

### Mise en évidence d'un dialogue entre la signalisation œstrogénique et le syndécane-1 dans les cellules de carcinome mammaire humain MCF7

Emmanuelle Fleurot

#### ► To cite this version:

Emmanuelle Fleurot. Mise en évidence d'un dialogue entre la signalisation œstrogénique et le syndécane-1 dans les cellules de carcinome mammaire humain MCF7. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2017. Français. NNT: 2017NORMC423. tel-01794495

### HAL Id: tel-01794495 https://theses.hal.science/tel-01794495

Submitted on 17 May 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



### THESE

### Pour obtenir le diplôme de doctorat

### Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Mise en évidence d'un dialogue entre la signalisation œstrogénique et le syndécane-1 dans les cellules de carcinome mammaire humain MCF7

### Présentée et soutenue par Emmanuelle FLEUROT

Thèse soutenue publiquement le 17 novembre 2017 devant le jury composé de		
Mme Muriel Le ROMANCER	Directeur de Recherche INSERM, Université de Lyon	Rapporteur
Mme Patricia ROUSSELLE	Directeur de Recherche CNRS, Université de Lyon	Rapporteur
Mr Noureddine BOUJRAD	Professeur des Universités, Université de Rennes	Examinateur
Mme Raffaèle FAUVET	PU-PH, Université de Caen Normandie	Examinateur
Mr Jérôme LEVALLET	Maître de Conférences-HDR, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Jérôme LEVALLET, Laboratoire Œstrogènes, Reproduction, Cancer (OeReCa). EA2608.



UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

EdNBISE **Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative**, Santé, Environnement



### Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'EA 2608 OeReCa, laquelle est dirigée par le Docteur Christelle Delalande qui a succédé au Professeur Pierre-Jacques Bonnamy. Je les remercie de leur accueil.

Je tiens à remercier Mme Patricia Rousselle et Mme Muriel Le Romancer, toutes deux directrices de recherche INSERM, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Mes remerciements vont également aux Professeurs Raffaèle Fauvet et Noureddine Boujrad pour avoir consenti à participer à ce jury de thèse.

Je remercie chaleureusement le Docteur Jérôme Levallet de m'avoir accordé sa confiance dans la réalisation de ce projet de thèse ainsi que pour sa grande disponibilité et sa bienveillance. Je le remercie également pour m'avoir encouragé à faire de l'enseignement.

J'adresse mes remerciements à tous les membres et anciens membres du laboratoire OeReCa (Hélène Bouraima, Carine Travert, Hervé Mittre, Annie Benhaim et Guénaelle Levallet). Qu'ils sachent que leur bonne humeur et leurs conseils dispensés lors des réunions scientifiques m'ont été bénéfiques. J'adresse plus particulièrement mes remerciements à Vincent Hanoux pour ses nombreux conseils et sa disponibilité.

Je remercie également Jean-Baptiste pour son appui lors des travaux pratiques de Licence ainsi qu'Isabelle pour son soutien, son optimisme et son assistance pour les manips de microscopie électronique. Un merci tout particulier à Jeannine pour son extrême bienveillance et sa gentillesse.

Je tiens également à remercier les personnels des différentes plateformes de l'Université de Caen : Maryline Guillamin en Cytométrie, Didier Goux et Nicolas Elie en Microscopie, Benoit Bernay et Julien Pontin à la plateforme Proteogen.

Cette thèse a été réalisée dans la bonne humeur malgré quelques coups durs grâce à la présence des filles : Elodie, Maureen, Camille, Vanessa, Renata, Fatemeh, Solenn, Julie, Anne-Sophie, Justine, Anne-Charlotte, Marie, Judith, Alysson et Mélanie. J'ai eu également plaisir à encadrer mes « deux petites stagiaires » Caroline et Marine.

Une petite pensée pour les membres de mon ancien laboratoire de Master (le BIOS) ainsi qu'à mes anciennes facultés de formation (Besançon et Reims) où j'ai pu acquérir un enseignement de qualité et fait de nombreux TP (comme dirait le proverbe : Binôme d'un jour, Binôme de toujours...).

Je voudrais simplement exprimer ma gratitude à Fanfan, Tata Brigitte, Christiane, Audrey et Marie-Christine qui m'ont offert le gîte et le couvert lors de mes différents congrès à Paris, Besançon, et Freiburg me permettant ainsi de valoriser les travaux de cette thèse.

Merci à mes amis caennais (Eva, Miléna, Laura, Robin, Xavier, Patrick et Thibault), la thèse n'aurait pas été la même sans vous !

À Fanny et Anastasia, que de chemin parcouru... à nous de construire l'avenir... !

À ma famille pour avoir toujours été là et s'intéresser à ce que je faisais !

Un immense merci à mes Parents, à Damien ainsi qu'à mes deux sœurs (Louise et Marie) pour avoir toujours été là et m'avoir poussée dans les moments difficiles !

# Table des matières

Liste d	les fi	gures	1
Liste d	les ta	bleaux	3
Liste d	les al	bréviations	5
Préam	bule		11
Introd	uctio	n	15
Cha	pitre	1 : Le cancer du sein	17
I	Le	e tissu sain	18
	I.1	Anatomie du sein	18
	1.2	Histologie du sein	20
	1.3	Le remodelage physiologique du sein	23
II	Le	e cancer du sein	25
	II.1	Prévalence du cancer du sein	25
	II.2	Etiologie et facteurs de risque	26
	II.3	Caractéristiques génétiques des tumeurs mammaires	27
	II.1	Caractérisation et classification des tumeurs mammaires	29
Cha	pitre	2 : La signalisation œstrogénique dans la carcinogenèse mammaire	33
I	Le	es æstrogènes et la signalisation æstrogénique	34
	I.1	Les œstrogènes	34
	1.2	Les récepteurs aux œstrogènes	38
	1.3	La signalisation œstrogénique	43
	1.4	Régulation transcriptionnelle	49
П	Ir	nplication des œstrogènes dans la carcinogenèse mammaire	54
	II.1	La carcinogenèse mammaire	54
	II.2	Implication d'ERα dans la carcinogenèse mammaire	56
	II.3	Dérégulation des acteurs de la signalisation œstrogénique dans le cancer du sein	58
	11.4	Traitement du cancer et hormonothérapie	59
Cha	pitre	3 : Le syndécane-1	61
I	G	énéralités	62
П	E	xpression du SDC-1	63
	II.1	Le gène	63
	II.2	Expression du SDC-1 au cours de l'embryogenèse	65
	II.3	Régulation transcriptionnelle du SDC-1	65
	11.4	Régulation post-transcriptionnelle du SDC-1	66

III	l Le	SDC-1 : un protéoglycane à héparane sulfate	68
	III.1	La partie glucidique du SDC-1	68
	111.2	L'axe protéique : structure et fonction	70
IV	/ Le	clivage de l'ectodomaine : « shedding » du SDC-1	76
	IV.1	Généralités	76
	IV.2	L'héparanase	76
	IV.3	Clivage de l'axe protéique : les protéases matricielles	81
V	La	localisation nucléaire du SDC-1	82
	V.1	Mécanisme	82
	V.2	Rôle	83
V	I Le	e syndécane-1 et le cancer du sein	84
Object	tifs		87
Matér	riel et	Méthodes	89
I	Li	ste de fournisseurs	90
П	Cu	ulture cellulaire	93
	II.1	Lignées cellulaires	93
	II.2	Entretien des cellules	96
	II.3	Privation des cellules et traitements	97
111	I A	nalyse des messagers	101
	III.1	Extraction des ARN totaux	101
	111.2	Dosage et évaluation qualitative des ARN extraits	101
	III.3	Digestion de l'ADN bactérien	101
	111.4	Transcription inverse	102
	III.5	PCR en temps réel	102
١v	/ Ai	nalyse protéique	104
	IV.1	Extractions des protéines totales	104
	IV.2	Dosage protéique Bradford/ préparation des échantillons	105
	IV.3	Western blot	105
	IV.4	Immunocytochimie	108
	IV.5	Microscopie électronique en transmission	110
	IV.6	Analyse du clivage protéolytique du SDC-1 par cytométrie en flux	111
V	Τe	ests cellulaires	111
	V.1	Etude de la prolifération cellulaire : coloration au cristal violet	111
	V.2	Test de migration par blessure	112
V	I A	nalyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux	112
V	II A	nalyse statistique	112

Résulta	ts	113
Valida	ation des outils	115
I	Détermination du gène de ménage (PCR quantitative)	116
П	Expression des ER dans la lignée MCF7	118
111	Discussion	119
Article	e 1 : Implication de la signalisation œstrogénique dans la régulation de l'e	pression
du SD	C-1	121
Implic	cation de l'œstradiol dans le clivage protéolytique du SDC-1	167
I	Expression de l'HPSE	169
II	Maturation des formes latentes de l'HPSE	171
111	Régulation de l'expression des MMP et TIMP par l'œstradiol	172
IV	Évaluation du clivage protéolytique du SDC-1	173
V	Discussion	174
Article	e 2 : Rôle du SDC-1 dans la régulation de la signalisation œstrogénique et c	les
proce	ssus cellulaires œstrogéno-induits	179
Discussi	ion Générale et Perspectives	217
Conclus	ion	227
Bibliogr	aphie	229

# Liste des figures

Figure 1 : Représentation anatomique du sein	18
Figure 2 : Coupe histologique du tissu mammaire	. 19
Figure 3 : Représentation schématique d'une unité tubulo-alvéolaire	. 21
Figure 4 : Immunomarquage de la lame basale	. 21
Figure 5 : Ramification de la glande mammaire	. 23
Figure 6 : Incidence du cancer du sein et de sa mortalité chez la femme en France	. 25
Figure 7 : Histologie des carcinomes mammaires	. 29
Figure 8 : Biosynthèse des œstrogènes chez l'Homme	. 34
Figure 9 : Concentrations moyennes des hormones stéroïdiennes	. 36
Figure 10 : Concentrations plasmatiques des hormones lors de la grossesse	. 36
Figure 11 : Organes cibles des œstrogènes chez la femme	. 37
Figure 12 : Structures des 3 principales isoformes d'ERa	. 39
Figure 13 : Les récepteurs aux œstrogènes ERα et ERβ	41
Figure 14 : Modèle d'activation de la signalisation œstrogénique	43
Figure 15 : Conformation d'ERα suite à la liaison d'un agoniste	45
Figure 16 : Le récepteur GPER induit les voies kinasiques	48
Figure 17: Localisation des sites de phosphorylation d'ERa66 étudiés lors de ce travail	49
Figure 18 : Sites de modifications post-traductionnelles présents sur ERa	50
Figure 19 : Assemblage du complexe transcriptionnel recruté via ERa	53
Figure 20 : Les étapes de la carcinogenèse	54
Figure 21 : Représentation schématique des HSPG à la membrane plasmique	62
Figure 22 : Mise en évidence de l'expression du SDC-1	63
Figure 23 : Structures des chaines d'héparane sulfate et de chondroïtine sulfate	68
Figure 24 : Structure du SDC-1	71
Figure 25 : Étapes de maturation de l'héparanase	78
Figure 26 : Sites de clivage présents sur l'ectodomaine du SDC-1	81
Figure 27 : Observation des cellules MCF7 au microscope optique	. 93
Figure 28 : Tri et remise en culture des cellules MCF7 surexprimant le SDC-1	. 96
Figure 29 : Expression des gènes de référence dans les cellules MCF7	117
Figure 30 : Expression basale des récepteurs ERa dans les cellules MCF7	118
Figure 31 : Expression génique de l'HPSE	169
Figure 32 : Expression protéique de la pré-proHPSE	170
Figure 33 : Maturation de la pré-proHPSE	171
Figure 34 : Évaluation du clivage protéolytique du SDC-1 par cytométrie en flux	173

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification TNM du cancer du sein	30
Tableau 2 : Classification moléculaire des tumeurs	32
Tableau 3 : Liste des siRNA utilisés	98
Tableau 4 : Liste des agonistes/activateurs utilisés	99
Tableau 5 : Liste des antagonistes/inhibiteurs utilisés	100
Tableau 6 : Liste des amorces utilisées en qPCR	103
Tableau 7 : Composition des tampons de lyse	104
Tableau 8 : Anticorps utilisés pour le western blot	107
Tableau 9 : Anticorps utilisés pour l'immunofluorescence	109
Tableau 10 : Expression des MMP et des TIMP dans les cellules MCF7	172

## Liste des

## abréviations

	-a-
AD :	Activation domain
ADAM :	A disintegrin and metalloprotease
AF:	Activation function
Akt :	Protéine kinase B
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1 :	Activator protein-1
APS :	Ammonium persulfate
	-b-
BRCA :	Breast cancer
BSA :	Bovine albumin serum
	-C-
CBP :	CREB-binding protein
Cdc :	Cell-division cycle protein
CDH :	Cadhérine
CDK2 :	Cyclin-dependent kinase 2
CREB :	cAMP response element binding protein
CS :	Chrondroïtine sulfate
Ct:	Cycle threshold
Ctr :	Control
	-d-
DBD :	DNA-binding domain
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DPBS :	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

DR-1 : Direct Repeat 1

-e-

E2:	17β-œstradiol
	r,p contactor

- EDTA : Ethylène diamine tétraacétique
- EGF : Epidermal growth factor
- EGFR : Epidermal growth factor receptor
- ER : Estrogen receptor
- ERE : Élement de réponse aux œstrogènes
- ERK : Extracellular signal-regulated kinases
- ESR : Estrogen receptors

#### -f-

- FACS :Fluorescence-activated cell sortingFGF :Fibroblast growth factorFGFR1 :Fibroblast growth factor receptor 1FiRE :FGF-inductible response elementFOXA1 :Forkhead box protein A1
- FOXO : Forkhead box class O
- FSH : Hormone folliculo-stimulante

#### -g-

- GAG : Glycosaminoglycane
- GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
- GATA : GATA Binding Protein
- GPER : G-protein coupled estrogen receptor

#### -h-

- Has-miR: Homo sapiens micro ARN
- HDAC : Histone deacetylase
- HER2 : Human epidermal growth factor receptor 2
- HGF : Hepatocyte growth factor
- HPSE : Héparanase
- HRP : Horseradish peroxidase
- HS : Héparane sulfate
- HSP : Heat shock proteins
- HSPG : Protéoglycane à héparane sulfate

#### -i-

- ICI : ICI 182,780
- IGF-1 : Insulin-like growth factor-1
- IGF1R : Insulin-like growth factor 1 receptor
- IKK : IKB kinase
- IL: Interleukine

#### -j-

JNK : c-Jun N-terminal kinases

#### -k-

KO: Knock out

#### -1-

- LBD : Ligand-binding domain
- LDL : Low-density lipoprotein
- LH : Hormone lutéinisante
- LRP: Low-density lipoprotein-receptor related protein

#### -m-

- MAPK : Mitogen-activated protein kinase
- MaSCs : Cellules souches mammaires
- MCF: Michigan Cancer Foundation
- MEC : Matrice extracellulaire
- MEK : Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase
- miRNA : Micro ARN
- M-MLV RT : Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
- MMP : Métalloprotéase matricielle
- MPR : Mannose 6-phosphate receptor

MT1-MMP: Membrane type 1-matrix metalloproteinase

#### -n-

- NCOR : Nuclear receptor corepressor
- NF-κB : Nuclear factor-kappa B
- NLS : Nuclear localization signal

#### -p-

- p53 : Protein 53
- PPAR $\gamma$ : Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$
- pCAF: p300 CBP associated factor
- pCMV : Promoteur de cytomégalovirus
- PCR : Polymerase chain reaction
- PDZ : Postsynaptic Density-95/Disc large protein/Zonula occludens-1
- PFA : Paraformaldéhyde
- PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
- PI3KCA : Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
- PKA, PKC : Protéine kinase A, C
- PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride

PR:	Progesterone Receptor
PRMT1:	Protein Arginine Methyltransferase 1
proHPSE :	Prohéparanase
	-S-
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
	-t-
TA :	Température ambiante
TBS :	Tris-buffered saline
TBS-T:	Tris-buffered saline with tween 20
TEM :	Transition épithélio-mésenchymateuse
TEMED :	N,N,N,N'-tetramethylenediamine
Tiam1 :	T-cell lymphoma invasion and metastasis gene 1
TGF :	Transforming growth factor
Tp53 :	Tumour protein of 53 kilodaltons
Tm :	Melting temperature
TNF :	Tumor necrosis factor
	-u-
UTR :	Untranslated transcribed tegion
	-V-
VEGF :	Vascular endothelial growth factor
VEGFR2 :	Vascular endothelial growth factor receptor 2

# Préambule

Le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez les femmes dans le monde. C'est une maladie hétérogène due à l'acquisition progressive de mutations menant à la dérégulation de la physiologie mammaire. Au cours de ce processus, les cellules cancéreuses mammaires acquièrent de nouvelles propriétés biologiques et phénotypiques menant à la dérégulation de la physiologie du sein (Guiu et al., 2012). Par exemple, elles acquièrent de nouvelles compétences en réponse aux signaux hormonaux, aux facteurs de croissance, ou vis-à-vis des éléments du microenvironnement cellulaire leur permettant *in fine* de se multiplier et d'envahir d'autres tissus.

Environ 70 à 75 % des cancers du sein expriment le récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes (ER $\alpha$ ) qui est le principal médiateur des effets tumorigéniques des œstrogènes dans la cellule. Les œstrogènes en se liant à leurs récepteurs activent des cascades de signalisation qui régulent l'expression de nombreux gènes contrôlant à la fois le métabolisme, la progression du cycle cellulaire ou l'apoptose et favorisant *in fine* la croissance tumorale. La dépendance aux œstrogènes a été exploitée avec succès dans les cancers ER (+) pour développer les thérapies anti-hormonales. Ces traitements ne sont pas totalement efficaces et 20 à 30 % des patientes ne répondent pas au traitement ou acquièrent une résistance entraînant une rechute (García-Becerra et al., 2012). Ainsi, des cibles thérapeutiques supplémentaires sont nécessaires pour surmonter ces résistances et pour le traitement des sous-types ER (-). Ces derniers, plus agressifs, sont caractérisés par une croissance rapide indépendante des œstrogènes et donc insensibles aux thérapies ciblant ER $\alpha$ .

Le syndécane-1 (SDC-1), un protéoglycane à héparane sulfate transmembranaire, est un récepteur matriciel, mais aussi un co-récepteur pour de nombreux facteurs de croissance (Couchman, 2010; Stepp et al., 2015). Ce protéoglycane pourrait être une cible thérapeutique dans de nombreux cancers de par son rôle clé dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) où il régule l'organisation du cytosquelette, la signalisation intracellulaire, mais aussi les interactions de la cellule avec son micro-environnement.

12

Dans le cancer du sein, l'expression du SDC-1 apparaît associée à la progression tumorale, à l'angiogenèse, à un grade histologique plus élevé et à une diminution de la survie sans progression (Barbareschi et al., 2003; Maeda et al., 2006). Le SDC-1 semble être un marqueur d'agressivité et de chimiorésistance dans le carcinome du sein humain (Barbareschi et al., 2003; Götte et al., 2006). De plus, une étude montre que l'expression du SDC-1 pourrait être inversement corrélée à l'expression du récepteur ER $\alpha$  chez les patientes ER (+) (Barbareschi et al., 2003).

Nous avons précédemment montré dans des cellules cancéreuses de la granulosa humaine que la surexpression du SDC-1 s'accompagne d'une inhibition de la synthèse des œstrogènes et du récepteur ER $\beta$  (Colombe et al., 2017). À partir de ces données, nous avons ainsi émis l'hypothèse de l'existence d'un antagonisme entre la signalisation œstrogénique et celle liée au SDC-1 dans les cellules tumorales mammaires.

Ce manuscrit comporte une partie introductive composée de trois chapitres permettant de présenter les différents acteurs de ce travail. Le premier chapitre présentera des éléments clés de la physiologie du sein et de sa structure ainsi que des éléments de base sur le cancer du sein permettant de contextualiser cette étude. Le second chapitre présentera les acteurs de la signalisation œstrogénique, son fonctionnement ainsi que son rôle dans la carcinogenèse mammaire. Le troisième chapitre, s'attachera à présenter la structure du SDC-1 ainsi que les rôles qui y sont associés pour finalement focaliser sur les conséquences de sa dérégulation dans le cancer du sein.

Les résultats obtenus lors de ce travail de thèse ont été divisés en 4 parties afin d'améliorer la lisibilité de ceux-ci. La première partie présente des résultats préliminaires, la seconde partie présentée sous forme d'article focalise sur le rôle de la signalisation œstrogénique dans l'expression du SDC-1. La troisième partie de ce travail a consisté à étudier le rôle de la signalisation œstrogénique dans le clivage du SDC-1. Elle n'a, pour le moment, pas vocation à être publiée. La quatrième et dernière partie de ces travaux de thèse sera également présentée sous forme d'un article et mettra en évidence les conséquences d'une dérégulation de l'expression du SDC-1 sur la signalisation œstrogénique et les processus œstrogéno-induits.

Le manuscrit se terminera par une discussion et une conclusion générale.

# Introduction

## **Chapitre 1 : Le cancer du sein**

#### I <u>Le tissu sain</u>

#### I.1 Anatomie du sein

Le sein est une glande exocrine tubulo-acineuse (également appelée tubulo-alvéolaire) synthétisant et sécrétant du lait. C'est un organe bilatéral se situant de chaque côté du sternum au niveau de la partie antéro-supérieure de la cage thoracique en avant du muscle pectoral droit ou gauche. Il est maintenu dans sa position par la seule présence d'attaches cutanées telles que les ligaments de Cooper (Figure 1) (Hassiotou and Geddes, 2013).





Le sein est un organe non fonctionnel à la naissance qui se développe sur le plan cellulaire, histologique et anatomique au cours d'un processus appelé mammogenèse. Le sein atteint uniquement sa maturité fonctionnelle lors de la lactation (Hassiotou and Geddes, 2013).

La glande mammaire est un organe ramifié, qui à maturité, peut être formé par le regroupement de 10 à 20 lobes. Chaque lobe est constitué de 20 à 40 lobules eux-mêmes constitués par 100 à 200 unités sécrétrices tubulo-acineuses appelées acini (Roux, 2013). Les acini permettent la synthèse et l'éjection du lait dans de petits canaux appelés canalicules se rejoignant ensuite pour former de plus gros canaux dits canaux lactifères ou galactophores (Figure 2).



<u>Figure 2 : Coupe histologique du tissu mammaire</u> La coloration hématoxyline/éosine montre l'organisation ramifiée du sein (Mills, 2012).

Les canaux galactophores convergent individuellement à l'extrémité du sein au niveau du mamelon. Environ 15 à 20 pores de canaux galactophores, correspondant certainement au nombre de lobes drainés, sont disposés de façon circonférentielle à la surface du mamelon. Celui-ci, entouré de l'aréole est constitué de fibres musculaires lisses lui permettant de contrôler l'excrétion du lait en agissant comme un sphincter (Hassiotou and Geddes, 2013; Mills, 2012).

#### I.2 Histologie du sein

D'un point de vue histologique, le sein se compose de deux parties séparées par une lame basale : une partie épithéliale fibreuse constituée à la fois par les lobules et les canaux galactophores et une partie stromale composée de tissus conjonctifs et adipeux permettant la séparation de chaque lobe et de chaque canal (Hassiotou and Geddes, 2013).

#### I.2.1 La composante épithéliale

La composante épithéliale des canaux et des lobules est formée suite à la différenciation des cellules souches mammaires (MaSCs). Ces cellules multipotentes sont localisées dans la partie inférieure de la composante épithéliale au contact de la lame basale (Figure 3). Les MaSCs sont à l'origine des progéniteurs luminaux et myoépithéliaux et sont indispensables à la formation de l'arborescence de la glande mammaire (Shackleton et al., 2006; Visvader and Stingl, 2014).

Les progéniteurs luminaux se différencient en cellules canalaires et alvéolaires. Les cellules canalaires forment la couche de cellules internes des canaux alors que les cellules alvéolaires forment celle des lobules (Hassiotou and Geddes, 2013; Visvader and Stingl, 2014).

- Les cellules canalaires présentent une expression hétérogène des récepteurs aux œstrogènes, une partie l'exprime alors que l'autre non (Visvader and Stingl, 2014). Ces cellules présentent également une forte expression du syndécane-1 qui est un protéoglycane transmembranaire fortement exprimé dans leur partie baso-latérale (Stanley et al., 1999).
- Les cellules alvéolaires sont elles-mêmes capables de se différencier en lactocytes afin de permettre la synthèse du lait lors de la lactation (Hassiotou and Geddes, 2013). Ces cellules n'expriment pas le syndécane-1 (Stanley et al., 1999) et sont globalement ER-, n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes (Sleeman et al., 2007; Visvader and Stingl, 2014).

Les progéniteurs myoépithéliaux se différencient en cellules myoépithéliales. Ces cellules constitutives de la couche externe des canaux et des lobules ont la particularité d'être contractiles (Hassiotou and Geddes, 2013; Visvader and Stingl, 2014).



*Figure 3 : Représentation schématique d'une unité tubulo-alvéolaire* (*Visvader and Stingl, 2014*)

#### I.2.2 La lame basale

La lame basale sépare la composante épithéliale de la composante stromale. Elle est majoritairement composée de fibres de collagène de type IV (Figure 4), de laminine, de nidogène et de perlecan (Insua-Rodríguez and Oskarsson, 2016).



Figure 4 : Immunomarquage de la lame basale

Le collagène IV a été immunomarqué, lequel est essentiellement présent au niveau de la lame basale qui sépare la partie épithéliale des acinis du stroma (Mills, 2012).

Il apparaît également que l'imprégnation hormonale lors de la grossesse et du cycle menstruel modifie les caractéristiques de la lame basale (Ferguson et al., 1990; Hassiotou and Geddes, 2013).

Au cours de la carcinogenèse, la lame basale subit des modifications de sa composition (Albrechtsen et al., 1981; Ferguson et al., 1990; Ioachim et al., 2002). Le collagène IV peut par exemple être dégradé par différentes enzymes dont les métalloprotéinases et les cathepsines (Insua-Rodríguez and Oskarsson, 2016). Ainsi, l'augmentation de l'expression de ces enzymes protéolytiques induit le remodelage de la lame basale qui devient perméable aux cellules mésenchymales lors de la TEM.

#### I.2.3 La composante stromale

La composante stromale de la glande mammaire est constituée par de nombreuses cellules telles que les adipocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales ainsi que les cellules impliquées dans l'immunité (macrophages et leucocytes) mais aussi par des fibres nerveuses et des vaisseaux sanguins et lymphatiques (Hassiotou and Geddes, 2013; Insua-Rodríguez and Oskarsson, 2016).

Les cellules mésenchymateuses ne sont pas à l'origine du cancer du sein cependant elles sont impliquées dans le développement des carcinomes mammaires. Par exemple, les adipocytes peuvent synthétiser des œstrogènes, une hormone sexuelle ayant un rôle oncogénique, et permettre l'initiation et la progression tumorale. Le système lymphatique et le système veineux sont quant à eux responsables de la dissémination métastatique.

Le microenvironnement cellulaire est également composé d'éléments de la matrice extracellulaire (fibronectine, fibres de collagènes (I, III, V), protéoglycanes (décorine, biglycane et syndécane)) et par leurs enzymes associées. Lors de la tumorigenèse et de la progression tumorale, des changements de la composition de la matrice extra-cellulaire sont observés (Insua-Rodríguez and Oskarsson, 2016).

#### I.3 Le remodelage physiologique du sein

Tout au long du cycle de la vie d'une femme, sous le contrôle des hormones, la glande mammaire subit des modifications lui permettant d'achever la mammogenèse et de la rendre fonctionnelle. L'imprégnation hormonale du sein contrôle en partie : le développement de la glande mammaire à la puberté, son remodelage lors de la grossesse et sa régression (appelé involution) à la ménopause (Figure 5). De plus, à chaque cycle menstruel, le sein peut subir un remodelage (Hassiotou and Geddes, 2013; Russo and Russo, 2006).



<sup>&</sup>lt;u>Figure 5 : Ramification de la glande mammaire</u> Mise en place de la ramification ducto-lobulaire de la glande mammaire chez une femme (de sa naissance à l'involution post-allaitement) (Visvader and Stingl, 2014)

À la naissance, la structure du sein est rudimentaire. Elle ne comporte aucune structure acino-lobulaire mais présente 15 à 25 canaux lactifères par sein (chez le garçon et la fille). À ce stade et jusqu'à l'allaitement, la grande mammaire ne présente aucune fonctionnalité (Hassiotou and Geddes, 2013; Roux, 2013).

À la puberté, la glande mammaire se développe chez les filles sous l'influence des hormones stéroïdiennes ( $17\beta$ -œstradiol, progestérone) mais, aussi des hormones gonadotropes (lutéinisante (LH) et folliculo-stimulante (FSH)). L'augmentation du tissu adipeux s'accompagne d'un accroissement du volume des seins. Les canaux se développent et se ramifient (segmentation galactophorique), à leur extrémité apparaît des bourgeons terminaux constitués de cellules épithéliales. La maturation de ces bourgeons, dite maturation ducto-lobulaire, permet la formation d'acini non fonctionnels. À ce stade, les acini se regroupent (groupe de 11) pour former des lobules de type 1 qui sont peu différenciés (Hassiotou and Geddes, 2013; Roux, 2013; Russo and Russo, 2006).

À partir de l'âge adulte, les lobules de type 1 se différencient en lobules de type 3. Chacun d'entre eux est formé par le regroupement d'approximativement 80 acini, cependant, ils n'ont pas de fonction sécrétoire.

Lors de la grossesse, les seins atteignent le stade le plus abouti (lobules de type 4). Ils acquièrent leur fonctionnalité notamment sous le contrôle du  $17\beta$ -æstradiol (E2) et de la progestérone (synthétisés par le placenta). Avant l'accouchement, la prolactine active la lactogenèse qui se met ainsi en place dans les acini. Ces derniers synthétisent et stockent des vacuoles de sécrétion constituées de lipides, glucides et protéines. L'ocytocine permet quant à elle l'excrétion du lait en induisant la contraction des cellules myoépithéliales. Il a été montré que les femmes ayant eu une maturation complète des lobules lors de la grossesse et de la lactation pouvait bénéficier d'un effet protecteur contre l'apparition et le développement d'une tumeur mammaire (Hassiotou and Geddes, 2013; Roux, 2013; Russo and Russo, 2006).

À la fin de l'allaitement, le lait resté dans les canaux induit l'involution de la glande mammaire. Les cellules sécrétrices rentrent en apoptose, les différentes structures lobulaires (de type 4) et canalaires composant le sein régressent au profit du tissu adipeux. La glande mammaire perd ainsi sa fonction sécrétrice jusqu'à une prochaine grossesse (Hassiotou and Geddes, 2013; Roux, 2013).

À la ménopause, l'arrêt de la fonction ovarienne entraîne une diminution de la concentration plasmatique en progestérone et  $17\beta$ -œstradiol (90 %). Cependant, la baisse de la concentration en E2 ne se reflète pas dans le sein. Cette absence de diminution peut être expliquée par une synthèse endogène d'œstradiol et par l'apport d'œstradiol sérique (Geisler, 2003). La composante épithéliale de la glande mammaire fibreuse diminue (apoptose des cellules épithéliales) au profit du tissu adipeux. Les canaux galactophores sont maintenus tandis que les acini et les lobules régressent (Russo and Russo, 2006).

Malgré un rôle majeur des hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone), les hormones de croissance ainsi que les glucocorticoïdes sont nécessaires au développement de la glande mammaire. Par exemple lors de la puberté, l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) et l'EGF (epidermal growth factor) permettent le développement des canaux galactophores en stimulant la prolifération des cellules canalaires (Stull et al., 2002).

#### II <u>Le cancer du sein</u>

#### II.1 Prévalence du cancer du sein

Le cancer du sein est un cancer à plus de 99 % féminin, il constitue le cancer le plus fréquent chez la femme en France (48 763 nouveaux cas estimés en 2012). L'incidence du cancer du sein croît régulièrement de 30 à 70 ans (Figure 6). En 2012, l'âge moyen au diagnostic était de 63 ans (Binder-Foucard et al., 2013).

Ce cancer est un véritable enjeu de santé publique, il est responsable du décès de 11 886 patientes en France métropolitaine en 2012 (Binder-Foucard et al., 2013). La mise en place d'un plan de prévention national permettant son diagnostic précoce ainsi que les mesures prises pour améliorer la prise en charge thérapeutique des patientes ont permis d'augmenter la survie nette 5 ans après le diagnostic passant de 80 % en 1989-1993 à 87 % pour la période 2005-2010 (Cowppli-Bony et al., 2016). En 2012, l'âge moyen de décès des femmes atteintes d'un cancer du sein était de 72 ans (Binder-Foucard et al., 2013).



*Figure 6 : Incidence du cancer du sein et de sa mortalité chez la femme en France* (*Binder-Foucard et al., 2013*)

Des manifestations cliniques peuvent rendre compte de l'apparition d'une tumeur mammaire et permettre un diagnostic précoce comme un écoulement anormal au niveau du mamelon, la présence d'une masse palpable dans le sein ou de ganglions durs au niveau de l'aisselle, ou encore des modifications de la peau du sein et du mamelon. L'apparition d'un eczéma au niveau du mamelon peut-être synonyme d'une maladie de Paget cependant celle-ci ne comporte pas forcément une tumeur sous-jacente. La rapidité du diagnostic est un facteur déterminant de la survie.
#### II.2 Etiologie et facteurs de risque

Le cancer mammaire a une étiologie diverse liée à des mutations génétiques ou des altérations épigénétiques induites par des facteurs hormonaux ou environnementaux et par des comportements individuels. Cependant, 10 % des cas de cancers sont intrinsèques (sans facteur de risque) puisqu'ils sont transmis de façon héréditaire (Claus et al., 1991; HEAL and CHEM Trust, 2008; Newman et al., 1988).

#### **II.2.1** Facteurs hormonaux

Les hormones et plus particulièrement les œstrogènes sont impliquées dans l'oncogenèse et le développement tumoral (Shantakumar et al., 2007). Chez les femmes ménopausées, une concentration élevée d'œstrogènes (œstrone et œstradiol) dans les urines et le sérum constitue un facteur de mauvais pronostic et est associée avec un risque élevé de présenter un cancer du sein (Friel et al., 2005).

La dose d'hormones reçue par chaque individu peut varier en fonction de leur sexe, de leur âge, du cycle de reproduction, de leur poids ou de leur environnement.

Chez les femmes ayant eu une puberté précoce et/ou une ménopause tardive l'augmentation du temps d'exposition aux œstrogènes accroit le risque de développer un cancer du sein (Friel et al., 2005; Russo and Russo, 2006; Yager and Davidson, 2006). Dans les cas de cancer à transmission familiale, une ovariectomie bilatérale engendrant l'arrêt de la synthèse endogène du  $17\beta$ -œstradiol par les ovaires, diminue considérablement le risque de développer un cancer du sein (Hilakivi-Clarke, 2000).

Cependant, bien que la concentration en 17β-œstradiol augmente fortement lors de la grossesse (facteur 100 à 1000), celle-ci diminue le risque de développer un cancer du sein 10 ans après la parturition. Ce risque tend à diminuer avec la multiplication du nombre de grossesses. Cependant, plus l'âge de la première grossesse est tardif, plus cet effet protecteur serait atténué (Britt et al., 2007)

Malgré un rapport bénéfice/risque indéniable, les œstrogènes exogènes, tels que la pilule contraceptive, ou les traitements substitutifs à base d'œstrogènes équins sans progestatifs, prescrits à la ménopause, pourraient augmenter le risque de développer un cancer du sein (Friel et al., 2005; Yager and Davidson, 2006).

Les thérapies de remplacement augmentent la densité du sein (visible à l'examen radiographique) laquelle est synonyme d'une prolifération accrue des cellules ce qui constitue un facteur de mauvais pronostic (Hassiotou and Geddes, 2013).

Les perturbateurs endocriniens tels que les bisphénols présents dans les plastiques durs, les billets ou les tickets de caisse par exemple ont une action œstrogéno-mimétique et pourraient être impliqués dans le cancer mammaire (Macon and Fenton, 2013). Par contre, les phyto-œstrogènes tels que le soja auraient quant à eux un rôle bénéfique en bloquant les effets des œstrogènes endogènes sur la progression tumorale.

#### II.2.2 Facteurs liés au comportement

La consommation d'alcool et le manque d'activité physique sont des facteurs de risque généraux de développer un cancer.

L'obésité quant à elle constitue un facteur de risque important de développer des cancers du sein et de l'utérus. L'augmentation du tissu adipeux dans le sein est associée à un accroissement de l'inflammation tumorale et à une augmentation de la synthèse endogène d'œstrogènes (Baumgarten and Frasor, 2012; Klinge, 2015; Yager and Davidson, 2006).

#### II.3 Caractéristiques génétiques des tumeurs mammaires

Sous l'effet d'agents carcinogènes, la cellule peut subir des modifications génétiques dues à des mutations et des altérations épigénétiques et être à l'origine du cancer.

Dans le cancer du sein, de nombreux promoteurs de gènes sont hyperméthylés tels que ceux codant pour le suppresseur de tumeur RASSF1A (Ras-association domain family 1, isoform A), pour les pro-apoptotiques (HOXA5 (homeobox A5), TMS1 (target of methylation-induced Silencing 1), pour la protéine de réparation de l'ADN BRAC1 (breast cancer 1) ou encore pour les protéines impliquées dans l'adhésion (E-cadhérine, cadhérine 13) (Widschwendter and Jones, 2002). Le promoteur du gène *ESR1* codant ERα apparaît lui-même méthylé dans les lignées de cancer mammaire ER négative (Ottaviano et al., 1994; Pathiraja et al., 2010). Environ 30 % des cancers mammaires sont décrits comme n'exprimant pas les récepteurs aux œstrogènes (ER).

Dans les tumeurs mammaires, les proto-oncogènes régulant la prolifération cellulaire MYC, HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) codé par le gène *ERBB2* et la cycline D1 codée par CCND1 (cyclin D1 gene) sont surexprimés (Ingvarsson, 1999). Dans le cas où le gène *ERBB2* est retrouvé amplifié (environ 30 % des cas), les choix thérapeutiques s'orientent vers l'utilisation de l'herceptine, un anticorps dirigé contre le récepteur à tyrosine kinase HER2 (Tan and Yu, 2013).

L'expression des gènes suppresseurs de tumeur *TP53* (tumour protein of 53 kilodaltons), *CDH1*, *PTEN* (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) et *BRCA1/2* est impliquée dans la préservation de la stabilité de l'information génétique. Cependant ceux-ci peuvent être mutés ou hyperméthylés dans leur région promotrice. La perte d'expression ou de fonctionnalité de ces gènes est impliquée dans l'instabilité génétique et à l'origine de l'initiation de la tumorigenèse. D'une façon générale, le gène *TP53* codant pour la protéine p53 est muté dans 15 à 34 % des cas de cancers du sein et 12 à 46 % des cancers du sein invasifs (Hassiotou and Geddes, 2013). Chez les femmes âgées de plus de 70 ans, le risque de développer un cancer est de plus de 55 % lorsque le gène *BRCA* est muté (Mavaddat et al., 2013).

Ces anomalies génétiques (mutations, modifications épigénétiques) touchent aussi bien les cellules souches, germinales, somatiques et sont responsables de modifications de l'expression de gènes ou de l'activité de protéine. L'altération de l'ADN des MaSC les transforment en cellules souches cancéreuses permettant ainsi la formation de progéniteurs ayant un ADN muté et permettant *in fine* la formation de niches tumorales (Visvader and Lindeman, 2008).

La présence d'anomalies génétiques dans les cellules germinales comme celle touchant le gène *BRCA* ou *TP53* est responsable de la transmission génétique du cancer. Ainsi, le risque de développer un cancer du sein à 50 ans est augmenté dès qu'une parente au 1<sup>er</sup> degré a elle-même développé un cancer du sein (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001).

# II.1 Caractérisation et classification des tumeurs mammaires

Les tumeurs primitives du sein sont caractérisées en fonction de critères histologiques, génétiques, moléculaires ou cliniques.

# II.1.1 Caractérisation histologique de la tumeur

Les hyperplasies issues de cellules épithéliales ductales et lobulaires peuvent être à l'origine d'adénomes (tumeurs bénignes) ou de carcinomes *in situ* lesquels se développent sous l'effet de mutations génétiques ou d'altérations épigénétiques. Les carcinomes canalaires représentent 70 à 80 % des cas de carcinome mammaire *in situ*, les carcinomes lobulaires étant plus rares (10-15 % des cas) (Edge and Compton, 2010; Rivenbark et al., 2013).

Les cellules de carcinome peuvent se transformer en cellules mésenchymateuses et acquérir de nouvelles propriétés leur permettant de migrer et d'envahir le stroma après franchissement de la lame basale. On distingue ainsi les carcinomes *in situ* des carcinomes infiltrants (Figure 7) (Hanahan and Weinberg, 2011). Les cancers infiltrants représentent environ 80 % des cas de cancers du sein et sont plus agressifs (Rivenbark et al., 2013).



<u>Figure 7 : Histologie des carcinomes mammaires</u> (A : cellules normales, B : cellules cancéreuses, C : membrane basale, D : lumière)

Les cellules cancéreuses présentes dans le stroma peuvent rejoindre les vaisseaux sanguins et lymphatiques et permettre la formation de métastases. En effet, les cellules tumorales circulantes peuvent être à l'origine du développement de métastases. Dans le cancer du sein, les métastases se développent préférentiellement dans les os, mais aussi dans le foie, le poumon et le cerveau (Rahman and Mohammed, 2015).

Le pronostic du cancer du sein métastatique est mauvais avec un taux de survie moyen de 30 à 36 mois, au moment du diagnostic. En 2010, la survie 5 ans après le diagnostic était seulement de 5 à 10 % pour les cancers du sein métastasés (Kucharczyk et al., 2017).

<sup>(</sup>Adaptée de http://www.centredesmaladiesdusein.ca/diagnostic/informations-generales/principaux-types-de-cancerdu-sein)

# II.1.2 La classification TNM

La classification TNM est une classification anatomopathologique couramment utilisée en clinique par le praticien. Elle permet l'évaluation du cancer au moment du diagnostic ou après un traitement chirurgical et permet la mise en place d'une stratégie thérapeutique adaptée à l'état plus ou moins avancé de celui-ci. Cette classification est basée sur plusieurs critères : la taille de la tumeur (T), la présence de ganglions lymphatiques (N) et la présence de métastases (M). Tous ces critères reflètent l'état du cancer (grade) et son facteur pronostique (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification TNM du cancer du sein

	Caractéristiques
Т	T0: Tumeur non palpable
	Tis: Carcinome in situ
	$T1: \leq 2cm$
	T2: entre 2 et 5cm
	T3: > 5cm
	T4: Tumeur de toute taille avec une extension à la paroi
	thoracique et/ou à la peau
N	N0: pas de ganglion palpable
	N1: Adénopathies axillaires homolatérales mobiles
	N2: Adénopathies axillaires homolatérales fixes
	N3: Adénopathies mammaires internes ou sus-claviculaires
М	M0: Absence de métastases
	M1: Présence de métastase(s) à distance

(Version simplifiée de la 7<sup>ème</sup> édition 2010) (T : Tumeur primaire, N : Ganglions lymphatiques, M : Métastase)

Les cancers inflammatoires du sein sont des cancers agressifs classifiés T4 dans la classification TNM. Ils présentent une croissance rapide et une proportion élevée de soustype ER- (Li et al., 2011). Cette croissance rapide est due à la présence de cellules souches cancéreuses qui ont un potentiel de prolifération illimité et présentent une résistance à la chimiothérapie (Ginestier et al., 2007; Li et al., 2008). Quand les cellules cancéreuses prolifèrent vite, elles épuisent les nutriments ainsi que l'oxygène et se retrouvent en état d'hypoxie. Dans ces conditions, elles meurent et libèrent des molécules proinflammatoires qui créent la réaction inflammatoire et activent des voies de l'inflammation (NF- $\kappa$ B ; nuclear factor-kappa B) (Robertson et al., 2010).

# II.1.3 La classification de Scarff, Bloom et Richardson

La classification de Scarff, Bloom et Richardson est utilisée en complément de la classification histologique. Elle permet de répertorier les cancers du sein en fonction de leur degré de différenciation (un même type histologique pouvant présenter des degrés de différenciation tissulaire différents).

- Le grade 1 fait référence à un cancer de faible grade où les cellules mammaires sont bien différenciées.
- Le grade 2 est un stade intermédiaire.
- Le grade 3 est un cancer à haut grade, de moins bon pronostic, où les cellules mammaires sont faiblement différenciées et prolifèrent vite (index mitotique élevé).

# II.1.4 Classification basée sur des données transcriptomiques

Les cancers du sein présentent une diversité phénotypique et génique importante. Ils peuvent être différenciés en fonction de leurs anatomo-pathologie, taille, type histologique, ou de la présence de marqueurs moléculaires ou de caractéristiques cliniques. Les cancers du sein ont longtemps été répertoriés en fonction de l'expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, ainsi que du niveau d'amplification de HER2.

- Les cancers hormono-sensibles (70 % des cas) présentent un profil ER+/PR+/HER2+ ou ER+/PR+/HER2- les rendant sensibles aux thérapies anti-œstrogèniques.
- Les cancers dits hormono-négatifs ER-/PR-/HER2+ ou triples négatifs (ER/PR-/HER2-) ne répondent pas à l'hormono-thérapie. Dans ces cancers, d'autres cibles thérapeutiques doivent être identifiées.

Au sein d'un même sous-groupe hormonal, l'hétérogénéité de la tumeur peut expliquer différentes réponses au traitement. Les avancées technologiques ont permis de créer une nouvelle classification des tumeurs basée sur des données transcriptomiques. Cette classification dite moléculaire est basée sur l'expression de certains marqueurs comme ER, PR, HER2 et d'autres marqueurs. Initialement composée de 6 catégories, cette classification dite moléculaire n'en comporte plus que cinq (Tableau 2). Elle permet de prédire l'évolution de la tumeur ainsi que sa réponse au traitement et ainsi oriente les choix thérapeutiques (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001).

Sous type	Fréquence	Statut	Traitement
Luminal A	50-60 %	ER+, PR+, HER2-, GATA-3+, FOXA1+ Ki-67 faible, Mutations <i>TP53</i> (15 %), <i>PI3KCA</i> (45 %) Tumeur de grade I ou II	Hormonothérapie
Luminal B	10-20 %	ER+, PR+, HER2- Ki-67 élevé, Mutations <i>TP53</i> (65 %), <i>PI3KCA</i> (29 %) Tumeur de grade II ou III	Hormonothérapie
HER2	10-15 % (45 % des tumeurs ER-)	ER-, PR-, HER2+ Mutations <i>TP53</i> (70 %), <i>PI3KCA</i> (39 %)	Chimiothérapie Trastuzumab
Basal-like	10-20 % (85 % des cancers héréditaires)	ER-, PR-, HER2-, CK 5/6/17, Laminine Ki-67 élevé, Mutations <i>TP53</i> (100 %), <i>PI3KCA</i> (9 %) Tumeur de grade III, pro-inflammatoire	Chimiothérapie
Claudin- low	10-15 %	ER-, PR-, HER2-, Expression forte des marqueurs de la TEM et des cellules souches.	Peu sensible à la Chimiothérapie

Tableau 2 : Classification moléculaire des tumeurs

(*PR* : progesterone receptor, *GATA3* : *GATA* binding protein 3, *FOXA1* : forkhead box protein A1, *CK* : cytokératine P13KCA : phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide)

D'après Ladoire and Fumoleau, 2017; Perou et al., 2000; Rivenbark et al., 2013; Sørlie et al., 2001

# **Chapitre 2 : La signalisation**

# œstrogénique dans la

# carcinogenèse mammaire

# I <u>Les œstrogènes et la signalisation œstrogénique</u>

### I.1 Les œstrogènes

### I.1.1 Biosynthèse des œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes sexuelles synthétisées de façon endogène à partir d'un précurseur lipidique, le cholestérol, lors d'un processus complexe appelé stéroïdogenèse.

Celle-ci fait intervenir de nombreuses protéines telles que la StAR (Steroidogenic acute regulatory protein), les enzymes de la famille HSD (hydroxysteroid deshydrogenase) et de la famille des cytochromes P450. Ces enzymes catalysent des réactions permettant au cholestérol, un lipide essentiel des membranes plasmiques, d'être converti en hormones stéroïdes (progestagènes, œstrogènes, androgènes, minéralcorticoïdes et glucocorticoïdes) (Figure 8) (Miller and Auchus, 2011).



*Figure 8 : Biosynthèse des œstrogènes chez l'Homme* (Adapté de Miller et Auchus 2011)

Le cholestérol peut être apporté par l'alimentation en étant associé au LDL (low-density lipoprotein) après l'endocytose par la cellule de ces transporteurs (Miller and Auchus, 2011). Il peut également être néo-synthétisé dans le réticulum endoplasmique à partir d'acétyl-coenzyme A, puis stocké sous forme estérifiée dans des gouttelettes lipidiques. Le cholestérol associé aux phospholipides constitue un des composants majeurs des membranes plasmiques (Miller and Auchus, 2011).

Une fois hydrolysé, le cholestérol devenu libre est transporté jusqu'à la membrane interne de la mitochondrie, par la protéine de transport StAR, où il est clivé par la P450scc permettant la formation de la prégnénolone. Cet intermédiaire est ensuite modifié dans le réticulum endoplasmique lisse pour permettre la formation d'autres progestagènes puis d'androgènes (Figure 8) (Miller and Auchus, 2011).

Seuls les organes stéroïdogènes (corticosurrénale, gonades et placenta) possèdent l'ensemble des enzymes permettant la biosynthèse des œstrogènes à partir du cholestérol.

Par contre, la conversion des androgènes en œstrogènes (aromatisation) est possible via la présence d'une enzyme mitochondriale très conservée de la famille des cytochromes P450, appelé aromatase (Simpson et al., 1994). Chez l'Homme, le gène *CYP19A1* codant pour l'expression de l'aromatase est exprimé dans de nombreux tissus dont les gonades (testicules, ovaires), le cerveau, le placenta, le tissu adipeux, le tissu osseux et les tissus fœtaux. Ce gène à la particularité d'être sous le contrôle de plusieurs promoteurs tissu-spécifiques permettant la formation de transcrits différents, cependant ils codent pour une protéine unique d'environ 55 kDa (Conley, 2001).

L'œstrone (E1) et l'œstradiol (E2) sont les premiers œstrogènes synthétisés. L'œstrone qui n'a pas d'action biologique provient de l'aromatisation de l'androsténedione alors que l'œstradiol est issu de l'aromatisation de la testostérone (Carreau et al., 2003). Chez la femme en âge de reproduction, la synthèse d'E2 a lieu principalement dans les ovaires, alors que chez la femme post-ménopausée, c'est la conversion périphérique (foie, tissus adipeux et muscles) des androgènes surrénaliens qui maintient un taux circulant d'œstradiol. Dans le placenta et les ovaires, la 17 $\beta$ -HSD1 peut également réduire l'œstrone en œstradiol tandis que la 17 $\beta$ -HSD2, exprimée principalement dans le foie, l'endomètre, l'intestin, et le placenta catalyse la réaction inverse (Miettinen et al., 1996). L'œstrone peut subir une 16 $\alpha$ -hydroxylation puis être réduite en œstriol (E3) par la 17 $\beta$ -HSD1. Cette dernière fortement exprimée dans le placenta permet la production de l'œstriol lors de la grossesse (Figure 8) (Cui et al., 2013; Miller and Auchus, 2011). Avant la ménopause, l'E2 est l'œstrogène majoritaire (Figure 9). Elle est principalement synthétisée par l'ovaire sous le contrôle des hormones hypophysaires (FSH et la LH) (Palermo, 2007; Steinkampf et al., 1987). En effet, une forte augmentation de l'œstradiol est observée au moment de l'ovulation, après le pic de LH. À la ménopause, l'arrêt de la fonction endocrine des ovaires n'est pas compensé par les tissus périphériques (tissu adipeux, foie, muscle) faisant chuter drastiquement la concentration sanguine en œstradiol. L'œstrone principalement synthétisée dans les tissus périphériques devient l'œstrogène majoritaire à la ménopause (Figure 9) (Altchek et al., 2003).

	Premenopause	Postmenopause
Estradiol	40-400 pg/ml	10-20 pg/ml
Estrone	30-200 pg/ml	30-70 pg/ml
Testosterone	20-80 ng/dl	15-70 ng/dl
Androstenedione	60-300 ng/dl	30-150 ng/dl

*Figure 9 : Concentrations moyennes des hormones stéroïdiennes* (Altchek, Deligdisch, et Kase 2003)

Chez la femme enceinte, le placenta permet la synthèse de l'œstriol (dès la 8<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhées) et augmente la synthèse d'œstradiol celle-ci pouvant atteindre 7000 à 31200 pg/ml dans les dernières semaines de la grossesse (Figure 10) (Institut de biologie clinique; Université libre de Bruxelles; Morel et al., 2016).



<u>Figure 10 : Concentrations plasmatiques des hormones lors de la grossesse</u> P : progéstérone, E1 : æstrone ; E2 : 17 $\beta$ -æstradiol, E3 : æstriol ; hCG : hormone chorionique gonadotrope (Morel et al., 2016)

# I.1.2 Rôles biologiques des æstrogènes

Les œstrogènes sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie de nombreuses cellules. Ainsi, chez la femme ils interviennent dans la fonction de reproduction en ayant par exemple un rôle important dans l'utérus et la glande mammaire et sont impliqués dans le développement et le maintien des fonctions sexuelles femelles et des caractères sexuels secondaires. Les œstrogènes régulent également la physiologie de la peau et de certains systèmes comme le système ostéo-articulaire, le système immunitaire, le système cardiovasculaire, le système nerveux central et le système neuroendocrinien (Figure 11) (Couse and Korach, 1999).



<u>Figure 11 : Organes cibles des æstrogènes chez la femme</u> (d'après Couse et Korach 1999; illustration *issue de Prossnitz et Barton 2011*)

#### I.2 Les récepteurs aux œstrogènes

Les actions biologiques des œstrogènes passent principalement par leur liaison à des récepteurs nucléaires spécifiques, les récepteurs aux œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  codés respectivement par les gènes *ESR1* et *ESR2*.

Le gène *ESR1* a été cloné en 1985 (Walter et al., 1985). Pendant plus de 10 ans, ER $\alpha$  est considéré comme l'unique médiateur des effets des œstrogènes. La découverte et l'identification du gène *ESR2* codant pour le récepteur ER $\beta$  dans une banque d'ADNc provenant de testicules de rat a mis à mal ce paradigme (Kuiper et al., 1996). Par la suite, l'expression d'ER $\beta$  a été mise en évidence chez différentes espèces, dont l'Homme (Mosselman et al., 1996).

#### I.2.1 Le récepteur a aux œstrogènes

Le gène *ESR1* est situé sur le chromosome 6 au niveau du locus q24-q27 chez l'Homme (Gosden et al., 1986). Il est sous le contrôle de plusieurs promoteurs dits « tissu-spécifiques » (Flouriot et al., 1998). Les transcrits codant pour ER $\alpha$  sont exprimés dans de nombreux organes dont ceux de l'appareil reproducteur chez la femme (ovaire, utérus, glande mammaire) ainsi que dans les tumeurs mammaires (Poola et al., 2002; Taylor et al., 2010).

