sein. Au cours de cette étude, d'autres membres de l'équipe du Dre Van Themsche ont découvert que PAX2 était nécessaire au maintien d'une faible activité invasive des cellules du cancer du sein luminales et donc, que son activité dictait la capacité invasive (et potentiellement la capacité métastatique) de ces cellules. Étant donné le lien que nous venions d'établir entre PAX2 et l'invasivité/métastase des cellules du cancer du sein, et considérant que plusieurs facteurs contrôlant les processus d'invasion et de métastase des cellules cancéreuses

sont régulés différemment lorsque la disponibilité de l'oxygène dans le milieu ambiant diminue, j'ai enfin examiné la régulation possible de PAX2 lorsque les cellules du cancer du sein étaient cultivées dans des conditions mimant un état d'hypoxie.

L'exposition des cellules mammaires saines à l'estradiol est un facteur de risque important pour l'initiation des cancers du sein luminaux. Toutefois, le rôle de l'estradiol dans la progression de ces cancers est moins bien connu. Notre étude a démontré que dans les cellules luminales MCF-7, qui sont déjà cancéreuses et dont la capacité invasive est reconnue pour être faible⁷², l'activation du récepteur à l'œstrogène ER α par l'estradiol augmentait le niveau de phosphorylation de PAX2 sur sérine 393 (un marqueur de son activation) et entraînait une diminution de l'expression du gène pro-invasif *ERBB2*¹⁶³. Un lien causal a ainsi pu être établi entre l'exposition à l'estradiol et le maintien d'un phénotype faiblement invasif dans ces cellules déjà cancéreuses, et nous avons montré pour la première fois que ce phénomène impliquait PAX2¹⁶³.

Il a déjà été déterminé que l'EGF a un impact pro-tumoral et pro-invasif dans les cellules du cancer du sein, d'une manière MAPK- et PI3K dépendante^{72,175-177}. De plus, plusieurs études documentent une augmentation de l'expression de PAX2 en réponse à l'EGF, même si cet aspect n'a pas encore été vérifié dans le contexte cancéreux^{142,178}. Puisque nous avons trouvé que PAX2 jouait à l'inverse un rôle anti-invasif dans les cellules du cancer du sein (du moins, les cellules luminales parce qu'il n'est tout simplement pas activé dans les cellules du cancer du sein non-luminales¹⁶³), nous avons posé comme hypothèse que si l'EGF augmente l'invasivité des cellules du cancer du sein, alors il ne devrait pas y augmenter l'expression ou l'activité de PAX2 contrairement à d'autres types de cellules (saines en l'occurrence)^{142,178}. Toutefois, notre hypothèse ne s'est pas avérée et nos expérimentations ont montré que l'exposition à l'EGF, même si elle n'affectait pas l'état d'activation de PAX2, augmentait son expression dans la lignée luminale MCF-7. De plus, en accord avec cette augmentation de la quantité totale de protéines PAX2, la quantité d'ERBB2 diminuait en réponse à l'EGF. Ceci suggère que dans les cellules du cancer du sein de type luminal, l'EGF

jouerait un rôle protecteur contre l'invasion, à l'inverse de ce qui a été décrit dans d'autres sous-types de tumeurs du sein^{179,180}.

En examinant les mécanismes intracellulaires sous-jacents, j'ai trouvé que dans les MCF-7, l'EGF activait la voie de ERK et diminuait l'activité de la voie de la PKA, sans toutefois modifier celle d'AKT. Ces résultats ont soulevé la possibilité que l'augmentation d'expression de PAX2 par l'EGF pouvait être due à l'activation de la voie de ERK. L'expérience subséquente impliquant l'inhibition pharmacologique de la voie de ERK nous a permis de vérifier cette hypothèse: l'inhibiteur pharmacologique PD98059 administré préalablement au traitement avec l'EGF a empêché ce dernier d'augmenter l'expression de PAX2.

Enfin, nous avons tenté de mimer l'effet des conditions hypoxiques retrouvées au coeur des tumeurs pour déterminer si la régulation de PAX2 en était affectée et comment dans les cellules luminales MCF-7. Généralement, les conditions d'hypoxie telles qu'on les retrouve au centre des tumeurs favorisent l'invasion et la métastase des cellules cancéreuses, incluant les cellules du cancer du sein^{181,182}. Ce processus implique la modulation de l'expression de différents facteurs cellulaires par le facteur induit par l'hypoxie HIF-1 α ¹⁶². Nous avons mimé ces conditions hypoxiques à l'aide d'un traitement au chlorure de cobalt (CoCl₂) et vérifié que la protéine HIF-1 s'accumulait dans les MCF-7 tel qu'attendu dans un contexte hypoxique¹⁶². Nos résultats ont montré une diminution de la quantité de la protéine PAX2, associée à une augmentation de la quantité d'ERBB2 dans les MCF-7. Ainsi, bien que des facteurs de transcription autres que PAX2 puissent réguler l'expression de *ERBB2* dans les cellules MCF-7⁵⁰, l'augmentation d'ERBB2 en réponse au CoCl₂ semble s'effectuer de façon PAX2-dépendante. Il faudrait maintenant déterminer si dans ces conditions, le niveau d'activation de PAX2 est régulé et si oui, de quelle façon, par le CoCl₂ et l'hypoxie.

4.2 Régulation négative de l'invasivité des cellules du cancer du sein luminal par PAX2

La première étude à laquelle j'ai participé dans le cadre de mon mémoire met en lumière pour la première fois un rôle pour PAX2 à titre de régulateur négatif de l'invasion des cellules cancéreuses du sein du sous-type luminal. Ainsi, en présence d'estradiol (tel que retrouvé dans les tumeurs du sein des patientes), PAX2 est activé et la quantité de la protéine PAX2 est diminuée, en accord avec une étude antérieure démontrant que PAX2 agit en tant que répresseur du gène pro-métastatique *ERBB2* en se liant directement à son promoteur en réponse à l'estradiol⁵⁰. De plus, nous avons réussi à déterminer que l'activation de PAX2 par l'estradiol conduisant à une diminution de l'expression de *ERBB2* dans les cellules du cancer du sein s'effectuait de manière classe-sélective, c'est-à-dire que cet effet de l'estradiol n'est pas observé dans les cellules du cancer du sein des sous-classes non-luminales¹⁶³. Ceci est en accord avec le fait que ces dernières n'expriment pas ER α ainsi qu'avec notre observation que l'activation de PAX2 par l'estradiol était ER α -dépendante¹⁶³. Puisque la grande majorité des patientes affligées d'un cancer du sein portent des tumeurs lumineales, nos observations ont une portée clinique très importante.

Nos résultats qui montrent que l'estradiol diminue non seulement l'expression de *ERBB2*, mais également l'invasivité des cellules du cancer du sein lumineales, font émerger un concept encore peu développé selon lequel l'estradiol jouerait un rôle protecteur contre l'invasion, et potentiellement contre la métastase, dans les cellules du cancer du sein lumineales. Il peut sembler contradictoire d'imaginer que l'exposition des cellules tumorales à un agent pro-mitotique, tel que l'estradiol, ait un effet protecteur pour la survie des patientes. En effet, il est reconnu que l'estradiol est un facteur initiateur du cancer du sein et qu'il augmente le pouvoir de prolifération des cellules tumorales^{79,183,184}. Cependant, les cancers du sein lumineux sont caractérisés par un meilleur pronostic et un meilleur taux de survie après cinq ans et produisent généralement des métastases après un délai beaucoup plus prolongé que les tumeurs de sous-type n'exprimant pas le récepteur ER α ³⁸. Cela suggère que malgré une activité

mitotique élevée des cellules, l'estradiol induit une diminution nette de la capacité invasive des cellules et potentiellement, une diminution nette de leur capacité métastatique qui serait responsable de l'observation clinique d'une survie plus longue des patientes concernées.

