UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
UFR sciences médicales et pharmaceutiques de Besançon
Année universitaire 2011-2012

THESE

Pour l'obtention du doctorat de l'Université de Franche-Comté,
spécialité Sciences de la Vie et de la Santé

Ecole Doctorale Homme Environnement et Santé

n° bibliothèque : 25.12.01

Effet d'agonistes de PPARβ sur l'expression du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et des cadhérines E et N dans des modèles de cancers épithéliaux

Soutenue publiquement le 10 février 2012 par

Emmanuelle ROCHE DESGRANGES

Composition du Jury :

Directeur de thèse :	Dr. Sylvie FAUCONNET	Université de Franche-Comté/ CHU Besançon
Rapporteurs :	PD Dr. Liliane MICHALIK	Université de Lausanne (Suisse)
	Dr. Gilles PAGES	Université de Nice
Examinateurs :	Pr Isabelle PELLERIN	Université de Rennes
	Pr Xavier PIVOT	CHU Besançon

Remerciements

Merci aux rapporteurs et membres du jury :

A **Mme le Dr. Liliane Michalik** et **Mr le Dr. Gilles Pagès** pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.

A **Mme le Pr. Isabelle Pellerin** et **Mr le Pr Xavier Pivot** pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci tout particulièrement à ma directrice de Thèse, **Mme le Dr. Sylvie Fauconnet** pour son encadrement et l'aboutissement de ce projet.

Merci également à **Mme le Dr. Isabelle Lascombe** pour ses conseils et son aide dans tous les domaines.

Merci à **Mme le Pr. Christiane Mougin**, directrice de l'équipe EA3181, et à **Mr le Dr. Jean-Luc Pretet**, pour leur accueil et leurs conseils lors des réunions de l'équipe.

Merci à tous les membres de l'équipe EA3181 et de l'IFR133, que ce soit les anciens qui m'ont accueillie et aidée dans mes débuts, et les nouveaux qui m'ont soutenue dans les derniers moments.

Merci à tous mes amis, qui ont su me donner des conseils et m'encourager lorsque j'en avais besoin.

Merci à ma famille, à ma mère, à mon père et sa femme, à ma sœur Nina, à mes frères Guillaume, Raphaël, Matthieu et Hugo, et aux copines des plus grands.

Je dédie cette thèse à mon mari Alesk, qui a toujours été là pour moi et qui m'a toujours soutenue en toute circonstance, à mon fils Gabin, qui m'a donné le courage d'aller au bout, et à ma future fille qui a participé à la rédaction de cette thèse avant même sa naissance. Sans vous, jamais j'aurai pu accomplir ce travail, cette thèse est pour vous.

RESUME

L'évolution des tumeurs est dominée par les risques de progression vers l'invasion musculaire. Le potentiel invasif et métastatique d'une tumeur est contrôlé par l'angiogenèse *via* le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et par les altérations des systèmes impliqués dans l'adhérence cellulaire *via* les cadhérines. En effet, la progression tumorale se manifeste par une diminution voire une perte de l'expression de la cadhérine E (marqueur épithélial) concomitante à une expression *de novo* de la cadhérine N (marqueur mésenchymateux).

Dans ce travail, à partir d'un modèle de cellules cancéreuses, nous avons étudié l'effet du récepteur nucléaire PPARβ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) sur la synthèse du VEGF et l'expression des cadhérines E et N.

PPARβ est un facteur de transcription ligand-dépendant qui régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique. Ce récepteur est impliqué dans la prolifération cellulaire, la mort cellulaire, intervient dans la différenciation épithéliale et est aussi impliqué dans la carcinogenèse. Les activateurs de ce récepteur sont des acides gras à longues chaînes, leurs métabolites ou des molécules synthétiques d'un grand intérêt pharmacologique puisqu'ils sont en cours d'évaluation clinique pour le traitement des dyslipidémies, du diabète de type II ou des maladies cardiovasculaires.

Des résultats obtenus précédemment dans notre groupe de recherche ont montré que PPARβ est impliqué dans l'angiogenèse, puisque dans un modèle de cellules dérivées de cancer de la vessie, un agoniste (L-165041) augmente la transcription du gène *vegf*.

En revanche, dans des cellules Hela dérivées de cancer du col de l'utérus, cancer dont le facteur étiologique est un papillomavirus, le L-165041 augmente l'expression du VEGF par un mécanisme différent de celui observé dans les cellules urothéliales malignes. En effet, dans les cellules Hela, le ligand contrôle l'expression du VEGF non pas en augmentant sa transcription mais en stabilisant ses messagers. La stabilisation des ARNm VEGF n'est pas dépendante de la présence de l'oncoprotéine virale E6 d'HPV18, ni de l'augmentation de l'expression de la protéine p53, mais est la conséquence de l'activation de la voie p38 MAPK. Ainsi, la phosphorylation de la protéine p38 conduit, seule ou suite à une cascade de phosphorylations, à l'activation de la protéine HuR. En effet, après un traitement par l'agoniste de PPARβ, HuR se déplace du noyau vers le cytoplasme, où elle stabiliserait l'ARNm du *vegf* conduisant ainsi à l'augmentation de son expression. Par l'utilisation d'un inhibiteur chimique de l'activité transcriptionnelle du récepteur et de siRNA PPARβ, nous montrons, et ce pour la première fois, que l'effet du ligand stabilise l'ARNm du *vegf* indépendamment de l'activation transcriptionnelle du récepteur et surtout indépendamment de la présence cellulaire du récepteur PPARβ.

De plus, les agonistes de PPARβ ont un rôle à jouer dans le contrôle de l'expression des cadhérines E et N, puisque le ligand (L-165041) diminue l'expression de la cadhérine N dans des cellules cancéreuses de vessie représentatives d'une tumeur très agressive.

Cependant, l'effet de ces ligands sur l'expression des cadhérines n'est observé que dans des cellules dérivées de cancer de la vessie et non dans des cellules dérivées de cancer du col de l'utérus.

Ainsi, les ligands de PPARβ sont des molécules angiogéniques puisqu'elles augmentent l'expression du VEGF, et interviennent dans la TEM « transition épithélio-mésenchymeateuse » puisqu'ils régulent l'expression des cadhérines E et N.

Mots clés : PPARβ, VEGF, cadhérine, cancer de la vessie, cancer du col de l'utérus.

ABSTRACT

Survival and proliferation of cancer cells depend on angiogenesis. Tumors secrete various pro-angiogenic factors such as VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) which is a key mediator of angiogenesis. Moreover, adaptation and selection of cancer cells during tumor progression is accompanied by the emergence of the epithelial to mesenchymal (EMT) transitions in human solid tumors characterized by a convergent loss of epithelial markers such as E-cadherin, and gain of mesenchymal markers such as N-cadherin.

In this work, we studied the nuclear receptor PPARβ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β) effect on both VEGF synthesis and E- and N-cadherins expression in cells derived from epithelial cancers, the cervical cancer (Human PapillomaVirus-inducible) and the bladder cancer (non HPV-inducible).

PPARβ is a ligand-inducible transcription factor activated by both natural (fatty acids and derivatives) and high affinity synthetic agonists which present a pharmacological interest since they are clinically evaluated for the treatment of dislipidemiae, type II diabetes and cardiovascular diseases. It regulates the expression of genes involved in lipids and glucose metabolism. This receptor is involved in cell proliferation, cell death, epithelial differentiation and also in carcinogenesis. PPARβ is thought to play a role in angiogenesis development and VEGF regulation but its contribution remains unclear.

In a previous work performed in bladder cancer cells, we reported a PPARβ-mediated transcriptional up-regulation of VEGF expression without mRNA stabilization process and involving the MAPK/ERK1/2 signaling pathway. Until now, PPARβ agonism effect on VEGF expression in cervical cancer cells was unknown. This led to our interest in assessing the effect of PPARβ activation on the regulation of different VEGF isoforms mRNA expression and the impact of E6 oncoprotein and its target p53 on this regulation in cervical cancer cells. Here, we showed that the PPARβ agonist L-165041 induces $VEGF_{121}$, $VEGF_{165}$ and $VEGF_{189}$ expression in HPV positive cells but not in HPV negative cells. The underlying mechanisms did involve neither E6 oncoprotein nor p53. We highlighted a novel mode of PPARβ ligand action different from that we have previously described in bladder cancer cells including a post-transcriptional regulation of VEGF mRNA expression through the p38 MAPK signaling pathway and the activation of the mRNA-stabilizing factor HuR. But most importantly, we clearly demonstrated that L-165041 acts independently of PPARβ since its effect was not reversed by a chemical inhibition with a specific antagonist and the siRNA-mediated knockdown of the nuclear receptor. As VEGF is crucial for cancer development, the impact of PPARβ ligands on VEGF production is of high importance. Otherwise, preliminary results showed that L-165041 decreased the N-cadherin expression independently of the receptor only in high grade bladder cancer cells and VEGF increased it.

To conclude, PPARβ ligand increased VEGF expression (in both cervical and bladder cancer cells) but decreased N-cadherin and VEGF increased N-cadherin. These apparently contradictory results need further investigations. More especially, it would be interesting to explore the biological effect of the different VEGF isoforms. The molecular mechanism of PPARβ ligand action has to be elucidated and as a result, PPARβ agonists currently in clinical trials should be carefully monitored.

Keywords : PPARβ, VEGF, N-cadherin, bladder cancer, cervical cancer.

Figures ..... - 5 -
Tableaux ..... - 7 -
Abréviations ..... - 9 -

Introduction ..... - 13 -
I. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta (PPARβ) ..... - 19 -
1. Isotypes de PPAR ..... - 19 -
2. Distribution tissulaire de PPARβ/δ ..... - 20 -
3. Structure du récepteur PPARβ ..... - 21 -
4. Nature des ligands ..... - 23 -
4.1. Ligands naturels ..... - 23 -
4.2. Ligands synthétiques ..... - 24 -
5. Mécanismes d'action ..... - 25 -
5.1. Hétérodimérisation ..... - 26 -
5.2. Liaison à l'ADN ..... - 26 -
5.3. Cofacteurs ..... - 27 -
5.4. Répression en absence de ligand ..... - 30 -
5.5. Action non génomique ..... - 31 -
6. Régulation par modifications post-traductionnelles ..... - 33 -
6.1. Phosphorylation ..... - 33 -
6.2. Ubiquitinylation ..... - 35 -
6.3. Sumoylation ..... - 36 -
7. Rôles ..... - 36 -
7.1. Métabolisme lipidique ..... - 37 -
7.2. Différenciation cellulaire ..... - 38 -
7.3. Rôle dans la carcinogenèse ..... - 39 -
7.4. PPARβ et angiogenèse tumorale ..... - 43 -
II.Angiogenèse tumorale ..... - 47 -
1. Généralités ..... - 47 -
2. Facteurs angiogéniques ..... - 50 -
3. Thérapie anti-angiogénique ..... - 51 -
4. VEGF ..... - 53 -
4.1. Famille des VEGF ..... - 53 -
4.1.1. Le VEGF-A ..... - 53 -
4.1.2. Le VEGF-B ..... - 55 -
4.1.3. Le VEGF-C ..... - 56 -
4.1.4. Le VEGF-D ..... - 56 -
4.1.5. Le VEGF-E ..... - 56 -
4.1.6. Le PlGF ..... - 56 -
4.2. Les récepteurs du VEGF ..... - 57 -
4.2.1. Le VEGFR-1 ..... - 57 -

4.2.2. Le VEGFR-2 ..... - 58 -
4.2.3. Le VEGFR-3 ..... - 59 -
4.2.4. Les neuropilines ..... - 59 -
4.2.5. Les héparanes sulfates ..... - 60 -
4.3. Rôles du VEGF ..... - 61 -
4.3.1. Perméabilité ..... - 62 -
4.3.2. Prolifération ..... - 62 -
4.3.3. Survie ..... - 63 -
4.3.4. Migration ..... - 63 -
4.4. Régulation du VEGF ..... - 64 -
4.4.1. Régulation transcriptionnelle du VEGF ..... - 65 -
4.4.2. Régulation de la stabilisation des messagers du VEGF ..... - 67 -
4.4.3. Régulation de la traduction du VEGF ..... - 72 -
III. Adhérence cellulaire ..... - 72 -
1. Généralités ..... - 72 -
2. Les cadhérines ..... - 73 -
2.1. Généralités ..... - 73 -
2.2. Structure ..... - 74 -
2.3. Complexe d'adhérence cadhérine E / caténines ..... - 75 -
2.4. Fonctions de la cadhérine E ..... - 76 -
2.4.1. Régulation de la signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase ..... - 76 -
2.4.2. Régulation de la voie de la caténine β ..... - 77 -
2.4.3. Régulation de la signalisation des Rho GTPases ..... - 80 -
2.5. Fonctions de la cadhérine N ..... - 80 -
3. La transition épithélio-mésenchymateuse ..... - 83 -
4. Régulation de la TEM ..... - 84 -
5. Valeur pronostique des cadhérines dans les cancers ..... - 85 -

Cadre & But du travail ..... - 87 -

Matériel & méthodes ..... - 93 -
I. Culture cellulaire ..... - 94 -
1. Lignées cellulaires ..... - 95 -
2. Maintien des lignées cellulaires en culture ..... - 95 -
3. Traitements des cellules ..... - 96 -
II. Etude par cytométrie de flux ..... - 96 -
III. Etude de l'expression des ARNm ..... - 97 -
1. Extraction des ARN totaux ..... - 97 -
2. Traitement des ARN à la DNase I et transcription inverse ..... - 97 -
3. PCR (Polymerase Chain Reaction) PPARα, β et γ et GAPDH ..... - 98 -

4. PCR en temps réel ..... - 98 -
4.1. qPCR ciblant les transcrits des isoformes 121, 165 et 189 du VEGF ..... - 98 -
4.2. qPCR ciblant les transcrits e6 d'HPV18, de la cadhérine E et de la cadhérine N.....- 99 -
IV. Etude de l'expression des protéines ..... - 101 -
1. Extraction et quantification des protéines totales..... - 101 -
2. Extraction des protéines cytosoliques et nucléaires ..... - 101 -
3. Western-blotting..... - 101 -
3.1. Migration et électrotransfert..... - 101 -
3.2. Hybridation et révélation..... - 102 -
4. Dosage du VEGF total par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)..... - 103 -
V. Etude de l'activité luciférase ..... - 103 -
1. Transfection transitoire ..... - 103 -
2. Préparation des lysats cellulaires..... - 104 -
3. Détermination de l'activité luciférase ..... - 104 -
VI. Interférence à l'ARN ..... - 104 -

Résultats ..... - 107 -
I. Effet du ligand de PPARβ sur l'expression du VEGF-A ..... - 108 -
II. Effet du L-165041 sur l'expression des cadhérines..... - 171 -
1. Distribution des cadhérines ..... - 171 -
2. Effet du L-165041 sur l'expression des cadhérines E et N ..... - 172 -
3.Voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'effet du L-165041 sur l'expression de la cadhérine N ..... - 176 -
4. L'effet du L-165041 est-il dépendant de l'activité du récepteur PPARβ ?..... - 177 -
5. Analyse par cytométrie de flux de l'effet du L-165041 sur le cycle cellulaire..... - 179 -
6. Rôle du VEGF dans l'effet du L-165041 sur l'expression des cadhérines E et N.... - 181 -
6.1. Expression des récepteurs au VEGF dans les cellules RT4 et T24..... - 181 -
6.2. Effet du VEGF exogène sur l'expression des cadhérines E et N ..... - 182 -
6.3. Effet de l'association du L-165041 et du VEGF sur l'expression des cadhérines E et N…… ..... - 183 -
6.4. Effet du L-165041 sur l'expression du VEGF165b ..... - 185 -

Discussion & perspectives..... - 187 -

Bibliographie..... - 201 -

Annexes..... - 247 -

Figures

Figure 1 : Les étapes de la progression tumorale.. ..... - 18 -

Figure 2 : Organisation structurale de PPARβ. ..... - 22 -

Figure 3 : Ligands naturels de PPARβ. ..... - 24 -

Figure 4 : Ligands synthétiques de PPARβ..... - 25 -

Figure 5 : Mécanismes de transactivation de la transcription de gènes cibles de PPARβ. - 29 -

Figure 6 : Mécanismes de répression de la transcription de gènes cibles de PPARβ en absence de ligand. ..... - 30 -

Figure 7 : Mécanismes d'action non génomique de PPARβ..... - 32 -

Figure 8 : Les étapes de l'angiogenèse. ..... - 49 -

Figure 9 : Schéma des transcrits alternatifs du VEGF humain. ..... - 54 -

Figure 10 : Récepteurs tyrosine kinase des isoformes et isotypes du VEGF..... - 58 -

Figure 11 : Structure de NRP-1 et formation du complexe VEGFR-2/NRP-1..... - 60 -

Figure 12 : Voies de signalisation intracellulaires activées par le VEGF et fonctions physiologiques du VEGF. ..... - 64 -

Figure 13 : Représentation schématique des sites de fixation de facteurs de transcription sur le promoteur du *vegf*..... - 65 -

Figure 14 : Structure des cadhérines. ..... - 75 -

Figure 15 : Rôle de la caténine β dans la voie de signalisation Wnt..... - 78 -

Figure 16 : Rôle de la caténine p120 cytosolique et nucléaire en absence de cadhérine E.- 79 -

Figure 17 : Fonctions de la cadhérine N dans le cancer.. ..... - 82 -

Figure 18 : Position des amorces et de la sonde Taqman pour la quantification spécifique des transcrits des isoformes du VEGF (VEGF 121, 165 et 189)..... - 99 -

Figure 19 : Analyse, par RT-qPCR et dosage ELISA dans les milieux conditionnés, de l'effet du L-165041, ligand de PPARβ sur l'expression du VEGF dans les cellules CaSki..... - 111 -

Figure 20 : Analyse de la présence du récepteur PPARβ par western-blotting et de sa fonctionnalité par mesure de l'activité luciférase dans les cellules CaSki..... - 112 -

Figure 21 : Analyse de l'effet des ligands de PPARα, β et γ sur l'expression du VEGF par RT-qPCR, et de sa fonctionnalité par mesure de l'activité luciférase dans les cellules HeLa..... ..... - 114 -

Figure 22 : Analyse par western-blotting de l'expression des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. ..... - 115 -

Figure 23 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de la cadhérine E et de la cadhérine N..... ..... - 172 -

Figure 24 : Analyse par western-blotting de l'expression de la cadhérine E et de la cadhérine N. ..... - 172 -

Figure 25 : Analyse par RT-qPCR de l'effet du L-165041 sur l'expression des transcrits de la cadhérine E et de la cadhérine N. ..... - 173 -

Figure 26 : Analyse par western-blotting de l'effet du L-165041 sur l'expression de la cadhérine E et de la cadhérine N. ..... - 174 -

Figure 27 : Analyse par western-blotting de l'effet de concentrations croissantes de L-165041 sur l'expression de la cadhérine N. ..... - 175 -

Figure 28 : Analyse par RT-qPCR de l'effet de différentes concentrations de L-165041 sur l'expression des transcrits de la cadhérine N. ..... - 175 -

Figure 29 : Analyse par western-blotting de l'effet d'inhibiteurs de voies de signalisation sur la diminution de l'expression de la cadhérine N induite par le L-165041. ..... - 176 -

Figure 30 : Analyse par western-blotting de l'effet d'un antagoniste de PPARβ sur la diminution de l'expression de la cadhérine N par le L-165041.. ..... - 177 -

Figure 31 : Analyse de l'effet de concentrations croissantes de L-165041 sur l'expression de la A-FABP. ..... - 178 -

Figure 32 : Analyse par western-blotting de l'effet d'un antagoniste de PPARβ sur la surexpression de la A-FABP par le L-165041. ..... - 179 -

Figure 33 : Analyse par cytométrie de flux de l'effet de concentrations croissantes de L-165041 sur la mort cellulaire des cellules T24. ..... - 179 -

Figure 34 : Analyse par cytométrie de flux de l'effet de concentrations croissantes de L-165041 sur le cycle cellulaire des cellules T24. ..... - 180 -

Figure 35 : Analyse par western-blotting de l'expression des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. ..... - 181 -

Figure 36 : Analyse par RT-qPCR de l'effet du VEGF sur l'expression des transcrits de la cadhérine E et de la cadhérine N. ..... - 182 -

Figure 37 : Analyse par western-blotting de l'effet du VEGF sur l'expression de la cadhérine E et de la cadhérine N. ..... - 183 -

Figure 38 : Analyse par western-blotting de l'effet du co-traitement VEGF + L-165041 sur l'expression de la cadhérine E et de la cadhérine N. ..... - 184 -

Figure 39 : Position des amorces pour la quantification spécifique des transcrits des isoformes du VEGF165 et VEGF165b. ..... - 185 -

Figure 40 : Analyse par RT-qPCR de l'effet du L-165041 sur l'expression des transcrits du VEGF165 et VEGF165b. ..... - 186 -

Tableaux

Tableau I : Traitements et concentrations utilisés pour stimuler les cellules ..... - 96 -

Tableau II: Séquences des amorces sens et antisens utilisées lors des PCR ..... - 98 -

Tableau III : Conditions de PCR ..... - 98 -

Tableau IV : Séquences des amorces et de la sonde utilisées lors des qPCR..... - 99 -

Tableau V : Concentrations et séquences des amorces et des sondes utilisées lors des qPCR.....- 100 -

Tableau VI : Anticorps utilisés en western-blotting ..... - 102 -

Abréviations

A
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AF : Activation Function
A-FABP : Adipocyte-Fatty Acid Binding Protein
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique
Ang : Angiopoïétine
AP : Activator Protein
APC : Adenomatous Polyposis Coli
ARE : Adenine and uridine Rich Element
ARE-BP : ARE Binding Protein
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : ARN messager
ARNpol : ARN polymérase

B
BAD : Bcl-2 Associated Death promoter
BCG : Bacillus Calmette Guérin
Bcl-2 : B-cell lymphoma-2

C
CAD : Cadherin Amino-terminal Domain
CARLA : Coactivator-dependent Receptor Ligand Assay
CARM : Coactivator-Associated arginine Methyltransferase
CBP : CREB Binding Protein
C/EBP : CCAAT-Enhancer-Binding Protein
CIS : Carcinome *In Situ*
CK1 : Caséine Kinase 1
CLIC : Chloride Intracellular Channel protein
CoA : Co-activateur
Cox-2 : Cyclo-oxygénase-2
CRBP : Cellular Retinol Binding Protein
CREBP : cAMP Response Element Binding Protein

D
DAG : Diacylglycerol
DBD : DNA Binding Domain
DR : Direct Repeat
DRIP : vitamine D Receptor Interacting Protein
DSH : Dishevelled

E
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : EGF Receptor
ELAV : Embryonic Lethal Abnormal Vision
ER : Estrogen Receptor
ERE : Estrogen Response Element
Erg : Early gene response protein
ERK : Extracellular-signal-Regulated Kinase

F
FAK : Focal Adhesion Kinase
FDA : Food and Drug Administration
FGF : Fibroblast Growth Factor
FT : Facteur de Transcription
Flt : Fms-Like Tyrosine kinase
Flk : Fetal Liver Kinase
Fz : Frizzled

G
GDP : Guanosine Diphosphate
GEF : GDP Exchange Factor
GTP : Guanosine Triphosphate
GRIP : Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein 1
GSK3β **:** Glycogen Synthase Kinase 3 beta

H
HAT : Histone Acetyltransferase
HAV : Histidine-Alanine-Valine
HDAC : Histone Desacetylase
HDL : High Density Lipoprotein
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HIF : Hypoxia Inducing Factor
HPV : Human Papillomavirus
HRE : HIF-Responsive Element
HSP : Heat Shock Protein

I
ICAM : Intracellular Adhesion Molecule
IGF : Insulin-like Growth Factor
IL : Interleukine
IP3 : Inositol 1,4,5 triphosphate

IRES : Internal Ribosome Enter Site

K
KBS : Kaiso Binding Site
kDa : kilo Dalton
KDR : Kinase insert Domain containing Receptor-human homologue
KLF : Krüppel-Like transcription Factor

L
LBD : Ligand Binding Domain
LDL : Low Density Lipoprotein
Lef-1 : Lymphoid enhancing factor 1
LRP : Lipoprotein receptor-Related Protein
LXR : Liver X Receptor
LXRRE : LXR Response Element

M
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
Mcl : Myeloid cell leukemia
MCP : Macrophage Chemoattractant Protein
MEC : Matrice Extracellulaire
MK2 : MAPK activated protein Kinase 2
MMP : Matrix Metalloproteinase
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

N
NCoR : Nuclear receptor co-Repressor
NF-κB : Nuclear Factor κB
NLS : Nuclear Localization Sequence
NOS : Nitric Oxide Synthase
NRC : Nuclear Receptor nomenclature Committee
NRP : Neuropiline
NSAID : Non Steroid Anti-Inflammatory Drug
NSCLC : Non-Small Cell Lung Cancer

P
PBP : PPAR Binding Protein
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR : PDGF Receptor
PG : Prostaglandine
PGC1 : PPARγ Coactivateur
PI3K : Phosphoinositide 3 Kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKA : Protéine Kinase A
PKB : Protéine Kinase B
PKC : Protéine Kinase C
PLC : Phosphoinositide phospholipase C
PlGF : Placental Growth Factor
PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acétate
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPRE : Peroxisome Proliferator Response Element
pRb : protéine du Rétinoblastome
PRE : Progesterone Response Element
PRIC : PPAR*α*-Receptor Interacting Cofactor
ProTα : Prothymosin α
PS1 : Présenilline-1
PVDF : Polyvinylidene Fluoride

R
Ras : Rat sarcoma
RAR : Retinoic Acid Receptor
RIP140 : Receptor Interacting Protein 140
RT-PCR : Reverse Transcription PCR
RXR : Retinoid X Receptor

S
SAPK : Stress-Activated Protein Kinase
SH2 : Src Homology-2
SIP1 : Smad-Interacting Protein 1
SIRT : Sirtuin
SMRT : Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptor
Sp : Specificity Protein
SRC : Steroid Receptor Coactivator
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
SUMO : Small Ubiquitin-like MOdifier

T
TBL1 : Transducin β-Like 1
TBLR1 : TBL 1 Related protein
Tcf4 : T-cell transcription factor 4
TGFβ : Transforming Growth Factor
TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TIF : Transcriptional Intermediary Factor 2

TIS11b : Tetra-decanoyl phorbol acetate-Induced Sequence 11b
TNFα : Tumor Necrosis Factor
TPA : O-TetradecanoylPhorbol-13-Acetate
TRAP : Thyroid hormone Receptor-Associated Protein
TSP : Thrombospondin
TTP : Tristetraproline
TVIM : Tumeur de la Vessie avec Infiltration Musculaire
TVNIM : Tumeur de la Vessie sans Infiltration Musculaire
TZD : Thiazolidinedione

U
uPa : Plasminogène
UTR : Untranslated Region
UV : Ultraviolet

V
VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR : VEGF Receptor
VLDL : Very Low Density Lipoprotein

Z
ZF : Zinc Finger

Introduction

A ce jour, en France, le cancer est l'une des premières causes de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme avec 357 500 nouveaux cas en 2010 (203 000 chez l'homme et 154 500 chez la femme). Un cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire incontrôlée au sein d'un tissu normal suite à la transformation par mutation d'une cellule initialement normale. Pour devenir cancéreuse, la cellule va subir un nombre important d'altérations génétiques conduisant à la perte du contrôle du cycle cellulaire permettant à la cellule d'échapper à la mort, d'acquérir une résistance à des signaux inhibiteurs de la prolifération et d'avoir un potentiel réplicatif illimité. La progression tumorale comprend une série d'événements complexes permettant à la tumeur de se développer grâce à l'angiogenèse tumorale et d'envahir les tissus environnants suite à l'acquisition de propriétés invasives. Certaines cellules vont ainsi réaliser une transition épithélio-mésenchymateuse ou TEM et exprimer un phénotype mésenchymateux ; en effet, suite à la modification de leur cytosquelette, les cellules vont exprimer certaines molécules d'adhérence qui leur permettront d'acquérir un phénotype invasif et vont synthétiser des enzymes protéolytiques capables de dégrader la matrice extracellulaire.