Les messagers codant pour les différents isoformes d'ERα peuvent subir un épissage alternatif (Flouriot et al., 1998). Aini, le transcrit sauvage codant pour l'isoforme à 66 kDa comporte 8 exons (Ponglikitmongkol et al., 1988) qui codent pour les 5 domaines fonctionnels (A/B, C, D, E et F) communs aux récepteurs nucléaires (Mangelsdorf et al., 1995). L'exon 1 code pour le domaine A/B, l'exon 2 et 3 pour le domaine C, la première partie de l'exon 4 pour le domaine D, la seconde partie de l'exon 4 ainsi que les exons 5, 6 et 7 pour le domaine E et l'exon 8 pour le domaine F. Il a également été décrit un 9<sup>ème</sup> exon, codant pour une séquence de 27 acides aminés, lequel est uniquement présent sur le transcrit à 36 kDa (Wang et al., 2005).

Les transcrits sont traduits en protéines grâce à l'existence de plusieurs sites d'initiation de la traduction localisés au niveau de l'exon 1 et 2 (Wang et al., 2005). À ce jour, 20 variants d'ER $\alpha$  ont été identifiés dans des cellules de lignées cancéreuses mammaires et des tumeurs du sein (Lee et al., 2008; Poola et al., 2000).

Ainsi, au niveau protéique, ER $\alpha$ 66, 46 et 36 présentent des structures différentes (Figure 12). L'isoforme de taille complète (ER $\alpha$ 66) comporte, au contraire des formes tronquées, les domaines de transactivation de la transcription AF-1 et AF-2 (activation function-1 et -2). En effet, ER $\alpha$ 46 suite à l'épissage de l'exon 1, est dépourvu du domaine AF-1 (Flouriot et al., 2000). L'isoforme à 36 kDa, est issue de l'épissage des exons 1, 7 et 8. ER $\alpha$ 36 est ainsi dépourvu à la fois du domaine AF-1, du domaine AF-2 et possède également un domaine de fixation au ligand tronqué (Wang et al., 2005).



*Figure 12 : Structures des 3 principales isoformes d'ERa* (AA : Acide aminé ; nct : nucléotides)

ER $\alpha$ 46 peut s'hétérodimériser avec ER $\alpha$ 66 ou rentrer en compétition avec celui-ci et s'opposer ainsi à l'expression des gènes induit par ER $\alpha$ 66 comme ceux impliqués dans la prolifération (Flouriot et al., 2000; Penot et al., 2005). Dans le cancer du sein, il a ainsi été montré qu'ER $\alpha$ 46 était un facteur de bon pronostic. En effet, son expression est associée à la fois à une diminution du volume tumoral et du grade de la tumeur (Chantalat et al., 2016).

ER $\alpha$ 36 inhibe également l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$ 66 (et d'ER $\beta$ ) (Wang and Yin, 2015; Wang et al., 2006). Dans les tumeurs mammaires, l'expression de cette isoforme apparaît diminuée par rapport au tissu sain laquelle est corrélée à la progression tumorale, la présence de ganglions métastatiques et un haut grade (Zheng et al., 2010). Il a cependant été montré, dans les cellules de carcinome mammaire, une corrélation entre l'expression d'ER $\alpha$ 36, la croissance tumorale, la dissémination métastatique et la résistance aux traitements (thérapie antihormonale et chimiothérapie) (Chaudhri et al., 2012; Wang et al., 2012).

#### **I.2.2** Le récepteur β aux œstrogènes

Le gène *ESR2* se localise chez l'Homme sur le chromosome 14 entre le locus q22 et q24 (Enmark et al., 1997). Il est composé de 8 exons codant pour les 5 domaines A/B, C, D, E et F. Le transcrit codant pour la protéine sauvage à 60 kDa ER $\beta$ 1 (également appelé ER $\beta$ ) peut subir un épissage alternatif et permettre l'expression de nombreux variants spécifiques de certains tissus (Poola et al., 2002). Les transcrits codant pour ER $\beta$  2-5 diffèrent de celui codant pour ER $\beta$  au niveau C-terminal. Ces derniers comportent une autre séquence que celle codée par l'exon 8. Les messagers codant pour ER $\beta$  4 et 5 ne contiennent que l'exon 7 et une séquence additionnelle en lieu et place de l'exon 8 (Moore et al., 1998).

L'identification d'ER $\beta$  a permis de comprendre comment les œstrogènes pouvaient avoir un effet dans des tissus n'exprimant que peu ou pas ER $\alpha$  (Nilsson et al., 2001). ER $\beta$  joue un rôle central dans la mise en place du système reproducteur chez l'homme en permettant l'action des œstrogènes dans le tractus uro-génital (testicules, prostate) et dans les gamètes mâles (spermatozoïdes) (Carreau and Hess, 2010; Enmark et al., 1997; Nilsson et al., 2001). Ce récepteur est exprimé chez la femme dans les ovaires, la glande mammaire, et l'utérus ainsi que dans certaines tumeurs mammaires (Enmark et al., 1997; Nilsson et al., 2001). Il apparaît également exprimé dans le poumon, le système nerveux central, le système cardiovasculaire et l'os (Enmark et al., 1997; Nilsson et al., 2001).

Les cinq variants principaux d'ER $\beta$  (60 kDa) sont ER $\beta$ 2/cx, ER $\beta$ 3, ER $\beta$ 4 et ER $\beta$ 5. Toutes ces isoformes sont dépourvues du domaine F et présentent un domaine AF2 plus ou moins tronqué. Les tumeurs mammaires expriment ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2 et ER $\beta$ 5 (Davies et al., 2004).

#### I.2.3 Structure/fonction d'ER $\alpha$ et $\beta$

Les ER appartiennent à la superfamille des facteurs de transcription activés par un ligand (Mangelsdorf et al., 1995). Les formes sauvages d'ER $\alpha$  et  $\beta$  (respectivement 66 et 60 kDa) comportent 5 grands domaines fonctionnels (Krust et al., 1986). Ces récepteurs partagent 95 % d'homologie de séquences dans le domaine C de liaison à l'ADN et 58 % d'homologie dans le domaine E impliqué dans la liaison au ligand (Figure 13) (Marino et al., 2006).



<sup>&</sup>lt;u>Figure 13 : Les récepteurs aux œstrogènes ERα et ERβ</u> Représentation des domaines fonctionnels d'ERα et ERβ et de leur pourcentage d'homologie (Marino et al., 2006).

Le domaine A/B se situe dans la région N-ter du récepteur et contient le domaine de transactivation indépendant du ligand AF-1 (Tora et al., 1989). Ce domaine est activé par des modifications post-traductionnelles en absence d'œstrogènes et peut ainsi induire l'activité transcriptionnelle du récepteur en son absence (Le Romancer et al., 2011). La taille et la séquence protéique de ce domaine varient fortement entre les deux isoformes  $\alpha/\beta$  (30 % d'homologie) (Marino et al., 2006). Le domaine AF-1 d'ER $\beta$  est tronqué par rapport à ER $\alpha$  expliquant ainsi une forte diminution de l'activité transcriptionnelle d'ER $\beta$ (Cowley and Parker, 1999). Ce domaine permet également le recrutement de nombreux co-régulateurs impliqués dans la régulation de l'expression génique (Hall and McDonnell, 2005; Métivier et al., 2001; Nilsson et al., 2001).

Le domaine C ou domaine DBD (DNA-binding domain), est un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé entre tous les récepteurs nucléaires (Mangelsdorf et al., 1995). Il se compose de 2 structures en doigt de zinc qui comportent chacune 4 cystéines. Au niveau C-terminal de ce domaine, les récepteurs aux œstrogènes présentent une p-box, constituée de 3 acides aminés (Glu203, Gly204 et Ala207), laquelle permet la reconnaissance des éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) (Mader et al., 1989). Ces séquences spécifiques sont présentes dans la région promotrice des gènes régulés directement par les œstrogènes (Klinge, 2001). Ce domaine est également impliqué dans la dimérisation des ER (Nilsson et al., 2001).

Le domaine D est une région charnière entre les domaines C et E qui participe à la transactivation du récepteur. En effet, cette région est sujette à des modifications post-traductionnelles (Le Romancer et al., 2011). Lesquelles sont impliquées dans le repliement allostérique du récepteur (Zwart et al., 2010), et dans la résistance aux thérapies anti-hormonales (Michalides et al., 2004). De plus, cette région permet la translocation nucléaire du récepteur via la présence d'une séquence NLS (Nuclear localization signal) (Burns et al., 2011).

Le domaine E ou domaine LBD (ligand-binding domain) permet la liaison avec le ligand. L'affinité différente de l'œstradiol pour ER $\alpha$  et ER $\beta$  peut s'expliquer par leur faible pourcentage d'homologie pour ce domaine (Figure 13) (Marino et al., 2006). Par exemple, la constante de dissociation Kd envers l'œstradiol est de 0,1 nM pour ER $\alpha$  et de 0,4 nM pour ER $\beta$  (Kuiper et al., 1997). Il contient également le domaine de transactivation AF-2 dont l'activité est dépendante du ligand (Brzozowski et al., 1997; Webster et al., 1988). En présence d'E2, ce domaine peut s'associer avec le domaine A/B d'ER $\alpha$  et augmenter ses effets transcriptionnels (Kraus et al., 1995; Zwart et al., 2010).

Le domaine F situé au niveau C terminal des ER (Patel and Skafar, 2015) modifie l'activité transcriptionnelle du récepteur en réponse au ligand (Montano et al., 1995). Ainsi le faible pourcentage d'homologie (23 %) entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  peut aussi expliquer leur différence d'activité transcriptionnelle en réponse aux ligands et aux thérapies antihormonales (Schwartz et al., 2002; Weatherman and Scanlan, 2001). Ce domaine régule l'activité du récepteur en recrutant le co-activateur SRC1 (steroid receptor coactivator 1) (Koide et al., 2007), le facteur de transcription Sp1 (Stimulating protein 1) (Kim et al., 2003) et permet l'expression de gènes possédant une séquence ERE (Montano et al., 1995) ou un site AP-1 (activator protein-1) (Weatherman and Scanlan, 2001).

# I.3 La signalisation œstrogénique

Les récepteurs aux œstrogènes régulent l'expression de nombreux transcrits à la fois positivement et négativement. Ils contrôlent ainsi différents processus cellulaires tels que la prolifération et l'apoptose (Frasor et al., 2003).

Il existe 3 voies de signalisation liées à l'activation des récepteurs aux œstrogènes et qui régulent *in fine* la transcription des gènes cibles (Cui et al., 2013).

- La voie génomique dépendante des œstrogènes qui permet l'activation du domaine AF-2 (en rose, Figure 14).
- La voie non génomique à effet rapide induite via la liaison des œstrogènes aux ER membranaires activant ainsi les voies de signalisation en aval (en jaune, Figure 14).
- La voie indépendante du ligand, c'est-à-dire indépendante des œstrogènes où l'activité transcriptionnelle d'ERα est induite suite à l'activation des voies de signalisation (en vert, Figure 14).



*Figure 14 : Modèle d'activation de la signalisation œstrogénique* (*Cui, Shen, et Li 2013*)

#### I.3.1 Voie génomique dépendante des œstrogènes

En l'absence de ligand, les récepteurs aux œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  sont associés à un complexe multiprotéique constitué par des protéines chaperonnes (HSP70 (heat shock proteins 70), HSP90) elles-mêmes associées à des co-chaperonnes (HSP40, P23) et à des immunophilines (cyclophilline 40) (Pratt et al., 2004; Tecalco-Cruz et al., 2017). Ce complexe chaperon participe à la navette nucléocytoplasmique des ER et apparaît indispensable à la localisation majoritairement nucléaire d'ER $\alpha$  observée en l'absence de ligand (King and Greene, 1984; Tecalco-Cruz et al., 2017). Ce transport nucléo-cytoplasmique peut être altéré suite à l'ajout d'ICI 182,780 (Dauvois et al., 1993). Ce complexe multiprotéique permet aux ER d'acquérir une conformation optimale nécessaire à la liaison de leur ligand permettant ainsi leur activité transcriptionnelle (Fliss et al., 2000; Tecalco-Cruz et al., 2017).

L'œstradiol de par sa nature lipophile, peut diffuser passivement à travers la bicouche lipidique (Muller et al., 1979) et interagir avec le domaine LBD des ER au niveau du cytosol. Cette liaison induit la dissociation de l'hétérocomplexe inhibiteur et des modifications post-traductionnelles des ER (Le Romancer et al., 2011; Tecalco-Cruz et al., 2017). Ces modifications induisent un changement conformationnel du récepteur permettant sa dimérisation (homo ou hétérodimérisation) et sa translocation dans le noyau (Marino et al., 2006; Matsuda et al., 2002; Shiau et al., 1998; Tecalco-Cruz et al., 2017).

Dans le noyau, les récepteurs aux œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$ , liés à leur ligand, peuvent interagir directement avec l'ADN grâce à leur domaine DBD (Jakacka et al., 2001; Kumar and Chambon, 1988). Ce dernier reconnait et se lie à un élément de réponse aux œstrogènes, situé dans la région promotrice, en amont du gène cible. La séquence nucléotidique palindromique reconnue est une séquence de 13 paires de bases (5'-GGTCAnnnTGACC-3') constituée de deux demi-séquences ERE séparées par 3 nucléotides (Kumar and Chambon, 1988). Les dimères ERa/ERa et ERa/ERß présentent une affinité de liaison envers les ERE similaire, mais supérieure par rapport à celle de l'homodimère formé par ER $\beta$  (Cowley et al.). Les ER peuvent également se lier à une séquence ERE imparfaite, cependant l'effet transcriptionnel s'y trouve atténué (Klinge, 2001).

Le complexe E2/ER $\alpha$  peut également interagir avec les facteurs de transcription JUN et FOS et augmenter la transcription des gènes possédant un site AP1. Au contraire, le complexe E2/ER $\beta$  inhibe l'expression de ces gènes (Paech et al., 1997).

Les ER peuvent aussi se lier aux complexes facteurs de transcription et éléments de réponse présents sur le promoteur de gène ne possédant pas d'ERE tels que les complexes Sp1/GC (Stimulating protein-1/GC-rich promoter sequences), ATF-1/CREB (Activating transcription factor-1/ cAMP response element binding protein), ATF-2/cJUN, ATF-2/CREB et augmenter *in fine* l'expression génique (O'Lone et al., 2004). Toutefois, les ER peuvent avoir une action répressive sur l'expression des gènes de l'inflammation en se liant au facteur de transcription RelA. Il empêche ainsi sa fixation sur un site NF-κB et ainsi prévient l'expression d'IL-6 (interleukine-6) (Galien and Garcia, 1997).

Ces modes de régulation de la transcription peuvent être tous deux mis en jeu pour la régulation d'un même gène. Par exemple, le gène codant pour le récepteur à la progestérone contient dans son promoteur deux sites Sp1 et une demi-séquence ERE (Petz and Nardulli, 2000)

Les récepteurs aux œstrogènes liés de façon directe ou indirecte au promoteur du gène régulent l'activité transcriptionnelle du gène cible en recrutant des co-activateurs. La liaison des œstrogènes au LBD, induit un repositionnement de l'hélice 12 au niveau du domaine AF-2. Ce repositionnement permet la formation d'une poche hydrophobe logeant le ligand et le recrutement de ces co-activateurs (Figure 15) (Brzozowski et al., 1997). Ces derniers sont impliqués dans le remodelage de la chromatine et la formation d'un complexe de pré-initiation nécessaire à l'activité de l'ARN polymérase II (Johnson and O'Malley, 2012; Walsh et al., 2012).



<u>Figure 15 : Conformation d'ERa suite à la liaison d'un agoniste</u> La position de l'hélice 12 d'ERa est modifiée suite à la liaison du ligand permettant la création d'une poche hydrophobe qui loge le ligand et permet le recrutement de co-activateurs (Miller, 2015).

# I.3.2 Voies kinasiques liées aux ER membranaires et dépendante de l'æstradiol

Dans la cellule, en plus des effets génomiques observés à long terme, l'activation de la signalisation œstrogénique induit des effets en quelques secondes ou quelques minutes (Russell et al., 2000; Szego and Davis, 1967). Ces effets rapides, qualifiés de « non génomiques » sont induits par l'activation des ER exprimés à la membrane (Klinge, 2015) et du récepteur GPER/GPR30 (G-protein coupled estrogen receptor/G-protein coupled receptor 30) (Thomas et al., 2005).

#### a) Les récepteurs aux æstrogènes membranaires

Le récepteur ER $\alpha$ 46 est localisé, en partie, dans des microdomaines membranaires, enrichis en cholestérol et en protéines, appelés cavéoles (Kim et al., 1999; Li et al., 2003). Il a été montré que la présence de cette isoforme dans ces radeaux lipidiques spécialisés de la membrane plasmique requiert une palmitoylation (Li et al., 2003). ER $\alpha$ 36 est lui aussi exprimé à la membrane plasmique des cellules (Lee et al., 2008; Wang et al., 2006).

Une étude a mis en évidence que la cystéine 447, est impliquée dans la localisation membranaire d'ER $\alpha$ . La palmitoylation de ce résidu permet son association avec la cavéoline-1 (Acconcia et al., 2005). La présence de la sérine 522 apparaît également requise pour permettre l'interaction des ER $\alpha$  avec la cavéoline-1 (Razandi et al., 2003).

En présence d'E2, ER $\alpha$  peut s'associer à des kinases et activer rapidement les voies non génomiques. Par exemple, le domaine SH2 (Src homology 2) de la kinase SRC reconnait le résidu tyrosine 447 phosphorylé d'ER $\alpha$  (Varricchio et al., 2007). La méthylation de l'arginine 260 d'ER $\alpha$ , permet le recrutement de la SRC et de la sous-unité p85 de la PI3K activant ainsi la signalisation Akt (Le Romancer et al., 2008).

Les ER peuvent s'associer aux récepteurs à l'EGF et à l'IGF ainsi qu'à des protéines d'échafaudage lesquelles permettent la formation de complexes de signalisation.

- La protéine HPIP (hematopoietic PBX-interacting protein) recrutée par le domaine D et F des ER (Manavathi et al., 2006).
- La Shc (Src-homology/collagen) et la striatine sont recrutées par le domaine A/B des ER (Lu et al., 2004).
- La protéine MNAR (Modulator of Non-genomic Activity of estrogen Receptor) est recrutée par le domaine E des ER (Levin, 2008).

Ainsi dans les cellules endothéliales, la striatine active la protéine Gαi et induit l'activation d'eNOS (endothelial NOS) (Lu et al., 2004), la MNAR quant à elle interagit avec la sous-unité p60 de la kinase SRC et la sous-unité p85 de la PI3K (phosphoinositide 3-kinase) (Cheskis et al., 2008). (*L'équipe de Cheskis n'a cependant pas montré de lien entre l'activation de ces kinases et les voies associées, plusieurs articles publiés par son équipe allant dans ce sens ont été retirés*).

Ainsi, en présence de ligand, les ER membranaires activent rapidement les voies de signalisation (MAPK (mitogen-activated protein kinase), PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase/Protéine kinase B), AMPc/PKA (adénosine monophosphate cyclique/protéine kinase A), PKC (protéine kinase C), mobilisent le calcium et libèrent l'oxyde nitrique dans les cellules endothéliales (Le Romancer et al., 2011; Marino et al., 2006).

#### b) Le récepteur GPER

Le récepteur GPER est exprimé dans le tissu mammaire sain ainsi que dans les cancers mammaires (Ignatov et al., 2013) où il contrôle notamment la formation de métastases (Marjon et al., 2014). Ce récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G est essentiellement exprimé au niveau des membranes intra-cellulaires comme celle du réticulum endoplasmique (Revankar et al., 2005).

Il possède une forte affinité (de l'ordre de 3 nM) pour l'œstradiol (Thomas et al., 2005) et permet une réponse rapide à celui-ci de façon indépendante du statut d'expression des ER (Albanito et al., 2007; Maggiolini et al., 2004).

Il permet ainsi une réponse rapide à l'œstradiol en activant l'adénylate cyclase qui synthétise l'AMPc (Filardo, 2017; Filardo et al., 2002) et en mobilisant le calcium intracellulaire (Revankar et al., 2005). Ce récepteur permet l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt et celles liées à la PKA (Revankar et al., 2005), et permet également l'activation des métalloprotéases (MMP). Ces dernières permettent l'activation autocrine des récepteurs EGFR, via la libération de l'HB-EGF (Heparinbinding EGF-like growth factor), et permettent l'activation des MAPK (Heparin-binding EGF-like growth factor) (Figure 16) (Biscardi et al., 1999; Filardo et al., 2000; Quinn et al., 2009).



<u>Figure 16 : Le récepteur GPER induit les voies kinasiques</u> (Tu and Jufri, 2013)

# I.3.3 Activation des ER de façon ligand indépendante

Les récepteurs aux œstrogènes peuvent être activés de façon indépendante du ligand par des phosphorylations. Ces modifications post-traductionnelles sont induites par des facteurs de croissance (EGF, IGF-1, héréguline (le ligand de HER2)), le TGF $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ), l'AMPc, la cycline A, l'insuline, la dopamine, l'IL-2, la chémokine CXCL12 ou les esters de phorbol (Nilsson et al., 2001; Le Romancer et al., 2011; Cenni and Picard, 1999).

Ces ligands, après liaison à leurs récepteurs respectifs, et ces seconds messagers permettent d'activer de façon rapide les voies de signalisation et les kinases associées (MAPK, PKA, PKC, PI3K) (Cui et al., 2013; Nilsson et al., 2001) aboutissant ainsi la phosphorylation activatrice du domaine AF-1.

La cycline D1, de façon indépendante des voies kinasiques, active les ER. L'interaction de la cycline D1 avec le domaine E/F des ER induit l'expression des gènes possédant un ERE dans leur séquence promotrice (Neuman et al., 1997; Zwijsen et al., 1997).

#### I.4 Régulation transcriptionnelle

# I.4.1 Induits par des modifications post-traductionnelles des ER et des corégulateurs transcriptionnels

#### a) Phosphorylations

L'activation des voies kinasiques permet la phosphorylation activatrice des facteurs de transcription AP-1, STATs (signal transducers and activators of transcription), ELK1 (ETS transcription factor), CREB, NF-κB. L'activation de ces derniers permet la formation du complexe transcriptionnel en permettant notamment le recrutement de co-activateurs transcriptionnels via le domaine AF-2 après la fixation du ligand (Björnström and Sjöberg, 2005). Il apparaît également que la phosphorylation des différents co-activateurs est impliquée dans la dissociation du complexe transcriptionnel.

L'activité transcriptionnelle des ER cytosplasmiques peut, elle aussi, être modifiée suite à l'activation des voies kinasiques. Les phosphorylations d'ERα modifient son affinité pour le ligand, sa dimérisation, sa localisation nucléaire, sa capacité de liaison à l'ADN et aux co-activateurs ainsi que sa stabilité (Le Romancer et al., 2011; Marsaud et al., 2003; Migliaccio et al., 1989).

Lors de ce travail de thèse, nos travaux ont focalisé sur l'étude de la phosphorylation des sérines 104/106, 118 et 167 présentes sur le domaine AF-1 d'ER $\alpha$ 66 (Figure 17). Ces dernières, peuvent être phosphorylées de façon indépendante du ligand et permettre la transcription des gènes cibles. La présence du domaine AF-1 peut expliquer ainsi la différence d'activité transcriptionnelle observée entre le ER $\alpha$ 66 et les récepteurs ER $\alpha$ 36, ER $\alpha$ 46 et ER $\beta$  où ce domaine est délété (Delaunay et al., 2000; Métivier et al., 2001).



*Figure 17: Localisation des sites de phosphorylation d'ERa66 étudiés lors de ce travail (Adapté de Le Romancer et al. 2011)* 

Les sérines 104/106 sont phosphorylées à la suite de l'activation des protéines kinases MAPK (Thomas et al., 2008), GSK3 (glycogen synthase kinase 3) (Medunjanin et al., 2005) et CDK2 (cyclin-dependent kinase 2) (Trowbridge et al., 1997) (Figure 18).

- La sérine 118 est phosphorylée de façon indépendante du ligand par la kinase ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases 1/2) (Bunone et al., 1996; Kato et al., 1995). Ce résidu sérine peut également être phosphorylé par le facteur de transcription TFIIH (transcription factor II H) qui contient la kinase CDK7 dont l'activité est dépendante du ligand et du domaine AF-2 (Chen et al., 2000). La kinase IKKα (IκB kinase α) activée de façon ligand dépendante est indispensable à la phosphorylation de cette sérine (Park et al., 2005). L'activation de la sérine 118 modifie l'activité transcriptionnelle d'ERα en augmentant sa sensibilité à l'œstradiol, en modifiant sa dimérisation et en favorisant le recrutement de co-activateurs SRC3 (Le Romancer et al., 2011; de Leeuw et al., 2011).
- La sérine 167 est phosphorylée en réponse à l'œstradiol par la caséine kinase II (CK2) (Arnold et al., 1994) et de indépendamment du ligand par plusieurs kinases dont Akt (Campbell et al., 2001) et p90RSK (p90 Ribosomal S6 Kinase) (Joel et al., 1998) (Figure 18). Cette phosphorylation induit la liaison d'ERα à l'ADN et entraîne le recrutement de SRC3 après la reconnaissance de l'œstradiol par ERα (de Leeuw et al., 2011).

Les ER peuvent être phosphorylés en dehors du domaine AF-1 et réguler leur activité transcriptionnelle (Figure 18). La phosphorylation de la sérine 305 favorise le recrutement du co-activateur transcriptionnel SRC1 (Michalides et al., 2004; Wang et al., 2002; Zwart et al., 2007) et la phosphorylation de la tyrosine 537 module l'affinité des ER pour l'ADN (Arnold et al., 1995).



*Figure 18 : Sites de modifications post-traductionnelles présents sur ERa* (*Le Romancer et al. 2011*)

# b) Autres modifications post-traductionnelles

L'activité transcriptionnelle d'ERa est également modulée à travers des modifications post-traductionnelles tels que des sumoylations induites par SUMO-1 (small ubiquitinlike modifier-1), des méthylations via PRMT1 (Protein Arginine Methyltransferase 1), des acétylations impliquant l'activité histone acétyl-transférase des protéines p300/CBP (p300/CREB-binding protein) ainsi que par son ubiquitinylation (Le Romancer et al., 2011).

L'ubiquitinylation des ER induit leur dégradation par le protéasome (Nawaz et al., 1999). La demi-vie d'ER augmente lors de la fixation du ligand (Eckert et al., 1984), celle-ci pouvant être expliquée par la diminution de l'accessibilité au site d'ubiquitinylation suite à la liaison du ligand et par l'augmentation de la phosphorylation de la sérine 118 qui réduit le recyclage des ER (Grisouard et al., 2007). Le recyclage des ER et de ses cofacteurs semble contribuer à son activité transcriptionnelle (Lonard et al., 2000).

Il apparaît également que la palmitoylation du résidu cystéine 447 permet la localisation membranaire des ER (Acconcia et al., 2005).

Les différents co-activateurs transcriptionnels recrutés par les ER suite à leur liaison avec le ligand peuvent être ubiquitinylés et acétylés. Cette acétylation induit la libération de ces co-activateurs et la dissociation du complexe transcriptionnel aboutissant à l'arrêt de la transcription.

# I.4.2 *Répression de l'activité transcriptionnelle*

En absence de ligand, les ER sont associés aux co-répresseurs SMRT (silencing mediator for retinoïd and thyroïd hormone receptors), NCOR (nuclear receptor corepressor) et RTA (repressor of tamoxifen transcriptional activity) (Hall and McDonnell, 2005).

- SMRT et NCOR interagissent avec le domaine AF-2 d'ERα via un motif CoRNR (CoRepressor Nuclear Receptor) dont la séquence consensus est LxxxIxxxL et recrutent des HDAC (histone deacetylase) impliqués dans la condensation de la chromatine.
- RTA se lie au domaine AF-1 et inhibe l'activité transcriptionnelle des ER en empêchant notamment le recrutement de co-activateurs.

# I.4.3 Mise en place de la machinerie transcriptionnelle

# a) Au niveau du domaine AF-2

En présence de leur ligand les ER se lient aux co-activateurs de la famille SRC : SRC1, SRC2 (appelé GRIP1, TIF-2, NCoA-2) et SRC3 (pCIP (p300/CBP-interacting protein), ACTR, AIB1, RAC3, NCoA-3 et TRAM1)) (Johnson and O'Malley, 2012; Walsh et al., 2012).

Les co-activateurs SRC présents dans le noyau (via une séquence NLS) (Li et al., 2007) interagissent avec le domaine AF-2 des ER par la présence d'une boite NR (nuclear receptor) composée de trois motifs LXXLL dans leur domaine central (Chang et al., 1999).

Toutefois, les ER peuvent aussi s'associer au co-répresseur RIP140 (receptor interacting protein of 140 kDa) qui interagit également via un motif LXXLL avec le domaine AF-2 des ER. Ce co-répresseur peut donc, par un phénomène de compétition, empêcher la fixation des co-activateurs SRC (Hall and McDonnell, 2005) et empêcher ainsi la formation du complexe transcriptionnel induite par les SRC (Cavailles et al., 1995).

SRC1 et 3 portent une activité histone acétyl-transférase intrinsèque. Celle-ci permet la réorganisation de la chromatine et facilite ainsi l'accès de différents co-activateurs (Chen et al., 1997; Spencer et al., 1997). Ces derniers sont recrutés via ses différents domaines :

- Le domaine bHLH/Pas (basic-helix-loop-helix/Per Ah receptor nuclear translocation/Sim) très conservé recrute des facteurs de transcription, d'autres co-activateurs et le complexe de remodelage de la chromatine (SWI/SNF, switch/Sucrose non-fermentable) dont l'activité est dépendante de l'ATP (Johnson and O'Malley, 2012; Reisman et al., 2009).
- Le domaine AD1 (activation domain) recrute des protéines possédant une activité acétyltransférase telles que p300, CBP (CREB binding protein) et pCAF (p300 CBP associated factor) (Chen et al., 1997; Walsh et al., 2012).
- Le domaine AD2 recrute les protéines à activité méthyltransférase : PRMT1 et CARM1 (Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1) (Johnson and O'Malley, 2012; Walsh et al., 2012).

Le complexe CBP/p300 recruté par AD1 peut ainsi acétyler le co-répresseur RIP140 lié aux ER et induire sa libération.

Le recrutement de toutes ces protéines (Figure 19) s'effectue suivant une chronologie précise permettant *in fine* le recrutement de l'ARN polymérase II et l'activation transcriptionnelle des gènes oestrogéno-régulés (Hall and McDonnell, 2005; Métivier et al., 2002; Shang et al., 2000; Xu and Li, 2003).



<u>Figure 19 : Assemblage du complexe transcriptionnel recruté via ERa</u> Suite à la liaison de l'E2 à ERa l'hélice 12 s'est déplacée permettant le recrutement de coactivateurs de la famille p160 SRC qui permettent la mise en place de la machinerie transcriptionnelle (Johnson et O'Malley 2012).

# b) Au niveau du domaine AF-1

Le domaine AF-1 peut permettre la mise en place de la machinerie transcriptionnelle suite à la phosphorylation de la sérine 118 permettant ainsi le recrutement du co-activateur SRA (steroid receptor RNA activator) (Deblois and Giguère, 2003). La contribution de l'hélicase à ARN p68 doit être éclaircie (Endoh et al., 1999).

# c) Effet synergique AF1/AF2

Les domaines AF-1 et AF-2 peuvent agir de façon synergique en coopérant lors de la transactivation de récepteur  $\alpha$  amplifiant ainsi l'activité transcriptionnelle des ER (Métivier et al., 2001, 2002).

Les co-activateurs p300/CREB, SRC1, SRC2 recrutés par le domaine AF-2 des récepteurs aux œstrogènes suite à la liaison du ligand peuvent également interagir avec le domaine A/B et permettre l'activation du domaine AF-1 (Benecke et al., 2000; Kobayashi et al., 2000; Onate et al., 1998)

### II Implication des œstrogènes dans la carcinogenèse mammaire

#### II.1 La carcinogenèse mammaire

La carcinogenèse est un processus pathologique complexe constitué par plusieurs étapes successives : l'initiation, la promotion et la progression (Figure 20).



*Figure 20 : Les étapes de la carcinogenèse* (*adaptée de Siddiqui et al., 2015*)

Au cours de ces différentes étapes, la cellule saine dite normale acquiert progressivement de nouvelles propriétés la conduisant à devenir une cellule cancéreuse. Ces étapes permettent ainsi la formation d'une masse tumorale puis de métastases. Dans les années 2000, il a été mis en évidence six marqueurs du cancer (Hanahan and Weinberg, 2000).

- Autosuffisance vis-à-vis des signaux prolifératifs
- Capacité réplicative illimitée
- Échappement à l'apoptose
- Insensibilité vis-à-vis des inhibiteurs de la croissance cellulaire
- Capacité des cellules à envahir et à métastaser
- Potentiel angiogénique

A ceux-ci sont venus s'ajouter 4 autres marqueurs (Hanahan and Weinberg, 2011).

- Dérégulation du métabolisme énergétique
- Instabilité et mutations du génome
- Échappement à la réaction immunitaire
- Inflammation pro-tumorale

Dans leurs travaux, Hanahan et Weinberg ont aussi souligné la contribution du microenvironnement tumoral (matrice extracellulaire et cellules stromales) dans la progression tumorale et dans l'acquisition de toutes ces caractéristiques.

#### II.1.1 *Effets mutagènes des œstrogènes*

En 2002, les œstrogènes ont été classés comme des hormones carcinogènes par l'Institut national de sciences de la santé environnementale aux USA (National Institute of Environmental Health Services, 2002). Ils constituent un facteur de risque déterminant dans la carcinogenèse mammaire, ainsi que dans le développement des cancers du rein, du foie ou de l'utérus en induisant des altérations de l'ADN (Klinge, 2015; Russo and Russo, 2006; Yager and Davidson, 2006).

- Formation de semi-quinones (espèces réactives de l'oxygène)
- Formation d'adduits (liaison covalente entre l'ADN et les protéines)
- Dépurination des bases puriques de l'ADN
- Induction d'aneuploïdie

Cependant, les effets mutagènes des œstrogènes induits par l'augmentation de leur concentration plasmatique peuvent être réduits. La signalisation œstrogénique via ses effets transcriptionnels augmente l'expression génique de suppresseurs de tumeur (p53 et BRCA1/2) qui préservent la stabilité du génome en réparant les altérations de l'ADN et en inhibant la prolifération des cellules lésées (Hilakivi-Clarke, 2000).

## **II.2** Implication d'ERα dans la carcinogenèse mammaire

La signalisation œstrogénique, via ses effets transcriptionnels, dérégule l'homéostasie des cellules lésées. Ces cellules possédant seulement un potentiel cancérigène peuvent sous l'action des œstrogènes former des lésions cancéreuses et acquérir de nouvelles propriétés (Hanahan and Weinberg, 2011).

L'activation œstrogèno-dépendante d'ER $\alpha$  régule l'expression de gènes codant pour des facteurs de transcription, des facteurs de croissance, des cytokines, des hormones et des molécules intervenant dans la signalisation cellulaire, le cycle cellulaire, l'apoptose (Baumgarten and Frasor, 2012; Frasor et al., 2003). L'expression de ces gènes favorise ainsi la progression tumorale et la TEM en ayant un effet direct sur la cellule ou indirect via les acteurs du microenvironnement cellulaire (Baumgarten and Frasor, 2012; Bouris et al., 2015; Frasor et al., 2003; Guttilla et al., 2012).

ER $\alpha$  inhibe à la fois l'expression de Snail en permettant l'expression de MTA3 (Metastasis-associated protein 3) (Fujita et al., 2003) et celle de Slug (Ye et al., 2008). Ces facteurs de transcription répriment l'expression du gène suppresseur de tumeur *CDH1* codant pour la E-cadhérine favorisant ainsi la TEM (Batlle et al., 2000; Bolós et al., 2003; Ye et al., 2010).

Les œstrogènes, via ER $\alpha$ , induisent l'expression du facteur de transcription GATA3 qui régule lui aussi l'expression d'ER $\alpha$  (Eeckhoute et al., 2007). GATA3 induit la transcription des gènes oestrogéno-régulés en favorisant la liaison d'ER $\alpha$  à l'ADN (Klinge, 2015). Ce facteur de transcription est également impliqué dans la différenciation des MaSC en cellules luminales (canalaires et lobulaires). Sa réexpression dans les cellules mésenchymateuses ayant perdu leur capacité d'adhésion et leur polarité suite à TEM permet la réapparition d'un phénotype épithélial (Asselin-Labat et al., 2007; Kouros-Mehr et al., 2006).

Le récepteur ER $\alpha$  augmente l'expression des régulateurs du cycle cellulaire tels que PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Ki-67, cycline D1, cdc20 (cell-division cycle protein 20), cdc2 et c-myc ou de facteurs de croissance permettant aux cellules tumorales d'être indépendantes vis-à-vis des facteurs prolifératifs. ER $\alpha$  inhibe également l'expression de régulateurs négatifs du cycle tels que p21 et p53 (Frasor et al., 2003). Toutes ces modifications d'expression se traduisent au niveau du cycle cellulaire par une sortie des cellules de la phase de quiescence G0 et un raccourcissement de la durée de la phase G1.

L'activation oestrogéno-dépendante d'ER $\alpha$  induit une résistance à l'apoptose en permettant l'expression de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), BIRC5 (baculoviral inhibitor of apoptosis protein repeat-containing 5) qui code pour la survivine. Ces dernières permettent aux cellules de résister à la chimiothérapie par exemple (Frasor et al., 2003; Teixeira et al., 1995).

D'une façon générale, le récepteur ER $\alpha$  favorise la formation de métastases. En présence d'œstrogène, la E-cadhérine est réprimée, les éléments du cytosquelette se réorganisent, l'expression et l'activité des métalloprotéases augmentent (Kousidou et al., 2004; Oesterreich et al., 2003). Les cellules cancéreuses présentes dans la tumeur primaire peuvent migrer et envahir le compartiment stromal. Dans ce dernier, les cellules rejoignent la circulation sanguine et ainsi colonisent d'autres tissus permettant la formation de tumeurs secondaires. ER $\alpha$  induit la vascularisation de la tumeur en permettant l'expression du facteur pro-angiogénique VEGF (vascular endothelial growth factor) qui induit l'angiogenèse des cellules endothéliales (Applanat et al., 2008; Kazi and Koos, 2007).

# II.3 Dérégulation des acteurs de la signalisation œstrogénique dans le cancer du sein

Lors du diagnostic moléculaire de la tumeur, l'expression d'ERα66 est recherchée puisqu'il constitue un indicateur pronostic important et oriente les choix thérapeutiques. Les cancers exprimant ce récepteur sont les seuls à répondre à la thérapie anti-hormonale qui cible la signalisation œstrogénique. Cette thérapie dite endocrine a pour but de réduire les effets mitogéniques des œstrogènes (Chow et al., 2004).

ER $\alpha$  est peu exprimé dans le tissu mammaire (10 à 20 % d'expression) mais l'est fortement dans le tissu cancéreux. Environ 70 % des tumeurs mammaires expriment le récepteur ER $\alpha$ 66 montrant ainsi l'importance de la signalisation œstrogénique dans le développement tumoral (DeSantis et al., 2011). Dans la lignée cellulaire mammaire saine MCF10A (Michigan Cancer Foundation-10A), ER $\alpha$  n'est pas exprimé, mais l'est fortement dans la lignée de carcinome mammaire MCF7. À *contrario*, le récepteur ER $\beta$ est fortement exprimé dans le tissu mammaire sain et faiblement dans le tissu cancéreux.

Les HDAC1, 2 et 3 (histone deacetylases) sont dérégulés dans les carcinomes mammaires ainsi il apparaît que la surexpression des HDAC2 et 3 est associée à des cancers agressifs (Müller et al., 2013). HDAC1 inhibe l'expression d'*ESR1* et permet la formation de cancers ER négatifs (Kawai et al., 2003).

L'expression des co-activateurs de la famille p160SRC, SRC1 et SRC3 est corrélée positivement avec le développement de la tumorigenèse mammaire (Johnson and O'Malley, 2012). SRC1 est augmenté dans 19-29 % des tumeurs mammaires (Xu et al., 2009) tandis que SRC3 est retrouvé amplifié dans 5 à 10 % des cancers mammaires et 64 % des tumeurs primaires de l'ovaire (Anzick et al., 1997; Bautista et al., 1998).

Chez les patientes présentant un cancer du sein, les enzymes impliquées positivement dans le métabolisme des œstrogènes (détoxification) comme la catéchol-O-méthyltransférase ou la glutathione-S-transferase P1-1 apparaissent avoir une activité diminuée (Yager and Davidson, 2006).

#### II.4 Traitement du cancer et hormonothérapie

Dans les cancers hormono-dépendants de profil ER+/PR+, la thérapie anti-hormonale (anti-aromatase, SERM (Selective estrogen receptor modulators), SERD (selective estrogen receptor downregulators)) peut être utilisée pour stopper la croissance des cellules cancéreuses.

Les inhibiteurs de l'aromatase (letrozole, l'anastrozole ou l'exemestane) sont ainsi utilisés en première intention chez la femme ménopausée et peuvent être associés à d'autres molécules comme les SERM.

Le tamoxifène est un SERM couramment utilisé comme adjuvant dans le cancer du sein ER+ afin d'éviter les rechutes à la suite de la chimiothérapie, de la radiothérapie ou de la chirurgie (exérèse de la tumeur, curage ganglionnaire). Il possède une action antagoniste sur la signalisation œstrogénique en modifiant l'orientation de l'hélice 12 qui est impliquée dans la liaison des co-activateurs (Brzozowski et al., 1997; Pike et al., 2001; Shiau et al., 1998). La liaison du tamoxifène au LBD empêche ainsi le recrutement de co-activateurs et favorise le recrutement de co-répresseurs (Shang et al., 2000; Shiau et al., 1998). Le tamoxifène bloque ainsi la croissance œstrogéno-dépendante des cellules de carcinome mammaire (Chow et al., 2004).

Il apparaît cependant que le tamoxifène peut avoir des effets agonistes dans certains tissus comme l'endomètre et le tissu osseux (Jordan et al., 2001; Love et al., 1992; Shang, 2006). Ces effets agonistes peuvent être expliqués par la surexpression des co-activateurs SRC (Johnson and O'Malley, 2012). Le tamoxifène est utilisé comme traitement substitutif lors de la ménopause à effets positifs sur l'ostéoporose, mais augmente l'incidence des cancers de l'endomètre (Shang, 2006). Le tamoxifène inhibe la voie PKC (O'Brian et al., 1985) mais active la voie MAPK et la signalisation liée à l'IGF permettant ainsi l'augmentation des phosphorylations activatrices des ER et l'activation du domaine AF-1 (Marsaud et al., 2003; Shang, 2006). Il induit également le recrutement de co-activateurs tels que p300 et des co-activateurs de la famille p160 favorisant ainsi l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  (Berry et al., 1990; Shou et al., 2004)

Il a été montré que le niveau de phosphorylation de certains résidus sérine était associé à une résistance au tamoxifène (de Leeuw et al., 2011). La phosphorylation des sérines 167 et/ou 305 constitue un marqueur de résistance au tamoxifène (Holm et al., 2009; de Leeuw et al., 2011; Pancholi et al., 2004). Par exemple, la phosphorylation de la sérine 305 permet le recrutement du co-activateur transcriptionnel SRC1 et de l'ARN polymérase II (Michalides et al., 2004; Zwart et al., 2007).

Il existe également des molécules décrites comme des antagonistes purs des ER appelées SERD, l'ICI <sub>182,780</sub> (ICI) est l'une d'entre elles (Osborne et al., 2004). La liaison de l'ICI aux ER empêche leur dimérisation, bloque la navette nucléo-cytoplasmique empêchant leur translocation nucléaire, et rend les domaines AF-1 et AF-2 inactivables (Dauvois et al., 1993; Fawell et al., 1990). Les ER peuvent être ubiquitinylés puis dégradés par le protéasome, cette dégradation nécessite la présence des cytokératines 8 et 18 (Long and Nephew, 2006). L'ICI est décrit comme exerçant un effet inhibiteur total en inhibant complètement l'activité transcriptionnelle des ER. En 2006, une étude lui a prêté une activité agoniste dans les neurones en permettant l'activation des voies kinasiques (ERK1/2, Akt) (Zhao et al., 2006)

# **Chapitre 3 : Le syndécane-1**
# I <u>Généralités</u>

Les syndécanes appartiennent à la grande famille des protéoglycanes à héparanes sulfates (HSPG). Contrairement aux glypicanes, une autre famille de HSPG, ils ne sont pas exprimés à la surface des cellules, mais traversent la membrane plasmique (Figure 21) (Bernfield et al., 1999).

Ces protéoglycanes transmembranaires possèdent un axe protéique (appelé core protéique) auquel se lient des chaines de glycosaminoglycanes (GAG). Sous certaines conditions, l'ectodomaine du SDC-1 peut être clivé et être libéré dans la matrice extracellulaire (Figure 21) (Rapraeger et al., 1985).



Figure 21 : Représentation schématique des HSPG à la membrane plasmique.

Le glypicane est lié à la membrane par un groupement GPI (glycosyl phosphatidyl inositol) alors que le syndécane traverse par son domaine protéique hydrophobe la membrane plasmique de part et d'autre. L'ectodomaine du SDC peut être clivé et libéré dans le microenvironnement cellulaire.

Ces protéoglycanes transmembranaires furent identifiés pour la première fois en 1983 dans une lignée de cellules mammaires murines (NMUMG) (Rapraeger and Bernfield, 1983). À ce jour, 4 membres de la famille des syndécanes ont été identifiés et clonés. Leur numérotation s'est effectuée dans l'ordre de leur découverte. Le clonage du SDC-1 s'effectua en 1989 (Mali et al., 1990; Saunders et al., 1989) et il s'ensuivit de celui du SDC-2 (fibroglycane) (Marynen et al., 1989), du SDC-3 (N-syndécane) (Carey et al., 1992; Gould et al., 1992) et du SDC-4 (amphiglycane, ryudocane) (David et al., 1992; Kojima et al., 1992).

Le syndécane-1 possède une spécificité d'expression cellulaire et tissulaire comme cela a été mis en évidence chez la souris (Kim et al., 1994). Le syndécane-4, au contraire, est décrit comme un protéoglycane ubiquitaire localisé essentiellement au niveau des contacts focaux (David et al., 1992; Gopal et al., 2017).

Le syndécane-1 est fortement exprimé au niveau des jonctions intercellulaires des épithéliums squameux et de transition (Hayashi et al., 1987). Il apparaît plus généralement localisé au niveau de la surface baso-latérale des épithéliums (Figure 22A) (Bernfield et al., 1999; Rapraeger et al., 1986). Ce protéoglycane est également un marqueur des plasmocytes matures (Figure 22B) et des lymphocytes pré-B (Kim et al., 1994; O'Connell et al., 2004; Wijdenes et al., 1996). De façon constitutive, il apparaît être peu exprimé dans les fibroblastes et les cellules endothéliales. Au contraire du SDC-3 qui est fortement exprimé dans le tissu neural, le SDC-1 est peu ou pas exprimé dans ce tissu (Bernfield et al., 1999).



Figure 22 : Mise en évidence de l'expression du SDC-1

Le SDC-1 est exprimé dans le tissu mammaire sain (A ; A' ; marquage brun) ainsi que les cellules plasmocytaires (B ; marquage bleu).

#### II Expression du SDC-1

#### II.1 Le gène

Chez les invertébrés, l'axe protéique du syndécane-1 est codé par un gène unique commun à tous les syndécanes. Lors du processus évolutif, ce gène pouvant être qualifié de gène ancestral a été dupliqué, puis a évolué permettant la formation d'un gène unique, codant spécifiquement pour l'axe protéique du SDC-1 chez les mammifères (Bernfield et al., 1999; Couchman, 2010). Au sein de la famille des syndécanes, il a été montré l'existence de 2 sous-catégories dont l'une regroupe le SDC-1 et le SDC-3. Ces deux protéoglycanes présentent une forte homologie de séquence (Bernfield et al., 1999; Couchman, 2010). Cette dichotomie dans la grande famille des syndécanes serait due à une seconde duplication au cours de l'évolution (Chakravarti and Adams, 2006).

Le gène codant pour l'axe protéique du syndécane-1 (ou CD138) fut cloné chez la souris (Saunders et al., 1989) puis chez l'Homme (Mali et al., 1990). Chez l'Homme, ce gène est localisé sur le bras court du chromosome 2 (2p24.1), possède une longueur de 19,5 kb et comprend 5 exons (Hinkes et al., 1993).

Les exons 1 à 4 codent pour l'ectodomaine, alors que l'exon 5 code quant à lui, la partie transmembranaire et cytoplasmique du SDC-1. L'extrémité 5'UTR (5' untranslated transcribed region) et le peptide signal sont codés par l'exon 1. Les sites d'attachements des GAG sont codés par l'exon 2, alors que les sites de clivage protéolytique situés à proximité du domaine transmembranaire sont codés par l'exon 4 (Hinkes et al., 1993).

Ce gène est sous le contrôle d'un promoteur proximal en amont de l'exon 1. Celui-ci contient différentes séquences consensus, permettant notamment la liaison de facteurs de transcription, et l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle (Hinkes et al., 1993; Cook et al., 1996; Sun et al., 2008; Jaakkola et al., 1997; Kim et al., 2008) :

- Une boite TATA, une boite CAAT et une boite E qui lie le facteur myogénique MyoD
- Un élément de réponse à PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) appelé PPRE (PPAR response element), un élément de réponse aux facteurs NF-κB, un élément de réponse au FGF (fibroblast growth factor) appelé FiRE (FGF-inductible response element), un élément de réponse à l'AMPc appelé CRE (cAMP responsive element) ainsi qu'un élément de réponse à Antennapedia
- Des régions riches en GC liant WT1 (Wilm's tumor), SP1 et AP2

Une analyse *in silico* de la région promotrice humaine fait apparaître d'autres sites potentiels de liaison pour des facteurs de transcription (FOXO, Elk-1, GATA-1 c-Myc ou c-Fos) (www.sabiosciences.com).

Ce gène possède également plusieurs sites d'initiation de la transcription à l'origine de 2 variants. Le variant 1 d'une longueur de 3309 paires de bases (NM\_001006946) et le variant 2 de 3217 pb (NM\_002997) diffèrent par leur extrémité 5' non traduite.

#### II.2 Expression du SDC-1 au cours de l'embryogenèse

Le niveau d'expression du SDC-1 n'est pas constant, il varie au cours du développement embryonnaire (Bernfield and Sanderson, 1990; Kim et al., 1994; Sutherland et al., 1991). Le SDC-1 est exprimé lors de la formation du blastocyste (dès le stade 4 cellules), lors de la gastrulation où il est présent à la surface de l'endoderme et de l'ectoderme (Sutherland et al., 1991; Teel and Yost, 1996). Il apparaît également exprimé lors de la morphogenèse par les cellules mésenchymateuses embryonnaires à l'origine des dents (Thesleff et al., 1988), du rein (Vainio et al., 1989) ou des membres (Solursh et al., 1990; Trautman et al., 1991). L'expression du SDC-1 est inhibée lors de la myogenèse indépendamment du facteur de transcription myogénine, lequel induit via sa liaison à la boite E l'expression du SDC-1 (Larraín et al., 1997).

Les études de souches mutantes et la génération de souris KO (knock-out) pour le gène SDC-1 ont montré que celles-ci étaient viables et présentaient un développement normal (aucun problème de fertilité et aucune pathologie majeure) (Alexander et al., 2000; Götte et al., 2002; Pal-Ghosh et al., 2008; Stepp, 2002). Il a été référencé quelques conséquences induites par la modulation du niveau de SDC-1 : augmentation de l'angiogenèse et de la migration, résistance aux carcinogènes, diminution de l'infection bactérienne, augmentation de la réponse immune s'accompagnant d'une augmentation de l'inflammation, de la lutte contre les infections bactériennes et un défaut de cicatrisation (Sarrazin et al., 2011).

En effet, il apparaît que l'expression du SDC-1 est augmentée au cours de la cicatrisation de la peau et de la cornée, et cela dès le lendemain de la blessure (Elenius et al., 1991; Ojeh et al., 2008; Stepp, 2002). Son expression est également liée au développement de la tumorigenèse mammaire (Alexander et al., 2000; McDermott et al., 2007).

# II.3 Régulation transcriptionnelle du SDC-1

L'expression du SDC-1 apparaît modulée au cours du cycle menstruel chez la femme à la fois dans le sein (Hallberg et al., 2010) et dans l'endomètre (Germeyer et al., 2007; Lai et al., 2007). Il semble ainsi qu'elle soit dépendante de l'état hormonal bien qu'une étude *in vitro* utilisant des kératinocytes issus du tissu ectocervical/vaginal ne montre pas de variation de l'expression du SDC-1 en présence d'œstradiol ou de progestérone (Inki, 1997).

Une étude *in vitro* montre que les facteurs de transcription de la famille Sp1 peuvent, à eux seuls, initier la transcription du SDC-1 et induire l'activité de son promoteur en condition basale dans les cellules épithéliales murines où le SDC-1 est fortement exprimé (Vihinen et al., 1996).

Le niveau de SDC-1 apparaît également modifié lors de la réponse immunitaire et de l'inflammation ou dans de nombreuses pathologies comme l'obésité et le cancer (Akl et al., 2015; Teng et al., 2012; Theocharis et al., 2015)

Il a été montré que le peptide PR-39 (proline-rich antimicrobial peptide) libéré dans l'exsudat inflammatoire lors de la phase initiale de la cicatrisation induit son augmentation (Gallo et al., 1994). Le niveau élevé de SDC-1 est retrouvé tout au long de la cicatrisation, mais celui-ci apparaît particulièrement augmenté lors de la phase de comblement de la blessure impliquant notamment les kératinocytes (Elenius et al., 1991). L'activation de l'élément de réponse FiRE induite par le b-FGF (basic fibroblast growth factor ou FGF-2) dans les fibroblastes et par l'EGF (de façon indépendante du FGF-2) dans les kératinocytes induit l'expression du SDC-1 (Jaakkola et al., 1997, 1998)

#### II.4 Régulation post-transcriptionnelle du SDC-1

Les transcrits codant pour le SDC-1 subissent plusieurs modifications post-transcriptionnelles influençant directement l'expression protéique du SDC-1. Dans les kératinocytes (Sanderson et al., 1992), les cellules mésenchymateuses embryonnaires (Vainio et al., 1989) ainsi que dans les macrophages (Yeaman and Rapraeger, 1993), il a été montré que le messager codant pour le SDC-1 s'accumule, mais n'est pas traduit. Dans ces cellules, le découplage entre l'expression du messager et celle de la protéine est dû à la formation de structures secondaires dans la région 5'UTR du transcrit, en raison de sa forte teneur en GC (70 %), empêchant ainsi sa traduction (Saunders et al., 1989).

Dans les macrophages, l'induction d'AMPc active la PKA qui restaure la traduction du transcrit en supprimant ses modifications post-transcriptionnelles (Yeaman and Rapraeger, 1993).

Il a également été montré, que la région 3'UTR du messager codant pour le SDC-1 est impliquée dans la réduction de la stabilité du transcrit indépendamment de sa polyadénylation (Nakanishi et al., 1999).

Des études récentes ont mis en évidence l'importance de petits ARN non codants, les miRNA (micro-ARN) dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du SDC-1. Les miRNA (10b, 143, 145, 302a) ciblent le transcrit codant pour le SDC-1 au niveau de sa région 3'UTR et induisent sa dégradation (Fujii et al., 2015; Guo et al., 2015; Ibrahim et al., 2014). La dérégulation de l'expression du SDC-1 est observée dans de nombreuses pathologies comme le cancer et peut être en partie associée à la dérégulation de ces mi-RNA (Ibrahim et al., 2014).