Notre étude qui montre que PAX2 joue un rôle protecteur contre l'invasion des cellules du cancer du sein luminales entre aussi en contradiction avec une autre étude, qui suggère qu'à l'inverse PAX2 augmente l'invasivité des cellules d'un autre type de cancer, le sarcome de Kaposi¹⁸⁵. Ceci suggère que bien que PAX2 dicterait la capacité invasive de plus d'un type de cancer, son effet est cancer-dépendant. Au niveau moléculaire, il est possible que le caractère hormono-dépendant (donc l'expression de ER α) représente un mécanisme par lequel les cellules du cancer du sein se distingueraient de plusieurs autres types de cellules cancéreuses quant à la régulation PAX2-dépendante du phénotype invasif.

Pour l'instant, nous n'avons pas de données qui nous permettent d'entrevoir si PAX2 serait impliqué dans l'effet pro-tumorigénique de l'estradiol dans le tissu mammaire. Par contre, nous avons observé que la répression de l'expression de PAX2 n'influençait pas la prolifération des cellules du cancer du sein luminales¹⁶³, ce qui suggère que dans ces cellules, PAX2 ne serait pas un élément central dictant la vitesse de prolifération. Dans d'autres tissus, PAX2 semble avoir une fonction pro-oncogénique. Ainsi, l'expression de PAX2 serait régulée à la hausse dans plusieurs sous-groupes de cancers rénaux comparé au tissu rénal sain¹⁸⁶. Ensuite, l'expression de PAX2 est associée à une augmentation du pouvoir prolifératif du cancer du côlon. À l'intérieur de cette tumeur, le facteur de transcription serait à l'origine d'une surexpression de la cycline D1¹⁸⁷. Enfin, la répression de PAX2 au sein de médulloblastome a provoqué un effet cytotoxique ce qui suggère que la protéine est aussi impliquée dans la résistance à l'apoptose dans ce type de cancer¹⁸⁸.

4.3 La régulation de l'expression et de l'activité de PAX2 dans les cellules luminales : l'effet de l'œstrogène

Deux types de voie de signalisation (Figure 4.1) sont transduites via les récepteurs à l'œstrogène : 1) la voie génomique classique et 2) la voie non-génomique. La première, qui est aussi la plus lente, implique les récepteurs nucléaires à l'œstradiol ($ER\alpha$ et $ER\beta$). Après liaison de leur principal ligand, l'œstradiol, ces récepteurs transloquent vers le noyau cellulaire où ils se lient à l'ADN au niveau de séquences consensus appelées éléments de réponse à l'œstrogène (ERE; Figure 4.1) situées dans le promoteur de leurs gènes cibles (Figure 4.1) et modulent, à la hausse ou à la baisse, l'expression de ces gènes cibles. Ainsi, ces deux récepteurs à l'œstradiol ont un rôle nucléaire, à titre de facteurs de transcription (ou de co-régulateurs parce que dans plusieurs cas ils s'associent à d'autres facteurs de transcription et facilitent leur activité).

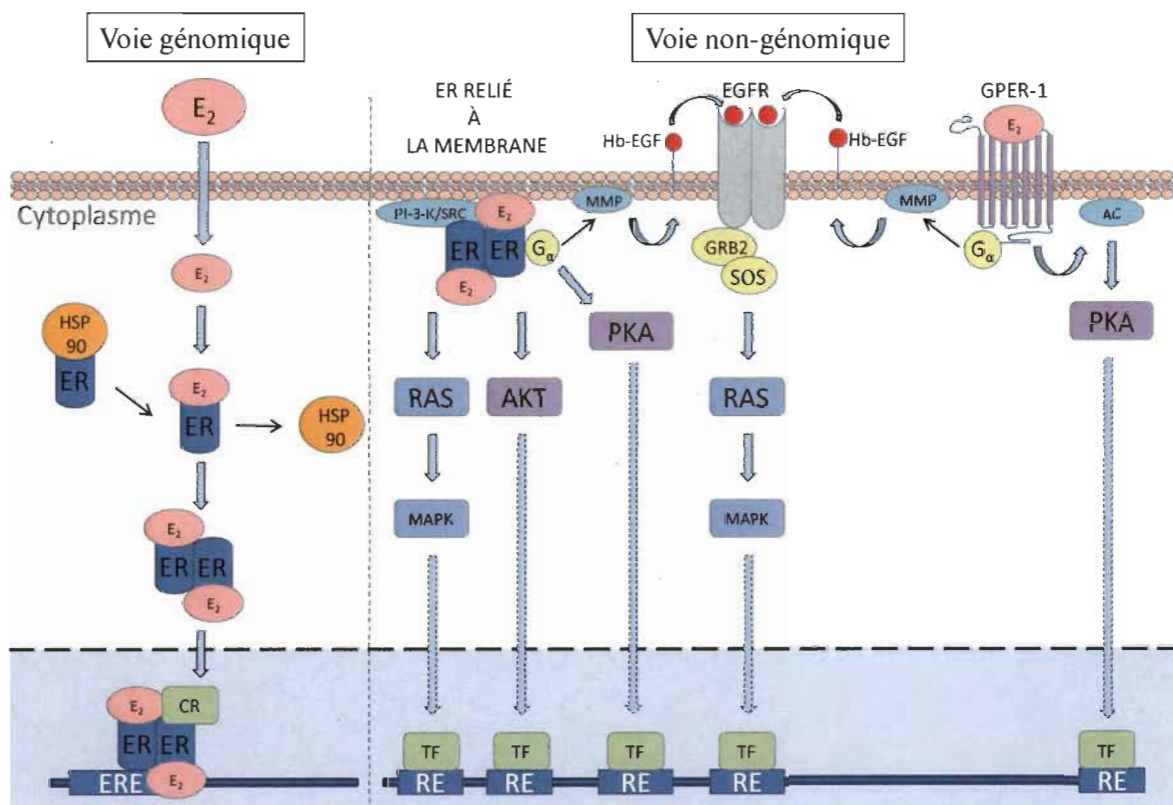


Figure 4.1 Voies de signalisation génomique et non génomique de l'œstradiol.

La seconde voie de signalisation à l'œstrogène, dite non-génomique, implique des récepteurs liés à la membrane plasmique tels que GPER (G protein-coupled estrogen receptor 1, décrits dans l'article de revue¹⁸⁹). Elle est plus rapide que la voie génomique et implique divers événements extra-nucléaires, dont plusieurs cascades de phosphorylation de protéines d'ancrage ou d'effecteurs (Figure 4.1)¹⁹⁰. Les principales voies intracellulaires ainsi activées via GPER sont PI3-K/AKT et MAPK^{191,192}; l'activation de ces voies en aval de GPER peut influencer l'expression génique¹⁹³. Dans les cellules du cancer du sein, les deux voies sont activées en réponse à l'estradiol, mais plusieurs indications expérimentales indirectes suggèrent que les fonctions de GPER et de ER α sont indépendantes : 1) dans les tumeurs du sein et les lignées du cancer du sein en culture, l'expression des deux récepteurs est indépendante¹⁹⁴; 2) les agonistes et antagonistes de GPER ont permis de révéler des fonctions différentes de celles de ER α ¹⁹⁵; 3) les phénotypes des souris où l'expression de l'un des deux récepteurs est inactivée génétiquement (souris knock-out) sont différents¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Au bout du compte néanmoins, c'est donc la balance des signaux provenant des voies génomique et non-génomique qui détermine quels seront les effets de l'exposition à estradiol, probablement d'une manière cellule- et gène-spécifique. À cet égard, nos résultats ont montré que la phosphorylation de PAX2 était induite rapidement en réponse à l'estradiol chez les MCF-7. Cela suggère que la transduction du signal menant à l'activation de PAX2 utilise la voie non-génomique et soulève la possibilité d'un rôle pour GPER dans la régulation de l'état d'activation de PAX2 par l'estradiol. Cette hypothèse sera examinée sous peu par l'équipe du Dre Van Themsche. D'ici là, nous pouvons proposer un certain nombre de mécanismes cellulaires qui pourraient être impliqués dans la phosphorylation/activation de PAX2 par l'estradiol. Ainsi, puisqu'il a déjà été rapporté que dans les cellules du cancer du sein, l'estradiol active rapidement la cascade des MAPKs via la protéine d'ancrage Src, ce qui engendre plusieurs effets tels que l'augmentation de la prolifération, de la croissance, de la survie et de la migration cellulaire¹⁹⁹, il est possible que la phosphorylation de PAX2 dans les MCF-7 exposées à l'estradiol implique ERK.