La première phase de la carcinogenèse est appelée initiation. Durant cette phase, des cellules épithéliales normales subissent des altérations génétiques. Par exemple, la cellule va être exposée à des facteurs cancérogènes tels que des rayonnements, des substances chimiques ou un virus (le papillomavirus humain dans le cas du cancer du col de l'utérus). Ces mutations aboutissent à la perte de points de contrôle du cycle cellulaire, à l'activation d'oncogènes et/ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. Les oncogènes sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire car ce sont des activateurs de la prolifération (c-myc) ou des inhibiteurs de la mort cellulaire (BCL-2 ou BCL-XL), tandis que les gènes suppresseurs de tumeur sont impliqués dans l'arrêt de la prolifération car ce sont des inducteurs d'apoptose ou des régulateurs du cycle cellulaire (p53, pRB, APC…). Ces mutations vont donc permettre à la cellule tumorale d'acquérir un potentiel de prolifération incontrôlée, associé à une résistance à la mort par apoptose. De plus, l'inactivation de gènes qui assurent la réparation des anomalies de l'ADN conduit à l'accumulation d'anomalies génétiques. La chronologie de ces événements est le plus souvent caractéristique d'un type de cancer. Par exemple, dans le cancer du côlon, la suite d'événements comprend, l'inactivation du gène suppresseur de tumeur APC, la mutation de l'oncogène K-Ras puis l'inactivation du gène suppresseur de

tumeur p53. L'altération du gène APC est spécifique du cancer du côlon alors que l'inactivation du gène p53 est retrouvée dans la plupart des cancers.

La transformation des cellules est définie par deux étapes, l'initiation et la promotion de la cancérogenèse, et cette étape est caractérisée par l'immortalisation des cellules. En effet, les cellules sont maintenant incapables d'initier leur propre mort. Les cellules transformées forment alors une tumeur primaire.

Au stade initial, la tumeur est avasculaire. Lorsque la tumeur atteint 2 mm^3, les cellules intra-tumorales sont en hypoxie. Cet état hypoxique va engendrer une cascade d'événements pro-angiogéniques tels que la sécrétion de facteurs angiogéniques (VEGF ou Vascular Endothelial Growth Factor), l'inhibition de la synthèse d'inhibiteurs de l'angiogenèse et la synthèse d'enzymes protéolytiques. Cette cascade d'événements va conduire à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants : c'est l'angiogenèse tumorale.

Dans les conditions physiologiques, il existe un équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques et les facteurs anti-angiogéniques. La sécrétion de facteurs angiogéniques par la cellule tumorale rompt cet équilibre en faveur des facteurs pro-angiogéniques : c'est le processus de « switch » angiogénique, qui va déclencher l'angiogenèse tumorale avec pour conséquence la croissance tumorale et la dissémination métastatique, puisque l'apport en nutriments et en oxygène est indispensable à la survie et au développement de la tumeur. L'acquisition du potentiel angiogénique va conditionner l'acquisition du potentiel métastatique de la tumeur. En effet, les cellules tumorales vont perdre leur phénotype épithélial en faveur d'un phénotype mésenchymateux.

Les cellules épithéliales forment une couche cellulaire due au fait qu'elles sont étroitement juxtaposées et associées les unes aux autres par des jonctions intercellulaires telles que les jonctions serrées, les jonctions adhérentes ou les desmosomes. Ces cellules adoptent une structure apico-basale, suite à une polarisation des filaments d'actine, et des faces latérales jointives grâce à la présence de molécules d'adhérence (cadhérines et intégrines), et sont séparées du tissu conjonctif par une membrane basale.

L'invasion tumorale sera permise grâce à la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire (MEC), mais, auparavant, nécessitera la perte d'expression ou de

fonctionnalité de molécules responsables de l'adhérence cellulaire. Ces molécules sont notamment la cadhérine E, protéine impliquée dans les jonctions adhérentes. Bien évidemment, ce processus implique la perte de fonctionnalité d'autres acteurs de l'adhérence cellulaire, que sont les protéines occludine et claudines qui sont des molécules des jonctions serrées. Les cellules vont ensuite perdre leurs propriétés épithéliales pour acquérir certaines propriétés des cellules mésenchymateuses, c'est la TEM.

Les cellules tumorales vont alors exprimer certaines caractéristiques de cellules mésenchymateuses, ce qui va se traduire par la perte de la polarisation apico-basale, la diminution des contacts serrés avec les autres cellules, ce qui conduira à la désorganisation de la couche cellulaire. Les cellules vont ensuite acquérir des propriétés migratoires et seront capables de synthétiser et de sécréter des enzymes protéolytiques que sont les métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui vont dégrader la membrane basale, ce qui permettra à la cellule d'envahir le tissu environnant. La désorganisation de la couche cellulaire est souvent le résultat de la perte d'expression d'une protéine épithéliale, la cadhérine E, associée à l'acquisition d'une cadhérine mésenchymateuse, la cadhérine N : c'est le « cadherin switch ». La cadhérine N va permettre aux cellules tumorales d'interagir avec le stroma environnant, et faciliter leur migration vers les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, ce qui va générer la formation à distance de métastases.

Les cellules vont pénétrer les vaisseaux par intravasation puis seront transportées de manière passive par le système circulatoire vers d'autres organes. Seules 0,01 % des cellules tumorales circulantes vont conduire à la formation de métastases car elles vont être confrontées au système immunitaire. En effet, les cellules cancéreuses sont en contact avec les cellules circulantes du système de défense (Natural Killer, lymphocytes T cytotoxiques) qui vont lyser et détruire une grande partie d'entre elles. Les cellules cancéreuses non lysées vont traverser l'endothélium vasculaire par extravasation puis envahir un nouvel organe afin d'établir des tumeurs à distance du foyer initial.

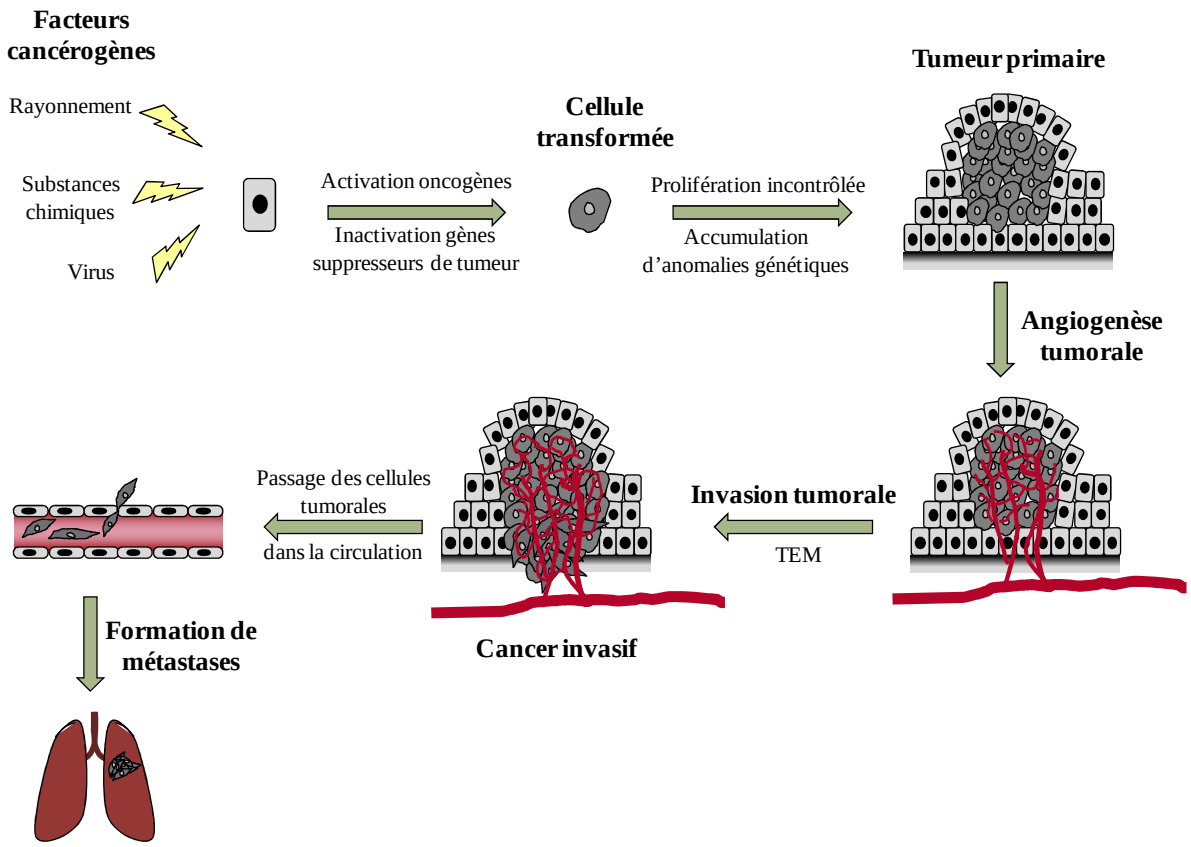

Figure 1: Les étapes de la progression tumorale. D'après Geiger et Peeper, 2009.

L'acquisition du potentiel métastatique d'une tumeur, donc la formation de métastases, fait du cancer une maladie difficile à traiter.

Comprendre les différents mécanismes contrôlant la progression tumorale engendrerait sans aucun doute des progrès cliniques dans le traitement des cancers. C'est d'ailleurs l'un des objectifs de notre équipe de recherche. En effet, l'identification de marqueurs moléculaires prédictifs et pronostiques de progression des cancers épithéliaux, permettrait d'établir un diagnostic plus précis afin de proposer des traitements plus adaptés dans le cas des cancers du col de l'utérus et de la vessie. Par ailleurs, la modulation de l'expression de ces marqueurs moléculaires devrait permettre de bloquer la progression tumorale et par conséquent le développement de métastases.

I. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta (PPARβ)

Les PPAR appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux. Trois isotypes ont été clonés et identifiés, PPARα (NR1C1), PPARβ/δ (NR1C2) et PPARγ (NR1C3) (Nuclear Receptor Nomenclature Committee, 1999) (Dreyer *et al.*, 1992). Ces récepteurs se distinguent par leur distribution tissulaire et la nature de leurs ligands.

Ce sont des facteurs de transcription qui interviennent dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. En effet, les récepteurs PPAR contrôlent le métabolisme lipidique et glucidique et interviennent dans les processus de prolifération, de différenciation et d'apoptose (Kersten *et al.*, 2000). De par leur effet sur ces différents mécanismes moléculaires, ils sont impliqués dans un certain nombre de pathologies comme le diabète, l'obésité, l'inflammation, l'athérosclérose et le cancer. Augmenter ou diminuer l'activité biologique de ces récepteurs a suscité un grand intérêt pharmacologique au regard des effets bénéfiques qu'ils induisent dans plusieurs pathologies.

1. Isotypes de PPAR

La découverte du premier PPAR (PPARα) chez les rongeurs date de 1990 (Issemann and Green, 1990) ; peu de temps après, les 3 isotypes (PPARα, β et γ) ont été identifiés chez le xénope (Dreyer *et al*., 1992) et ensuite dans différentes espèces dont la souris, le rat, le hamster et l'Homme (Sher *et al.*, 1993).

Bien que les 3 isotypes de PPAR soient codés par des gènes distincts localisés sur des chromosomes différents, leurs protéines montrent de nombreuses homologies de séquence en acides aminés, en particulier dans le domaine de liaison à l'ADN et dans le domaine de liaison du ligand. La structure générale des 3 gènes codant les PPAR montre une organisation génomique conservée de 6 exons, quel que soit le modèle étudié (xénope, souris, Homme). Ceci indique que ces gènes dérivent probablement d'un gène ancestral commun.

Dans ce document, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'un de ces isotypes, PPARβ. Chez l'Homme, le gène codant PPARβ est localisé sur le chromosome 6 à la position 6p21.1-p21.2 (Yoshikawa *et al.*, 1996) et présente 90% d'identité de séquence nucléotidique avec le gène *pparβ* des rongeurs, mais présente aussi des homologies de

séquence avec le PPARβ du xénope et du poulet (Takada *et al.,* 2000). PPARβ a aussi été identifié chez le poisson et il semblerait que les domaines C et E de ce récepteur présentent plus de 70% d'homologie de séquence en acides aminés avec les domaines C et E de la protéine humaine (Leaver *et al.,* 2005).

La protéine PPARβ, constituée de 441 acides aminés, est organisée selon une structure en 5 domaine fonctionnels, A/B, C, D et E (Schoonjans *et al.,* 1996 ; Feige *et al.,* 2006). Un exon code le domaine A/B N-terminal, 2 exons codent le domaine de fixation à l'ADN (un exon pour chaque motif en doigt de zinc), un exon code la région charnière D, 2 exons codent le domaine de liaison au ligand (Desvergne et Wahli, 1999).

2. Distribution tissulaire de PPARβ/δ

De façon générale, les PPAR sont exprimés dans tous les organes où le catabolisme lipidique est élevé, tels que le foie, le cœur, les reins, le tissu adipeux ou le muscle squelettique. Leur expression tissulaire semble donc refléter leur fonction biologique (Braissant *et al.,* 1996). Chez le xénope, PPARβ a une expression ubiquitaire avec un taux relativement élevé dans le cerveau (Dreyer *et al.,* 1993). Chez le rat, PPARβ est fortement exprimé dans les premiers jours de la vie du jeune animal puis son expression diminue chez l'adulte. Cependant, lorsque son taux d'expression est comparé à celui des autres PPAR, PPARβ est plus exprimé que PPARα et PPARγ dans des tissus comme le système nerveux central, les reins, l'intestin et le côlon (Braissant *et al.,* 1996). PPARβ est aussi exprimé dans l'endomètre où il semble jouer un rôle important lors de la nidation du blastocyste puisqu'un taux élevé de ce récepteur a été détecté dans l'endothélium endométrial au moment de l'implantation de l'embryon (Lim *et al.,* 1999). Chez la souris, l'invalidation du gène *pparβ* (*pparβ*$^{-/-}$) n'est pas létale mais modifie considérablement le phénotype de la souris. En effet, cette dernière sera de plus petite taille, avec une diminution de la masse adipeuse et des défauts dans la croissance, le développement et la différenciation de nombreux types cellulaires (Barak *et al.,* 2002 ; Michalik *et al.,* 2001 ; Peters *et al.,* 2000). Chez l'homme, PPARβ est ubiquitaire avec un taux d'expression selon les tissus testés, équivalent à celui déterminé chez les rongeurs (Auboeuf *et al.,* 1997 ; Loviscach *et al.,* 2000). A l'heure d'aujourd'hui, peu d'études ont été réalisées sur la détection et la quantification du PPARβ dans les tissus normaux et tumoraux de la vessie. Chez l'homme, PPARβ est exprimé par l'urothélium normal (Chopra *et al.,* 2008 ; Guan *et al.,* 1997 ; Guan, 2002) mais aussi

pathologique car dans des échantillons tumoraux issus de 170 patients atteints de cancer de la vessie, sa présence a été révélée (Yoshimura *et al.*, 2003). D'autre part, PPARβ est exprimé par des cellules dérivées de cancer de vessie (RT4 et T24) (Fauconnet *et al.*, 2002 ; Chopra *et al.*, 2009). A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'expression du PPARβ dans les tissus normaux ou cancéreux du col de l'utérus. Cependant, au vu de nos résultats, nous pouvons supposer que celui-ci est exprimé dans les tissus cervicaux pathologiques issus de patientes atteintes de cancer de col de l'utérus puisqu'à partir d'un modèle *in vitro*, nous avons montré que PPARβ est exprimé dans les cellules HeLa, CaSki et C-33A, cellules dérivées de cancer du col de l'utérus.

3. Structure du récepteur PPARβ

Le récepteur PPARβ possède plusieurs domaines fonctionnels qui sont indépendants les uns des autres.

- Dans la région N-terminale siège le domaine A/B : c'est une zone variable dont la séquence en acides aminés est peu conservée entre les différents isotypes de PPAR. Ce domaine possède une fonction impliquée dans l'activation de la transcription en absence de ligand (AF-1, Activation Function-1) et présente plusieurs sites de phosphorylation (Werman *et al.*, 1997).

- Le domaine C constitue le domaine de fixation à l'ADN. Il contient 66 acides aminés qui permettent au récepteur de reconnaître une séquence spécifique d'ADN appelée PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element). Le domaine C est stabilisé par deux structures en doigt de gant comprenant chacune un atome de zinc, lié à 4 résidus cystéine (Luisi *et al.*, 1991). Les parties C-terminales des 2 doigts de gant à atome de zinc présentent une structure en hélice α. Le domaine C est fortement conservé au sein de la super-famille des récepteurs nucléaires en particulier au niveau de 2 régions appelées boîte P et boîte D. La boîte P (proximale) (CEGCKG) se situe dans la partie C-terminale du 1er doigt à atome de zinc et elle est directement impliquée dans la spécificité de reconnaissance d'un motif hexamérique localisé sur l'ADN (AGGTCA). La boîte D (distale), région localisée entre les 2 premiers résidus cystéine du 2ème doigt à atome de zinc, est impliquée dans les interfaces de dimérisation des récepteurs et dans la reconnaissance de l'espacement entre les 2 demi-sites de l'élément de réponse (Evans, 1988).

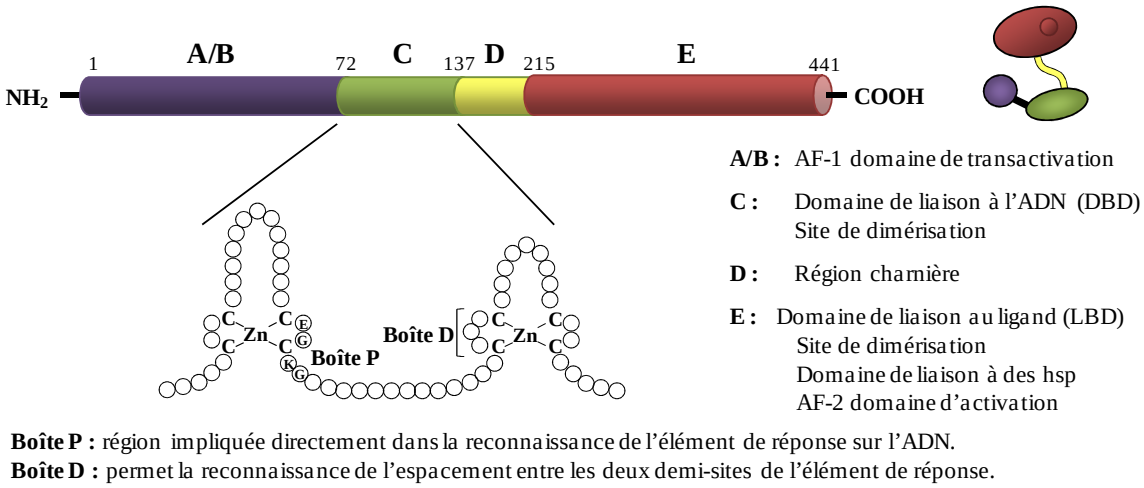

Figure 2: Organisation structurale de PPARβ. D'après Escher et Wahli, 2000.

- Le domaine D est une région charnière flexible entre les domaines C et E. Ce domaine permet au récepteur d'adopter des conformations qui vont faciliter les interactions mises en place par les domaines C et E et abrite un signal de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localization Signal), qui permet la translocation nucléaire du récepteur cytoplasmique. Ce domaine aurait un rôle à jouer dans les liaisons que le récepteur va établir avec les co-activateurs et les corépresseurs.

- Le domaine carboxy-terminal (E) est le domaine de liaison du ligand (LBD, Ligand Binding Domain). C'est un domaine multifonctionnel. Sa séquence est structurée en 12 hélices α et 4 feuillets β qui créent une cavité hydrophobe particulièrement large pouvant recevoir le ligand (Nolte *et al.*, 1998 ; Xu *et al.*, 1999 ; Xu *et al.*, 2001). La largeur de la poche laisse supposer que ces récepteurs sont activés par de nombreuses molécules lipophiles (naturelles et synthétiques) (Fyffe *et al.*, 2006). Cependant, le domaine E du PPARβ semble être plus petit que celui des récepteurs PPARα et γ, ce qui conditionnerait la spécificité du récepteur PPARβ vis-à-vis de ses ligands (Xu *et al.*, 2001). Le domaine E possède une fonction de transactivation dépendante de la liaison du ligand (AF-2, Activation Function-2) (Blanquart *et al.*, 2003), une surface qui est impliquée dans la dimérisation du récepteur ainsi qu'une surface impliquée dans les liaisons avec des protéines régulatrices de l'activité transcriptionnelle du récepteur. La liaison du ligand stabilise le LBD en une structure relativement rigide qui conduit à un changement global de conformation du récepteur permettant le recrutement des co-activateurs. Le recrutement des co-activateurs est permis

grâce à l'interaction qui existe entre les acides aminés conservés du domaine E du récepteur et les acides aminés du motif LxxLL des co-activateurs.

4. Nature des ligands

Les domaines de liaison du ligand des différents PPAR ont des séquences en acides aminés suffisamment différentes pour conditionner la sélectivité des ligands. De façon générale, les PPAR sont activés par des acides gras polyinsaturés à chaîne longue, leurs métabolites, et des molécules à grand intérêt pharmacologique (ligands synthétiques).

4.1. Ligands naturels

A l'heure d'aujourd'hui, parmi les ligands naturels identifiés présentant une forte (nM) ou une faible affinité (µM) pour le récepteur PPARβ, on distingue différents acides gras insaturés à longue chaîne comme l'acide linoléique ou l'acide arachidonique. Ces molécules sont capables de lier et d'activer PPARβ mais également PPARα et γ (Forman *et al.*, 1997). Les ligands du récepteur PPARβ sont aussi des métabolites des acides gras notamment certains eicosanoïdes tels que les prostaglandines des séries A, D, E2, I2 et J. Par exemple, la prostaglandine I2 ou prostacycline, est un ligand de PPARβ mais peut également lier et activer PPARα (Gupta *et al.*, 2000). Par contre, l'acide rétinoïque all-trans, qui est un ligand du RAR (Récepteur à l'Acide Rétinoïque), se lierait et activerait le récepteur PPARβ, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter la prolifération des cellules COS-7 (Shaw *et al.*, 2003). Cependant, dans des cellules humaines de kératinocytes (HaCaT), l'acide rétinoïque ne contrôlerait pas la transcription des gènes cibles de PPARβ mais celle des gènes cibles de RXR, suggérant que l'acide rétinoïque ne se lie pas et n'active pas le récepteur PPARβ (Borland *et al.*, 2008).

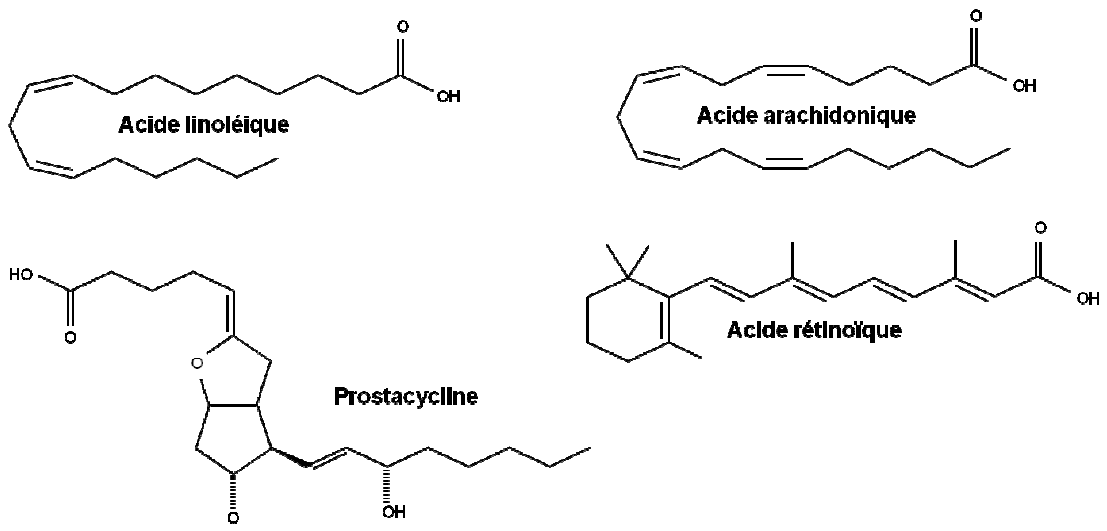

Figure 3 : Ligands naturels de PPARβ.

4.2. Ligands synthétiques

Compte-tenu du rôle important que peut avoir PPARβ dans le métabolisme lipidique et glucidique, des molécules synthétiques capables d'activer ce récepteur ont été développées. D'ailleurs, certaines d'entre elles sont à l'heure d'aujourd'hui en essais cliniques pour traiter certains symptômes du syndrome métabolique (Bedu *et al.,* 2005 ; Billin, 2008).

Actuellement, peu de ligands synthétiques de PPARβ ont été synthétisés. En effet, selon les données de la littérature, le L-165041 est le premier ligand synthétique, de haute affinité pour le récepteur PPARβ (Ki = 6 nM), à avoir été développé par les laboratoires Merck (Berger *et al.,* 1999). Par la suite, les molécules GW501516 (EC_{50} = 1,1 nM) et GW0742 ont été synthétisées avec une sélectivité améliorée pour PPARβ (Sznaidman *et al.,* 2003). Le GW501516 est la première molécule à avoir été testée dans un modèle animal de primates obèses. Dans ce modèle, l'absorption de cette molécule par les animaux conduit à un profil lipidique sérique favorable à la diminution des maladies cardiovasculaires. En effet, le transport inverse du cholestérol est favorisé et le taux plasmatique de triglycérides est diminué (Oliver *et al.,* 2001). Une étude récente montre que l'administration de GW501516 pendant 2 semaines chez des hommes présentant certains critères du syndrome métabolique, permet une amélioration de leur profil lipidique sérique, amélioration probablement due à une augmentation de l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique (Riserus *et al.,* 2008).

D'autres composés, ligands de PPARβ, ont été décrits dans la littérature. Nous pouvons citer le composé F qui a une haute affinité pour PPARβ mais aussi pour PPARγ (EC_{50} = 2 nM pour PPARβ et EC_{50} = 400 nM pour PPARγ) (Vosper *et al.*, 2001), la prostaglandine carba-prostacyclin, ligand et activateur de PPARβ, active également PPARα (Forman *et al.*, 1997). La méthode CARLA (coactivator-dependent receptor ligand assay) a permis de montrer que le bezafibrate, un composé hypolipidémique, a une haute affinité pour PPARβ sans être spécifique de ce récepteur (Krey *et al.*, 1997).

Néanmoins, pour comprendre le rôle biologique et pharmaceutique du récepteur PPARβ, des molécules antagonistes ont été développées comme le GSK0660 (Shearer *et al.*, 2008), le GSK3787 (Shearer *et al.*, 2010) et le SR13904 (Zaveri *et al.*, 2009).