- miR-10b dans le cancer du sein (Hannafon et al., 2011; Ibrahim et al., 2012)
- miR-143 dans le mélanome (Li et al., 2014), le cancer colorectal (Michael et al., 2003), le cancer de la vessie (Song et al., 2010), du poumon non à petites cellules (Gao et al., 2010)
- miR-145 dans le carcinome urothélial (Fujii et al., 2015) et le cancer du sein (Hannafon et al., 2011)
- miR-302a dans le cancer de l'ovaire (Guo et al., 2015)

Une analyse *in silico* a montré que le messager du syndécane-1 était une cible potentielle pour d'autres miRNA : hsa-miR-520 (Homo sapiens-miR-520), hsa-miR-665, hsa-miR-372, hsa-miR-298, hsa-miR-520d-3p, hsa-miR-302b, hsa-miR-561, hsa-miR-373, hsa-miR-10a, hsa-miR-659, hsa-miR-302c, hsa-miR-19b, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-19a.

#### III <u>Le SDC-1 : un protéoglycane à héparane sulfate</u>

Les membres de la famille SDC présentent une organisation protéique similaire, mais peuvent lier des chaines de GAG de nature différente. Les syndécane-1 et -3 sont constitués de chaines d'héparane sulfate (HS) et de chrondroïtine sulfate (CS) alors que les syndécane-2 et -4 sont tous deux de plus petite taille et sont uniquement constitués par des chaines d'HS.

#### III.1 La partie glucidique du SDC-1

#### III.1.1 Structure/assemblage

Suite à la synthèse de l'axe protéique du SDC-1, les chaines de GAG peuvent s'y attacher et permettre la formation d'un protéoglycane. Pour ce faire, l'ectodomaine du SDC-1 est glycosylé au niveau de plusieurs résidus sérines dans le réticulum endoplasmique permettant ainsi l'ajout de 3 chaines d'HS et de 2 chaines de CS.

L'assemblage des chaines de GAG commence toujours de la même façon, quelle que soit leur nature (dermatanes sulfates, chrondroïtines sulfates, héparanes sulfates). Un résidu xylosyl est transféré par une xylosyl-transférase (XYLT1 et 2) sur une sérine de l'ectodomaine (Figure 23). Pour les chaines d'HS, ce résidu sérine se trouve souvent à côté d'une glycine. À ce xylosyl, s'ajoutent 2 résidus galactosyls grâce à une galactosyltransférase (GalT-1 et -2). Finalement, l'addition de l'acide glucuronique (GlcUA) via une glucuronyl-transférase (GlcAT-1) permet la formation d'une amorce tétrasaccharidique liée au résidu sérine (Kreuger and Kjellén, 2012; Mikami and Kitagawa, 2013; Sarrazin et al., 2011).



*Figure 23 : Structures des chaines d'héparane sulfate et de chondroïtine sulfate (Couchman 2010)* 

Une fois cette amorce greffée à l'ectodomaine du SDC-1, les chaines d'HS et de CS s'allongent par l'ajout successif de résidus glucidiques. Le choix de la synthèse d'une chaine de GAG (CS, HS) plutôt qu'une autre pourrait impliquer des modifications de l'amorce tétrasaccharidique (phosphorylation, sulfatation) (Ueno et al., 2001).

- La chaine de chondroïtine sulfate est formée par l'assemblage de résidus N-acetylgalactosamine (GalNAC) et d'acide glucuronique à la suite de l'assemblage d'un premier résidu galactosamine sur l'amorce par une N-actetylgalactosamine transferase.
- La chaine d'héparane sulfate est constituée par la répétition de résidus N-acetylglucosamine et d'acide glucuronique suite à l'ajout d'un premier résidu N-acétylglucosmaine par une EXTL (Exostosin-Like glycosyltransferase). L'acide iduronique est formé dans l'appareil de golgi après la déacétylation de l'acide glucuronique qui peut ensuite subir une épimérisation (Kreuger and Kjellén, 2012)

Dans l'appareil de golgi, les chaines d'héparane sulfate ou de chrondroïtine sulfate peuvent être déacétylées, sulfatées ce qui modifient leurs fonctions. Dans les cellules de mésothélium, le SDC-1 augmente la sulfatation des chaines d'HS mais diminue la synthèse de celles-ci en modifiant l'expression de nombreuses enzymes (Heidari-Hamedani et al., 2015).

#### III.1.2 Rôle des chaines d'HS liées au SDC-1

Les chaines d'héparane sulfate sont des polysaccharides linéaires chargés négativement, présents au niveau de l'ectodomaine du SDC-1.

À la membrane, le SDC-1 via ses chaines d'HS, peut lier de nombreux ligands tels que des cytokines (CC, CXC, IL-8), des morphogènes (Wnt, BMP2 (bone morphogenetic protein 2)), des facteurs de croissance (EGF, HGF (hepatocyte growth factor), FGF) et ainsi leur servir de corécepteur. Dans les cellules de carcinome mammaire, le SDC-1 membranaire est un corécepteur au FGF-2 activant les voies MAPK (Nikolova et al., 2009). Les chaines d'HS peuvent également lier des enzymes telles que des protéases (HPSE (héparanase), MMP (métalloprotéases)), et des agents pathogènes (bactéries, virus, parasites) (Bernfield et al., 1999; Stepp et al., 2015).

Le SDC-1 joue également le rôle d'un récepteur matriciel en liant par l'intermédiaire de ses chaines d'HS des fibres de collagènes (I, II, V) (Koda et al., 1985), ainsi que des glycoprotéines.

- Laminine-332 : induit la déphosphorylation de la Tyr-309 du SDC-1 permettant l'acquisition d'un phénotype migratoire via le recrutement de la synténine (Sulka et al., 2009).
- Thrombospondine-1 : permet l'activation de la région V du SDC-1 laquelle est aussi impliquée dans la migration cellulaire (Adams et al., 2001; Chakravarti et al., 2005).
- Intégrines  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ : recrutées par le SDC-1 dans un état inactif. Ce complexe peut s'associer à IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) et permettre l'activation de celles-ci en phosphorylant la taline. Suite à cette activation, les cellules MDA-MB-231 migrent sur un substrat constitué de vitronectine (Beauvais and Rapraeger, 2010).

Les chaines d'HS sont impliquées dans la progression tumorale en régulant la croissance des tumeurs, l'angiogenèse, le processus métastatique ainsi que la réponse immune (Knelson et al., 2014; Liu et al., 2002; Sasisekharan et al., 2002). Les héparines sont des molécules disposant d'autorisations de mise sur le marché (AMM) en France pour le traitement des phlébites et font l'objet de nombreuses études en cancérologie. En effet, ces anticoagulants présentent des effets anti-tumoraux en empêchant la liaison des différents ligands aux chaines d'HS portées par le SDC-1 (Knelson et al., 2014).

#### **III.2** L'axe protéique : structure et fonction

L'axe protéique du SDC-1 est composé de 310 acides aminés et est enchâssé dans la membrane plasmique. Il se compose de 3 domaines plus ou moins conservés entre les membres de la famille SDC : le domaine extracellulaire (appelé ectodomaine ou domaine N-ter), le domaine transmembranaire et le domaine intracellulaire (également appelé endodomaine, domaine cytoplasmique, ou C-ter) (Figure 24). Les domaines cytoplasmique et transmembranaire sont plus conservés au sein de la famille syndécane avec une forte homologie de séquence (Bernfield et al., 1999; Mali et al., 1990).



#### Figure 24 : Structure du SDC-1

Le SDC-1 est composé de 3 domaines : extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique. Ces domaines plus ou moins conservés au sein de la famille SDC ont tous un rôle spécifique dans la régulation des processus cellulaires tels que l'adhésion, l'angiogenèse ou la migration (Beauvais, 2004; Couchman, 2010; Manon-Jensen et al., 2013; Stepp et al., 2015)

#### III.2.1 L'ectodomaine

Le domaine extracellulaire du syndécane-1 contient 5 séquences consensus (Glycine-Sérine) qui sont fortement conservées chez les mammifères et O-glycosylées par des chaines de GAG (Kokenyesi and Bernfield, 1994; Sasisekharan et al., 2002). Il semblerait que trois chaines d'HS soient liées aux résidus sérines 37, 45 et 47 situés au niveau Nter de l'ectodomaine. Les résidus sérines en position 206 et 216 se situant à proximité du domaine transmembranaire sont quant à eux O-glycosylés par deux chaines de CS (Manon-Jensen et al., 2013).

L'ectodomaine possède une courte séquence de cinq acides aminés hydrophobes (AVAAV) au niveau des acides aminés 222 à 226. Cette séquence impliquée dans l'inhibition de l'invasion des cellules tumorales est appelée domaine régulateur de l'invasion (IRD) (Langford et al., 2005). En effet, une mutation dans ce site modifie uniquement la capacité invasive de cellules tumorales, mais ne modifie pas les propriétés de liaison du SDC-1 au collagène, l'étalement cellulaire ainsi que l'adressage du SDC-1 à la surface cellulaire (Langford et al., 2005; Stepp et al., 2015).

L'ectodomaine du SDC-1 peut également via des séquences spécifiques être impliqué directement dans la régulation de la signalisation cellulaire. La synthèse de peptides inhibiteurs, appelés synstatine (SSTN), possédant la même séquence protéique que l'ectodomaine a permis ainsi de cartographier quelques fonctions portées par cet ectodomaine.

- Ainsi la synthèse de la SSTN<sup>93-120</sup> a montré l'implication de la séquence protéique de l'ectodomaine, allant du 93<sup>ème</sup> au 120<sup>ème</sup> acide aminé, dans la liaison activatrice de l'IGF1R. Ce récepteur à activité tyrosine kinase induit les voies MAPK impliquées dans l'activation des intégrines αvβ3 et αvβ5. Ce fragment de l'ectodomaine est ainsi impliqué dans l'adhésion, la migration cellulaire, ainsi que l'angiogenèse (Rapraeger, 2013).
- La SSTN<sup>210-240</sup> inhibe la liaison du SDC-1 au récepteur tyrosine kinase HER2 et à l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ . Le recrutement d'HER2 via l'ectodomaine est permis suite à l'interaction de la sous-unité  $\beta 4$  des intégrines avec la partie intracellulaire du SDC-1. HER2 peut être activé par autophosphorylation permettant ainsi l'activation de nombreuses kinases dont PKC et de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  qui induisent la migration des cellules (Wang et al., 2015).
- Les SSTN<sup>214-236</sup> et SSTN<sup>210-233</sup> inhibent respectivement l'interaction de l'ectodomaine du SDC-1 avec le récepteur VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) et l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$ . À la suite du clivage protéolytique du SDC-1, il s'avère que les acides aminés 210 à 236 sont accessibles et sont reconnus par l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  et le VEGFR2. Ils permettent tous deux une activation des voies de signalisation liées à Rac et induisent, ainsi, une réorganisation du cytosquelette d'actine et la migration des cellules (Jung et al., 2016).

Ce domaine peut être clivé par différentes protéases (plasmine, thrombine et MMP) au niveau de sites spécifiques majoritairement situés proche du domaine transmembranaire entre les acides aminés 227 à 251 (Manon-Jensen et al., 2013). La susceptibilité à la protéolyse, ou « shedding », semble dépendre de la longueur des chaines de GAG et donc de leur dégradation par des osidases telles que l'héparanase (Ramani et al., 2012) (voir paragraphe IV).

#### **III.2.2** Le domaine transmembranaire

Le domaine transmembranaire des syndécanes, constitué de 25 acides aminés hydrophobes, permet l'ancrage de l'axe protéique au niveau de la membrane plasmique. Il est impliqué dans les interactions avec le cholestérol, l'un des composants essentiels des radeaux lipidiques, et permet ainsi sa localisation dans ces microdomaines membranaires (Barrett et al., 2012; Prakash et al., 2011).

Ce domaine contient également deux motifs GXXXG permettant la dimérisation du SDC-1 (Dews and MacKenzie, 2007; McQuade and Rapraeger, 2003). Via la présence de ce motif, le SDC-1 présent dans les radeaux lipidiques peut s'associer directement avec lui-même ou avec d'autres protéines porteuses de ce motif tel que les SDC-2 et -3, les intégrines et le récepteur HER2 (Dews and MacKenzie, 2007; Stepp et al., 2015).

Il a été mis en évidence dans les cellules lymphoïdes Raji, que la dimérisation du SDC-1 est directement impliquée dans la capacité migratoire des cellules en permettant un réarrangement du cytosquelette (McQuade and Rapraeger, 2003). L'expression du domaine transmembranaire dans les cellules épithéliales pulmonaires est suffisante pour réduire les taux de migration cellulaire via des altérations du recyclage de la paxilline et de la kinase FAK (focal adhesion kinase) au niveau des adhésions focales (Altemeier et al., 2012).

#### **III.2.3** Le domaine cytoplasmique

Le domaine cytoplasmique composé de 33 acides aminés est dépourvu d'une activité enzymatique intrinsèque (Stepp et al., 2015). Cependant, la présence de 3 résidus tyrosines conservés entre les syndécanes et la présence de motifs protéiques permettent à eux deux, la liaison de nombreuses protéines qui régulent l'activité biologique du SDC-1. De plus, il s'avère que les résidus tyrosines sont également impliqués dans le clivage protéolytique du SDC-1 (Ott and Rapraeger, 1998; Rousselle and Letourneur, 2009).

Ce domaine se compose de 3 régions : deux régions conservées entre les différents syndécanes (C1 et C2) et une région centrale variable appelée région V qui est spécifique à chaque syndécane.

#### a) La région C1

La région C1 est la région cytosolique la plus proche de la membrane. Elle est impliquée dans l'adressage du SDC-1 à la membrane (Miettinen et al., 1994).

Le motif RMKKK contenu dans ce domaine permet l'activation de la kinase ERK, suite à la liaison du SDC-1 avec l'un de ses ligands. Cette kinase induit la dissociation du complexe  $\alpha$ -tubuline/SDC-1 qui lie le SDC-1 à la membrane et permet ainsi sa localisation dans les radeaux lipidiques (et ainsi sa dimérisation via le domaine transmembranaire) (Chen and Williams, 2013). Ce motif permet aussi l'activation de la tyrosine kinase SRC qui phosphoryle les différents résidus tyrosines présents sur le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique (Chen and Williams, 2013; Rousselle and Letourneur, 2009).

La dimérisation du SDC-1 dans les radeaux lipidiques, ainsi que le recrutement de la cortactine permise par la phosphorylation de ces résidus tyrosine favorise son endocytose, jusqu'au compartiment lysosomal (Chen and Williams, 2013) et peut ensuite rejoindre le noyau (Zong et al., 2009).

Dans les cellules épithéliales murines (NMuMG), le résidu sérine 286 porté par le domaine C1 peut être phosphorylé par la PKA, suite à leur activation par le TGF $\beta$  ou la forskolin. Cette phosphorylation augmente l'expression du SDC-1 au niveau membranaire (Hayashida et al., 2006).

Des travaux menés au laboratoire sur des cellules de sertoli, suggèrent que les protéoglycanes, dont le SDC-1, pourraient interagir avec la protéine phosphatase 2A (PP2A) et la phosphodiestérase (PDE) et modifier la réponse de ces cellules au FSH (Levallet et al., 2007, 2013).

### b) La région V

La région V est spécifique au SDC-1 et lui confère des propriétés uniques, notamment dans l'adhésion cellulaire dépendante de la laminine et la migration cellulaire tridimensionnelle (Chakravarti et al., 2005).

Cette région participe à la formation de complexes multi-protéiques, à l'origine de la formation de protrusions cytoplasmiques. Celles-ci sont formées par l'assemblage des filaments d'actine et de fascine. Ces structures sont essentielles à la constitution des lamellipodes et des filopodes qui sont impliqués dans la migration cellulaire (Adams et al., 2001; Chakravarti et al., 2005).

# c) La région C2

La région C2 est située à l'extrémité C-ter du domaine cytoplasmique et porte le domaine très conservé EFYA.

Ce domaine permet la liaison de protéines porteuses du domaine PDZ (Postsynaptic Density-95/Disc large protein/Zonula occludens-1) telles que : CASK (Ca<sup>2+</sup>/calmoduline associated serine/threonine kinase)/Lin-2 (Cohen et al., 1998), Tiam1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis gene 1) lequel induit l'adhésion cellulaire (Shepherd et al., 2010)

La tyrosine-309 portée par ce domaine peut être phosphorylée par les kinases de la famille Src (Ott and Rapraeger, 1998). Cependant, sa déphosphorylation semble être un prérequis dans les processus d'adhésion pour permettre le recrutement de la protéine à domaine PDZ synténine (Grootjans et al., 1997; Sulka et al., 2009). Le recrutement de cette protéine par le SDC-1 permet la formation de prolongements cytoplasmiques et l'acquisition d'un phénotype migratoire (Sulka et al., 2009).

#### IV Le clivage de l'ectodomaine : « shedding » du SDC-1

#### IV.1 Généralités

Le clivage protéolytique du SDC-1, aussi appelé « shedding » en anglais, peut être induit lors d'un stress cellulaire pouvant être mécanique, thermique, oxydatif ou être dû à un choc osmotique (Fitzgerald et al., 2000; Kliment et al., 2009). Il peut aussi être induit à la suite de la liaison de facteurs de croissance (EGF, HB-EGF), de cytokines (IFN $\gamma$ (interféron  $\gamma$ ), TNF (tumor necrosis factor)), d'esters de phorbol ou d'agents pathogènes (Hayashida et al., 2008a; Henry-Stanley et al., 2006; Park et al., 2000; Subramanian et al., 1997).

Le clivage protéolytique du SDC-1 est un mécanisme complexe conduisant à la libération dans la matrice extracellulaire de son ectodomaine. Ce clivage est accéléré par la dégradation des chaines d'HS portées par l'ectodomaine. L'HPSE, du fait de son activité glycosidase, augmente à la fois la dégradation des chaines d'HS et l'activité d'enzymes protéolytiques, lesquelles sont impliquées dans le clivage de l'ectodomaine (Purushothaman et al., 2008; Ramani et al., 2012; Sørensen et al., 2008; Yang et al., 2007).

#### IV.2 L'héparanase

L'héparanase (HPSE) sous forme active est une endo- $\beta$ -D-glucuronidase responsable de la dégradation des chaines d'héparane sulfate.

#### IV.2.1 Du gène à la protéine active

Elle est codée par le gène *hpr1* qui est porté par le chromosome 4q21.3. Ce gène comprend 14 exons. Il est sous le contrôle d'un promoteur de 3,5 kb contenant des régions riches en GC permettant la liaison du facteur de transcription Sp1 ainsi que des sites de liaison aux protéines Ets (Dong et al., 2000; Jiang et al., 2002; Vlodavsky et al., 2002). De façon constitutive, le facteur de transcription Sp1 permet l'expression de l'HPSE (Jiang et al., 2002). Il a également été montré que l'œstradiol conduit à l'expression de cette enzyme, laquelle expression peut être inhibée par l'utilisation d'antagonistes de la signalisation œstrogénique (tamoxifène, ICI 182,780) (Elkin et al., 2003). Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est associé à une résistance des cellules de myélomes à la chimiothérapie en induisant l'expression de l'héparanase (Ramani et al., 2016). D'une façon générale, l'expression de l'HPSE est corrélée à l'apparition de nombreuses pathologies et constitue un outil diagnostic. L'HPSE apparaît être surexprimée dans le diabète (Katz et al., 2002) et dérégulée dans de nombreux cancers (Gomes et al., 2013; Hammond et al., 2014; Nadir and Brenner, 2014; Parish et al., 2001; Vlodavsky et al., 2008).

Les transcrits du gène *hpr1* subissent un épissage alternatif permettant la formation de deux ARNm qui possèdent le même cadre de lecture. Ces deux transcrits codent pour une même protéine de 543 acides aminés appelée pré-prohéparanase (Dong et al., 2000). Ce précurseur latent de l'héparanase est composé d'un peptide signal de 35 acides aminés (Met<sup>1</sup>-Ala<sup>35</sup>) au niveau de son extrémité N-ter permettant son adressage au réticulum endoplasmique. La prohéparanase (proHPSE) (65 kDa) issue du clivage de ce peptide signal est ensuite adressée à l'appareil de golgi avant son exocytose (Figure 25) (Fairbanks et al., 1999; Gingis-Velitski et al., 2004a).

La prohéparanase présente en position 158-161 le motif KKDC, lequel est capable d'interagir avec les chaines d'héparanes sulfate portées par le SDC-1 (Levy-Adam et al., 2008). La reconnaissance par la proHPSE des chaines d'HD du SDC-1 est facilitée par les récepteurs membranaires au mannose 6-phosphate (MPR, mannose 6-phosphate receptor) et au LDL (LRP, low-density lipoprotein-receptor related protein). La formation du complexe proHPSE/SDC-1 permet une localisation membranaire de la proHPSE (Vreys et al., 2005) qui peut rapidement être internalisée dans des vésicules d'endocytose (Gingis-Velitski et al., 2004a). Il semblerait également que les récepteurs LRP et MPR puissent induire l'internalisation de la prohéparanase indépendamment de la présence des chaines d'HS (Vreys et al., 2005).

Les vésicules d'endocytose contenant la proHPSE et le SDC-1 sont acheminées vers les endosomes tardifs puis vers les lysosomes (Figure 25). Dans ces derniers la proHPSE est clivée deux fois par la L-cathepsine (Abboud-Jarrous et al., 2008; Zetser et al., 2004). Cette enzyme protéolytique digère la pro-héparanase et permet la formation de 2 polypeptides qui s'hétérodimérisent : l'un de 8 kDa correspondant à la région N-ter (PCA<sup>36</sup> à Glu<sup>109</sup>) de la prohéparanase et l'autre de 50 kDa correspondant à son extrémité C-ter (lys<sup>158</sup> à Ile<sup>543</sup>) (Fairbanks et al., 1999). L'HPSE mature, formée par ces deux polypeptides, clive les chaines d'HS faiblement sulfatées (Fux et al., 2009; Levy-Adam et al., 2003).



Figure 25 : Étapes de maturation de l'héparanase (Gingis-Velitski et al., 2004)

### IV.2.2 Modes d'action de l'HPSE

#### a) Activité enzymatique de l'HPSE

L'héparanase mature à la suite de sa translocation dans la matrice extracellulaire permet la libération de courtes chaines d'HS (environ 10 à 20 sucres) biologiquement actives. Cette activité enzymatique participe au remodelage de la matrice extracellulaire en permettant la libération des facteurs de croissance (mitogéniques, angiogéniques) liés aux chaines d'HS. Ces dernières peuvent s'accumuler dans le micro-environnement cellulaire et favoriser la progression tumorale (Roy and Marchetti, 2009).

L'héparanase, via son activité enzymatique, régule aussi la biodisponibilité des cytokines et chemokines liées aux HS. Elle contrôle ainsi la réponse inflammatoire et la diapédèse (Goldberg et al., 2013).

#### b) Effet non enzymatique de l'HPSE

La proHPSE contient au niveau de son extrémité C-ter, deux sites de liaison aux HS en plus de celui identifié au niveau de la lysine 158 (Levy-Adam et al., 2005). Ces deux sites de liaison, en s'unissant chacun à une chaine d'HS portés par le SDC-1, permettent la formation d'un complexe multiprotéique SDC-1/proHPSE/SDC-1.

La proHPSE, de façon indépendante de son activité glucuronidase, induit l'activation de la PKC et de Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) régulant ainsi le phénotype migratoire et les capacités adhésives des cellules (Fux et al., 2009; Levy-Adam et al., 2008). Elle favorise aussi la phosphorylation des kinases p38 et SRC permettant l'expression du facteur pro-angiogénique VEGF (Fux et al., 2009).

L'HPSE présente dans les radeaux lipidiques augmente l'activité de la voie PI3K/Akt et favorise la migration et l'invasion des cellules endothéliales (Ben-Zaken et al., 2007; Fux et al., 2009; Gingis-Velitski et al., 2004b). La surexpression de l'HPSE, induit l'activité de la kinase ERK et est ainsi associée à une augmentation de la métalloprotéase MMP-9 et du récepteur uPAR (urokinase receptor), lequel est impliqué dans l'activation de la MMP-9 (Purushothaman et al., 2008). Ces deux protéines favorisent le clivage protéolytique de l'ectodomaine du SDC-1.

#### IV.2.3 Héparanase et carcinogenèse

*In vivo*, la réalisation d'un modèle de xénogreffe chez la souris montre que la surexpression de l'HPSE dans les cellules de carcinome mammaire de la lignée MCF7 promeut l'angiogenèse, la croissance et la survie des cellules (Cohen et al., 2006). De même, cette surexpression dans des cellules de myélome montre une augmentation de la croissance et de la vascularisation de la tumeur ainsi que l'augmentation de ses capacités à métastaser dans les os et les organes (Yang et al., 2005). Dans les carcinomes de la tête et du cou, la surexpression de l'HPSE s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la kinase SRC qui induit des phosphorylations activatrices du récepteur à l'EGF. Son activation augmente la prolifération cellulaire ainsi que la migration et la croissance cellulaire en agar (Cohen-Kaplan et al., 2008; Fux et al., 2009).

Dans la littérature, de nombreux articles scientifiques, notamment de cancérologie, étudient la localisation du SDC-1 en réalisant des coupes histologiques et distinguent deux types de SDC : le syndécane membranaire exprimé à la membrane plasmique et le syndécane stromal exprimé dans le tissu conjonctif correspondant au SDC ayant subi un clivage protéolytique. D'autres articles, utilisant des cultures cellulaires, font référence au SDC-1 soluble pour désigner le SDC libéré dans le milieu de culture cellulaire. Le SDC-1 clivé appelé SDC sérique peut également être quantifié par test ELISA, à partir d'un prélèvement sanguin chez le patient ou l'animal.

Chez l'Homme, l'augmentation du clivage du SDC-1 peut témoigner de l'apparition d'une pathologie. Il a été montré que le clivage protéolytique du SDC-1 se trouve dérégulé lors d'un retard de cicatrisation, de l'inflammation (Kato et al., 1998; Subramanian et al., 1997) ou du cancer (Akl et al., 2015; Szatmári et al., 2015). La quantification du niveau d'expression du SDC-1 et de son clivage constitue un outil pronostique et diagnostic dans le myélome multiple. En effet, chez un individu en bonne santé le taux de SDC-1 sérique est assez bas (médiane à 128 U/ml), cette valeur médiane augmentant d'un facteur 5 pour les patients atteints d'un myélome (Seidel et al., 2000). Toutefois, le clivage du SDC-1 reflète le turnover physiologique du SDC-1 à la membrane.

Le développement d'inhibiteurs de l'héparanase fait donc l'objet de nombreuses recherches *in vitro* et *in vivo* et est déjà utilisé en clinique pour stopper la progression tumorale. Le PI-88 (phosphomannopentaose sulfate), un inhibiteur de l'activité HPSE est utilisé pour stopper la progression tumorale notamment du fait de son action antiangiogénique. Il est utilisé en clinique dans les mélanomes les plus avancés et de nombreux cancers (prostate, hépatocarcinome) (Ferro et al., 2007; Khasraw et al., 2010; Lewis et al., 2008; Liu et al., 2014).

#### IV.3 Clivage de l'axe protéique : les protéases matricielles

De nombreux signaux extra-cellulaires (facteurs de croissance, cytokines) peuvent induire le clivage de l'ectodomaine du SDC-1 en permettant l'activation des voies kinasiques (MAPK, JNK (c-Jun N-terminal kinases), PKC, SRC). Ces dernières régulent l'activité d'enzymes protéolytiques tels que la plasmine, la thrombine, les ADAMs (a disintegrin and metalloprotease), les MMP (MMP-2, -3, -7 et -9) ainsi que la MMP membranaire MMP-14 également appelée MT1-MMP (membrane type 1-matrix metalloproteinase) (Figure 26) (Endo et al., 2003; Fitzgerald et al., 2000; Manon-Jensen et al., 2013; Pruessmeyer et al., 2010; Subramanian et al., 1997). L'activité des MMP-2 et -9 peut être inhibée par TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase) qui contrôle ainsi le clivage du SDC-1 (Fitzgerald et al., 2000).

La protéine G Rab5 (Ras-related protein Rab-5) liée au niveau du domaine cytoplasmique du SDC-1 peut être activée et induire le clivage protéolytique du SDC-1 (Hayashida et al., 2008b). Cette activation est permise suite à la reconnaissance de la GEF (Guanine nucleotide exchange factors) Tiam-1 (Díaz et al., 2014) avec le résidu tyrosine-309 phosphorylé (Shepherd et al., 2010).



*Figure 26 : Sites de clivage présents sur l'ectodomaine du SDC-1* (*Manon-Jensen et al., 2013*)

# V La localisation nucléaire du SDC-1

Outre sa localisation membranaire ou intracellulaire, plusieurs études ont montré la présence du SDC-1 dans le noyau des cellules (Chen and Sanderson, 2009; Kovalszky et al., 2014; Zong et al., 2009).

# V.1 Mécanisme

Le SDC-1 membranaire, suite à la liaison du FGF2 via ses chaines d'HS, est internalisé dans des vésicules d'endocytose. Il peut être acheminé jusqu'au compartiment nucléaire dans un processus requérant la séquence RMKKK (Zong et al., 2009). Il apparaît que le récepteur FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1) participant à la formation du complexe ternaire SDC-1/FGF2/FGFR1 n'est pas présent dans le noyau, mais est recyclé dans les lysosomes.

Le SDC-1 peut également être transloqué dans le noyau suite à sa liaison à la fibronectine (Richardson et al., 2001). D'une façon générale, la localisation nucléaire du SDC-1 apparaît être dépendante de l'activité de la PKC (Hsia et al., 2003; Richardson et al., 2001)

Il a été montré *in vitro*, que l'ectodomaine du SDC-1 pouvait être transloqué dans le compartiment nucléaire des cellules stromales de la moelle osseuse. Cette translocation est dépendante de la présence de chaines d'HS, qui en se liant aux facteurs de croissance, permet l'endocytose du complexe ternaire (*SDC-1/facteur de croissance /récepteur au facteur de croissance*) et apparaît indépendante de la présence de la séquence RMKKK (Stewart et al., 2015).

Le transport intracellulaire des vésicules d'endocytose contenant le SDC-1 nécessite la présence de la tubuline (Brockstedt et al., 2002; Zong et al., 2009).

Il apparaît également que les HS peuvent être localisés dans le noyau (Buczek-Thomas et al., 2008; Ishihara et al., 1986).

#### V.2 Rôle

Dans le noyau, le SDC-1 et les HS inhibent l'activité HAT des protéines p300 et pCAF (Buczek-Thomas et al., 2008; Ishihara et al., 1986; Purushothaman et al., 2011; Stewart et al., 2015). De même, dans les cellules de myélomes, la perte de la localisation nucléaire du SDC-1 (via une augmentation de l'HPSE) augmente l'activité HAT permettant ainsi l'expression de gènes impliqués dans la progression tumorale comme MMP-9, VEGF, RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) et HGF (Chen and Sanderson, 2009; Purushothaman et al., 2008, 2011; Stewart et al., 2015).

La surexpression du Syndécane-1, dans une lignée cellulaire de mésothéliome pleural malin, s'accompagne d'une modification importante du transcriptome (expression des gènes impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire, la progression du cycle cellulaire, l'adhésion, la migration et l'organisation de la matrice extracellulaire). De plus, il apparaît que l'expression de facteurs de croissance, d'interleukines, de protéines de la matrice extracellulaire (MEC), de protéoglycanes et d'enzymes impliquées dans la sulfatation des chaînes d'héparane sulfate est également modifiée. L'extinction par siRNA de l'expression du SDC-1 a des conséquences plus faibles sur l'évolution du transcriptome. Toutefois, la surexpression comme l'extinction du SDC-1 induisent une augmentation de l'expression des acteurs des voies de signalisation du TGF $\beta$ , EGF, VEGF et ERK / MAPK (Szatmári et al., 2012).

Dans le noyau, le SDC-1 est retrouvé co-localisé au niveau des fuseaux mitotiques avec la tubuline (Brockstedt et al., 2002). Le SDC-1 nucléaire et les HS sont également associés à une inhibition de l'activité de l'ADN topoisomérase-I en induisant sa dissociation de l'ADN (Kovalszky et al., 1998). Les chaines d'HS peuvent également inhiber l'expression génique en empêchant la liaison des facteurs de transcription à leur séquence consensus (Kovalszky et al., 2014)

#### VI <u>Le syndécane-1 et le cancer du sein</u>

Dans le tissu mammaire sain, le SDC-1 est seulement exprimé dans la partie baso-latérale des cellules canalaires (Stanley et al., 1999). Ainsi, la dérégulation de son expression et de sa localisation peut être impliquée dans la tumorigenèse mammaire notamment en lien avec sa capacité à réguler la TEM (Nikolova et al., 2009; Ibrahim et al., 2012).

Les travaux de Stanley en 1999, sur une petite cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein, montrent une diminution d'expression du SDC-1 par les cellules cancéreuses de carcinome canalaire invasif (n=20). Pourtant, la comparaison du tissu mammaire malin et non malin révèle une différence dans l'expression du syndécane-1 dans le compartiment stromal. Au niveau des cellules de carcinomes canalaires infiltrants, le marquage du SDC-1 est intense dans le tissu conjonctif et à la surface des cellules, alors qu'il est absent dans le stroma du sein normal (Stanley et al., 1999). Pourtant, il a été montré une absence de corrélation entre la localisation du SDC-1 (stromale et épithéliale), les caractéristiques histologiques de la tumeur (taille, grade) et la présence de nodules (Götte et al., 2006; Leivonen et al., 2004). Une étude plus récente n'observe aucune corrélation entre l'expression du SDC-1 et le grade, mais cette étude met en évidence que les carcinomes de plus haut grade sont corrélés avec un fort pourcentage de cellules exprimant le SDC-1 (Tiemann et al., 2014).

Inversement, sur des cohortes plus importantes, une corrélation entre le niveau d'expression du SDC-1 et l'acquisition de marqueurs pronostiques défavorables tels qu'un grade histologique, une taille et un index mitotique élevé est établie (Baba et al., 2006; Barbareschi et al., 2003; Leivonen et al., 2004; Löfgren et al., 2007; Matsuda et al., 2001). De plus, dans l'étude de 2004, les auteurs précisent que l'expression du syndécane-1 à la fois dans l'épithélium et le stroma peut être un facteur pronostic défavorable dans le cancer du sein. Ainsi, la perte du syndécane-1 épithélial est associée à un pronostic plus favorable (Leivonen et al., 2004). Ces résultats restent contradictoires avec ceux obtenus par Loussouarn en 2008 qui montrent que la perte d'expression du SDC-1 épithélial est un marqueur de mauvais pronostic et est inversement corrélée avec la survie sans récidive (Loussouarn et al., 2008).

Les résultats observés, a priori contradictoires, peuvent avoir plusieurs explications : les limites des techniques et des outils utilisés (immunohistochimie, anticorps), des différences phénotypiques des tumeurs, l'origine des patientes et les particularités de localisation du SDC-1 (membranaire, intracellulaire, nucléaire, ou extracellulaire).

L'augmentation de l'expression du SDC-1 stromal au dépend du SDC-1 membranaire est un marqueur pronostic favorable (Baba et al., 2006; Barbareschi et al., 2003; Leivonen et al., 2004). L'augmentation de ce marquage stromal peut être en partie liée au clivage protéolytique de l'ectodomaine du SDC-1 épithélial et à la synthèse et la sécrétion du SDC-1 par les fibroblastes. Une étude *in vitro* a montré que l'ectodomaine du SDC-1 peut inhiber la croissance cellulaire de plusieurs lignées de carcinome mammaire incluant les cellules MCF7 (Mali et al., 1994). Les résultats de Nikolova et collaborateurs en 2009 suggèrent que les formes clivées et liées à la membrane du SDC-1 jouent différents rôles à différents stades de la progression du cancer du sein et que le clivage protéolytique du SDC-1 marque un passage d'un phénotype prolifératif à un phénotype invasif (Nikolova et al., 2009).

L'ectodomaine du SDC-1 clivé peut être associé à de plus ou moins grandes chaines de GAG. Cependant, comme cela a été exposé dans le paragraphe précédent, les chaines d'HS ont la capacité d'inhiber le clivage de l'ectodomaine du SDC-1 (Ramani et al., 2012). L'héparanase régule l'expression du SDC-1 ainsi que la longueur des chaînes d'HS et, de ce fait, régule le clivage du SDC-1. Il a été montré que l'HPSE influence la progression du cancer, ainsi son expression élevée est associée à un mauvais pronostic dans le cancer (Elkin et al., 2003; Yang et al., 2007).

Dans le cancer mammaire, l'expression du SDC-1 est associée à d'autres paramètres cruciaux pour le devenir des tumeurs. Ainsi, une corrélation entre le niveau de vascularisation des carcinomes mammaires (n=207) et le niveau d'expression du SDC-1 stromal a été établie (Maeda et al., 2006). Le SDC-1 peut servir de corécepteurs aux facteurs pro-angiogéniques VEGF et bFGF lesquels induisent dans les cellules endothéliales l'expression des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$ , elles-mêmes impliquées dans l'induction de l'angiogenèse suite à leur liaison avec le SDC-1 (Beauvais, 2004; Beauvais et al., 2009).

L'expression du SDC-1 est aussi corrélée avec une résistance des cellules à la chimiothérapie (Barbareschi et al., 2003). Une étude portant sur 37 patientes présentant un cancer du sein a montré que l'expression du SDC-1 dans ces tumeurs diminuait la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante. En effet, sur les 16 patientes exprimant le SDC-1, six d'entre elles n'ont pas répondu à la chimiothérapie (aucun changement) (soit 62,5 % de réponse) alors que sur les 21 patientes n'exprimant pas le SDC-1 ce taux de réponse est de 81 %. Cette étude précise également qu'aucune des patientes exprimant le SDC-1 n'a présenté une rémission complète (Götte et al., 2006).

Enfin, le niveau d'expression du SDC-1 semble dépendant du statut hormonal de la tumeur. En effet, l'expression élevée du SDC-1 dans le carcinome du sein est liée à un phénotype agressif et à un pronostic défavorable, caractéristiques des carcinomes triples négatifs (Baba et al., 2006; Barbareschi et al., 2003). Il a également été mis en évidence que l'expression épithéliale du SDC-1 est corrélée avec un statut ER- alors qu'une localisation stromale du SDC-1 est associée, quant à elle, à un statut ER+ (Leivonen et al., 2004). Inversement, alors que la surexpression du SDC-1 a été associée à un cancer ER- dans la population caucasienne, chez les femmes asiatiques une expression protéique du SDC-1 forte est corrélée à la survie globale chez les patients présentant un carcinome du sein triple positif (Lim et al., 2014). La corrélation étroite entre l'expression du syndécane-1 et le statut ER suggère la possibilité d'une régulation hormonale de ce protéoglycane et confirme son importance dans l'initiation et la progression des carcinomes mammaires.

# Objectifs

À la lumière des données exposées en partie introductive, nous émettons l'hypothèse de l'existence d'un dialogue entre la signalisation œstrogénique et le métabolisme du syndécane-1 à la fois dans des conditions physiologiques comme lors du cycle menstruel ou lors de situations pathologiques comme le cancer.

Les objectifs de ce travail de thèse ont été d'évaluer les conséquences de la dérégulation réciproque et/ou combinée de la signalisation œstrogénique et celle dépendante du SDC-1 sur les processus tumorigéniques des cellules de carcinome mammaire. Ainsi, ce projet a eu pour but de répondre à plusieurs questions :

- Les œstrogènes peuvent-ils réguler l'expression du SDC-1 dans les cellules tumorales mammaires? Et si oui comment ?
- Les modifications post-traductionnelles du SDC-1 impliquent-elles la signalisation œstrogénique ?
- En retour, le SDC-1 influence-t-il la réponse des cellules cancéreuses mammaires aux œstrogènes ? Est-il impliqué dans la variation d'expression des récepteurs aux œstrogènes, et dans la résistance à l'hormonothérapie ?

Nous avons ainsi modulé l'activité de la signalisation œstrogénique et de ses acteurs dans la lignée de carcinome mammaire ER(+) MCF7 pour étudier et comprendre les conséquences sur l'expression du SDC-1 ainsi que sur son clivage protéolytique. De façon similaire, nous avons modulé l'expression du SDC-1 afin d'en observer les conséquences sur la signalisation œstrogénique et les processus œstrogéno-induits.

# Matériel et

# Méthodes

# I <u>Liste de fournisseurs</u>

## I.1 Culture cellulaire

# Invitrogen : PA Hygromycine B Lipofectamine® 2000 Lipofectamine® RNAiMax Gibco : Sérum de veau fœtal (SVF) Opti-MEM® Interchim pCMV/hygro - negative control vector

# PAN Biotech : Amphotéricine B DPBS (10x) sans Ca2+, sans Mg2+ DMEM sans rouge de phénol DMEM avec rouge de phénol Ham's F12 L-glutamine Kanamycine Pénicilline/Streptomycine Trypsine

# I.2 Biologie moléculaire

# **Eurogentec :**

Amorces de PCR

#### Proméga :

Désoxyribonucléotides Triphosphates Héxamères aléatoires

MMLV-RT

# RNasine®

GO Taq® qPCR Master Mix

DNASE (+ tampon; solution STOP)

# Merck :

TRI-Reagent®

fluoride

de

#### I.3 Western Blot

#### **Biosolve chimie :** Merck : Acrylamide/bis-acrylamide β-mercaptoéthanol (37.1:1, 40 %) N,N,N,N'-**GE Healthcare Life Science :** Tetramethylenediamine (TEMED) Amersham ECL Western **Blotting Detection Reagent** Fixateur Amersham Hyperfilm ECL Ammonium persulfate (APS) Hybond-ECL Révélateur **Nippon Genetics Europe :** Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) PiNK Prestained Protein Marker Santa Cruz : Orthovanadate de sodium Phenylmethylsulfonyl (PMSF) d'inhibiteurs Cocktail protéases

#### **I.4** Microscopie électronique en transmission

# Merck :

Fluoroshield Mounting Medium with Dapi

Méthylcellulose

# **Orion**:

Aurion Blocking BSA-c<sup>TM</sup>

# I.5 Analyse du cycle cellulaire

### **Beckman Coulter :**

DNA Pre Reagent kit

### I.6 Divers

#### Diméthylsylfoxyde (DMSO) **BioRad**: Bleu de bromophénol Ethylène diamine tétraacétique (EDTA) **Carlo Erba :** D-glucose Acide acétique Formladéhyde Ethanol Gélatine Isopropanol Glutaraldéhyde Chloroforme Glycérol Merck : Glycine Acide orthophosphorique Paraformaldéhyde (PFA) Bicarbonate de sodium Ponceau S Bleu de Coomassie **Tris-Base** BSA (bovin serum albumin) Tris-HCL Charbon TritonX100 Chlorure de sodium Tween 20 Crystal violet

# II <u>Culture cellulaire</u>

# II.1 Lignées cellulaires

# II.1.1 *MCF7*

Les cellules MCF7 (Michigan Cancer Foundation-7) sont des cellules immortelles de forme polygonale provenant d'un adénocarcinome mammaire canalaire invasif. Cette lignée a été établie dans les années 70 à partir d'une ponction pleurale réalisée chez une patiente caucasienne de 69 ans.

Les cellules de cette lignée (HTB-22<sup>TM</sup>) ont conservé un phénotype épithélial (Figure 27) et présentent une aneuploïdie. Elles expriment la forme sauvage des protéines p53 et APC (adenomatous polyposis coli), (Lim et al., 2009) mais n'expriment pas la caspase 3.

Les cellules MCF7 sont décrites comme étant luminal A, elles expriment le récepteur ER $\alpha$ 66 mais ne surexpriment pas HER2. Elles possèdent un index mitotique (Ki67) bas, répondent bien à la chimiothérapie et présentent une réponse aux hormones (Holliday and Speirs, 2011). Cette lignée exprime également le récepteur GPER ce qui en fait un très bon modèle pour étudier la signalisation œstrogénique dans les cancers mammaires.



*Figure 27 : Observation des cellules MCF7 au microscope optique Les cellules ont conservé un caractère épithélial.* 

#### II.1.2 MDA-MB-231

Les cellules MDA-MB-231 (HTB-26<sup>TM</sup>) sont des cellules immortelles de forme fibroblastique provenant d'un adénocarcinome mammaire canalaire invasif. Leur isolement a été réalisé à partir de l'épanchement pleural d'une patiente caucasienne de 51 ans (Neve et al., 2006).

Ces cellules adhérentes décrites comme triples négatives, et plus particulièrement comme « claudine-low », sont plus agressives que les cellules MCF7.

#### II.1.3 Établissement de la lignée MCF7 surexprimant le SDC-1

#### a) Transfection stable du plasmide codant le SDC-1

Afin de surexprimer le syndécane-1 dans les cellules MCF7, nous avons réalisé une transfection reverse. Les cellules ont été ensemencées et transfectées par le plasmide de façon concomitante.

La lignée MCF7-Ctr a été obtenue après la transfection du plasmide pCMV/hygro - negative control vector. La lignée de surexpression du SDC-1 appelé MCF7-SDC1 est quant à elle issue de la transfection du plasmide pCMV/hygro SDC-1, lequel possède la séquence codante du SDC-1 sous le contrôle d'un promoteur fort (CMV) ainsi qu'un gène de résistance à l'hygromycine.

Une plaque 6 puits a été ensemencée avec 450 000 cellules par puits dans du milieu Ham's F12/DMEM (H/D) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (30 min à 56 °C), 2 mM de glutamine, 2,4 g/l de bicarbonate de sodium. Les cellules ont ensuite été transfectées avec 100 ng de plasmide qui ont au préalable été dilués dans de l'Opti-MEM® et incubés 15 min à température ambiante avec 5 µl de lipofectamine® 2000 et d'Opti-MEM® (500 µl).

Afin de sélectionner les clones ayant intégré le plasmide de surexpression, nous avons traité les cellules 24 h après la transfection avec 0,1 g/l d'hygromycine. Les clones ayant intégré la séquence codante du syndécane-1 au niveau de leur ADN sont ainsi isolés et conservés au fil des passages.

# b) Enrichissement de la population cellulaire surexprimant le SDC-1

Les cellules MCF7-SDC1 ont été triées avec un FACS (Fluorescence-activated cell sorting) (Epics Altra Beckman Coulter) afin d'enrichir la proportion de cellules surexprimant le SDC-1 et d'augmenter l'expression globale.

Afin de procéder au marquage des cellules MCF7-SDC1, le tapis cellulaire a été lavé puis les cellules ont été incubées 5-10 min à 37 °C avec du PBS/EDTA 8,55 mM. L'utilisation de la trypsine est proscrite afin d'éviter le clivage protéolytique du SDC-1. L'action de l'EDTA a été stoppée par l'ajout d'un volume équivalent de milieu H/D (composition voir paragraphe II.2) contenant du SVF. L'homogénat cellulaire a été centrifugé à 400 g pendant 5 min, le culot cellulaire a été repris dans du milieu H/D SVF 3 % et dilué afin d'avoir 13 millions de cellules par ml. Les amas cellulaires sont cassés par pipetage refoulement pour permettre l'individualisation des cellules et permettre leur passage cellule à cellule devant le laser du FACS.

Quatre millions de cellules vivantes ont été marquées pendant 30 min à TA (température ambiante) avec 20 µl d'anticorps anti-SDC-1 de souris (B-A38, Santa Cruz) dirigés contre un épitope extracellulaire du SDC-1. Après centrifugation, les cellules ont été lavées avec du H/D SVF 3 % puis reprises dans 300 µl de ce tampon afin d'être marquées avec 1,5 µl d'anticorps secondaires anti souris couplés à l'Alexa Fluor® 488 (Life Technologies) pendant 30 min à TA. Les cellules sont lavées dans du PBS puis reprises dans 500 µl de PBS.

Tout en conservant leur stérilité, les cellules situées dans la tubulure du trieur de cellules passent une à une devant le laser qui détermine le niveau de fluorescence de chaque cellule. Le passage des cellules dans cet appareil nous permet de distinguer deux populations, l'une exprimant faiblement le syndécane-1 et l'une plus fortement. Nous avons ainsi déterminé un seuil de fluorescence (cut-off), cette limite nous permet de déterminer à partir de quel niveau de fluorescence les cellules seront conservées.

Les cellules ainsi récupérées ont été remises en culture dans un milieu enrichi en sérum jusqu'au lendemain pour permettre leur survie et leur attachement. Les cellules ont ensuite été cultivées de façon conventionnelle dans un milieu H/D complet, lequel est supplémenté avec de l'hygromycine.

Une analyse du niveau d'expression de SDC-1 a ensuite été réalisée par qRT-PCR, immunofluorescence (Figure 28) et western blot pour vérifier l'enrichissement de nos cellules.



<u>Figure 28 : Tri et remise en culture des cellules MCF7 surexprimant le SDC-1.</u> (A) Intensité de marquage du SDC-1 dans les cellules MCF7-Ctr, MCF7-SDC1 avant et après le tri. (B) Observation en microscopie confocale des cellules MCF7-SDC1 avant et après le tri cellulaire. Celles-ci ont été fixées, perméabilisées puis marquées avec un anticorps polyclonal reconnaissant le SDC-1 (R&D).

#### II.2 Entretien des cellules

Les cellules MCF7 et MDA-MB-231 ont été mises en culture à partir d'aliquotes de congélation conservées à l'azote. Elles sont rapidement décongelées, puis remises en culture dans un flacon de 25 cm<sup>2</sup> (T25) contenant du milieu H/D complet. Pour constituer ce milieu complet, le H/D est supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (30 min à 56 °C), 2 mM de glutamine, 2,4 g/l de bicarbonate de sodium et des antibiotiques (50U/ml pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, 100 µg/ml de kanamycine et 0,25 µg/ml de d'amphotéricine B). Les cellules sont cultivées à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO2. Le lendemain, le milieu est renouvelé afin de retirer les cellules mortes et le DMSO présent dans le milieu de congélation.

À 80-90 % de confluence, nous effectuons un passage des cellules. Le milieu usagé est retiré, les cellules sont rincées avec de l'EDTA dilué à 8,55 mM dans du PBS. Elles sont ensuite décollées en présence de trypsine 0,25 % diluée dans la solution de PBS-EDTA. La trypsine est retirée avant décollement du tapis cellulaire et les cellules sont incubées 5 min, à 37 °C. Les cellules sont reprises dans du milieu de culture H/D complet après pipetage refoulement et sont ensemencées au 1/10<sup>ème</sup> pour un entretien courant.

Pour réaliser des ampoules de congélation, les cellules sont reprises dans du milieu de congélation (70 % H/D complet, 10 % SVF et 10 % DMSO). Le volume de celui-ci est ajusté pour obtenir une concentration de 1,5 million de cellules/ml après comptage cellulaire. Chaque ampoule est refroidie 20 min à 4 °C avant d'être congelée 1 h à -20 °C puis conservée une journée à -80 °C. Les cryotubes sont ensuite transférés dans de l'azote liquide pour conservation.

#### **II.3** Privation des cellules et traitements

#### **II.3.1** Privation en æstrogènes

Durant cette étude, nous avons travaillé sur la signalisation œstrogénique en utilisant un milieu dépourvu d'œstrogènes ne contenant pas de rouge de phénol (DMEM) afin de maximiser la réponse aux œstrogènes et aux agonistes de la signalisation œstrogénique.

Le lendemain de l'ensemencement, le milieu H/D est retiré et remplacé par du milieu DMEM complet (appelé MEM) afin de priver les cellules d'œstrogènes (jusqu'à 5 jours). Ce milieu contient les mêmes concentrations de glutamine et d'antibiotiques que le milieu H/D sauf qu'il est supplémenté avec du glucose (concentration finale de 3.5 g/l), du sodium bicarbonate (concentration finale de 3.7 g/l) et 10 % de SVF décomplémenté et déstéroïdé au charbon actif.

Pour la déstéroïdation du SVF, 100 ml de SVF précédemment décomplémenté ont été incubés une nuit à 4 °C sous agitation avec 6 g de charbon. Deux centrifugations à 4 °C sont réalisées pour éliminer le charbon, la première à 3 100 g pendant 15 min et la seconde à une moyenne de 80 000 g pendant 1 heure.
Trois jours après la privation en œstrogènes, les cellules MCF7 sont généralement ensemencées dans du milieu MEM complet dans des T25 ou des plaques 6, 24 ou 96 puits à la densité de 25000 cellules/cm<sup>2</sup> à l'exception des cellules qui sont transfectées par des siRNa. Ces cellules sont ensemencées au 2<sup>ème</sup> jour de la privation dans un milieu MEM complet où les antibiotiques sont absents.

# II.3.2 Interférence des ARNm par la transfection transitoire de siRNA

L'interférence des ARNm cibles a été réalisée par la transfection transitoire de siRNA (Tableau 3) laquelle est réalisée 24 heures après l'ensemencement.

ARN messagers interférés	Séquences nucléotidiques	Concentration d'utilisation
ERα S: UCAUCGCAUUCCUUGCAAA AS: UUUGCAAGGAAUGCGAUGA		10 nM
Rel-A (p65)	S: CCAUCAACUAUGAUGAGU AS: AACUCAUAGUUGAUGG	10 nM
SDC-1	S : GCCCACCAAACAGGAGGAAUUCUAU AS : CGGGUGGUUUGUCCUCCUUAAGAUA	10 nM

Tableau 3 : Liste des siRNA utilisés

La lipofectamine® RNAiMAX, a été utilisée comme agent transfectant, celui-ci permet la formation de liposomes qui emprisonnent les siRNA. Les acides nucléiques peuvent ainsi être libérés dans la cellule après la fusion des membranes lipidiques (du liposome et de la membrane plasmique). Cinq microlitres de lipofectamine ont été utilisés par puits pour les plaques 6 puits, 1µl par puits pour les plaques 24 puits et 0,3 µl par puits pour les plaques 96 puits.

Les siRNA ainsi que l'agent transfectant ont été dilués séparément dans du milieu Opti-MEM® puis mélangés volume à volume. Le tout est incubé 15 min à température ambiante puis ajouté aux cellules. Les cellules sont laissées en contact avec les acides nucléiques pendant 6 h puis remises en milieu MEM complet.

# II.3.3 Traitements des cellules

Au  $5^{eme}$  jour de la privation, les cellules ont été stimulées avec différentes molécules activant la signalisation œstrogénique, la voie NF- $\kappa$ B ainsi que les voies kinasiques (Tableau 4).

Catégorie	Nom	Spécificité	Concentration d'utilisation	Fournisseur
	E2	Agoniste ERα ERβ GPER	De 1 pM à 10 nM	Merck
Activateur de la signalisation	PPT (propyl-pyrazole triol)	Agoniste ERα (l'affinité de liaison est 400 fois plus basse pour ERβ)	10 nM	Tocris
œstrogénique	DPN (Diaryl-propionitrile)	Agoniste ERβ (l'affinité de liaison est 70 fois plus basse pour ERα)	10 nM	Merck
	G1	GPER	10 nM	Calbiochem
Cytokine pro- inflammatoire	TNFα	Activateur voie NF-κB	10 ng/ml	Merck
Facteur de croissance	EGF	Activateur des MAPK	1,56 nM	Merck

Tableau 4 : Liste des agonistes/activateurs utilisés

# Suivant les conditions, les cellules ont été préalablement traitées puis stimulées à l'œstradiol comme résumé dans le tableau 5.