Il est également utile de considérer que dans nos conditions expérimentales, un antagoniste d'ER α , le ICI 182780, n'était pas en mesure d'inhiber complètement l'augmentation de la phosphorylation de PAX2 induite par l'estradiol. Du même coup, l'inhibition de ERBB2 induite par l'estradiol n'était pas complètement renversée. Ces observations soulèvent la possibilité qu'un récepteur différent d'ER α soit également impliqué dans la phosphorylation/activation de PAX2 et donc, dans le contrôle de l'invasion cellulaire. À cet égard, plusieurs études ont rapporté que l'activation de ER β était associée à une diminution de la capacité d'invasion des cellules du cancer du sein^{200,201}. Par conséquent, malgré la plus faible expression du récepteur ER β que celle d'ER α dans la lignée MCF-7²⁰², l'analyse de la régulation de PAX2 E₂-dépendante par ER β constitue une voie intéressante compte tenu de son rôle dans le contrôle de l'invasion. Plusieurs isoformes et variants du récepteur ont cependant été caractérisés jusqu'à maintenant²⁰³. La plupart d'entre eux possédant une activité spécifique qui dans certains cas est associée à un mauvais pronostic²⁰³, un fin criblage du mode régulation de chacun d'entre eux devra être pratiqué dans notre modèle.

4.4 La régulation de l'expression et de l'activité de PAX2 dans les cellules luminales : l'effet de l'EGF

De manière générale, l'EGF peut influencer une variété de processus tels que la prolifération, la croissance, la survie, l'invasion et la métastase des cellules cancéreuses. Dans nos conditions expérimentales, l'EGF a rapidement induit l'activation de la voie de ERK et l'inhibition de la voie de PKA chez les cellules MCF-7. Par contre, après une exposition de 30 min à l'EGF, les voies de PI3-K et JNK n'étaient toujours pas modulées. Une telle activation sélective de la voie de ERK fournit une piste de recherche sérieuse pour l'identification des voies intracellulaires impliquées dans les effets biologiques de l'EGF dans notre modèle. À cet égard, nous avons observé qu'un traitement de plus longue durée des MCF-7 avec de l'EGF augmentait la quantité totale de la protéine PAX2. De plus, la quantité d'ERBB2, dont l'expression est régulée à la baisse par PAX2 dans les MCF-7⁵⁰, était diminuée. Cela suggère fortement que l'EGF induit une diminution de l'expression de *ERBB2* en augmentant l'expression et l'activité

de PAX2. Nous pouvons alors poser l'hypothèse que la régulation de PAX2 par l'EGF serait transcriptionnelle et nécessiterait la participation de ERK : cela sera investigué sous peu dans l'équipe du Dre Van Themsche. Dans l'affirmative, il sera intéressant de déterminer si dans nos conditions expérimentales, l'augmentation de la quantité de PAX2 par l'EGF a un impact négatif sur le potentiel invasif des MCF-7, de la même façon que l'augmentation de la phosphorylation de PAX2 et la diminution de ERBB2 en réponse à l'estradiol réduisent l'invasion par ces cellules. L'EGF est en effet capable d'établir un phénotype faiblement invasif dans plusieurs types de cancers qui répondent à d'autres molécules pro-invasives comme l'amphiréguline (AR) et le TGF- α ²⁰⁴. Par contre, dans le cas des cellules du sein, normales et cancéreuses, les études antérieures suggèrent fortement que l'activation de ERK par l'EGF aurait pour effet de promouvoir l'invasion cellulaire plutôt que de l'inhiber, ce qui va à l'encontre de notre observation que l'EGF augmente PAX2 et diminue ERBB2 dans les MCF-7^{179,205}.

4.5 La régulation de l'expression et de l'activité de PAX2 dans les cellules luminales : l'effet de l'hypoxie

L'hypoxie présente au centre d'une tumeur est à l'origine de plusieurs mécanismes d'adaptation des cellules cancéreuses qui favorisent la croissance tumorale, la prolifération, l'angiogenèse, l'invasion et la métastase. Ces changements sont consécutifs à l'activation de la transcription de plusieurs gènes cibles par le facteur induit par l'hypoxie (HIF-1 α), dont la protéine est stabilisée dans des conditions hypoxiques. Par exemple, HIF-1 α qui s'accumule dans les cellules cancéreuses en réponse à l'hypoxie est impliqué dans l'expression de VEGF, un facteur de transcription ayant un rôle central dans le processus d'angiogenèse (formation de vaisseaux sanguins au sein de la tumeur à partir de vaisseaux pré-existants)^{157,206}. Depuis longtemps, des études ont montré que le traitement des cellules du cancer du sein MCF-7 avec du CoCl₂, de façon à mimer des conditions hypoxiques, induit l'accumulation de HIF-1 α et l'augmentation de son activité transcriptionnelle sur ses gènes cibles²⁰⁷. De la même façon dans nos conditions expérimentales, l'exposition au CoCl₂ a provoqué dans les MCF-7 l'augmentation du niveau protéique d'HIF-1 α .

Plusieurs études ont permis d'établir un lien entre l'hypoxie et l'augmentation de l'invasion et de la métastase des cellules cancéreuses, incluant celles du sein²⁰⁸⁻²¹⁰. Ainsi, au niveau moléculaire, il a déjà été montré que l'hypoxie pouvait moduler, à la hausse ou à la baisse, l'expression de certains facteurs impliqués dans le contrôle, positif ou négatif, de l'invasion et la métastase. Par exemple, dans le cas des cellules MCF-7 qui sont faiblement invasives et métastatiques, l'induction de l'hypoxie diminue l'expression de protéases de la matrice ayant un rôle pro-métastatique alors qu'à l'inverse leur expression est augmentée dans les MDA-MB-231, qui sont hautement invasives et métastatiques, lorsqu'elles sont traitées de la même façon²⁰⁸. Alors, puisque PAX2 influence aussi les propriétés invasives des MCF-7, même si ce n'est pas de la même façon que le font les métalloprotéases de la matrice, nous avons émis l'hypothèse que placer les MCF-7 dans des conditions ambiantes mimant l'hypoxie pourrait moduler son expression et/ou son activité.

Notre étude a montré que dans les conditions mimant l'hypoxie induites par le CoCl_2 , l'accumulation de la protéine HIF-1 α dans les MCF-7 n'était associée à aucun changement de la quantité de la protéine PAX2. Toutefois, ce changement est survenu d'une manière contraire à celui qui serait attendu dans le cas d'un facteur pro-tumorigénique ou pro-métastatique, c'est-à-dire que l'hypoxie n'a pas augmenté, mais bien diminué la quantité de PAX2 dans les cellules. En même temps, la quantité de la protéine ERBB2, un gène cible de PAX2 qui confère un net avantage invasif et métastatique aux cellules cancéreuses qui l'expriment, a été augmentée par l'hypoxie: il est tentant de spéculer que la diminution de l'expression de PAX2 est nécessaire pour que l'augmentation de celle de *ERBB2* puisse survenir, et pour que l'hypoxie puisse efficacement augmenter l'invasivité des cellules luminales.