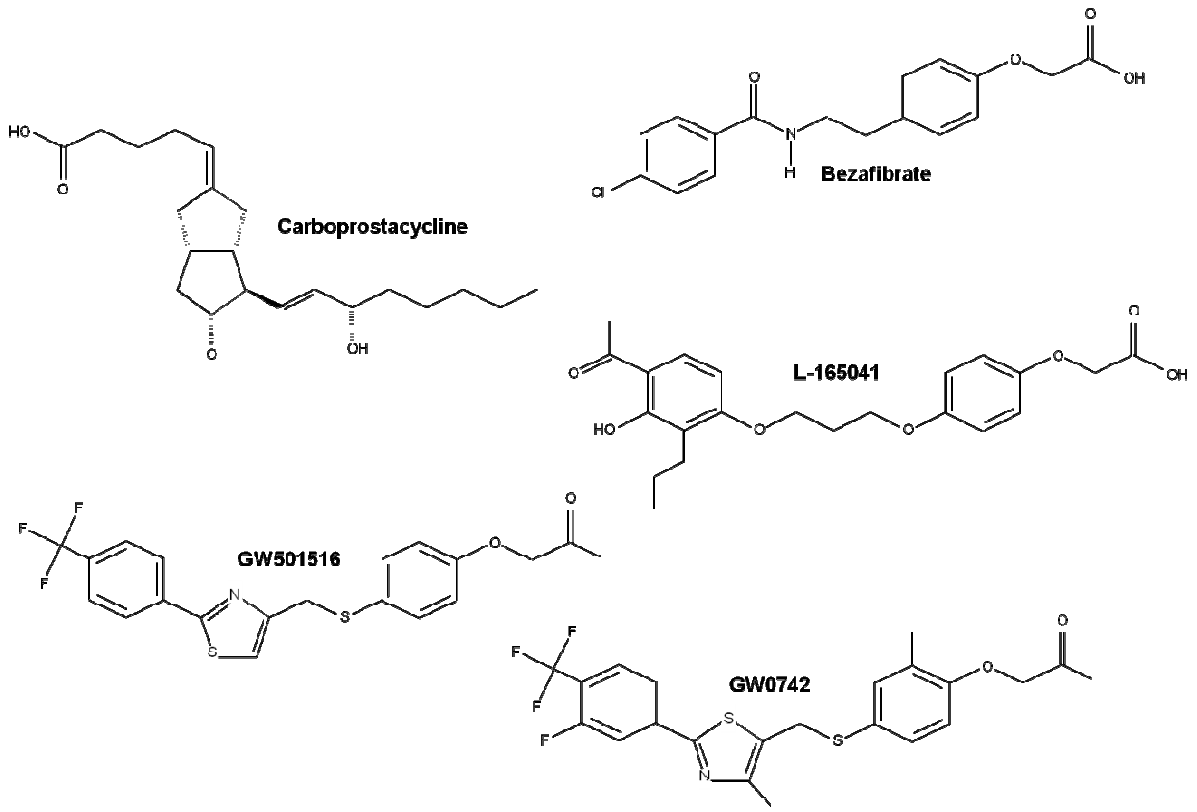

Figure 4 : Ligands synthétiques de PPARβ.

5. Mécanismes d'action

Les PPAR interviennent et contrôlent un certain nombre de fonctions biologiques selon différents mécanismes.

5.1. Hétérodimérisation

Ce qu'il y a de commun avec tous les récepteurs nucléaires, c'est que la fixation du ligand est un événement capital dans la fonction de régulation de l'activité transcriptionnelle des PPAR. En effet, une fois activés par un ligand naturel (acide gras par exemple) ou exogène (molécule pharmaceutique), les PPAR forment des hétérodimères avec les récepteurs de l'acide 9-cis rétinoïque (RXR), puis cet hétérocomplexe active la transcription en se fixant sur des séquences conservées de l'ADN (PPRE, peroxisome proliferator response element), localisées en 5' des gènes cibles (Kliewer *et al.,* 1992). Différentes isoformes de RXR (α, β et γ) existent et sont capables de s'hétérodimériser avec PPAR. D'ailleurs, l'affinité des hétérocomplexes pour leur élément de réponse serait conditionnée par la nature des hétérodimères formés (Juge-Aubry *et al.,* 1997).

De plus, selon certaines études, la formation de l'hétérodimère RXR/PPARβ peut s'établir en absence du ligand (Feige *et al.,* 2005). Pourtant, la liaison du ligand à son récepteur PPARβ potentialise la formation d'un complexe entre PPARβ et son partenaire RXRα (Matsusue *et al.,* 2006). Par contre, certains ligands synthétiques ou naturels (l'acide 9-cis rétinoïque) spécifiques de RXR, activent les complexes PPARβ/RXRα pour contrôler la transcription de gènes cibles de PPARβ. C'est pourquoi, l'ajout concomitante du ligand de RXR à celui de PPARβ, potentialise la transcription du gène cible de PPARβ (Ferre, 2004 ; Mukherjee *et al.,* 1997).

Cependant, dans la cellule, en plus de former des hétérocomplexes avec PPARβ, le récepteur RXR peut aussi former des hétérodimères avec RAR (Retinoic Acid Receptor) ; la présence de RXR va donc générer des compétitions entre le récepteur PPARβ et le récepteur RAR pour former l'hétérodimère RXR/PPARβ. La liaison des ligands spécifiques sur PPARβ et sur RXR favorise la formation de l'hétérodimère PPARβ/RXR et le recrutement de co-activateurs. Par contre, la formation de l'hétérodimère RAR/RXR laisse PPARβ associé à des corépresseurs (DiRenzo *et al.,* 1997).

5.2. Liaison à l'ADN

Lorsque le complexe PPARβ/RXR est formé, il se fixe au niveau de la séquence *cis*-régulatrice (PPRE) localisée dans la région promotrice du gène cible afin de permettre sa transcription. Généralement, une à plusieurs copies de PPRE existent dans le promoteur.

L'élément de réponse est formé par la répétition directe du motif hexamérique de reconnaissance des récepteurs nucléaires (DR ou Direct Repeat) espacée d'un nucléotide (DR-1) (AGGTCAnAGGTCA). Cette structure permet la fixation des 2 partenaires de l'hétérodimère qui reconnaissent chacun un motif hexamérique : PPARβ se fixe sur le motif en 5' et RXR sur le motif en 3' (IJpenberg *et al.,* 1997 ; IJpenberg *et al.,* 2004).

PPARβ existe dans la cellule, non libre mais complexé à des protéines auxiliaires et des corépresseurs et a vraisemblablement une localisation nucléaire. Les protéines complexées au PPARβ possèdent une activité déacétylase des histones (HDAC), ce qui permet de maintenir la structure chromatinienne sous forme compactée, empêchant ainsi toute transcription. Suite à la liaison de son ligand, PPARβ change de conformation, ce qui conditionne la libération des protéines auxiliaires et des corépresseurs, et le recrutement des co-activateurs présentant une activité acétylase. L'acétylation des histones conduit à une réorganisation du nucléosome permettant le recrutement de l'ARN polymérase II et la transcription des gènes cibles.

5.3. Cofacteurs

Les cofacteurs sont des protéines qui répriment (corépresseurs) ou stimulent (coactivateurs) l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires.

En absence de leur ligand, les hétérodimères PPAR/RXR sont liés aux corépresseurs NCoR (Nuclear Receptor Corepressor) et SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptor). NCoR et SMRT interagissent directement avec le répresseur transcriptionnel Sin 3 pour former un complexe multiprotéique, conditionnant le recrutement des HDAC (Nagy *et al.,* 1997). La compaction de la chromatine suite à l'hypoacétylation des histones permet de bloquer l'activité transcriptionnelle des PPAR. De nombreux corépresseurs ont été identifiés, comme RIP140 (receptor-interating protein 140), qui recrute des HDAC, et qui est un corépresseur fort de PPARα (Miyata *et al.,* 1998) mais aussi de PPARβ (Lim *et al.,* 2004).

En présence de ligand, la fixation de ce dernier à son récepteur provoque un changement conformationnel du récepteur, il s'en suivra la libération des corépresseurs qui seront ensuite dégradés par le protéasome, et le recrutement des co-activateurs. Ce mécanisme d'échange est favorisé par des facteurs d'échange TBL1 (transducin β-like 1) et TBLR1 (transducin β-like 1 related protein). Ces facteurs sont associés au complexe récepteurs nucléaires/corépresseurs et

servent d'adaptateurs pour recruter les protéines permettant l'ubiquitinylation puis la dégradation des corépresseurs (Perissi *et al.,* 2004). Lorsque les corépresseurs sont libérés, les co-activateurs se fixent et induisent l'acétylation des histones, le recrutement et la stabilisation du complexe transcriptionnel qui est associé à l'ARN polymérase II puis l'initiation de la transcription du gène cible. La plupart des co-activateurs possèdent un ou plusieurs motifs LxxLL (L = leucine ; x = autre acide aminé). En présence du ligand, les co-activateurs à motif LxxLL vont interagir avec le domaine de liaison au ligand (AF-2) du récepteur afin d'être recrutés par l'hétérodimère PPARβ/RXR (Roeder, 2005). Grâce à leur activité histone acétyltransférase (HAT) et méthyltransférase, les co-activateurs vont générer un changement de conformation de la chromatine permettant le recrutement d'un autre complexe protéique (p160/SRC). Ce complexe possède aussi une activité HAT, une fonction d'activation du domaine AF-2 du récepteur et la possibilité de se complexer avec d'autres co-activateurs que sont CBP (cyclic-AMP responsive element binding protein) et p300, protéines qui possèdent aussi des activités HAT (Spencer *et al.,* 1997; Viswakarma *et al.,* 2010). Le complexe protéique va ensuite former un complexe intermédiaire, qui va recruter des co-activateurs sans activité enzymatique, mais qui vont faciliter l'interaction du complexe avec les acteurs de la transcription et l'ARN polymérase II. Par exemple, le co-activateur PBP (PPAR binding protein) appartient à un complexe médiateur constitué de multiples sous-unités, comme TRAP (thyroid hormone receptor-associated protein) ou DRIP (vitamine D receptor interacting protein) (Zhu *et al.,* 1997 ; Lim *et al*., 2004). Ces protéines ne possèdent pas d'activité enzymatique connue, pourtant, elles sont nécessaires au recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Malik *et al.,* 2004).

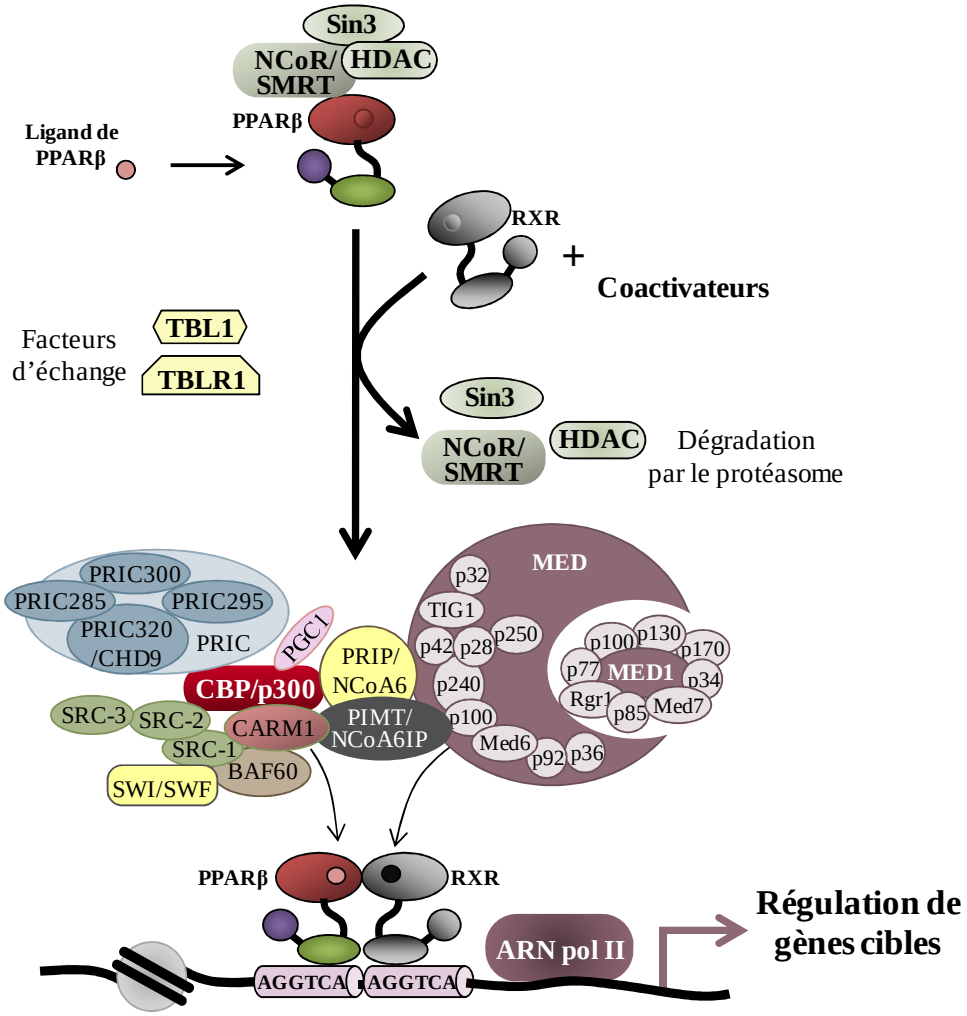

Figure 5: Mécanismes de transactivation de la transcription de gènes cibles de PPARβ. D'après Peters *et al.*, 2008 ; Viswakarma *et al.*, 2010.

A l'heure d'aujourd'hui, beaucoup de co-activateurs ont été identifiés. Sans être exhaustif, nous pouvons citer quelques protéines impliquées dans ces complexes, possédant soit des activités enzymatiques telles que CARM1 (méthyltransférase), PRIC285 (PPARα-receptor interacting cofactor) (hélicase) et le complexe PRIC320 (ATP dependent chromatin remodeling properties) (Viswakarma *et al.*, 2010), soit ne présentant pas d'activité enzymatique tel que PGC-1α (PPARγ coactivator) (Wang *et al.*, 2003). PGC-1 interagit également avec le domaine AF-2 du récepteur PPARβ *via* sa séquence LxxLL. Ne possédant pas d'activité enzymatique, PGC-1 permet le recrutement de co-activateurs possédant une activité HAT.

5.4. Répression en absence de ligand

En règle générale, c'est la présence du ligand puis sa liaison à son récepteur qui conditionne l'activité transcriptionnelle des PPAR. Cependant, un certain nombre d'études laissent à penser que les PPAR pourraient exercer leur activité transcriptionnelle en absence de leur ligand respectif. En effet, en absence de son ligand, PPARβ peut être complexé à RXR, être associé aux corépresseurs, être lié au PPRE, interagir avec la machinerie transcriptionnelle et bloquer la transcription de gènes. Selon ce schéma, PPARβ inhiberait l'activité transcriptionnelle de PPARα et γ (Shi *et al.*, 2002). Cependant, c'est le tissu qui conditionnerait l'effet de PPARβ sur l'activité de PPARα. En effet, dans un modèle animal de souris invalidées pour le gène *pparβ*, dans le foie, le tissu adipeux et l'intestin, les cibles exprimées suite à l'activation du récepteur PPARα sont identiques à celles exprimées dans les mêmes tissus mais à partir de souris exprimant PPARβ (Peters *et al.*, 2003). Par contre, la même équipe, quelques années plus tard, a montré chez des souris *pparβ*$^{-/-}$, que l'activation du PPARα dans le côlon, contrôle l'expression de gènes cibles alors que chez des souris *pparβ*$^{+/+}$, dans le côlon, l'activation de PPARα ne contrôle pas l'expression de ces gènes cibles (Marin *et al.*, 2006).

Récemment, un effet du PPARβ, bien que son ligand ne soit pas présent, a été mis en évidence. En effet, chez des souris dont le gène *pparβ* a été invalidé (*pparβ*$^{-/-}$), et chez des souris sauvages (dont le gène *pparβ* n'a pas été invalidé, *pparβ* $^{+/+}$), l'inflammation du côlon a été induite et les souris ont ensuite été traitées ou non avec le GW0742, ligand de PPARβ. Les auteurs ont constaté une augmentation de l'expression de protéines inflammatoires chez les souris *pparβ*$^{-/-}$ et *pparβ*$^{+/+}$, que les souris aient été traitées ou non avec le ligand. Ces résultats suggèrent un effet de PPARβ indépendant de la présence de son ligand (Hollingshead *et al.*, 2007b).

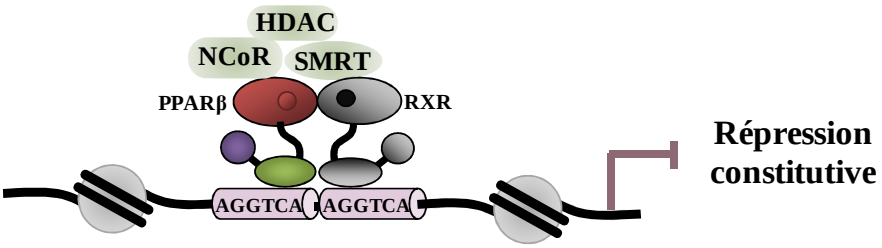

Figure 6: Mécanismes de répression de la transcription de gènes cibles de PPARβ en absence de ligand. D'après Peters *et al*., 2008.

Contrairement à ce qui est communément admis, PPARβ pourrait contrôler la transcription de gènes en absence de son ligand. C'est ce modèle qui permettrait d'expliquer l'activité transcriptionnelle basale du récepteur PPARβ. En effet, PPARβ interagirait non plus avec ses corépresseurs mais avec ses co-activateurs pour induire la transcription de ces gènes cibles (Molnar *et al.,* 2005).

5.5. Action non génomique

Le schéma classique d'activation des PPAR comprend leur hétérodimérisation avec leur partenaire et leur fixation sur des sites spécifiques d'ADN pour contrôler la transcription des gènes. Cependant, ces récepteurs contrôleraient la transcription de gènes alors que l'hétérocomplexe n'est pas fixé sur l'ADN (Feige *et al*., 2006).

- En effet, l'hétérodimère PPAR/RXR, en séquestrant un facteur de transcription, peut l'empêcher de se fixer sur son site spécifique et ainsi inhiber l'activité transcriptionnelle de ce facteur. C'est le phénomène de « Tethering ». Ce mécanisme d'action a été décrit pour les récepteurs PPARα et γ. En effet, PPARα, en interagissant avec les sous-unités p65/RelA de NF-κB (nuclear factor κB) ou avec c-jun de AP-1, bloque l'activité transcriptionnelle de ces complexes protéiques (Delerive *et al.,* 1999). D'autre part, PPARγ, en présence de son ligand, va séquestrer STAT3 phosphorylé (signal transducer and activator of transcription 3), qui ne pourra plus se lier à l'ADN, ce qui aura pour conséquence d'inhiber la transcription d'IL-6 (Wang *et al.,* 2004a). Il en serait de même pour PPARβ, ce qui pourrait expliquer l'effet anti-inflammatoire de ce récepteur (Kino *et al.,* 2007). De plus, PPARβ peut interagir avec la voie NF-κB, puisque le récepteur PPARβ empêche la translocation de la sous-unité p65 de NF-κB, du cytoplasme vers le noyau, inhibant ainsi l'effet de NF-κB sur la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (Rival *et al.,* 2002).

- D'autre part, l'hétérodimère PPAR/RXR peut séquestrer un ou plusieurs cofacteurs nécessaires à l'activité transcriptionnelle de certains facteurs, c'est le « squelching ». Par exemple, PPARα bloque l'action du facteur de transcription C/EBPβ (CCAAT box/enhancer-binding protein β) sur la transcription du *fibrinogène,* en séquestrant les co-activateurs GRIP1/TIF-2 (glucocorticoid receptor-interacting protein 1/transcriptional intermediary factor 2) nécessaires à l'action de C/EBPβ (Gervois *et al.,* 2001). En présence de son ligand, PPARγ recrute le co-activateur CBP (cAMP Response Element Binding Protein) et interfère avec les

voies NF-κB, AP-1 et STAT1, empêchant ainsi la transactivation de *iNOS* (Li *et al.*, 2000b ; Ricote *et al.*, 1998).

Bien que ces deux mécanismes aient été surtout décrits pour PPARα et γ, un certain nombre d'études montre un effet non génomique de PPARβ. En effet, Lee et ses collaborateurs ont proposé en 2003 le mécanisme de « squelching » suivant : en absence de son ligand, PPARβ séquestre le répresseur transcritionnel BCL-6 (B-cell lymphoma 6) et l'empêche d'agir sur la transcription de gènes pro-inflammatoires tels que MCP-1 (*macrophage chemoattractant protein 1*). En présence de l'agoniste GW501516, ce dernier se lie au récepteur PPARβ et l'empêche de séquestrer BCL-6, ce qui aura pour conséquence la libération de BCL-6 et cette protéine pourra ensuite inhiber la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation (Lee *et al.*, 2003).

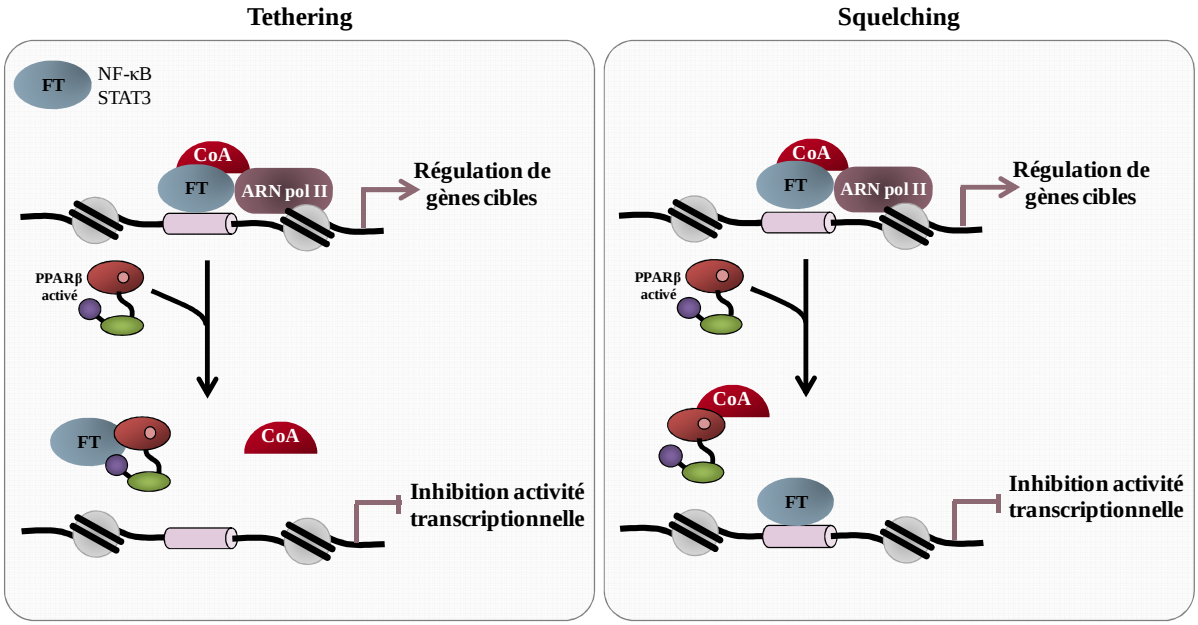

Figure 7 : Mécanismes d'action non génomique de PPARβ. D'après Feige *et al.*, 2006. FT : facteur de transcription, CoA : co-activateur, ARNpol II : ARN polymérase II.

De plus, récemment, il a été montré un effet non génomique de PPARβ puisqu'un effet du récepteur a été décrit dans les plaquettes alors qu'il n'y a pas d'ADN. Le GW501516, une fois lié à son récepteur, va favoriser l'association de PPARβ à la PKCα (protéine kinase C), et ainsi, inhiber l'activité de cette kinase, l'empêchant de jouer son rôle dans les propriétés d'adhérence des plaquettes (Ali *et al.*, 2009). Par ailleurs, PPARβ en se complexant à ERK5

(extracellular-signal-regulated kinase 5), empêche la phosphorylation de ERK5, bloquant ainsi l'action de NF-κB sur la transcription de cytokines inflammatoires (Woo *et al.*, 2006).

D'autre part, dans le processus de vasculogenèse, qui est la formation de vaisseaux sanguins à partir de la différenciation de cellules souches embryonnaires, précurseurs de la cellule endothéliale, un effet non génomique de PPARβ a été observé. En effet, dans des modèles *in vivo* et *in vitro*, il a été montré que les ligands de PPARβ (GW501516 ou L-165041) vont permettre l'augmentation de la prolifération et de la migration des précurseurs des cellules endothéliales mais aussi conduire à la formation de tubes vasculaires. Cependant, les résultats de ces études ne décrivent pas une activité transcriptionnelle de PPARβ, mais plutôt une interaction du récepteur avec la sous-unité régulatrice p85α de la PI3K qui conduit à la phosphorylation de la protéine Akt et à la prolifération cellulaire (Han *et al.*, 2008).

6. Régulation par modifications post-traductionnelles

L'activité transcriptionnelle des PPAR est contrôlée par la liaison du ligand mais aussi par des mécanismes post-traductionnels tels que la phosphorylation, l'ubiquitinylation et la sumoylation.

6.1. Phosphorylation

Comme tous les récepteurs nucléaires, la fixation du ligand est l'événement qui contrôle l'activité transcriptionnelle du récepteur. Cependant, cette activité peut aussi être régulée par phosphorylation de ce dernier en réponse à un stimulus provenant de la membrane plasmique. Les PPAR sont des phosphoprotéines phosphorylées par la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) activées par des cytokines et des facteurs de croissance, la voie des PKC (protéine kinase calcium dépendante) ou la voie des PKA (protéine kinase AMPc dépendante). Selon l'isotype de PPAR, le résidu modifié, le stimulus, la protéine kinase mise en jeu, le type cellulaire et le promoteur étudié, la phosphorylation va conditionner l'augmentation ou la diminution de l'activité du récepteur. Cependant, selon les données de la littérature, il semblerait que c'est la voie de signalisation intracellulaire empruntée pour phosphoryler les récepteurs nucléaires (IGF ou insulin-like growth factor, EGF...) qui va conditionner le sens dans lequel le récepteur va agir. Par exemple, la phosphorylation peut modifier l'affinité qu'a le récepteur pour son ligand. En effet, dans des cellules 3T3-L1, la

phosphorylation du domaine A/B de PPARγ conduit à diminuer l'affinité qu'a ce récepteur pour son ligand BRL49653 donc diminue la liaison ligand-PPARγ (Shao *et al.,* 1998). De plus, la phosphorylation du récepteur peut modifier la capacité du récepteur à former des hétérodimères. En effet, dans des cellules COS-1, la phosphorylation par la PKC des résidus thréonine T129 et sérine S179 de PPARα diminue la formation du complexe PPARα-RXR (Gray *et al.,* 2005). La phosphorylation du récepteur peut aussi modifier les interactions qu'il forme avec ses cofacteurs. Par exemple, en réponse à un stress cellulaire, la p38 MAPK activée phosphoryle des résidus sérine situés dans le domaine A/B de PPARα ce qui a pour conséquence de favoriser son interaction avec le co-activateur PCG-1 et d'augmenter son activité transcriptionnelle (Barger *et al.,* 2001).