Catázonia	Nom	Spácificitá	Concentration	Mode	Fournisseur	
Calegone	NOIII	specificite	d'utilisation	d'utilisation	Fourinsseur	
Antagoniste des	ICI 182,780	SERD (induit la dégradation d'ERα)	10 nM	24 h avant E2	Merck	
récepteurs de la signalisation	4-OH-tamoxifène	SERM, (antagoniste d'ERα)	1 M	Simultanément à E2	Merck	
œstrogénique	G15	Antagoniste de GPER	10 nM	30 min avant E2	Calbiochem	
	UO126	Inhibe MEK1/2	10 µM		Selleck	
	Ly294002	Inhibe PI3K	20 µM		Selleck	
Inhibiteur des voies kinasiques	H89	Inhibe PKA	20 µM	30 min avant E2	Merck	
	Bay1170-85	Inhibe IKK	10 µM		Merck	
	SP600125	Inhibe JNK	10 µM		Merck	
Inhibiteur de la traduction	Cycloheximide	Inhibe la synthèse protéique	10 µg/ml	1 h avant E2	Merck	
Inhibiteur de la transcription	Actinomycine D	Inhibe l'ARN pol II	2 μΜ	1 h avant E2	Merck	
Traitement	Aza (5-Azadeoxycytidine)	Inhibe les Dnmt	20 µM	48 h avant E2	Merck	
épigénétique	TSA (Trichostatine A)	Inhibe les HDAC	1 µM	-	Merck	

Tableau 5 : Liste des antagonistes/inhibiteurs utilisés

### III Analyse des messagers

### III.1 Extraction des ARN totaux

Pour extraire les ARN messagers, nous utilisons la méthode phénol/chloroforme. Les cellules sont lavées avec du PBS puis lysées pendant 5 min dans du TRI Reagent<sup>®</sup> contenant du phénol et du guanidium isothiocynate.

Les lysats cellulaires sont transférés dans des tubes de 1,5 ml et incubés 5min en présence de chloroforme pour un volume équivalent au 1/5 du volume de TRI Reagent<sup>®</sup> après agitation de 15 secondes. Une centrifugation à 12000 g pendant 15 min à 4 °C permet de séparer la phase organique et la phase aqueuse contenant les ARN totaux. La phase aqueuse est prélevée, les acides nucléiques sont ensuite précipités avec de l'isopropanol et culottés après centrifugation à 12 000g pendant 10 min à 4 °C. Les ARN totaux sont ensuite lavés avec de l'éthanol 75 %, lequel est éliminé après une centrifugation de 5 min à 7500 g à 4 °C. Les culots sont séchés et repris dans 40 µl d'eau stérile exempte de nucléases puis solubilisés à 55 °C pendant 10-15 min.

# **III.2** Dosage et évaluation qualitative des ARN extraits

Une mesure d'absorbance des ARN totaux au Nanodrop<sup>TM</sup> 2000c permet de déterminer la qualité et la concentration protéique. En effet, une unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration d'ARN de 40 µg/ml. De plus, les ratios 260/280 et 260/230 permettent de vérifier la qualité de l'extraction d'ARN. Le ratio 260/280 détermine la contamination par les protéines et plus particulièrement des cycles benzènes des acides-aminés aromatiques qui absorbent à 280 nm. Ce ratio doit être compris entre 1,8 et 2. Le rapport 260/230 rend compte, quant à lui de la contamination par les phénols.

# III.3 Digestion de l'ADN bactérien

À la suite du dosage, 500 ng d'ARN totaux issus des cellules MCF7-Ctr ou MCF7-SDC1 sont incubés avec de la DNASE 15X, du tampon DNASE 10X (volume final de 15  $\mu$ l) pendant 30 min à 37 °C afin de dégrader l'ADN plasmidique. La réaction est stoppée par l'ajout de 2  $\mu$ l d'une solution STOP (10 min à 65 °C).

# **III.4** Transcription inverse

La rétrotranscription de 250 ng d'ARN en ADN complémentaire (ADNc) simple brin a été réalisée en présence de 20 nmoles de dNTP (soit 5 nmoles de chaque desoxyribonucléotide triphosphates), 100ng de random primer, 12 U de RNasin® (ribonuclease inhibitor) et 100 U M-MLV RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase) dilués dans du tampon M-MLV RT pour un volume final de 20 µl. Un blanc appelé RT- est réalisé en remplaçant les ARN par de l'eau.

La réaction de rétrotranscription s'est déroulée pendant 1 h 30 à 37 °C puis à 70 °C pendant 5 minutes pour dénaturer l'enzyme selon les recommandations du fabricant (kit promega).

# III.5 PCR en temps réel

Le kit GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix est utilisé pour réaliser et suivre l'amplification des gènes d'intérêts à partir de nos ADNc. Ce kit utilise un marqueur fluorescent proche de la technologie SYBR<sup>®</sup> Green, la fluorescence ainsi émise reflète la quantité d'ADNc initiale et donc d'ARNm codant pour le gène d'intérêt.

Les produits de RT sont dilués au  $1/10^{\text{ème}}$  dans de l'eau sans nucléases. La réaction de PCR est réalisée à partir de 5 µl d'ADNc dilués en présence de 5 pmoles de chaque amorce, 10 µl de GoTaq qPCR Master Mix (2X), 0,1 µl de CXR (carboxy-X-rhodamine) dilué dans de l'eau. Les amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Liste des amorces utilisées en gPCR

	Nom	Séquence des Amorce		
e	Actine	sens	CAACCGTGAAAAGATGACCAG	
nag		anti-sens	ATGGGCACAGTGTGGGTGAC	
mé	S16	sens	CTGGAGCCAGTTGTGCTTCT	
de		anti-sens	TCTGGTAATAGGCCACCAGG	
ène	GAPDH	sens	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	
Ŭ		anti-sens	GAAGATGGTGATGGGATTTC	
ır le	ESR1	sens	AGACATGAGAGCTGCCAACC	
pteı ıx gèr		anti-sens	GCCAGGCACATTCTAGAAGG	
éce au strc	ESR2	sens	GAGTCTGGTCGTGTGAAGGA	
R 8		anti-sens	ACTTCTCTGTCTCCGCACAA	
ou	PS2	sens	CACCATGGAGAACAAGGTGA	
ne gèr gulé		anti-sens	AGCCCTTATTTGCACACTGG	
Gè strc -rég	PGR	sens	TCGAGCTCACAGCGTTTCTA	
8		anti-sens	CACCATCCCTGCCAATATCT	
	SDC-1	sens	GAAACCTCGGGGGGAGAATAC	
se		anti-sens	TACAGCATGAAACCCACCAG	
ana	SDC-2	sens	GCTGCTCCAAAAGTGGAAAC	
xe par		anti-sens	CAGCAATGACAGCTGCTAGG	
A hé	SDC-4	sens	CGATCCGAGAGACTGAGGTC	
DC		anti-sens	CACCAAGGGATGGACAACTT	
S	HSPE	sens	ATCAATGGGTCGCAGTTAGG	
		anti-sens	CTTGGTAGCAGTCCGTCCAT	
_	P50	sens	TGGGAATCCAGTGTGTGAA	
tior 3		anti-sens	CACAGCATTCAGGTCGTAGT	
lisa <sup>7</sup> -ĸF	REL-A	sens	GCCATGGACGAACTGTTCCCC	
DF	(p65)	anti-sens	TGGTATCTGTGCTCCTCTCG	
Si	IL-6	sens	AGTGAGGAACAAGCCAGAGC	
		anti-sens	GCGCAGAATGAGATGAGTTGT	
	TIMP-1	sens	AATTCCGACCTCGTCATCAG	
		anti-sens	GTTGTGGGACCTGTGGAAGT	
	TIMP-2	sens	AAGATGTTCAAAGGGCCTGA	
EC		anti-sens		
١M	TIMP-4	sens		
le 1a		anti-sens	AGGGCICGATGTAGTTGCAC	
ge d	MMP2	sens	AATCCUACUAACCUTCAGAG	
ela£		anti-sens	GIGUCUIUIIGAGACAGICI	
por	MMP-/	sens		
Ren		anu-sens		
Ľ.	MMP-9	sens		
		anu-sens		
	WIWF-14	sens		
	PCI 2	anu-sens		
e ire/ JSe	BCL2	sens		
Cycle cellulair Apopto	D21	anu-sens		
	P21	sens		
		anu-sens	GOCGITIGGAGIGGIAGAAA	

L'amplification des gènes d'intérêt réalisée dans le thermocycler Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) sous le contrôle du logiciel MxPro commence par une étape de 3 min à 95 °C afin de dénaturer les brins d'ADNc et les anticorps bloquant la Taq polymérase. Cette étape de dénaturation est suivie par 40 cycles comprenant une étape de 30 secondes à 95 °C et une étape d'une minute à 60 °C. C'est la répétition de ces cycles qui permet l'amplification de chaque brin d'ADNc et l'émission de la fluorescence lorsque l'agent fluorescent se fixe aux brins amplifiés. La réaction d'amplification se termine par une étape d'une minute à 95 °C.

La température de fusion (Tm) de chaque amplicon est ensuite déterminée par des mesures répétées de l'intensité de fluorescence tous les 0,5 °C (allant de 55 °C à 95 °C). La réalisation d'une courbe de fusion permet de vérifier l'amplification d'un seul produit de PCR dont la Tm servira de contrôle inter-expérience.

L'expression relative des gènes étudiés est obtenue par la méthode des  $\Delta$ Ct selon la formule 2<sup>- $\Delta$ Ct</sup> où  $\Delta$ Ct est la différence de nombre de cycles d'amplification nécessaires à l'obtention d'une quantité seuil de produits entre le gène de référence GAPDH et le gène cible.

# IV Analyse protéique

# IV.1 Extractions des protéines totales

Les cellules ont été lavées au PBS froid puis décollées par grattage dans la glace dans du tampon de lyse froid (Tableau 7) auquel il a été ajouté 1 mM d'orthovanadate de sodium, 2 mM de PMSF et 10 µl/ml d'un mélange d'inhibiteurs de protéases.

Nom du tampon	Composition	Dosage
RIPA	Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton X100 1 % (v/v), SDS 0,1 % (p/v) pH 7,4	Dosage Bradford
SDS lysis buffer	Tris HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2 % (p/v), Glycérol 10 % (v/v), DTT 50 mM, Bleu de Bromophénol 0,01 %(p/v)	Pas de quantification possible par dosage Bradford.

Tableau 7 : Composition des tampons de lyse

Quand les cellules sont reprises dans du SDS lysis buffer et RIPA, les échantillons sont homogénéisés 5 secondes dans un appareil à ultrasons (sonicateur) qui fragilise les membranes. Les protéines totales sont dosées le cas échéant et stockées à -20 °C avant utilisation.

# IV.2 Dosage protéique Bradford/ préparation des échantillons

Le dosage des protéines extraites a été réalisé par la méthode de Bradford après la réalisation d'une gamme d'étalonnage linéaire de BSA (allant de 0 à 30  $\mu$ g/ml). Le bleu de Coomassie présent dans le réactif de Bradford change de couleur et absorbe à 595 nm en se liant aux acides aminés aromatiques et aux résidus hydrophobes des acides aminés. La valeur d'absorbance de chaque échantillon reflète ainsi la concentration en protéines de l'échantillon.

La gamme de BSA ainsi que les échantillons à doser, dilués si besoin pour rentrer dans la gamme, ont été incubés à température ambiante pendant 5 min avec 1 ml de réactif de Bradford (Bleu de Coomassie 0,01 % (p/v), éthanol 0,005 % (v/v), acide orthophosphorique 10 %)

L'absorbance est mesurée à 595 nm dans un spectrophotomètre (UV-1280 ; Shimadzu France). Les échantillons sont dosés en duplicata et la moyenne des deux valeurs est utilisée pour déterminer la concentration de l'échantillon correspondant.

# IV.3 Western blot

Afin de quantifier l'expression relative d'une protéine d'intérêt, nous avons réalisé une séparation des protéines sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante. La première partie du gel permet de déposer les échantillons et de concentrer les protéines et la seconde partie permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire.

 Quand les cellules ont été lysées avec du tampon SDS lysis buffer, nous déposons dans un chaque puits un volume équivalent (20 µl) de chaque échantillon. Quand les protéines ont été extraites avec le tampon RIPA, nous avons déposé des quantités équivalentes de protéines dans les puits. Les échantillons ont été préparés dans leur tampon et dilués dans du tampon de charge 4X (TrisHCl 50 mM, SDS 2 % (p/v), glycérol 10 % (v/v), β-mercaptoéthanol 1 % (v/v), EDTA 12,5 mM, bleu de bromophénol 0,02 % (p/v)).

Les échantillons dénaturés (5 min à 95 °C) ainsi que le marqueur de poids moléculaire (Pink Prestained Protein Marker) sont déposés dans un gel de concentration (polyacrylamide 3,2 % (v/v), Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 0,1 % (p/v)) polymérisé par de l'APS 0,0001 % (p/v) et du TEMED 0,1 % (v/v). La séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire est réalisée dans un gel de séparation composé d'acrylamide 10 %, Tris-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,1 %, APS 0,0001 % (p/v) et TEMED 0,1 % (v/v).

La migration des protéines est effectuée à ampérage constant (40 mA ou 80 mA en fonction du nombre de gels) dans du tampon d'électrophorèse (Tris base 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3). Cette étape de migration est suivie du transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose à 100 volts pendant 1 h sous agitation dans du tampon de transfert froid (Tris 25 mM, glycine 200 mM, éthanol 20 %, pH 8,3). Une coloration au rouge ponceau (acide acétique 5 %, Ponceau S 0,1 %) permet de vérifier le transfert des protéines sur la membrane puis celle-ci est rincée avec du TBS (Tris-Buffered Saline ; Tris 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4).

Les sites aspécifiques présents sur la membrane sont bloqués pendant 1h à température ambiante avec une solution de blocage 5 % poudre de lait écrémé dans du TBS-T (TBS-Tween20<sup>®</sup>; 0,1 % (v/v) Tween 20/TBS). Les protéines sont ensuite incubées une nuit à 4 °C en présence de l'anticorps primaire dilué dans du lait 5 %/TBS-T ou BSA 5 %/TBS-T (Tableau 8).

L'excédent d'anticorps est enlevé par 3 rinçages de 5 min au TBS-T puis les membranes sont incubées en présence de l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (horseradish peroxidase) pendant 1 h à température ambiante (Tableau 8). Trois lavages de 5 min au TBS-T sont ensuite réalisés.

		Désignation	Espèce	Dilution	Fournisseur
	Actine	Anti-Actine (Ab-1)	Souris	1/5000 Lait 5 %/TBS-T	Calbiochem
	Akt	Akt (pan)	Lapin	1/1000 BSA 5 %/TBS-T	Cell Signaling
	Phospho Akt	Phospho Akt (Ser473)	Lapin	1/1000 BSA 5 %/TBS-T	Cell Signaling
	ERα	ERα F-10	Souris	1/1000 Lait 5 %/TBS-T	Santa Cruz
		ERα	Lapin	1/1000 BSA 5 %/TBS-T	
	Kit Phospho- Estrogen	P-ERα (Ser 167)	Lapin	1/1000 BSA 5 %/TBS-T	Coll Signaling
S	Receptor a	P-ERα (Ser 118)	Souris	1/1000 Lait 5 %/TBS-T	Cen Signaling
imaire		P-ERα (Ser 104/106)	Lapin	1/1000 BSA 5 %/TBS-T	
rps Pri	ERβ	$\frac{1}{1} ER\beta (B-1) \qquad Souris \qquad La$		1/500 Lait 5 %/TBS-T	Santa Cruz
Inticol	ERK 1/2	p44/42 MAPK (Erk1/2)	Lapin	1/1000 BSA 5 %/TBS-T	Cell Signaling
Α	Phospho ERK1/2	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Lapin	1/1000 BSA 5 %/TBS-T	Cell Signaling
	HPSE	Anti-HPSE	Lapin	1/2000 BSA 5 %/TBS-T	OriGene Europe
	JNK (FL)	JNK	Lapin	1/1000 BSA 5 %/TBS-T	Santa Cruz
	Phospho JNK	p-JNK (Thr183/Tyr185)	Chèvre	1/400 BSA 5 %/TBS-T	Santa Cruz
	SDC-1 (épitope extracellulaire)	SDC-1 (B-A38)	Souris	1/500 BSA 5 %/TBS-T	Santa Cruz
	Syndécane-1 Human SDC-1		Chèvre	1/500 BSA 5 %/TBS-T	R&D
Anticorps Secondaires	Anti-souris	Goat anti-mouse IgG-HRP	- 1/5000 Lait 5 %/TBS-T		Santa Cruz Cell Signaling
	Anti-chèvre	Mouse anti-goat IgG-HRP	-	1/2000	Santa Cruz
	Anti-lapin	Goat anti-rabbit IgG-HRP	-	Lait 5 %/TBS-T	Santa Cruz Cell Signaling

Tableau a	8.	: Anticorps	utilisés	pour le	western	blot
				-		

Les membranes sont incubées 1min à l'obscurité avec un volume équivalent de luminol et de peroxyde d'hydrogène provenant du kit d'électrochimiluminescence (Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent). En présence de l'HRP, le peroxyde est dégradé en ROS (espèces réactives de l'oxygène). Ces ROS dégradent le luminol qui émet de la lumière à l'endroit où se trouve la protéine d'intérêt. La révélation a lieu suite à l'exposition d'un film auto-radiographique sur la membrane (Hybond-ECL). Les films (Amersham Hyperfilm ECL) sont révélés dans du révélateur puis fixés.

Pour calculer l'intensité relative de chaque protéine, nous avons comparé l'intensité du signal de la protéine d'intérêt avec celle d'une protéine de référence, l'actine, à l'aide du logiciel ImageJ<sup>®</sup>. Pour cela, nous avons dénaturé pendant 30 min à 56 °C les anticorps fixés à la membrane en utilisant une solution de déshybridation ( $\beta$ -mercaptoéthanol 100 mM, SDS 0,02 % (p/v), Tris HCL 62,5 mM pH 6,7). Les membranes sont lavées plusieurs fois par des bains successifs de TBS-T puis bloquées et incubées avec l'anticorps anti-actine et l'anticorps secondaire correspondant.

La quantification des protéines d'intérêt est effectuée en comparant l'intensité du signal de la protéine d'intérêt à celle de référence.

### IV.4 Immunocytochimie

Les cellules, préalablement ensemencées à hauteur de 46000 cellules sur lamelle de verre dans des plaques 24 puits ont été lavées deux fois au PBS puis fixées pendant 15 min à température ambiante avec 400 µl de paraformaldéhyde (PFA) 4 % dilué dans du PBS préchauffé à 37 °C. Les lamelles ont été rincées deux fois avec du PBS pour éliminer le PFA puis sont conservées à 4 °C dans du PBS ou sont directement utilisées.

Le cas échéant, les cellules ont été perméabilisées avec 400  $\mu$ l de méthanol froid pendant 10 min à -20 °C. Celui-ci a complètement été éliminé par 2 lavages successifs au PBS. Les sites non spécifiques ont été saturés avec une solution de PBS contenant 5 % de SVF et 0,3 % de tritonX100 pendant 1 h à température ambiante. Les lamelles ont été rincées rapidement au PBS puis les cellules marquées pendant 1 nuit à 4 °C avec 150  $\mu$ l d'une solution de marquage (PBS ; 1 % BSA ; 0,3 % tritonX100) où l'anticorps primaire a été dilué (Tableau 9). Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois 5 min avec du PBS pour enlever l'excèdent d'anticorps puis incubées 1 heure à température ambiante à l'obscurité avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor® dilué dans le tampon de marquage (Tableau 9) à raison de 150 µl par lamelle.

Nom		Espèce	Dilution	Fournisseur
Anticorps Primaires	ERa F-10	Souris	1/100	Santa Cruz
	Human SDC-1	Chèvre	1/100	R&D
Anticorps Secondaires	Anti mouse Alexa 633	Lapin	1/200	Life Technologies
	Anti goat Alexa 488	Âne	1/200	Life Technologies

Tableau 9 : Anticorps utilisés pour l'immunofluorescence

Après 3 lavages successifs de 5 min au PBS, les lamelles ont été montées sur lame avec une goutte de milieu de montage contenant du DAPI (4',6'-diamidino-2-phényllindole, UltraCruz® mounting medium) fluoroshield. Celui-ci permet de marquer les noyaux cellulaires en s'intercalant à l'ADN. Les lamelles ont été scellées sur la lame avec du vernis puis stockées à 4 °C.

En cas de double marquage, pour observer des colocalisations par exemple, les anticorps primaires et secondaires ont été incubés en même temps.

Les immunomarquages ont été observés avec le microscope confocal à balayage laser FV1000 (Olympus) et du logiciel associé (Fluoview FV-1000) présent au niveau du Centre de Microscopie Appliquée à la biologie (CMAbio3) de l'Université de Caen.

### IV.5 Microscopie électronique en transmission

Les cellules, remises en suspension, ont été fixées deux fois pendant 30 minutes à 4 °C dans du tampon phosphate de Sorensen 0,1 M à pH 7,4 contenant 4 % de PFA et 0,1 % de glutaraldéhyde. Après 3 lavages, les aldéhydes libres ont été bloqués avec de la glycine à 50 mM diluée dans du tampon phosphate de Sorensen 0,1 M. Les cellules ont ensuite été enrobées dans de la gélatine à 10 % (10 min à 37 °C) permettant le découpage de blocs de 1 mm<sup>3</sup>.

Ces blocs ont été cryoprotégés par immersion dans une solution de saccharose 2,3 M en PBS pendant 4 h puis ont été montés sur des clous en aluminium. L'ensemble a été vitrifié dans de l'azote liquide puis a été placé dans un cryo-ultramicrotome (RMC Boeckeler). Le bloc a été taillé à -90 °C sur 4 côtés afin d'obtenir une pyramide. La température a ensuite été abaissée à -110 °C afin de réaliser des coupes ultra-fines de 80 nm d'épaisseur. Ces sections, sous forme de rubans, ont été récupérées puis plongées dans du saccharose 2,3 M. Elles ont enfin été déposées sur des grilles de microscopie en nickel recouvertes de Formwar et stockées à 4 °C avant immuno-marquage.

Les grilles ont été lavées deux fois par retournement sur des gouttes de PBS à 37 °C afin d'ôter le sucrose. Les aldéhydes libres ont été une nouvelle fois inactivés (glycine à 50 mM en PBS, 15 min à RT) puis les sites de liaisons non spécifiques ont été bloqués avec la solution Aurion Blocking (Aurion) (30 minutes à RT).

Les sections ont été placées une heure à RT en présence d'anticorps anti-ER $\alpha$  (F10, Santa Cruz) et anti Syndecan-1 (R&D Systems), utilisées tous deux à 5 µg/ml après dilution dans du PBS contenant 5 % de BSA-c <sup>TM</sup> (Aurion). Après 6 lavages, les grilles ont été incubées 1 h 30 à RT avec un anticorps secondaire conjugué à de l'or colloïdal de 6 nm (ciblant l'anticorps anti-SDC-1 de chèvre) ou de 10 nm (ciblant l'anticorps anti-ER $\alpha$  de souris) (Aurion ou Jackson ImmunoResearch Lab) (1:40).

Les échantillons ont été fixés une nouvelle fois avec du glutaraldéhyde à 1 %, puis ont été colorés avec un mélange d'uranylacétate à 0,4 % et de méthylcellulose à 2 % pendant 5 min à 4 °C. Les grilles ont été observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission (JEM-1011, JEOL, Croissy sur Seine, France) équipé d'une caméra Gatan (Evry, France) (Orius 200).

# IV.6 Analyse du clivage protéolytique du SDC-1 par cytométrie en flux

Afin d'étudier le clivage protéolytique du SDC-1, les cellules ont été récupérées de façon similaire au protocole décrit dans la partie II.1.3.b sauf que l'EDTA a été stoppé par l'ajout de MEM supplémenté en SVF déstéroidé.

Les cellules ont été fixées avec du formaldéhyde 4 % (10 min à 4 °C), ce dernier a été éliminé par centrifugation. À la suite de cette fixation, les cellules ont été conservées à 4 °C ou ont été bloquées et perméabilisées dans un tampon PBS - BSA 0,5 % - Triton 0,5 % (30 min à TA). L'ectodomaine du syndécane-1 et sa partie intra-cytoplasmique sont marqués respectivement suite à l'incubation de 1 µg d'anticorps (pour 1 million de cellules) de l'anticorps B-A38 et de l'anticorps C-20 (1 nuit à 4 °C). Le lendemain, les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS puis marquées avec un anticorps anti-souris Alexa 633 (dirigé contre l'anticorps B-A38) et un anticorps anti-chèvre Alexa 488 (dirigé contre l'anticorps C-20). Les cellules sont lavées deux fois au PBS puis passées au cytomètre de flux (Gallios Flow Cytometer; Beckman Coulter).

# V <u>Tests cellulaires</u>

# V.1 Etude de la prolifération cellulaire : coloration au cristal violet

Les cellules ont été ensemencées en triplicat en plaque 96 puits, dans le cas échéant une transfection de siRNA a précédé la stimulation des cellules.

À la fin du traitement, les cellules ont été fixées par du formaldéhyde 4 %/PBS pendant 30 min. Deux lavages au PBS ont été réalisés avant de réaliser la coloration des membranes cellulaires et du noyau par une solution de cristal violet 0,1 % (p/v), éthanol 2 % (v/v) diluée dans du PBS (30 min à température ambiante). L'excèdent de colorant a été retiré par deux lavages à l'eau osmosée puis la coloration a été solubilisée dans 100 µl d'acide acétique 10 %.

L'absorbance, qui est proportionnelle à la densité cellulaire présente dans chaque puits, est mesurée à 600 nm par un lecteur de plaques  $\sum$ 960 (MeterTech).

# V.2 Test de migration par blessure

Les cellules sont ensemencées en duplicata à une densité de 96 000 cellules par puits d'une plaque 24 puits. Après 24 h de culture, les cellules sont stimulées selon le protocole habituel.

La blessure est effectuée au milieu de chaque puits à l'aide d'une pointe de cône. Les tapis cellulaires sont ensuite lavés au PBS afin d'éliminer les cellules décollées et éviter qu'elles s'attachent dans la blessure. Pour suivre la migration des mêmes cellules au cours du temps, nous avons réalisé trois repères par puits. Les acquisitions sont réalisées à partir du microscope optique.

# VI <u>Analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux</u>

Les cellules ont été décollées puis fixées une nuit avec 70 % d'éthanol froid. Elles ont été lavées deux fois avec une solution salée tamponnée au phosphate froid puis incubées avec 100 µg/ml de RNaseA et 5 µg/ml d'iodure de propidium pendant 30 min à 37 °C. Les caractéristiques du cycle cellulaire des cellules ont ensuite été analysées en cytomètre de flux (FACSCalibur<sup>TM</sup>, Beckton-Dickinson, États-Unis).

# VII Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (Standard Error of Mean) et ont été reportés dans le logiciel d'analyse statistique GraphPad. L'analyse statistique a été réalisée quand nous avions au moins 3 expériences indépendantes. Les différences sont considérées comme significatives si p≤0,05 après un test de Student ou une analyse de la variance (Anova) suivie d'un test post hoc (Tukey ou Dunett).

# Résultats

# Validation des outils

# I <u>Détermination du gène de ménage (PCR quantitative)</u>

Les résultats de qRT-PCR présentés dans cette étude sont exprimés en  $2^{-\Delta Ct}$  ou en  $2^{-\Delta \Delta Ct}$ , c'est-à-dire que l'expression du gène d'intérêt est relative par rapport à celle d'un gène de référence. Nous avons donc dans un premier temps évalué, dans les cellules MCF7, l'absence d'effets significatifs des œstrogènes sur l'expression de 3 gènes couramment utilisés comme gène de référence : la *GAPDH* (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), une enzyme de la glycolyse, *ACTB* codant pour l'actine et *RPS16* codant pour la protéine ribosomale S16.

La stimulation des cellules MCF7, par des doses croissantes d'œstradiol pendant 6 ou 24 h, n'a pas montré de modification significative (variation inférieure à 0,7 Ct) de l'expression de ces 3 gènes par rapport à la condition contrôle (Ctr) où les cellules sont laissées dans un milieu MEM dépourvu d'œstrogènes (Figure 29).



Figure 29 : Expression des gènes de référence dans les cellules MCF7

Les cellules MCF7 cultivées en milieu MEM pendant 5 jours ont été traitées pendant 6 h (blanc) et 24 h (noir) avec des doses croissantes de 17 $\beta$ -æstradiol (0,001nM à 10nM) n=3. Le test Anova suivi d'un test post-hoc de Dunett permet de comparer l'effet dose de l'æstradiol sur l'expression des différents gènes de ménage (GAPDH, S16, actine) par rapport à la condition contrôle (Ctr). (Ct : Cycle threshold)

# II Expression des ER dans la lignée MCF7

À l'état basal, dans un milieu dépourvu d'œstrogènes, la lignée de carcinome mammaire MCF7 exprime fortement le messager ESR1 ( $2^{-\Delta Ct}$  à 0,031 ; n=3), lequel code au niveau protéique les isoformes 66 et 46 kDa du récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes (Figure 30A).

La présence de l'isoforme à 36 kDa n'a pas pu être mise en évidence avec l'anticorps monoclonal utilisé, celui-ci est dirigé contre l'épitope C-terminal (au niveau des acides aminés 576-595) uniquement exprimé par ERα66 et 46 (Figure 30B).



Figure 30 : Expression basale des récepteurs ERa dans les cellules MCF7

Les cellules MCF7 ont été cultivées dans du milieu MEM dépourvus d'æstrogène, pendant 2 jours. (A) L'expression protéique des isoformes 66 et 46 kDa d'ER $\alpha$  a été évaluée à la suite d'un immunoblot avec l'anticorps F10 (Santa Cruz) après transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose.(B) Représentation schématique de la séquence protéique des 3 isoformes d'ER $\alpha$ .

La présence du récepteur ER $\beta$ , bien que décrit dans la littérature comme étant exprimé dans les cellules MCF7, n'a pas pu être mise en évidence avec le couple d'amorces utilisé. De plus, l'absence d'expression protéique d'ER $\beta$  a été confirmée en western blot.

### III Discussion

Nous avons utilisé la lignée de cellules cancéreuses mammaires MCF7 afin d'étudier l'implication de la signalisation œstrogénique dans la régulation de l'expression du SDC-1 et de son métabolisme. Ces cellules décrites comme luminal A ne présentent pas de surexpression d'HER2, ni de mutation de la protéine p53, mais expriment les récepteurs  $\alpha$  aux œstrogènes permettant à ces cellules une réponse proliférative suite à une stimulation par l'E2 (Neve et al., 2006).

Afin d'étudier le rôle du récepteur ER $\alpha$ , nous aurions pu ré-exprimer dans les cellules MDA-MB-231, ce récepteur via la transfection d'un plasmide de surexpression. En effet, ER $\beta$  est exprimé dans ces cellules, mais pas ER $\alpha$ . Cependant, cette solution bien qu'attrayante a été écartée. En effet, bien que permettant l'expression des gènes oestrogéno-induits par ER $\alpha$  en présence d'E2, la prolifération cellulaire y apparaît inhibée (Jiang and Jordan, 1992; Zajchowski et al., 1993).

Au cours de ce travail, les cellules MCF7 ont été traitées avec des concentrations de 17β-œstradiol allant de 0,001 nM à 10 nM. L'essentiel des résultats a été obtenu après une stimulation des cellules avec une concentration de 0,1 nM d'E2 laquelle est équivalente à la concentration médiane en E2 retrouvée dans le tissu mammaire cancéreux de femmes ménopausées (Garvin and Dabrosin, 2008). La sensibilité des cellules à l'E2 a été augmentée en privant celles-ci de stéroïdes (œstrogènes, androgènes). En effet, le milieu de culture utilisé est dépourvu de rouge de phénol (un œstrogéno-mimétique reconnu) et complémenté avec 10 % de SVF traité au charbon actif pour éliminer les stéroïdes. Les cellules MCF7 expriment faiblement l'aromatase (Etique et al., 2004) et ont été cultivées dans un milieu non enrichi en cholestérol et acide arachidonique (deux précurseurs de la stéroïdogenèse). Nous avons ainsi choisi de ne pas utiliser d'inhibiteurs de l'aromatase. De plus, une absence d'effet des inhibiteurs de l'aromatase sur l'expression du SDC-1 a été mise en évidence dans les cellules MCF7 (Benad-Mehner et al., 2014). Dans ces conditions expérimentales, l'expression des ARNm codant pour la GAPDH, de l'actine ou la protéine ribosomique S16 n'a pas montré de variations significatives. Pour l'ensemble des expériences de qRT-PCR effectuées, le gène de la GAPDH sera utilisé pour normaliser l'expression des gènes d'intérêt.

# **Article 1 : Implication de la**

# signalisation œstrogénique dans la

# régulation de l'expression du

# <u>SDC-1</u>

Plusieurs études suggèrent que, dans le sein, les œstrogènes jouent un rôle dans la perte d'expression du SDC-1 à la fois dans des conditions physiologiques lors du cycle menstruel ou lors de situations pathologiques comme le cancer. Comme exposé dans l'introduction, la surexpression du SDC-1 dans les tumeurs mammaires agressives semble être associée à un statut ER- (Barbareschi et al., 2003). L'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes ERα66 dans ces cellules altère l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la TEM en permettant notamment une dérégulation de la prolifération cellulaire ou de l'apoptose.

Ces données suggèrent ainsi que la dédifférenciation cellulaire amenant à une perte d'expression des récepteurs aux œstrogènes dans les cellules cancéreuses mammaires pourrait permettre une surexpression du SDC-1.

Nous avons ainsi étudié *in vitro* l'implication de la signalisation œstrogénique dans la régulation de l'expression du SDC-1 dans les carcinomes mammaires. L'essentiel de ces travaux de thèse a été réalisé en utilisant la lignée cellulaire de carcinome mammaire ER+ (MCF7) dans laquelle nous avons modulé la signalisation œstrogénique par l'utilisation de différentes stratégies : (1) en modulant l'activité des récepteurs (utilisation d'agonistes et antagonistes activant ou inhibant spécifiquement un récepteur), (2) en réprimant l'expression d'ER $\alpha$  (interférence ARN par siRNA ou utilisation de molécules induisant une dégradation du récepteur), (3) en modulant l'activité des voies kinasiques (agonistes ou inhibiteurs), (4) en inhibant l'expression de facteurs de transcription participant à l'activité transcriptionnelle des ER (siRNA).

Ainsi, ce travail a eu pour objectif d'évaluer si l'expression du SDC-1 était modifiée par les œstrogènes et/ou par l'activation ligand-indépendante de la signalisation œstrogénique et d'en identifier les acteurs associés (récepteurs) ainsi que les voies et intermédiaires mis en jeux. Les résultats de ce travail seront soumis prochainement à la revue « Endocrine Related Cancer ».

#### Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer



# Estrogen induced syndecan-1 down-regulation in human breast carcinoma cells

Journal:	Endocrine-Related Cancer
Manuscript ID	ERC-17-0457
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	13-Oct-2017
Complete List of Authors:	Fleurot, Emmanuelle; Université de Caen, Laboratoire Oestrogènes et Reproduction Goudin, Caroline; Université de Caen, Laboratoire Oestrogènes et Reproduction Hanoux, Vincent; Université de Caen, Laboratoire Oestrogènes et Reproduction Bonnamy, Pierre-Jacques; Université de Caen, Laboratoire Oestrogènes et Reproduction Levallet, Jérôme; Université de Caen, Laboratoire Oestrogènes et Reproduction
Keywords:	Syndecan-1, Breast cancer, Estrogen, MCF-7



#### Page 1 of 42 Manuscript su

Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

# 1 Estrogen induced syndecan-1 down-regulation in

# 2 human breast carcinoma cells

- 3 Emmanuelle Fleurot, Caroline Goudin, Vincent Hanoux, Pierre-Jacques Bonnamy and Jérôme
- 4 Levallet
- 5 <sup>1</sup> Normandie Univ, France; UNICAEN, IBFA, F-14032 Caen, France; EA 2608, F-14032
- 6 Caen, France
- 7 Corresponding author's: Levallet J. Estrogènes, Reproduction, Cancer (OeReCa), EA
- 8 2608, Université de Caen Normandie, CS 14032. 14032 CAEN
- 9 E-mail address: Jerome.levallet@unicaen.fr. Phone: +33 (0) 2 31565526
- 10 Short title: Estrogen repress SDC1 in breast cancer cells
- 11 Keywords: Syndecan-1, Estrogen, Breast cancer, MCF-7
- 12 Abbreviations : GPER1: G protein-coupled estrogen receptor 1; ESR1: estrogen receptor 1
- 13 (ERa), ERBB2: erb-b2 receptor tyrosine kinase 2; IL-6 : interleukin-6; PGR: progesterone
- 14 receptor; SDC1: syndecan-1; NFκB: nuclear factor kappa B, SERM : Selective Estrogen
- 15 Receptor Modulator.
- 16 World count: 4809
- 17

#### Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

Page 2 of 42

#### 18 ABSTRACT

19 Breast cancer is the first cause of cancer-related mortality among women. Patients expressing 20 the estrogen receptor a (ERa), the main mediator of the tumorigenic effects of estrogen, are responsive to anti-hormonal therapy. However, 30% of these patients become resistant and 21 22 relapse. Overexpression of syndecan-1 (SDC1), a transmembrane heparan sulfate 23 proteoglycan involved in angiogenesis, proliferation and invasiveness of cancer is associated 24 with a poor prognosis and contributes to chemoresistance in human breast carcinoma. 25 Furthermore, the up-regulation of SDC1 is correlated with ER negative status and with the 26 aggressiveness of the tumor. The aim of this study was to elucidate the effects of estrogen 27 signaling on SDC1 expression. We demonstrated that in ER positive mammary carcinoma 28 cells MCF-7, ERa induces downregulation of SDC1 expression through both ligand-29 dependent and independent processes. This inhibitory effect, which can be antagonized by 30 tamoxifen and ICI, depends on de novo synthesis. Furthermore, the addition of Bay as an inhibitor of IKK kinase abrogated E2-mediated SDC1 inhibition by preventing the ERa 31 32 phosphorylation on Ser118 which is a prerequisite for transcriptional activity. We also 33 demonstrated that Bay increases ER $\alpha$  turnover suggesting that IKK stabilize ER $\alpha$  in its active 34 form and maintains the inhibitory activity of the ligand-activated ER on SDC1 expression. 35 Our results demonstrated an antagonism between estrogen signaling and SDC1 expression 36 which could influence the mammary carcinoma cells phenotype. Our results highlight SDC1 37 as a new and attractive therapeutic target for treatment of estrogen-resistant ER(+) breast 38 cancer as well as for the aggressive ER(-) subtype.

39

#### Page 3 of 42

Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

#### 40 Introduction

41 Breast Cancer is a heterogeneous disease with distinct clinical outcomes; it represented 25 % 42 of all women cancers diagnosis in the world, in 2012, and was the first cause of cancer-related 43 mortality among women (Torre et al., 2015). Breast tumors are classified on the basis of 44 histologic, genetic and molecular analysis, thus allowing the definition of subtypes according 45 to the hormone receptors expression (HR+/HR-) including estrogen (ER) or progesterone 46 receptors (PR) and/or human erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (ERBB2) (HER2+/HER2-) 47 (Malhotra et al., 2010). ER+ tumors, accounting for about 70% of breast cancers, expressed 48 estrogen receptors (ER), and thus indicate an estrogen-dependent tumor progression (DeSantis 49 et al., 2011). The biological functions of estrogens are mediated by the two structurally 50 related estrogen receptor subtypes ER $\alpha$  and ER $\beta$  (coded respectively by ESR1 and ESR2 genes), primarily through their ability to function as ligand-activated transcription factors. The 51 binding of estrogen to ERa, the main mediator of estrogen action in breast cancer, induces 52 receptors dimerization and their subsequent nuclear translocation. E2-ER complex can 53 interact with DNA either directly through recognition and binding to estrogen response 54 55 elements (ERE) or through tethering to other transcription factors such as AP-1, SP1 or NFkB (O'Lone et al., 2004; Saville et al., 2000; Galien and Garcia, 1997). Both mechanisms lead to 56 57 the recruitment of multiprotein complexes, containing transcriptional co-regulators and 58 chromatin-modifying enzymes, regulating target genes transcription (Frasor et al., 2003; Hall 59 and McDonnell, 2005; O'Lone et al., 2004). However, ER $\alpha$  activity can also be regulated by 60 post-translational modifications such as phosphorylation, acetylation, sumoylation, or ubiquitination (Le Romancer et al., 2011). Therefore, ERs expression and function have 61 62 important implications in tumor biology and therapy as estrogen markedly influences gene expression patterns of breast carcinomas (DeSantis et al., 2011). In this respect, ER+ subtype 63

#### Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

#### Page 4 of 42

64 displayed sensitivity to selective estrogen receptor modulator (SERM, i.e tamoxifen) or to 65 selective estrogen receptor down regulator (SERD, i.e ICI 182,780) both targeting ER $\alpha$ respectively with an antagonist activity or by promoting receptor disruption through 66 67 proteasomal degradation (Howell et al., 2004). Although, anti-estrogen treatments have been positively exploited they are not effective in all ER+ tumors in such a way that de novo or 68 acquired resistance occurs, resulting in patient relapse (ca. 20-30 %) (Castrellon, 2017). 69 Additionally, triple-negative breast cancers (TNBCs) which do not express any of the 70 71 receptors (ER, PR or HER2) are therefore subtypes resistant to most hormonal targeted 72 therapies (Rivenbark et al., 2013). Thus, the understanding of breast cancer biology is essential to identify potential predictive markers of endocrine therapy response or new 73 74 molecular targets for the treatment of aggressive breast carcinomas and/or the resistance to 75 anti-hormonal therapy.

76 In breast cancer, a complex interplay between mitogen pathways and matrix environment 77 governs not only the development but also the acquisition of therapy resistance. SDC1, a 78 transmembrane heparan sulfate proteoglycan, is an essential component of the cellular 79 microenvironment and despite devoid of intrinsic catalytic activity, syndecan-1 plays critical 80 roles in cellular processes such as cytoskeletal organization, adhesion/migration, proliferation 81 and differentiation. Through binding the extracellular matrix (ECM) and/or soluble ligands as 82 growth factors, SDC1 may act as cell surface co-receptors to regulate intracellular signaling 83 pathways (Multhaupt et al., 2009). SDC1 can also be translocated into the nucleus to interact with nuclear proteins, including transcription factors or histones, and thus modulate the 84 85 expression of target genes (Brockstedt et al., 2002; Szatmári et al., 2012). In accordance, we recently demonstrated that SDC1 overexpression in human granulosa tumour cell line KGN 86 87 drastically affects estrogen synthesis and action through transcriptional inhibition of 88 CYP191A and ESR2 expression (Colombe et al. 2017). SDC1 expression appears to be highly

#### Page 5 of 42

#### Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

controlled and its dysregulation is involved in many diseases including breast carcinoma 89 90 where it was found overexpressed in the most aggressive carcinomas subtypes (Barbareschi et 91 al., 2003). SDC1 expression appears to be associated with tumor progression, angiogenesis, a 92 higher histological grade of tumor and a decrease of relapse-free survival (Barbareschi et al., 93 2003; Maeda et al., 2004, 2006). Indeed, the SDC1 seems to be a marker of aggressiveness 94 and chemo-resistance in human breast carcinoma (Götte et al., 2006). Furthermore, a 95 resistance of syndecan-1-deficient mice to experimentally-induced breast tumorigenesis has been demonstrated (Alexander et al., 2000; Ibrahim et al., 2012; McDermott et al., 2007). 96 97 In light of these data, and although no direct evidence has been established, we hypothesized that a functional antagonism between E2-mediated signaling and SDC1 metabolism might 98 99 participate in mammary tumorigenesis. Thus, we studied the consequences of estrogen 100 stimulation in SDC1 gene and protein expression in both ER positive MCF-7 and ER negative (MDA-MB-231) mammary carcinoma cells. 101

102

Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

Page 6 of 42

# **Materials and methods**

#### 104 Materials

105 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), Ham F12 medium, trypsin, kanamycin, 106 penicillin, fungizone antibiotics, TriReagent® solution were purchased from Dominique 107 DUTSCHER SAS (Brumath, France). Goat polyclonal and mouse monoclonal anti-human 108 Syndecan-1 antibodies were respectively from R&D Systems (Lille, France) and Santa Cruz 109 Biotechnology (Heidelberg, Germany) respectively. ESR1-antibody (F10), HRP-conjugated 110secondary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Fetal 111 bovine serum, Opti-MEM®, Lipofectamine® RNAiMax, ECL staining kit, Hybond® ECL 112 nitrocellulose membrane were purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France). M-MLV-RT, random primers, dNTPs, RNasin, Taq DNA polymerase, GoTaq qPCR Master 113 114 Mix were from Promega (Charbonière-les-bains, France). E2, propyl pyrazole triol (PPT), Diaryl-propionitrile (DPN), G1, G15, H89, were from Sigma (Saint Quentin Fallavier, 115 France) Kinase inhibitors Ly290004, UO126 and Bay 11-7085 were purchase from 116 selleckchem (Souffelweyersheim, France). 117

#### 118 Cell line and basal culture conditions

The human mammary adenocarcinoma cells MCF-7 (ATCC HTB-22) and MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) were obtained from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) (Salisbury, UK) and cultured in Ham's/DMEM medium (1:1 / v:v) supplemented with 10% (w/v) of heat inactivated fetal bovine serum (HD-10 %FBS), 2mmol/L glutamine and antibiotics (50 UI/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin, 100  $\mu$ g/ml kanamycin and 0.25  $\mu$ g/ml fungizone) in a humidified atmosphere of 5 % CO2 at 37 °C.

#### Page 7 of 42 Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

#### 125 Hormonal and chemical treatments

126 Before hormonal or chemical treatments cells were cultured during 5 days in DMEM medium 127 without phenol red, supplemented with 4.5 g/l glucose and 10 % (w/v) of charcoal treated 128 FBS (MEM-10 % FBSdest) for steroid deprivation. Cells were trypsinized and re-seeded in 129 appropriate culture dishes at a density adjusted to subsequent experiments. 17ß-estradiol (E2) was used in concentration ranging from 10<sup>-12</sup> mol/L to 10<sup>-8</sup> mol/L during incubation time 130 ranging from 30 min to 96 h. Anti-estrogen ICI 182,780 (ICI) and 4-OH-tamoxifen (Tam) 131 132 were used at 10<sup>-8</sup> mol/L as well as selective estrogen agonist and antagonist (PPT, DPN, G1 and G15) or kinase pathway inhibitors (H89, Ly290004, UO126, SP600125 and 133 Bay 11-7085). 134

#### 135 Small interfering RNA studies

MCF-7 cells were plated in a 96, 6 or 24-well plate in MEM-10 % FBSdest without 136 137 antibiotics 24 h before transfection. SDC1-siRNA (HSS14-3872, Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France) or ESR1-siRNA (5'-UCA-UCG-CAU-UCC-UUG-CAA-AdTdT-3'; 138 139 5'-UUU-GCA-AGG-AAU-GCG-AUG-AdTdT-3') as well as negative control siRNA Medium GC duplex #2 were diluted in Opti-MEM® medium and transfected using 140141 Lipofectamine® RNAiMax according to the supplier recommendation. Six hours after 142 transfection, medium was renewed with medium containing antibiotics. Cellular 143 consequences of mRNA and protein silencing levels were studied from 24 to 72 h after 144 transfection.

- 145 RNA extraction and real-time RT-PCR
- Total cellular RNA from MCF-7 or MDA-MB-231 cells was isolated using the TRI Reagent®
  Kit (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's protocol. Two hundred and fifty nanograms
- 148 of RNA were reverse transcribed during 1h30 at  $37\,^\circ\mathrm{C}$  with  $200\,\mathrm{U}$  M-MLVRT,

#### Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

#### Page 8 of 42

149 20 U RNasin, 0.5 µg oligo dT, and 100 µmol/L dNTP following by 5 min at 65 °C. Semi 150 quantitative PCR was performed with Agilent Technologies Mx3005P real-time PCR system 151 (Agilent Technologies, Massy, France) and the detection was done by the fluorescent dye 152 SYBRGreen with GoTaq qPCR Master Mix (Promega, France). After initial step of 3 min at 153 95 °C, 40 cycles of PCR including 30 sec at 95 °C followed by 1 min at 60 °C were 154 performed using specifics primers set (Table 1). Cycle threshold values were normalized by 155 housekeeping gene GAPDH. The relative mRNA expression level was calculated as fold 156 changes using the comparative threshold cycle value (2- $\Delta\Delta$ CT). The specificity of the 157 primers was confirmed for each PCR run by dissociation curve analysis.

#### 158 Western blotting

159 Cell lysates were obtained after incubation of cell layer with SDS lysis buffer (62,5mM Tris-HCl pH 6.8; 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerol; 50 mmol/L DTT; 0.01 % 160 161 (w/v) Bromophenol Blue). Total proteins were sonicated and denatured 5 min at 95 °C before 162 loading and separating by SDS-PAGE and electro-transferred to Hybond-ECL nitrocellulose membrane. Membranes were blocked in 5% nonfat dry milk in TTBS (Tris-base 20 mmol/L, 163 164 NaCl 200 mmol/L, 0.1 % Tween 20) at room temperature for 1 h before probing with primary antibody (1:1000 in TTBS-1% BSA) overnight at 4 °C. Membranes were washed 165 166 with TTBS then incubated with HRP-conjugated secondary antibody for 1 hour at room 167 temperature. Immunoreactive bands were detected using an enhanced chemiluminescence 168 reaction kit (ECL), revealed by autoradiography and quantified by densitometry using Image J software. For loading control, the membranes were stripped and re-probed with mouse anti-169 170 actin antibody (Ab-1).

#### 171 Cell growth assay and cell cycle analysis

- 172 MCF-7 cells were plated in 96-well plates at a density of  $6 \times 10^3$  cells per well and cultured for
- 173 additional 24 to 96 h in MEM-10 % FBSdest containing or not E2 and/or additional

#### Page 9 of 42

#### Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

174 chemical treatments (ICI, Tam). At the end of incubation period, cells were washed with PBS 175 before fixed with formal dehyde 4 % and stained during 30 min with crystal violet  $0.1\ \%$ 176 (w/v). Dye excess was removed washing and solubilized with 10 % acetic acid. Absorbance of crystal violet was measured at 600 nm using a microplate reader  $\sum$  960 (Metertech). Each 177 178 treatment was performed in triplicate. For flow cytometry, cells  $(1 \times 10^6)$  were harvested with 179 PBS-EDTA, fixed in 75 % ice-cold ethanol, and stained with propidium iodide (DNA-Prep 180Reagents kit). Cell cycle analysis was performed using the Gallios Flow Cytometer System 181 and analyzed with Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter, Villepinte, France). 182 Confocal imunocytochemistry

183 Cells were grown on glass coverslips in 24-well plates, fixed with 4 % paraformaldehyde for 184 15min then permeabilized with 100 % methanol at -20 °C for 10min. Non-specific binding 185 sites were blocked with PBS-5 % BSA before overnight incubation at 4 °C with primary 186 antibody (diluted 1:50 in PBS containing 0.3 % Triton X-100 and 1 % BSA) in a humidified 187 dark chamber. After washing, Alexa Fluor® conjugated secondary antibody (1:100) was 188 added at room temperature for 1 h and coverslips mounted with Fluoroshield<sup>TM</sup> (Sigma-189 Aldrich, France) mounting medium containing 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 190 DNA counterstaining. The slides were observed by confocal laser scanning microscopy using 191 a FluoView-FV1000, Olympus. Scaling, fluorescence signal collection and measurement 192 were performed through the control software (FV10-ASW-1.7, Olympus).

193 Statistical analysis

The GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, Inc.) was used for the statistical analysis. Experimental data are expressed as the means ± SE. The differences between groups were analyzed using the Student's t-test or the one-way analysis of variance followed if

#### Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

- 197 difference by Dunnett's or Tukey's test. Differences were considered statistically significant
- 198 at P < 0.05.

199
#### Page 11 of 42

#### Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

# 200 **Results**

201 Estradiol inhibits SDC1 mRNA and proteins expression in MCF-7

MCF-7 cells were treated for 24 h with increasing concentrations of 17β-estradiol (10<sup>-12</sup> to 202 203  $10^{-8}$  mol/L) in medium without phenol red, and supplemented with 10 % of charcoal treated 204 FBS for steroid deprivation (MEM). As shown in Fig. 1A, E2 induced a dose-dependent 205 repression of SDC1 mRNA expression reaching up to 70 % inhibition with 10<sup>-10</sup> mol/L. In the 206 same experimental conditions, PGR expression, a notorious estrogen target gene, was 207 drastically up-regulated (Fig1B). SDC1 inhibition can also be observed at protein level either 208 by western blot (Fig. 1C) or by immunocytochemistry (Fig. 1D) after at least 24 h of E2-209 treatment. As expected, down-regulation of SDC1, at both mRNA and protein levels, could 210 also be observed in cells cultured in medium supplemented with FBS containing steroids 211 (non- charcoal-treated) (HD), which adequately confirms E2-dependent inhibition of SDC1 212 expression (Figure 1E and F).

## 213 E2 repressing SDC1 in an ERα-dependent manner

214 MCF-7 is an epithelial carcinoma cell line expressing human ESR1 and GPER but not ESR2 215 (Fig. 2A). In order to identify the estrogen receptor involved in E2-dependent SDC1 216 repression, MCF-7 cells were stimulated with selective agonists of ER $\alpha$ , ER $\beta$  and GPER (respectively PPT, DPN and G1 at 10<sup>-8</sup> mol/L). As shown in Fig. 2B, only the ERa-agonist 217 218 PPT mimics E2 action and inhibits SDC1 expression. Furthermore, the GPER antagonist G15 219 cannot prevent estradiol effects, suggesting the absence of GPER signaling contribution in the 220 repression of E2-mediated SDC1. The involvement of ER is further supported by the use of 221 tamoxifen (Tam), an ER-selective antagonist, which totally blocks the E2-dependent 222 inhibition of SDC1 without affecting its basal expression (Fig. 2C). Furthermore, no

#### Page 12 of 42

223 repression of SDC1 mRNA was observed in MDA-MB-231 cells (Fig. 2E), which do not

224 express any ERs (Fig. 2D.

# 225 Indirect ERα-dependent genomic signaling pathway required to down-regulate SDC1

226 expression

227 To induce or repress transcription of its target genes, ERa relies on several mechanisms 228 including classical genomic pathway, epigenetic changes such as DNA methylation or 229 acetylation but also uses secondary long-term action through tethering/sequestration of 230 transcriptional elements (Katzenellenbogen et al., 2000). As shown in Fig. 3A E2-mediated 231 SDC1 mRNA repression was observed only after 12 h of E2 treatment (Fig. 3A) and after 232 24 h at protein level (Fig. 3). The well-known ER-target genes TFF1, PGR and cyclin D1 233 (CCND1), which are regulated respectively through the direct ERE site (O'Lone et al., 2004), 234 or the indirect transcription factor AP1/SP1 (Saville et al., 2000) or NFKB (Galien and Garcia, 235 1997) were up-regulated as early as 3 h after E2 treatment (Fig. 3C and D). In contrast, 236 ERBB2 and ESR1, which are not primary target genes of estrogen, respectively require a 237 minimum of 6 h and 12 h of E2-treatment to finally display a significant repression (Fig. 3E); 238 suggesting that SDC1 belongs to this subclass of late regulated genes. Furthermore, a pre-239 treatment with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) drastically reduce E2-240 dependent down-regulation of SDC1 expression (83.4 % in untreated cell to 44.8 % in CHX-241 treated cells) (Fig. 3F). Additionally the RNA polymerase inhibitor actinomycine D (ACT) 242 totally abrogate this inhibition confirming that transcriptional events are required to sustain a 243 full action of E2 on SDC1 expression.

Furthermore, in MCF-7 cells pre-treated with ACT+CHX and stimulated for 1 to 6 h with or without E2, *SDC1* mRNA level remains unchanged (Fig. 3F); this suggests a high stability of *SDC1* mRNA and an absence of E2-regulated turn-over. Finally, the epigenetic regulation of *SDC1* expression was estimated using the DNA methyltransferase inhibitor,

### Page 13 of 42

#### Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

248 5-aza-2-deoxycytidine (AZA) and the histone deacetylase inhibitor TSA. The AZA treatment 249 has no incidence on both basal and E2-inhibited SDC1 expression suggesting that methylation 250 does not represent a mechanism of SDC1 silencing (Fig. 3G). In contrast, SDC1 mRNA 251 expression was highly reduced (- 46 %) from 6 h of TSA treatment to achieve 80 % inhibition 252 after 24 and 48 h (Fig. 3H). In the same experimental conditions, ESR1 mRNA expression 253 was more deeply affected, with a loss of 93 % of its expression level after 6 h to become 254 almost undetectable thereafter, thus suggesting that whether acetylation/deacetylation 255 mechanism seems to be involved in the regulation of SDC1 expression, this would be 256 independent to ER signaling.