4.6 Conclusion et perspectives

Mes travaux de maîtrise se sont attardés à la régulation d'un facteur émergent, PAX2, jouant un rôle clé dans la physiopathologie du cancer du sein. Ils ont contribué à faire la démonstration que l'expression de PAX2 était augmentée lors de l'exposition des

cellules du cancer du sein luminales à l'EGF, alors que son activité était augmentée en réponse à l'estradiol et directement impliquée dans une diminution de l'expression d'*ERBB2* à l'origine d'un phénotype faiblement invasif de ces cellules. Considérés ensemble, ces deux résultats suggèrent que l'exposition simultanée à l'EGF et l'E₂, tel qu'elle survient certainement dans le microenvironnement des tumeurs luminales, confère un phénotype faiblement invasif aux cellules cancéreuses du sein luminales. Dans le futur, nous tenterons d'évaluer le lien possible entre l'augmentation de l'expression de PAX2 en réponse à l'EGF et son activation par l'estradiol, comme étant deux étapes intrinsèquement liées menant à une diminution de la capacité d'invasivité et de métastase des cellules cancéreuses du sein ER+. Déterminer ainsi une collaboration entre les deux phénomènes permettrait de bénéficier de deux cibles thérapeutiques (EGFR et ER) afin d'accentuer l'efficacité d'un éventuel traitement pour le cancer du sein de sous-type luminal. Par ailleurs, mes travaux ont tourné les projecteurs vers une voie de signalisation particulière, celle de ERK, comme médiatrice potentielle de l'effet de l'EGF sur la régulation de l'expression de PAX2 dans les cellules du cancer du sein luminales. Des travaux supplémentaires seront requis par la suite pour identifier précisément quels sont les facteurs intracellulaires en aval de ERK qui agissent sur la protéine PAX2 (si cette régulation est post-traductionnelle) ou sur le gène qui l'encode (si la régulation est transcriptionnelle, ce qui sera vérifié sous peu par l'équipe du Dre Van Themsche à l'aide de la PCR quantitative). Considérés dans leur globalité, les travaux présentés dans le présent mémoire ont permis un avancement certain des connaissances dans le domaine, et ils soulèvent d'importantes questions et pistes de recherche, à la fois pertinentes et fascinantes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. www.cancer.ca.
2. Du, J., et al., *Arsenic Induces Functional Re-Expression of Estrogen Receptor alpha by Demethylation of DNA in Estrogen Receptor-Negative Human Breast Cancer*. Plos One, 2012. **7**(4): p. e35957.
3. www.statcan.gc.ca.
4. Cheeseman, K., et al., *A diagnostic genetic test for the physical mapping of germline rearrangements in the susceptibility breast cancer genes BRCA1 and BRCA2*. Hum Mutat, 2012. **33**(6): p. 998-1009.
5. Rick, A., et al., *Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012*. American Cancer Society, 2011.
6. Sluiter, M.D. and van Rensburg, E.J., *Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **125**(2): p. 325-49.
7. Buckley, N.E. and Mullan, P.B., *BRCA1 - Conductor of the Breast Stem Cell Orchestra: The Role of BRCA1 in Mammary Gland Development and Identification of Cell of Origin of BRCA1 Mutant Breast Cancer*. Stem Cell Rev, 2012.
8. World Cancer Research Fund, A.I.f.C.R., *Food, Nutrition, Physical activity and Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington DC, AICR., 2007.
9. Thomson, C.A., et al., *Vegetable intake is associated with reduced breast cancer recurrence in tamoxifen users: a secondary analysis from the Women's Healthy Eating and Living Study*. Breast Cancer Research and Treatment, 2011. **125**(2): p. 519-527.
10. Holick, C.N., et al., *Physical activity and survival after diagnosis of invasive breast cancer*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2008. **17**(2): p. 379-386.
11. Warren, G.W., Kasza, K.A., Reid, M.E., Michael Cummings, K., and Marshall, J.R., *Smoking at diagnosis and survival in cancer patients*. Int J Cancer, 2012.
12. Villarini, A., et al., *Lifestyle and breast cancer recurrences: The DIANA-5 trial*. Tumori, 2012. **98**(1): p. 1-18.
13. Terry, P.D. and Goodman, M., *Is the association between cigarette smoking and breast cancer modified by genotype? A review of epidemiologic studies and meta-analysis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(4): p. 602-11.
14. Simpson, E., et al., *Local estrogen biosynthesis in males and females*. Endocr Relat Cancer, 1999. **6**(2): p. 131-7.
15. Ronco, A.L., et al., *Food patterns and risk of breast cancer: A factor analysis study in Uruguay*. Int J Cancer, 2006. **119**(7): p. 1672-8.
16. Patterson, R.E., et al., *Marine Fatty Acid Intake Is Associated with Breast Cancer Prognosis*. Journal of Nutrition, 2011. **141**(2): p. 201-206.
17. Macinnis, R.J., English, D.R., Gertig, D.M., Hopper, J.L., and Giles, G.G., *Body size and composition and risk of postmenopausal breast cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004. **13**(12): p. 2117-25.

18. Lahmann, P.H., et al., *Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC)*. Int J Cancer, 2004. **111**(5): p. 762-71.
19. Key, T.J. and Verkasalo, P.K., *Endogenous hormones and the aetiology of breast cancer*. Breast Cancer Res, 1999. **1**(1): p. 18-21.
20. Holmes, M.D., Chen, W.Y., Hankinson, S.E., and Willett, W.C., *Physical activity's impact on the association of fat and fiber intake with survival after breast cancer*. Am J Epidemiol, 2009. **170**(10): p. 1250-6.
21. Fung, T.T., et al., *Dietary patterns and the risk of postmenopausal breast cancer*. Int J Cancer, 2005. **116**(1): p. 116-21.
22. Cheng, G., Basha, E., Wysocki, V.H., and Vierling, E., *Insights into small heat shock protein and substrate structure during chaperone action derived from hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry*. J Biol Chem, 2008. **283**(39): p. 26634-42.
23. Berrino, F., Villarini, A., De Petris, M., Raimondi, M., and Pasanisi, P., *Adjuvant diet to improve hormonal and metabolic factors affecting breast cancer prognosis*. Estrogens and Human Diseases, 2006. **1089**: p. 110-118.
24. Cheng, G., et al., *Beyond overweight: nutrition as an important lifestyle factor influencing timing of puberty*. Nutr Rev, 2012. **70**(3): p. 133-52.
25. Rock, C.L., et al., *Plasma carotenoids and recurrence-free survival in women with a history of breast cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(27): p. 6631-6638.
26. Ingram, D., *Diet and Subsequent Survival in Women with Breast-Cancer*. British Journal of Cancer, 1994. **69**(3): p. 592-595.
27. Rock, C.L., *Carotenoids: Biology and treatment*. Pharmacology & Therapeutics, 1997. **75**(3): p. 185-197.
28. Kang, X., Zhang, Q., Wang, S., Huang, X., and Jin, S., *Effect of soy isoflavones on breast cancer recurrence and death for patients receiving adjuvant endocrine therapy*. CMAJ, 2010. **182**(17): p. 1857-62.
29. Fink, B.N., et al., *Dietary flavonoid intake and breast cancer survival among women on Long Island*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(11): p. 2285-92.
30. Brueggemeier, R.W., *Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer*. Am J Ther, 2001. **8**(5): p. 333-44.
31. Hedelin, M., et al., *Dietary phytoestrogen, serum enterolactone and risk of prostate cancer: the cancer prostate Sweden study (Sweden)*. Cancer Causes Control, 2006. **17**(2): p. 169-80.
32. Adlercreutz, H., *Phytoestrogens and breast cancer*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2002. **83**(1-5): p. 113-8.
33. McCann, S.E., et al., *Dietary lignan intakes in relation to survival among women with breast cancer: the Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) Study*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **122**(1): p. 229-35.
34. Platet, N., Cathiard, A.M., Gleizes, M., and Garcia, M., *Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **51**(1): p. 55-67.