A l'heure d'aujourd'hui, nous connaissons peu de choses sur les modifications de l'activité transcriptionnelle du récepteur PPARβ suite à sa phosphorylation. Pourtant, les protéines kinases (PKA et AMPc) sont capables de phosphoryler le récepteur PPARβ, en absence ou en présence du ligand afin d'augmenter son activité transcriptionnelle. Plusieurs sites de phosphorylation ont été décrits : 2 dans le domaine A/B, 2 sites dans le domaine de liaison à l'ADN et 2 dans le domaine E. Le domaine de liaison à l'ADN semble être la cible principale du processus de phosphorylation. En effet, dans des préadipocytes 3T3-L1, en présence du ligand de PPARβ (L-165041), l'AMPc favorise l'activité transcriptionnelle du récepteur puisque la fixation du récepteur sur son PPRE est augmentée (Hansen *et al.,* 2001 ; Lazennec *et al.,* 2000). La potentialisation de l'action du récepteur par l'AMPc est inhibée en présence d'un taux important de corépresseurs NCoR et SMRT (Krogsdam *et al.,* 2002).

De plus, dans des cellules de myotubes squelettiques primaires humains (C2C12), l'inhibition de la voie p38 MAPK diminue l'effet du PPARβ sur le transport intracellulaire du glucose, ce qui suggère que l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de PPARβ est le résultat de la phosphorylation du récepteur mettant en jeu la voie de signalisation intracellulaire p38 MAPK (Burns et Vanden Heuvel, 2007 ; Kramer *et al.,* 2005).

Cependant, ce qui est particulièrement intéressant, c'est que l'activité transcriptionnelle des PPAR peut être contrôlée non pas en agissant sur la protéine PPARβ, mais en phosphorylant son partenaire, le RXR, afin de diminuer la formation du complexe PPARβ/RXR (Solomon *et al.,* 1999), ou en phosphorylant les cofacteurs du récepteur. Par exemple, les protéines PBP et SRC-1, lorsqu'elles sont phosphorylées, potentialisent l'activité de transcription du récepteur (Misra *et al.,* 2002 ; Rowan *et al.,* 2000). De plus, la phosphorylation du corépresseur SMRT

entraîne sa dissociation du complexe protéique de transcription, ce qui aura pour conséquence d'augmenter l'activité transcriptionnelle du récepteur (Jonas et Privalsky, 2004).

Par ailleurs, la phosphorylation des récepteurs PPAR peut être un signal de dégradation du récepteur par le système ubiquitine-protéasome.

6.2. Ubiquitinylation

Le système de dégradation Ubiquitine-Protéasome régule l'activité des récepteurs nucléaires puisque leur dégradation conduit de ce fait à bloquer leur activité transcriptionnelle.

Les protéines dégradées par cette voie sont d'abord modifiées de manière covalente par fixation de polypeptides de 8 kDa appelés ubiquitine. L'ubiquitinylation des protéines s'effectue sur des résidus lysine et demande l'intervention d'une cascade enzymatique impliquant 3 types d'enzymes appelées E1 (enzyme d'activation), E2 (enzyme de conjugaison), et E3 (ubiquitine ligase). Dans un deuxième temps, les protéines poly-ubiquitinylées sont dégradées par le protéasome 26S. Cependant, pour inhiber la dégradation du récepteur, il faut que l'activité des ubiquitines ligases soit bloquée, ou que l'activité des enzymes de dé-ubiquitinylation (enzymes qui enlèvent les ubiquitines avant qu'il n'y ait dégradation par protéolyse) soit augmentée (Genini et Catapano, 2007). La liaison de ligands sur le récepteur PPARγ contrôle d'une part l'activité transcriptionnelle du récepteur et d'autre part sa dégradation. En effet, le corépresseur RIP140, une fois lié au PPARγ, va protéger le récepteur de la dégradation. Par contre, pour PPARα, c'est la fixation du ligand qui protège le récepteur de la dégradation (Hauser *et al.*, 2000 ; Blanquart *et al.*, 2002). En ce qui concerne PPARβ/δ, le processus d'ubiquitinylation qui conduit à sa dégradation est encore peu étudié. Cependant, il a été montré qu'en absence de son ligand, le récepteur PPARβ est sujet à une dégradation rapide par le protéasome 26S, permettant de maintenir un faible taux de récepteur dans les cellules, et qu'en présence de son ligand, le récepteur n'est plus dégradé. Le ligand stabiliserait le récepteur lorsque celui-ci est lié à l'ADN. En effet, le domaine DBD est nécessaire à la stabilisation du récepteur. Par contre, une autre étude a établi que si le taux de PPARβ est faible, il n'y a plus de dégradation du récepteur même en présence du ligand ; à l'inverse, lorsque le taux de PPARβ augmente, sa dégradation est alors favorisée (Rieck *et al.*, 2007).

6.3. Sumoylation

La sumoylation est un processus qui permet l'attachement covalent et réversible d'une ou plusieurs petite(s) protéine(s) SUMO de 12 kDa (*small ubiquitin-like modifier*) à la protéine cible. La liaison se fait entre une glycine de la région C-terminale de la protéine SUMO et un résidu lysine localisé dans une séquence consensus spécifique de sumoylation ψ-K-X-E/D (ψ représente un résidu hydrophobe de la protéine cible). La sumoylation met en jeu un processus enzymatique conduisant à la dégradation du récepteur, donc ce mécanisme contrôle la stabilité des protéines, la translocation nucléaire et la transcription de gènes, puisqu'elle contrôle l'activité transcriptionnelle des PPAR. Des sites de sumoylation dans le domaine AF1 de la partie N-terminale du PPARγ ont été décrits. Lorsque ce récepteur est sumoylé, son activité transcriptionnelle est diminuée (Shimizu *et al.,* 2006). Par contre, lorsque PPARα est sumoylé par la protéine SUMO-1 sur le résidu lysine 185 de la région charnière, son activité transcriptionnelle serait conservée (Pourcet *et al.,* 2010).

A notre connaissance, la sumoylation de PPARβ n'a pas été rapportée dans la littérature. Par contre, PPARβ semble contrôler la sumoylation de la protéine KLF5 (Krüppel-like transcription factor 5), protéine impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Normalement, KLF5 sumoylée est associée à un complexe comprenant PPARβ et des corépresseurs ; ce complexe bloque la transcription des gènes cibles de KLF5. Par contre, lorsqu'un agoniste lie et active PPARβ, KLF5 est désumoylée, conduisant à la dissociation de KLF5 au complexe répresseur et son association à un complexe activateur de la transcription contenant PPARβ lié à son ligand et le co-activateur CBP. Il s'en suivra une augmentation de l'expression des gènes cibles de KLF5 (Oishi *et al.,* 2008).

7. Rôles

La mise au point d'un modèle animal où le gène *pparβ* est invalivé, mais aussi l'identification et la synthèse de ligands spécifiques du PPARβ ont permis de faire évoluer nos connaissances sur les différentes fonctions de ce récepteur. Cependant, l'établissement du modèle de souris *pparβ*$^{-/-}$ a posé de nombreuses difficultés puisque la plupart des embryons *pparβ*$^{-/-}$ n'étaient pas viables (Peters *et al*., 2000). Ceci peut s'expliquer par le fait que le récepteur PPARβ joue un rôle dans l'implantation du blastocyste ; en effet, chez les souris, les ligands de PPARβ, prostacycline ou L-165041, favorisent l'implantation du blastocyste (Lim

et Dey, 2000). Chez ces souris, lorsque le gène *pparβ*$^{-/-}$ est muté, le développement du placenta est affecté, ce qui conduit à la mort de la plupart des embryons (Nadra *et al.*, 2006).

7.1. Métabolisme lipidique

Le récepteur PPARβ joue un rôle très important dans le métabolisme lipidique, ce qui en fait une cible dans le traitement de pathologies associées à un désordre métabolique. PPARβ est impliqué dans l'oxydation des acides gras dans un certain nombre de tissus tels que le côlon, le tissu adipeux, mais aussi dans le muscle squelettique, puisqu'il favorise l'oxydation des acides gras dans ces cellules, liée à l'activité physique (Barish *et al.*, 2006). En effet, PPARβ est fortement exprimé dans le muscle squelettique, et l'administration de GW501516 active le récepteur et augmente l'expression de gènes impliqués dans le flux de cholestérol, la β-oxydation des acides gras et le découplage de l'énergie (Dressel *et al.*, 2003). Que ce soit à partir de souris transgéniques, chez lesquelles le nombre de récepteurs PPARβ est augmenté, et où le récepteur est constitutivement actif dans le muscle squelettique, ou à partir de souris sauvages, auxquelles est administré du GW501516, le nombre de fibres oxydatives augmente ainsi que l'expression de gènes impliqués dans le transport des acides gras. De plus, chez ces souris, la masse grasse est diminuée ainsi que la taille des cellules adipeuses (Luquet *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2004b). Chez des souris prédisposées à l'obésité, l'activation ciblée de PPARβ dans les tissus adipeux induit spécifiquement l'expression de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras. Les souris pour lesquelles le récepteur PPARβ est constitutivement actif dans les tissus adipeux blanc et brun, vont présenter un faible taux d'acides gras libres et de triglycérides plasmatiques (Wang *et al.*, 2003). Ces animaux soumis à un régime riche en graisses sont d'ailleurs moins susceptibles de développer une obésité. D'autre part, l'administration de GW501516 à des souris db/db qui présentent un défaut dans le gène *db* codant la lectine, qui se caractérisent par un excès de graisse, et qui sont soumises à une alimentation riche en graisses, semble diminuer leur chance de développer une obésité (Tanaka *et al.*, 2003).

En résumé, PPARβ intervient dans le contrôle du métabolisme lipidique du muscle squelettique, participe au remodelage du muscle en favorisant la formation de fibres musculaires de type I et permet l'adaptation oxydative du muscle squelettique en réponse à l'exercice physique (Ehrenborg et Krook, 2009).

L'activation du récepteur PPARβ peut modifier le profil lipidique en contrôlant l'homéostasie des lipoprotéines dans un autre modèle animal que la souris. En effet, chez des primates obèses, l'administration de GW501516 conduit à une augmentation du taux plasmatique de HDL, à une diminution de LDL cholestérol et à une diminution du taux de triglycérides (Oliver *et al*., 2001). Par contre, chez les souris (db/db) obèses et diabétiques, l'administration de GW0742 conduit à une faible augmentation de HDL plasmatiques et diminue l'absorption du cholestérol intestinal (van der Veen *et al.,* 2005), et l'administration de L-165041 conduit à une diminution du taux de HDL plasmatique et à une activité diminuée de la lipoprotéine lipase dans le tissu adipeux (Leibowitz *et al.,* 2000). Chez les souris où le gène *pparβ* a été invalidé, il y a une augmentation du taux de LDL plasmatique et des triglycérides (Akiyama *et al.,* 2004).

Des essais cliniques ont été réalisés. En effet, chez des volontaires sains (sans pathologie apparente), l'administration de GW501516 augmente significativement le taux plasmatique de HDL cholestérol, réduit le taux de triglycérides et favorise l'oxydation des acides gras par le muscle squelettique (Sprecher *et al.,* 2007). Une deuxième étude donne des résultats tout à fait intéressants. En effet, un petit nombre de personnes présentant certains symptômes du syndrome métabolique comme un profil lipidique perturbé, ont ingéré du GW501516 pendant 2 semaines et ont vu une amélioration dans la qualité de leur profil lipidique, avec une diminution du taux plasmatique des triglycérides, une diminution des apolipoprotéines ainsi qu'une diminution du LDL cholestérol. Par contre, le taux de HDL cholestérol reste inchangé (Riserus *et al.,* 2008).

De plus, les ligands de PPARβ peuvent également supprimer l'inflammation provenant de l'activation des macrophages (Coll *et al.,* 2009). Vraisemblablement, l'utilisation d'agonistes de PPARβ semble être une stratégie pharmacologique prometteuse dans le traitement des désordres liés au syndrome métabolique et des pathologies qui lui sont associées (diabète de type 2, athérosclérose).

7.2. Différenciation cellulaire

Comme nous l'avons décrit précédemment, PPARβ joue un rôle important dans le développement du placenta puisque l'inactivation de PPARβ entraine d'importants défauts dans la placentation (Barak *et al*., 2002). De plus, il semblerait que PPARβ intervienne dans

la différenciation des cellules géantes trophoblastiques (Nadra *et al.*, 2006). PPARβ interviendrait aussi dans la différenciation adipocytaire car il potentialise l'effet du PPARγ sur l'adipogenèse (Matsusue *et al.*, 2004).

Et bien évidemment, le récepteur PPARβ intervient dans la différenciation des kératinocytes ; ce récepteur contrôle la mort cellulaire des kératinocytes, mais aussi la prolifération des cellules (Kim *et al.*, 2006 ; Schmuth *et al.*, 2004). Aujourd'hui, il est bien admis que PPARβ exerce un rôle fondamental dans la cicatrisation de la peau après blessure. En effet, suite à une blessure, l'expression de PPARβ est ré-induite et son activité transcriptionnelle va permettre de stimuler la survie et la différenciation des kératinocytes ; d'ailleurs, l'invalidation du gène *pparβ* entraîne un retard dans la cicatrisation (Michalik *et al.*, 2001). Suite à la blessure, le taux de PPARβ est augmenté en réponse à l'activation de la voie des SAPK (stress-activated protein kinase) par des cytokines inflammatoires synthétisées par des cellules bordant la plaie (Tan *et al.*, 2001).

7.3. Rôle dans la carcinogenèse

Selon les données de la littérature, PPARβ est un activateur de la prolifération cellulaire. D'ailleurs, un certain nombre d'études suggèrent que ce récepteur serait impliqué dans les processus menant à la cancérisation.

En effet, PPARβ serait impliqué dans la carcinogenèse et la progression des cancers colorectaux, plus particulièrement dans la polypose adénomateuse familiale humaine. Cependant, des données contradictoires lui attribuent soit un rôle pro-cancéreux soit un rôle anti-cancéreux. En effet, certaines études suggèrent que l'activation de PPARβ potentialise la tumorigenèse *via* la voie APC/β-caténine/Tcf-4 (T-cell transcription factor 4). La protéine APC, codée par un gène suppresseur de tumeur, est déficiente chez les patients atteints de tumeurs colorectales. La perte de la fonction APC conduit à une augmentation de l'activité de la protéine β-caténine qui a pour conséquence d'augmenter l'activité transcriptionnelle de Tcf-4, donc d'activer la transcription de gènes tels que *c-myc* et *pparβ* (He *et al.*, 1999). Ainsi, chez les patients atteints de carcinomes colorectaux, le taux d'ARNm de PPARβ, donc de la protéine, serait augmenté, permettant au récepteur d'exercer un contrôle sur la prolifération des cellules colorectales. D'autres arguments sont en faveur du rôle pro-tumoral de PPARβ. En effet, des lignées cellulaires humaines dérivées de cancer colorectal (HCT116), dans

lesquelles le gène *pparβ* a été invalidé, voient leur capacité à établir des tumeurs diminuer lorsqu'elles sont injectées à des souris Nude (Park *et al.*, 2001). Dans un modèle animal de souris APC^{min} (modèle où le gène APC est muté, prédisposant ces souris au développement de multiples adénomes intestinaux et représentant un modèle de polypes adénomateux familiaux humains) exposées au GW501516, ligand spécifique de PPARβ, une augmentation du nombre et de la grosseur des tumeurs dans le côlon de ces souris est observée. La culture *in vitro* dans un milieu sans sérum, provoque l'apoptose des cellules HCT116. Par contre, l'addition de GW501516 protège les cellules de la mort cellulaire (Gupta *et al.*, 2004).

L'implication de PPARβ dans la carcinogenèse et le développement de tumeurs colorectales, permettrait d'expliquer le mécanisme moléculaire de l'action anti-tumorale des NSAID (anti-inflammatoires non stéroïdiens). En effet, il a été montré que traiter des souris présentant des adénomes intestinaux avec des NSAID, diminue significativement le développement des tumeurs coliques chez ces animaux. De plus, il a été montré que ces molécules induiraient la régression des tumeurs coliques chez les patients présentant des tumeurs colorectales familiales (Smalley et DuBois, 1997). L'effet anti-tumoral des NSAID pourrait s'expliquer par le fait qu'elles seraient antagonistes de l'activité du PPARβ (He *et al*., 1999), induiraient la diminution du taux de ce récepteur et bloqueraient l'activité des COX (Cyclo-oxygénase), inhibant la synthèse de ligands endogènes de PPARβ, et donc empêcheraient l'activité transcriptionnelle de ce récepteur (Liou *et al.*, 2007).

Cependant, un certain nombre de données suggèrent qu'au contraire, le PPARβ serait impliqué dans l'inhibition, tout au moins, dans la diminution des processus conduisant au développement des cancers coliques. En effet, chez des souris APC^{min} où des tumeurs coliques ont été induites, lorsque le gène *pparβ* est invalidé, le nombre et le développement des tumeurs dans le côlon de ces souris sont augmentés (Harman *et al.*, 2004 ; Reed *et al.*, 2004). De plus, des cellules humaines dérivées de cancer de côlon où l'expression du PPARβ est inhibée par l'utilisation de la technique d'interférence à l'ARN, vont beaucoup plus proliférer que les cellules exprimant le récepteur (Yang *et al.*, 2008). D'autres études ont rapporté que la stimulation par des ligands spécifiques du PPARβ (GW0742 et GW501516) ne conditionne aucunement la prolifération des cellules humaines de cancer du côlon (HT29, HCT116 et LS-174T) (Hollingshead *et al.*, 2007a). D'ailleurs, l'administration des ligands spécifiques de PPARβ à des souris APC n'a aucun effet sur le nombre de tumeurs coliques chez ces animaux, que le gène *pparβ* soit invalidé ou non (Marin *et al*., 2006).

Vraisemblablement, les divergences de résultats concernant l'activité pro- ou anti-proliférative du récepteur PPARβ seraient observées dans d'autres tissus.

En effet, à partir de cellules dérivées de cancer du foie, quelques études présentent des résultats contradictoires. Certaines montrent que l'activation du PPARβ augmente la prolifération de cellules HepG2 (Glinghammar *et al.,* 2003 ; Hellemans *et al.,* 2003), alors que d'autres montrent que l'activation du PPARβ n'a aucun effet sur la prolifération de ces mêmes cellules (Hollingshead *et al.,* 2007a).

A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur le rôle de PPARβ dans la cancérogenèse du col de l'utérus et de la vessie. Par contre, l'effet du PPARβ dans le contrôle de gènes impliqués dans la prolifération de cellules dérivées de cancer de la peau, du sein et du poumon, révèle aussi des résultats contradictoires.

Aujourd'hui, il est admis que PPARβ exerce un rôle fondamental dans la cicatrisation de la peau après blessure. En effet, les travaux réalisés par le Docteur Liliane Michalik et Andrew Tan démontrent que PPARβ contrôle la prolifération, l'apoptose et la migration des cellules normales de la peau puisque chez des souris auxquelles une lésion de la peau est effectuée, l'invalidation du gène *pparβ,* entraine un retard dans la cicatrisation (Michalik *et al.,* 2001 ; Tan *et al.,* 2001). D'autre part, il a été montré que PPARβ intervenait dans la différenciation des kératinocytes avec une induction de la mort cellulaire concomitante à une inhibition de la prolifération des cellules (Kim *et al.,* 2006). Pourtant, dans les mécanismes contrôlant la carcinogenèse épithéliale, le rôle du PPARβ ne semble pas élucidé. En effet, soit l'inactivation du PPARβ inhibe la prolifération, permet la survie et la migration des kératinocytes HaCat (Borland *et al*., 2008) et des kératinocytes primaires de souris (Di-Poi *et al.,* 2002), soit, l'activation du récepteur PPARβ n'a aucun effet sur la prolifération des cellules humaines (UACC903) dérivées de mélanome (Girroir *et al.,* 2008). Cependant, un certain nombre d'arguments sont en faveur d'un rôle inhibiteur du PPARβ dans la formation de tumeurs de la peau. En effet, lorsque un promoteur de tumeur (TPA, O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) est administré à des souris où le gène *pparβ* a été invalidé (*pparβ*$^{-/-}$), une hyperplasie de l'épithélium est observée (Michalik *et al*., 2001 ; Peters *et al*., 2000). De plus, l'administration régulière de TPA rend les souris *pparβ*$^{-/-}$ plus susceptibles de développer des tumeurs (Kim *et al.,* 2004). Ces études suggèrent que le récepteur PPARβ protège les animaux de l'effet inducteur de tumeur du carcinogène. De plus, des études

récentes ont montré que des cellules issues de mélanome humain expriment le récepteur PPARβ et que le récepteur, une fois activé par son ligand (GW0742) inhibe la prolifération cellulaire sans conduire à l'apoptose (Bility *et al.*, 2008 ; Burdick *et al.*, 2007 ; Michiels *et al.*, 2010).

Dans des cellules dérivées de cancer du sein (MCF-7, T47D), l'activation du récepteur PPARβ par le GW501516 ou le composé F, augmente la prolifération des cellules exprimant des récepteurs aux estrogènes alors que ces composés n'ont aucune action sur des cellules n'exprimant pas les récepteurs aux estrogènes (Stephen *et al.*, 2004). Par contre, une étude réalisée dans un autre laboratoire, montre qu'une forte concentration du ligand GW501516 (10 µM) inhibe la prolifération des MCF-7 ; le récepteur est bien activé puisque le taux de la cible de PPARβ, *angptl4* (Angiopoietin-like4) est augmenté (Girroir *et al.*, 2008). Des résultats contradictoires concernant l'effet pro- ou anti-proliferatif du PPARβ sont aussi observés à partir de modèles animaux. En effet, chez des souris présentant des tumeurs mammaires induites par un cancérogène, soit le GW501516 augmente le nombre de souris qui présenteront des tumeurs (Yin *et al.*, 2005), soit l'invalidation du gène *pparβ* diminue l'incidence des cellules cancéreuses (Ghosh *et al.*, 2009). Par contre, récemment, il a été montré que le GW501516 *via* le PPARβ, diminue la prolifération ainsi que la clonogénicité des cellules de cancer du sein (C20). Ce phénomène est précédé d'une augmentation de la mort des cellules tumorales et d'une surexpression du gène cible de PPARβ (*angptl4*) confirmant l'activation du récepteur PPARβ (Foreman *et al.*, 2010).

Des études réalisées à partir de cellules dérivées de cancer du poumon ont retenu notre attention. En effet, le PPARβ a soit un effet proliferatif, soit un effet anti-proliferatif. Dans des cellules dérivées de cancer du poumon (A549), le GW501516 inhibe la mort cellulaire induite par un stress oxydatif, en réactivant la prolifération des cellules (Pedchenko *et al.*, 2008). Le GW501516 augmente aussi la prolifération des cellules humaines (H18338 et H2106) dérivées de cancer de poumon ; cet effet est dépendant du récepteur PPARβ et implique la voie PI3K ainsi que le cofacteur PGC-1α (Han *et al.*, 2008 ; Han *et al.*, 2009). Cependant, quelques années auparavant, un autre laboratoire a obtenu des résultats différents. En effet, à partir des lignées cellulaires citées précédemment, des doses importantes de ligand de PPARβ (L-165041) diminuent la prolifération des cellules (Fukumoto *et al.*, 2005). Dans un modèle animal de souris transgéniques chez lesquelles des cancers de poumon ont été

induits, l'invalidation du gène *pparβ* est associée au développement tumoral (Muller-Brusselbach *et al.*, 2007a). Cependant, il est particulièrement difficile de conclure sur le rôle pro- ou anti-tumoral de PPARβ dans ce modèle car cette même équipe a récemment obtenu d'autres résultats. En effet, deux semaines après l'injection de cellules issues d'un carcinome pulmonaire de Lewis, chez les souris pour lesquelles le gène *pparβ* a été invalidé, la prolifération des cellules tumorales est inhibée ce qui stoppe le développement des tumeurs (Muller *et al.*, 2008). De plus, 90% des souris *pparβ*$^{-/-}$ survivent beaucoup plus longtemps que les souris pour lesquelles le gène *pparβ* est exprimé. L'inhibition du développement des tumeurs chez ces souris peut être expliquée par une diminution de la vascularisation de la tumeur due à une diminution et à une malformation des microvaisseaux intratumoraux. Ces résultats suggèrent que le récepteur PPARβ a un rôle primordial dans l'angiogenèse tumorale.

7.4. PPARβ et angiogenèse tumorale

La progression d'un cancer, l'invasion et la formation de métastases sont conditionnées par un événement essentiel, le « switch » angiogénique, événement caractérisé par la rupture de l'équilibre qui existe entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques, en faveur des facteurs pro-angiogéniques, ce qui aura pour conséquence de déclencher le processus d'angiogenèse tumorale.

Comme nous venons de le décrire précédemment, PPARβ serait une molécule angiogénique. En effet, chez des souris xénogreffées avec des cellules tumorales issues de carcinomes pulmonaires de Lewis (LLC) ou de mélanomes, les tumeurs qui se sont développées sont moins vascularisées chez les animaux pour lesquels le gène *pparβ* a été invalidé (*pparβ*$^{-/-}$) que chez les souris témoins (*pparβ*$^{+/+}$). Vraisemblablement, diminuer le nombre et la qualité des microvaisseaux intratumoraux conduit à inhiber la croissance tumorale et à augmenter considérablement la vie de ces souris *pparβ*$^{-/-}$ (Abdollahi *et al.*, 2007; Muller-Brusselbach *et al.*, 2007b). Chez les souris *pparβ*$^{-/-}$, la plupart des microvaisseaux présentent une paroi épaisse avec une lumière obstruée, diminuant ainsi fortement la vascularisation de la tumeur. Les malformations de ces microvaisseaux intratumoraux sont dues à la prolifération anormale des cellules endothéliales, mais aussi des cellules périvasculaires. Ces études suggèrent que le PPARβ a un rôle primordial dans la formation des vaisseaux donc dans le bon fonctionnement du réseau vasculaire.

PPARβ peut avoir un effet direct sur l'angiogenèse, en régulant l'expression de gènes angiogéniques, tels que le VEGF, mais aussi une action indirecte en contrôlant des gènes indirectement impliqués dans l'angiogenèse. En effet, le profil moléculaire des cellules endothéliales et fibroblastiques des souris *pparβ*$^{-/-}$ est très différent de celui des cellules endothéliales et fibroblastiques de souris sauvages (Adamkiewicz *et al.,* 2007). Par exemple, chez les souris *pparβ*$^{-/-}$, le taux de protéines CLIC4 (chloride intracellular channel protein) qui a un rôle indiscutable dans la formation du réseau vasculaire (Bohman *et al.,* 2005), est fortement diminué. La diminution d'expression de CLIC4 va engendrer un réseau vasculaire défectueux. De plus, chez les souris *pparβ*$^{-/-}$, le taux de la protéine CRBP1 (cellular retinol binding protein 1) est fortement augmenté. Cette protéine est capable de se lier et de capter des ligands spécifiques destinés à activer les récepteurs RAR et RXR, dont l'activité transcriptionnelle favorise la prolifération, la différenciation et la formation des microcapillaires ; ces récepteurs ne seront donc plus sollicités (Liu *et al.,* 2005). L'inhibition de leur activité va contribuer à la mise en place de microvaisseaux défectueux. Selon ces résultats, PPARβ intervient dans la formation du réseau vasculaire. D'ailleurs, d'autres études réalisées *in vitro* sont en faveur du rôle angiogénique de PPARβ.