257 NFκB pathway inhibitor Bay 11-7085 reduces the ERα-mediated SDC1 down258 regulation.

259 It is well established that a cross-talk between ER signaling and growth factors pathways can 260 affect both genomic and nongenomic estrogen signaling through post-transcriptional modification of ER and finally of its activity. The activation of MAPK/ERK, PI3K/AKT or 261 262 JNK pathways were estimated 30 min after addition of estradiol or EGF treatment. As shown 263 in figure 4A, even though EGF can induce a rapid phosphorylation and activation of ERK1/2 264 and AKT, these growth factors have no effect on SDC1 expression (Fig. 4B). In contrast, the 265 estradiol treatment, which was ineffective to activate these pathways, can sustain the 266 inhibition of SDC1 expression, even in presence of MEK, PI3K and JNK pathway inhibitors (respectively by UO126, Ly294002 or sp600125) (Fig. 4B). However, a 30-min pre-treatment 267 268 with the NF $\kappa$ B pathway inhibitor Bay 11-7085, which had no effects on basal expression, significantly reduced the E2-mediated SDC1 repression by twofold (Fig. 5A). Interestingly, 269 270 TNF $\alpha$ , an upstream activator of NF $\kappa$ B (Fig. 5B), or the silencing of RelA, the main

271 downstream mediator of NFkB (fig. 5C and D) have no impact on E2-mediated SDC1

#### Page 14 of 42

272 repression. Considering that RelA (Fig. 5E) as well as p50 (not shown) are not target gene of E2, we hypothesized that Bay directly affects ERa transcriptional activity. In figure 5F, we 273 274 showed that phosphorylation of ER $\alpha$  on Ser118, a marker of ER $\alpha$  activity that can be induced 275 after a 30-minute E2 treatment, is abrogated by a pre-treatment with Bay. However, the 276 phosphorylation of Ser167 and Ser104/106 or the total ERa66 contents were found unaffected 277 either by the short Bay treatment or by E2 stimulation. In contrast, after a long-term treatment 278 with Bay (6 h) the cellular content of the ER $\alpha$  protein was significantly reduced (Fig. 5G). It 279 should be noted that the functionality of Bay (Fig. 6A), of the TNF $\alpha$  treatment (Fig. 6B) and 280 the effectiveness of siRelA silencing were confirmed by measuring consequences on IL6 281 expression (Fig. 6C and 6D).

282 Loss of ERα induces SDC1 mRNA expression

283 We have demonstrated in present paper that ER $\alpha$  mediates the E2-dependent inhibition of 284 SDC1 expression. We then investigated the consequences of loss of ERa expression using 285 RNA interference. A siRNA targeting ESRI mRNA was transiently transfected in MCF-7 286 which resulted in ERa down-regulation (Fig. 7A). This down-regulation was observed at both 287 mRNA and protein levels with a comparable 60% decrease in expression (Fig. 7B and C). In 288 addition, a concomitant  $2.9 \pm 0.7$ -fold increase of SDC1 expression was observed in mRNA (Fig. 7D) and 2.8  $\pm$  0.7-fold in protein (Fig. B and C). Even after siER $\alpha$  transfection, the ER 289 expression level was still detectable by QRT-PCR and western blot, these transfected MCF-7 290 291 acquired characteristics of ER (-) cells including the absence of E2-mediated inhibition of 292 SDC1 expression and Bay effects (Fig. 7D) and finally reduced PGR expression in response 293 to E2 stimulation (Fig. 7E). The pure anti-estrogen ICI 182,780 (ICI) was used to confirm the 294 up-regulation of SDC1 in ERa depleted MCF-7 cells. Additionally, after a 24-hour ICI 295 treatment, a significant increase of SDC1 mRNA expression (Fig. 8A) was observed. The ICI

## Page 15 of 42

#### Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

- treatment induces a time-dependent proteasomal degradation of ERα which was inversely correlated to SDC1 protein content (Fig. 8B). The antagonism between ERα expression level and SDC1 content was also exemplified using on immunocytological approach and confocal observation demonstrating a 30% decrease in ERa contents against 45% increase of SDC1 (Fig. 8C and D).
- 301



Page 16 of 42

# 302 **Discussion**

303 In the current study, we have investigated the impact of estrogen and its down-stream 304 signaling pathways on SDC1 expression. In the ER (+) MCF-7 cells, we demonstrated that 305 17β-estradiol inhibits SDC1 mRNA expression, in a dose-dependent manner, resulting in a 306 significant decrease in SDC1 protein level. Through various strategies, we strictlu identified 307 ERa as being a main mediator of E2 responsiveness. Firstly, E2-dependent inhibition can be 308 mimicked by the selective ERa agonist PPT; however, this is notthe case with ERB or GPER 309 agonists. Secondly, tamoxifen, a SERM, which prevents ligand-dependent ERa activation 310 (Pearce et al., 2003), inhibited E2-mediated SDC1 repression. Finally, we have shown that 311 estradiol-dependent inhibition of SDC1 is lost in ER (-) MDA-MB-231 cell lines. Taken 312 together, these results demonstrate the importance of ERa in estradiol-dependent inhibition of 313 SDC1 expression. Interestingly, we also showed that depletion of ER $\alpha$  induces an up-314 regulation of both SDC1 mRNA and protein expression, suggesting a basal ligand-315 independent repression of SDC1 by ERa. Down regulation of ERa was obtained either by 316 siRNA or by using ICI, which inhibits the nucleocytoplasmic shuttling of ER (Dauvois et al., 317 1993) and targets ER for proteasomal degradation (Kocanova et al., 2010). Although an inverse correlation between ER status and SDC1 expression has been observed in breast 318 319 cancer overexpressing SDC1 (Barbareschi et al., 2003), we identified for the first time to our 320 knowledge, that SDC1 belongs to the estrogen target gene in breast cancer cells. In fact, a link 321 between the cyclic hormonal status and SDC1 expression has already been evoked in 322 connection with human ovary and endometrium (Germeyer et al., 2007; Hallberg et al., 323 2010), but these cyclic changes in SDC1 expression has been mainly attributed to the growth factors actions rather than to direct sex steroid regulation (Inki, 1997). However, the estrogen 324 325 dependency of other syndecan family members has been previously demonstrated in MCF-7

Page 17 of 42

## 326 cell lines (Kousidou et al., 2008). Yet, even if an increases in SDC4 expression and a down-327 regulation of SDC2 have been reported, in the particular case of SDC2, E2 effects seem to be 328 mediated through ER $\alpha$ only for SDC2 (Kousidou et al., 2008), which leads us to believe that 329 E2 might influence expression of syndecan member's through multiple signaling pathways. 330 Moreover, our results bring some new elements of understanding of the mechanism that 331 sustains E2-mediated SDC1 repression. First of all, we showed that estradiol inhibition was 332 only effective after 12-hour E2 exposition, which suggests that E2-mediated repression of 333 SDC1 synthesis is an indirect mechanism, presumably involving early changes in transcriptional regulators expression. This observation is also consistent with previous 334 335 observations showing that up-regulation of gene expression occurs in acute estrogen treatment 336 while the majority of E2-down-regulated genes require a sustained estrogen treatment and 337 appear to be regulated through indirect mechanisms (Frasor et al., 2003; Hah and Kraus, 338 2014; Lin et al., 2004). In this respect, in silico analysis of human SDC1 promoter did not 339 reveal ERE-like sequences in human 5'-UTR of SDC1 gene, and to our knowledge, a direct 340 binding of ER $\alpha$ to SDC1 promoter has never been reported. Nonetheless, to sustain breast 341 cancer growth and progression, in addition to genomic classical (via ERE) actions, an 342 alternative ER signaling can be mediated through the interaction of ER $\alpha$ with other 343 transcription factors (FOS/JUN, SP1, NFkB). Some responsive elements for this transcription factor have been identified in the SDC1 promoter including SP1 (Vihinen et al., 1996) and 344 345 NFkB (Hinkes et al., 1993; Iguchi-Ishiguro et al., 2012). The assumption that SDC1 is a 346 secondary response gene, is also supported by the loss of E2-mediated inhibition after 347 addition of ARN polymerase II or protein synthesis inhibitor; indeed this demonstrates that 348 SDC1 repression induced by $17\beta$ -estradiol was mediated through the activation of ER $\alpha$

349 ligand-dependent genomic pathways.

#### Page 18 of 42

350 Moreover, we have also investigated the contribution of different kinase pathways in SDC1 351 repression. These pathways are activated by growth factors resulting in the activation of ER $\alpha$ 352 through ligand-independent post translational modification such as phosphorylation (Barone 353 et al., 2010; Le Romancer et al., 2011). Using selective inhibitors, we demonstrated that 354 neither ERK nor JNK were involved in E2-mediated or ligand-independent SDC1 repression. 355 However, the inhibition of PI3K/AKT pathway reduced basal SDC1 expression but had no 356 effect on its E2-induced repression. Finally, the activation of these downstream signaling 357 pathways (ERK and AKT), subsequently to EGF treatment had no impact on SDC1 358 expression, suggesting a reduced influence of these pathways on SDC1 regulation of breast 359 cancer cells. In contrast, IKK inhibitor (Bay 11-7085), which prevents the activation of NFKB 360 pathway (Pierce et al., 1997) considerably reduced E2-dependent SDC1 inhibition without 361 modifying their basal expression. It B kinase (IKK) complex, which consists of IKK $\alpha$  and 362 IKK $\beta$  and the regulatory subunit IKK $\gamma$ , is a critical activator of the NF $\kappa$ B pathway. A 363 dialogue between NFkB pathway and ER signaling has already been reported (Frasor et al., 364 2009; Kalaitzidis and Gilmore, 2005; Van Laere et al., 2007) and E2-dependent inhibition of 365 TNF $\alpha$ -induced *IL6* expression, dealt with in the present article, confirms this crosstalk. Moreover, we have shown that the IKK inhibitor Bay prevents the E2-mediated 366 367 phosphorylation of ERa on serine 118. Keeping in mind that this posttranslational 368 modification is a prerequisite for ER transcriptional activity and that Bay has no effect on 369 basal SDC1 expression, we hypothesized that the phosphorylation of ligand-activated ER $\alpha$  by 370 IKK is required for E2-dependent SDC1 repression. The activation of ER $\alpha$  through the 371 Ser118 phosphorylation has been previously described with IKK $\alpha$  (Park et al., 2005) and 372 MAPK (Kato et al., 1995) kinases in the MCF-7 cells. This phosphorylation facilitates the 373 direct binding of ER to the promoter of ER target genes and also promotes interactions with 374 coregulators (Le Romancer et al. 2011); it is therefore required for the down-regulation of

## Page 19 of 42

#### Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

375 gene expression by 17β-estradiol and 4-hydroxytamoxifen (Cheng et al., 2007). In this line, 376 Marino et al. demonstrated that E2 inhibits the expression of cytokine IL-6 (IL-6) through the 377 interaction between ER $\alpha$  and the c-rel subunit, thus preventing NF- $\kappa$ B binding to *IL-6* 378 promoter and finally its transcriptional stimulation (Marino et al., 2006). It is interesting to 379 highlight that, even if TNFa stimulation or RelA silencing profoundly modulates IL-6 380 expression in the MCF-7 cells, these treatments had no impact on E2-mediated inhibition of 381 SDC1 expression, excluding a direct interaction of NF $\kappa$ B transcriptional complex and ER $\alpha$  in 382 the SDC1 promoter. However, we also demonstrated that in MCF-7 cells, a sustain treatment 383 with the IKK inhibitor increases ERa turnover both in a ligand-dependent and independent 384 manners. Thus, by phosphorylating ERa, IKK could stabilize ERa in the active form and 385 prevents its degradation by the proteasome, and therefore maintain the inhibitory activity of 386 the ligand-activated ER on SDC1 expression. It has been shown that SDC1, overexpressed in 387 ER (-) breast cancer (Baba et al., 2006; Barbareschi et al., 2003), can act as a co-receptor for 388 IL-6 via its glycosaminoglycan chains and thus promote the activation of the inflammatory 389 NFkB pathway and the appearance of more aggressive and inflammatory forms of cancers 390 (Hassan et al., 2013). Hence, the activation of NF $\kappa$ B in the inflammatory form of breast 391 cancer (IBC) is associated with a loss of estrogen receptors (Van Laere et al., 2007). Indeed, 392 the malignant progression of breast cancer, is coincident with a shift from the estrogen 393 dependence to estrogen independence which also coincides with an increase in NFKB activity 394 (Ray et al., 1997). The current first line therapy for ER positive breast cancer patients is a 395 treatment based on the selective estrogen receptor modulator tamoxifen. However, in accordance with our observations, this treatment might, by blocking estrogen signaling, 396 397 remove ER-mediated repression on SDC1 and NFkB pathways and thus participate in the 398 resistance and relapse mechanism.

#### Page 20 of 42

399	In conclusion, our results demonstrated for the first time an antagonism between E2-mediated
400	signaling and SDC1 expression. Indeed, we have shown that IKK activation, which
401	phosphorylates ER $\alpha$ on Ser118, is required for the E2-dependent inhibition of SDC1. Our
402	results could also support the inverse correlation between SDC1 and ER expression
403	previously suggested in ER (+) breast cancer as well as the up-regulation of SDC1 observed
404	in ER (-) tumors (Baba et al., 2006; Barbareschi et al., 2003). Novel therapeutic strategies are
405	needed for the treatment of drug-resistant ER (+) and ER (-) breast cancer and SDC1 might be
406	a potential candidate.
407	

407

# Page 21 of 42 Manuscript submitted for rev

# Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

# 408 **Declaration of interest**

- 409 The authors declare no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the
- 410 impartiality of the reported research.

# 411 Funding

- 412 This work was supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la
- 413 Recherche et de l'Innovation.

# 414 Acknowledgements

- 415 The authors thank D. Goux and N. Elie from the Centre de Microspeopie Appliquée à la
- 416 Biologie (CMABIO3), University of Caen Normandie. We also thank I. Guénon from
- 417 OeReCa laboratory and M. Guillamin from the Service Cytométrie of the Centre François
- 418 Baclesse (BioTICLA). The authors would like to thank C. Quint from the "Carré
- 419 International", University of Caen Normandy for the proofreading of this manuscript.

420

Page 22 of 42

# 421 **References**

- 422 Alexander, C.M., Reichsman, F., Hinkes, M.T., Lincecum, J., Becker, K.A., Cumberledge, S.,
- 423 and Bernfield, M. (2000). Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis
- 424 in mice. Nat. Genet. 25, 329–332.
- 425 Baba, F., Swartz, K., van Buren, R., Eickhoff, J., Zhang, Y., Wolberg, W., and Friedl, A.
- 426 (2006). Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative,
- 427 highly proliferative breast carcinoma subtype. Breast Cancer Res. Treat. 98, 91-98.
- 428 Barbareschi, M., Maisonneuve, P., Aldovini, D., Cangi, M.G., Pecciarini, L., Angelo Mauri,
- 429 F., Veronese, S., Caffo, O., Lucenti, A., Palma, P.D., et al. (2003). High syndecan-1
- 430 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis.
- 431 Cancer 98, 474–483.
- 432 Barone, I., Brusco, L., and Fuqua, S.A.W. (2010). Estrogen receptor mutations and changes in
- 433 downstream gene expression and signaling. Clin. Cancer Res. 16, 2702–2708.
- 434 Brockstedt, U., Dobra, K., Nurminen, M., and Hjerpe, A. (2002). Immunoreactivity to cell
- 435 surface syndecans in cytoplasm and nucleus: tubulin-dependent rearrangements. Exp. Cell
- 436 Res. 274, 235–245.
- 437 Castrellon, A.B. (2017). Novel strategies to improve the endocrine therapy of breast cancer.438 Oncol. Rev. 11.
- 439 Cheng, J., Zhang, C., and Shapiro, D.J. (2007). A functional serine 118 phosphorylation site
- 440 in estrogen receptor- $\alpha$  is required for down-regulation of gene expression by 17 $\beta$ -estradiol and
- 441 4-hydroxytamoxifen. Endocrinology 148, 4634–4641.

#### Page 23 of 42

### Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

- 442 Colombe, S., Houllier, L., Fleurot, E., Levallet, G., Benhaïm, A., Bonnamy, P., Levallet, J.
- 443 (2017) Syndecan 1 represses cell growth and FSH responsiveness in human granulosa cells
- 444 Reproduction. 153, 797-808.
- 445 Dauvois, S., White, R., and Parker, M.G. (1993). The antiestrogen ICI 182780 disrupts
- 446 estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. J. Cell Sci. 106, 1377–1388.
- 447 DeSantis, C., Siegel, R., Bandi, P., and Jemal, A. (2011). Breast cancer statistics, 2011. CA.
- 448 Cancer J. Clin. 61, 408–418.
- 449 Frasor, J., Danes, J.M., Komm, B., Chang, K.C.N., Lyttle, C.R., and Katzenellenbogen, B.S.
- 450 (2003). Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer
- 451 cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation
- 452 and cell phenotype. Endocrinology 144, 4562–4574.
- 453 Frasor, J., Weaver, A., Pradhan, M., Dai, Y., Miller, L.D., Lin, C.-Y., and Stanculescu, A.
- 454 (2009). Positive cross-talk between estrogen receptor and NF-kB in breast cancer. Cancer
- 455 Res. 69, 8918-8925.
- Galien, R., and Garcia, T. (1997). Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by
  preventing protein binding on the NF-κB site. Nucleic Acids Res. 25, 2424–2429.
- 458 Germeyer, A., Klinkert, M.S., Huppertz, A.-G., Clausmeyer, S., Popovici, R.M., Strowitzki,
- 459 T., and von Wolff, M. (2007). Expression of syndecans, cell-cell interaction regulating
- 460 heparan sulfate proteoglycans, within the human endometrium and their regulation throughout
- 461 the menstrual cycle. Fertil. Steril. 87, 657–663.

#### Page 24 of 42

- 462 Götte, M., Kersting, C., Ruggiero, M., Tio, J., Tulusan, A.H., Kiesel, L., and Wülfing, P.
- 463 (2006). Predictive value of syndecan-1 expression for the response to neoadjuvant
- 464 chemotherapy of primary breast cancer. Anticancer Res. 26, 621-627.
- 465 Hah, N., and Kraus, W.L. (2014). Hormone-regulated transcriptomes: lessons learned from
- 466 estrogen signaling pathways in breast cancer cells. Mol. Cell. Endocrinol. 382, 652–664.
- 467 Hall, J.M., and McDonnell, D.P. (2005). Coregulators in nuclear estrogen receptor action:
- 468 from concept to therapeutic targeting. Mol. Interv. 5, 343–357.
- 469 Hallberg, G., Andersson, E., Naessén, T., and Ordeberg, G.E. (2010). The expression of
- 470 syndecan-1, syndecan-4 and decorin in healthy human breast tissue during the menstrual
- 471 cycle. Reprod. Biol. Endocrinol. 8, 1.
- 472 Hassan, H., Greve, B., Pavao, M.S.G., Kiesel, L., Ibrahim, S.A., and Götte, M. (2013).
- 473 Syndecan-1 modulates β-integrin-dependent and interleukin-6-dependent functions in breast
- 474 cancer cell adhesion, migration, and resistance to irradiation. FEBS J. 280, 2216–2227.
- 475 Hinkes, M.T., Goldberger, O.A., Neumann, P.E., Kokenyesi, R., and Bernfield, M. (1993).
- 476 Organization and promoter activity of the mouse syndecan-1 gene. J. Biol. Chem. 268,
  477 11440-11448.
- 478 Howell, S.J., Johnston, S.R.D., and Howell, A. (2004). The use of selective estrogen receptor
- 479 modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer. Best Pract. Res.
  480 Clin. Endocrinol. Metab. 18, 47–66.
- 481 Ibrahim, S.A., Yip, G.W., Stock, C., Pan, J.-W., Neubauer, C., Poeter, M., Pupjalis, D., Koo,
- 482 C.Y., Kelsch, R., Schüle, R., et al. (2012). Targeting of syndecan-1 by microRNA miR-10b

Page 25 of 42

503

223-232.

483	promotes breast cancer cell motility and invasiveness via a Rho-GTPase- and E-cadherin-
484	dependent mechanism. Int. J. Cancer 131, E884-E896.
485	Iguchi-Ishiguro, H., Ouchi, Y., Watanabe, S., and Numabe, Y. (2012). Analysis of syndecan-1
486	gene promoter during mouse tooth development. Arch. Oral Biol. 57, 531–538.
487	Inki P (1997) Expression of syndecan-1 in female reproductive tract tissues and cultured
488	keratinocytes. Mol. Hum. Reprod. <i>3</i> , 299–305.
489	Kalaitzidis, D. (2005). Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kB.
490	Trends Endocrinol. Metab. TEM 16, 46–52.
491	Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S.,
492	Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., et al. (1995) Activation of the estrogen receptor
493	through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. Science. 270, 1491-1494.
494	Katzenellenbogen, BS., Choi, I., Delage-Mourroux, R., Ediger, TR., Martini, PG., Montano,
495	M., Sun, J., Weis K., and Katzenellenbogen, JA. (2000) Molecular mechanisms of estrogen
496	action: selective ligands and receptor pharmacology. J Steroid Biochem Mol Biol. 74(5),
497	279-85.
498	Kocanova, S., Mazaheri, M., Caze-Subra, S., and Bystricky, K. (2010). Ligands specify
499	estrogen receptor alpha nuclear localization and degradation. BMC Cell Biol. 11, 98.
500	Kousidou, O.C., Berdiaki, A., Kletsas, D., Zafiropoulos, A., Theocharis, A.D., Tzanakakis,
501	G.N., and Karamanos, N.K. (2008). Estradiol-estrogen receptor: A key interplay of the
502	expression of syndecan-2 and metalloproteinase-9 in breast cancer cells. Mol. Oncol. 2,

- 504 Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J.-M., and Corbo, L. (2011).
- 505 Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. Endocr. Rev. 32,
  506 597-622.
- 507 Lin, C.-Y., Ström, A., Vega, V.B., Li Kong, S., Li Yeo, A., Thomsen, J.S., Chan, W.C.,
- 508 Doray, B., Bangarusamy, D.K., Ramasamy, A., et al. (2004). Discovery of estrogen receptor
- 509  $\alpha$  target genes and response elements in breast tumor cells. Genome Biol. 5, R66.
- 510 Maeda, T., Alexander, C.M., and Friedl, A. (2004). Induction of syndecan-1 expression in
- stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells. Cancer Res. 64,612-621.
- 513 Maeda, T., Desouky, J., and Friedl, A. (2006). Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts
- promotes breast carcinoma growth in vivo and stimulates tumor angiogenesis. Oncogene 25,
  1408–1412.
- Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and
  functional subtypes of breast cancers. Cancer Biol. Ther. 10, 955–960.
- 518 Marino, M., Galluzzo, P., and Ascenzi, P. (2006). Estrogen signaling multiple pathways to 519 impact gene transcription. Curr. Genomics 7, 497.
- 520 McDermott, S.P., Ranheim, E.A., Leatherberry, V.S., Khwaja, S.S., Klos, K.S., and
- 521 Alexander, C.M. (2007). Juvenile syndecan-1 null mice are protected from carcinogen-
- 522 induced tumor development. Oncogene 26, 1407–1416.
- 523 Multhaupt, H.A., Yoneda, A., Whiteford, J.R., Oh, E.S., Lee, W., and Couchman, J.R. (2009).
- 524 Syndecan signaling: when, where and why. J Physiol Pharmacol 60, 31–38.

## Page 27 of 42

526

#### Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

- 525 O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K., and Hansen, U. (2004). Genomic Targets of Nuclear

Estrogen Receptors. Mol. Endocrinol. 18, 1859-1875.

- 527 Park, K.J., Krishnan, V., O'Malley, B.W., Yamamoto, Y., and Gaynor, R.B. (2005) Formation
- 528 of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated
- 529 gene activation.Mol Cell. 18(1), 71-82.
- 530 Pearce, S.T., Liu, H., and Jordan, V.C. (2003). Modulation of estrogen receptor a function
- and stability by tamoxifen and a critical amino acid (Asp-538) in helix 12. J. Biol. Chem. 278,
  7630–7638.
- 533 Pierce, J.W., Schoenleber, R., Jesmok, G., Best, J., Moore, S.A., Collins, T., and Gerritsen,
  534 M.E. (1997). Novel inhibitors of cytokine-induced IκBα phosphorylation and endothelial cell
  535 adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. J. Biol. Chem. 272,
  536 21096–21103.
- 537 Ray, P., Ghosh, S.K., Zhang, D.-H., and Ray, A. (1997). Repression of interleukin-6 gene 538 expression by  $17\beta$ -estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription 539 factors NF-IL6 and NF- $\kappa$ B by the estrogen receptor. FEBS Lett. 409, 79–85.
- 540 Rivenbark, A.G., O'Connor, S.M., and Coleman, W.B. (2013). Molecular and cellular
  541 heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. Am. J. Pathol. 183,
  542 1113-1124.
- 543 Saville, B., Wormke, M., Wang, F., Nguyen, T., Enmark, E., Kuiper, G., Gustafsson, J.-Å.,
- 544 and Safe, S. (2000). Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype ( $\alpha/\beta$ )-dependent activation
- 545 at GC-rich (Sp1) promoter elements. J. Biol. Chem. 275, 5379–5387.

#### Page 28 of 42

- 546 Szatmári, T., Mundt, F., Heidari-Hamedani, G., Zong, F., Ferolla, E., Alexeyenko, A., Hjerpe,
- 547 A., and Dobra, K. (2012). Novel genes and pathways modulated by syndecan-1: implications
- 548 for the proliferation and cell-cycle regulation of malignant mesothelioma cells. PLoS ONE 7,
- 549 e48091.
- 550 Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global
- 551 cancer statistics, 2012: Global cancer statistics, 2012. CA. Cancer J. Clin. 65, 87–108.
- 552 Van Laere, S.J., Van der Auwera, I., Van den Eynden, G.G., van Dam, P., Van Marck, E.A.,
- 553 Vermeulen, P.B., and Dirix, L.Y. (2007). NF-κB activation in inflammatory breast cancer is
- 554 associated with oestrogen receptor downregulation, secondary to EGFR and/or ErbB2
- overexpression and MAPK hyperactivation. Br. J. Cancer 97, 659-669.
- 556 Vihinen, T., Määttä, A., Jaakkola, P., Auvinen, P., and Jalkanen, M. (1996). Functional
- 557 characterization of mouse syndecan-1 promoter. J. Biol. Chem. 271, 12532–12541.
- 558



#### Page 29 of 42

#### Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

# 559 Figure legends

## 560 Figure 1: Estradiol induces a dose dependent inhibition of syndecan-1 expression

Syndecan-1 (A) and PGR (B) mRNA expression in MCF-7 cells cultured in estrogen deprived 561 medium (MEM) and treated for 24 h with increasing concentration of estradiol (10<sup>-12</sup> to 562  $10^{-8}$  mol/L). Data are mean ± SEM of 4 independent QRT-PCR experiments. \* p < 0.05; 563 \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 estimated by one-way analysis of variance followed by Dunnett's 564 565 test. (C) Western blot showing SDC1 proteins content in control (Ctrl) and E2-treated cells (24 h) (Upper panel). Blots were reprobed with actin for normalization and densitometric 566 567 quantification was performed with ImageJ software (Lower panel). The results were the mean 568 ± SEM of 3 separate experiments. (D) Immunocytochemical observation of SDC1 expression in MCF-7 treated or not with E2 (10<sup>-10</sup> mol/L) during 24 and 48 h. Anti-SDC1 antibody was 569 reveal with Alexa-488-labelled antibody and cells were counterstained with nuclear dye DAPI 570 571 (Left panel). Total SDC1 immunofuorescence intensity was measured per field using FV10-572 ASW-1.7 Olympus software and divided by the number of stain nucleus. Data were means  $\pm$ 573 SEM from three independent immunocytochemistry analysis (3 fields/preparation; around 574 40 individualized cells/fields) and compared by Student's t test. \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 575 (Right panel). For figures E and F, cells were cultured in estrogen deprived medium MEM or 576 in medium containing phenol red and non-charcoal treated FBS (HD). (E) Expression of 577 SDC1 and PGR were measured by QRT-PCR. (F) Immunocytochemical observation (Left 578 panel) and quantification (Right panel) of SDC1 expression after 48 h of culture in MEM or 579 HD medium. \* p < 0.05 using Student's t test. (Scale bar=50 µm)

580

Page 30 of 42

581 Figure 2: Estrogen receptor alpha mediates E2-dependent inhibition of syndecan 1

582

expression

583 (A) Relative expressions of ESR1, ESR2 and GPER in MCF-7 cells cultured in MEM. For (B) and (C), cells were cultured in MEM before addition of E2 (10<sup>-8</sup> mol/L) for 24 h or specific 584 agonist of ERα (PPT), ERβ (DPN) or GPER (G1) used at 10<sup>-8</sup> mol/L. GPER antagonist G15 585 586 was added 30 min before E2 stimulation. Tamoxifen (Tam) was used at 10<sup>-6</sup> mol/L. Values 587 are means ± SEM of QRT-PCR from 3 separate experiments. Significantly different at \*\* p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 by one-way analysis of variance with Tukey multiple comparison 588 589 test. (D) Expression in MCF-7, MDA-MB-231 and human tumour granulosa cell (KGN) of 590 estrogen receptor ER $\alpha$  and ER $\beta$  were evaluated by western blot. (E) MDA-MB-231 cells 591 were cultured in MEM medium in presence of various concentration of E2. SDC1 expression was measured by QRT-PCR after 24 h. Values are means  $\pm$  SEM of 3 separate experiments. 592

Figure 3: E2-mediated inhibition of syndecan-1 is an indirect mechanism requiring *de novo* synthesis

595 Expression of SDC1 was estimated by QRT-PCR (A) or western blot (B) in MCF-7 cells cultured in MEM after addition of E2 (10<sup>-10</sup> mol/L) for increasing period of time (1 h to 24 h). 596 Expression of TFF1, PGR (C), CCND1 (D), ESR1 and ERBB2 (E) mRNA in MCF-7 cells 597 598 cultured in MEM medium and stimulated by E2 for 1 to 24 h. Data were means ± SEM of QRT-PCR from three independent experiments \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\*p < 0.01 using 599 one-way analysis of variance followed by Dunnett's test. (F) CHX (10 µg/ml) and ACT 600 601  $(2 \times 10^{-6} \text{ mol/L})$  were added 30 min before E2 stimulation and SDC1 expression was evaluated 602 after 24 h by QRT-PCR. SDC1 mRNA expression was measured in cells pre-treated with ACT+CHX and stimulated with E2 at (10<sup>-10</sup> mol/L). (G) DNA methyltransferase inhibitor, 5-603 aza-2'-deoxycytidine (AZA) was added in MEM culture medium for 24 h. (H) SDC1 or ESR1 604 expression in presence of histone deacetylase inhibitor of TSA at (10-6 mol/L). Significantly 605

#### Page 31 of 42

# Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

- 606 different at \*\* p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 by one-way analysis of variance with Tukey multiple
- 607 comparison test.

## 608 Figure 4: SDC1 inhibition doesn't involve MAPK (ERK, JNK) or AKT pathways

609 (A) Activation/phosphorylation of ERK, AKT and JNK pathways evaluated by western blot 610 after 20 min stimulation with E2 ( $10^{-10}$  mol/L) or EGF (10 ng/ml). (B) MCF-7 cells were 611 stimulated for 24 h with E2 ( $10^{-10}$  mol/L) or EGF (10 ng/ml) after pre-treatment with MEK 612 inhibitor UO126, AKT inhibitor Ly294002 or JNK inhibitor (sp600125) and *SDC1* mRNA 613 expression quantified. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 compared to pre-treated control. 614 ## p < 0.01 compared to untreated control cells.

# 615 Figure 5: NFκB inhibitor Bay-11-7085 blocks ERα activation and *SDC1* inhibition.

616 Cells were pre-treated for 30 min with NF kB inhibitor Bay-1170-85 (10-5 mol/L) and E2 or 617 TNFa (10 ng/ml) was added for 24 h (A and B) before SDC1 mRNA quantification. (C) Expression of RELA was silenced by siRNA (see Materials and Methods) and 618 619 consequences on SDC1 expression after addition of E2, TNFa or both estimated by QRT-620 PCR. Values are means  $\pm$  SEM of 3 separate silencing experiments \* p < 0.05 compared to cells transfected with negative control siRNA using Student's t test. ## p < 0.01; 621 622 ### p < 0.001 compared to respective untreated control cells by one-way analysis of variance 623 with Tukey multiple comparison test. (E) Expression of RELA mRNA after E2 stimulation (10<sup>-8</sup> mol/L) in MCF-7. (F) Phosphorylation of ERa at Ser118, Ser167 and Ser104/106 624 625 observed by western blot in cells treated for 30 min with Bay or E2 or pre-treated with Bay 626 for 30 min prior to E2 stimulation. Lower panel represent Ser118 phosphorylation quantified 627 after densitometric analysis. (G) Total ERa protein content was determined in MCF-7 cells 628 after 6 h of culture with Bay or E2 or after pre-treatment with Bay before E2 incubation. 629 \* p < 0.5; \*\* p < 0.01 by one-way analysis of variance with Tukey multiple comparison test.

#### Page 32 of 42

#### 630 Figure 6 : Consequences of Bay, TNFα and siRelA on IL-6 mRNA expression

Cells were pre-treated or not for 30 min with NFκB inhibitor Bay-11-7085 (10<sup>-5</sup> mol/L) and stimulated with E2, TNFα (10 ng/ml) or both for 24 h before *IL-6* mRNA quantification (A and B). (C and D) *IL-6* expression was quantified after *RELA* and *ERα* silencing in cells stimulated or not with E2 (C), TNFα and both (D). Values are means  $\pm$  SEM of 3 separate silencing experiments \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 compared to cells transfected with negative control siRNA using Student's t test.

## 637 Figure 7: ERa silencing induces a SDC1 up-regulation at both mRNA and protein level. 638 Expression of ESR1 48h after siRNA transfection with siRNA duplexes specific for ESR1 639 (siERa) or with negative control siRNA (siNeg) estimated by QRT-PCR (A). (B) ERa and 640 SDC1 protein expression were measured 72 h after transfection by western blot and quantified 641 (C). \* p < 0.05 compared to cells transfected with negative control siRNA using Student's t 642 test. (D) SDC1 expression in siNeg and siERa transfected cells incubated in MEM and treated 643 with E2, Bay or E2+Bay for 24 h. (E) PGR expression in response to E2 stimulation was 644 evaluated after siRNA transfection. \*\* p < 0.01 compared to respective untreated control cells 645 by one way analysis of variance with Tukey multiple comparison test. #p < 0.05 compared to

646 siNeg using Student's t test.

Figure 8: Increased expression of SDC1 after ERα silencing by selective ER downregulator ICI.

549 SDC1 expression in MCF-7 cells cultured in MEM and treated with E2, ICI (10-8 mol/L) or 550 both for 24 h (A) \* p <0.5; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 by one-way analysis of variance with 551 Tukey multiple comparison test. (B) Representative western blot showing ERα and SDC1 552 protein expression after ICI treatment for increasing period of time (Upper panel). Expression 553 levels were normalized with actin as loading control and densitometric quantification was

#### Page 33 of 42

#### Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

performed with ImageJ software. \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 compared to untreated cells 654 using Student's t test. (C) Immunocytochemical observation of SDC1 and ERa expression in 655 MCF-7 treated or not with ICI (10<sup>-8</sup> mol/L) during 24 h. SDC1 was reveal with 656 Alexa-488-labelled and ERa by Alexa-633-labelled antibodies and cells counterstained by 657 658 DAPI (Left panel) (Scale bar=50 µm). (D) SDC1 and ERa immunofluorescence intensities 659 were measured per field and normalized by nuclear numbers. Data were means  $\pm$  SEM intensity relative to untreated cells from three independent immunocytochemistry. \*\* p < 0.01660 661 compared with Student's t test.

### Page 34 of 42

# Figure 1.



190x254mm (96 x 96 DPI)

# Page 35 of 42

# Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer





190x254mm (96 x 96 DPI)

Page 36 of 42



# Figure 3.

190x254mm (96 x 96 DPI)

# Page 37 of 42

# Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

# Figure 4.



190x254mm (96 x 96 DPI)



# Figure 5.



190x254mm (96 x 96 DPI)

# Page 39 of 42

# Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

# Figure 6



190x254mm (96 x 96 DPI)

Page 40 of 42



# Figure 7.

190x254mm (96 x 96 DPI)

# Page 41 of 42 Manuscript submitted for review to Endocrine-Related Cancer

# Figure 8



190x254mm (96 x 96 DPI)

Page 42 of 42

# Table 1: Primers used for real-time PCR

Genes	id	Primer set	Length (bp)
GAPDH	NM_002046	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	225
		GAAGATGGTGATGGGATTTC	
CCND1	NM_053056	CGTGGCCTCTAAGATGAAGG	185
		CTGGCATTTTGGAGAGGAAG	
ERBB2	NM_004448	AATTCCAGTGGCCATCAAAG	195
		TCCCGGACATGGTCTAAGAG	
ESR1	NM_000125	AGACATGAGAGCTGCCAACC	299
		GCCAGGCATTCTAGAAGG	
ESR2	NM_001437.2	GAGTCTGGTCGTGTGAAGGA	218
		ACTTCTCTGTCTCCGCACAA	
GPER1	NM_001505	GCAGGTCCAGCAGAGGTACA	128
		GAGCTGCTCACTCTCTGGGT	
IL6	NM_000600.4	TGGGAATCCAGTGTGTGAA	183
		CACAGCATTCAGGTCGTAGT	
NFKB1 (P50)	NM_003998.3	TGGGAATCCAGTGTGTGAA	125
		CACAGCATTCAGGTCGTAGT	
PGR	NM_001202474	TCGAGCTCAGCGTTTCTA	183
		CACCATCCCTGCAATATCT	
REL-A (p65)	NM_021975.3	GCCATGGACGAACTGTTCCCC	166
		TGGTATCTGTGCTCCTCTCG	
SDC1	NM_001006946	GAAACCTCGGGGGGAGAATAC	188
		TACAGCATGAAACCCACCAG	
TFF1	NM_003225	CACCATGGAGAACAAGGTG	161
		AGCCCTTATTTGCACACTGG	
	1		

# Implication de l'œstradiol dans le

# clivage protéolytique du SDC-1

À la suite de nos travaux montrant que l'œstradiol modifie l'expression du SDC-1, nous avons initié une étude sur l'implication de la signalisation œstrogénique dans la régulation de son clivage protéolytique dans les cellules de carcinome mammaire MCF7. Le « shedding » du SDC-1 dans le cancer du sein est encore peu étudié comparé aux myélomes. Cependant, il a été mis en évidence dans ces cellules que l'ectodomaine du SDC-1 est impliqué dans la TEM et favorise l'invasion ainsi que l'angiogenèse, mais diminue la prolifération de ces cellules (Nikolova et al., 2009).

Le SDC-1 peut, à la suite de l'assemblage des chaines d'HS et de CS au niveau de son ectodomaine, être adressé à la membrane plasmique où il sert de corécepteur et de récepteur matriciel (Couchman, 2010; Stepp et al., 2015). À la membrane, l'ectodomaine du SDC-1 peut être clivé suite à l'activation de la protéine G Rab5 (Hayashida et al., 2008b) ou via l'activation d'enzyme protéolytique (métalloprotéases, ADAMs, thrombine, plasmine) (Manon-Jensen et al., 2013; Pruessmeyer et al., 2010; Subramanian et al., 1997). Le clivage du SDC-1 est ainsi réprimé via les TIMP qui régulent l'activité des MMP, mais aussi par la présence des chaines d'HS qui inhibent également l'activité de MMP-9 (Purushothaman et al., 2008; Ramani et al., 2012).

Lors de ce travail, nous avons orienté nos recherches sur l'étude de l'HPSE, une endo- $\beta$ -glucuronidase qui coupe les chaines d'HS et favorise le clivage du SDC-1 (Yang et al., 2007), ainsi que sur l'expression des MMP et des TIMP.

Les résultats présentés ne sont que des résultats préliminaires devant être confirmés et poursuivis.

# I <u>Expression de l'HPSE</u>

Comme explicité dans la partie introductive, l'axe protéique du SDC-1 peut être clivé suite à la dégradation de ses chaines d'HS par l'HPSE. Nous avons donc évalué, en réponse à l'œstradiol, l'expression de l'ARNm de HSPE par qRT-PCR et du précurseur protéique de l'HPSE, la pré-proHPSE (68,5 kDa) par western blot.

L'expression des messagers codant pour l'HSPE a été évaluée après une stimulation de 6 et 24 h avec des doses croissantes d'E2 (Figure 31). Quelle que soit la durée de traitement ou la dose d'E2 utilisée, nous montrons une absence de variation significative du taux d'expression de l'HSPE.



# Figure 31 : Expression génique de l'HPSE

L'expression de l'HPSE a été évaluée par qRT-PCR à la suite de la stimulation des cellules MCF7 avec des doses croissantes de 17 $\beta$ -estradiol pendant 6 h et 24 h. L'expression des messagers a été normalisée avec la GAPDH et comparée à la condition contrôle sans æstrogènes à 6 ou 24 h (méthode des 2<sup>^</sup>- $\Delta\Delta$ Ct). L'effet dose a été analysé par une ANOVA suivie d'un test post hoc de Dunett (\* P < 0.05; n = 3).
L'expression protéique de la pré-proHPSE a été évaluée suite à une stimulation des cellules MCF7 pendant 1 à 24 h avec 0,1 nM d'E2. Les résultats présentés dans la figure 32, bien que préliminaires (n=1), suggèrent une chute drastique du précurseur de l'HPSE après une heure de stimulation (94 %) suivi d'une ré-expression progressive dès 3 h. Après 24 h de stimulation à l'E2, une augmentation de 70 % de la pré-proHPSE par rapport au niveau basal est observée.



Figure 32 : Expression protéique de la pré-proHPSE

Les cellules MCF7 ont été privées d'æstrogènes dans un milieu MEM pendant 5 J puis stimulées avec 0,1 nM d'æstradiol pendant 1 à 24 h. Les protéines du lysat cellulaire ont été séparées sur gel de polyacrylamide et transférées sur une membrane de nitrocellulose. L'HPSE et l'actine ont ensuite été mis en évidence par l'utilisation d'un anticorps anti-HPSE et anti-actine. L'expression protéique de la pré-proHPSE a été quantifiée puis corrigée avec l'actine pour chaque dépôt et comparée à l'expression de la pré-proHPSE dans la condition contrôle. (n=1).

# II Maturation des formes latentes de l'HPSE

Nous avons ensuite étudié sur un temps court, la maturation des différents précurseurs de l'héparanase suite à une stimulation des cellules MCF7 pendant 30 min avec 0,1 nM d'E2. L'enzyme mature est formée de 2 chaines polypeptidiques de 50 et 8 kDa chacune, lesquelles sont issues du double clivage protéolytique de la pro-HPSE (65 kDa). Elle est, elle-même issue du clivage du peptide signal de la pré-proHPSE (68,5 kDa).

La maturation de l'HPSE, entre l'état basal et stimulé par l'œstradiol, a été évaluée en comparant l'intensité de la bande à 50 kDa correspondant à une des 2 chaines de l'HPSE mature à l'intensité de la bande à 68,5 kDa correspondant à la pré-proHPSE (Figure 33).

L'analyse du ratio HPSE 50 kDa/pré-proHPSE montre une augmentation moyenne de celui-ci de 50 % qui n'est cependant pas significative en raison d'une très grande variabilité de la réponse à l'E2 sur les 3 expériences indépendantes.



# Figure 33 : Maturation de la pré-proHPSE

La maturation de la pré-proHPSE a été évaluée par western blot à la suite du traitement des cellules MCF7 avec 0,1 nM d'æstradiol pendant 30 min. La bande à 50 kDa a été indiquée par une flèche alors que celle à 68,5 kDa correspondant à la pré-prohéparanase a été indiquée par une étoile. La maturation de l'HPSE suite à la stimulation par l'æstradiol a été évaluée en déterminant le ratio HPSE mature/proHPSE. (Test de student ; n=3).

# III <u>Régulation de l'expression des MMP et TIMP par l'œstradiol</u>

Nous avons évalué l'expression génique de différentes MMP (-2, -7, -9 et -14) et de leurs inhibiteurs, les TIMP (-1, -2 et -4), dans les cellules MCF7 traitées ou non par de l'E2 seule ou par la combinaison E2+ICI. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 10). Nous observons sur 2 expériences indépendantes l'absence d'expression de la MMP-2 et un niveau d'expression très faible des MMP-7 et -9. L'expression de MMP-14, bien que supérieure aux autres MMP mesurées, reste faible. Aucune modification d'expression des MMP n'a pu être observée en présence d'E2. Inversement, TIMP-1, un inhibiteur d'ADAM 10 et de MMP-9, et TIMP2 sont fortement exprimés à l'état basal dans les cellules MCF7. Leur expression est inhibée suite à un traitement de 24 h avec de l'œstradiol. Cette inhibition induite par l'E2 apparaît également bloquée en présence d'ICI.

La dégradation d'ERα par l'ICI semble empêcher la régulation œstrogéno-dépendante de TIMP-1 et TIMP-2.

	Expression basale moyenne	Variation du niveau de messager par rapport à la condition contrôle	
		En présence d'E2	En présence d'E2 et d'ICI
MMP-7	< 0,0001	-	-
MMP-9	< 0,0001	-	-
MMP-14 (MT1-MMP)	0,0003	+49 %	+53 %
TIMP-1	0,1405	-26 % ± 1,4 %	$+2\% \pm 0.1 \%$
TIMP-2	0,0465	- 47 % $\pm$ 0,7 %	+ 1% ± 18 %
TIMP-4	< 0,0001	-	-

Tableau 10 : Expression des MMP et des TIMP dans les cellules MCF7

Les cellules MCF7 ont été laissées dans un milieu MEM ou pré-traitées pendant 24 h avec 10 nM d'ICI avant d'être stimulées 24 h avec 0,1 nM d'E2. L'expression basale des différents messagers d'intérêt a été évaluée par rapport à la GAPDH ( $2^{-\Delta Ct}$ ). La variation de la quantité de transcrits par rapport à la condition contrôle a été déterminée suite aux traitements E2 ou E2+ICI (variation moyenne ± SEM) (MMP-14 n=1 ; TIMP-1, -2 n=2).

# IV Évaluation du clivage protéolytique du SDC-1

Le clivage protéolytique du SDC-1 dans les cellules MCF7 a été évalué en cytométrie en flux (Figure 34).

Les cellules préalablement fixées puis perméabilisées ont été marquées avec un anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire et un anticorps dirigé contre l'ectodomaine du SDC-1. Le ratio FL1/FL6 a été déterminé. Ce dernier correspond à l'intensité de fluorescence du SDC-1 au niveau de la partie intracellulaire (mesurée via FL1) rapporté à l'intensité de marquage de l'ectodomaine (mesurée par FL6). Ce rapport permet ainsi d'évaluer le clivage de l'ectodomaine (augmentation du ratio). Nous montrons sur 2 expériences indépendantes que la stimulation des cellules MCF7 avec 0.1 nM d'E2 pendant 24 h augmente le clivage de l'ectodomaine.



Figure 34 : Évaluation du clivage protéolytique du SDC-1 par cytométrie en flux

Les cellules MCF7 ont été laissées en condition contrôle dans un milieu dépourvu d'æstrogène (milieu MEM) ou traitées avec 0,1 nM d'E2. Au bout de 24 h, les cellules ont été fixées, perméabilisées puis le SDC-1 a été marqué avec deux anticorps l'un dirigé contre un épitope extracellulaire (B-A38) et l'autre reconnaissant un épitope intracellulaire (C-20). Ces deux anticorps primaires sont chacun reconnus par un anticorps secondaire couplé à un Alexa Fluor ®. La fluorescence de chaque cellule est mesurée en cytométrie en flux.

# V <u>Discussion</u>

L'HPSE est une endoglucosidase qui permet le clivage des chaines d'HS. Il a été montré que cette enzyme régule l'expression génique du SDC-1 (Mahtouk et al., 2007a). L'HPSE est synthétisée sous la forme d'un ARNm précurseur, lequel une fois traduit en protéine subit plusieurs clivages successifs lui permettant d'acquérir sa maturité fonctionnelle (Fux et al., 2009; Zetser et al., 2004).

Le promoteur de l'HPSE peut être activé par l'œstradiol dans les cellules MCF7, augmentant ainsi son expression génique (Elkin et al., 2003). Ces effets transcriptionnels sont associés à la liaison d'ERa (activé par l'E2) au niveau d'une séquence promotrice contenant un ERE (Cohen et al., 2007; Elkin et al., 2003). L'expression génique de l'HPSE peut être induite par le tamoxifène indépendant de l'E2 (Cohen et al., 2007).

Dans notre étude, nous ne montrons pas d'augmentation significative de l'expression du messager codant pour l'HPSE suite à une stimulation de 6 h ou 24 h avec 1 nM d'E2. Les travaux d'Elkin et collaborateurs ont montré, après une stimulation de 1 nM pendant 24 h, une augmentation de l'activité luciférase d'une construction possédant le promoteur de l'HPSE. Pourtant, l'augmentation d'expression endogène de l'HPSE dans les cellules MCF7 n'est observée qu'après 8h de stimulation par l'E2 (Elkin et al., 2003).

Ainsi, l'absence de réponse à l'E2 observée dans ce travail pourrait résulter d'un mauvais « timing » à 6 h et être liée à une 1/2 vie courte des messagers de l'HPSE et/ou à une traduction rapide, et à une observation trop tardive des effets de l'E2 à 24 h. Il sera donc nécessaire de refaire ces expériences en adaptant le temps d'exposition à l'E2. Il pourra aussi être envisagé d'utiliser un inhibiteur de la synthèse protéique pour évaluer l'accumulation du messager.

L'expression de l'HPSE est aussi sous le contrôle des facteurs de transcription de la famille NF-κB (Hadigal et al., 2015). Il a été montré que ces facteurs de transcription pouvaient également induire l'expression du SDC-1 (Watanabe et al., 2006) et celle de la métalloprotéase MMP-9 favorisant ainsi son clivage protéolytique (Oh et al., 2009). Certaines molécules utilisées en chimiothérapie augmentent l'expression de ce facteur de transcription (Ramani et al., 2016). Ainsi, la chimiothérapie peut à la fois favoriser l'expression du SDC-1 ainsi que son clivage (Ramani and Sanderson, 2014), lequel est associé à l'augmentation de la TEM dans les cellules mammaires (Nikolova et al., 2009; Yang et al., 2007). De plus, il a été montré que le SDC-1 soluble, grâce à la présence de chaines d'HS sert de co-récepteur au facteur de croissance Hb-EGF (Higashiyama et al., 1993; Wang et al., 2014). Dans ce contexte, le SDC-1 favorise l'activation du récepteur à l'EGFR et l'activation de la voie Ras/Raf/MEK/ERK qui est impliquée dans l'invasion, la migration, l'adhésion et la régulation du cycle cellulaire et plus particulièrement de la transition G1/S favorisant ainsi la résistance des cellules à la chimiothérapie (Chen et al., 2012; Mythreye and Blobe, 2009; Wang et al., 2014).

L'étude de l'expression protéique de l'HPSE suggère, sur une seule expérience, une chute drastique du niveau protéique de la pré-proHPSE observée dans la 1<sup>ère</sup> heure suite à une stimulation avec l'E2 mais serait en faveur, à long terme, d'une augmentation de la quantité de cette protéine. Cette baisse pourrait être expliquée par une augmentation du niveau de maturation de ce précurseur. Pourtant, il n'a été montré aucune augmentation significative des formes maturées du précurseur de l'HPSE dans les cellules MCF7 suite à une stimulation de 30 min par l'œstradiol. Là encore, il est nécessaire de poursuivre ces expériences en contrôlant la variabilité observée dans la réponse à l'E2 et l'état basal de maturation de l'HPSE.

Il est décrit dans la littérature que l'activité enzymatique de l'HPSE facilite le clivage protéolytique de l'ectodomaine du SDC-1 (Yang et al., 2007). Nous montrons sur deux expériences indépendantes, une augmentation de ce clivage, cependant celui-ci reste faible. Pour confirmer ces résultats, les chaines d'HS présentes dans le surnageant de culture pourront être quantifiées par test ELISA. Dans nos conditions expérimentales, l'absence de régulation par l'E2 de l'HPSE, tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau de sa maturation, est cohérente avec un « shedding » limité du SDC-1. En effet, les données bibliographiques suggèrent que l'E2, en activant l'HSPE et l'élimination des chaînes d'HS, favorise le clivage protéolytique de l'ectodomaine du SDC-1 par les métalloprotéases matricielles. Il peut aussi être suggéré que sous nos conditions expérimentales, l'activité et l'expression des enzymes protéolytiques impliquées dans le clivage du SDC-1 ne soient pas induites par l'E2. Les MMP -2, -7 ainsi que la MMP-9 sont impliquées dans le clivage protéolytique du SDC-1 (Manon-Jensen et al., 2013).

Les cellules de la lignée MCF7 sont considérées comme des cellules peu invasives possédant un faible potentiel métastatique. En effet, l'analyse de l'expression de trois MMP (-7, -9 et -14) n'a permis de mettre en évidence qu'une très faible expression de la MMP-14. Cette dernière est impliquée dans la maturation de la MMP-2 et lui permet ainsi de passer d'une forme pro-active à une forme active (Wang et al., 2000). D'autres travaux soutiennent nos résultats. En effet, ceux-ci montrent que les cellules MCF7 expriment faiblement les MMP (MMP-2, -9 -14) comparées à d'autres cellules issues de lignées tumorales mammaires plus invasives (Figueira et al., 2009; Köhrmann et al., 2009). Il a également été montré que dans les cellules MCF7, l'expression de TIMP-1 et -2 est également abaissée (Figueira et al., 2009). De plus, l'inhibition œstrogéno-dépendante de l'activité des collagénases de type 4 (MMP-2 et MMP-9) a déjà été observée dans les cellules MCF7 (Bouris et al., 2015; Carreau et al., 2008; Kousidou et al., 2004; Nilsson et al., 2007).

Une étude récente a mis en évidence que l'expression des métalloprotéases (-1, -2, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -15, -19, -23, -24, -27 et -28) était fortement augmentée dans le tissu mammaire cancéreux par rapport au tissu sain au contraire de la MMP-7 qui est diminuée (Köhrmann et al., 2009). Lors de la carcinogenèse mammaire, la concentration plasmatique en MMP-9 augmente, en moyenne d'un facteur 2,3, chez les patientes atteintes d'un cancer du sein (Zucker et al., 1993). Il apparaît également que l'expression de certaines MMP (-8, -10, -12, -27) est corrélée au grade de la tumeur (Köhrmann et al., 2009).

Dans le sérum de patients atteints par un cancer colorectal, le niveau d'expression du SDC-1 est corrélé à celui de la MMP-7 (Wang et al., 2014). Cette métalloprotéase peu exprimée dans le tissu mammaire cancéreux (Köhrmann et al., 2009) a une activité régulée par le FGF-2 lequel peut être lié aux chaines d'HS (Ding et al., 2005). Ce facteur de croissance est également impliqué dans la libération stromale des MMP-2 et -9 (Strutz et al., 2002). Dans les cellules rénales, le FGF-2 peut, via la présence de l'HPSE, induire l'activité de la voie PI3K/Akt et favoriser la TEM (Masola et al., 2012).