35. Massarweh, S. and Schiff, R., *Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk*. *Endocr Relat Cancer*, 2006. **13 Suppl 1**: p. S15-24.
36. Bourgier, C., Heymann, S., Vielh, P., and Azria, D., *[Radiobiology and breast cancer molecular classification: present or future?]*. *Cancer Radiother*, 2012. **16**(1): p. 29-33.
37. Lopez, L.H., et al., *Anxiolytic-like effect of losartan injected into amygdala of the acutely stressed rats*. *Pharmacol Rep*, 2012. **64**(1): p. 54-63.
38. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
39. Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., and Huber, J.C., *Production and actions of estrogens*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(5): p. 340-52.
40. Larsen, B. and Hwang, J., *Progesterone interactions with the cervix: translational implications for term and preterm birth*. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2011. **2011**: p. 353297.
41. Shang, Y., *Hormones and cancer*. *Cell Res*, 2007. **17**(4): p. 277-9.
42. Tan, H., Zhong, Y., and Pan, Z., *Autocrine regulation of cell proliferation by estrogen receptor-alpha in estrogen receptor-alpha-positive breast cancer cell lines*. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 31.
43. Maehle, B.O., Collett, K., Tretli, S., Akslen, L.A., and Grotmol, T., *Estrogen receptor beta--an independent prognostic marker in estrogen receptor alpha and progesterone receptor-positive breast cancer?* *APMIS*, 2009. **117**(9): p. 644-50.
44. Weigel, N.L., *Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation*. *Biochem J*, 1996. **319 (Pt 3)**: p. 657-67.
45. Pettersson, K., Grandien, K., Kuiper, G.G., and Gustafsson, J.A., *Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha*. *Mol Endocrinol*, 1997. **11**(10): p. 1486-96.
46. Bolt, M.J., et al., *Coactivators enable glucocorticoid receptor recruitment to fine-tune estrogen receptor transcriptional responses*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(7): p. 4036-48.
47. Smith, D.F. and Toft, D.O., *Steroid receptors and their associated proteins*. *Mol Endocrinol*, 1993. **7**(1): p. 4-11.
48. Klinge, C.M., *Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors*. *Steroids*, 2000. **65**(5): p. 227-51.
49. Suen, C.S., et al., *A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(42): p. 27645-53.
50. Hurtado, A., et al., *Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen*. *Nature*, 2008. **456**(7222): p. 663-6.
51. Harari, D. and Yarden, Y., *Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer*. *Oncogene*, 2000. **19**(53): p. 6102-14.
52. Yu, D. and Hung, M.C., *Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies*. *Oncogene*, 2000. **19**(53): p. 6115-21.
53. Saxena, R. and Dwivedi, A., *ErbB family receptor inhibitors as therapeutic agents in breast cancer: current status and future clinical perspective*. *Med Res Rev*, 2012. **32**(1): p. 166-215.

54. Balz, L.M., et al., *The interplay of HER2/HER3/PI3K and EGFR/HER2/PLC-gamma1 signalling in breast cancer cell migration and dissemination*. J Pathol, 2012. **227**(2): p. 234-44.
55. Vu, T. and Claret, F.X., *Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 62.
56. Guy, C.T., et al., *Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10578-82.
57. Lee, J.S., Son, B.H., and Ahn, S.H., *The Predictive Value of Serum HER2/neu for Response to Anthracycline-Based and Trastuzumab-Based Neoadjuvant Chemotherapy*. J Breast Cancer, 2012. **15**(2): p. 189-96.
58. Cobleigh, M.A., et al., *Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease*. Journal of Clinical Oncology, 1999. **17**(9): p. 2639-48.
59. Burden, S. and Yarden, Y., *Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis*. Neuron, 1997. **18**(6): p. 847-55.
60. Frey, M.R. and Brent Polk, D., *ErbB receptors and their growth factor ligands in pediatric intestinal inflammation*. Pediatr Res., 2014. **75**(1-2): p. 127-32. doi: 10.1038/pr.2013.210. Epub 2013 Nov 6.
61. Hubert, P., *Growth factors of the EGF family and their receptors* Bull Cancer, 2006. **hors série** p. 17-24.
62. www.SABiosciences.com.
63. Carraway, K.L., 3rd and Sweeney, C., *Co-opted integrin signaling in ErbB2-induced mammary tumor progression*. Cancer Cell, 2006. **10**(2): p. 93-5.
64. Wong, C. and Chen, S., *The development, application and limitations of breast cancer cell lines to study tamoxifen and aromatase inhibitor resistance*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2012. **131**(3-5): p. 83-92.
65. Hermanto, U., Zong, C.S., and Wang, L.H., *ErbB2-overexpressing human mammary carcinoma cells display an increased requirement for the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in anchorage-independent growth*. Oncogene, 2001. **20**(51): p. 7551-62.
66. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
67. Weigelt, B., Pusztai, L., Ashworth, A., and Reis-Filho, J.S., *Challenges translating breast cancer gene signatures into the clinic*. Nat Rev Clin Oncol, 2012. **9**(1): p. 58-64.
68. Russo, J. and Russo, I.H., *The role of the basal stem cell of the human breast in normal development and cancer*. Adv Exp Med Biol, 2011. **720**: p. 121-34.
69. Akashi, S., et al., *Fine-needle aspiration cytology of triple-negative basal-like breast cancer*. Diagnostic Cytopathology, 2011.
70. Yu, K.D., Shen, Z.Z., and Shao, Z.M., *The immunohistochemically "ER-negative, PR-negative, HER2-negative, CK5/6-negative, and HER1-negative" subgroup is not a surrogate for the normal-like subtype in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **118**(3): p. 661-3.

71. Loi, S., *Molecular analysis of hormone receptor positive (luminal) breast cancers: what have we learnt?* European Journal of Cancer, 2008. **44**(18): p. 2813-8.
72. Neve, R.M., et al., *A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes.* Cancer Cell, 2006. **10**(6): p. 515-27.
73. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8418-23.
74. Reis-Filho, J.S. and Pusztai, L., *Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction.* Lancet, 2011. **378**(9805): p. 1812-23.
75. Garcia Fernandez, A., et al., *Survival and clinicopathological characteristics of breast cancer patient according to different tumour subtypes as determined by hormone receptor and Her2 immunohistochemistry. A single institution survey spanning 1998 to 2010.* Breast, 2012.
76. Yang, X.R., et al., *Analysis of terminal duct lobular unit involution in luminal A and basal breast cancers.* Breast Cancer Res, 2012. **14**(2): p. R64.
77. Platet, N., Cunat, S., Chalbos, D., Rochefort, H., and Garcia, M., *Unliganded and liganded estrogen receptors protect against cancer invasion via different mechanisms.* Mol Endocrinol, 2000. **14**(7): p. 999-1009.
78. Yang, X.R., et al., *Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(3): p. 439-43.
79. Russo, J. and Russo, I.H., *The role of estrogen in the initiation of breast cancer.* The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2006. **102**(1-5): p. 89-96.
80. Russo, J., et al., *17Beta-estradiol is carcinogenic in human breast epithelial cells.* The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2002. **80**(2): p. 149-62.
81. Russo, J., Hasan Lareef, M., Balogh, G., Guo, S., and Russo, I.H., *Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells.* The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2003. **87**(1): p. 1-25.
82. Preston-Martin, S., Pike, M.C., Ross, R.K., Jones, P.A., and Henderson, B.E., *Increased cell division as a cause of human cancer.* Cancer research, 1990. **50**(23): p. 7415-21.
83. Simstein, R., Burow, M., Parker, A., Weldon, C., and Beckman, B., *Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system.* Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(9): p. 995-1003.
84. Elder, E.E., et al., *Patterns of breast cancer relapse.* Eur J Surg Oncol, 2006. **32**(9): p. 922-7.
85. Lu, P., Weaver, V.M., and Werb, Z., *The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression.* J Cell Biol, 2012. **196**(4): p. 395-406.
86. Perez-Yepe, E.A., Ayala-Summano, J.T., Reveles-Espinoza, A.M., and Meza, I., *Selection of a MCF-7 Breast Cancer Cell Subpopulation with High Sensitivity to IL-1beta: Characterization of and Correlation between Morphological and Molecular Changes Leading to Increased Invasiveness.* Int J Breast Cancer, 2012. **2012**: p. 609148.