En effet, à partir d'un modèle *in vitro* de cellules HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), HAEC (human aortic endothelial cells) et EAHy926 (cellules endothéliales immortelles), il a été montré d'une part, que le récepteur PPARβ est exprimé dans ces cellules et d'autre part, que le GW501516 *via* le PPARβ, augmente la prolifération cellulaire et la formation de nouveaux microvaisseaux *via* la synthèse et la sécrétion de la molécule clef de l'angiogenèse, le VEGF (Piqueras *et al.,* 2007). De plus, PPARβ favorise la prolifération et la survie des cellules endothéliales en protégeant ces dernières de l'apoptose. Effectivement, la prostacycline PGI2, ligand endogène et spécifique du PPARβ, ainsi que son ligand synthétique L-165041, protègent les cellules HUVEC de la mort. En effet, les ligands, par l'intermédiaire de PPARβ, augmentent la transcription de la protéine 14-3-3ε qui va séquestrer et empêcher les protéines pro-apoptotiques telles que Bad d'exercer leur action, ce qui aura pour conséquence de protéger la cellule de l'apoptose (Liou *et al.,* 2006).

Comme nous venons de le voir, PPARβ augmente la prolifération des cellules endothéliales mais aussi celle de certaines cellules tumorales, selon un mécanisme moléculaire direct mais aussi indirect. En effet, les ligands *via* leur récepteur, augmentent la synthèse et la sécrétion de VEGF et augmentent aussi le nombre de récepteurs au VEGF à la

surface des cellules tumorales. La survie et la prolifération de ces cellules sont favorisées par la boucle autocrine VEGF/récepteur au VEGF. En effet, une faible concentration de GW501516 (1 µM), *via* son récepteur PPARβ, augmente l'expression du VEGF et de son récepteur VEGFR-2 dans des cellules dérivées de cancer du côlon (LS-174T et HCT116), ce qui a pour conséquence l'augmentation de la prolifération et de la survie de ces cellules (Wang *et al.*, 2006a). Dans d'autres cellules dérivées d'un cancer colorectal (SW480 et HT29), le GW501516 augmente l'expression de l'ARNm et de la protéine VEGF. Cet effet est bien dépendant de la présence du récepteur PPARβ (Rohrl *et al.*, 2011). De même, à partir de cellules dérivées de cancer du sein (MCF7 et T47D), et de la prostate (LNCaP et PNT1A), l'équipe de Stephen et collaborateurs montre que la synthèse du VEGF et de son récepteur est augmentée *via* l'activation du récepteur PPARβ et est concomitante à une augmentation de la prolifération des cellules (Stephen *et al*., 2004). Ces résultats suggèrent que PPARβ contrôle la transcription du gène *vegf* et serait donc une molécule angiogénique. D'ailleurs, notre groupe de recherche en Urologie a obtenu des résultats similaires à partir d'un modèle de cellules dérivées de cancer de la vessie. En effet, le ligand L-165041 augmente la synthèse et la sécrétion du VEGF (121, 165 et 189) et ce, quel que soit le phénotype des cellules (Fauconnet *et al*., 2002). En effet, PPARβ augmente l'expression du VEGF dans les cellules RT4, issues d'un carcinome urothélial papillaire récidivant de grade I et représentatives d'une tumeur non agressive, et dans les cellules T24, issues d'un carcinome urothélial indifférencié de grade III et représentatives d'une tumeur agressive à haut potentiel métastatique.

D'autres études présentent des résultats contradictoires avec ce que nous venons de décrire précédemment. Ainsi, la stimulation de cellules dérivées de cancer du côlon (HT29, HCT-119 et LS-174T) par le ligand de PPARβ (GW501516), ne montre aucun effet sur le taux de VEGF, et ce, que les stimulations soient effectuées en présence ou en absence de sérum (Hollingshead *et al*., 2007a). Ces résultats suggèrent que le récepteur PPARβ n'intervient pas sur la synthèse de VEGF.

Cependant, la plupart des données de la littérature montrent que les ligands de PPARβ ont un effet pro-angiogénique en contrôlant l'expression du VEGF et cet effet est dépendant de leur récepteur. En effet, même si pour de nombreuses études cela n'a pas été confirmé, c'est par l'intermédiaire du récepteur PPARβ que la synthèse du VEGF est contrôlée. Pourtant, récemment, il a été montré que dans les kératinocytes, le L-165041 augmente le taux de

VEGF (ARNm et protéine) et que cet effet du ligand est indépendant de la présence de son récepteur PPARβ (Schiefelbein *et al.*, 2008).

II. Angiogenèse tumorale

1. Généralités

L'angiogenèse est un processus complexe, multi-étapes qui permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux pré-existants. C'est un processus normal indispensable à de nombreux processus physiologiques, tels que le développement embryonnaire puisqu'il est essentiel à la croissance des vaisseaux sanguins durant l'embryogenèse et à la formation du placenta. Chez l'adulte, ce phénomène est plus rare puisque le réseau vasculaire est déjà en place. En effet, un faible taux de cellules endothéliales sont actives durant la vie adulte (Folkman, 2002). Ce processus intervient dans des situations d'inflammation, de cicatrisation ou de réparation osseuse et chez la femme lors de la reconstitution du réseau vasculaire dans l'endomètre au cours du cycle menstruel ou pendant la grossesse. L'angiogenèse est hautement régulée dans les conditions physiologiques ; cependant, elle peut devenir pathologique, lorsque la croissance de nouveaux capillaires devient incontrôlée. Cette néovasculation excessive dans le cadre de l'angiogenèse tumorale est primordiale à la croissance des tumeurs malignes et au développement des métastases (Folkman, 1995).

En effet, la croissance tumorale et la dissémination métastatique dépendent de la néoformation de vaisseaux sanguins (Folkman *et al.*, 1971). Quand la taille d'une tumeur est inférieure à 2 mm^3, l'apport en nutriments et en oxygène se fait par diffusion simple ; c'est la phase de dormance de la tumeur, indépendante de l'angiogenèse. Lorsque la tumeur grossit, un état hypoxique intratumoral est généré. Cet état hypoxique va conduire à l'augmentation de l'expression de facteurs clefs de l'angiogenèse par les cellules tumorales et déclencher un « switch » angiogénique. L'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques va basculer en faveur des facteurs pro-angiogéniques et va aboutir à une vascularisation excessive qui permettra un apport en nutriments et en oxygène suffisant pour la progression tumorale (Li *et al.*, 2000a).

L'architecture des vaisseaux tumoraux est bien différente de celle des vaisseaux normaux. En effet, le réseau vasculaire tumoral est hautement désorganisé et hétérogène ; les vaisseaux ont un diamètre irrégulier, sont dilatés, tortueux et présentent des ramifications excessives. De plus, ces vaisseaux sont fragilisés. Leur membrane basale est discontinue ou absente et il y a

de larges jonctions inter-endothéliales, donnant ainsi des vaisseaux tumoraux perméables et hémorragiques.

Le processus angiogénique peut être divisé en plusieurs étapes.

- Déstabilisation des vaisseaux pré-existants : tout d'abord, l'activation des cellules endothéliales entraîne une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité des vaisseaux conduisant à l'extravasation de protéines plasmatiques comme l'activateur du plasminogène (uPa). Ce dernier permet l'activation du plasminogène en plasmine qui active ensuite des métalloprotéases (MMP), sécrétées par les cellules tumorales et le tissu stromal environnant. Ces enzymes vont conduire à la dégradation de la matrice extra-cellulaire (MEC) et de la membrane basale (Carmeliet, 2000). Il s'en suivra la déstabilisation du vaisseau pré-existant suite à la perte des contacts entre les cellules endothéliales et les cellules vasculaires avoisinantes, les péricytes, qui se détachent des jonctions inter-endothéliales altérées (Moses, 1997). L'angiopoïétine-2, qui est un antagoniste de l'angiopoïétine-1 (facteur limitant la perméabilité endothéliale), permet le détachement des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire.
- Protrusion des cellules endothéliales à travers la lésion formée dans la membrane basale vasculaire.
- Migration et prolifération : la déstabilisation des vaisseaux favorise la migration des cellules endothéliales en direction de la source angiogénique. Simultanément, la matrice extracellulaire (MEC) environnante est dégradée sous l'action des MMP pour permettre l'intégration de nouveaux vaisseaux. Leur prolifération est possible grâce aux facteurs de croissance tels que le FGF (Fibroblast Growth Factor) et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) qui étaient séquestrés dans la MEC. Les cellules endothéliales, sous le contrôle de ces facteurs de croissance, synthétisent et sécrètent des protéines qui facilitent la migration cellulaire. D'ailleurs, pour interagir avec la MEC, les cellules endothéliales expriment à leur surface de nouveaux récepteurs tels que ICAM (IntraCellular Adhesion Molecule), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), des sélectines (E et P) ou des intégrines ($\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$) (Bazan-Socha *et al.*, 2005 ; Eliceiri et Cheresh, 2001). Sous l'influence des facteurs angiogéniques, les cellules endothéliales donnent naissance par bourgeonnement, à de nouveaux capillaires dépourvus de cellules péri-vasculaires.

- Les capillaires néoformés entrent ensuite dans une phase de stabilisation et de maturation qui permet la réorganisation de la paroi du vaisseau. Durant cette étape, la membrane basale est reconstituée et il y a recrutement de cellules mésenchymateuses suite à l'action du PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) qui attire les fibroblastes sur le site de maturation vasculaire. Ces fibroblastes qui se différencient localement en péricytes sous l'action du TGFβ (Transforming Growth Factor) et des cellules musculaires lisses sont recrutées sous l'action de l'angiopoïétine-1 (Ang-1) (Darland et D'Amore, 2001). Il y a maturation des cellules pour former des tubes fonctionnels capables d'établir un flux sanguin.

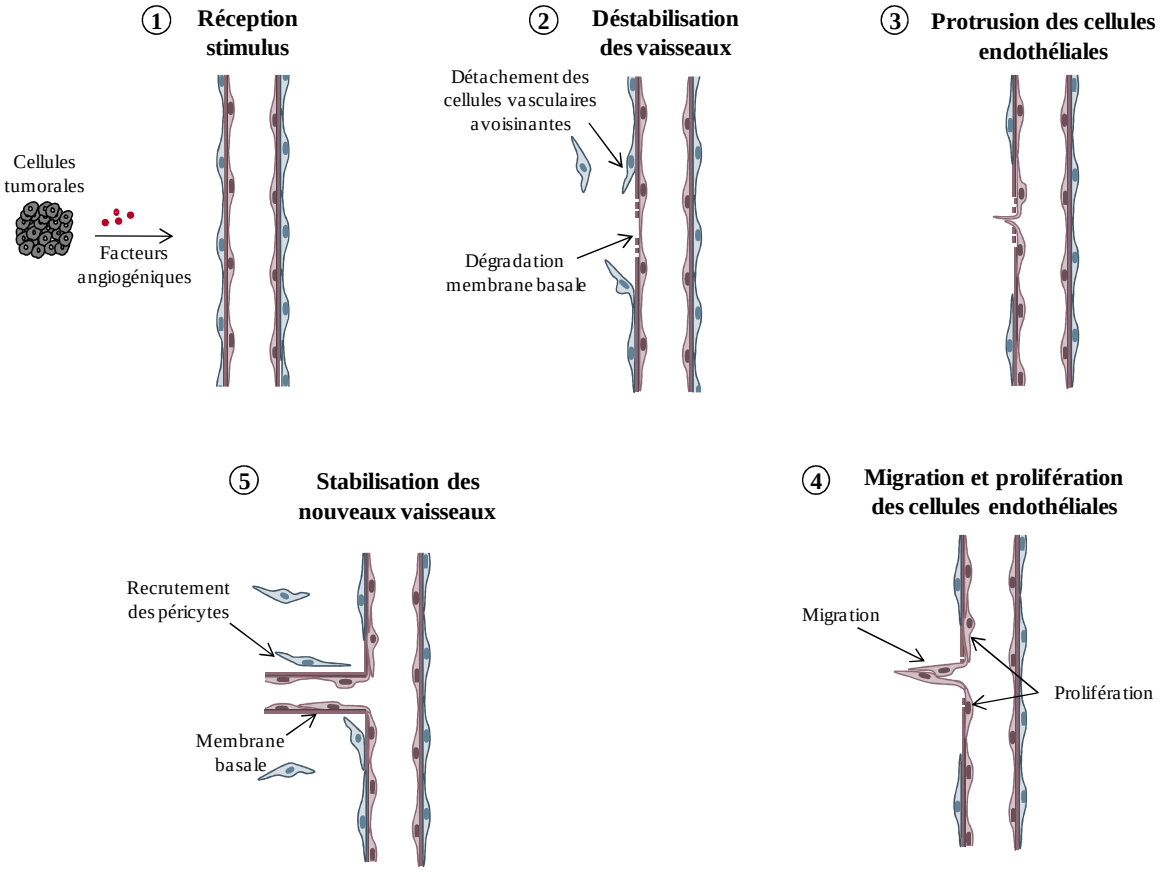

Figure 8 : Les étapes de l'angiogenèse. D'après Bergers et Benjamin, 2003.

L'angiogenèse tumorale initiée par le phénomène de bourgeonnement n'est pas le seul mécanisme permettant la vascularisation de la tumeur.

En effet, il peut y avoir co-option de vaisseaux pré-existants irriguant normalement des tissus sains avoisinants. Ces derniers vont alors fusionner et leur nombre va diminuer. Il s'en suivra une hypoxie qui entrainera une augmentation de la vascularisation périphérique de la tumeur (Holash *et al.,* 1999). La vascularisation par co-option et la vascularisation par induction de l'angiogenèse ont des contributions distinctes lors de l'initiation des microtumeurs et dépend du micro-environnement local et du nombre de cellules dans la microtumeur (Zhao *et al.,* 2011).

La tumeur peut également recruter des précurseurs circulants des cellules endothéliales issus des progéniteurs sanguins endothéliaux ou angioblastes. Les progéniteurs s'incorporent dans les sites angiogéniques et permettent la mise en place de la vascularisation (Rabbany *et al.,* 2003).

La vascularisation de la tumeur peut également impliquer des cellules tumorales. Des vaisseaux mosaïques ont été décrits. Il s'agit de vaisseaux constitués de cellules endothéliales et de cellules tumorales. Ces vaisseaux sont très perméables et favorisent donc la formation de métastases (Chang *et al.,* 2000). Certains vaisseaux peuvent également être constitués uniquement de cellules tumorales qui se transdifférencient en cellules endothéliales, c'est le mécanisme de mimétisme vasculaire (Maniotis *et al.,* 1999).

2. Facteurs angiogéniques

Les inhibiteurs et les activateurs de l'angiogenèse sont des cytokines, des facteurs de croissance, synthétisés par la tumeur mais aussi par de nombreuses cellules, qui agissent directement sur les cellules endothéliales *via* des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules ou indirectement *via* des cellules présentes dans le stroma proche du lieu de l'angiogenèse. En effet, les facteurs angiogéniques vont dicter aux cellules constituant le stroma de synthétiser des protéines intervenant dans le processus angiogénique.

Le facteur clef de l'angiogenèse est le VEGF (Ferrara *et al.,* 2003). En plus de son rôle dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire, son activité mitogène permet de stimuler la prolifération des cellules endothéliales. D'autres facteurs ont un rôle angiogénique, ou de facteurs de croissance tels que le FGF, le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), l'Epidermal Growth Factor (EGF) ou l'Insuline Growth Factor (IGF-1) (Baselga, 2002 ; Gospodarowicz *et al.,* 1989 ; Oh *et al.,* 2002). Par exmple, le FGF-2 contrôle la prolifération

et la migration des cellules endothéliales en contrôlant la taux des intégrines nécessaires à la migration des cellules (Serini *et al.,* 2006). Les angiopoïétines ont un rôle essentiel dans l'angiogenèse puisqu'elles participent à la formation et à la maturation des microvaisseaux. L'Ang-2 a un rôle activateur ou inhibiteur de l'angiogenèse en fonction de la présence ou de l'absence de VEGF. En présence de VEGF, l'Ang-2 induit la migration et la prolifération des cellules endothéliales et inhibe l'Ang-1 qui maintient la quiescence des cellules endothéliales. En absence de VEGF, l'ang-2 déstabilise les vaisseaux et augmente l'apoptose des cellules endothéliales (Lobov *et al.,* 2002) et l'Ang-1 participe à la stabilisation des vaisseaux (Davis *et al.,* 1996 ; Suri *et al.,* 1996). Le TGF-β permet la différenciation des cellules endothéliales et des péricytes et intervient dans la reconstruction de la lame basale, et lorsqu'il est en présence de TNF-α (Tumor Necrosis Factor), ces deux facteurs peuvent jouer un rôle dans la formation des vaisseaux et leur stabilisation ou inhiber la formation du réseau vasculaire (Frater-Schroder *et al.,* 1987 ; Pepper, 1997 ; Roberts *et al.,* 1986).

De nombreux inhibiteurs de l'angiogenèse ont été identifiés. Parmi ceux-ci, l'angiostatine et l'endostatine sont capables de diminuer la prolifération et la migration des cellules endothéliales et d'augmenter leur apoptose ; la thrombospondine, qui est une protéine de la MEC, participe à la stabilisation des vaisseaux néoformés en contrôlant la migration de cellules endothéliales et en participant à la restructuration de la lame basale. Le TNFα peut inhiber la prolifération des cellules endothéliales induites par le FGF et les CXC-chemokines inhibent la liaison du VEGF165 et du FGF à leur récepteur (Belperio *et al.,* 2000 ; Boehm *et al.,* 1997 ; Claesson-Welsh *et al.,* 1998).

3. Thérapie anti-angiogénique

Le développement d'une vascularisation intra ou péri-tumorale est un événement clef, aussi bien pour la croissance de la tumeur que pour la dissémination métastatique par la voie sanguine. La connaissance des mécanismes moléculaires de l'angiogenèse tumorale a permis d'identifier une série de molécules capables de cibler le réseau vasculaire irriguant la tumeur. Ainsi, bloquer l'effet du VEGF et/ou l'activité des récepteurs au VEGF, localisés à la surface des cellules endothéliales, semblent être des traitements efficaces pour moduler la croissance et la dissémination tumorale.

Le premier traitement anti-angiogénique approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) en 2004 est le bevacizumab ou Avastin™. C'est un anticorps monoclonal

humanisé dirigé contre le VEGF. Des essais thérapeutiques associant le bevacizumab à une chimiothérapie classique ont été proposés à des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques (Hurwitz *et al.,* 2004), de cancers bronchiques non à petites cellules (Herbst *et al.,* 2005), de cancers du sein (Mauri *et al.,* 2008) et de carcinomes rénaux à un stade avancé ou métastatiques (Escudier *et al.,* 2007). Ces essais cliniques comparatifs ont démontré que l'Avastin™ associé avec une chimiothérapie augmentait significativement la survie sans progression et la survie globale de patients atteints de cancers colorectaux métastatiques et de cancers du poumon non à petites cellules.

Une autre stratégie anti-angiogénique consiste à utiliser des molécules capables d'inhiber l'activité tyrosine kinase de récepteurs intracellulaires ; ces molécules ont donné naissance à des médicaments administrés par voie orale. Le sunitinib (SU11248) inhibe les VEGFR, PDGFR, C-kit, et Flt-3 et le sorafenib (BAY43-9006) inhibe les VEGFR, PDGFR mais aussi c-Raf et B-Raf (Homsi et Daud, 2007). Le sorafenib a été approuvé pour le traitement de carcinomes hépatiques (Lang, 2008) et de cancers du rein métastatiques (Eto et Naito, 2006). Le sunitinib a été approuvé pour le traitement de cancers du rein métastatiques (Motzer *et al.,* 2007), de tumeurs stromales gastro-intestinales (Rock *et al.,* 2007), et utilisé en phase III pour le traitement de cancers du sein (Murray *et al.,* 2003), de cancers bronchiques non à petites cellules (Novello *et al.,* 2009), d'hépatocarcinomes (Rossi *et al.,* 2010) et de cancers de la prostate (Gasent *et al.,* 2011).

Une autre stratégie consiste à cibler les cellules endothéliales afin de bloquer leur migration et leur prolifération en utilisant des inhibiteurs de la voie de signalisation impliquant mTOR tels que le Temsirolimus (Toricel) et l'everolimus (Affinitor) (Negrier et Raymond, 2011).

D'autres stratégies utilisées dans le cadre d'essais cliniques, sont des molécules qui ciblent le récepteur au VEGF et au FGF. Ces molécules vont empêcher la fixation des facteurs de croissance sur leur récepteur donc empêcher que le signal intracellulaire soit activé (Allen *et al.,* 2011 ; Bello *et al.,* 2011 ; Kim *et al.,* 2011). De plus, certains médicaments vont cibler le micro-environnement de la tumeur, soit en empêchant la destruction de la MEC par des inhibiteurs des enzymes dégradant la MEC, soit en bloquant certaines protéines localisées à la surface des cellules endothéliales pour empêcher la migration des cellules.

4. VEGF

Le VEGF-A a été cloné en 1989 par Ferrara et Henzel et identifié comme étant un facteur angiogénique majeur et spécifique des cellules endothéliales (Ferrara et Henzel, 1989). En effet, c'est un facteur clef de la vasculogenèse et de l'angiogenèse physiologique durant la vie embryonnaire (car l'inactivation du gène *vegf* entraîne une mort précoce des embryons de souris), mais également durant la vie adulte (Carmeliet *et al.*, 1996).

4.1. Famille des VEGF

Le VEGF-A appartient à la famille des VEGF qui comprend aussi les VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et le PlGF (Facteur de croissance placentaire). Ce sont des glycoprotéines qui vont former des homodimères car elles possèdent un domaine composé de 8 cystéines impliquées dans les liaisons disulfures des dimères (Neufeld *et al.*, 1999). Les VEGF se distinguent par leurs propriétés biologiques ainsi que par leur affinité aux différents récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3.

4.1.1. Le VEGF-A

Le gène du *vegf-a* humain est localisé sur le chromosome 6 en position 6p21.3 et est organisé en 8 exons séparés par 7 introns (Vincenti *et al.*, 1996).

Par épissage alternatif, plusieurs isoformes sont synthétisées et leur composition varie de 111 à 206 acides aminés. Cependant, la plupart des cellules expriment préférentiellement les isoformes VEGF121, 165 et 189 ; le VEGF165 étant la forme prédominante. Les VEGF sont des glycoprotéines dimériques de 34 à 45 kDa et sont sécrétées puisqu'un peptide signal est localisé dans la partie N-terminale de la protéine. Les exons de 1 à 5 codent des régions qui sont communes à toutes les isoformes. L'exon 1 et une partie de l'exon 2 codent la séquence signal de 26 acides aminés (Siemeister *et al.*, 1998). Les exons 3 et 4 codent des domaines qui possèdent des sites qui vont permettre à la protéine de se lier aux récepteurs (VEGFR-1 et VEGFR-2) (Keyt *et al.*, 1996). L'exon 5 code un domaine qui présente des sites de clivage protéolytique pour la plasmine (Claffey *et al.*, 1995) et pour les métalloprotéases (Lee *et al.*, 2005). Les exons 6 et 7 codent un domaine de la protéine présentant des sites de fixation aux héparanes sulfates, ce qui confère aux isoformes possédant ces exons, la capacité d'être séquestrées dans la MEC (Park *et al.*, 1993). L'exon 8a code la partie C-terminale de la

protéine qui présente l'activité mitogène. Le VEGF121, qui ne possède pas les exons 6 et 7 (Anthony *et al.*, 1994), ne se lie pas aux héparanes sulfates ; il pourra diffuser librement contrairement aux formes 189 et 206 qui seront complètement séquestrées dans la MEC. Le VEGF165 existe sous les 2 formes, libre ou séquestrée dans la MEC.

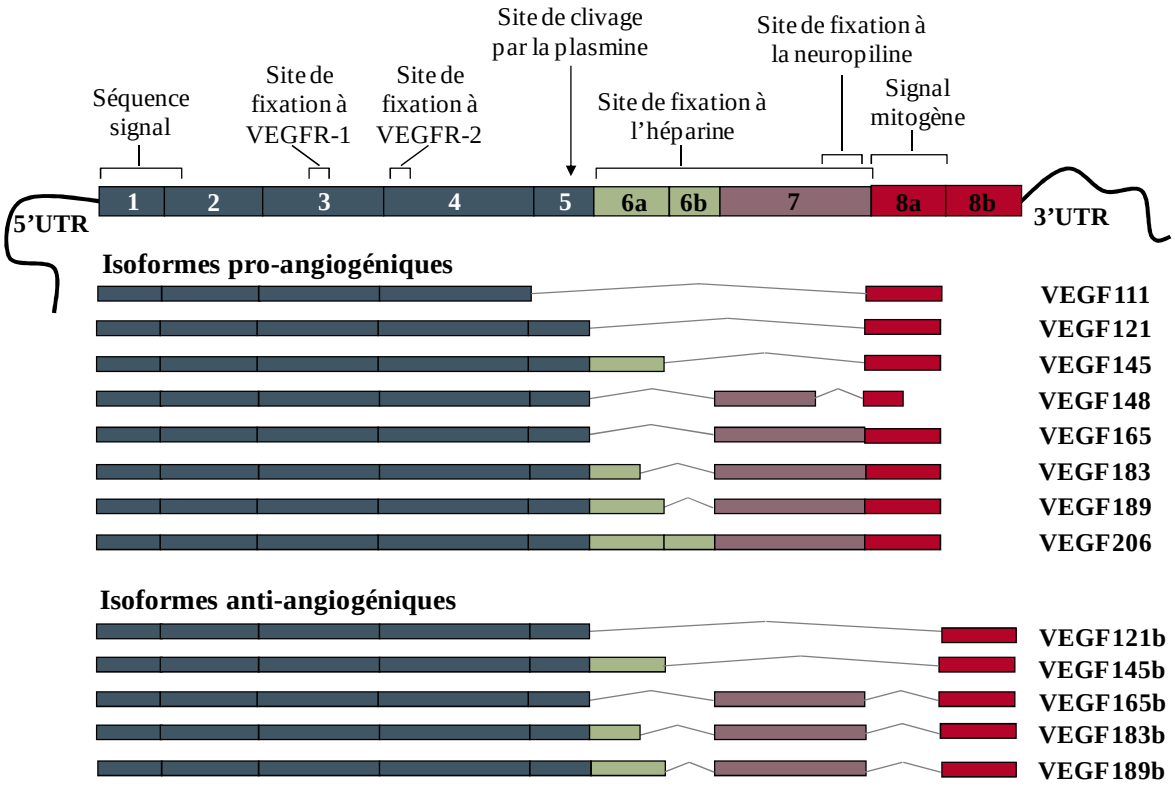

Figure 9 : Schéma des transcrits alternatifs du VEGF humain. D'après Hilmi *et al.*, 2012.

Toutes les isoformes sont sécrétées sous forme de monomères pour ensuite se complexer et former des dimères. Les 2 monomères sont tête-bêche l'un par rapport à l'autre et vont former une liaison covalente entre la cystéine 51 d'un monomère et la cystéine 61 de l'autre monomère (Potgens *et al.*, 1994) ; c'est sous forme de dimère que les différents VEGF vont se lier aux récepteurs.

Les différentes isoformes du VEGF ont des activités biologiques différentes bien que toutes les isoformes soient capables d'induire l'angiogenèse. Le VEGF121 serait plutôt impliqué dans le contrôle de la perméabilité vasculaire alors que le VEGF165 activerait préférentiellement la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Zhang *et al.*, 2008). Le VEGF189, bien qu'étant en quantité moins importante que les VEGF121 et 165,

reste piégé dans la MEC, ce qui lui permettra de stimuler préférentiellement la migration des cellules endothéliales (Stalmans *et al.,* 2002). Le VEGF145 est exprimé uniquement dans le tractus génital de la femme (Poltorak *et al.,* 1997). Une nouvelle isoforme a été récemment identifiée, il s'agit du VEGF111. Cette isoforme n'est vraisemblablement pas présente dans les tissus normaux ; par contre, elle est exprimée lorsque les cellules sont soumises à des stress génotoxiques induits par des rayonnements UV ou des agents chimiothérapeutiques. Ne possédant pas l'exon 5, elle ne peut être lysée par la plasmine (Mineur *et al.,* 2007). Le VEGF111 participerait à l'acquisition par la cellule d'une résistance aux chimiothérapies mais serait aussi un outil thérapeutique intéressant pour corriger les ischémies induites par certaines pathologies.