Les MMP-2 et -9 sont impliquées dans le TEM, suite à la dégradation du collagène, et favorisent la migration cellulaire, l'invasion et la formation de métastases. L'E2 régule également l'expression et l'activité des MMP en diminuant l'expression de TIMP-1 mais n'a, cependant, aucun effet sur l'expression de TIMP-2 (Afratis et al., 2017).

Nous avons montré que le niveau d'expression du SDC-1 est diminué au niveau protéique dès 24 h d'exposition avec l'E2 à des concentrations habituellement retrouvées dans le tissu cancéreux mammaire. D'après Elkin, l'E2 augmente l'expression génique de l'HPSE, laquelle coupe les chaines d'HS qui régulent la transcription génique, le cycle cellulaire, l'expression et l'activité de la MMP-9 et le clivage du SDC-1 (Kovalszky et al., 2014; Purushothaman et al., 2008, 2011).

Toutefois, cette étude soulève la question de l'importance des effets biologiques du clivage protéolytique du SDC-1 suite à une stimulation par l'œstradiol. En effet, une imprégnation continue des cellules ER+ avec l'E2 doit sensiblement diminuer l'expression du SDC-1 membranaire et ainsi diminuer les conséquences biologiques du « shedding ».

# Article 2 : Rôle du SDC-1 dans la régulation de la signalisation œstrogénique et des processus cellulaires œstrogéno-induits

Les travaux réalisés au laboratoire ont montré que la surexpression du SDC-1 dans les cellules KGN (cellules cancéreuses de granulosa humaine) induisait une inhibition à la fois de la synthèse endogène d'œstrogènes, de l'expression d'Erβ et de la croissance cellulaire en augmentant la proportion de cellules en phase G0/G1 (Colombe et al., 2017). Au vu de ces résultats, des données bibliographiques suggérant un antagonisme fonctionnel entre la signalisation œstrogénique et le SDC-1 (Barbareschi et al., 2003) et des résultats précédemment exposés, nous avons voulu étudier les conséquences de la variation de l'expression du SDC-1 sur la signalisation œstrogénique et sur les processus tumorigéniques œstrogéno-induits dans les cellules tumorales mammaires MCF7.

Pour cela nous avons développé un modèle de surexpression stable du SDC-1 (transfection d'un plasmide de surexpression du SDC-1) et d'extinction par siRNA dans les cellules de la lignée MCF7.

# **Deregulation of syndecan-1 expression alters ERa trafficking**

# 2 and E2 responsiveness in human breast carcinoma cells.

- 3 Emmanuelle Fleurot, Vincent Hanoux, Pierre-Jacques Bonnamy and Jérôme Levallet
- 4 <sup>1</sup> Normandie Univ, France; UNICAEN, IBFA, F-14032 Caen, France; EA 2608, F-
- 5 14032 Caen, France
- 6 Corresponding author's: Levallet J. Estrogènes, Reproduction, Cancer (OeReCa), EA
- 7 2608, Université de Caen Normandie, CS 14032. 14032 CAEN
- 8 E-mail address: <u>Jerome.levallet@unicaen.fr</u>. Phone: +33 (0) 2 31565526
- 9 Short title: syndecan-1 modulate estrogen responsiveness
- 10 Keywords: Syndecan 1, Estrogen, breast cancer, MCF7

# 11 Introduction

12 Syndecans (SDC) are a family of four transmembrane proteoglycans (PG) present in 13 mammals displaying a tissue- and cell-specific expression patterns (Chakravarti & Adams 14 2006; Couchman 2010). SDC1, which is mostly expressed in epithelial tissue (Koda et 15 al. 1985), is composed of an extracellular domain bearing the glycosaminoglycan (GAG) 16 chains, a plasma membrane spanning domain and a cytoplasmic tail. Specifically, SDC1 17 ectodomain carries three heparan-sulfate and two chondroitin sulfate chains able to bind 18 to components of the extracellular matrix (ECM) and/or soluble ligands. SDC1 19 intracellular C-term sequence contains a specific protein-binding sequence allowing interactions with cytoplasmic protein involved in cytoskeletal organization and signaling 20 21 pathways (Couchman 2010; Stepp et al. 2015). Accordingly, Syndecan-1 may act as a 22 coreceptor for growth and angiogenic factors, morphogens and chemokines. Thus, while 23 devoid of catalytic activity, SDC1 plays a crucial role in cell proliferation, cell adhesion, 24 migration and angiogenesis. Under specific conditions, SDC1 ectodomain could be 25 cleaved and released into the cell microenvironment modifying its physiologic effects 26 (Ramani et al. 2012). Dysregulated expression or shedding of syndecan-1 have been 27 demonstrated in many human diseases and largely described during cancer progression, 28 invasion and metastasis (Manon-Jensen et al. 2010; Jozzo & Sanderson 2011; Teng et al. 29 2012). Clinical studies in breast cancer, established that SDC1 overexpression is 30 associated with an aggressive phenotype and a poorer prognosis (Barbareschi et al. 2003) 31 while loss of epithelial syndecan-1 was associated with a more favorable prognosis 32 (Leivonen et al. 2004).

33 Breast cancer (BC) is the most prevalent cancer among women worldwide and the second 34 cause of death in women between the ages of 35-55 in developed countries (Downs-35 Holmes & Silverman 2011; Ferlay et al. 2015). BC is a heterogeneous disease that can 36 be classified into multiple subtypes with distinctive phenotypes and biological features (Guiu et al. 2012). These molecular subtypes are classified into Basal-like and HER2+ 37 38 subtypes that are hormone-receptor negative (ER(-)) and have poor prognosis and luminal 39 breast cancers, with luminal B tumors having poorer outcomes than luminal A tumors, 40 which are characterized by the expression of estrogen receptors (ER $\alpha$ ) (Perou *et al.* 2000). About 70 % of all breast cancers express the estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) (DeSantis *et al.* 41 42 2011) which mediates proliferative effect of estrogen and promotes tumor growth by 43 regulating transcription of genes associated with metabolism, cell cycle progression and 44 survival. Whether, the estrogen dependency in ER+ tumors has been positively exploited 45 to develop hormonal therapy, antiestrogens treatments are not fully effective and 20-30 % of patients do not respond to first line treatment or acquired resistance resulting in 46 47 patient relapse (García-Becerra et al. 2012). Thus, additional therapeutic targets are 48 needed to overcome these resistances in ER(+) BC and for the treatment of poorly 49 differentiated aggressive ER(-) subtypes characterized by a rapid growth independent of 50 estrogen and thus insensitive to endocrine therapy targeting ERa.

51 Syndecan-1 have been selected as therapeutic target in breast cancer according to its 52 ability to regulate epithelial to mesenchymal transition (EMT), tumor microenvironment 53 and signal transduction pathways (Ibrahim *et al.* 2012; Kotiyal & Bhattacharya 2014). 54 SDC1 expression is associated with tumor progression, angiogenesis, a higher 55 histological grade of tumor and a decrease of relapse-free survival (Barbareschi *et al.* 56 2003; Maeda *et al.* 2004, 2006). Indeed, SDC1 seems to be a marker of aggressiveness 57 and chemo-resistance in human breast carcinoma (Barbareschi *et al.* 2003; Götte *et al.* 

58	2003; Götte et al. 2006). Interestingly, major part of ER(-) cancers exhibited SDC1
59	overexpression (Baba et al. 2006). Additionally, in the breast cancer, SDC1
60	overexpression is inversely correlated with estrogen receptor expression (Barbareschi et
61	al. 2003). Taken together, these studies associated with our recent data demonstrating that
62	$ER\alpha$ mediates estrogen-dependent transcriptional repression of SDC1 expression in
63	MCF7 cells (Fleurot et al., Submitted), we hypothesized that a functional antagonism
64	between $ER\alpha$ signaling and SDC1 exist. To investigated this potential interplay, and to
65	go further into the study of SDC1 as potential therapeutic targets in BC, we have
66	overexpress this proteoglycan in ER(+) breast carcinoma cell line (MCF7). Effects of
67	SDC1 overexpression on genomic and non-genomic estrogen signaling and its
68	consequences on phenotypic orientation of breast carcinoma cells have been studied.

# 69 Materials and Methods

### 70 Antibodies

71 Syndecan-1 was detected using an affinity-purified polyclonal goat anti Human 72 Syndecan-1/CD138 IgG (R&D Systems). Detection of ERα was performed with mouse 73 monoclonal anti ERα (F10) IgG (Santa Cruz Biotechnology). Antibodies against Akt, 74 pAkt (Ser473), ERK, pERK (Thr202/Tyr204) were from Cell Signaling technology 75 (Ozyme, Saint Quentin Yvelines France). Gold nanoparticles-, HRP- and Alexa-76 conjugated secondary antibodies were used to detect primary antibody.

### 77 Establishment of stable transfected MCF-7 cell lines

Human breast cancer cells MCF-7 (HTB-22) were seeded and transfected using
Lipofectamine<sup>™</sup>2000 following manufacturer's recommendations with 100 ng of
pCMV-Hygro-SDC1 vector encoding full length human SDC1 cds (Ref: HG11429-M-N)
or pCMV-Hygro-Negative vector (from BioScience Innovations (Interchim, Montluçon,
France)) to generate MCF7-SDC1 and MCF7-Ctr cell line respectively. Stable transfected
cells were selected with hygromycin B at 200 µg/ml and subsequently grown in
HamF12/DMEM-10% FBS in the presence of hygromycin B at 100 µg/ml.

#### 85 SDC1 silencing by Small interfering RNA approach

86 MCF-7 cells were plated in a 96, 6 or 24-well plate in MEM-10%FBSdest without 87 antibiotics 24 h before transfection. SDC1-siRNA (HSS14-3872, Thermo Fisher 88 Scientific (Illkirch, France) (5'-GCC-CAC-CAA-ACA-GGA-GGA-AUU-CUA-U3'; 5'-89 AUA-GAA-UUC-CUC-CUG-UUU-GGU-GGG-C-3') as well as negative control 90 siRNA Medium GC duplex #2 were diluted in Opti-MEM<sup>™</sup> medium and transfected 91 using Lipofectamine® RNAiMax according to supplier recommendation. Six hours after 92 transfection, medium were renewed with medium containing antibiotics. Protein and 93 mRNA silencing levels as well as their cellular consequences were studied 24 to 72 h 94 after transfection.

#### 95 Cell cultures

96 MCF7-WT, MCF7-Ctr and MCF7-SDC1 were subsequently grown in a humidified 97 atmosphere of 5 % CO2 at 37°C with HamF12/DMEM supplemented with 10 % of heat 98 inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco-Invitrogen), 2 mM glutamine and antibiotics 99 (50 U/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin, 100  $\mu$ g/ml kanamycin and 0.25  $\mu$ g/ml 100 fungizone). For transfected cells 100  $\mu$ g/ml Hygromycin B were added to maintain 101 selection pressure.

#### 102 Cells treatment

103 Cells at around 40-50 % confluence were cultured in DMEM without phenol red, 4.5 g/l 104 glucose, with 10 % of heat inactivated fetal bovine serum depleted in estrogen (charcoal 105 incubation), in the presence of 2 mM glutamine and antibiotics. After 3 days of E2 106 starvation, cells were seeded in this same medium in culture well plates at 107 25 000 cells/cm<sup>2</sup>. Five days after estrogen starvation cells were stimulated with E2 or 108 EGF. For scratch-wound assay cells were let in complete H/D medium and plates at 109 50 000 cells/cm<sup>2</sup>.

# 110 Cell growth assay

111 Cells were seeded in triplicate in 96-well plates and treated with E2 or EGF. After 48 h, 112 cells were fixed with formaldehyde 4 % (v/v) (30 min at room temperature (RT)), washed 113 twice before and then staining with crystal violet 0.1% (w/v) (30 min at RT). Dye was 114 eluted with 100 µl of 10 % acetic acid, and absorbance at 600 nm was measured using a 115 Metertech  $\Sigma$ 960 Microplate reader.

# 116 Cell cycle analysis

MCF-7 cells seeded in T-25 flask were treated 24 h with 0.1 nM of 17β-estradiol. Cells
were harvested then fixed with 70 % ethanol overnight at -20 °C. Cold phosphatebuffered saline (PBS) was used twice to wash cells before incubation with DNA-PREP
Reagents Kit (Beckman Coulter). Cell cycle analysis was performed using the Gallios
Flow Cytometer System (Beckman Coulter) and analysed with Kaluza® Flow Analysis
Software (Beckman Coulter, Villepinte, France).

#### 123 RNA extraction and real-time QRT-PCR

124 MCF-7 cells seeded in 6-well plate were treated with estradiol for 24 h then lysate with 125 the TRI Reagent® (Sigma-Aldrich). Total RNA was isolated following the 126 manufacturer's protocol then its purity and concentration were determined with the 127 NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Reverse transcription and real 128 time PCR were managed as described previously (Fleurot et al. submitted) using 129 appropriate primers sets (Table1). Cycle threshold values were normalized by 130 housekeeper gene GAPDH. The relative fold-change was calculated using the  $2-\Delta\Delta Ct$ method. The specificity of primers was confirmed for each PCR run by dissociation curve 131 132 analysis (Software).

#### 133 Wound healing Assay

Cells was seeded onto 24-well at 50 000cells/cm<sup>2</sup>. When cells reach 90% confluence, wound scratch assay was performed using a pipette tip. Photographs were taken at 0 h and after 24 h of culture. The cell velocity ( $\mu$ m/hour) was determined by measured of gap closure of the wound between 0 h and 24 h.

#### 138 Western blotting

MCF-7 cells were seeded in 6-well plates and cultured as described in "cell treatment" paragraph. After treatment or not with E2 (30 min or 24 h) or EGF (30 min), cells were washed with cold PBS before adding SDS lysis buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8; 2 % (w/v) SDS, 10 % Glycerol; 50 mM DTT; 0.01 % w/v Bromophenol Blue) supplemented with 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM PMSF and 10  $\mu$ l/ml of protease inhibitor cocktail. Protein samples were sonicated then denatured 5 min at 95 °C. Protein lysates (20  $\mu$ l) were separated by 10% SDS-PAGE and electroblotted onto Hybond-ECL nitrocellulose membrane. All primary antibodies were diluted at 1:1000 in PBS-Tween,
0.1% BSA except for SDC1 antibody used at 1:500 dilution. Targets proteins were
revealed using HRP-conjugated secondary antibodies and ECL reagent. Membranes were
stripped and re-probed with mouse anti-actin (Ab-1) for loading control when needed.
Semi-quantitative estimation of band intensity was performed after a densitometric
analysis using Image J software.

### 152 Confocal Immunocytochemistry

153 MCF-7 cells seeded on coverslip in 12-well plates were fixed with 4 % paraformaldehyde 154 for 15 min then permeabilized with methanol at -20 °C for 10 min. Non-specific binding 155 sites were blocked with PBS - 5 % FBS - 0.3% triton at room temperature. Samples were 156 incubated overnight at 4 °C with appropriate primary antibody diluted at 1:100 in PBS - 5 157 % BSA - 0.3% triton. Slips were washed three times with PBS then incubate with Alexa 158 Fluor® conjugated secondary antibodies at room temperature for 1 h. Slips were washed 159 then mounted with fluoroshield DAPI and observed with a confocal microscopy using a 160 FluoView-FV1000, Olympus. Fluorescence signal collection. Analysis was and scaling 161 were performed through the control software (FV10-ASW-1.7, Olympus).

## 162 Transmission electronic microscopy

A cell suspension was fixed twice in 4 % PFA in Sorensen's phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4 for 30 min at 4 °C then was washed three times. Free aldehydes were quenched with 50mM glycine. Cells embedded in 10 % gelatin (10 min at 37°C) were cut into blocks (1mm<sup>3</sup>). Cells in blocks were cryoportected by sucrose infiltration (2.3 M in Sorensen's phosphate buffer) for 4 h. Sample was mounted on aluminum pins and plunged in liquid nitrogen. The sample mounted in a cryo-ultramicrotome (RMC Boeckeler) at -110 °C

169 was trimmed then using a diamond knife (Diatome) and a section ribbon of 80nm was 170 achieved. Ribbon was retrieved from the cryo-chamber with a droplet of 2.3 M sucrose 171 then a section of ribbon was attached to the grid. Section was washed twice with 172 phosphate buffer (2 min at  $37^{\circ}$ C), free aldehydes were inactivated then unspecific binding 173 sites were blocked for 30 min with Aurion Blocking Solution (Aurion). Sections were 174incubated with the anti-ERa and anti-SDC1 antibody used each at 5µg/ml in PBS 5 % 175 BSA c<sup>TM</sup> (Aurion) for 1 h. After 6 washes with PBS 5 % BSA-c<sup>TM</sup>, sections were 176 incubated with the 6 nm and 10 nm colloidal gold-conjugated secondary antibody 177 (Aurion) (1:40) for 1 h 30 recognize each a primary antibody. Sample was fixed with 1 178 % glutaraldehyde in PBS then with a 0.4 % uranylacetate, 2 % methylcellulose mixture 179 for 5 min at 4°C. The grids were examined using a transmission electron microscope 180 (JEM-1011, JEOL, Croissy sur Seine, France) equipped with a Gatan (Evry, France) 181 camera (Orius 200). Pictures were acquired with a Digital micrograph software.

### 182 Statistical analysis

The GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, Inc.) was used for the statistical analysis. Experimental data are expressed as the means  $\pm$  SE. The differences between groups were analyzed using the Student's t-test or the one-way analysis of variance followed if difference by Dunnett's or Tukey test. Differences were considered statistically significant at P<0.05.

# 188 **Results**

## 189 Establishment of the MCF-7 cell line overexpressing Syndecan-1

190 To investigate the potential role of SDC1 on the estrogen regulated processes in breast 191 carcinoma cells MCF7, we generated a stable MCF7 cell line overexpressing the SDC1 192 (MCF7-SDC1) and its control cell line (MCF7-Ctr). SDC1 mRNA overexpression in 193 MCF7-SDC1 cells was checked by real time RT-PCR (QRT-PCR) demonstrating a 194 significant increase expression by 5.32-fold compared with MCF7-Ctr in which empty 195 plasmid was transfected (Fig1.A). SDC1 overexpression was also evidenced at the protein 196 level, using western blot approach (Fig1.B). To study cellular targeting of the exogenous 197 overexpressed SDC1, an immuncytolocalization have been done. Primary SDC1-198 antibody was used and revealed by colloidal gold-conjugated secondary antibody. 199 Following a transmission electron microscopy (TEM) examination of the ultrastructure 200 of the MCF7-SDC1, gold nanoparticles were observed mainly associated with plasma 201 membrane ultrastructure and at a lesser level in a perinuclear and nucleolar localization 202 (unpublished observations). As syndecan family members may display redundant 203 functions, we have investigated if SDC1 overexpression can induce a compensatory 204 mechanism in MCF7 cells. As shown in Fig1. C and D neither SDC2 nor SDC4 gene 205 exhibits a significant variation of its expression in MC7-SDC1 compared to control cell 206 line. Absence of SDC1-mediated change has been also evidenced for HPSE expression, 207 a known partner of SDC1 metabolism (Fig1.E).

# 208 Syndecan-1 overexpression increases cell migration and reduces proliferation of

# 209 MCF7 cells cultured in complete medium.

A wound scratch assay and cell density analysis were performed to determine the effects of SDC1 overexpression in MCF7 and its functional consequences on cells migration and growth. Cells velocity at 24h in complete HD medium was significantly increased for MCF7-SDC1 cells (11.35  $\mu$ m/h) versus MCF7-Ctr cells (7.95  $\mu$ m/h) (Fig2.A; Fig2.B). In contrast, in this medium, MCF7-SDC1 growth is decreased compared to the one of MCF7-Ctr at all-time points studied but appears only significant at 48h of culture, an incubation time retain for further experiments (Fig2.C).

# SDC1 overexpression reduced estrogen-mediated growth rate without affecting cell cycle distribution

219 Thus cells were cultured for 48 h either in HD medium or in steroid depleted medium 220 (MEM) supplemented or not with E2 or EGF (Fig. 3A). MCF7-SDC1 growth retardation 221 compared to MCF7-Ctr, observed in HD, was lost in MEM medium as in MEM+EGF. In 222 contrast, addition of E2 in MEM medium restores the reduced growth rate observed in 223 cells overexpressing SDC1. MCF7-Ctr cell density was about 1.52 fold above that MCF7-224 SDC1 cells. Cells were cultured for 24h with or without E2 and then stained with 225 propidium iodide then cell cycle distribution analysed by flow cytometry (Fig 3B). In 226 these experimental conditions, no difference in proportion of cells in each phase of the 227 cell cycle had been evidenced between MCF7-SDC1 and control cells. Furthermore, 228 addition of E2 induces an exit from the G0/G1 phase and entry into S and G2/M phases 229 with a similar rate in both cell lines.

#### 230 ERa expression and transcriptional activity is not affected by SDC1 overexpression.

231 To further understand the mechanism leading to reduced proliferation after estrogen 232 stimulation in cells overexpressing the SDC1, we have focused on ER $\alpha$  which is the main 233 mediator of estrogens mitogenic action in MCF7 cells. Gene (ESR1) and protein 234 expression of ERa was evaluated by QRT-PCR (Fig. 4A) and western blot (Fig. 4B) in 235 cell lines cultured in MEM supplemented or not with estradiol. In both conditions, no 236 significant modification of mRNA or protein levels was found. Furthermore, expression 237 of well admitted ERa target genes has been estimated after E2 stimulation in both cell 238 lines. E2-mediated stimulation of P21 (CDKN1A) (Fig. 4C) and PGR (Fig4.E) gene 239 expressions was significantly observed in both MCF7-Ctr and MCF7-SDC1. However, 240 amplitude of the transcriptional response to estrogen-stimulation in MCF7 cells 241 overexpressing SDC1 was not significantly different than response measured in control 242 cell line.

#### 243 SDC1 overexpression affects basal ERK and Akt pathways but has no effect on E2-

### 244 dependent ERa phosphorylation

245 We next investigated the contribution of kinase pathways MAPK and 246 phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways. These kinases can modify ER activity 247 through ligand-independent post translational modifications such as phosphorylation 248 (Barone et al. 2010; Le Romancer et al. 2011). As shown in Fig5A, ERK pathway 249 displays a constitutive activation in MCF-7, illustrated by high basal level of 250 phosphorylated ERK1/2 proteins (Fig. 5A). Interestingly, the pERK/ERK ratio was 251 significantly reduced (minus 33%) in MCF7-SDC1 compared to control cell line. In 252 contrast, a non-significant increase of Akt phosphorylation was observed in MCF7-SDC1 253 in both basal and E2 treated condition (Fig. 5B). In time course studied, E2 failed to 254 initiate ERK1/2 or Akt phosphorylation in both cell lines while this ability was observable 255 after EGF stimulation. In a second set of experiments, phosphorylation status of ER $\alpha$  was 256 evaluated in both cell line after E2 stimulation (30 min) (Fig. 5C and D). E2 strongly 257 induced Ser118 and Ser167 phosphorylation in both cell line suggesting that SDC1 258 overexpression had no effect on E2-mediated phosphorylation.

### 259 SDC1 overexpression alters estradiol mediating ERa trafficking

260Analysis of SDC1 protein expression by confocal microscopy displays a heterogeneous 261 expression level of SDC1 within MCF7-SDC1 cell line (Fig 6A). A significant 3.59-fold 262 increase of SDC1 relative intensity was measured per field, due to higher expression of 263 SDC1 in the majority of cells compared to control cells while some cells remain poorly 264 stained (Fig 6B). We took advantage of this variation in SDC1 expression between 265 MCF7-SDC1 cells to study after short estradiol stimulation (30 min), the localization of 266 ERa and SDC1. Immunocytochemical observation of MCF7-SDC1 cells shows 267 differential localisation of ERa between cells expressing high or low level of SDC1. As 268 expected, ERa accumulates in nucleus after E2-stimulation but preferentially in cells 269 exhibiting low level of SDC1 expression. In contrast, the cells who expresses high level 270 of SDC1 displayed a diffuse cytosolic or perinuclear ERa staining.

#### 271 Silencing SDC1 increased E2-dependent proliferation and ERa nuclear localization

272 Considering the results observed with SDC1 overexpression, we used siRNA approach 273 to downregulate SDC1 expression. Efficacy of SDC1 silencing (siSDC1) have been 274 demonstrated a both mRNA and protein level and compared to cells sham transfected 275 (Lipo) or transfected with control siRNA (siNeg) (Fig. 7 A and B). Whether SDC1

276	silencing was effective, both ER $\alpha$ mRNA and protein expression level were unaffected
277	(Fig. 7C and D). Cellular growth rate of cells cultured in MEM was similar in cell line
278	expressing or not SDC1 (Fig. 7E). In these cells, E2 was able to increase this rate but in
279	higher level in cell with silenced SDC1 expression. Furthermore, immunocytochemical
280	staining of SDC1 and $\text{ER}\alpha$ , show inverse correlation between SDC1 expression and
281	nuclear localization of ERa (Fig. 7F).

## 282 Overexpression of SDC1 induced SDC1/ERa clustering in perinuclear region

283 Co-localization of SDC1 and ERa was studied using transmission electron microscopy 284 after coupling both primary antibodies (from different host species) with respective 285 colloidal gold-conjugated secondary antibody bearing two different sizes of nanoparticles (10 nm for ERa and 6 nm for SDC1). TEM observations at increasing magnification 286 287 reveal cluster of nanoparticles composed of both size. Theses clusters were mainly 288 localized close to nuclear membrane in both inner and outer side (Fig. 8). Even if SDC1 289 was mainly found associated with plasma membrane, co-localization experiments did not 290 show cluster in this cell compartment.

# 291 Discussion

292 SDC1 expression is dysregulated in many cancers including breast neoplasia (Akl et al. 293 2015). In human breast tumors, high level of SDC1 is associated with an aggressive 294 phenotype, a large tumor size, a high grade and an elevated mitotic index. Thus, SDC1 295 overexpression is correlated with an increased risk of mortality, a poor prognosis/clinical 296 outcomes in breast cancer (Barbareschi et al. 2003; Baba et al. 2006; Lendorf et al. 2011). 297 However, in invasive ductal breast carcinoma loss of epithelial SDC1 expression is 298 associated with a poor prognosis (Loussouarn et al. 2008). These controversial results 299 could be link to hormonal status of tumors, as epithelial SDC1 expression was associated 300 with negative ER status while stromal SDC1 expression was associated with positive ER 301 status (Leivonen et al. 2004). Thus, consequences of SDC1 dysregulation in breast 302 carcinoma cells are still misunderstood and its impact on estrogen signalling and E2-303 mediated tumorigenic process has never been studying.

304 We demonstrated in present article that overexpression of SDC1 in MCF7 cells was 305 associated with an increased migration ability. These results are consistent with the role of matrix receptor sustain by SDC1 (Maeda et al. 2006; Nikolova et al. 2009) and its 306 307 involvement in the remodelling of breast cancer tissue through the interaction with other 308 extracellular matrix and basement membrane components (Tsanou et al. 2004). In the 309 MCF7 cells overexpressing SDC1, expression of SDC2 and SDC4, two other members 310 of SDC family as well as those of heparanase (HPSE), an endo- $\beta$ -glucuronidase 311 degrading heparan sulfate (HS) chain, were not affected. These results suggest that SDC1 312 overexpression is sufficient to sustain the increased cell migration observed. SDC1 was 313 found negatively correlated with tenascin and type IV collagen which loss is associated 314 with EMT and facilitated tumor cell invasion into stromal compartment (Tsanou et al.

315 2004). Enzymatic activity of HPSE induces cleavage of HS chains, which are carrying by 316 syndecan-1, promoting SDC1 shedding and releasing of SDC1 ectodomain in 317 extracellular compartment. In MDA-MB-231 mammary carcinoma cell line, SDC1 318 ectodomain can binds and activates  $\alpha\nu\beta3$  integrin which triggers cell spreading and 319 angiogenesis (Beauvais & Rapraeger 2003; Beauvais *et al.* 2009).

320 In addition to increased invasiveness, we found that SDC1 overexpression has a growth 321 inhibitory effect on MCF7 cells cultured in complete medium. The role of SDC1 in the 322 cell proliferation has already been study and showed that SDC1 overexpression increased 323 in short-term (6 hours) MCF7 proliferation (Nikolova et al. 2009). This study highlight 324 that proteolytic cleavage of SDC1 ectodomain, which is released into the stroma, induces 325 decrease of MCF-7 proliferation (Nikolova et al. 2009). Moreover, stromal SDC1, 326 synthetized by fibroblasts and released in stroma, induces MDA-MB-231 cells 327 proliferation but not T47D carcinoma cells or murine normal mammary cell line 328 proliferation (Maeda et al. 2004). Thus our contradictory results could be explained by 329 the basal SDC1 cleavage. We highlight that in a medium depleted with estrogens MCF7-330 SDC1 and MCF7-Ctr have a comparable growth. In addition, we observed that E2-331 stimulated growth is reduced in MCF7 cells overexpressing SDC1. We found that cell 332 cycle distribution in response to E2 is not affected in MCF7-SDC1 compared to MCF7-333 Ctr. However, this difference could be explained by increase of time spent in each phase 334 of the cell cycle when SDC1 is overexpressed. In mesothelioma cells, SDC1 335 overexpression alters cells proliferation by prolongation of S-phase (Zong et al. 2010), 336 Additionally, SDC1 silencing also reduces cells proliferation by decrease proportion of 337 cells in G0/G1 and decreased number of cells in G2/M phase (Szatmári et al. 2012). In 338 fibrosarcoma cell line, syndecan-1 overexpression promotes proliferation along with the 339 activation of genes driving the G1/S phase transition (Péterfia et al. 2012).

Previous reports, describe that high level of SDC1 is inversely correlated with ER expression in breast tumor (Barbareschi *et al.* 2003) moreover SDC1 appears higher express in HER2 and triple-negative breast carcinomas (Nguyen *et al.* 2013). Loss of ERa expression is associated with EMT processes like migration, invasion, and ECM remodelling (Bouris *et al.* 2015). Here, we found that cellular SDC1 overexpression is not associated with modification of ER expression in MCF-7 in agreement with previous study in breast tumor (Benad-Mehner *et al.* 2014).

Our results also shown a reduced basal phosphorylation of ERK and an increased activation of Akt signalling in cell overexpressing SDC1. However, activation rates of MAP kinase and Akt-kinase induced by E2 are not modified by level of SDC1 in MCF-7. Interestingly, in mesothelium cells, SDC1 increases ERK activation but decreases Akt activation and decreases cell proliferation (Heidari-Hamedani *et al.* 2015) suggesting an inverse correlation between SDC1 mediated effects on kinasis pathways and their consequences on cell proliferation in breast cancer and mesothelium cells.

354 In absence of ligand, ER $\alpha$  is shuttled between cytoplasm and nucleus but appears 355 preferentially present in nucleus(Kocanova et al. 2010), unlike others nuclear receptors 356 mostly present in cytoplasm (Picard et al. 1990). Under E2 stimulation, ERa was 357 preferentially located in nucleus attached to nuclear component (Htun et al. 1999). 358 Several studies have demonstrated that alteration of ER $\alpha$  nuclear sub-localisation by 359 ERRβ (Tanida et al. 2015) or SAFB1/2 (Hashimoto et al. 2012) reduces its transcriptional 360 activity. In fact ERR $\beta$  interaction with AF-1 domain of ER $\alpha$  reduces transcriptional 361 activity of ERE promoter, decreases estradiol dependent proliferation and modification 362 of transcriptional co-regulators recruitment. Here we suggest that SDC1 overexpression 363 in MCF-7 restraint ERa in cytoplasm and modify its transcriptional activity. In fibroblast 364 cells, ER location is increased in the cytoplasm following IGF-I treatment through a

- 365 mechanism involving MAPK pathways (Yu et al. 2013).
- 366 In conclusion, we have shown that SDC1 overexpression is not associated with a loss of
- 367 ERα expression but rather to alteration of ERα localization in ER+ breast carcinoma cells
- 368 MCF7. This SDC1 mediated sequestration of ERa explain the decrease of estrogen
- 369 dependent proliferation. In previous study, from our laboratory, we demonstrated the
- 370 ability of E2 to regulated SDC1 expression (Fleurot et al. submitted). Taking together,
- 371 these results suggest existence of an antagonism between estrogen signalling and SDC1
- 372 which may control breast cancer cell progression and in aggressiveness of breast tumor.

# 373 **REFERENCES**

- Akl MR, Nagpal P, Ayoub NM, Prabhu SA, Gliksman M, Tai B, Hatipoglu A, Goy A &
  Suh KS 2015 Molecular and clinical profiles of syndecan-1 in solid and hematological
  cancer for prognosis and precision medicine. *Oncotarget* 6 28693.
- Baba F, Swartz K, van Buren R, Eickhoff J, Zhang Y, Wolberg W & Friedl A 2006
  Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly
  proliferative breast carcinoma subtype. *Breast Cancer Research and Treatment* 98 91-98.
- Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, Cangi MG, Pecciarini L, Angelo Mauri F,
  Veronese S, Caffo O, Lucenti A, Palma PD *et al.* 2003 High syndecan-1 expression in
  breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer*98 474–483.
- Barone I, Brusco L & Fuqua SAW 2010 Estrogen receptor mutations and changes in
  downstream gene expression and signaling. *Clinical Cancer Research* 16 2702–2708.
- Beauvais DM & Rapraeger AC 2003 Syndecan-1-mediated cell spreading requires
  signaling by αvβ3 integrins in human breast carcinoma cells. *Experimental Cell Research*286 219–232.
- 389 Beauvais DM, Ell BJ, McWhorter AR & Rapraeger AC 2009 Syndecan-1 regulates  $\alpha\nu\beta3$ 390 and  $\alpha\nu\beta5$  integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel 391 peptide inhibitor. *Journal of Experimental Medicine* **206** 691–705.
- Benad-Mehner P, Thiele S, Rachner TD, Göbel A, Rauner M & Hofbauer LC 2014
  Targeting syndecan-1 in breast cancer inhibits osteoclast functions through up-regulation
  of osteoprotegerin. *Journal of Bone Oncology* **3** 18–24.
- Bouris P, Skandalis SS, Piperigkou Z, Afratis N, Karamanou K, Aletras AJ, Moustakas
  A, Theocharis AD & Karamanos NK 2015 Estrogen receptor alpha mediates epithelial to
  mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties
  of breast cancer cells. *Matrix Biology*.
- Chakravarti R & Adams JC 2006 Comparative genomics of the syndecans defines an
   ancestral genomic context associated with matrilins in vertebrates. *BMC Genomics* 7 83.
- 401 Couchman JR 2010 Transmembrane signaling proteoglycans. *Annual Review of Cell and*402 *Developmental Biology* 26 89–114.
- 403 DeSantis C, Siegel R, Bandi P & Jemal A 2011 Breast cancer statistics, 2011. CA: A
  404 Cancer Journal for Clinicians 61 408–418.
- 405 Downs-Holmes C & Silverman P 2011 Breast cancer: overview & updates. *The Nurse*406 *Practitioner* 36 20–26; quiz 7.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman
Bray F 2015 Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major

- 409 patterns in GLOBOCAN 2012. International Journal of Cancer **136** E359–E386.
- 410 Fleurot E, Goudin C, Hanoux V, Bonnamy PJ, Levallet J Soumis Estrogen induced
- 411 syndecan-1 down-regulation in human breast carcinoma cells. *Endocrine-Related* 412 *Cancer.*
- García-Becerra R, Santos N, Díaz L & Camacho J 2012 Mechanisms of resistance to
  endocrine therapy in breast cancer: focus on signaling pathways, miRNAs and genetically
  based resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 14 108–145.
- 416 Götte M, Kersting C, Ruggiero M, Tio J, Tulusan AH, Kiesel L & Wülfing P 2006
- 417 Predictive value of syndecan-1 expression for the response to neoadjuvant chemotherapy 418 of primary broad appart *Antiography* **26** 621 627
- 418 of primary breast cancer. *Anticancer Research* **26** 621–627.
- 419 Guiu S, Michiels S, André F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A, Hennessy BT, Sorlie T,
- Sotiriou C, Turner N *et al.* 2012 Molecular subclasses of breast cancer: how do we define
  them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Annals of Oncology: Official*
- 422 Journal of the European Society for Medical Oncology 23 2997–3006.
- Hashimoto T, Matsuda K-I & Kawata M 2012 Scaffold attachment factor B (SAFB)1 and
  SAFB2 cooperatively inhibit the intranuclear mobility and function of ERα. *Journal of Cellular Biochemistry* 113 3039–3050.
- Heidari-Hamedani G, Vivès RR, Seffouh A, Afratis NA, Oosterhof A, van Kuppevelt
  TH, Karamanos NK, Metintas M, Hjerpe A, Dobra K *et al.* 2015 Syndecan-1 alters
  heparan sulfate composition and signaling pathways in malignant mesothelioma. *Cellular Signalling* 27 2054–2067.
- Htun H, Holth LT, Walker D, Davie JR & Hager GL 1999 Direct visualization of the
  human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the
  receptor. *Molecular Biology of the Cell* 10 471–486.
- Ibrahim SA, Yip GW, Stock C, Pan J-W, Neubauer C, Poeter M, Pupjalis D, Koo CY,
  Kelsch R, Schüle R *et al.* 2012 Targeting of syndecan-1 by microRNA miR-10b promotes
  breast cancer cell motility and invasiveness via a Rho-GTPase- and E-cadherin-dependent
  mechanism. *International Journal of Cancer* 131 E884–E896.
- 437 Iozzo RV & Sanderson RD 2011 Proteoglycans in cancer biology, tumour
  438 microenvironment and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15
  439 1013–1031.
- Kocanova S, Mazaheri M, Caze-Subra S & Bystricky K 2010 Ligands specify estrogen
  receptor alpha nuclear localization and degradation. *BMC Cell Biology* 11 98.
- Koda JE, Rapraeger A & Bernfield M 1985 Heparan sulfate proteoglycans from mouse
  mammary epithelial cells. Cell surface proteoglycan as a receptor for interstitial
  collagens. *Journal of Biological Chemistry* 260 8157–8162.
- 445 Kotiyal S & Bhattacharya S 2014 Breast cancer stem cells, EMT and therapeutic targets.
- 446 Biochemical and Biophysical Research Communications **453** 112–116.

- Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, Sentis S, Renoir J-M & Corbo L 2011 Cracking
  the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocrine Reviews* 32
  597–622.
- Leivonen M, Lundin J, Nordling S, Von Boguslawski K & Haglund C 2004 Prognostic value of syndecan-1 expression in breast cancer. *Oncology* **67** 11–18.
- 452 Lendorf ME, Manon-Jensen T, Kronqvist P, Multhaupt HAB & Couchman JR 2011
- 453 Syndecan-1 and Syndecan-4 Are Independent Indicators in Breast Carcinoma. *Journal of* 454 *Histochemistry & Cytochemistry* **59** 615–629.
- Loussouarn D, Campion L, Sagan C, Frenel J-S, Dravet F, Classe J-M, Pioud-Martigny
  R, Berton-Rigaud D, Bourbouloux E, Mosnier J-F *et al.* 2008 Prognostic impact of
  syndecan-1 expression in invasive ductal breast carcinomas. *British Journal of Cancer*98 1993–1998.
- Maeda T, Alexander CM & Friedl A 2004 Induction of syndecan-1 expression in stromal
   fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Research* 64 612–
   621.
- Maeda T, Desouky J & Friedl A 2006 Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts
  promotes breast carcinoma growth in vivo and stimulates tumor angiogenesis. *Oncogene*25 1408–1412.
- Manon-Jensen T, Itoh Y & Couchman JR 2010 Proteoglycans in health and disease: the
  multiple roles of syndecan shedding. *The FEBS Journal* 277 3876–3889.
  (doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07798.x)
- Nguyen TL, Grizzle WE, Zhang K, Hameed O, Siegal GP & Wei S 2013 Syndecan-1
  overexpression is associated with nonluminal subtypes and poor prognosis in advanced
  breast cancer. *American Journal of Clinical Pathology* 140 468–474.
- 471 Nikolova V, Koo C-Y, Ibrahim SA, Wang Z, Spillmann D, Dreier R, Kelsch R,
  472 Fischgrabe J, Smollich M, Rossi LH *et al.* 2009 Differential roles for membrane-bound
  473 and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression. *Carcinogenesis* 30
  474 397-407.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross
  DT, Johnsen H, Akslen LA *et al.* 2000 Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406 747–752.
- Péterfia B, Füle T, Baghy K, Szabadkai K, Fullár A, Dobos K, Zong F, Dobra K, Hollósi
  P, Jeney A *et al.* 2012 Syndecan-1 Enhances Proliferation, Migration and Metastasis of
  HT-1080 Cells in Cooperation with Syndecan-2. *PLoS ONE* 7 e39474.
- 481 Picard D, Kumar V, Chambon P & Yamamoto KR 1990 Signal transduction by steroid
  482 hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid
  483 receptors. *Cell Regulation* 1 291–299.
- Ramani VC, Pruett PS, Thompson CA, DeLucas LD & Sanderson RD 2012 Heparan
  sulfate chains of syndecan-1 regulate ectodomain shedding. *Journal of Biological Chemistry* 287 9952–9961.

487 Stepp MA, Pal-Ghosh S, Tadvalkar G & Pajoohesh-Ganji A 2015 Syndecan-1 and its
488 expanding list of contacts. *Advances in Wound Care* 4 235–249.

489 Szatmári T, Mundt F, Heidari-Hamedani G, Zong F, Ferolla E, Alexeyenko A, Hjerpe A
490 & Dobra K 2012 Novel genes and pathways modulated by syndecan-1: implications for
491 the proliferation and cell-cycle regulation of malignant mesothelioma cells. *PLoS ONE* 7

492 e48091.

493 Tanida T, Matsuda KI, Yamada S, Hashimoto T & Kawata M 2015 Estrogen-related 494 receptor  $\beta$  reduces the subnuclear mobility of estrogen receptor  $\alpha$  and suppresses 495 estrogen-dependent cellular function. *Journal of Biological Chemistry* **290** 12332–12345.

Teng YH-F, Aquino RS & Park PW 2012 Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biology* **31** 3–16.

Tsanou E, Ioachim E, Briasoulis E, Charchanti A, Damala K, Karavasilis V, Pavlidis N
& Agnantis NJ 2004 Clinicopathological study of the expression of syndecan-1 in
invasive breast carcinomas. correlation with extracellular matrix components. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 23 641–650.

Yu Z, Gao W, Jiang E, Lu F, Zhang L, Shi Z, Wang X, Chen L & Lv T 2013 Interaction
between IGF-IR and ER Induced by E2 and IGF-I. *PLoS ONE* 8.

Zong F, Fthenou E, Castro J, Péterfia B, Kovalszky I, Szilak L, Tzanakakis G & Dobra
 K 2010 Effect of syndecan-1 overexpression on mesenchymal tumour cell proliferation

506 with focus on different functional domains. Cell Proliferation 43 29-40.

507

# 508 Figure legends

#### 509 Figure 1: Generation of MCF-7 cell line overexpressing SDC1

510 MCF-7 cells were stably transfected with empty plasmid or SDC1 overexpression 511 plasmid to generate MCF7-Ctr and MCF7-SDC1 cell lines respectively. After non-clonal 512 selection and amplification expression level of SDC1 was estimated (A) at mRNA level 513 by quantitative real-time PCR, B) at protein level after western blot analysis. Values are 514 average  $\pm$  SEM of three independent experiments. (\*\* p < 0.005 versus control) using 515 one-way analysis of variance follow by Tukey's test. Expression of SDC2 (C), SDC4 (D) 516 and HPSE (E) mRNA, in MCF7-ctrl and MCF7 overexpressing SDC1, were analysed by QRT-PCR and expressed as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Values are average  $\pm$  SEM of three independent 517 518 experiments. (\* p < 0.05; \*\* p < 0.005) using student's t test.

# 519 Figure 2: Overexpression of SDC1 promotes MCF7 cell migration but alters 520 estradiol dependent cellular growth.

521 Representative pictures of MCF7-Ctr and MCF7-SDC1 cells migration at 0 h and 24 h 522 after scratch-wounds assay in HD medium (A), the gap closure in µm was measured at 0 523 and 24 h to determine cells velocity (B). Values are average  $\pm$  SEM of three independent 524 experiments in triplicate. (\*\*  $p \le 0.01$ ) using student's t test. Cellular density was assessed 525 after 24 to 96 h of E2 treatment (0.1nM) by quantification of absorbance after crystal 526 violet staining (C). Values are average  $\pm$  SEM of three independent experiments in triplicate. (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01) using one-way analysis of variance follow by 527 528 Dunnett's test. ( $\#p \le 0.05$ ) using student's t-test.

# 529 Figure 3 : SDC1 overexpression alters estradiol dependent growth but not the cell

# 530 cycle distribution.

531 MCF7-Ctr and MCF7-SDC1 cellular density was assessed after 48h of E2 or EGF 532 treatment (both at 0.1nM) by quantification of absorbance after crystal violet staining (A). 533 Values are average  $\pm$  SEM of fold increased from three independent experiments in 534 triplicate. \* p < 0.05; \*\*p < 0.01 compared to relative density before E2 stimulation using 535 one-way analysis of variance follow by Tukey's test. #p< 0.05; ##p< 0.01 compare to 536 MCF7-Ctr by student t test. (B) Cell cycle repartition of E2-treated (hatched) and un-537 treated (filled) MCF7 cells determined by propidium iodide incorporation 24-hours after 538 treatment. Cell cycle progression was determined by flow cytometry using Coulter DNA-539 Prep Reagents kit (representative experiment). Percentages of cells in sub-G1; G0-G1, S, 540 and G2-M phases were means  $\pm$  SEM from 3 independent experiment. \*\*p< 0.01; 541 \*\*\* p < 0.001 compared to untreated controls in each cell line.

# 542 Figure 4: SDC1 overexpression has no impact on ERα expression and on its 543 transcriptional activity

544 MCF7-Ctr and MCF7-SDC1 cells were stimulated 24 h with 0.1 nM (A, C, D) or 10 nM 545 (B) of 17 $\beta$ -estradiol. ER $\alpha$  mRNA and protein expression were determined by QRT-PCR 546 (A) and western blot (B). Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A) (C) and PR 547 (PGR gene) (D) relative mRNA level were quantified using QRT-PCR. \* p < 0.05; 548 \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001) using one-way analysis of variance follow by Tukey's test.
#### 549 Figure 5: SDC1 alters basal ERK and Akt phosphorylation but has no effect on E2-

#### 550 dependent ERa phosphorylation

Evaluation of ERK and Akt phosphorylation using western blot analysis in MCF7-Ctr and MCF7-SDC1 treated with E2 and EGF for 30 min (both 10nM). Ratios pERK/ERK (A) and pAkt/Akt (B) were determined by densitometry analysis. Phosphorylation levels of ER $\alpha$  Ser-118 (C) and ER $\alpha$  Ser-167 (D) were analysed following treatment with 0.1 nM E2 for 30 min. The levels of ER $\alpha$  phosphorylation were normalized with ER $\alpha$ 66 (C, D). (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01) using one-way analysis of variance follow by Tukey's test.

#### 557 Figure 6: SDC-1 overexpression alters ERa nuclear localization in MCF7.

558 MCF7-Ctr and MCF7-SDC1 cells cultivated in MEM medium were immunostained for 559 SDC-1 and counterstained by DAPI then observed by confocal microscopy (A). (B) 560 SDC1 immunofluorescence intensities was measured per field and normalized by nuclear 561 numbers. Data were means  $\pm$  SEM intensity relative to control transfected cells from three 562 independent immunocytochemistry. \*\* p < 0.01 compared with Student's t test. (C) 563 MCF7-SDC1 cells were stimulated 30 min with E2 at 0,1nM then double stained with 564 anti-syndecan and anti-ERa. SDC1 was revealed with Alexa 488 labelled (green) and 565 ERα by Alexa 633 labelled (red) antibodies and cells counterstained by DAPI (Left panel) 566 (Scale bar=100 µm).

567

## 568 Figure 7: SDC1 silencing increases E2-dependent proliferation and ERα nuclear

#### 569 localization

570 The MCF7-WT cells were transiently sham transfected with transfection reagent alone 571 (Lipo) or containing negative control siRNA (siNeg) or siRNA targeting SDC1 (siSDC1). 572 Relative SDC1 mRNA (A) and protein expression (B) were estimated by for real time 573 PCR and western blot respectively after 48- and 72-hours after transfection. In the same 574 experimental conditions ER $\alpha$  gene (C) and protein (D) expression were examined. (E) 575 Cells were cultivated 48 h in MEM medium supplemented or not with E2 (0.1 nM) then 576 cellular density using violet was assessed crystal staining method. 577 (F) Immunocytochemical staining of SDC1 and ER $\alpha$  in siSDC1-transfected MCF7 cells.

#### 578 Figure 8: Colocalization of SDC1 and ERα in MCF7-SDC1.

MCF7-SDC1 cells were cultivated in h/d medium then SDC1 and ERα localization were
observed by electronic microscopy after labelling with primary antibody (anti-SDC1
R&D and anti-ERα F10) which are recognized by secondary antibody coupled to gold
nanoparticle: 6 nm for SDC1 (black arrows) and 10 nm for ERα (white arrows).

583

### Figure 1.





### Figure 2.



### Figure 3.



Figure 4.

#### Figure 5.



### Figure 6.



#### Figure 7.



## Figure 8.



GAPDH	sens	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	anti-sens	GAAGATGGTGATGGGATTTC
SDC1	sens	GAAACCTCGGGGGGAGAATAC
	anti-sens	TACAGCATGAAACCCACCAG
SDC 2	sens	GCTGCTCCAAAAGTGGAAAC
	anti-sens	CAGCAATGACAGCTGCTAGG
SDC4	sens	CGATCCGAGAGACTGAGGTC
	anti-sens	CACCAAGGGATGGACAACTT
HSPE	sens	ATCAATGGGTCGCAGTTAGG
	anti-sens	CTTGGTAGCAGTCCGTCCAT
ESR1	sens	AGACATGAGAGCTGCCAACC
	anti-sens	GCCAGGCACATTCTAGAAGG
PS2	sens	CACCATGGAGAACAAGGTGA
	anti-sens	AGCCCTTATTTGCACACTGG
PGR	sens	TCGAGCTCACAGCGTTTCTA
	anti-sens	CACCATCCCTGCCAATATCT
P21	sens	CAGCAGAGGAAGACCATGTG
	anti-sens	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA

#### Table 1: Primers used for real-time PCR

# **Discussion Générale**

# et Perspectives

Le cancer du sein est la première cause de décès par cancer chez la femme en France (Binder-Foucard et al., 2014). La caractérisation moléculaire de la tumeur associée à son évaluation anatomo-pathologique a permis l'amélioration de la prise en charge des patientes en orientant les stratégies thérapeutiques (Rivenbark et al., 2013). En effet, la mise en place du diagnostic moléculaire a permis de caractériser au niveau de celle-ci, la présence ou non des récepteurs aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR) ainsi que le niveau d'expression du récepteur HER2.

De nombreuses approches thérapeutiques, dans la prise en charge du cancer du sein, visent à empêcher l'activation des récepteurs aux œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  (codés respectivement par les gènes *ESR1* et *ESR2*) afin de prévenir leurs effets biologiques, lesquels sont essentiels au développement et à la progression tumorale (Howell et al., 2004). Par exemple, l'activation d'ER $\alpha$  par l'œstradiol peut à la fois induire la voie génomique et les voies de signalisation kinasique (PI3K/Akt, MAPKs) (Marino et al., 2006) ayant pour conséquence la prolifération des cellules cancéreuses. Dans les cancers ER+, l'utilisation de modulateurs sélectifs des ER (tamoxifène) et/ou de molécules permettant leur dégradation (fulvestrant) se révèle donc très efficace dans le traitement du cancer du sein (Howell et al., 2004).

Cependant, 30 % des patientes présentent une tumeur de type ER(-) (DeSantis et al., 2011), c'est-à-dire que les cellules cancéreuses n'expriment pas ER $\alpha$ 66, et sont ainsi insensibles à ces thérapies. Ces tumeurs décrites comme très agressives présentent un index mitotique élevé et sont associées à un facteur de mauvais pronostic (MdPaiman et al., 2014). Ainsi, chez les patientes présentant une tumeur ER(-), ou dans le cas de résistance *de novo* ou acquise aux anti-œstrogènes, d'autres cibles doivent être identifiées pour stopper la progression tumorale. La mise en place d'une nouvelle stratégie thérapeutique peut impliquer d'autres classes d'hormonothérapies et/ou de chimiothérapies.

Dans les cancers ER (+), la résistance à l'hormonothérapie peut avoir plusieurs origines dont la perte d'expression d'ER $\alpha$ , une dérégulation des voies kinasiques ou peut être due à un effet agoniste des SERM (Girault et al., 2006; Osborne and Schiff, 2011). Ainsi, dans le cancer du sein et de l'utérus, le tamoxifène peut induire l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$ 66 via le recrutement de co-activateurs transcriptionnells (Girault et al., 2006; Shang, 2006). En parallèle de la dépendance hormonale, l'acquisition par la cellule de propriétés tumorigéniques est aussi dépendante de son interaction avec la matrice extracellulaire, via des récepteurs matriciels comme le syndécane-1. Ce protéoglycane transmembranaire à héparane sulfate est capable d'interagir à la fois avec la matrice et les cellules adjacentes et peut servir de co-récepteur aux facteurs de croissance et de partenaire aux intégrines. Il contrôle ainsi des processus cellulaires tels que l'adhésion, l'invasion et la prolifération cellulaire (Couchman, 2010). Le SDC-1 peut également réguler la signalisation intracellulaire et être transloqué dans le noyau où il régule la transcription génique notamment celles des gènes régulant le cycle cellulaire (Stewart et al., 2015; Szatmári et al., 2012). Dans le cancer du sein, le syndécane-1 est associé à un facteur de mauvais pronostic (Stanley et al., 1999). En effet, l'augmentation de son expression est associée à une augmentation de l'index mitotique, de la taille et du grade histologique de la tumeur ainsi qu'à une mauvaise réponse à la chimiothérapie (Baba et al., 2006; Barbareschi et al., 2003; Götte et al., 2006).

Le syndécane-1 et les ER sont tous deux décrits comme des gardiens du phénotype épithélial (Leppa et al., 1996; Park et al., 2008). Ils peuvent également intégrer des signaux environnementaux, interagir avec la signalisation kinasique et les voies génomiques (Bernfield et al., 1999). Dans les cancers les plus agressifs, le statut ER(-) est corrélé à une expression élevée du syndécane-1 (Baba et al., 2006; Barbareschi et al., 2003). Même si cette corrélation inverse a été établie, il serait faux de surinterpréter ces résultats et dire que tous les cancers ER(-) surexpriment le SDC-1. En effet, l'évolution des technologies et le développement des puces à ARN ont permis d'analyser le transcriptome des tumeurs mettant ainsi en évidence la diversité phénotypique des cancers du sein (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001). Ainsi, les tumeurs ER(-) regroupent plusieurs sous-types tumoraux qui ne présentent pas les mêmes caractéristiques moléculaires, de survie ou de réponse aux traitements. De plus, au sein d'un même sous-type, il existe encore une grande hétérogénéité (Vuong et al., 2014; Weigelt et al., 2010).

Ce paradoxe d'une surexpression du SDC-1 dans des cellules ayant perdu leur phénotype épithélial au profit d'un phénotype mésenchymateux est sans doute à relier aux « shedding » du SDC-1, lequel caractérise les carcinomes mammaires de plus mauvais pronostic (Leivonen et al., 2004). En effet, le clivage protéolytique du syndécane-1 peut libérer la région extracellulaire (ectodomaine) qui porte les chaines d'HS. Le clivage du syndécane-1 est favorisé par l'héparanase, une enzyme qui dégrade les chaines d'héparane sulfate, et qui favorise l'activation des métalloprotéinases matricielles (MMP-9) (Jung et al., 2016; Purushothaman et al., 2008; Ramani et al., 2012). Celles-ci peuvent ainsi libérer dans l'environnement des molécules telles que des facteurs de croissance, des cytokines et des enzymes impliquées dans l'invasion tumorale et l'angiogenèse (Bernfield et al., 1999; Stepp et al., 2015).