87. Nguyen, A., Hoang, V., Laquer, V., and Kelly, K.M., *Angiogenesis in cutaneous disease: part I*. J Am Acad Dermatol, 2009. **61**(6): p. 921-42; quiz 943-4.
88. Song, Y., et al., *Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways*. Angiogenesis, 2012.
89. Thairu, N., Kiriakidis, S., Dawson, P., and Paleolog, E., *Angiogenesis as a therapeutic target in arthritis in 2011: learning the lessons of the colorectal cancer experience*. Angiogenesis, 2011. **14**(3): p. 223-34.
90. Acharyya, S., et al., *A CXCL1 Paracrine Network Links Cancer Chemoresistance and Metastasis*. Cell, 2012. **150**(1): p. 165-78.
91. Lorusso, G. and Ruegg, C., *New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis*. Semin Cancer Biol, 2012. **22**(3): p. 226-33.
92. Solomayer, E.F., Diel, I.J., Meyberg, G.C., Gollan, C., and Bastert, G., *Metastatic breast cancer: clinical course, prognosis and therapy related to the first site of metastasis*. Breast Cancer Res Treat, 2000. **59**(3): p. 271-8.
93. Kretschmann, K.L. and Welm, A.L., *Mouse models of breast cancer metastasis to bone*. Cancer Metastasis Rev, 2012.
94. Yue, W., Wang, J.P., Hamilton, C.J., Demers, L.M., and Santen, R.J., *In situ aromatization enhances breast tumor estradiol levels and cellular proliferation*. Cancer research, 1998. **58**(5): p. 927-32.
95. Pelekanou, V. and Leclercq, G., *Recent insights into the effect of natural and environmental estrogens on mammary development and carcinogenesis*. Int J Dev Biol, 2011. **55**(7-9): p. 869-78.
96. Eden, J.A., *Breast cancer, stem cells and sex hormones. Part 3: the impact of the menopause and hormone replacement*. Maturitas, 2011. **68**(2): p. 129-36.
97. Howe, L.R. and Brown, P.H., *Targeting the HER/EGFR/ErbB family to prevent breast cancer*. Cancer Prev Res (Phila), 2011. **4**(8): p. 1149-57.
98. Dobashi, Y., et al., *Molecular alterations in AKT and its protein activation in human lung carcinomas*. Human Pathology, 2012.
99. Chin, Y.R. and Toker, A., *Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer*. Cellular signalling, 2009. **21**(4): p. 470-6.
100. Phelps, M., Phillips, A., Darley, M., and Blaydes, J.P., *MEK-ERK signaling controls Hdm2 oncoprotein expression by regulating hdm2 mRNA export to the cytoplasm*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 16651-8.
101. Yang, Y., et al., *GAB2 induces tumor angiogenesis in NRAS-driven melanoma*. Oncogene, 2012.
102. Fantozzi, A. and Christofori, G., *Mouse models of breast cancer metastasis*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(4): p. 212.
103. Palmieri, D., et al., *Her-2 overexpression increases the metastatic outgrowth of breast cancer cells in the brain*. Cancer research, 2007. **67**(9): p. 4190-8.
104. Bunn, F., Jones, D.J., and Bell-Syer, S., *Prophylactic antibiotics to prevent surgical site infection after breast cancer surgery*. Cochrane Database Syst Rev, 2012. **1**: p. CD005360.
105. Yurek, D., Farrar, W., and Andersen, B.L., *Breast cancer surgery: comparing surgical groups and determining individual differences in postoperative sexuality and body change stress*. J Consult Clin Psychol, 2000. **68**(4): p. 697-709.

106. Hilton, J., et al., *BRCA1 protein levels and PIK3CA mutations as predictive biomarkers for response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer: An exploratory analysis*. *Oncol Lett*, 2012. **4**(1): p. 141-145.
107. Mukesh, M., Harris, E., Jena, R., Evans, P., and Coles, C., *Relationship between irradiated breast volume and late normal tissue complications: A systematic review*. *Radiother Oncol*, 2012. **104**(1): p. 1-10.
108. Clarke, M., et al., *Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. *Lancet*, 2005. **366**(9503): p. 2087-106.
109. Schratte-Sehn, A., *Breast cancer radiotherapy*. *HAMDAN MEDICAL JOURNAL*, 2012. **5**.
110. Yoo, C., et al., *Impact of immunohistochemistry-based molecular subtype on chemosensitivity and survival in patients with breast cancer following neoadjuvant chemotherapy*. *J Breast Cancer*, 2012. **15**(2): p. 203-10.
111. Weber, G., *Biochemical strategy of cancer cells and the design of chemotherapy: G. H. A. Clowes Memorial Lecture*. *Cancer research*, 1983. **43**(8): p. 3466-92.
112. Hayes, D.F., *Targeting adjuvant chemotherapy: a good idea that needs to be proven!* *Journal of Clinical Oncology*, 2012. **30**(12): p. 1264-7.
113. Shen, K., et al., *Distinct Genes Related to Drug Response Identified in ER Positive and ER Negative Breast Cancer Cell Lines*. *Plos One*, 2012. **7**(7): p. e40900.
114. Leung, E., Kannan, N., Krissansen, G.W., Findlay, M.P., and Baguley, B.C., *MCF-7 breast cancer cells selected for tamoxifen resistance acquire new phenotypes differing in DNA content, phospho-HER2 and PAX2 expression, and rapamycin sensitivity*. *Cancer Biol Ther*, 2010. **9**(9): p. 717-24.
115. Kiyotani, K., Mushiroda, T., Nakamura, Y., and Zembutsu, H., *Pharmacogenomics of tamoxifen: roles of drug metabolizing enzymes and transporters*. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2012. **27**(1): p. 122-31.
116. Wu, H., et al., *Hypomethylation-linked activation of PAX2 mediates tamoxifen-stimulated endometrial carcinogenesis*. *Nature*, 2005. **438**(7070): p. 981-7.
117. Osborne, C.K., *Tamoxifen in the treatment of breast cancer*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(22): p. 1609-18.
118. Brueggemeier, R.W., Hackett, J.C., and Diaz-Cruz, E.S., *Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer*. *Endocrine Reviews*, 2005. **26**(3): p. 331-45.
119. Williams-Brown, M.Y., et al., *The effect of tamoxifen and raloxifene on estrogen metabolism and endometrial cancer risk*. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2011. **126**(3-5): p. 78-86.
120. Geisler, J., *Differences between the non-steroidal aromatase inhibitors anastrozole and letrozole--of clinical importance?* *Br J Cancer*, 2011. **104**(7): p. 1059-66.
121. Beguelini, M.R., et al., *Differential expression of aromatase, estrogen receptor alpha and 17beta-HSD associated with the processes of total testicular regression and recrudescence in the bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae)*. *Gen Comp Endocrinol*, 2014. **11**(14): p. 044.
122. Rose, C., et al., *An open randomised trial of second-line endocrine therapy in advanced breast cancer. comparison of the aromatase inhibitors letrozole and anastrozole*. *European Journal of Cancer*, 2003. **39**(16): p. 2318-27.