En 2002, un nouveau variant de la famille du VEGF a été identifié, le VEGF165b. Comparativement au VEGF165, seul le domaine correspondant au 8ème exon diffère. En effet, le VEGF165b diffère du VEGF165 par les 6 acides animés situés en position C-terminale, région contenant le signal mitogène. Le VEGF165b a la capacité de se lier au récepteur au VEGF mais n'a pas la capacité d'activer les voies de signalisation dépendantes de ce récepteur. Le VEGF165b a une activité anti-angiogénique car il est capable d'une part, d'inhiber la prolifération et la migration des cellules endothéliales induites par le VEGF165 (Bates *et al.,* 2002) et d'autre part d'inhiber l'angiogenèse dans un modèle *in vivo* (Woolard *et al.,* 2004).

4.1.2. Le VEGF-B

Le VEGF-B présente une homologie de séquence en acides aminés de 43 % avec le VEGF-A. Le gène humain *vegf-B* est situé sur le chromosome 11 en position 11q13 (Paavonen *et al.,* 1996). Il comprend 7 exons. Suite à un épissage alternatif, 2 isoformes sont synthétisées, le VEGF167 qui a la possibilité de diffuser dans la MEC et le VEGF186 qui peut se lier à la membrane cellulaire et à la MEC (Olofsson *et al.,* 1996). Le VEGF-B peut former des homodimères mais aussi des hétérodimères avec le VEGF-A. Le VEGF-B peut se lier et activer le récepteur VEGFR-1 mais il peut aussi se lier à la neuropiline-1. Cet isotype serait impliqué dans le développement et le bon fonctionnement de la vascularisation du cœur et des muscles squelettiques. Cependant, sa présence ne semble pas indispensable au processus angiogénique (Aase *et al.,* 1999).

4.1.3. Le VEGF-C

Le VEGF-C présente 30% d'homologie de séquence en acides aminés avec le VEGF-A et 60% avec le VEGF-D. Comme pour le VEGF-D, il est synthétisé sous forme de précurseur et doit être clivé pour devenir une forme pouvant se lier et activer les récepteurs. Le gène humain est organisé en 6 exons et est situé sur le chromosome 4 en position 4q34 (Joukov *et al.*, 1996 ; Paavonen *et al.*, 1996). Le VEGF-C a une forte affinité pour les récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3. Par le récepteur VEGFR-2, il a un rôle dans la migration et la prolifération des cellules endothéliales, et par le récepteur VEGFR-3, il joue un rôle important dans la lymphangiogenèse (Karkkainen *et al.*, 2004).

4.1.4. Le VEGF-D

Le VEGF-D présente une homologie de séquence en acides aminés de 31 % avec le VEGF-A et de 60 % avec le VEGF-C. Son gène est organisé en 7 exons et est situé sur le chromosome X en position Xp22.31 (Yamada *et al.*, 1997). Le VEGF-D, aussi appelé FlGF (c-fos induced growth factor) active les récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3. De par son affinité pour ces récepteurs, il a un rôle dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse (Stacker *et al.*, 2001).

4.1.5. Le VEGF-E

Le VEGF-E a été identifié en 1994 dans le génome des paropoxivirus qui infectent les moutons, les chèvres et occasionnellement l'Homme où il provoque des lésions de la peau qui résultent d'une prolifération et d'une dilatation des capillaires sanguins (Lyttle *et al.*, 1994). En fait, il s'agit d'un groupe de protéines qui se lie au récepteur VEGFR-2 mais pas au VEGFR-1 et VEGFR-3 et aurait un rôle biologique proche de celui du VEGF165 (Meyer *et al.*, 1999).

4.1.6. Le PlGF

Le gène *plgf* est organisé en 7 exons et est localisé sur le chromosome 14 en position 14q24-q31. Comme le VEGF-A, le PlGF est une glycoprotéine homodimérique. Ce facteur se lie au VEGFR-1 mais pas au VEGFR-2. Le PlGF entre en compétition avec le VEGF-A pour

le VEGFR-1 ; il favoriserait de ce fait la liaison du VEGF-A sur le VEGFR-2 et potentialiserait la réponse angiogénique du VEGF-A (Carmeliet *et al.,* 2001).

4.2. Les récepteurs du VEGF

Les différentes isoformes et isotypes du VEGF exercent leur activité biologique par l'intermédiaire de récepteurs à activité tyrosine kinase principalement localisés à la surface des cellules endothéliales. La famille de ces récepteurs comprend le VEGFR-1, le VEGFR-2 et le VEGFR-3. Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires qui possèdent un domaine extracellulaire composé de 7 boucles « immunoglobulin-like » impliquées dans la reconnaissance et la fixation du ligand, une région polypeptidique transmembranaire et un domaine intracytoplasmique à activité tyrosine kinase conduisant à l'activation des voies de signalisation intracellulaires. Ces récepteurs monomériques sont activés par la liaison d'un dimère de VEGF qui va conduire à la dimérisation des récepteurs, ce qui déclenche une activité kinase intrinsèque conduisant à une trans autophosphorylation. Il existe aussi des formes solubles, dépourvues des domaines transmembranaire et intracellulaire, qui ne possèdent donc pas d'activité tyrosine kinase.

4.2.1. Le VEGFR-1

Le VEGFR-1, également appelé flt-1 (fms-like tyrosine kinase 1), a été le premier récepteur isolé et identifié ayant une haute affinité pour le VEGF (Shibuya *et al.,* 1990 ; de Vries *et al.,* 1992). C'est une glycoprotéine transmembranaire de 180 kDa qui est localisée à la surface des cellules endothéliales et des péricytes (Nomura *et al.,* 1995), des monocytes et des macrophages (Barleon *et al.,* 1996), des cellules dendritiques (Dikov *et al.,* 2005), des ostéoblastes (Byun *et al.,* 2007), des cellules souches hématopoïétiques (Kaplan *et al.,* 2005) et des cellules vasculaires du muscle lisse (Grosskreutz *et al.,* 1999). Le VEGFR-1 est aussi situé à la surface des cellules tumorales colorectales (Fan *et al.,* 2005) et des cellules de carcinomes de vessie (Brown *et al.,* 1993 ; Sato *et al.,* 1998). Le VEGFR-1 est un récepteur pour le VEGF, VEGF-B et le PlGF. Lorsqu'il est activé, il peut former des homodimères ou des hétérodimères avec le VEGFR-2. Selon le complexe formé, il peut induire des fonctions différentes (Huang *et al.,* 2001). Le VEGFR-1 est impliqué dans la migration des cellules endothéliales mais aussi des monocytes et des macrophages (Sawano *et al.,* 2001) et dans le recrutement des cellules souches hématopoïétiques (Hattori *et al.,* 2002).

Une forme soluble de VEGFR-1, issue d'un épissage alternatif du gène et possèdant seulement les 6 premiers domaines IgG-like, a été identifiée (Kondo *et al.*, 1998 ; Shibuya 2001). Cette forme séquestrerait le VEGF et inhiberait son activité (Kendall et Thomas 1993; Kendall *et al.*, 1996).

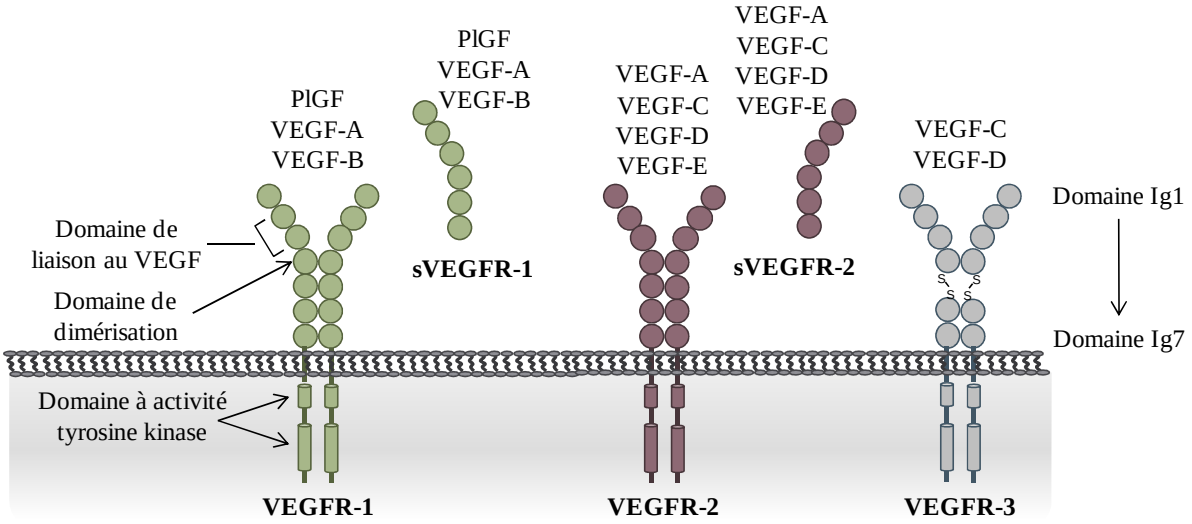

Figure 10 : Récepteurs tyrosine kinase des isoformes et isotypes du VEGF. D'après Neufeld *et al*., 1999 ; Pavlakovic *et al*., 2010.

4.2.2. Le VEGFR-2

Le VEGFR-2 également appelé KDR (Kinase insert Domain containing Receptor-human homologue) ou flk-1 (fetal liver kinase-1) est une glycoprotéine de 230 kDa (Terman *et al.*, 1992) qui est localisée à la surface des cellules endothéliales mais aussi à la surface des cellules souches hématopoïtiques, des cellules neuronales, des ostéoblastes, des cellules pancréatiques, des mégakaryocytes et des cellules vasculaires du muscle lisse (Grosskreutz *et al*., 1999). La présence de ce récepteur a été également identifié dans des lignées cellulaires dérivées de cancer humain du sein (de Jong *et al.*, 1998 ; Kranz *et al.*, 1999), de neuroblastomes (Langer *et al.*, 2000), de cancers gastriques (Takahashi *et al.*, 1996 ; Zhang *et al.*, 2002), de carcinomes urothéliaux (Xia *et al.*, 2006) et dans des cellules de carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus (Nagy *et al.*, 2011). Le VEGFR-2 est un récepteur pour le VEGF et les formes clivées du VEGF-C et du VEGF-D ainsi que pour la forme virale, le VEGF-E. Ce récepteur est considéré comme le principal médiateur des effets du VEGF-A puisqu'il est impliqué dans la prolifération, la migration, la perméabilisation et la survie des

cellules endothéliales (Shibuya et Claesson-Welsh, 2006). Il interviendrait aussi dans les processus de chimiotactisme et de lymphangiogenèse (Nagy *et al.,* 2002). Une forme soluble du VEGFR-2 de 160 kDa a été détectée dans le plasma humain (Ebos *et al.,* 2004). Les rôles de sVEGFR-2 ne sont pas totalement élucidés ; cependant, cette forme capterait et diminuerait l'effet des molécules capables de bloquer l'activité du récepteur transmembranaire VEGFR-2.

4.2.3. Le VEGFR-3

Le VEGFR-3 ou flt4 (195 kDa), est synthétisé sous la forme d'un précurseur qui subit un clivage protéolytique au niveau du 5ème domaine Ig-like de sa partie extracellulaire. Les fragments générés restent assemblés par un pont disulfure qui relie 2 chaînes : une de 125 kDa et une de 75 kDa (Cebe-Suarez *et al.,* 2006). Le VEGFR-3 est un récepteur de haute affinité pour le VEGF-C et le VEGF-D ; c'est le principal récepteur impliqué dans la lymphangiogenèse. Chez l'adulte, le VEGFR-3 est exprimé par les vaisseaux lymphatiques où il est impliqué dans la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales lymphatiques (Kaipainen *et al.,* 1995 ; Makinen *et al.,* 2001).

4.2.4. Les neuropilines

Deux autres récepteurs sont inclus dans la famille des récepteurs du VEGF : ce sont les neuropilines (NRP). NRP-1 et NRP-2 sont des glycoprotéines transmembranaires qui possèdent une partie extracellulaire et une courte queue cytoplasmique comportant un domaine PDZ (post synaptic density protein) (Pellet-Many *et al.,* 2008). Ces récepteurs ne possèdent pas d'activité tyrosine kinase mais agissent comme des corécepteurs du VEGF. NRP-1 peut lier le VEGF-A, -B et le PIGF-2 alors que NRP-2 peut lier les VEGF-A, -C et -D. NRP-1 peut se complexer avec le VEGFR-2, augmentant l'efficacité de liaison du VEGF-A sur son récepteur VEGFR-2. D'ailleurs, le VEGF165 a plus d'affinité pour la NRP-1 que le VEGF121, ce qui pourrait expliquer pourquoi le VEGF165 a une activité angiogénique plus élevée que celle du VEGF121 (Soker *et al.,* 1998). Les neuropilines, plus particulièrement NRP-1, sont présentes à la surface des cellules endothéliales et neuronales. Elles sont aussi exprimées à la surface des cellules endothéliales et participent à la formation du réseau vasculaire qui irrigue la tumeur, comme cela a été décrit dans le cas des neuroblastomes (Fakhari *et al.,* 2002) et du cancer du sein (Stephenson *et al.,* 2002). Elles sont aussi exprimées à la surface des cellules tumorales de poumon (Kawakami *et al.,* 2002).

Vraisemblablement, les NRP ont un rôle déterminant au cours du développement embryonnaire et sur le maintien des systèmes nerveux et cardiovasculaire durant la vie adulte. De plus, ces récepteurs sont impliqués dans la mise en place de l'angiogenèse tumorale et la formation de métastases.

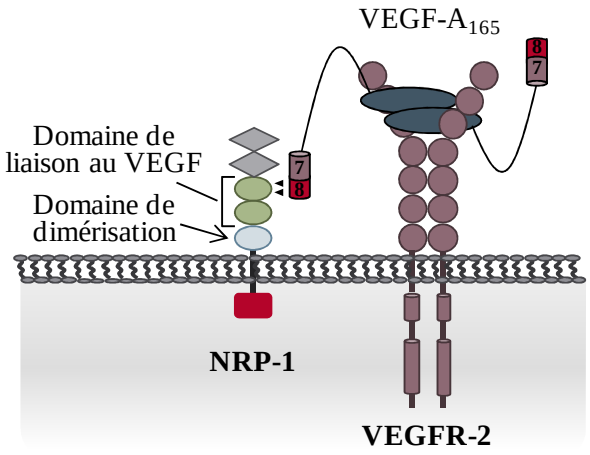

Figure 11 : Structure de NRP-1 et formation du complexe VEGFR-2/NRP-1. D'après Pellet-Many *et al*., 2008.

4.2.5. Les héparanes sulfates

Les héparanes sulfates sont des glycosaminoglycanes présents dans la MEC et lorsqu'ils sont liés à des protéines, sont situés à la surface de la plupart des cellules. Les héparanes sulfates sont des cofacteurs non spécifiques, intervenant dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Leur fonction biologique leur donne un rôle important dans l'adhérence cellule-MEC, les interactions cellule-cellule et les interactions facteur de croissance-récepteur (Vlodavsky *et al.*, 1996). Les protéoglycanes et les héparanes sulfates interviennent dans les processus angiogéniques. Ces glycosaminoglycanes interviennent dans l'interface qui existe entre les constituants de la MEC et les cellules endothéliales et vont influencer la migration, la prolifération des cellules mais aussi la stabilisation des capillaires formés. Ces constituants de la MEC interviennent dans l'action biologique du VEGF-A. En effet, la liaison du VEGF-A à l'héparine, appartenant à la famille des héparanes sulfates qui ont une forte affinité pour le VEGF, favorise la fixation du VEGF sur le VEGFR-2 et de ce fait, diminue sa liaison sur le VEGFR-1. De plus, les héparines permettent la séquestration

des isoformes du VEGF possédant des sites de fixation à l'héparine, ce qui permettra à la MEC d'être un réservoir de facteurs de croissance (Houck *et al.,* 1992).

4.3. Rôles du VEGF

La fixation du VEGF, au niveau de la partie extracellulaire du récepteur, va conduire à l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaire, contrôlant les fonctions biologiques suivantes : migration, prolifération, différenciation, survie et perméabilité vasculaire (Cross *et al.,* 2003 ; Holmes *et al.,* 2007).

Selon les données de la littérature, le VEGFR-2 est capable, à lui seul, d'induire tous les effets biologiques du VEGF-A (Ferrara *et al*., 2003). D'ailleurs, le VEGFR-2 est indispensable à la vasculogenèse lors du développement embryonnaire puisque les embryons chez lesquels le gène *vegfr-2* a été invalidé meurent dès les premiers jours de la vie fœtale suite au développement d'un réseau vasculaire anormal (Carmeliet *et al*., 1996 ; Ferrara *et al.,* 1996 ; Shalaby *et al.,* 1995).

Néanmoins, le récepteur VEGFR-1 a aussi un rôle très important à jouer dans l'organisation du réseau vasculaire au cours de l'embryogenèse puisque l'invalidation du gène codant le VEGFR-1 entraine une mortalité précoce chez les embryons *vegfr-1*$^{-/-}$ (Fong *et al.,* 1995). Cependant, les souris où seule la partie du gène codant le domaine tyrosine kinase du récepteur a été invalidée, se développent normalement. Ces résultats suggèrent que le récepteur VEGFR-1, séquestre le VEGF-A, l'empêchant de se lier au VEGFR-2, limitant ainsi la fonction biologique du VEGFR-2 (Hiratsuka *et al.,* 1998). D'autre part, le VEGFR-1 a une affinité 10 fois plus importante pour le VEGF que celle du VEGFR-2. Pourtant, son activité tyrosine kinase est 10 fois moins efficace que celle du récepteur VEGFR-2 (Takahashi et Shibuya, 2005). Chez l'adulte, l'activation du VEGFR-1 par le VEGF induit la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales et des péricytes (Kanno *et al.,* 2000).

Le VEGFR-1 semble être un corécepteur favorisant l'action du VEGF-A ; il potentialiserait l'action du VEGF-A sur la perméabilité vasculaire. Il a aussi un rôle important à jouer dans l'endothélium pathologique, lors de l'angiogenèse tumorale (Carmeliet *et al*., 2001 ; Ferrara *et al*., 2003). De plus, le VEGFR-1 est fortement exprimé à la surface des cellules progénitrices hématopoïtiques de la moelle osseuse, cellules qui sont recrutées sur les

sites métastatiques. Ainsi, l'expression du récepteur VEGFR-1 à la surface de ces cellules va favoriser la dissémination métastatique en créant un environnement propice à la stabilisation des cellules cancéreuses (Kaplan *et al*., 2005).

Le VEGFR-3 est situé principalement à la surface des cellules endothéliales qui constituent le réseau vasculaire lymphatique, et joue un rôle fondamental dans le développement embryonnaire puisque l'invalidation de son gène conduit à la mort précoce des embryons, car il intervient dans le développement cardiovasculaire des embryons (Dumont *et al.,* 1998).

4.3.1. Perméabilité

A l'origine, le VEGF a été le premier facteur de croissance identifié comme un régulateur clef de la perméabilité vasculaire (Senger *et al.,* 1983). L'induction de la perméabilité vasculaire nécessite l'activation de la eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) afin de produire du NO (monoxyde d'azote), inducteur de la perméabilité vasculaire. L'activation de la NOS est due à l'activité de la PLCγ ou à sa phosphorylation par la voie PI3K/Akt/PKB (PhosphoInositide 3 Kinase/Akt/protéine kinase B) (Dimmeler *et al.,* 1999 ; Fulton *et al.,* 1999). L'IP3 (inositol 1,4,5 triphosphate) formé va se lier à des récepteurs spécifiques à la surface du réticulum endoplasmique favorisant la libération de Ca^{2+} permettant la production de NO. Les membres de la famille Scr semblent être impliqués dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF mais leur rôle n'est pas encore clairement établi (Eliceiri *et al.,* 1999). Par ailleurs, une étude suggère que le processus de perméabilité vasculaire nécessite la coopération entre le VEGFR-2 et la NRP-1 (Becker *et al.,* 2005). L'augmentation de la perméabilité vasculaire provoque l'extravasation de protéines plasmatiques, protéines qui vont intervenir dans la formation de substrats favorisant la prolifération endothéliale.

4.3.2. Prolifération

Les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la prolifération des cellules endothéliales font intervenir des MAPK et des ERK1/2. La fixation du VEGF à ses récepteurs permet la phosphorylation de la tyrosine 1175 du récepteur qui conduira à la phosphorylation de la PLCγ et à sa fixation au VEGFR-2 *via* ses 2 domaines SH2 (Src homology-2). La PLCγ, ainsi activée, hydrolysera le PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) en IP3 et DAG (diacylglycérol). L'IP3 entrainera une augmentation de calcium intracellulaire et le DAG

activera la PKC qui, à son tour, activera une cascade de signalisation impliquant les protéines raf, les kinases MEK1 et MEK2 et les protéines kinases ERK1/2, afin de contrôler l'expression de gènes impliqués dans la prolifération (Takahashi *et al.,* 1999 ; Takahashi *et al.,* 2001). D'autre part, l'activation du récepteur au VEGF conduit aussi à l'activation de Ras qui va initier une cascade de phosphorylations contrôlant la migration cellulaire (Meadows *et al.,* 2001). La voie PI3K/Akt intervient également dans le contrôle de la prolifération des cellules endothéliales (Vinals *et al.,* 1999).

4.3.3. Survie

Le VEGF joue un rôle important dans le contrôle de la survie des cellules endothéliales (Alon *et al.,* 1995). *In vitro*, le VEGF protège les cellules endothéliales de l'apoptose induite par le TNFα (Spyridopoulos *et al.,* 1997) ou les radiations ionisantes (Katoh *et al.,* 1995). En effet, les cellules endothéliales des vaisseaux immatures requièrent des signaux de survie sans quoi une mort cellulaire par apoptose est induite (Frisch, 1997). L'activation du VEGFR-2 conduit à l'activation de l'enzyme PI3K qui phosphoryle le PIP2 pour donner du PIP3. Le PIP3 déclenchera la phosphorylation de Akt/PKB, ce qui va bloquer l'activité des protéines pro-apoptotiques BAD (Bcl-2 associated death promotor) et caspase 9, et augmenter l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ou la survivine, capable d'inhiber l'activité des caspases 3 et 7 (Gerber *et al.,* 1998). Le processus conditionnant la survie des cellules endothéliales serait contrôlé par un autre mécanisme faisant intervenir la protéine kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) (Levkau *et al.,* 1998 ; Zachary et Gliki, 2001). En effet, le recrutement et la phosphorylation de FAK, qui est une protéine cytoplasmique retrouvée au sein du complexe d'adhérence, va favoriser l'ancrage des cellules endothéliales à la MEC donc leur survie.

4.3.4. Migration

L'activation du VEGFR-2 favorise la polymérisation de l'actine, la formation de lamellipodes et la contraction des fibres de myosine conduisant à la migration cellulaire selon deux voies de signalisation. D'une part, la phosphorylation de la tyrosine 1175 du VEGFR-2 permet le recrutement de la protéine adaptatrice shb qui conduit à l'activation des voies de signalisation impliquant les protéines FAK et PI3K, toutes deux impliquées dans la migration cellulaire (Holmqvist *et al.,* 2004). D'autre part, la phosphorylation de la tyrosine 1214 du

récepteur VEGFR-2 permet l'activation de la p38 MAPK impliquée dans la réorganisation de l'actine *via* la phosphorylation de la MK2 et de la HSP27 (Heat-Shock-Protein 27) (Rousseau *et al.*, 1997). La migration cellulaire est un mécanisme essentiel rendu possible suite à des modifications des systèmes impliqués dans l'adhérence cellulaire.

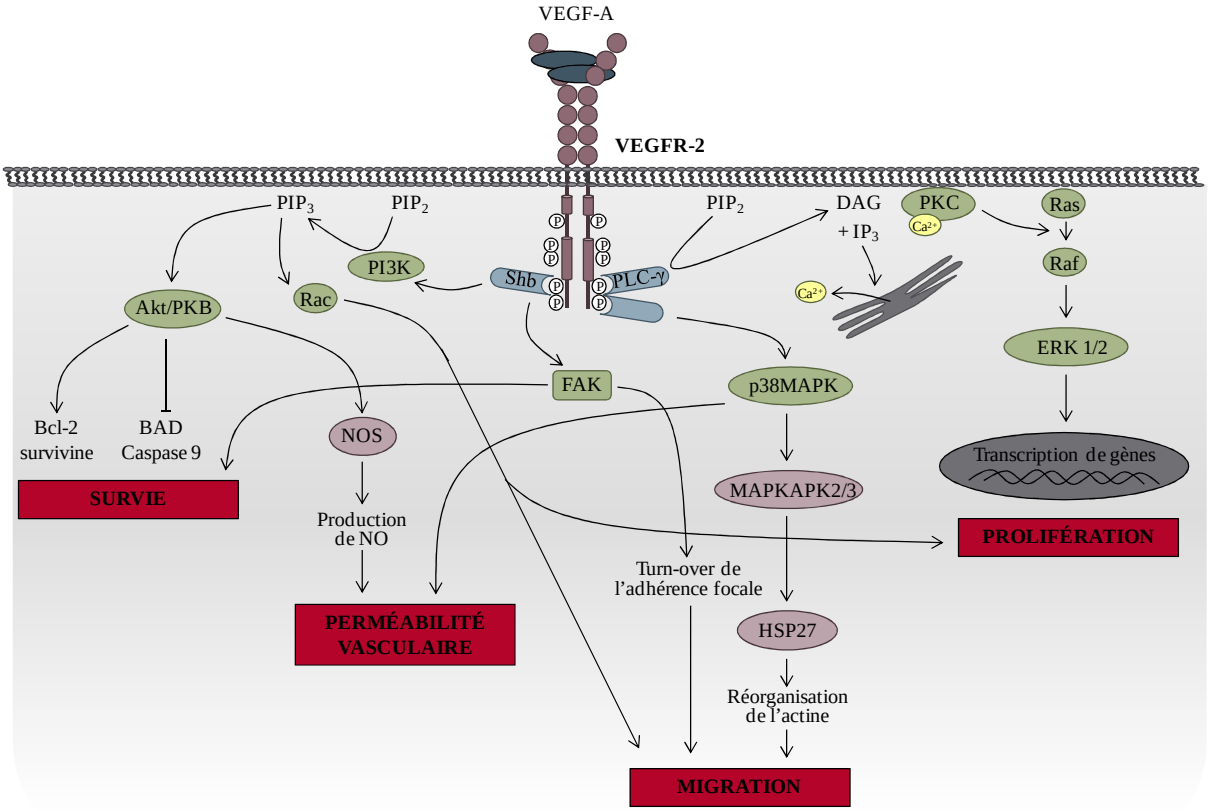

Figure 12 : Voies de signalisation intracellulaires activées par le VEGF et fonctions physiologiques du VEGF. D'après Holmes *et al*., 2007.