Ainsi des mécanismes moléculaires coordonnés impliquant l'axe syndécane-1/héparanase et la signalisation œstrogénique pourraient contrôler le phénotype épithélial et l'agressivité des tumeurs et ainsi être impliqués dans les processus carcinogéniques.

Ce travail de thèse a eu pour objectif d'étudier l'existence d'un potentiel dialogue entre la signalisation œstrogénique et le SDC-1 dans des cellules de carcinome mammaire ER(+). Ces objectifs ont été formulés en 3 questions ;

- Les œstrogènes peuvent-ils réguler l'expression du SDC-1 dans les cellules tumorales mammaires? Et si oui, comment ?
- Les modifications post-traductionnelles du SDC-1 impliquent-elles la signalisation œstrogénique ?
- En retour, le SDC-1 influence-t-il la réponse des cellules cancéreuses mammaires aux œstrogènes ? Est-il impliqué dans la variation d'expression des récepteurs aux œstrogènes, et dans la résistance à l'hormonothérapie ?

Nos résultats montrent une inhibition dose-dépendante de l'expression du syndécane-1 par l'œstradiol observable après un minimum de 12 h de culture dans un milieu dépourvu d'œstrogènes (MEM sans rouge de phénol contenant 10 % de sérum de veau fœtal destéroïdé). Dans ces conditions, aucune modification de l'expression de l'héparanase n'a été observée alors que la réponse aux œstrogènes est confirmée par une augmentation d'expression du récepteur à la progestérone. Cette répression transcriptionnelle, œstrogéno-induite, se traduit par une diminution marquée de l'expression protéique du syndécane-1 (observée par microscopie confocale) à la surface des cellules MCF7 traitées par l'œstradiol.

L'utilisation d'agonistes/antagonistes spécifiques des différents récepteurs des œstrogènes (ER $\alpha$ , ER $\beta$  et GPER) désigne ER $\alpha$  comme le médiateur principal de l'action d'E2. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'un antagoniste pur des ER, l'ICI 182,780 (fulvestrant) qui en induisant la dégradation des ER $\alpha$  augmente l'expression génique et protéique du SDC-1. De plus l'ICI, comme le tamoxifène abolissent tout deux les effets inhibiteurs de l'œstradiol sur l'expression du syndécane-1.

Malgré l'absence d'élément de réponse ERE sur le promoteur du gène codant pour le SDC-1 (Hinkes et al., 1993; Vihinen et al., 1996), nous avons montré l'importance de l'activation des effets transcriptionnels d'ER $\alpha$  dans l'inhibition de l'expression du SDC-1, laquelle se trouve réduite par le tamoxifène. En effet, son utilisation empêche l'activation du domaine AF-2 prévenant, ainsi, le recrutement de co-activateurs transcriptionnels essentiels à l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle (Brzozowski et al., 1997; Hall and McDonnell, 2005; Shang et al., 2000). Nos résultats suggèrent que ces effets transcriptionnels soient nécessaires à la synthèse d'un intermédiaire protéique lequel serait impliqué dans la répression transcriptionnelle du SDC-1 ou dans l'augmentation du turn-over du transcrit codant pour celui-ci (diminution de la demi-vie).

La répression œstrogéno-dépendante des gènes passe soit par une déstabilisation de la machinerie transcriptionnelle (recrutement de co-répresseurs), par une synthèse de mi-RNA (Frasor et al., 2003; Klinge, 2015) ou par la compétition qui s'exerce entre les différents récepteurs nucléaires pour interagir et recruter les différents co-activateurs nécessaires à l'assemblage du complexe initiateur de la transcription.

Plusieurs données bibliographiques suggèrent que le SDC-1 puisse être régulé par ER $\alpha$  de façon indépendante de la synthèse *de novo* d'un intermédiaire protéique. En effet, il a été montré que le récepteur ER $\alpha$  inhibe les effets transcriptionnels du facteur de transcription PPAR $\gamma$  en l'empêchant de recruter des co-activateurs transcriptionnels (Jeong and Yoon, 2011). Ainsi l'activation de la signalisation œstrogénique pourrait empêcher la formation du complexe transcriptionnel suite à la liaison de PPAR $\gamma$  avec l'élément de réponse PPRE, présent sur le promoteur du SDC-1, lequel est composé de deux séquences DR-1 (Direct Repeat 1) (Sun et al., 2008).

La signalisation œstrogénique peut aussi servir de relais à d'autres signalisations, comme celle initiée par le farnesol. Le récepteur du farnesol peut suite à son activation, lier le demi-élément de réponse DR-1 (Anisfeld et al., 2003) et ainsi, potentiellement, empêcher la liaison de PPARy et l'expression du SDC-1. Il a également été montré que cette signalisation peut induire l'activité des ER permettant ses effets prolifératifs (Journe et al., 2007) et renforçant ainsi l'effet inhibiteur de l'œstradiol sur l'expression du SDC-1. En conséquence dans les cellules ER-, le farnesol n'a pas d'effet prolifératif.

Nos travaux n'ont pas montré l'implication des voies de signalisation ERK1/2, PI3K, PKA et JNK dans l'inhibition E2-dépendente du SDC-1. Inversement le traitement par le Bay, un inhibiteur des kinases IKK empêche les effets inhibiteurs de l'E2 sur l'expression du SDC-1. En effet, la phosphorylation activatrice de la Ser118 présente au niveau du domaine AF-1 d'ER $\alpha$ 66 par IKK $\alpha$  semble nécessaire pour induire la répression liganddépendante du SDC-1. De plus, nos résultats suggèrent que la kinase IKK $\alpha$ , en phosphorylant ER $\alpha$  permettrait de le stabiliser sous forme active et d'empêcher sa dégradation par le protéasome maintenant ainsi l'activité inhibitrice du complexe E2/ER $\alpha$ sur l'expression du SDC-1.

Il a été montré que les cancers ER+/PR+/HER2+ surexprimaient le SDC-1 (Lim et al., 2014). De plus de façon surprenante, nous avons observé que le niveau d'expression basal du SDC-1 dans les cellules MCF7 est supérieur à celui des cellules MDA-MB-231 alors que nous avons clairement mis en évidence que ER $\alpha$  de façon basale ou induite par l'E2 inhibe l'expression du SDC-1. Ces données ont été confirmées par Benad-Meher (Benad-Mehner et al., 2014). Ces résultats peuvent être expliqués par des différences génétiques, en effet nos cellules sont issues de l'épanchement pleural d'une femme caucasienne, alors

que l'étude de Lim a porté sur une population de femme asiatique. De même, les cellules MCF7 sont des cellules décrites comme luminal A alors que les cellules MDA-MB-231 sont décrites comme triples négatives (Neve et al., 2006). Ces dernières ne présentent pas les mêmes capacités invasives, de prolifération et de réponse à l'hormonothérapie, de plus elles possèdent des caractéristiques moléculaires propres.

Bien que participant à la carcinogenèse mammaire, l'utilisation du SDC-1 comme marqueur pronostic dans le cancer du sein se révèle complexe et soumise à discussion. En effet dans le cancer du sein, il est à la fois décrit comme un facteur de mauvais pronostic quand il est surexprimé (Lendorf et al., 2011; Stanley et al., 1999) mais aussi de bon pronostic quand celui-ci est exprimé à la membrane des cellules tumorales (Loussouarn et al., 2008). Ces résultats à priori paradoxaux, trouvent leur explication dans la localisation tissulaire du syndécane-1 laquelle induit des effets spécifiques sur le comportement cellulaire et la progression tumorale. (Tiemann et al. 2014). La conversion du SDC-1 d'une forme liée à la membrane en une molécule soluble marque le passage d'un phénotype prolifératif à un phénotype invasif (Nikolova et al., 2009).

Même si le SDC-1 apparaît difficilement utilisable comme facteur pronostic dans les carcinomes mammaires, il est cependant utilisé en routine comme marqueur diagnostic du myélome multiple (Wijdenes et al., 1996). Dans le myélome, l'augmentation de l'expression du syndécane-1 est associée à une augmentation de son clivage protéolytique. Ainsi, le SDC-1 clivé peut être dosé par test ELISA à la suite d'un prélèvement sanguin (Seidel et al., 2000). Les patients présentant une forte expression d'HPSE, laquelle favorise le clivage de l'ectodomaine, ont une survie abaissée par rapport à ceux l'exprimant plus faiblement (Mahtouk et al., 2007a). L'HPSE est associée à une augmentation de la formation de métastases osseuses et de l'angiogenèse (Kelly et al., 2003; Yang et al., 2005).

Comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe précédent, le rôle du SDC-1 dans le cancer du sein est étroitement lié à sa localisation cellulaire, son clivage protéolytique luimême dépendant de l'expression et de l'activité de l'HPSE, et des métalloprotéases. Au vu de l'importance de la signalisation œstrogénique dans la régulation transcriptionnelle du SDC-1, il était essentiel de mieux comprendre les effets des œstrogènes sur les mécanismes de régulation post-traductionnels pouvant affecter le métabolisme du SDC-1. Nos résultats préliminaires associés aux données bibliographiques suggèrent que l'E2 puisse augmenter le clivage protéolytique du SDC-1. Bien que nous n'ayons pas clairement mis une évidence une augmentation de l'expression génique de l'HPSE et de sa maturation protéique.

L'un des objectifs de ces travaux de thèse était d'identifier les conséquences d'une modification de l'expression du SDC-1 sur la signalisation œstrogénique et sur les processus œstrogéno-induits dont la prolifération. Nos résultats montrent que dans les cellules où le niveau d'expression du SDC-1 est artificiellement augmenté, la croissance cellulaire en réponse à une stimulation par l'E2 est réduite. Inversement, la perte d'expression du SDC-1 s'accompagne d'une augmentation de la prolifération œstrogénoinduite. Cette baisse de sensibilité à l'œstradiol, observée dans le modèle de surexpression est imputable ni à une diminution de l'expression des récepteurs ER $\alpha$ , ni à une baisse de leur capacité à s'activer en réponse à l'œstradiol. Par contre, en présence d'E2, dans les cellules surexprimant le SDC-1, nous avons observé une diminution de la localisation nucléaire d'Er $\alpha$ .

Cette rétention du récepteur ER $\alpha$  à l'extérieur du noyau suggère que le SDC-1 peut altérer sa navette nucléo-cytoplasmique (Tecalco-Cruz et al., 2017). Il a été mis en évidence une colocalisation du SDC-1 et d'ER $\alpha$  par microscopie confocale laquelle a pu être vérifiée en microscopie électronique à transmission, technique beaucoup plus résolutive (<nanomètre). Les résultats de ce travail suggèrent que le SDC-1 pourrait empêcher les effets transcriptionnels des ER en prévenant leur interaction avec l'ADN ou avec les facteurs de transcription. Cependant, nous ne montrons pas de modification d'expression des gènes œstrogéno-régulés, étudiés dans ce travail, suggérant ainsi que la surexpression du SDC-1 ne modifie pas la signalisation œstrogénique par les voies génomiques.

Les effets d'une dérégulation de l'expression du syndécane-1 ne sont pas limités aux récepteurs de surface cellulaire, mais influencent aussi leurs effecteurs en aval. Ainsi, les modifications d'expression du syndécane-1 s'accompagnent d'une dérégulation des voies ERK/MAPK, PI3K/Akt ou p38/MAPK impliquées dans la régulation du cycle et de la survie cellulaire (Szatmari et al. 2012).

Dans les cellules myélomateuses, la surexpression du SDC-1 induit une dérégulation des voies kinasiques en liant via ses chaines d'HS différents ligands, dont l'AREG, l'HB-EGF ou le NRG1. Le SDC-1 peut ainsi leur servir de corécepteur et faciliter ainsi l'activation des voies kinasiques associées (MAPK) (Mahtouk et al., 2007a, 2007b). Il a également été montré que l'œstradiol pouvait, via des effets à court terme passant par le récepteur GPER, augmenter la libération de l'HB-EGF (Biscardi et al., 1999; Filardo et al., 2000; Quinn et al., 2009). Ainsi, sur des temps courts l'œstradiol et le SDC-1 pourraient avoir des effets synergiques sur l'activation des voies kinasiques.

Les études réalisées sur le cancer du sein montrent que le niveau d'expression du SDC-1 apparaît associé à une chimiorésistance (Barbareschi et al., 2003; Götte et al., 2006). Ainsi son ciblage pourrait améliorer la réponse à la chimiothérapie. De plus, il a été montré dans les tumeurs exprimant fortement le SDC-1 une corrélation inverse avec l'expression des récepteurs aux œstrogènes (Barbareschi et al., 2003; Leivonen et al., 2004). Nous montrons dans ces travaux de thèse que l'altération de l'expression du SDC-1 ne modifie pas le niveau d'expression génique et protéique d'ER $\alpha$  dans les cellules MCF7. Cependant, dans ces cellules la présence de ces récepteurs était nécessaire à l'inhibition de l'expression du SDC-1.

Il a été mis en évidence dans les cellules cancéreuses ER(+) que le miR-10b, ciblant le messager codant pour le SDC-1 (Ibrahim et al., 2014), induit une résistance au tamoxifène et est associé à une augmentation des capacités invasives des cellules (Ahmad et al., 2015).

Dans le myélome multiple, de nombreuses études ont montré les effets bénéfiques d'un anticorps monoclonal dirigé contre le SDC-1 (Ikeda et al., 2009; Schönfeld et al., 2017). Cet anticorps appelé indatuximab ravtansine (BT062) couplé à un agent cytotoxique (maytansinoid DM4) peut être internalisé dans la cellule suite à sa liaison au SDC-1. Dans la cellule de myélome, le DM4 induit l'arrêt de la prolifération cellulaire et leur apoptose (Ikeda et al., 2009). Ainsi 56 % des patients porteurs d'un myélome multiple récidivant ou réfractaire traités par cet anticorps présentent un arrêt de la progression tumorale (Heffner et al., 2012). De plus, les effets bénéfiques de cet anticorps peuvent être amplifiés par sa combinaison avec le lénalidomide et la dexaméthasone (ORR à 78 %) (Kelly et al., 2014).

Il pourrait être intéressant de vérifier si les effets inhibiteurs des œstrogènes sur l'expression du SDC-1 observé dans les cellules de carcinome mammaire ou les conséquences de la dérégulation du SDC-1 sont transposables à d'autres cancers œstrogéno-dépendants tels que les cancers gynécologiques (endomètre, ovaires), mais également aux cancers du poumon, colorectal ou de la prostate. Les travaux récents, auxquels j'ai participé montre que dans le modèle de tumeur de la granulosa humaine (cellules KGN), la surexpression du SDC-1 s'accompagne entre autres d'une réduction de la croissance cellulaire et surtout d'un effondrement de la production d'œstrogènes (Colombe et al., 2017). De plus, l'expression génique du récepteur ER $\beta$  est aussi fortement réduite confirmant un lien privilégié entre la signalisation œstrogénique et le SDC-1.

Dans le colon, la perte d'expression d'ER $\beta$  qui exerce un effet anti-inflammatoire, proapoptique et s'oppose à la prolifération est ainsi associée à la carcinogenèse (Caiazza et al., 2015). Il apparaît également que le niveau d'expression du SDC-1 est réduit dans le carcinome colorectal (Day et al., 1999) pouvant suggérer un lien entre la perte d'ER $\beta$ dans ces cellules et la réduction du SDC-1. Dans le modèle pulmonaire, les formes de mésothélium pleural malin les plus agressives présentent un niveau d'expression du syndécane-1 et d'ER $\beta$  (Pinton et al., 2009) fortement réduits suggérant que la perte du phénotype épithélial et l'agressivité des tumeurs pourraient être liées à la dérégulation d'une boucle de contrôle entre ER et syndécane-1.

# Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette thèse démontrent l'existence d'un dialogue entre la signalisation œstrogénique et l'axe syndécane-1/héparanase lequel pourrait influencer l'orientation phénotypique des cellules de carcinome mammaire. Ces résultats apportent des éléments concrets pour comprendre à la fois la corrélation entre la perte d'expression d'ERa et l'augmentation du SDC-1, tous deux facteurs de mauvais pronostic, et la surexpression du SDC-1 dans les tumeurs mammaires ER(-) n'exprimant pas  $ER\alpha 66$ . De plus, nos travaux suggèrent que le caractère agressif des tumeurs récidivantes, résistant à l'hormonothérapie, puisse être consécutif à une surexpression du SDC-1. En effet, le SDC-1 régule de nombreux processus cellulaires, responsables de la progression tumorale, tels que la prolifération, la migration ou l'angiogenèse. De par la présence de chaines d'HS et de sa localisation transmembranaire, le SDC-1 capte les signaux émis par le microenvironnement cellulaire et les intègre. Le SDC-1 influence ainsi l'organisation du cytosquelette, les voies de signalisation kinasiques pouvant permettre in fine la régulation de l'expression génique. De façon remarquable, les œstrogènes et leur récepteur ERa utilisent un mécanisme similaire au SDC-1 pour médier leurs effets tumorigéniques. Ainsi, si le blocage de la signalisation œstrogénique dans les tumeurs mammaires ER(+) est une approche thérapeutique validée, la dérégulation du métabolisme du SDC-1 (synthèse, maturation post-traductionnelle (shedding), dégradation) pourrait être une alternative pour les tumeurs ER(+) résistantes aux thérapies hormonales et les sous-types ER(-).

# Bibliographie

Abboud-Jarrous, G., Atzmon, R., Peretz, T., Palermo, C., Gadea, B.B., Joyce, J.A., and Vlodavsky, I. (2008). Cathepsin L is responsible for processing and activation of proheparanase through multiple cleavages of a linker segment. J. Biol. Chem. 283, 18167–18176.

Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalance, A., Visca, P., and Marino, M. (2005). Palmitoylation-dependent estrogen receptor  $\alpha$  membrane localization: regulation by 17 $\beta$ -estradiol. Mol. Biol. Cell *16*, 231–237.

Adams, J.C., Kureishy, N., and Taylor, A.L. (2001). A role for syndecan-1 in coupling fascin spike formation by thrombospondin-1. J. Cell Biol. *152*, 1169–1182.

Afratis, N.A., Bouris, P., Skandalis, S.S., Multhaupt, H.A., Couchman, J.R., Theocharis, A.D., and Karamanos, N.K. (2017). IGF-IR cooperates with ER $\alpha$  to inhibit breast cancer cell aggressiveness by regulating the expression and localisation of ECM molecules. Sci. Rep. 7, srep40138.

Ahmad, A., Ginnebaugh, K.R., Yin, S., Bollig-Fischer, A., Reddy, K.B., and Sarkar, F.H. (2015). Functional role of miR-10b in tamoxifen resistance of ER-positive breast cancer cells through down-regulation of HDAC4. BMC Cancer *15*, 540.

Akl, M.R., Nagpal, P., Ayoub, N.M., Prabhu, S.A., Gliksman, M., Tai, B., Hatipoglu, A., Goy, A., and Suh, K.S. (2015). Molecular and clinical profiles of syndecan-1 in solid and hematological cancer for prognosis and precision medicine. Oncotarget *6*, 28693.

Albanito, L., Madeo, A., Lappano, R., Vivacqua, A., Rago, V., Carpino, A., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R., Musti, A.M., Andò, S., et al. (2007). G Protein–Coupled Receptor 30 (GPR30) Mediates gene expression changes and growth response to  $17\beta$ -estradiol and selective GPR30 Ligand G-1 in ovarian cancer cells. Cancer Res. *67*, 1859–1866.

Albrechtsen, R., Nielsen, M., Wewer, U., Engvall, E., and Ruoslahti, E. (1981). Basement membrane changes in breast cancer detected by immunohistochemical staining for laminin. Cancer Res. *41*, 5076–5081.

Alexander, C.M., Reichsman, F., Hinkes, M.T., Lincecum, J., Becker, K.A., Cumberledge, S., and Bernfield, M. (2000). Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. Nat. Genet. *25*, 329–332.

Altchek, A., Deligdisch, L., and Kase, N. (2003). Diagnosis and management of ovarian disorders (Academic Press).

Altemeier, W.A., Schlesinger, S.Y., Buell, C.A., Parks, W.C., and Chen, P. (2012). Syndecan-1 controls cell migration by activating Rap1 to regulate focal adhesion disassembly. J. Cell Sci. *125*, 5188–5195.

Anisfeld, A.M., Kast-Woelbern, H.R., Meyer, M.E., Jones, S.A., Zhang, Y., Williams, K.J., Willson, T., and Edwards, P.A. (2003). Syndecan-1 expression is regulated in an isoform-specific manner by the farnesoid-x receptor. J. Biol. Chem. *278*, 20420–20428.

Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M., and Meltzer, P.S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. Science 277, 965–968.

Applanat, M.P., Buteau-Lozano, H., Herve, M.A., and Corpet, A. (2008). Vascular endothelial growth factor is a target gene for estrogen receptor and contributes to breast cancer progression. Adv. Exp. Med. Biol. *617*, 437–444.

Arnold, S.F., Obourn, J.D., Jaffe, H., and Notides, A.C. (1994). Serine 167 is the major estradiolinduced phosphorylation site on the human estrogen receptor. Mol. Endocrinol. *8*, 1208–1214.

Arnold, S.F., Vorojeikina, D.P., and Notides, A.C. (1995). Phosphorylation of tyrosine 537 on the human estrogen receptor is required for binding to an estrogen response element. J. Biol. Chem. *270*, 30205–30212.

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

Baba, F., Swartz, K., van Buren, R., Eickhoff, J., Zhang, Y., Wolberg, W., and Friedl, A. (2006). Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype. Breast Cancer Res. Treat. *98*, 91–98.

Barbareschi, M., Maisonneuve, P., Aldovini, D., Cangi, M.G., Pecciarini, L., Angelo Mauri, F., Veronese, S., Caffo, O., Lucenti, A., Palma, P.D., et al. (2003). High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. Cancer *98*, 474–483.

Barrett, P.J., Song, Y., Van Horn, W.D., Hustedt, E.J., Schafer, J.M., Hadziselimovic, A., Beel, A.J., and Sanders, C.R. (2012). The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. Science *336*, 1168–1171.

Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and García De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. Nat. Cell Biol. *2*, 84–89.

Baumgarten, S.C., and Frasor, J. (2012). Minireview: Inflammation: an instigator of more aggressive estrogen receptor (ER) positive breast cancers. Mol. Endocrinol. *26*, 360–371.

Bautista, S., Vallès, H., Walker, R.L., Anzick, S., Zeillinger, R., Meltzer, P., and Theillet, C. (1998). In breast cancer, amplification of the steroid receptor coactivator gene AIB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity. Clin. Cancer Res. *4*, 2925–2929.

Beauvais, D.M. (2004). The syndecan-1 ectodomain regulates  $\alpha\nu\beta3$  integrin activity in human mammary carcinoma cells. J. Cell Biol. *167*, 171–181.

Beauvais, D.M., and Rapraeger, A.C. (2010). Syndecan-1 couples the insulin-like growth factor-1 receptor to inside-out integrin activation. J. Cell Sci. *123*, 3796–3807.

Beauvais, D.M., Ell, B.J., McWhorter, A.R., and Rapraeger, A.C. (2009). Syndecan-1 regulates  $\alpha\nu\beta3$  and  $\alpha\nu\beta5$  integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor. J. Exp. Med. 206, 691–705.

Benad-Mehner, P., Thiele, S., Rachner, T.D., Göbel, A., Rauner, M., and Hofbauer, L.C. (2014). Targeting syndecan-1 in breast cancer inhibits osteoclast functions through up-regulation of osteoprotegerin. J. Bone Oncol. *3*, 18–24.

Benecke, A., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (2000). Synergy between estrogen receptor  $\alpha$  activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. EMBO Rep. *1*, 151–157.

Ben-Zaken, O., Gingis-Velitski, S., Vlodavsky, I., and Ilan, N. (2007). Heparanase induces Akt phosphorylation via a lipid raft receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. *361*, 829–834.

Bernfield, M., and Sanderson, R.D. (1990). Syndecan, a developmentally regulated cell surface proteoglycan that binds extracellular matrix and growth factors. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. *327*, 171–186.

Bernfield, M., Götte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. Annu. Rev. Biochem. *68*, 729–777.

Berry, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1990). Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. EMBO J. *9*, 2811–2818.

Binder-Foucard, F., Belot, A., Delafosse, P., Remontet, L., Woronoff, A., and Bossard, N. (2013). Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 – Tumeurs solides. (Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire).

Binder-Foucard, F., Bossard, N., Delafosse, P., Belot, A., Woronoff, A.-S., and Remontet, L. (2014). Cancer incidence and mortality in France over the 1980–2012 period: Solid tumors. Rev. Épidémiol. Santé Publique *62*, 95–108.

Biscardi, J.S., Maa, M.-C., Tice, D.A., Cox, M.E., Leu, T.-H., and Parsons, S.J. (1999). c-Srcmediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. J. Biol. Chem. 274, 8335–8343.

Björnström, L., and Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. Mol. Endocrinol. *19*, 833–842.

Bolós, V., Peinado, H., Pérez-Moreno, M.A., Fraga, M.F., Esteller, M., and Cano, A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. J. Cell Sci. *116*, 499–511.

Bouris, P., Skandalis, S.S., Piperigkou, Z., Afratis, N., Karamanou, K., Aletras, A.J., Moustakas, A., Theocharis, A.D., and Karamanos, N.K. (2015). Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. Matrix Biol.

Britt, K., Ashworth, A., and Smalley, M. (2007). Pregnancy and the risk of breast cancer. Endocr. Relat. Cancer 14, 907–933.

Brockstedt, U., Dobra, K., Nurminen, M., and Hjerpe, A. (2002). Immunoreactivity to cell surface syndecans in cytoplasm and nucleus: tubulin-dependent rearrangements. Exp. Cell Res. 274, 235–245.

Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engström, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. Nature *389*, 753–758.

Buczek-Thomas, J.A., Hsia, E., Rich, C.B., Foster, J.A., and Nugent, M.A. (2008). Inhibition of histone acetyltransferase by glycosaminoglycans. J. Cell. Biochem. *105*, 108–120.

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

Burns, K.A., Li, Y., Arao, Y., Petrovich, R.M., and Korach, K.S. (2011). Selective mutations in estrogen receptor  $\alpha$  D-domain alters nuclear translocation and non-estrogen response element gene regulatory mechanisms. J. Biol. Chem. 286, 12640.

Caiazza, F., Ryan, E.J., Doherty, G., Winter, D.C., and Sheahan, K. (2015). Estrogen receptors and their implications in colorectal carcinogenesis. Front. Oncol. *5*.

Campbell, R.A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N.M., Constantinidou, D., Ali, S., and Nakshatri, H. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. J. Biol. Chem. 276, 9817–9824.

Carey, D.J., Evans, D.M., Stahl, R.C., Asundi, V.K., Conner, K.J., Garbes, P., and Cizmeci-Smith, G. (1992). Molecular cloning and characterization of N-syndecan, a novel transmembrane heparan sulfate proteoglycan. J. Cell Biol. *117*, 191–201.

Carreau, S., and Hess, R.A. (2010). Oestrogens and spermatogenesis. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. *365*, 1517–1535.

Carreau, C., Flouriot, G., Bennetau-Pelissero, C., and Potier, M. (2008). Enterodiol and enterolactone, two major diet-derived polyphenol metabolites have different impact on ER $\alpha$  transcriptional activation in human breast cancer cells. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *110*, 176–185.

Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B., and Bourguiba, S. (2003). Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. Reprod. Biol. Endocrinol. RBE *1*, 35.

Cavailles, V., Dauvois, S., L'Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P.J., and Parker, M.G. (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. EMBO J. *14*, 3741.

Cenni, B., and Picard, D. (1999). Ligand-independent activation of steroid receptors: new roles for old players. Trends Endocrinol. Metab. *10*, 41–46.

Chakravarti, R., and Adams, J.C. (2006). Comparative genomics of the syndecans defines an ancestral genomic context associated with matrilins in vertebrates. BMC Genomics *7*, 83.

Chakravarti, R., Sapountzi, V., and Adams, J.C. (2005). Functional role of syndecan-1 cytoplasmic V region in lamellipodial spreading, actin bundling, and cell migration. Mol. Biol. Cell *16*, 3678–3691.

Chang, C., Norris, J.D., Grøn, H., Paige, L.A., Hamilton, P.T., Kenan, D.J., Fowlkes, D., and McDonnell, D.P. (1999). Dissection of the LXXLL nuclear receptor-coactivator interaction motif using combinatorial peptide libraries: discovery of peptide antagonists of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . Mol. Cell. Biol. *19*, 8226–8239.

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

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

Chen, K., and Williams, K.J. (2013). Molecular mediators for raft-dependent endocytosis of syndecan-1, a highly conserved, multifunctional receptor. J. Biol. Chem. 288, 13988–13999.

Chen, L., and Sanderson, R.D. (2009). Heparanase regulates levels of syndecan-1 in the nucleus. PLoS ONE 4, e4947.

Chen, D., Riedl, T., Washbrook, E., Pace, P.E., Coombes, R.C., Egly, J.M., and Ali, S. (2000). Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIIH and participation of CDK7. Mol. Cell *6*, 127–137.

Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y., and Evans, R.M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. Cell *90*, 569–580.

Chen, S.-J., Luan, J., Zhang, H.-S., Ruan, C.-P., Xu, X.-Y., Li, Q.-Q., and Wang, N.-H. (2012). EGFR-mediated G1/S transition contributes to the multidrug resistance in breast cancer cells. Mol. Biol. Rep. *39*, 5465–5471.

Cheskis, B.J., Greger, J., Cooch, N., McNally, C., Mclarney, S., Lam, H.-S., Rutledge, S., Mekonnen, B., Hauze, D., Nagpal, S., et al. (2008). MNAR plays an important role in ERa activation of Src/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. Steroids *73*, 901–905.

Chow, S.K., Chan, J.Y., and Fung, K.P. (2004). Suppression of cell proliferation and regulation of estrogen receptor alpha signaling pathway by arsenic trioxide on human breast cancer MCF-7 cells. J. Endocrinol. *182*, 325–337.

Claus, E.B., Risch, N., and Thompson, W.D. (1991). Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. Am. J. Hum. Genet. *48*, 232–242.

Cohen, A.R., Wood, D.F., Marfatia, S.M., Walther, Z., Chishti, A.H., and Anderson, J.M. (1998). Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells. J. Cell Biol. *142*, 129–138.

Cohen, I., Pappo, O., Elkin, M., San, T., Bar-Shavit, R., Hazan, R., Peretz, T., Vlodavsky, I., and Abramovitch, R. (2006). Heparanase promotes growth, angiogenesis and survival of primary breast tumors. Int. J. Cancer *118*, 1609–1617.

Cohen, I., Maly, B., Simon, I., Meirovitz, A., Pikarsky, E., Zcharia, E., Peretz, T., Vlodavsky, I., and Elkin, M. (2007). Tamoxifen induces heparanase expression in estrogen receptor–positive breast cancer. Clin. Cancer Res. *13*, 4069–4077.

Cohen-Kaplan, V., Doweck, I., Naroditsky, I., Vlodavsky, I., and Ilan, N. (2008). Heparanase augments epidermal growth factor receptor phosphorylation: correlation with head and neck tumor progression. Cancer Res. *68*, 10077–10085.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2001). Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. Lancet Lond. Engl. *358*, 1389–1399.

Colombe, S., Houllier, L., Fleurot, E., Levallet, G., Benhaïm, A., Bonnamy, P.-J., and Levallet, J. (2017). Syndecan 1 represses cell growth and FSH responsiveness in human granulosa cells. Reprod. Camb. Engl. *153*, 797–808.

Conley, A. (2001). Mammalian aromatases. Reproduction 121, 685–695.

Cook, D.M., Hinkes, M.T., Bernfield, M., and Rauscher, F.J. (1996). Transcriptional activation of the syndecan-1 promoter by the Wilms' tumor protein WT1. Oncogene *13*, 1789–1799.

Couchman, J.R. (2010). Transmembrane Signaling Proteoglycans. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 26, 89–114.

Couse, J.F., and Korach, K.S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? Endocr. Rev. 20, 358–417.

Cowley, S.M., and Parker, M.G. (1999). A comparison of transcriptional activation by ER $\alpha$  and ER $\beta$ . J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *69*, 165–175.

Cowley, S.M., Hoare, S., Mosselman, S., and Parker, M.G. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  form heterodimers on DNA.

Cowppli-Bony, A., Uhry, Z., Remontet, L., Guizard, A.-V., Voirin, N., Monnereau, A., Bouvier, A.-M., Colonna, M., Bossard, N., Woronoff, A.-S., et al. (2016). Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine, 1989-2013. Partie 1 – Tumeurs solides (Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire).

Cui, J., Shen, Y., and Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. Trends Mol. Med. *19*, 197–209.

Dauvois, S., White, R., and Parker, M.G. (1993). The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. J. Cell Sci. *106*, 1377–1388.

David, G., van der Schueren, B., Marynen, P., Cassiman, J.-J., and Van den Berghe, H. (1992). Molecular cloning of amphiglycan, a novel integral membrane heparan sulfate proteoglycan expressed by epithelial and fibroblastic cells. J. Cell Biol. *118*, 961–969.

Davies, M.P.A., O'Neill, P.A., Innes, H., Sibson, D.R., Prime, W., Holcombe, C., and Foster, C.S. (2004). Correlation of mRNA for oestrogen receptor beta splice variants  $ER\beta1$ ,  $ER\beta2/ER\betacx$  and  $ER\beta5$  with outcome in endocrine-treated breast cancer. J. Mol. Endocrinol. *33*, 773–782.

Day, R.M., Hao, X., Ilyas, M., Daszak, P., Talbot, I.C., and Forbes, A. (1999). Changes in the expression of syndecan-1 in the colorectal adenoma–carcinoma sequence. Virchows Arch. 434, 121–125.

Deblois, G., and Giguère, V. (2003). Ligand-independent coactivation of ERalpha AF-1 by steroid receptor RNA activator (SRA) via MAPK activation. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *85*, 123–131.

Delaunay, F., Pettersson, K., Tujague, M., and Gustafsson, J.A. (2000). Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. Mol. Pharmacol. *58*, 584–590.

DeSantis, C., Siegel, R., Bandi, P., and Jemal, A. (2011). Breast cancer statistics, 2011. CA. Cancer J. Clin. *61*, 408–418.

Dews, I.C., and MacKenzie, K.R. (2007). Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. *104*, 20782–20787.

Díaz, J., Mendoza, P., Silva, P., Quest, A.F., and Torres, V.A. (2014). A novel caveolin-1/p85α/Rab5/Tiam1/Rac1 signaling axis in tumor cell migration and invasion. Commun. Integr. Biol. 7.

Ding, K., Lopez-Burks, M., Sánchez-Duran, J.A., Korc, M., and Lander, A.D. (2005). Growth factorinduced shedding of syndecan-1 confers glypican-1 dependence on mitogenic responses of cancer cells. J. Cell Biol. *171*, 729–738.

Dong, J., Kukula, A.K., Toyoshima, M., and Nakajima, M. (2000). Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene. Gene 253, 171–178.

Eckert, R.L., Mullick, A., Rorke, E.A., and Katzenellenbogen, B.S. (1984). Estrogen receptor synthesis and turnover in MCF-7 breast cancer cells measured by a density shift technique. Endocrinology *114*, 629–637.

Edge, S.B., and Compton, C.C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Ann. Surg. Oncol. *17*, 1471–1474.

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

Elenius, K., Vainio, S., Laato, M., Salmivirta, M., Thesleff, I., and Jalkanen, M. (1991). Induced expression of syndecan in healing wounds. J. Cell Biol. *114*, 585–595.

Elkin, M., Cohen, I., Zcharia, E., Orgel, A., Guatta-Rangini, Z., Peretz, T., Vlodavsky, I., and Kleinman, H.K. (2003). Regulation of heparanase gene expression by estrogen in breast cancer. Cancer Res. *63*, 8821–8826.

Endo, K., Takino, T., Miyamori, H., Kinsen, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M., and Sato, H. (2003). Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. J. Biol. Chem. 278, 40764–40770.

Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., and Kato, S. (1999). Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. Mol. Cell. Biol. *19*, 5363–5372.

Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M., and Gustafsson, J.A. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. J. Clin. Endocrinol. Metab. *82*, 4258–4265.

Etique, N., Chardard, D., Chesnel, A., Merlin, J.-L., Flament, S., and Grillier-Vuissoz, I. (2004). Ethanol stimulates proliferation,  $ER\alpha$  and aromatase expression in MCF-7 human breast cancer cells. Int. J. Mol. Med.

Fairbanks, M.B., Mildner, A.M., Leone, J.W., Cavey, G.S., Mathews, W.R., Drong, R.F., Slightom, J.L., Bienkowski, M.J., Smith, C.W., Bannow, C.A., et al. (1999). Processing of the human heparanase precursor and evidence that the active enzyme is a heterodimer. J. Biol. Chem. 274, 29587–29590.

Fawell, S.E., White, R., Hoare, S., Sydenham, M., Page, M., and Parker, M.G. (1990). Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 6883–6887.

Ferguson, J.E., Schor, A.M., Howell, A., and Ferguson, M.W.J. (1990). Tenascin distribution in the normal human breast is altered during the menstrual cycle and in carcinoma. Differentiation *42*, 199–207.

Ferro, V., Dredge, K., Liu, L., Hammond, E., Bytheway, I., Li, C., Johnstone, K., Karoli, T., Davis, K., Copeman, E., et al. (2007). PI-88 and novel heparan sulfate mimetics inhibit angiogenesis. Semin. Thromb. Hemost. *33*, 557–568.

Figueira, R.C., Gomes, L.R., Neto, J.S., Silva, F.C., Silva, I.D., and Sogayar, M.C. (2009). Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. BMC Cancer *9*, 20.

Filardo, E.J. (2017). A role for G-protein coupled estrogen receptor (GPER) in estrogen-induced carcinogenesis: Dysregulated glandular homeostasis, survival and metastasis. J. Steroid Biochem. Mol. Biol.

Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I., and Frackelton, A.R. (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via transactivation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *14*, 1649–1660.

Filardo, E.J., Quinn, J.A., Frackelton, A.R., and Bland, K.I. (2002). Estrogen action via the G proteincoupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *16*, 70–84.

Fitzgerald, M.L., Wang, Z., Park, P.W., Murphy, G., and Bernfield, M. (2000). Shedding of syndecan-1 and-4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3–sensitive metalloproteinase. J. Cell Biol. *148*, 811–824.

Fliss, A.E., Benzeno, S., Rao, J., and Caplan, A.J. (2000). Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *72*, 223–230.

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

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

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

Friel, P.N., Hinchcliffe, C., and Wright, J.V. (2005). Hormone replacement with estradiol: conventional oral doses result in excessive exposure to estrone. Altern Med Rev *10*, 36–41.

Fujii, T., Shimada, K., Tatsumi, Y., Hatakeyama, K., Obayashi, C., Fujimoto, K., and Konishi, N. (2015). microRNA-145 promotes differentiation in human urothelial carcinoma through down-regulation of syndecan-1. BMC Cancer *15*.

Fujita, N., Jaye, D.L., Kajita, M., Geigerman, C., Moreno, C.S., and Wade, P.A. (2003). MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. Cell *113*, 207–219.

Fux, L., Ilan, N., Sanderson, R.D., and Vlodavsky, I. (2009). Heparanase: busy at the cell surface. Trends Biochem. Sci. *34*, 511–519.

Galien, R., and Garcia, T. (1997). Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-κB site. Nucleic Acids Res. *25*, 2424–2429.

Gallo, R.L., Ono, M., Povsic, T., Page, C., Eriksson, E., Klagsbrun, M., and Bernfield, M. (1994). Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. Proc. Natl. Acad. Sci. *91*, 11035–11039.

Gao, W., Yu, Y., Cao, H., Shen, H., Li, X., Pan, S., and Shu, Y. (2010). Deregulated expression of miR-21, miR-143 and miR-181a in non small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis. Biomed. Pharmacother. *64*, 399–408.

García-Becerra, R., Santos, N., Díaz, L., and Camacho, J. (2012). Mechanisms of resistance to endocrine therapy in breast cancer: focus on signaling pathways, miRNAs and genetically based resistance. Int. J. Mol. Sci. *14*, 108–145.

Garvin, S., and Dabrosin, C. (2008). In vivo measurement of tumor estradiol and Vascular Endothelial Growth Factor in breast cancer patients. BMC Cancer *8*, 73.

Geisler, J. (2003). Breast cancer tissue estrogens and their manipulation with aromatase inhibitors and inactivators. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *86*, 245–253.

Germeyer, A., Klinkert, M.S., Huppertz, A.-G., Clausmeyer, S., Popovici, R.M., Strowitzki, T., and von Wolff, M. (2007). Expression of syndecans, cell–cell interaction regulating heparan sulfate proteoglycans, within the human endometrium and their regulation throughout the menstrual cycle. Fertil. Steril. 87, 657–663.

Ginestier, C., Korkaya, H., Dontu, G., Birnbaum, D., Wicha, M.S., and Charafe-Jauffret, E. (2007). La cellule souche cancéreuse: Un pilote aux commandes du cancer du sein. Médecine/Sciences *23*, 1133–1140.

Gingis-Velitski, S., Zetser, A., Kaplan, V., Ben-Zaken, O., Cohen, E., Levy-Adam, F., Bashenko, Y., Flugelman, M.Y., Vlodavsky, I., and Ilan, N. (2004a). Heparanase uptake is mediated by cell membrane heparan sulfate proteoglycans. J. Biol. Chem. *279*, 44084–44092.

Gingis-Velitski, S., Zetser, A., Flugelman, M.Y., Vlodavsky, I., and Ilan, N. (2004b). Heparanase induces endothelial cell migration via protein kinase B/Akt activation. J. Biol. Chem. 279, 23536–23541.

Girault, I., Bièche, I., and Lidereau, R. (2006). Role of estrogen receptor alpha transcriptional coregulators in tamoxifen resistance in breast cancer. Maturitas *54*, 342–351.

Goldberg, R., Meirovitz, A., Hirshoren, N., Bulvik, R., Binder, A., Rubinstein, A.M., and Elkin, M. (2013). Versatile role of heparanase in inflammation. Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol. *32*, 234–240.

Gomes, A.M., Stelling, M.P., and Pavão, M.S.G. (2013). Heparan sulfate and heparanase as modulators of breast cancer progression. BioMed Res. Int. 2013, 1–11.

Gopal, S., Multhaupt, H.A.B., Pocock, R., and Couchman, J.R. (2017). Cell-extracellular matrix and cell-cell adhesion are linked by syndecan-4. Matrix Biol. *60–61*, 57–69.

Gosden, J.R., Middleton, P.G., and Rout, D. (1986). Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome  $6q24 \rightarrow q27$  by in situ hybridization. Cytogenet. Genome Res. 43, 218–220.

Götte, M., Joussen, A.M., Klein, C., Andre, P., Wagner, D.D., Hinkes, M.T., Kirchhof, B., Adamis, A.P., and Bernfield, M. (2002). Role of syndecan-1 in leukocyte-endothelial interactions in the ocular vasculature. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. *43*, 1135–1141.

Götte, M., Kersting, C., Ruggiero, M., Tio, J., Tulusan, A.H., Kiesel, L., and Wülfing, P. (2006). Predictive value of syndecan-1 expression for the response to neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer. Anticancer Res. *26*, 621–627.

Gould, S.E., Upholt, W.B., and Kosher, R.A. (1992). Syndecan 3: a member of the syndecan family of membrane-intercalated proteoglycans that is expressed in high amounts at the onset of chicken limb cartilage differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. *89*, 3271–3275.

Grisouard, J., Medunjanin, S., Hermani, A., Shukla, A., and Mayer, D. (2007). Glycogen synthase kinase-3 protects estrogen receptor alpha from proteasomal degradation and is required for full transcriptional activity of the receptor. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *21*, 2427–2439.

Grootjans, J.J., Zimmermann, P., Reekmans, G., Smets, A., Degeest, G., Dürr, J., and David, G. (1997). Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 13683–13688.

Guiu, S., Michiels, S., André, F., Cortes, J., Denkert, C., Di Leo, A., Hennessy, B.T., Sorlie, T., Sotiriou, C., Turner, N., et al. (2012). Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. 23, 2997–3006.

Guo, T., Yu, W., Lv, S., Zhang, C., and Tian, Y. (2015). MiR-302a inhibits the tumorigenicity of ovarian cancer cells by suppression of SDC1. Int. J. Clin. Exp. Pathol. *8*, 4869.

Guttilla, I.K., Adams, B.D., and White, B.A. (2012). ER $\alpha$ , microRNAs, and the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. Trends Endocrinol. Metab. 23, 73–82.

Hadigal, S.R., Agelidis, A.M., Karasneh, G.A., Antoine, T.E., Yakoub, A.M., Ramani, V.C., Djalilian, A.R., Sanderson, R.D., and Shukla, D. (2015). Heparanase is a host enzyme required for herpes simplex virus-1 release from cells. Nat. Commun. *6*, ncomms7985.

Hall, J.M., and McDonnell, D.P. (2005). Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. Mol. Interv. *5*, 343–357.

Hallberg, G., Andersson, E., Naessén, T., and Ordeberg, G.E. (2010). The expression of syndecan-1, syndecan-4 and decorin in healthy human breast tissue during the menstrual cycle. Reprod. Biol. Endocrinol. 8, 1.

Hammond, E., Khurana, A., Shridhar, V., and Dredge, K. (2014). The role of heparanase and sulfatases in the modification of heparan sulfate proteoglycans within the tumor microenvironment and opportunities for novel cancer therapeutics. Front. Oncol. *4*.

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

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144, 646–674.

Hannafon, B.N., Sebastiani, P., de las Morenas, A., Lu, J., and Rosenberg, C.L. (2011). Expression of microRNA and their gene targets are dysregulated in preinvasive breast cancer. Breast Cancer Res. *13*, R24.

Hassiotou, F., and Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. Clin. Anat. *26*, 29–48.

Hayashi, K., Hayashi, M., Jalkanen, M., Firestone, J.H., Trelstad, R.L., and Bernfield, M. (1987). Immunocytochemistry of cell surface heparan sulfate proteoglycan in mouse tissues. A light and electron microscopic study. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. *35*, 1079–1088.

Hayashida, K., Johnston, D.R., Goldberger, O., and Park, P.W. (2006). Syndecan-1 expression in epithelial cells is induced by transforming growth factor beta through a PKA-dependent pathway. J. Biol. Chem. *281*, 24365–24374.

Hayashida, K., Chen, Y., Bartlett, A.H., and Park, P.W. (2008a). Syndecan-1 is an in vivo suppressor of Gram-positive Toxic Shock. J. Biol. Chem. 283, 19895–19903.

Hayashida, K., Stahl, P.D., and Park, P.W. (2008b). Syndecan-1 ectodomain shedding is regulated by the small GTPase Rab5. J. Biol. Chem. 283, 35435–35444.

HEAL, and CHEM Trust (2008). Facteurs qui influencent le risque de cancer du sein — Facteurs établis et émergents.

Heffner, L.T., Jagannath, S., Zimmerman, T.M., Lee, K.P., Rosenblatt, J., Lonial, S., Lutz, R.J., Czeloth, N., Osterroth, F., Ruehle, M., et al. (2012). BT062, an antibody-drug conjugate directed against CD138, given weekly for 3 weeks in each 4 week cycle: safety and further evidence of clinical activity. Blood *120*, 4042–4042.

Heidari-Hamedani, G., Vivès, R.R., Seffouh, A., Afratis, N.A., Oosterhof, A., van Kuppevelt, T.H., Karamanos, N.K., Metintas, M., Hjerpe, A., Dobra, K., et al. (2015). Syndecan-1 alters heparan sulfate composition and signaling pathways in malignant mesothelioma. Cell. Signal. *27*, 2054–2067.

Henry-Stanley, M.J., Zhang, B., Erlandsen, S.L., and Wells, C.L. (2006). Synergistic effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on enterocyte shedding of syndecan-1 and associated decreases in internalization of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus. Cytokine *34*, 252-259.

Higashiyama, S., Abraham, J.A., and Klagsbrun, M. (1993). Heparin-binding EGF-like growth factor stimulation of smooth muscle cell migration: dependence on interactions with cell surface heparan sulfate. J. Cell Biol. *122*, 933–940.

Hilakivi-Clarke, L. (2000). Estrogens, BRCA1, and breast cancer. Cancer Res. 60, 4993–5001.

Hinkes, M.T., Goldberger, O.A., Neumann, P.E., Kokenyesi, R., and Bernfield, M. (1993). Organization and promoter activity of the mouse syndecan-1 gene. J. Biol. Chem. *268*, 11440–11448.

Holliday, D.L., and Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast Cancer Res. *13*, 215.

Holm, C., Kok, M., Michalides, R., Fles, R., Koornstra, R.H.T., Wesseling, J., Hauptmann, M., Neefjes, J., Peterse, J.L., Stål, O., et al. (2009). Phosphorylation of the oestrogen receptor alpha at serine 305 and prediction of tamoxifen resistance in breast cancer. J. Pathol. *217*, 372–379.

Howell, S.J., Johnston, S.R.D., and Howell, A. (2004). The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *18*, 47–66.

Hsia, E., Richardson, T.P., and Nugent, M.A. (2003). Nuclear localization of basic fibroblast growth factor is mediated by heparan sulfate proteoglycans through protein kinase C signaling. J. Cell. Biochem. *88*, 1214–1225.

Ibrahim, S.A., Yip, G.W., Stock, C., Pan, J.-W., Neubauer, C., Poeter, M., Pupjalis, D., Koo, C.Y., Kelsch, R., Schüle, R., et al. (2012). Targeting of syndecan-1 by microRNA miR-10b promotes breast cancer cell motility and invasiveness via a Rho-GTPase- and E-cadherin-dependent mechanism. Int. J. Cancer *131*, E884–E896.

Ibrahim, S.A., Hassan, H., and Götte, M. (2014). MicroRNA regulation of proteoglycan function in cancer. FEBS J. 281, 5009–5022.

Ignatov, T., Weißenborn, C., Poehlmann, A., Lemke, A., Semczuk, A., Roessner, A., Costa, S.D., Kalinski, T., and Ignatov, A. (2013). GPER-1 expression decreases during breast cancer tumorigenesis. Cancer Invest. *31*, 309–315.

Ikeda, H., Hideshima, T., Fulciniti, M., Lutz, R.J., Yasui, H., Okawa, Y., Kiziltepe, T., Vallet, S., Pozzi, S., Santo, L., et al. (2009). The monoclonal antibody nBT062 conjugated to cytotoxic Maytansinoids has selective cytotoxicity against CD138-positive multiple myeloma cells in vitro and in vivo. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *15*, 4028–4037.

Ingvarsson, S. (1999). Molecular genetics of breast cancer progression. Semin. Cancer Biol. 9, 277–288.

Inki, P. (1997). Expression of syndecan-1 in female reproductive tract tissues and cultured keratinocytes. Mol. Hum. Reprod. *3*, 299–305.

Institut de biologie clinique; Université libre de Bruxelles Fiche Analyse: oestrone - oestradiol. (http://www.ulb-ibc.be)

Insua-Rodríguez, J., and Oskarsson, T. (2016). The extracellular matrix in breast cancer. Adv. Drug Deliv. Rev. 97, 41–55.
Ioachim, E., Charchanti, A., Briasoulis, E., Karavasilis, V., Tsanou, H., Arvanitis, D.L., Agnantis, N.J., and Pavlidis, N. (2002). Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. Eur. J. Cancer *38*, 2362–2370.

Ishihara, M., Fedarko, N.S., and Conrad, H.E. (1986). Transport of heparan sulfate into the nuclei of hepatocytes. J. Biol. Chem. *261*, 13575–13580.

Jaakkola, P., Vihinen, T., Määttä, A., and Jalkanen, M. (1997). Activation of an enhancer on the syndecan-1 gene is restricted to fibroblast growth factor family members in mesenchymal cells. Mol. Cell. Biol. *17*, 3210–3219.

Jaakkola, P., Määttä, A., and Jalkanen, M. (1998). The activation and composition of FiRE (an FGFinducible response element) differ in a cell type- and growth factor-specific manner. Oncogene *17*, 1279–1286.

Jakacka, M., Ito, M., Weiss, J., Chien, P.-Y., Gehm, B.D., and Jameson, J.L. (2001). Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway. J. Biol. Chem. 276, 13615–13621.

Jeong, S., and Yoon, M. (2011). 17 $\beta$ -Estradiol inhibition of PPAR $\gamma$ -induced adipogenesis and adipocyte-specific gene expression. Acta Pharmacol. Sin. 32, 230–238.

Jiang, S.Y., and Jordan, V.C. (1992). Growth regulation of estrogen receptor-negative breast cancer cells transfected with complementary DNAs for estrogen receptor. J. Natl. Cancer Inst. *84*, 580–591.

Jiang, P., Kumar, A., Parrillo, J.E., Dempsey, L.A., Platt, J.L., Prinz, R.A., and Xu, X. (2002). Cloning and characterization of the human heparanase-1 (HPR1) gene promoter: role of GA-binding protein and Sp1 in regulating HPR1 basal promoter activity. J. Biol. Chem. 277, 8989–8998.

Joel, P.B., Smith, J., Sturgill, T.W., Fisher, T.L., Blenis, J., and Lannigan, D.A. (1998). pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. Mol. Cell. Biol. *18*, 1978–1984.

Johnson, A.B., and O'Malley, B.W. (2012). Steroid receptor coactivators 1, 2, and 3: Critical regulators of nuclear receptor activity and steroid receptor modulator (SRM)-based cancer therapy. Mol. Cell. Endocrinol. *348*, 430–439.

Jordan, V.C., Gapstur, S., and Morrow, M. (2001). Selective estrogen receptor modulation and reduction in risk of breast cancer, osteoporosis, and coronary heart disease. J. Natl. Cancer Inst. *93*, 1449–1457.

Journe, F., Laurent, G., Chaboteaux, C., Nonclercq, D., Durbecq, V., Larsimont, D., and Body, J.-J. (2007). Farnesol, a mevalonate pathway intermediate, stimulates MCF-7 breast cancer cell growth through farnesoid-X-receptor-mediated estrogen receptor activation. Breast Cancer Res. Treat. *107*, 49–61.

Jung, O., Trapp-Stamborski, V., Purushothaman, A., Jin, H., Wang, H., Sanderson, R.D., and Rapraeger, A.C. (2016). Heparanase-induced shedding of syndecan-1/CD138 in myeloma and endothelial cells activates VEGFR2 and an invasive phenotype: prevention by novel synstatins. Oncogenesis *5*, e202.

Kato, M., Wang, H., Kainulainen, V., Fitzgerald, M.L., Ledbetter, S., Ornitz, D.M., and Bernfield, M. (1998). Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2. Nat. Med. *4*, 691–697.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., et al. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. Science 270, 1491–1494.

Katz, A., Van-Dijk, D.J., Aingorn, H., Erman, A., Davies, M., Darmon, D., Hurvitz, H., and Vlodavsky, I. (2002). Involvement of human heparanase in the pathogenesis of diabetic nephropathy. Isr. Med. Assoc. J. IMAJ *4*, 996–1002.

Kawai, H., Li, H., Avraham, S., Jiang, S., and Avraham, H.K. (2003). Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor  $\alpha$ . Int. J. Cancer *107*, 353–358.

Kazi, A.A., and Koos, R.D. (2007). Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor- $1\alpha$ , vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. Endocrinology *148*, 2363–2374.

Kelly, K.R., Chanan-Khan, A., Heffner, L.T., Somlo, G., Siegel, D.S., Zimmerman, T., Karnad, A., Munshi, N.C., Jagannath, S., Greenberg, A.L., et al. (2014). Indatuximab ravtansine (BT062) in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma: clinical activity in patients already exposed to lenalidomide and bortezomib. Blood *124*, 4736–4736.