123. Goncalves, A., Viens, P., Sobol, H., Maraninchi, D., and Bertucci, F., [*Molecular alterations in breast cancer: clinical implications and new analytical tools*]. Rev Med Interne, 2005. **26**(6): p. 470-8.
124. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med, 2001. **344**(11): p. 783-92.
125. Jones, S.E., *Metastatic breast cancer: the treatment challenge*. Clin Breast Cancer, 2008. **8**(3): p. 224-33.
126. Stone, A., et al., *Tamoxifen-induced epigenetic silencing of oestrogen-regulated genes in anti-hormone resistant breast cancer*. Plos One, 2012. **7**(7): p. e40466.
127. Lu, Y., Zi, X., Zhao, Y., Mascarenhas, D., and Pollak, M., *Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin)*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(24): p. 1852-7.
128. Margariti, N., Fox, S.B., Bottini, A., and Generali, D., *"Overcoming breast cancer drug resistance with mTOR inhibitors". Could it be a myth or a real possibility in the short-term future?* Breast Cancer Res Treat, 2011. **128**(3): p. 599-606.
129. Wang, Q., et al., *Pax genes in embryogenesis and oncogenesis*. Journal of cellular and molecular medicine, 2008. **12**(6A): p. 2281-94.
130. Chi, N. and Epstein, J.A., *Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease*. Trends Genet, 2002. **18**(1): p. 41-7.
131. Dressler, G.R. and Woolf, A.S., *Pax2 in development and renal disease*. Int J Dev Biol, 1999. **43**(5): p. 463-8.
132. Beland, M. and Bouchard, M., [*PAX gene function during kidney tumorigenesis: a comparative approach*]. Bull Cancer, 2006. **93**(9): p. 875-82.
133. Eccles, M.R., et al., *PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development*. Int J Dev Biol, 2002. **46**(4): p. 535-44.
134. Mansouri, A., Hallonet, M., and Gruss, P., *Pax genes and their roles in cell differentiation and development*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(6): p. 851-7.
135. Lang, D., Powell, S.K., Plummer, R.S., Young, K.P., and Ruggeri, B.A., *PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer*. Biochem Pharmacol, 2007. **73**(1): p. 1-14.
136. Zannini, T.d.C.a.M., *Mus musculus paired box gene 8*. Transcription Factor Encyclopedia, 2009.
137. Kahraman, K., et al., *Expression pattern of PAX2 in hyperplastic and malignant endometrium*. Arch Gynecol Obstet, 2012. **286**(1): p. 173-8.
138. Li, C.G. and Eccles, M.R., *PAX Genes in Cancer; Friends or Foes?* Front Genet, 2012. **3**: p. 6.
139. Robson, E.J., He, S.J., and Eccles, M.R., *A PANorama of PAX genes in cancer and development*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(1): p. 52-62.
140. Bose, S.K., Gibson, W., Bullard, R.S., and Donald, C.D., *PAX2 oncogene negatively regulates the expression of the host defense peptide human beta defensin-1 in prostate cancer*. Molecular Immunology, 2009. **46**(6): p. 1140-8.
141. <http://www.scht.com/>.
142. de Graaff, A.A., et al., *Paired-box gene 2 is down-regulated in endometriosis and correlates with low epidermal growth factor receptor expression*. Hum Reprod, 2012. **27**(6): p. 1676-84.

143. Silberstein, G.B., Dressler, G.R., and Van Horn, K., *Expression of the PAX2 oncogene in human breast cancer and its role in progesterone-dependent mammary growth*. *Oncogene*, 2002. **21**(7): p. 1009-16.
144. Leao, R.B., et al., *Differences in estrogen and progesterone receptor expression in endometrial polyps and atrophic endometrium of postmenopausal women with and without exposure to tamoxifen*. *Mol Clin Oncol.*, 2013. **1**(6): p. 1055-1060. Epub 2013 Sep 12.
145. Dang, M., et al., *Regulated ADAM17-dependent EGF family ligand release by substrate-selecting signaling pathways*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(24): p. 9776-81.
146. Stenflo, J., *Structure-function relationships of epidermal growth factor modules in vitamin K-dependent clotting factors*. *Blood*, 1991. **78**(7): p. 1637-51.
147. Eccles, S.A., *The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology*. *Int J Dev Biol*, 2011. **55**(7-9): p. 685-96.
148. Wang, G.L. and Semenza, G.L., *Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(3): p. 1230-7.
149. Zepeda, A.B., et al., *Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS*. *Cell Biochem Funct*, 2013. **31**(6): p. 451-9.
150. Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
151. Strieter, R.M., *Masters of angiogenesis*. *Nat Med*, 2005. **11**(9): p. 925-7.
152. Wang, G.L. and Semenza, G.L., *Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction*. *Blood*, 1993. **82**(12): p. 3610-5.
153. Sutter, C.H., Laughner, E., and Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2000. **97**(9): p. 4748-53.
154. Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., and Bunn, H.F., *Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(50): p. 32253-9.
155. Acs, G., et al., *Autocrine erythropoietin signaling inhibits hypoxia-induced apoptosis in human breast carcinoma cells*. *Cancer Lett*, 2004. **214**(2): p. 243-51.
156. Blagosklonny, M.V., et al., *p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(20): p. 11995-8.
157. Semenza, G.L., *Molecular mechanisms mediating metastasis of hypoxic breast cancer cells*. *Trends Mol Med.*, 2012. **18**(9): p. 534-43. doi: 10.1016/j.molmed.2012.08.001. Epub 2012 Aug 23.
158. Hohenberger, P., Felgner, C., Haensch, W., and Schlag, P.M., *Tumor oxygenation correlates with molecular growth determinants in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat.*, 1998. **48**(2): p. 97-106.
159. Smollich, M., et al., *Selective ETAR antagonist atrasentan inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion*. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. **108**(2): p. 175-82.

160. Keith, B. and Simon, M.C., *Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer*. Cell., 2007. **129**(3): p. 465-72.
161. Stingl, J. and Caldas, C., *Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis*. Nat Rev Cancer., 2007. **7**(10): p. 791-9.
162. Cho, J., Kim, D., Lee, S., and Lee, Y., *Cobalt chloride-induced estrogen receptor alpha down-regulation involves hypoxia-inducible factor-1alpha in MCF-7 human breast cancer cells*. Mol Endocrinol., 2005. **19**(5): p. 1191-9. Epub 2005 Feb 3.
163. Beauchemin, D., Lacombe, C., and Van Themsche, C., *PAX2 is activated by estradiol in breast cancer cells of the luminal subgroup selectively, to confer a low invasive phenotype*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 148.
164. Cai, Y., et al., *Phosphorylation of Pax2 by the c-Jun N-terminal kinase and enhanced Pax2-dependent transcription activation*. J Biol Chem., 2002. **277**(2): p. 1217-22. Epub 2001 Nov 7.
165. Villanueva, S., Cespedes, C., and Vio, C.P., *Ischemic acute renal failure induces the expression of a wide range of nephrogenic proteins*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., 2006. **290**(4): p. R861-70. Epub 2005 Nov 10.
166. Ross, H.H., et al., *In vivo intermittent hypoxia elicits enhanced expansion and neuronal differentiation in cultured neural progenitors*. Exp Neurol., 2012. **235**(1): p. 238-45. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.01.027. Epub 2012 Feb 14.
167. Dressler, G.R., *Pax-2, kidney development, and oncogenesis*. Med Pediatr Oncol., 1996. **27**(5): p. 440-4.
168. Lacroix, M. and Leclercq, G., *Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update*. Breast Cancer Res Treat, 2004. **83**(3): p. 249-89.
169. Levenson, A.S. and Jordan, V.C., *MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line*. Cancer research, 1997. **57**(15): p. 3071-8.
170. Charafe-Jauffret, E., et al., *Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers*. Oncogene, 2006. **25**(15): p. 2273-84.
171. Salnikow, K., Su, W., Blagosklonny, M.V., and Costa, M., *Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism*. Cancer Res., 2000. **60**(13): p. 3375-8.
172. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer., 2003. **3**(10): p. 721-32.
173. Katzenellenbogen, B.S., Kendra, K.L., Norman, M.J., and Berthois, Y., *Proliferation, hormonal responsiveness, and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cancer cells grown in the short-term and long-term absence of estrogens*. Cancer Res., 1987. **47**(16): p. 4355-60.
174. Surazynski, A., Miltyk, W., Prokop, I., and Palka, J., *The effect of estrogen on prolidase-dependent regulation of HIF-1alpha expression in breast cancer cells*. Mol Cell Biochem., 2013. **379**(1-2): p. 29-36. doi: 10.1007/s11010-013-1623-9. Epub 2013 Apr 3.
175. Breindel, J.L., et al., *EGF Receptor Activates MET through MAPK to Enhance Non-Small Cell Lung Carcinoma Invasion and Brain Metastasis*. Cancer research, 2013. **73**(16): p. 5053-65.
176. Lan, T., et al., *Type II cGMP-dependent protein kinase inhibits EGF-induced MAPK/JNK signal transduction in breast cancer cells*. Oncology reports, 2012. **27**(6): p. 2039-44.