4.4. Régulation du VEGF

Le VEGF est synthétisé et sécrété par les cellules tumorales mais aussi par une grande variété de cellules telles que les cellules endothéliales, les macrophages, les lymphocytes… (Folkman, 2002). L'expression du VEGF est contrôlée par un grand nombre de facteurs mais c'est l'hypoxie survenant au sein de la tumeur, qui représente l'inducteur principal du VEGF. L'ARNm du VEGF possède une extrémité 5'UTR et une extrémité 3'UTR (UnTranslated Region) et la régulation de l'expression du VEGF se fait à 3 niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel.

4.4.1. Régulation transcriptionnelle du VEGF

Le promoteur du *vegf* s'étend sur environ 2,3 kb. Le site d'initiation principal de la transcription est situé à 1038 pb en amont du site d'initiation de la traduction ATG. Un promoteur alternatif serait situé à + 632 pb en aval du site majeur d'initiation de la transcription et a été décrit à l'origine dans la région 5'UTR du *vegf* (Akiri *et al.*, 1998). L'activation de ce promoteur permettrait la synthèse d'un transcrit court, dont la région 5'UTR est raccourcie comparativement au transcrit issu du promoteur classiquement décrit. De plus, pour faciliter la traduction, cette région possède des structures IRES (Internal Ribosome Entry Site), éléments qui vont faciliter la fixation du ribosome.

La séquence promotrice ne contient pas de boite TATA mais de nombreux éléments de réponse tels que HRE, ERE, PRE et des sites régulateurs fonctionnels tels que Sp1, AP1/2, STAT3 suggérant une régulation par de nombreux facteurs de transcription (Krejsgaard *et al.*, 2006 ; Pages et Pouyssegur, 2005).

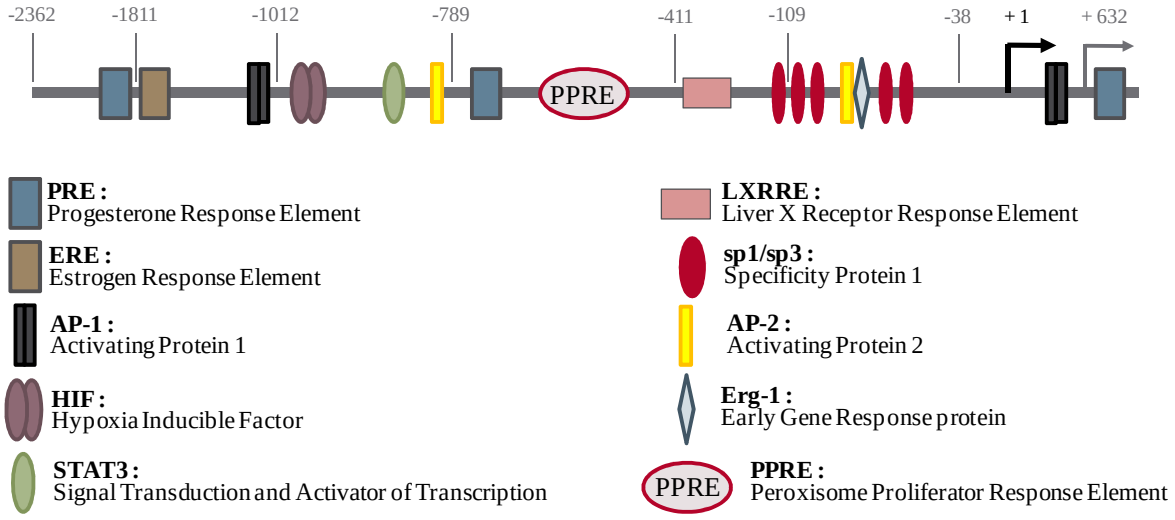

Figure 13 : Représentation schématique des sites de fixation de facteurs de transcription sur le promoteur du *vegf*. D'après Pages et Pouyssegur, 2005 ; Peeters *et al.*, 2005.

La régulation du VEGF dans des conditions d'hypoxie implique le facteur de transcription HIF (Hypoxia Inducing Factor). Celui-ci est composé de 2 sous-unités HIF-1α et HIF-1β. En condition normoxique, les taux de HIF-1α sont faibles. Par contre, en condition hypoxique, il y a accumulation de la protéine HIF-1α qui va se déplacer vers le noyau afin de s'associer

avec HIF-1β. L'hétérodimère HIF-1 formé va se fixer sur une séquence cible HRE (HIF-responsive element) localisée dans le promoteur du gène *vegf* et ainsi augmenter sa transcription (Wang *et al.,* 1995).

L'angiogenèse étant un processus indispensable au bon fonctionnement des appareils reproducteurs mâle et femelle, l'effet des hormones stéroïdes a évidemment été étudié sur l'expression du VEGF. Les estrogènes augmentent la transcription du VEGF *via* un élément de réponse aux estrogènes (ERE) situé en position -1520 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Cet ERE lie les récepteurs aux estrogènes ERα et ERβ (Hyder *et al.,* 2000). Dans des cellules dérivées du cancer du sein, le récepteur ERα est séquestré par BRCA1, empêchant de ce fait l'activation de la transcription du VEGF. En présence d'estrogènes, ce complexe va se dissocier, et ERα peut alors se fixer sur sa séquence ERE et activer la transcription du gène *vegf* (Kawai *et al.,* 2002). De plus, ERα peut interagir directement avec les sites Sp1 et Sp3 et augmenter la transcription du VEGF et ce, sans que le récepteur se fixe sur son élément de réponse ERE (Stoner *et al.,* 2004). L'expression du VEGF est régulée par les estrogènes, mais aussi par les androgènes. En effet, à partir d'une lignée cellulaire dérivée de cancer du sein, il a été montré que les estrogènes et les androgènes contrôlent le taux d'ARNm du VEGF (Ruohola *et al.,* 1999). De plus, lorsqu'une castration du rat mâle est pratiquée, une régression du réseau vasculaire de la prostate est observée, suggérant que la vascularisation est aussi sous le contrôle des androgènes (Haggstrom *et al.,* 1999).

Le promoteur du VEGF comprend également plusieurs PRE (Progesterone Responsive Element) permettant une régulation du VEGF par la progestérone *via* les récepteurs à la progestérone A et B (Wu *et al.,* 2004).

Les récepteurs nucléaires LXR (Liver X Receptor) interviennent aussi dans le contrôle de la transcription du VEGF. En effet, un élément de réponse au LXR, LXRRE, a été identifié dans le promoteur humain du VEGF (Walczak *et al.,* 2004).

Selon les données de la littérature, de nombreux facteurs de croissance tels que l'EGF, le FGF, le HGF et le TGF-β régulent l'expression du VEGF. D'ailleurs, la plupart de ces facteurs ont un taux d'expression très élevé dans de nombreux cancers. Par exemple, le FGF-4 peut contrôler l'angiogenèse soit en agissant directement sur les cellules endothéliales *via* ses récepteurs, augmentant la prolifération des cellules endothéliales, soit indirectement en régulant la transcription du VEGF (Deroanne *et al.,* 1997). Ces facteurs de croissance vont activer deux voies de signalisation intracellulaires, la voie Ras/Raf/MEK/Erk et la voie PI3K/

Akt, impliquées dans l'activation de facteurs de transcription requis pour l'augmentation de la transcription du VEGF *via* des éléments régulateurs sp1 ou sp3, AP-2 et Egr-1. Par exemple, le TGF-β augmente la transcription du VEGF en favorisant la liaison du complexe Sp1 sur son site localisé dans le promoteur du VEGF dans des lignées issues de carcinome hépatique (Benckert *et al.,* 2003 ; Sugano *et al.,* 2003).

Les cytokines interviennent aussi dans la régulation de la transcription du VEGF. En effet, l'interleukine-1β (IL-1β) et l'IL-6 sont des molécules angiogéniques car elles contrôlent le taux de VEGF dans des cellules de cancers gastriques ou des cellules de gliomes (Cohen *et al.,* 1996 ; Huang *et al.,* 2004 ; Kawaguchi *et al.,* 2004). Nous pouvons aussi citer le TNF-α qui, dans des cellules dérivées de gliomes, contrôle la transcription du VEGF *via* les sites Sp1 (Ryuto *et al.,* 1996).

Etant donné le rôle important que jouent les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur dans les processus menant à la cancérisation, ces derniers ont aussi un rôle crucial à jouer dans le processus angiogénique. En effet, l'activation d'oncogènes tels que *ras* est associée à une augmentation de l'expression du VEGF alors que le rôle des protéines suppresseurs de tumeurs est associé à une inhibition de l'expression du VEGF. Dans des cellules tumorales issues de sarcomes, lorsque la forme sauvage de la protéine suppressive de tumeur p53 n'est pas exprimée, des taux élevés de VEGF sont observés. Par contre, lorsque l'expression de p53 est restaurée, le taux de VEGF est fortement diminué. Cette régulation de la transcription se fait par l'intermédiaire des sites Sp1 et AP-2 (Zhang *et al.,* 2000). Dans des lignées cellulaires dérivées de cancers du col de l'utérus, l'oncoprotéine virale E6 augmente la transcription du VEGF par l'intermédiaire de sites proches des sites de régulation utilisés par p53 pour contrôler le VEGF. Cependant, l'effet de E6 sur la transcription du VEGF ne fait pas intervenir la protéine p53 (Lopez-Ocejo *et al.,* 2000).

4.4.2. Régulation de la stabilisation des messagers du VEGF

La régulation de la stabilité des ARNm permet une régulation rapide des ARNm et détermine la période pendant laquelle ces ARNm seront disponibles pour la traduction, permettant d'ajuster rapidement leur niveau d'expression en protéines.

Le contrôle de la stabilisation des messagers du *vegf* est un processus faisant intervenir d'une part, une séquence ARE, riche en adénines et uridines et située dans la région non

traduite 3'UTR et d'autre part, des protéines de stabilisation ou de déstabilisation. Cette région consensus riche en A-U a été initialement identifiée dans les régions 3'UTR des ARNm du TNF chez l'Homme (Caput *et al.*, 1986). Depuis, des séquences ARE ont été identifiés et localisées dans les régions 3'UTR d'un grand nombre d'ARNm à demi-vie courte tels que des ARNm codant des cytokines, des proto-oncogènes, des médiateurs de l'inflammation ou des facteurs de croissance (Eberhardt *et al.*, 2007). Ces séquences riches en A-U sont longues de 50 à 150 nucléotides (Chen et Shyu, 1995).

La région 3'UTR de l'ARNm codant le VEGF contient 2 séquences consensus de type UUAUUUA(A/U)(A/U) ainsi que 5 motifs pentamériques AUUUA (Levy *et al.*, 1996). Les séquences ARE sont des sites de liaison pour des protéines appelées ARE-Binding protein (ARE-BP). Ces protéines influencent la stabilisation ou la déstabilisation des messagers. Plusieurs protéines participant à la régulation de la stabilité des ARNm du VEGF ont été identifiées parmi lesquelles une famille de protéines stabilisatrices, ELAV (Embryonic Lethal Abnormal Vision) (Levy *et al.*, 1998) et une famille de protéines déstabilisatrices, TIS11 (Tetra-decanoyl phorbol acetate-induced sequence) dont la TTP (Tristetraproline) (Essafi-Benkhadir *et al.*, 2007) et la TIS11b (Ciais *et al.*, 2004). En effet, la stabilisation ou la dégradation des messagers du VEGF dépendent de la présence, de la quantité et de l'activité des différentes ARE-BP impliquées car il existe une compétition de liaison entre les protéines stabilisatrices et les protéines de dégradation des ARNm. De plus, la liaison des ARE-BP à ses sites est dépendante de la structure secondaire de la région 3'UTR des ARNm. En effet, sur l'ARNm du VEGF, 2 séquences ARE nécessaires au recrutement des ARE-BP ont été identifiées. Ces séquences sont adjacentes et sont localisées dans une région formant une structure très stable en épingle à cheveux (Claffey *et al.*, 1998).

- <u>Exemple de protéine de stabilisation des ARNm : HuR</u>

La protéine HuR appartient à la superfamille des protéines ELAV comprenant également HuB, HuC et HuD (Antic et Keene, 1997). C'est une protéine de 36 kDa exprimée de façon ubiquitaire. Elle possède 3 domaines de liaison à l'ARN : 2 motifs N-terminaux interviennent dans la liaison de la protéine à des séquences ARE et un motif C-terminal est impliqué dans la liaison à la queue poly(A). Les protéines HuR sont localisées dans le noyau des cellules ; cependant, c'est dans le cytoplasme que ces protéines stabilisent les ARNm auxquels elles sont liées. La translocation de la protéine HuR, du noyau vers le cytoplasme, serait le résultat

de l'activation de certaines protéines kinases telles que les MAPK, l'AMP-activated kinase ou la PKC (Doller *et al.,* 2007 ; Lafarga *et al.,* 2009).

En effet, un certain nombre d'études ont montré que la voie de signalisation p38 MAPK était impliquée dans l'activité stabilisatrice de HuR (Farooq *et al.,* 2009 ; Pages *et al.,* 2000), et ferait intervenir la MK-2, cible de p38 MAPK (Dean *et al.,* 2004 ; Subbaramaiah *et al.,* 2003 ; Tran *et al.,* 2003). Cette voie de signalisation faisant intervenir des protéines kinases, participerait à la phosphorylation de HuR nécessaire à sa translocation, du noyau vers le cytoplasme (Lafarga *et al*., 2009). L'activité stabilisatrice de HuR est contrôlée par la quantité, la localisation et la liaison de la protéine aux ARNm cibles et est influencée par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitinylation, méthylation et clivage de HuR) (Abdelmohsen *et al.,* 2009 ; Li *et al.,* 2002 ; Mazroui *et al.,* 2008).

La protéine HuR a un rôle important à jouer dans les processus cellulaires que sont la différenciation cellulaire, la réponse aux dommages cellulaires et la réponse inflammatoire. De plus, la protéine HuR serait impliquée dans la progression des cancers puisqu'elle régule l'expression de gènes impliqués dans les processus de carcinogenèse. En effet, HuR contrôle l'expression de protéines qui ont un effet dans la prolifération (cycline D1, E1, A2 et B1, p27, EGF et eIF4E), qui contrôlent la mort cellulaire (ProTα (prothymosin α), Bcl-2, Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1), SIRT1 (sirtuin), p21, Mdm-2 et c-Myc), ou qui favorisent le processus d'angiogenèse (HIF-1α, le VEGF, COX-2 et TSP1). Vraisemblablement, certaines études décrivent cette protéine comme un élément clef de l'invasion et de la formation de métastases (Abdelmohsen et Gorospe, 2010). D'ailleurs, il est bien admis aujourd'hui, qu'en condition hypoxique, la protéine HuR stabilise les ARNm du VEGF (Levy *et al*., 1998 ; Pages *et al*., 2000) en se liant à une séquence ARE située dans la région 3'UTR de 40 bp (1285-1335) de l'ARNm du VEGF (Goldberg-Cohen *et al.,* 2002).

D'après les données de la littérature, le taux de HuR est plus élevé dans les tissus cancéreux comparativement aux tissus normaux correspondants. Dans les tissus tumoraux, HuR a une localisation cytoplasmique alors que dans les tissus normaux, HuR est localisée préférentiellement dans le noyau (Lopez de Silanes *et al.,* 2003). HuR serait un facteur pronostique de l'évolution des cancers car comparativement au tissu sain, un taux élevé de la protéine HuR est retrouvé dans des cancers du sein (Heinonen *et al.,* 2005), du colon (Denkert *et al.,* 2006), des ovaires (Erkinheimo *et al.,* 2003), de la prostate (Niesporek *et al.,* 2008), du pancréas (Costantino *et al.,* 2009), des cancer buccaux (Cho *et al.,* 2007) et dans des tumeurs

du cerveau (Nabors *et al.,* 2001). D'ailleurs, la surexpression de la protéine HuR est souvent associée à une surexpression du VEGF dans les glioblastomes (Ido *et al.,* 2008), le cancer du rein (Basu *et al.,* 2010), le cancer du sein (Gubin *et al.,* 2010), et dans les cancers endométriaux (Kurosu *et al.,* 2011).

La capacité de HuR à stabiliser les ARNm dépend de sa capacité à empêcher sa dégradation. En effet, la protéine HuR peut bloquer la dégradation de certains ARNm car la fixation de HuR sur ses sites empêche les exonucléases de dégrader les ARNm (Ford *et al.,* 1999).

Comme nous venons de le décrire, HuR joue rôle crucial dans la stabilisation des ARNm. Cependant, il semblerait que HuR puisse intervenir à d'autres niveaux. En effet, HuR cytoplasmique pourrait également intervenir au niveau de la traduction des ARNm. Certaines études suggèrent que HuR influence la traduction de certains ARNm en favorisant leur exportation du noyau vers le cytoplasme où ils seront traduits (Fan et Steitz, 1998). De plus, en réponse à un stress cellulaire, la liaison de HuR sur la région 3'UTR de certains ARNm va permettre la relocalisation de ces ARNm des P-bodies (granules cytoplasmiques permettant le stockage des ARNm) vers les polysomes où ils pourront être traduits (Bhattacharyya *et al.,* 2006). Par contre, HuR pourrait inhiber la traduction de certains ARNm en bloquant l'initiation de la traduction indépendante de la coiffe, au niveau des IRES (Kullmann *et al.,* 2002).

Les rôles que pourrait jouer HuR nucléaire sont très peu décrits dans la littérature. Cependant, HuR interviendrait dans l'épissage de l'ARNm ; en effet, une étude a montré que la protéine nucléaire HuR peut réguler l'épissage alternatif de Fas (Izquierdo, 2008).

- <u>Exemple de protéine de déstabilisation des ARNm : TIS11b</u>

TIS11b (tetradecanoylphorbol acetate-inducible sequence 11b) ou ZFP36-L1, appartient à une famille de protéines à doigt de gant liant le de zinc (où l'atome de zinc lie 3 cystéines et une histidine) qui comprend aussi la TTP ou tristétraproline (Chinn *et al.,* 2002). Majoritairement localisées dans le cytoplasme, ces protéines ont une activité de déstabilisation des ARNm cibles en favorisant leur dégradation. Dans des cellules corticosurrénales bovines en culture primaire, TIS11b participe à la déstabilisation des ARNm du VEGF (Ciais *et al*., 2004). De plus, dans des cellules COS7, la cotransfection par des plasmides d'expression TIS11b (pCMV-TIS11b) ou HuR (pCMV-HuR) avec un plasmide

contenant la région 3'UTR du VEGF placée en amont du gène *luciférase*, ont montré que les protéines HuR et TIS11b ont des effets opposés sur la stabilité de l'ARNm du VEGF. En effet, ces protéines se lient à des séquences ARE localisées dans la région 3'UTR des ARNm du VEGF (Cherradi *et al.*, 2006), ces séquences sont localisées en des sites différents mais très proches (HuR :1285-1325 (Goldberg-Cohen *et al.*, 2002) et TIS11b : 1161-1235 (Ciais *et al.*, 2004)). TIS11b et HuR peuvent se lier aux ARNm du VEGF de façon simultanée ; cependant, lorsque le taux de la protéine TIS11b est supérieur à celui de HuR, la liaison de HuR à sa séquence cible est diminuée, ce qui conduit à la déstabilisation des ARNm du VEGF (Cherradi *et al.*, 2006).

Les protéines TTP sont des phosphoprotéines et l'activité de ces protéines semble contrôlée par phosphorylation. Les conséquences de la phosphorylation de TIS11b sont peu décrites dans la littérature. En revanche, la phosphorylation de TTP conduirait à une diminution de son activité qui aurait pour conséquence la stabilisation d'ARNm cibles comme COX-2 (Clement *et al.*, 2011 ; Marchese *et al.*, 2010).

Vraisemblablement, la protéine TTP aurait un rôle de suppresseur de tumeur (Stoecklin *et al.*, 2003). En effet, il a été montré que la surexpression de la protéine TTP conduirait à dégrader l'ARNm du VEGF, à inhiber la vascularisation des tumeurs et la prolifération de cellules tumorales (Essafi-Benkhadir *et al.*, 2007). D'ailleurs, il a été mis en évidence que le taux des ARNm TTP est bien inférieur dans les tissus tumoraux comparativement aux tissus sains. C'est le cas dans les cancers suivants : thyroïde, poumon, ovaires, utérus et sein. Dans des lignées cellulaires dérivées de cancer du poumon (A549) ou dérivées de cancer du col de l'utérus (HeLa), la TTP est très faiblement exprimée. En revanche, lorsque l'expression de la TTP est ré-induite dans les cellules HeLa, des modifications de la morphologie des cellules sont observées, les cellules vont moins proliférer, seront plus sensibles à l'apoptose et surtout, l'expression du VEGF va diminuer (Brennan *et al.*, 2009). Dans des cellules dérivées de carcinome du rein, l'inhibition de l'expression de TIS11b est associée à une augmentation du taux des ARNm du VEGF (Sinha *et al.*, 2009). D'ailleurs, dans un modèle de tumeur pré-établi chez les souris, la surexpression de la TTP conduit à inhiber la croissance tumorale, à ré-induire la densité micro-vasculaire et à diminuer l'expression du VEGF (Planel *et al.*, 2010).

4.4.3. Régulation de la traduction du VEGF

L'initiation de la traduction du VEGF peut se faire par un mécanisme alternatif indépendant de la coiffe, faisant intervenir des séquences particulières localisées dans la région 5'UTR des ARNm, les IRES. Une séquence IRES possède une structure secondaire en tige-boucle. Lors de l'initiation de la traduction *via* les IRES, la sous-unité ribosomique 40s n'intervient pas au niveau de la coiffe et n'effectue pas de balayage permettant de reconnaître le codon initiateur, mais se positionne directement sur le codon de l'extrémité 3' des IRES. La traduction est donc initiée de manière indépendante du facteur eIF4E (eucaryotic Initiation Factor 4E).

Les ARNm du VEGF possèdent une région 5'UTR de 1038 nucléotides qui comprend 2 séquences IRES. Ces 2 séquences sont localisées en amont de 2 codons alternatifs d'initiation de la traduction. L'IRES-A (+ 745/+ 1038) est localisée juste en amont du codon initiateur AUG (Akiri *et al.,* 1998). L'initiation de la traduction au niveau de ce codon permet la synthèse du VEGF-A. L'IRES-B (+ 91/ + 483) est localisée en amont de l'IRES-A et permet l'initiation de la traduction au niveau d'un codon initiateur alternatif CUG. Ce codon alternatif est en phase avec le codon initiateur AUG et permet la synthèse d'un précurseur du VEGF, le L-VEGF, contenant une extension N-terminale de 26 acides aminés. Cette isoforme du VEGF sera ensuite clivée en VEGF et N-VEGF (partie amino-terminale de 206 aa) (Huez *et al.,* 1998 ; Huez *et al.,* 2001). Les fonctions biologiques des L-VEGF et N-VEGF restent à être élucidées. Par contre, l'épissage alternatif du VEGF semble être conditionné par l'utilisation de l'un ou l'autre des codons initiateurs. En effet, le VEGF121 est le résultat de l'initiation de la traduction à partir du codon CUG alors que pour générer les VEGF165 et 189, l'initiation de la traduction peut se faire à partir de l'un ou l'autre des codons (Bornes *et al.,* 2004).

III. Adhérence cellulaire

1. Généralités

La dernière étape de la progression tumorale est l'acquisition du potentiel métastatique par les tumeurs. Les métastases sont la principale cause d'échec des traitements et de décès des patients atteints de cancer. La dissémination métastatique est précédée de processus

fondamentaux par lesquels les cellules tumorales vont acquérir la capacité de métastaser en se dédifférenciant, à partir de cellules épithéliales en cellules à phénotype mésenchymateux : c'est la transition épithélio-mésenchymateuse ou TEM. Ainsi, les évènements qui conduisent à la TEM comprennent, entre autres, des modifications de l'adhérence cellule-cellule.

Au sein de l'épithélium, la cohésion des cellules épithéliales entre elles est assurée grâce à la présence de jonctions intercellulaires. Il existe 3 types de jonctions intercellulaires : les jonctions serrées (zonula occludens), les jonctions adhérentes (zonula adherens) et les desmosomes. Ces jonctions présentent une organisation similaire, c'est-à-dire qu'elles sont constituées de molécules transmembranaires reliées au cytosquelette de la cellule.

Au cours de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à la régulation de l'expression de deux cadhérines, principales protéines impliquées dans les jonctions adhérentes.

2. Les cadhérines

2.1. Généralités

Les cellules épithéliales sont normalement polarisées, fermement liées les unes aux autres *via* les jonctions adhérentes, constituées principalement de la protéine transmembranaire cadhérine E liée au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des caténines. Les cellules épithéliales sont aussi liées à la membrane basale *via* d'autres molécules d'adhérence comme les intégrines.

Les modifications d'adhérence, associées à l'acquisition des propriétés migratoires et/ou invasives des cellules épithéliales, sont généralement associées à la perte d'expression de la cadhérine E. La cadhérine E est une glycoprotéine transmembranaire d'environ 120 kDa appartenant à la superfamille des cadhérines ; chaque membre nécessite la liaison du calcium et possède une distribution tissulaire particulière (Nollet *et al.*, 2000). La cadhérine E peut être active et exprimée dans tous les tissus épithéliaux. La cadhérine P est restreinte aux cellules de la couche basale des épithélia pluristratifiés et la cadhérine N est exprimée principalement dans le tissu nerveux mais également par les cellules mésenchymateuses, les fibroblastes, les cellules musculaires et les cellules endothéliales.

2.2. Structure

Au niveau structural, les cadhérines sont composées d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique dont l'extrémité C-terminale est très conservée.

- Une partie extracellulaire N-terminale

Cette partie est constituée de 5 sous-unités répétées, les domaines CAD (cadherin amino-terminal domain) d'environ 110 acides aminés, avec des motifs contenant des sites de fixation pour le calcium nécessaires à l'activité d'adhérence (Cavallaro et Christofori, 2004). La sous-unité CAD N-terminale contient un motif HAV (Histidine-Alanine-Valine). La structure et la fonction des cadhérines dépendent de la concentration en calcium. En absence de calcium, la structure est désorganisée et la fonction d'adhérence est impossible. L'association du calcium structure le domaine extracellulaire des cadhérines les rendant résistantes à la protéolyse ; les interactions homotypiques entre 2 molécules de cadhérines deviennent alors possibles (Pertz *et al.*, 1999). La formation des dimères entre cadhérines repose sur l'interaction entre les domaines CAD-HAV. Cependant, des interactions avec le deuxième domaine CAD sont également possibles (Huber *et al.*, 1999 ; Ozawa et Kemler 1998). L'adhérence intercellulaire est possible grâce aux interactions qui existent entre les cadhérines présentes sur les cellules permettant ainsi la liaison entre deux cellules épithéliales d'un même tissu.

- Un domaine transmembranaire

Ces cadhérines n'ont qu'un seul domaine transmembranaire qui est hydrophobe.

- Une partie C-terminale cytoplasmique

La fonction des cadhérines dépend de l'interaction de leur domaine cytoplasmique avec des partenaires cytosoliques, les caténines, qui établissent un contact avec les filaments d'actine. Les jonctions adhérentes sont formées par un complexe protéique selon le schéma suivant :

- une interaction entre la partie cytoplasmique de la cadhérine et la caténine β ou γ
- une interaction entre la caténine β ou γ et la caténine α
- une interaction entre la caténine α et les filaments d'actine.

- la caténine p120 se lie à la région juxtamembranaire de la cadhérine.