Kelly, T., Miao, H.-Q., Yang, Y., Navarro, E., Kussie, P., Huang, Y., MacLeod, V., Casciano, J., Joseph, L., Zhan, F., et al. (2003). High heparanase activity in multiple myeloma is associated with elevated microvessel density. Cancer Res. *63*, 8749–8756.

Khasraw, M., Pavlakis, N., McCowatt, S., Underhill, C., Begbie, S., de Souza, P., Boyce, A., Parnis, F., Lim, V., Harvie, R., et al. (2010). Multicentre phase I/II study of PI-88, a heparanase inhibitor in combination with docetaxel in patients with metastatic castrate-resistant prostate cancer. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *21*, 1302–1307.

Kim, C., Wilcox-Adelman, S., Sano, Y., Tang, W.-J., Collier, R.J., and Park, J.M. (2008). Antiinflammatory cAMP signaling and cell migration genes co-opted by the anthrax bacillus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 6150–6155.

Kim, C.W., Goldberger, O.A., Gallo, R.L., and Bernfield, M. (1994). Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. Mol. Biol. Cell *5*, 797–805.

Kim, H.P., Lee, J.Y., Jeong, J.K., Bae, S.W., Lee, H.K., and Jo, I. (1999). Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. Biochem. Biophys. Res. Commun. *263*, 257–262.

Kim, K., Thu, N., Saville, B., and Safe, S. (2003). Domains of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) required for ER $\alpha$ /Sp1-mediated activation of GC-rich promoters by estrogens and antiestrogens in breast cancer cells. Mol. Endocrinol. *17*, 804–817.

King, W.J., and Greene, G.L. (1984). Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. Nature *307*, 745–747.

Kliment, C.R., Englert, J.M., Gochuico, B.R., Yu, G., Kaminski, N., Rosas, I., and Oury, T.D. (2009). Oxidative stress alters syndecan-1 distribution in lungs with pulmonary fibrosis. J. Biol. Chem. 284, 3537–3545.

Klinge, C.M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. Nucleic Acids Res. 29, 2905–2919.

Klinge, C.M. (2015). miRNAs regulated by estrogens, tamoxifen, and endocrine disruptors and their downstream gene targets. Mol. Cell. Endocrinol. *418*, 273–297.

Knelson, E.H., Nee, J.C., and Blobe, G.C. (2014). Heparan sulfate signaling in cancer. Trends Biochem. Sci. 39, 277–288.

Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., and Kato, S. (2000). p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the N-terminal A/B domains. J. Biol. Chem. 275, 15645–15651.

Koda, J.E., Rapraeger, A., and Bernfield, M. (1985). Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Cell surface proteoglycan as a receptor for interstitial collagens. J. Biol. Chem. *260*, 8157–8162.

Köhrmann, A., Kammerer, U., Kapp, M., Dietl, J., and Anacker, J. (2009). Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. BMC Cancer *9*, 188.

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

Kojima, T., Shworak, N.W., and Rosenberg, R.D. (1992). Molecular cloning and expression of two distinct cDNA-encoding heparan sulfate proteoglycan core proteins from a rat endothelial cell line. J. Biol. Chem. 267, 4870–4877.

Kokenyesi, R., and Bernfield, M. (1994). Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1. J. Biol. Chem. 269, 12304–12309.

Kouros-Mehr, H., Slorach, E.M., Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2006). GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. Cell *127*, 1041–1055.

Kousidou, O.C., Roussidis, A.E., Theocharis, A.D., and Karamanos, N.K. (2004). Expression of MMPs and TIMPs genes in human breast cancer epithelial cells depends on cell culture conditions and is associated with their invasive potential. Anticancer Res. *24*, 4025–4030.

Kovalszky, I., Dudás, J., Oláh-Nagy, J., Pogány, G., Töváry, J., Timár, J., Kopper, L., Jeney, A., and Iozzo, R.V. (1998). Inhibition of DNA topoisomerase I activity by heparan sulfate and modulation by basic fibroblast growth factor. Mol. Cell. Biochem. *183*, 11–23.

Kovalszky, I., Hjerpe, A., and Dobra, K. (2014). Nuclear translocation of heparan sulfate proteoglycans and their functional significance. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. *1840*, 2491–2497.

Kraus, W.L., McInerney, E.M., and Katzenellenbogen, B.S. (1995). Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 12314–12318.

Kreuger, J., and Kjellén, L. (2012). Heparan sulfate biosynthesis. J. Histochem. Cytochem. 60, 898–907.

Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J.M., and Chambon, P. (1986). The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. EMBO J. *5*, 891.

Kucharczyk, M.J., Parpia, S., Walker-Dilks, C., Banfield, L., and Swaminath, A. (2017). Ablative therapies in metastatic breast cancer: a systematic review. Breast Cancer Res. Treat. *164*, 13–25.

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

Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology *138*, 863–870.

Kumar, V., and Chambon, P. (1988). The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. Cell *55*, 145–156.

Ladoire, S., and Fumoleau, P. (2017). Classifications moléculaires des cancers du sein : Applications cliniques. Congrès Oncotrans 2017. Besançon.

Lai, T., King, J., Shih, I., Vlahos, N., and Zhao, Y. (2007). Immunological localization of syndecan-1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. Fertil. Steril. *87*, 121–126.

Langford, J.K., Yang, Y., Kieber-Emmons, T., and Sanderson, R.D. (2005). Identification of an Invasion Regulatory Domain within the Core Protein of Syndecan-1. J. Biol. Chem. *280*, 3467–3473.

Larraín, J., Cizmeci-Smith, G., Troncoso, V., Stahl, R.C., Carey, D.J., and Brandan, E. (1997). Syndecan-1 expression is down-regulated during myoblast terminal differentiation. Modulation by growth factors and retinoic acid. J. Biol. Chem. *272*, 18418–18424.

Le Romancer, M., Treilleux, I., Leconte, N., Robin-Lespinasse, Y., Sentis, S., Bouchekioua-Bouzaghou, K., Goddard, S., Gobert-Gosse, S., and Corbo, L. (2008). Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. Mol. Cell *31*, 212–221.

Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J.-M., and Corbo, L. (2011). Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. Endocr. Rev. *32*, 597–622.

Lee, L.M., Cao, J., Deng, H., Chen, P., Gatalica, Z., and Wang, Z.-Y. (2008). ER- $\alpha$ 36, a novel variant of ER- $\alpha$ , is expressed in ER-positive and-negative human breast carcinomas. Anticancer Res. 28, 479–483.

de Leeuw, R., Neefjes, J., and Michalides, R. (2011). A role for estrogen receptor phosphorylation in the resistance to tamoxifen. Int. J. Breast Cancer 2011.

Leivonen, M., Lundin, J., Nordling, S., Von Boguslawski, K., and Haglund, C. (2004). Prognostic value of syndecan-1 expression in breast cancer. Oncology *67*, 11–18.

Lendorf, M.E., Manon-Jensen, T., Kronqvist, P., Multhaupt, H.A.B., and Couchman, J.R. (2011). Syndecan-1 and syndecan-4 are independent indicators in breast carcinoma. J. Histochem. Cytochem. *59*, 615–629.

Leppa, S., Vleminckx, K., Van Roy, F., and Jalkanen, M. (1996). Syndecan-1 expression in mammary epithelial tumor cells is E-cadherin-dependent. J. Cell Sci. *109*, 1393–1403.

Levallet, G., Levallet, J., and Bonnamy, P.-J. (2007). Alterations in proteoglycan synthesis selectively impair FSH-induced particulate cAMP-phosphodiesterase 4 (PDE4) activation in immature rat Sertoli cells. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. *1770*, 638–648.

Levallet, G., Bonnamy, P.-J., and Levallet, J. (2013). Alteration of cell membrane proteoglycans impairs FSH receptor/Gs coupling and ERK activation through PP2A-dependent mechanisms in immature rat Sertoli cells. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. *1830*, 3466–3475.

Levin, E.R. (2008). Rapid signaling by steroid receptors. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 295, R1425-1430.

Levy-Adam, F., Miao, H.-Q., Heinrikson, R.L., Vlodavsky, I., and Ilan, N. (2003). Heterodimer formation is essential for heparanase enzymatic activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. *308*, 885–891.

Levy-Adam, F., Abboud-Jarrous, G., Guerrini, M., Beccati, D., Vlodavsky, I., and Ilan, N. (2005). Identification and characterization of heparin/heparan sulfate binding domains of the endoglycosidase heparanase. J. Biol. Chem. *280*, 20457–20466.

Levy-Adam, F., Feld, S., Suss-Toby, E., Vlodavsky, I., and Ilan, N. (2008). Heparanase facilitates cell adhesion and spreading by clustering of cell surface heparan sulfate proteoglycans. PLoS ONE *3*, e2319.

Lewis, K.D., Robinson, W.A., Millward, M.J., Powell, A., Price, T.J., Thomson, D.B., Walpole, E.T., Haydon, A.M., Creese, B.R., Roberts, K.L., et al. (2008). A phase II study of the heparanase inhibitor PI-88 in patients with advanced melanoma. Invest. New Drugs *26*, 89–94.

Li, C., Wu, R.-C., Amazit, L., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J., and O'Malley, B.W. (2007). Specific amino acid residues in the basic helix-loop-helix domain of SRC-3 are essential for its nuclear localization and proteasome-dependent turnover. Mol. Cell. Biol. 27, 1296–1308.

Li, J., Gonzalez-Angulo, A.M., Allen, P.K., Yu, T.K., Woodward, W.A., Ueno, N.T., Lucci, A., Krishnamurthy, S., Gong, Y., Bondy, M.L., et al. (2011). Triple-negative subtype predicts poor overall survival and high locoregional relapse in inflammatory breast cancer. The Oncologist *16*, 1675–1683.

Li, L., Haynes, M.P., and Bender, J.R. (2003). Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor  $\alpha$  variant (ER46) in human endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *100*, 4807–4812.

Li, R., Zhang, L., Jia, L., Duan, Y., Li, Y., Wang, J., Bao, L., and Sha, N. (2014). MicroRNA-143 targets syndecan-1 to repress cell growth in melanoma. PLoS ONE 9.

Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.-F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., et al. (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. J. Natl. Cancer Inst. *100*, 672–679.

Lim, G.-H., Tan, P.-H., Jara-Lazaro, A.R., Thike, A.A., Sim, W.-C., Yap, V.-B., and Yip, G.W.-C. (2014). Syndecan-1 is a potential biomarker for triple-positive breast carcinomas in Asian women with correlation to survival. Singapore Med. J. *55*, 468–472.

Lim, L.Y., Vidnovic, N., Ellisen, L.W., and Leong, C.-O. (2009). Mutant p53 mediates survival of breast cancer cells. Br. J. Cancer *101*, 1606–1612.

Liu, C.-J., Chang, J., Lee, P.-H., Lin, D.-Y., Wu, C.-C., Jeng, L.-B., Lin, Y.-J., Mok, K.-T., Lee, W.-C., Yeh, H.-Z., et al. (2014). Adjuvant heparanase inhibitor PI-88 therapy for hepatocellular carcinoma recurrence. World J. Gastroenterol. WJG *20*, 11384–11393.

Liu, D., Shriver, Z., Venkataraman, G., El Shabrawi, Y., and Sasisekharan, R. (2002). Tumor cell surface heparan sulfate as cryptic promoters or inhibitors of tumor growth and metastasis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 568–573.

Löfgren, L., Sahlin, L., Jiang, S., Von Schoultz, B., Fernstad, R., Skoog, L., and Von Schoultz, E. (2007). Expression of syndecan-1 in paired samples of normal and malignant breast tissue from postmenopausal women. Anticancer Res. *27*, 3045–3050.

Lonard, D.M., Nawaz, Z., Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (2000). The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. Mol. Cell *5*, 939–948.

Long, X., and Nephew, K.P. (2006). Fulvestrant (ICI 182,780)-dependent interacting proteins mediate immobilization and degradation of estrogen receptor-alpha. J. Biol. Chem. 281, 9607–9615.

Loussouarn, D., Campion, L., Sagan, C., Frenel, J.-S., Dravet, F., Classe, J.-M., Pioud-Martigny, R., Berton-Rigaud, D., Bourbouloux, E., Mosnier, J.-F., et al. (2008). Prognostic impact of syndecan-1 expression in invasive ductal breast carcinomas. Br. J. Cancer *98*, 1993–1998.

Love, R.R., Mazess, R.B., Barden, H.S., Epstein, S., Newcomb, P.A., Jordan, V.C., Carbone, P.P., and DeMets, D.L. (1992). Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. N. Engl. J. Med. *326*, 852–856.

Lu, Q., Pallas, D.C., Surks, H.K., Baur, W.E., Mendelsohn, M.E., and Karas, R.H. (2004). Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 17126–17131.

Macon, M.B., and Fenton, S.E. (2013). Endocrine disruptors and the breast: early life effects and later life disease. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia *18*, 43–61.

Mader, S., Kumar, V., de Verneuil, H., and Chambon, P. (1989). Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. Nature *338*, 271–274.

Maeda, T., Desouky, J., and Friedl, A. (2006). Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts promotes breast carcinoma growth in vivo and stimulates tumor angiogenesis. Oncogene 25, 1408–1412.

Maggiolini, M., Vivacqua, A., Fasanella, G., Recchia, A.G., Sisci, D., Pezzi, V., Montanaro, D., Musti, A.M., Picard, D., and Andò, S. (2004). The G Protein-coupled receptor GPR30 mediates *c*-*fos* up-regulation by  $17\beta$ -estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. J. Biol. Chem. 279, 27008–27016.

Mahtouk, K., Hose, D., Raynaud, P., Hundemer, M., Jourdan, M., Jourdan, E., Pantesco, V., Baudard, M., De Vos, J., Larroque, M., et al. (2007a). Heparanase influences expression and shedding of syndecan-1, and its expression by the bone marrow environment is a bad prognostic factor in multiple myeloma. Blood *109*, 4914–4923.

Mahtouk, K., Vos, J.D., Moreaux, J., Jourdan, M., Baudard, M., Rossi, J.F., Rème, T., and Klein, B. (2007b). Les puces à ADN : un outil pour l'étude de la biologie du myélome multiple. Hématologie *13*, 110–121.

Mali, M., Jaakkola, P., Arvilommi, A.-M., and Jalkanen, M. (1990). Sequence of human syndecan indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans. J. Biol. Chem. *265*, 6884–6889.

Mali, M., Andtfolk, H., Miettinen, H.M., and Jalkanen, M. (1994). Suppression of tumor cell growth by syndecan-1 ectodomain. J. Biol. Chem. *269*, 27795–27798.

Manavathi, B., Acconcia, F., Rayala, S.K., and Kumar, R. (2006). An inherent role of microtubule network in the action of nuclear receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. *103*, 15981–15986.

Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell *83*, 835–839.

Manon-Jensen, T., Multhaupt, H.A.B., and Couchman, J.R. (2013). Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. FEBS J. 280, 2320–2331.

Marino, M., Galluzzo, P., and Ascenzi, P. (2006). Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. Curr. Genomics 7, 497.

Marjon, N.A., Hu, C., Hathaway, H.J., and Prossnitz, E.R. (2014). G Protein–coupled estrogen receptor regulates mammary tumorigenesis and metastasis. Mol. Cancer Res. *12*, 1644–1654.

Marsaud, V., Gougelet, A., Maillard, S., and Renoir, J.-M. (2003). Various phosphorylation pathways, depending on agonist and antagonist binding to endogenous estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), differentially affect ER $\alpha$  extractability, proteasome-mediated stability, and transcriptional activity in human breast cancer cells. Mol. Endocrinol. *17*, 2013–2027.

Marynen, P., Zhang, J., Cassiman, J.J., Van den Berghe, H., and David, G. (1989). Partial primary structure of the 48- and 90-kilodalton core proteins of cell surface-associated heparan sulfate proteoglycans of lung fibroblasts. Prediction of an integral membrane domain and evidence for multiple distinct core proteins at the cell surface of human lung fibroblasts. J. Biol. Chem. *264*, 7017–7024.

Masola, V., Gambaro, G., Tibaldi, E., Brunati, A.M., Gastaldello, A., D'Angelo, A., Onisto, M., and Lupo, A. (2012). Heparanase and syndecan-1 interplay orchestrates fibroblast growth factor-2-induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular cells. J. Biol. Chem. 287, 1478–1488.

Matsuda, K., Maruyama, H., Guo, F., Kleeff, J., Itakura, J., Matsumoto, Y., Lander, A.D., and Korc, M. (2001). Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells. Cancer Res. *61*, 5562–5569.

Matsuda, K., Ochiai, I., Nishi, M., and Kawata, M. (2002). Colocalization and ligand-dependent discrete distribution of the estrogen receptor (ER) $\alpha$  and ER $\beta$ . Mol. Endocrinol. *16*, 2215–2230.

Mavaddat, N., Peock, S., Frost, D., Ellis, S., Platte, R., Fineberg, E., Evans, D.G., Izatt, L., Eeles, R.A., Adlard, J., et al. (2013). Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. J. Natl. Cancer Inst. *105*, 812–822.

McDermott, S.P., Ranheim, E.A., Leatherberry, V.S., Khwaja, S.S., Klos, K.S., and Alexander, C.M. (2007). Juvenile syndecan-1 null mice are protected from carcinogen-induced tumor development. Oncogene *26*, 1407–1416.

McQuade, K.J., and Rapraeger, A.C. (2003). Syndecan-1 transmembrane and extracellular domains have unique and distinct roles in cell spreading. J. Biol. Chem. 278, 46607–46615.

MdPaiman, N., Md Ali, S.A., MdZin, R., Meor Kamal, M.Z., Md Amin, W.A., Nallusamy, M., Puspanathan, P., Muhammad, R., Wan Puteh, S.E., and Das, S. (2014). Estrogen receptor-negative breast ductal carcinoma: clinicopathological features and Mib-1 (Ki-67) proliferative index association. PLoS ONE *9*, e89172.

Medunjanin, S., Hermani, A., De Servi, B., Grisouard, J., Rincke, G., and Mayer, D. (2005). Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. J. Biol. Chem. 280, 33006–33014.

Métivier, R., Penot, G., Flouriot, G., and Pakdel, F. (2001). Synergism between ER $\alpha$  transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *15*, 1953–1970.

Métivier, R., Stark, A., Flouriot, G., Hübner, M.R., Brand, H., Penot, G., Manu, D., Denger, S., Reid, G., Koš, M., et al. (2002). A dynamic structural model for estrogen receptor- $\alpha$  activation by ligands, emphasizing the role of interactions between distant A and E Domains. Mol. Cell *10*, 1019–1032.

Michael, M.Z., O' Connor, S.M., van Holst Pellekaan, N.G., Young, G.P., and James, R.J. (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. Mol. Cancer Res. MCR 1, 882–891.

Michalides, R., Griekspoor, A., Balkenende, A., Verwoerd, D., Janssen, L., Jalink, K., Floore, A., Velds, A., van `t Veer, L., and Neefjes, J. (2004). Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor  $\alpha$  after PKA activation in breast cancer. Cancer Cell *5*, 597–605.

Miettinen, H.M., Edwards, S.N., and Jalkanen, M. (1994). Analysis of transport and targeting of syndecan-1: effect of cytoplasmic tail deletions. Mol. Biol. Cell *5*, 1325–1339.

Miettinen, M.M., Mustonen, M.V., Poutanen, M.H., Isomaa, V.V., and Vihko, R.K. (1996). Human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 isoenzymes have opposite activities in cultured cells and characteristic cell- and tissue-specific expression. Biochem. J. *314 (Pt 3)*, 839–845.

Migliaccio, A., Di Domenico, M., Green, S., de Falco, A., Kajtaniak, E.L., Blasi, F., Chambon, P., and Auricchio, F. (1989). Phosphorylation on tyrosine of in vitro synthesized human estrogen receptor activates its hormone binding. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *3*, 1061–1069.

Mikami, T., and Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. Biochim. Biophys. Acta *1830*, 4719–4733.

Miller, W.L., and Auchus, R.J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. Endocr. Rev. 32, 81–151.

Mills, S.E. (2012). Histology for pathologists 4th (Lippincott Williams & Wilkins).

Montano, M.M., Müller, V., Trobaugh, A., and Katzenellenbogen, B.S. (1995). The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. Mol. Endocrinol. *9*, 814–825.

Moore, J.T., McKee, D.D., Slentz-Kesler, K., Moore, L.B., Jones, S.A., Horne, E.L., Su, J.L., Kliewer, S.A., Lehmann, J.M., and Willson, T.M. (1998). Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. Biochem. Biophys. Res. Commun. *247*, 75–78.

Morel, Y., Roucher, F., Plotton, I., Goursaud, C., Tardy, V., and Mallet, D. (2016). Evolution of steroids during pregnancy: maternal, placental and fetal synthesis. Ann. Endocrinol. 77, 82–89.

Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. FEBS Lett. *392*, 49–53.

Müller, B.M., Jana, L., Kasajima, A., Lehmann, A., Prinzler, J., Budczies, J., Winzer, K.-J., Dietel, M., Weichert, W., and Denkert, C. (2013). Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer - overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. BMC Cancer *13*, 215.

Muller, R.E., Johnston, T.C., Traish, A.M., and Wotiz, H.H. (1979). Studies on the mechanism of estradiol uptake by rat uterine cells and on estradiol binding to uterine plasma membranes. Adv. Exp. Med. Biol. *117*, 401–421.

Mythreye, K., and Blobe, G.C. (2009). Proteoglycan signaling co-receptors: Roles in cell adhesion, migration and invasion. Cell. Signal. *21*, 1548–1558.

Nadir, Y., and Brenner, B. (2014). Heparanase multiple effects in cancer. Thromb. Res. 133, S90–S94.

Nakanishi, K., Yoshioka, N., Oka, K., and Hakura, A. (1999). Reduction of syndecan-1 mRNA in cervical-carcinoma cells is involved with the 3' untranslated region. Int. J. Cancer 80, 527–532.

National Institute of Environmental Health Services (2002). New federal report on carcinogens lists estrogen therapy, ultraviolet, wood dust.

Nawaz, Z., Lonard, D.M., Dennis, A.P., Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (1999). Proteasomedependent degradation of the human estrogen receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. *96*, 1858–1862.

Neuman, E., Ladha, M.H., Lin, N., Upton, T.M., Miller, S.J., DiRenzo, J., Pestell, R.G., Hinds, P.W., Dowdy, S.F., Brown, M., et al. (1997). Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. Mol. Cell. Biol. *17*, 5338.

Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.-P., Tong, F., et al. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer Cell *10*, 515–527.

Newman, B., Austin, M.A., Lee, M., and King, M.C. (1988). Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *85*, 3044–3048.

Nikolova, V., Koo, C.-Y., Ibrahim, S.A., Wang, Z., Spillmann, D., Dreier, R., Kelsch, R., Fischgrabe, J., Smollich, M., Rossi, L.H., et al. (2009). Differential roles for membrane-bound and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression. Carcinogenesis *30*, 397–407.

Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J.-\AAke (2001). Mechanisms of estrogen action. Physiol. Rev. 81, 1535–1565.

Nilsson, U.W., Garvin, S., and Dabrosin, C. (2007). MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells. Breast Cancer Res. Treat. *102*, 253–261.

O'Brian, C.A., Liskamp, R.M., Solomon, D.H., and Weinstein, I.B. (1985). Inhibition of protein kinase C by tamoxifen. Cancer Res. 45, 2462–2465.

O'Connell, F.P., Pinkus, J.L., and Pinkus, G.S. (2004). CD138 (Syndecan-1), a Plasma cell marker: immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms. Am. J. Clin. Pathol. *121*, 254–263.

Oesterreich, S., Deng, W., Jiang, S., Cui, X., Ivanova, M., Schiff, R., Kang, K., Hadsell, D.L., Behrens, J., and Lee, A.V. (2003). Estrogen-mediated down-regulation of E-cadherin in breast cancer cells. Cancer Res. *63*, 5203–5208.

Oh, J.-H., Kim, J.-H., Ahn, H.-J., Yoon, J.-H., Yoo, S.-C., Choi, D.-S., Lee, I.-S., Ryu, H.-S., and Min, C.K. (2009). Syndecan-1 enhances the endometrial cancer invasion by modulating matrix metalloproteinase-9 expression through nuclear factor κB. Gynecol. Oncol. *114*, 509–515.

Ojeh, N., Hiilesvuo, K., Wärri, A., Salmivirta, M., Henttinen, T., and Määttä, A. (2008). Ectopic expression of syndecan-1 in basal epidermis affects keratinocyte proliferation and wound re-epithelialization. J. Invest. Dermatol. *128*, 26–34.

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

Onate, S.A., Boonyaratanakornkit, V., Spencer, T.E., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J., Edwards, D.P., and O'Malley, B.W. (1998). The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. J. Biol. Chem. *273*, 12101–12108.

Osborne, C.K., and Schiff, R. (2011). Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. Annu. Rev. Med. *62*, 233–247.

Osborne, C.K., Wakeling, A., and Nicholson, R.I. (2004). Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. Br. J. Cancer *90*, S2–S6.

Ott, V.L., and Rapraeger, A.C. (1998). Tyrosine phosphorylation of syndecan-1 and -4 cytoplasmic domains in adherent B82 fibroblasts. J. Biol. Chem. 273, 35291–35298.

Ottaviano, Y.L., Issa, J.P., Parl, F.F., Smith, H.S., Baylin, S.B., and Davidson, N.E. (1994). Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. Cancer Res. *54*, 2552–2555.

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

Palermo, R. (2007). Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. Reprod. Biomed. Online 15, 326–337.

Pal-Ghosh, S., Tadvalkar, G., Jurjus, R.A., Zieske, J.D., and Stepp, M.A. (2008). BALB/c and C57BL6 mouse strains vary in their ability to heal corneal epithelial debridement wounds. Exp. Eye Res. *87*, 478–486.

Pancholi, S., Lykkesfeldt, A., Johnston, S., Dowsett, M., and Martin, L.-A. (2004). Elevated levels of AKT and p90rsk induce activation of ER $\alpha$  ser167 in tamoxifen-resistant cells. Cancer Res. 64, 1202–1203.

Parish, C.R., Freeman, C., and Hulett, M.D. (2001). Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. Biochim. Biophys. Acta BBA-Rev. Cancer *1471*, M99–M108.

Park, K.-J., Krishnan, V., O'Malley, B.W., Yamamoto, Y., and Gaynor, R.B. (2005). Formation of an IKK $\alpha$ -dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. Mol. Cell *18*, 71–82.

Park, P.W., Pier, G.B., Preston, M.J., Goldberger, O., Fitzgerald, M.L., and Bernfield, M. (2000). Syndecan-1 shedding is enhanced by LasA, a secreted virulence factor of Pseudomonas aeruginosa. J. Biol. Chem. *275*, 3057–3064.

Park, S.-H., Cheung, L.W.T., Wong, A.S.T., and Leung, P.C.K. (2008). Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-Cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor α. Mol. Endocrinol. *22*, 2085–2098.

Patel, S.R., and Skafar, D.F. (2015). Modulation of nuclear receptor activity by the F domain. Mol. Cell. Endocrinol. *418*, 298–305.

Pathiraja, T.N., Stearns, V., and Oesterreich, S. (2010). Epigenetic regulation in estrogen receptor positive breast cancer—role in treatment response. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia *15*, 35–47.

Penot, G., Le Péron, C., Mérot, Y., Grimaud-Fanouillère, E., Ferrière, F., Boujrad, N., Kah, O., Saligaut, C., Ducouret, B., Métivier, R., et al. (2005). The human estrogen receptor- $\alpha$  isoform hER $\alpha$ 46 antagonizes the proliferative influence of hER $\alpha$ 66 in MCF7 breast cancer cells. Endocrinology *146*, 5474–5484.

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

Petz, L.N., and Nardulli, A.M. (2000). Sp1 binding sites and an estrogen response element half-site are involved in regulation of the human progesterone receptor A promoter. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *14*, 972–985.

Pike, A.C., Brzozowski, A.M., Walton, J., Hubbard, R.E., Thorsell, A.G., Li, Y.L., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (2001). Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen. Struct. Lond. Engl. 1993 *9*, 145–153.

Pinton, G., Brunelli, E., Murer, B., Puntoni, R., Puntoni, M., Fennell, D.A., Gaudino, G., Mutti, L., and Moro, L. (2009). Estrogen receptor- $\beta$  affects the prognosis of human malignant mesothelioma. Cancer Res. *69*, 4598–4604.

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

Poola, I., Koduri, S., Chatra, S., and Clarke, R. (2000). Identification of twenty alternatively spliced estrogen receptor alpha mRNAs in breast cancer cell lines and tumors using splice targeted primer approach. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 72, 249–258.

Poola, I., Abraham, J., and Baldwin, K. (2002). Identification of ten exon deleted ER $\beta$  mRNAs in human ovary, breast, uterus and bone tissues: alternate splicing pattern of estrogen receptor  $\beta$  mRNA is distinct from that of estrogen receptor  $\alpha$ . FEBS Lett. *516*, 133–138.

Prakash, A., Janosi, L., and Doxastakis, M. (2011). GxxxG motifs, phenylalanine, and cholesterol guide the self-association of transmembrane domains of ErbB2 receptors. Biophys. J. *101*, 1949–1958.

Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Harrell, J.M., and DeFranco, D.B. (2004). Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. Cell. Signal. *16*, 857–872.

Pruessmeyer, J., Martin, C., Hess, F.M., Schwarz, N., Schmidt, S., Kogel, T., Hoettecke, N., Schmidt, B., Sechi, A., Uhlig, S., et al. (2010). A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates inflammation-induced shedding of syndecan-1 and -4 by lung epithelial cells. J. Biol. Chem. 285, 555–564.

Purushothaman, A., Chen, L., Yang, Y., and Sanderson, R.D. (2008). Heparanase stimulation of protease expression implicates it as a master regulator of the aggressive tumor phenotype in myeloma. J. Biol. Chem. *283*, 32628–32636.

Purushothaman, A., Hurst, D.R., Pisano, C., Mizumoto, S., Sugahara, K., and Sanderson, R.D. (2011). Heparanase-mediated Loss of nuclear syndecan-1 enhances histone acetyltransferase (HAT) Activity to promote expression of genes that drive an aggressive tumor phenotype. J. Biol. Chem. 286, 30377– 30383.

Quinn, J.A., Graeber, C.T., Frackelton, A.R., Kim, M., Schwarzbauer, J.E., and Filardo, E.J. (2009). Coordinate regulation of estrogen-mediated fibronectin matrix assembly and epidermal growth factor receptor transactivation by the g protein-coupled receptor, GPR30. Mol. Endocrinol. *23*, 1052–1064.

Rahman, M., and Mohammed, S. (2015). Breast cancer metastasis and the lymphatic system. Oncol. Lett. *10*, 1233–1239.

Ramani, V.C., and Sanderson, R.D. (2014). Chemotherapy stimulates syndecan-1 shedding: a potentially negative effect of treatment that may promote tumor relapse. Matrix Biol. *35*, 215–222.

Ramani, V.C., Pruett, P.S., Thompson, C.A., DeLucas, L.D., and Sanderson, R.D. (2012). Heparan sulfate chains of syndecan-1 regulate ectodomain shedding. J. Biol. Chem. 287, 9952–9961.

Ramani, V.C., Vlodavsky, I., Ng, M., Zhang, Y., Barbieri, P., Noseda, A., and Sanderson, R.D. (2016). Chemotherapy induces expression and release of heparanase leading to changes associated with an aggressive tumor phenotype. Matrix Biol.

Rapraeger, A.C. (2013). Synstatin: a selective inhibitor of the syndecan-1-coupled IGF1R- $\alpha\nu\beta$ 3 integrin complex in tumorigenesis and angiogenesis. FEBS J. 280, 2207–2215.

Rapraeger, A.C., and Bernfield, M. (1983). Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. A putative membrane proteoglycan associates quantitatively with lipid vesicles. J. Biol. Chem. *258*, 3632–3636.

Rapraeger, A., Jalkanen, M., Endo, E., Koda, J., and Bernfield, M. (1985). The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. J. Biol. Chem. *260*, 11046–11052.

Rapraeger, A., Jalkanen, M., and Bernfield, M. (1986). Cell surface proteoglycan associates with the cytoskeleton at the basolateral cell surface of mouse mammary epithelial cells. J. Cell Biol. *103*, 2683–2696.

Reisman, D., Glaros, S., and Thompson, E.A. (2009). The SWI/SNF complex and cancer. Oncogene 28, 1653–1668.

Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., and Prossnitz, E.R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. Science *307*, 1625–1630.

Richardson, T.P., Trinkaus-Randall, V., and Nugent, M.A. (2001). Regulation of heparan sulfate proteoglycan nuclear localization by fibronectin. J. Cell Sci. *114*, 1613–1623.

Rivenbark, A.G., O'Connor, S.M., and Coleman, W.B. (2013). Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. Am. J. Pathol. *183*, 1113–1124.

Robertson, F.M., Bondy, M., Yang, W., Yamauchi, H., Wiggins, S., Kamrudin, S., Krishnamurthy, S., Le-Petross, H., Bidaut, L., Player, A.N., et al. (2010). Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment. CA. Cancer J. Clin. *60*, 351–375.

Rousselle, P., and Letourneur, F. (2009). Mysterious tasks of tyrosines in syndecan-1 cytoplasmic tail. Sci. World J. 9, 629–632.

Roux, M. (2013). Fibroadénome géant chez l'adolescente et influence hormonale: analyse d'une série de 90 cas. Université Paris 7-Paris.

Roy, M., and Marchetti, D. (2009). Cell surface heparan sulfate released by heparanase promotes melanoma cell migration and angiogenesis. J. Cell. Biochem. *106*, 200–209.

Russell, K.S., Haynes, M.P., Sinha, D., Clerisme, E., and Bender, J.R. (2000). Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 5930–5935.

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

Sanderson, R.D., Hinkes, M.T., and Bernfield, M. (1992). Syndecan-1, a cell-surface proteoglycan, changes in size and abundance when keratinocytes stratify. J. Invest. Dermatol. *99*, 390–396.

Sarrazin, S., Lamanna, W.C., and Esko, J.D. (2011). Heparan sulfate proteoglycans. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *3*, a004952–a004952.

Sasisekharan, R., Shriver, Z., Venkataraman, G., and Narayanasami, U. (2002). Roles of heparansulphate glycosaminoglycans in cancer. Nat. Rev. Cancer 2, 521–528.

Saunders, S., Jalkanen, M., O'Farrell, S., and Bernfield, M. (1989). Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. J. Cell Biol. *108*, 1547–1556.

Schönfeld, K., Zuber, C., Pinkas, J., Häder, T., Bernöster, K., and Uherek, C. (2017). Indatuximab ravtansine (BT062) combination treatment in multiple myeloma: pre-clinical studies. J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol *10*.

Schwartz, J.A., Zhong, L., Deighton-Collins, S., Zhao, C., and Skafar, D.F. (2002). Mutations targeted to a predicted helix in the extreme carboxyl-terminal region of the human estrogen receptor- $\alpha$  alter its response to estradiol and 4-hydroxytamoxifen. J. Biol. Chem. 277, 13202–13209.

Seidel, C., Sundan, A., Hjorth, M., Turesson, I., Dahl, I.M.S., Abildgaard, N., Waage, A., and Børset, M. (2000). Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. Blood *95*, 388–392.

Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. Nature *439*, 84–88.

Shang, Y. (2006). Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis. Nat. Rev. Cancer *6*, 360–368.

Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A., and Brown, M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor–regulated transcription. Cell *103*, 843–852.

Shantakumar, S., Terry, M.B., Paykin, A., Teitelbaum, S.L., Britton, J.A., Moorman, P.G., Kritchevsky, S.B., Neugut, A.I., and Gammon, M.D. (2007). Age and menopausal effects of hormonal birth control and hormone replacement therapy in relation to breast cancer risk. Am. J. Epidemiol. *165*, 1187–1198.

Shepherd, T.R., Klaus, S.M., Liu, X., Ramaswamy, S., DeMali, K.A., and Fuentes, E.J. (2010). The Tiam1 PDZ domain couples to Syndecan1 and promotes cell-matrix adhesion. J. Mol. Biol. *398*, 730–746.

Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., and Greene, G.L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. Cell *95*, 927–937.

Shou, J., Massarweh, S., Osborne, C.K., Wakeling, A.E., Ali, S., Weiss, H., and Schiff, R. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. JNCI J. Natl. Cancer Inst. *96*, 926–935.

Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., and Michael, M.D. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endocr. Rev. *15*, 342–355.

Sleeman, K.E., Kendrick, H., Robertson, D., Isacke, C.M., Ashworth, A., and Smalley, M.J. (2007). Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. J. Cell Biol. *176*, 19–26.

Solursh, M., Reiter, R.S., Jensen, K.L., Kato, M., and Bernfield, M. (1990). Transient expression of a cell surface heparan sulfate proteoglycan (syndecan) during limb development. Dev. Biol. *140*, 83–92.

Song, T., Xia, W., Shao, N., Zhang, X., Wang, C., Wu, Y., Dong, J., Cai, W., and Li, H. (2010). Differential miRNA expression profiles in bladder urothelial carcinomas. Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP *11*, 905–911.

Sørensen, H.P., Vivès, R.R., Manetopoulos, C., Albrechtsen, R., Lydolph, M.C., Jacobsen, J., Couchman, J.R., and Wewer, U.M. (2008). Heparan sulfate regulates ADAM12 through a molecular switch mechanism. J. Biol. Chem. *283*, 31920–31932.

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

Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., et al. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. Nature *389*, 194–198.

Stanley, M.J., Stanley, M.W., Sanderson, R.D., and Zera, R. (1999). Syndecan-1 expression is induced in the stroma of infiltrating breast carcinoma. Am. J. Clin. Pathol. *112*, 377–383.

Steinkampf, M.P., Mendelson, C.R., and Simpson, E.R. (1987). Regulation by follicle-stimulating hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P-450 in human granulosa cells. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *1*, 465–471.

Stepp, M.A. (2002). Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. J. Cell Sci. *115*, 4517–4531.

Stepp, M.A., Pal-Ghosh, S., Tadvalkar, G., and Pajoohesh-Ganji, A. (2015). Syndecan-1 and its expanding list of contacts. Adv. Wound Care 4, 235–249.

Stewart, M.D., Ramani, V.C., and Sanderson, R.D. (2015). Shed syndecan-1 translocates to the nucleus of cells delivering growth factors and inhibiting histone acetylation: a novel mechanism of tumor-host cross-talk. J. Biol. Chem. 290, 941–949.

Strutz, F., Zeisberg, M., Ziyadeh, F.N., Yang, C.-Q., Kalluri, R., Müller, G.A., and Neilson, E.G. (2002). Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. Kidney Int. *61*, 1714–1728.

Stull, M.A., Richert, M.M., Loladze, A.V., and Wood, T.L. (2002). Requirement for IGF-I in epidermal growth factor-mediated cell cycle progression of mammary epithelial cells. Endocrinology *143*, 1872–1879.

Subramanian, S.V., Fitzgerald, M.L., and Bernfield, M. (1997). Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. J. Biol. Chem. 272, 14713–14720.

Sulka, B., Lortat-Jacob, H., Terreux, R., Letourneur, F., and Rousselle, P. (2009). Tyrosine dephosphorylation of the syndecan-1 PDZ binding domain regulates syntenin-1 recruitment. J. Biol. Chem. 284, 10659–10671.

Sun, H., Berquin, I.M., Owens, R.T., O'Flaherty, J.T., and Edwards, I.J. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor -mediated up-regulation of syndecan-1 by n-3 fatty acids promotes apoptosis of human breast cancer cells. Cancer Res. *68*, 2912–2919.

Sutherland, A.E., Sanderson, R.D., Mayes, M., Seibert, M., Calarco, P.G., Bernfield, M., and Damsky, C.H. (1991). Expression of syndecan, a putative low affinity fibroblast growth factor receptor, in the early mouse embryo. Dev. Camb. Engl. *113*, 339–351.

Szatmári, T., Mundt, F., Heidari-Hamedani, G., Zong, F., Ferolla, E., Alexeyenko, A., Hjerpe, A., and Dobra, K. (2012). Novel genes and pathways modulated by syndecan-1: implications for the proliferation and cell-cycle regulation of malignant mesothelioma cells. PLoS ONE *7*, e48091.

Szatmári, T., Ötvös, R., Hjerpe, A., and Dobra, K. (2015). Syndecan-1 in cancer: implications for cell signaling, differentiation, and prognostication. Dis. Markers *2015*.

Szego, C.M., and Davis, J.S. (1967). Adenosine 3', 5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. Proc. Natl. Acad. Sci. 58, 1711–1718.

Tan, M., and Yu, D. (2013). Molecular mechanisms of ErbB2-mediated breast cancer chemoresistance (Landes Bioscience).

Taylor, S.E., Martin-Hirsch, P.L., and Martin, F.L. (2010). Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. Cancer Lett. 288, 133–148.

Tecalco-Cruz, A.C., Pérez-Alvarado, I.A., Ramírez-Jarquín, J.O., and Rocha-Zavaleta, L. (2017). Nucleo-cytoplasmic transport of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. Cell. Signal. *34*, 121–132.

Teel, A.L., and Yost, H.J. (1996). Embryonic expression patterns of Xenopus syndecans. Mech. Dev. *59*, 115–127.

Teixeira, C., Reed, J.C., and Pratt, M.A. (1995). Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. Cancer Res. *55*, 3902–3907.

Teng, Y.H.-F., Aquino, R.S., and Park, P.W. (2012). Molecular functions of syndecan-1 in disease. Matrix Biol. *31*, 3–16.

Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Neill, T., Multhaupt, H.A.B., Hubo, M., Frey, H., Gopal, S., Gomes, A., Afratis, N., Lim, H.C., et al. (2015). Insights into the key roles of proteoglycans in breast cancer biology and translational medicine. Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer *1855*, 276–300.

Thesleff, I., Jalkanen, M., Vainio, S., and Bernfield, M. (1988). Cell surface proteoglycan expression correlates with epithelial-mesenchymal interaction during tooth morphogenesis. Dev. Biol. *129*, 565–572.

Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., and Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. Endocrinology *146*, 624–632.

Thomas, R.S., Sarwar, N., Phoenix, F., Coombes, R.C., and Ali, S. (2008). Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor-alpha activity. J. Mol. Endocrinol. *40*, 173–184.

Tiemann, K., Weigel, M.T., Alkatout, I., Wenners, A.S., Mundhenke, H., Schäfer, F.W., Bauer, M., Schem, C., Maass, N., Jonat, W., et al. (2014). Significance of syndecan-1 expression in ductal carcinoma in situ of the breast. Anticancer Res. *34*, 3607–3616.

Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., and Chambon, P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. Cell *59*, 477–487.

Trautman, M.S., Kimelman, J., and Bernfield, M. (1991). Developmental expression of syndecan, an integral membrane proteoglycan, correlates with cell differentiation. Dev. Camb. Engl. *111*, 213–220.

Trowbridge, J.M., Rogatsky, I., and Garabedian, M.J. (1997). Regulation of estrogen receptor transcriptional enhancement by the cyclin A/Cdk2 complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 10132–10137.

Ueno, M., Yamada, S., Zako, M., Bernfield, M., and Sugahara, K. (2001). Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells. Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence. J. Biol. Chem. 276, 29134–29140.

Vainio, S., Lehtonen, E., Jalkanen, M., Bernfield, M., and Saxén, L. (1989). Epithelial-mesenchymal interactions regulate the stage-specific expression of a cell surface proteoglycan, syndecan, in the developing kidney. Dev. Biol. *134*, 382–391.

Varricchio, L., Migliaccio, A., Castoria, G., Yamaguchi, H., Falco, A. de, Domenico, M.D., Giovannelli, P., Farrar, W., Appella, E., and Auricchio, F. (2007). Inhibition of estradiol receptor/src association and cell growth by an estradiol receptor  $\alpha$  tyrosine-phosphorylated peptide. Mol. Cancer Res. 5, 1213–1221.

Vihinen, T., Määttä, A., Jaakkola, P., Auvinen, P., and Jalkanen, M. (1996). Functional characterization of mouse syndecan-1 promoter. J. Biol. Chem. 271, 12532–12541.

Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat. Rev. Cancer *8*, 755–768.

Visvader, J.E., and Stingl, J. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. Genes Dev. 28, 1143–1158.

Vlodavsky, I., Goldshmidt, O., Zcharia, E., Atzmon, R., Rangini-Guatta, Z., Elkin, M., Peretz, T., and Friedmann, Y. (2002). Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. Semin. Cancer Biol. *12*, 121–129.

Vlodavsky, I., Elkin, M., Abboud-Jarrous, G., Levi-Adam, F., Fuks, L., Shafat, I., and Ilan, N. (2008). Heparanase: one molecule with multiple functions in cancer progression. Connect. Tissue Res. *49*, 207–210.

Vreys, V., Delande, N., Zhang, Z., Coomans, C., Roebroek, A., Dürr, J., and David, G. (2005). Cellular uptake of mammalian heparanase precursor involves low density lipoprotein receptor-related proteins, mannose 6-phosphate receptors, and heparan sulfate proteoglycans. J. Biol. Chem. *280*, 33141–33148.

Vuong, D., Simpson, P.T., Green, B., Cummings, M.C., and Lakhani, S.R. (2014). Molecular classification of breast cancer. Virchows Arch. Int. J. Pathol. 465, 1–14.

Walsh, C.A., Qin, L., Tien, J.C.-Y., Young, L.S., and Xu, J. (2012). The function of steroid receptor coactivator-1 in normal tissues and cancer. Int. J. Biol. Sci. 8, 470–485.

Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J.M., Jeltsch, J.M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M., et al. (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. *82*, 7889–7893.

Wang, Z.-Y., and Yin, L. (2015). Estrogen receptor alpha-36 (ER- $\alpha$ 36): A new player in human breast cancer. Mol. Cell. Endocrinol. *418*, 193–206.

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

Wang, H., Jin, H., and Rapraeger, A.C. (2015). Syndecan-1 and syndecan-4 capture epidermal growth factor receptor family members and the  $\alpha 3\beta 1$  integrin via binding sites in their ectodomains: novel synstatins prevent kinase capture and inhibit  $\alpha 6\beta 4$ -integrin-dependent epithelial cell motility. J. Biol. Chem. jbc.M115.679084.

Wang, R.-A., Mazumdar, A., Vadlamudi, R.K., and Kumar, R. (2002). P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor- $\alpha$  and promotes hyperplasia in mammary epithelium. EMBO J. 21, 5437–5447.

Wang, X., Zuo, D., Chen, Y., Li, W., Liu, R., He, Y., Ren, L., Zhou, L., Deng, T., Wang, X., et al. (2014). Shed syndecan-1 is involved in chemotherapy resistance via the EGFR pathway in colorectal cancer. Br. J. Cancer.

Wang, Z., Juttermann, R., and Soloway, P.D. (2000). TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. J. Biol. Chem. 275, 26411–26415.

Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., and Deuel, T.F. (2005). Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- $\alpha$ 36, a novel variant of human estrogen receptor- $\alpha$ 66. Biochem. Biophys. Res. Commun. *336*, 1023–1027.

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

Watanabe, A., Mabuchi, T., Satoh, E., Furuya, K., Zhang, L., Maeda, S., and Naganuma, H. (2006). Expression of syndecans, a heparan sulfate proteoglycan, in malignant gliomas: participation of nuclear factor-kappaB in upregulation of syndecan-1 expression. J. Neurooncol. *77*, 25–32.

Weatherman, R.V., and Scanlan, T.S. (2001). Unique protein determinants of the subtype-selective ligand responses of the estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) at AP-1 sites. J. Biol. Chem. 276, 3827–3832.

Webster, N.J., Green, S., Jin, J.R., and Chambon, P. (1988). The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. Cell *54*, 199–207.

Weigelt, B., Mackay, A., A'hern, R., Natrajan, R., Tan, D.S.P., Dowsett, M., Ashworth, A., and Reis-Filho, J.S. (2010). Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. Lancet Oncol. *11*, 339–349.

Widschwendter, M., and Jones, P.A. (2002). DNA methylation and breast carcinogenesis. Oncogene 21, 5462–5482.

Wijdenes, J., Vooijs, W.C., Clément, C., Post, J., Morard, F., Vita, N., Laurent, P., Sun, R.-X., Klein, B., and Dore, J.-M. (1996). A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. Br. J. Haematol. *94*, 318–323.

Xu, J., and Li, Q. (2003). Review of the *in vivo* functions of the p160 steroid receptor coactivator family. Mol. Endocrinol. *17*, 1681–1692.

Xu, J., Wu, R.-C., and O'Malley, B.W. (2009). Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. Nat. Rev. Cancer *9*, 615–630.

Yager, J.D., and Davidson, N.E. (2006). Estrogen carcinogenesis in breast cancer. N. Engl. J. Med. 354, 270–282.

Yang, Y., Macleod, V., Bendre, M., Huang, Y., Theus, A.M., Miao, H.-Q., Kussie, P., Yaccoby, S., Epstein, J., Suva, L.J., et al. (2005). Heparanase promotes the spontaneous metastasis of myeloma cells to bone. Blood *105*, 1303–1309.

Yang, Y., MacLeod, V., Miao, H.-Q., Theus, A., Zhan, F., Shaughnessy, J.D., Sawyer, J., Li, J.-P., Zcharia, E., Vlodavsky, I., et al. (2007). Heparanase enhances syndecan-1 shedding: A novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. J. Biol. Chem. 282, 13326–13333.

Ye, Y., Xiao, Y., Wang, W., Yearsley, K., Gao, J.-X., and Barsky, S.H. (2008). ERa suppresses slug expression directly by transcriptional repression. Biochem. J. *416*, 179.

Ye, Y., Xiao, Y., Wang, W., Yearsley, K., Gao, J.X., Shetuni, B., and Barsky, S.H. (2010). ERa signaling through slug regulates E-cadherin and EMT. Oncogene *29*, 1451–1462.

Yeaman, C., and Rapraeger, A.C. (1993). Post-transcriptional regulation of syndecan-1 expression by cAMP in peritoneal macrophages. J. Cell Biol. *122*, 941–950.

Zajchowski, D.A., Sager, R., and Webster, L. (1993). Estrogen inhibits the growth of estrogen receptor-negative, but not estrogen receptor-positive, human mammary epithelial cells expressing a recombinant estrogen receptor. Cancer Res. *53*, 5004–5011.

Zetser, A., Levy-Adam, F., Kaplan, V., Gingis-Velitski, S., Bashenko, Y., Schubert, S., Flugelman, M.Y., Vlodavsky, I., and Ilan, N. (2004). Processing and activation of latent heparanase occurs in lysosomes. J. Cell Sci. *117*, 2249–2258.

Zhao, L., O'Neill, K., and Brinton, R.D. (2006). Estrogenic agonist activity of ICI 182,780 (Faslodex) in hippocampal neurons: implications for basic science understanding of estrogen signaling and development of estrogen modulators with a dual therapeutic profile. J. Pharmacol. Exp. Ther. *319*, 1124–1132.

Zheng, Y., Zhang, J., Xu, Z., Sheng, J., Zhang, X., Wang, H., Teng, X., Liu, X., Cao, J., and Teng, L. (2010). Quantitative profiles of the mRNAs of ER-alpha and its novel variant ER-alpha36 in breast cancers and matched normal tissues. J. Zhejiang Univ. Sci. B *11*, 144–150.

Zong, F., Fthenou, E., Wolmer, N., Hollósi, P., Kovalszky, I., Szilák, L., Mogler, C., Nilsonne, G., Tzanakakis, G., and Dobra, K. (2009). Syndecan-1 and FGF-2, but not FGF receptor-1, share a common transport route and co-localize with heparanase in the nuclei of mesenchymal tumor cells. PLoS ONE *4*, e7346.

Zucker, S., Lysik, R.M., Zarrabi, M.H., and Moll, U. (1993). Mr 92,000 Type IV Collagenase Is Increased in Plasma of Patients with Colon Cancer and Breast Cancer. Cancer Res. *53*, 140–146.

Zwart, W., Griekspoor, A., Berno, V., Lakeman, K., Jalink, K., Mancini, M., Neefjes, J., and Michalides, R. (2007). PKA-induced resistance to tamoxifen is associated with an altered orientation of ERα towards co-activator SRC-1. EMBO J. *26*, 3534–3544.

Zwart, W., Leeuw, R. de, Rondaij, M., Neefjes, J., Mancini, M.A., and Michalides, R. (2010). The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. J Cell Sci *123*, 1253–1261.

Zwijsen, R.M.L., Wientjens, E., Klompmaker, R., Sman, J. van der, Bernards, R., and Michalides, R.J.A.M. (1997). CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. Cell *88*, 405–415.

## Résumé : Mise en évidence d'un dialogue entre la signalisation œstrogénique et le syndécane-1 dans les cellules de carcinome mammaire humain MCF7

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Sa croissance et sa progression sont dépendantes de signaux hormonaux, tels que les œstrogènes, et de l'interaction des cellules cancéreuses avec le microenvironnement matriciel. La perte d'expression du récepteur aux estrogènes ERα est un marqueur de mauvais pronostic et de non réponse à l'hormonothérapie. Dans ces tumeurs agressives, l'expression du SDC-1, un protéoglycane transmembranaire impliqué dans l'angiogenèse, la prolifération et l'invasion, est augmentée suggérant un antagonisme entre la signalisation œstrogénique et le SDC-1 dans ces tumeurs. En utilisant les cellules de carcinome mammaire ER(+) MCF7, nous avons montré que les œstrogènes via le récepteur ERa sont capables d'inhiber l'expression du SDC-1 par un mécanisme nécessitant une néosynthèse protéique et la phosphorylation d'ERa par la kinase IKK. Parallèlement, nos résultats montrent que la dérégulation de l'expression du SDC-1 affecte la réponse proliférative des œstrogènes dans les cellules MCF7 en modifiant la localisation subcellulaire d'ERα. Nos résultats montrent à la fois l'inhibition tonique et E2-induite de l'expression du SDC-1 par ERa dans les cellules MCF7 et la potentialité du SDC-1 à réduire la réponse œstrogénique de ces cellules. Ainsi, ces résultats sont autant d'arguments qui renforcent l'hypothèse d'un antagonisme entre la signalisation médiée par ERα et le SDC-1 lequel influencerait l'orientation phénotypique des cellules de carcinome mammaire.

Mots clés : Signalisation æstrogénique, Syndécane-1, Récepteur aux æstrogènes, Cancer du sein, MCF7

## Abstract : Evidence of a crosstalk between estrogenic signaling and syndecan-1 in human mammary carcinoma cells MCF7

Breast cancer is the most common cancer in women. Its growth and progression depend on hormone signals, such as estrogens, and on interactions with the matrix microenvironment. The loss of the estrogen receptor ER $\alpha$  expression is a poor prognosis marker and predicts a resistance to antihormonal therapies. In these aggressive tumors, SDC-1 expression, a transmembrane proteoglycan involved in angiogenesis, proliferation and invasiveness is increased suggesting an antagonism between estrogenic signaling and SDC-1 in breast tumors. Using ER (+) MCF7 mammary carcinoma cells, we have shown that estrogens via the ER $\alpha$  are able to inhibit the expression of SDC-1 by a mechanism requiring protein synthesis and phosphorylation of ER $\alpha$  by the IKK kinase. Additionally, our results show that dysregulation of SDC-1 expression affects the proliferative response to estrogens in MCF7 cells by altering the subcellular localization of ER $\alpha$ . Our results show both a tonic and E2-induced inhibition of SDC-1 expression by ER $\alpha$  in MCF7 cells and the potentiality of SDC-1 to reduce the estrogenic response of these cells. Thus, these results support the hypothesis that an antagonism between ER $\alpha$  signaling and SDC-1 which could influence the phenotypic orientation of mammary carcinoma cells.

Key words : Estrogenic signalisation, Syndecan-1, Estrogen Receptor, Breast cancer, MCF7