177. Mut, M., Lule, S., Demir, O., Kurnaz, I.A., and Vural, I., *Both mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular-signal-regulated kinases (ERK) 1/2 and phosphatidylinositide-3-OH kinase (PI3K)/Akt pathways regulate activation of E-twenty-six (ETS)-like transcription factor 1 (Elk-1) in U138 glioblastoma cells*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2012. **44**(2): p. 302-10.
178. Liu, S., Cieslinski, D.A., Funke, A.J., and Humes, H.D., *Transforming growth factor-beta 1 regulates the expression of Pax-2, a developmental control gene, in renal tubule cells*. Experimental nephrology, 1997. **5**(4): p. 295-300.
179. Gordon, J.A., Sodek, J., Hunter, G.K., and Goldberg, H.A., *Bone sialoprotein stimulates focal adhesion-related signaling pathways: role in migration and survival of breast and prostate cancer cells*. J Cell Biochem., 2009. **107**(6): p. 1118-28. doi: 10.1002/jcb.22211.
180. Lotz, M., Wang, H.H., Cance, W., Matthews, J., and Pories, S., *Epidermal growth factor stimulation can substitute for c-Src overexpression in promoting breast carcinoma invasion*. J Surg Res., 2003. **109**(2): p. 123-9.
181. Fu, O.Y., Hou, M.F., Yang, S.F., Huang, S.C., and Lee, W.Y., *Cobalt chloride-induced hypoxia modulates the invasive potential and matrix metalloproteinases of primary and metastatic breast cancer cells*. Anticancer research, 2009. **29**(8): p. 3131-8.
182. Cronin, P.A., Wang, J.H., and Redmond, H.P., *Hypoxia increases the metastatic ability of breast cancer cells via upregulation of CXCR4*. BMC Cancer., 2010. **10:225**.(doi): p. 10.1186/1471-2407-10-225.
183. Beato, M., Herrlich, P., and Schutz, G., *Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot*. Cell, 1995. **83**(6): p. 851-7.
184. La Rosa, P., Pesiri, V., Marino, M., and Acconcia, F., *17beta-Estradiol-induced cell proliferation requires estrogen receptor (ER) alpha monoubiquitination*. Cellular signalling, 2011. **23**(7): p. 1128-35.
185. Buttiglieri, S., et al., *Role of Pax2 in apoptosis resistance and proinvasive phenotype of Kaposi's sarcoma cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4136-43.
186. Patricio, P., et al., *Deregulation of PAX2 expression in renal cell tumours: mechanisms and potential use in differential diagnosis*. Journal of cellular and molecular medicine, 2013.
187. Zhang, H.S., et al., *PAX2 protein induces expression of cyclin D1 through activating AP-1 protein and promotes proliferation of colon cancer cells*. J Biol Chem, 2012. **287**(53): p. 44164-72.
188. Burger, M.C., et al., *PAX2 is an antiapoptotic molecule with deregulated expression in medulloblastoma*. International journal of oncology, 2012. **41**(1): p. 235-41.
189. Barton, M., *Position paper: The membrane estrogen receptor GPER--Clues and questions*. Steroids., 2012. **77**(10): p. 935-42. .
190. Madak-Erdogan, Z., et al., *Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(9): p. 2116-27.
191. Ruan, S.Q., et al., *Heregulin-beta1-induced GPR30 upregulation promotes the migration and invasion potential of SkBr3 breast cancer cells via ErbB2/ErbB3-MAPK/ERK pathway*. Biochem Biophys Res Commun., 2012. **420**(2): p. 385-90. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.004. Epub 2012 Mar 8.

192. Wei, Y., et al., *Nuclear estrogen receptor-mediated Notch signaling and GPR30-mediated PI3K/AKT signaling in the regulation of endometrial cancer cell proliferation*. *Oncol Rep.*, 2012. **27**(2): p. 504-10. doi: 10.3892/or.2011.1536. Epub 2011 Nov 8.
193. Maggiolini, M., et al., *The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells*. *J Biol Chem.*, 2004. **279**(26): p. 27008-16. Epub 2004 Apr 16.
194. Filardo, E.J., et al., *Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression*. *Clin Cancer Res.*, 2006. **12**(21): p. 6359-66.
195. Dennis, M.K., et al., *Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity*. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 2011. **127**(3-5): p. 358-66. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.07.002. Epub 2011 Jul 14.
196. Couse, J.F. and Korach, K.S., *Contrasting phenotypes in reproductive tissues of female estrogen receptor null mice*. *Ann N Y Acad Sci.*, 2001. **948**: p. 1-8.
197. Iafrati, M.D., et al., *Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice*. *Nat Med.*, 1997. **3**(5): p. 545-8.
198. Martensson, U.E., et al., *Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice*. *Endocrinology.*, 2009. **150**(2): p. 687-98. doi: 10.1210/en.2008-0623. Epub 2008 Oct 9.
199. Wessler, S., Otto, C., Wilck, N., Stangl, V., and Fritzemeier, K.H., *Identification of estrogen receptor ligands leading to activation of non-genomic signaling pathways while exhibiting only weak transcriptional activity*. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2006. **98**(1): p. 25-35.
200. Lazennec, G., Bresson, D., Lucas, A., Chauveau, C., and Vignon, F., *ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells*. *Endocrinology*, 2001. **142**(9): p. 4120-30.
201. Leung, Y.K., Lee, M.T., Lam, H.M., Tarapore, P., and Ho, S.M., *Estrogen receptor-beta and breast cancer: translating biology into clinical practice*. *Steroids*, 2012. **77**(7): p. 727-37.
202. Monje, P. and Boland, R., *Expression and cellular localization of naturally occurring beta estrogen receptors in uterine and mammary cell lines*. *Journal of cellular biochemistry*, 2002. **86**(1): p. 136-44.
203. Shaaban, A.M., et al., *Nuclear and cytoplasmic expression of ERbeta1, ERbeta2, and ERbeta5 identifies distinct prognostic outcome for breast cancer patients*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2008. **14**(16): p. 5228-35.
204. Wilson, K.J., Gilmore, J.L., Foley, J., Lemmon, M.A., and Riese, D.J., 2nd, *Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer*. *Pharmacology & therapeutics*, 2009. **122**(1): p. 1-8.
205. Price, D.J., Avraham, S., Feuerstein, J., Fu, Y., and Avraham, H.K., *The invasive phenotype in HMT-3522 cells requires increased EGF receptor signaling through both PI 3-kinase and ERK 1,2 pathways*. *Cell communication & adhesion*, 2002. **9**(2): p. 87-102.

206. Zhang, H., et al., *HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs*. *Oncogene*, 2012. **31**(14): p. 1757-70.
207. Salnikow, K., An, W.G., Melillo, G., Blagosklonny, M.V., and Costa, M., *Nickel-induced transformation shifts the balance between HIF-1 and p53 transcription factors*. *Carcinogenesis*, 1999. **20**(9): p. 1819-23.
208. Canning, M.T., Postovit, L.M., Clarke, S.H., and Graham, C.H., *Oxygen-mediated regulation of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression by invasive cells*. *Exp Cell Res.*, 2001. **267**(1): p. 88-94.
209. Cardone, R.A., et al., *The NHERF1 PDZ2 domain regulates PKA-RhoA-p38-mediated NHE1 activation and invasion in breast tumor cells*. *Mol Biol Cell.*, 2007. **18**(5): p. 1768-80. Epub 2007 Mar 1.
210. Ji, F., et al., *Hypoxia inducible factor 1alpha-mediated LOX expression correlates with migration and invasion in epithelial ovarian cancer*. *Int J Oncol.*, 2013. **42**(5): p. 1578-88. doi: 10.3892/ijo.2013.1878. Epub 2013 Mar 29.