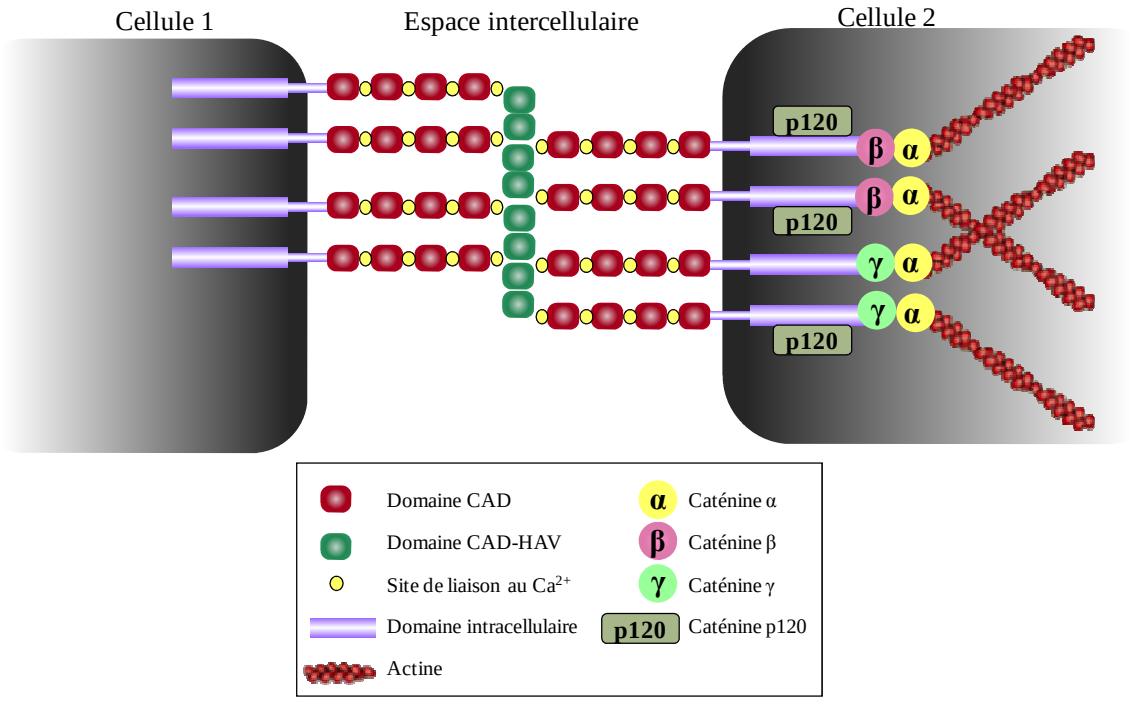

Figure 14 : Structure des cadhérines. D'après Cavallaro et Christofori, 2004.

2.3. Complexe d'adhérence cadhérine E / caténines

La fonctionnalité des cadhérines est assurée grâce aux interactions homotypiques entre les deux domaines extracellulaires en présence de calcium mais aussi grâce à l'ancrage du domaine cytoplasmique à l'actine *via* les caténines (Ozawa *et al.*, 1989). Les caténines sont des protéines de la famille Armadillon, et sont caractérisées par des répétitions de motifs armadillo qui favorisent les interactions protéines-protéines et la formation de larges complexes protéiques (McCrea *et al.*, 1991).

Le domaine cytoplasmique C-terminal de la cadhérine E se lie à la caténine β ou la caténine γ (ou plakoglobine) qui entre en compétition pour le même site de liaison. La liaison de la caténine β avec la partie carboxy-terminale de la cadhérine E est permise grâce aux répétitions de motifs armadillo. La caténine γ peut se lier à la cadhérine E, à la place de la caténine β sans diminuer l'adhérence cellulaire ; cependant, le rôle de la caténine γ dans l'adhérence n'est pas complètement élucidé (Butz et Kemler, 1994).

La caténine α se lie à la partie amino-terminale de la caténine β, et s'associe aux filaments d'actine du cytosquelette de manière directe ou *via* des intermédiaires tels que la vinculine (protéine homologue de la caténine α), l'α-actinine et ZO-1 (Imamura *et al.*, 1999).

L'adhérence cellulaire est influencée par la présence de la caténine p120. En effet, la caténine p120 se lie à la partie juxtamembranaire de la cadhérine E par l'intermédiaire de la répétition de ses motifs armadillo, ce qui a pour conséquence de stabiliser la cadhérine E à la membrane. La caténine p120 contrôle aussi la quantité de cadhérine E disponible (Davis *et al.*, 2003). Une protéine entre en compétition avec la caténine p120 pour sa liaison avec la cadhérine E, il s'agit de la présenilline-1 (PS1). Cette interaction favorise la liaison cadhérine E/caténine permettant de stabiliser le complexe d'adhérence (Baki *et al.*, 2001).

2.4. Fonctions de la cadhérine E

La cadhérine E est essentielle à la qualité de la jonction adhérente établie entre les cellules. Cependant, elle est aussi impliquée dans la transduction du signal puisqu'elle est en relation avec de nombreuses voies de signalisation intracellulaires faisant intervenir des molécules cytoplasmiques ou membranaires.

2.4.1. Régulation de la signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase

Un certain nombre d'études suggèrent que les cadhérines, lorsqu'elles sont impliquées dans les jonctions adhérentes interviennent dans l'activité de récepteurs à activité tyrosine kinase (Wheelock et Johnson, 2003). La cadhérine E peut induire l'activation des récepteurs à EGF, et ce de façon indépendante de la présence du ligand, et déclencher une cascade de signalisation impliquant les voies MAPK (Pece et Gutkind, 2000). Selon une autre étude, dans des cellules où un taux important de cadhérine E est impliqué dans les jonctions cellulaires, l'affinité des récepteurs EGFR pour leur ligand est diminuée. En revanche, lorsque les jonctions cellulaires sont désorganisées, le taux de cadhérine E est diminué et les récepteurs EGFR sont activés et stimulent la voie des MAPK, favorisant la mobilité cellulaire (Qian *et al.*, 2004).

2.4.2. Régulation de la voie de la caténine β

La caténine β est une molécule qui a un rôle structural et transcriptionnel. En effet, elle a un rôle de lien dans les jonctions adhérentes, et, sous sa forme libre, elle agit comme un facteur de transcription de gènes impliqués dans le processus de TEM et dans les processus de progression métastatique. Ainsi, la caténine β est une protéine dont le rôle varie en fonction de sa localisation cellulaire. La caténine β et la caténine p120 sont toutes les deux impliquées dans la voie Wnt. En séquestrant ces deux caténines à la membrane cellulaire, la cadhérine E est donc un régulateur négatif de la voie Wnt. La voie Wnt ou voie de la caténine β est une voie de signalisation importante dans le développement des vertébrés et des invertébrés. Elle est impliquée dans l'embryogenèse et la morphogenèse et joue un rôle majeur dans la programmation cellulaire des cellules souches vers la différenciation ou la prolifération.

La caténine β est un élément central de cette voie. Lorsqu'elle n'est pas impliquée dans l'adhérence intercellulaire *via* son interaction avec les cadhérines, et en l'absence de ligand Wnt, activateurs de la voie Wnt, la caténine β cytoplasmique est régulée par un complexe de destruction multiprotéique formé par l'axine et la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli). L'axine lie directement la caténine β et permet le recrutement des sérine/thréonine kinases GSK3β (Glycogène synthase kinase 3β) et CK1 (caséine kinase 1) favorisant la phosphorylation des résidus sérine du domaine N-terminal de la caténine β (Amit *et al.,* 2002 ; Yost *et al.,* 1996). Cette phosphorylation conduit à la poly-ubiquitinylation et à la destruction de la caténine β par le protéasome, contrôlant ainsi la quantité de caténine β cytoplasmique.

En présence des ligands Wnt, le système de dégradation de la caténine β est inhibé. En effet, les ligands Wnt sont des glycoprotéines sécrétées capables de lier les récepteurs transmembranaires Frizzled (Fz) et LRP-5/6 (Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6) (He *et al.,* 2004). L'activation de ces récepteurs permet le recrutement et la phosphorylation de la protéine cytoplasmique Dishevelled (DSH) qui peut alors s'associer à la protéine Fz, et le complexe ainsi formé peut recruter l'axine à la membrane plasmique, ce qui conduit à la déstabilisation du complexe de destruction de la caténine β. Celle-ci n'étant donc plus dégradée, elle s'accumule dans le cytoplasme et pourra ensuite gagner le noyau et activer la transcription de gènes cibles, stimulée par le complexe TCF/Lef-1 (T Cell Factor/Lymphoid Enhancing Factor 1) (Brembeck *et al.,* 2006). En absence de Wnt, le TCF agit comme une répresseur en se fixant sur les promoteurs des gènes cibles de cette voie. En formant un

complexe avec Groucho, des CtBP (C-terminal Binding Protein) et des HDAC, le TCF inhibe la transcription. Une fois dans le noyau, la caténine β interagit avec le TCF, dissocie le complexe de Groucho et permet le recrutement de co-activateurs possédant une activité histone acétylase.

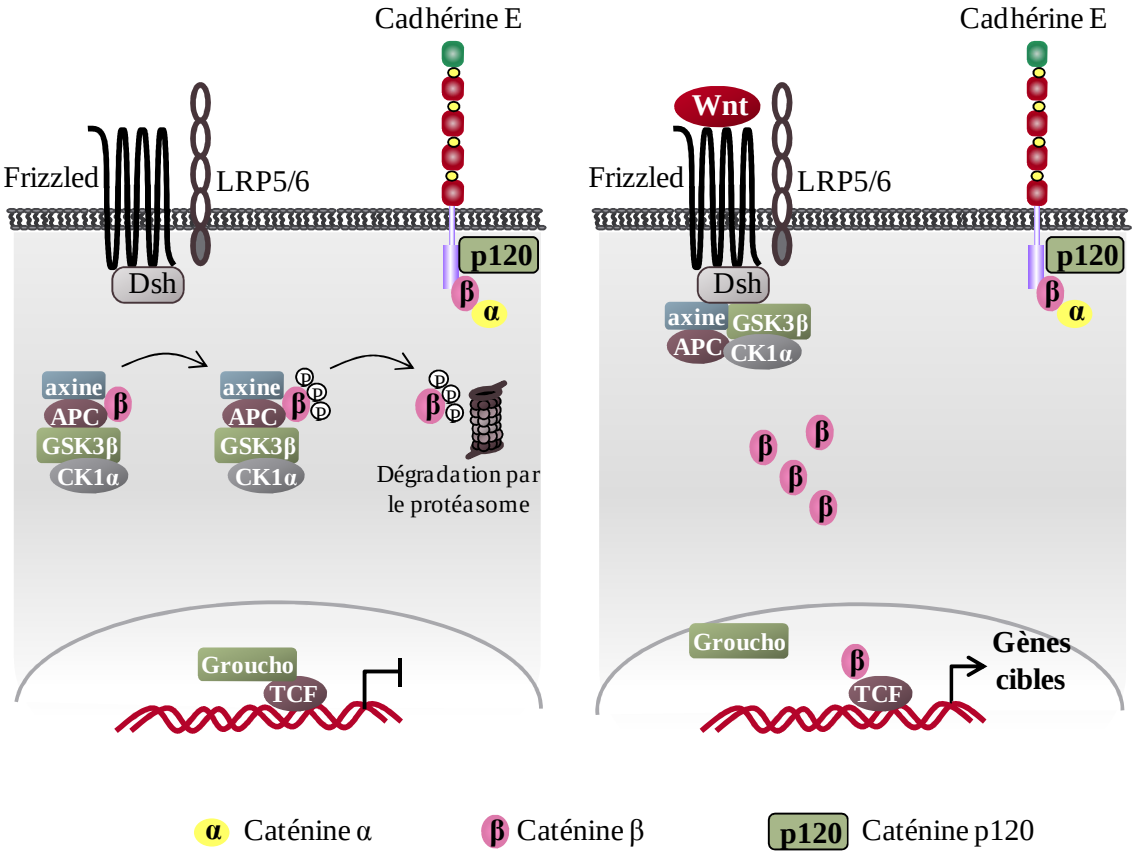

Figure 15 : Rôle de la caténine β dans la voie de signalisation Wnt. D'après Cavallaro et Christofori, 2004.

Lors de la déstabilisation du complexe d'adhérence cadhérine E/caténine, à la suite de la transmission du signal initié par Wnt, la caténine p120 libérée rejoint le noyau. Lorsque les cellules n'expriment plus la cadhérine E, des taux nucléaires importants de caténine p120 ont été observés. Dans le noyau, la caténine p120 peut interagir avec la protéine Kaiso qui est un facteur de transcription ZF (zinc finger). Kaiso agit comme un répresseur en se fixant sur les promoteurs des gènes contenant des séquences méthylées CpG, ou des séquences spécifiques KBS (Kaiso Binding site). Vraisemblablement, Kaiso recrute des corépresseurs (NCoR ou Groucho) et peut aussi lier le facteur de transcription TCF/Lef-1, inhibant de ce fait son contrôle sur la transcription de nombreux gènes (Daniel et Reynolds, 1999 ; van Roy et McCrea, 2005). La caténine p120 nucléaire va capturer Kaiso, lever la répression et conduire

à l'augmentation de la transcription de nombreux gènes impliqués dans la TEM (van Roy et McCrea, 2005 ; Zhang *et al.*, 2011).

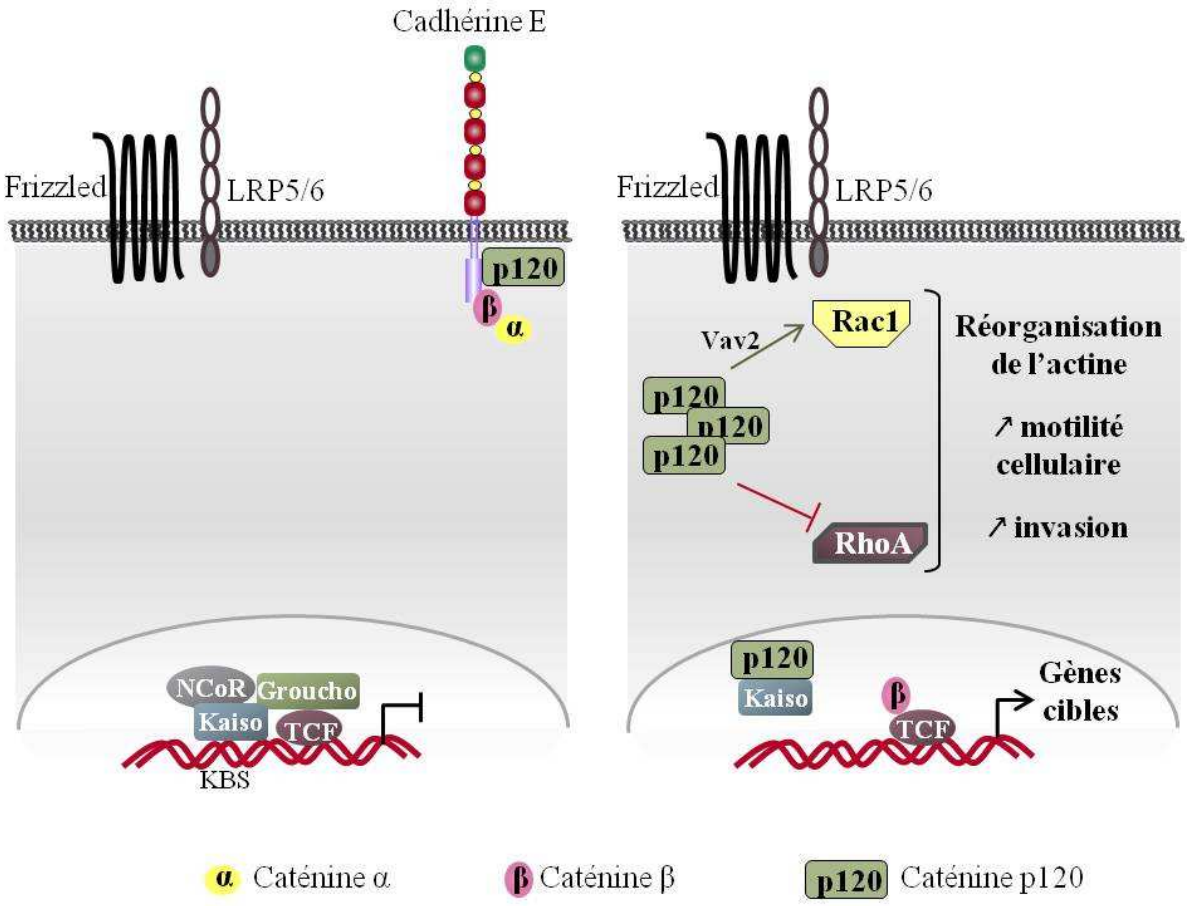

Figure 16 : Rôle de la caténine p120 cytosolique et nucléaire en absence de cadhérine E. D'après Anastasiadis et Reynolds, 2001 ; van Roy et McCrea, 2005.

La perte d'expression de la cadhérine E favorise donc l'accumulation de la caténine β et de la caténine p120 dans le cytoplasme puis dans le noyau, ce qui va conduire à la transcription de gènes cibles du complexe TCF/Lef-1, qui sont impliqués dans les processus de TEM et d'invasion, et qui sont entre autres, des gènes codant des métalloprotéases matricielles (MMP), des composants de la MEC (fibronectine, laminine…), des protéines telles que la vimentine, la claudine, et d'autres gènes impliqués dans la prolifération et la migration (c-myc, slug, cycline…).

La cadhérine E est également en relation avec de nombreuses voies de signalisation impliquant des protéines cytosoliques (APC, Rho, GTPase…) et des protéines

transmembranaires telles que des récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase.

2.4.3. Régulation de la signalisation des Rho GTPases

La caténine p120 a également un rôle cytoplasmique puisqu'elle intervient dans l'organisation du cytosquelette d'actine *via* la régulation des protéines Rho GTPases. C'est pourquoi, lors de la perte d'expression de la cadhérine E, la caténine p120 s'accumule dans le cytoplasme où elle va séquestrer RhoA sous la forme non active (Anastasiadis *et al.,* 2000). De plus, la caténine p120 peut interagir avec Vav2 (Rho GEF), permettant l'activation de Rac1 (Noren *et al.,* 2000). L'inhibition de RhoA et/ou l'activation de Rac1 conduit à une réorganisation des filaments d'actine qui va faciliter la migration cellulaire conditionnant l'invasion tumorale (Anastasiadis et Reynolds 2001 ; Simpson *et al.,* 2004).

Ainsi, la cadhérine E, en séquestrant la caténine p120 tend à inhiber les capacités migratoires des cellules (Asnaghi *et al.,* 2010). Cependant, selon la cadhérine mise en jeu, la capacité de migration des cellules est limitée. En effet, le complexe cadhérine E/caténine p120 est beaucoup plus rigide, plus stable que ne l'est le complexe cadhérine N/caténine p120. De plus, dans les cellules mésenchymateuses qui expriment non pas la cadhérine E mais la cadhérine N, l'accumulation cytoplasmique de la caténine p120 est associée à une augmentation de la motilité cellulaire (Anastasiadis et Reynolds 2001 ; Soto *et al.,* 2008).

2.5. Fonctions de la cadhérine N

La cadhérine N est exprimée principalement par le tissu nerveux mais aussi par les fibroblastes, les cellules musculaires et les cellules endothéliales.

Elle est impliquée au cours de l'embryogenèse, dans la formation du mésoderme (Radice *et al.,* 1997), dans le développement du système nerveux (Tanaka *et al.,* 2000), dans l'ostéogenèse (Marie, 2002), dans la différenciation des muscles squelettiques (George-Weinstein *et al.,* 1997) et dans le développement cardiaque (Linask *et al.,* 1997). Chez l'adulte, la fonction physiologique de la cadhérine N dans l'adhérence cellulaire est importante pour le maintien de l'architecture de certains tissus (Shapiro *et al.,* 1995). Elle joue aussi un rôle dans la mise en place de synapses neuronales fonctionnelles et dans la formation de la paroi vasculaire, essentielle pour la stabilisation des vaisseaux.

Dans un contexte physiologique, la cadhérine N est nécessaire pour la survie des myocytes cardiaques (Radice *et al.*, 1997) et par conséquent, pour le développement du cœur ; c'est un facteur critique pour la survie des entérocytes (Hermiston et Gordon, 1995), des ostéoblastes (Marie, 2002) et des cellules ovariennes (Peluso, 1997). La cadhérine N favorise aussi la survie de cellules cancéreuses, en particulier des cellules de mélanomes et de carcinomes de la prostate *via* l'activation de la voie PKB/Akt. L'activation d'Akt phosphoryle et inactive la protéine pro-apoptotique Bad et augmente ainsi l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Li *et al.*, 2001 ; Tran *et al.*, 2002). La cadhérine N augmente la migration et l'invasion des cellules normales mais aussi cancéreuses en modulant l'activité des Rho GTPases. Cependant, les résultats obtenus dans la littérature concernant l'activation ou l'inhibition de RhoA et Rac1, suggèrent une signalisation *via* les Rho GTPases dépendante du type et de l'environnement cellulaires (Charrasse *et al.*, 2002 ; Lambert *et al.*, 2002). La cadhérine N augmente aussi l'invasion cellulaire en interagissant avec le FGFR dans un contexte physiologique ou dans des cellules cancéreuses (cas du cancer du sein par exemple) (Hazan *et al.*, 2000).

Le clivage protéolytique de la cadhérine N par la métalloprotéase ADAM-10 conduit à 2 fragments biologiquement actifs : un fragment correspondant à la portion extracellulaire ou NTF (N-Terminal Fragment) de 95 kDa et un fragment lié à la membrane CTF1 (C-Terminal Fragment 1) de 40 kDa (Reiss *et al.*, 2005). Ce dernier est, à son tour, clivé par le complexe préseniline/γ sécrétase, au niveau de l'interface membrane-cytosol, en un fragment cytoplasmique CTF2 de 35 kDa laissant un petit fragment transmembranaire à la surface cellulaire. Le clivage de la cadhérine N a plusieurs conséquences au niveau cellulaire : NTF1 régule l'adhérence cellulaire, la migration et stimule la croissance des neurites (Paradies et Grunwald, 1993 ; Utton *et al.*, 2001). Ce fragment soluble peut interagir avec le FGFR, activer sa voie de signalisation intracellulaire de manière indépendante de FGF et peut ainsi stimuler la migration des cellules endothéliales (Derycke *et al.*, 2006).

CTF2 peut réguler la transcription selon différents mécanismes. CTF2 lie la CBP, provoquant sa dégradation par le protéasome. La diminution du taux de CBP dans le noyau réprime ainsi la transcription induite par CBP (Marambaud *et al.*, 2003). Par ailleurs, la translocation de CTF2 dans le noyau réprime la transcription de la cadhérine N (Uemura *et al.*, 2006) et favorise la transcription dépendante de la caténine β (Reiss *et al.*, 2005 ; Uemura *et al.*, 2006).

L'activité pro-angiogénique de NTF1 indique que la cadhérine N pourrait être impliquée dans l'angiogenèse par bourgeonnement (Gerhardt *et al.*, 1999). Compte-tenu de son expression dans les cellules tumorales, de son rôle dans la survie cellulaire, la migration, l'invasion, de sa fonction dans la maturation des vaisseaux sanguins et probablement de son implication dans l'angiogenèse, la cadhérine N est une cible thérapeutique potentielle pour traiter le cancer. En effet, l'inhibition de la fonction de la cadhérine N pourrait bloquer ou atténuer l'invasion tumorale et l'angiogenèse tumorale.

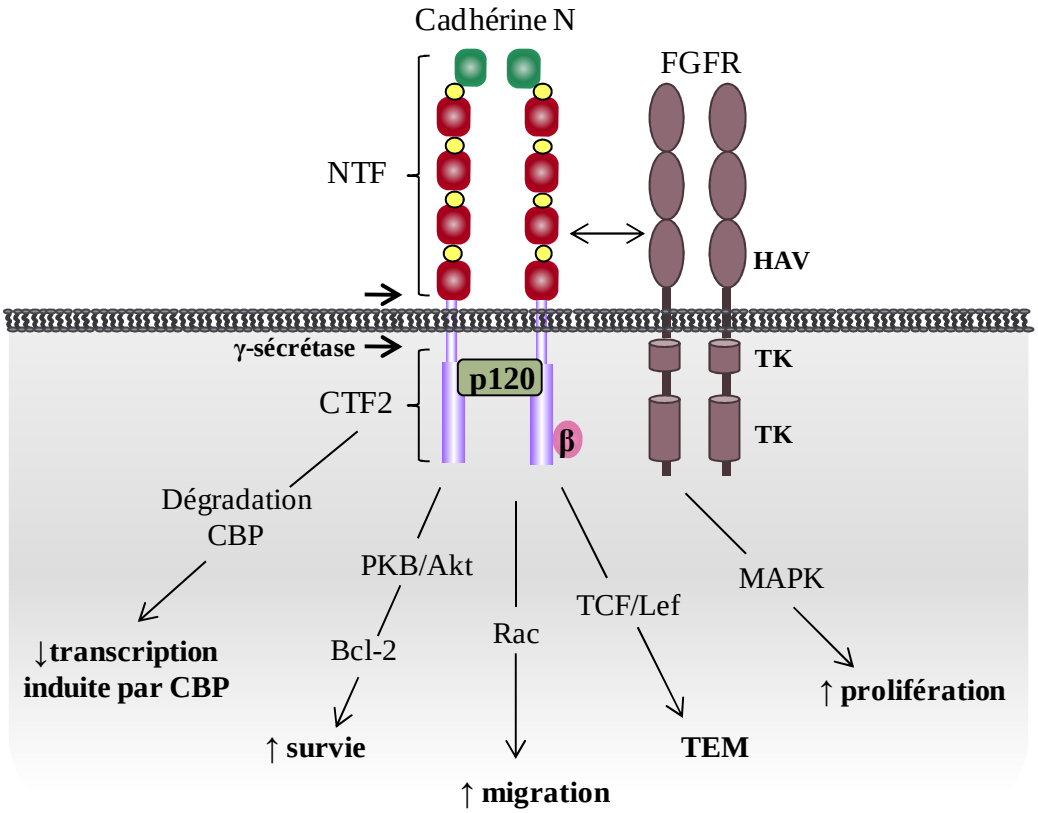

Figure 17 : Fonctions de la cadhérine N dans le cancer. D'après Mariotti *et al.*, 2007.

En 2000, un pentapeptide cyclique (ADH-1) mimant la séquence HAVD naturelle de la cadhérine N a été développé et il bloque spécifiquement la fonction de la cadhérine N (Williams *et al.*, 2000). Le traitement à base d'ADH-1 s'adresse à des tumeurs exprimant fortement la cadhérine N. Des tests pré-cliniques ont été réalisés chez l'animal. Une diminution de la croissance tumorale a été observée en particulier dans des modèles de carcinomes du sein, de l'ovaire, du côlon et des poumons en accord avec une activité antivasculaire de ADH-1. En revanche, ADH-1 n'avait pas d'effet sur les vaisseaux matures

(Mariotti *et al*., 2007). Une étude a rapporté qu'ADH-1 permettait de sensibiliser des cellules de mélanomes aux effets anti-tumoraux du melphalan (agent alkylant) dans un modèle de xénogreffe chez le rat (Mariotti *et al*., 2007). ADH-1 ne semble pas présenter de signe majeur de toxicité chez l'animal et chez l'Homme. Il est en cours d'essais cliniques de phase II pour un certain nombre de cancers : œsophage, poumon non à petites cellules, rein, foie.

3. La transition épithélio-mésenchymateuse

Au cours de la progression tumorale, suite à une perte de cohésion cellulaire, les cellules tumorales vont acquérir des capacités de migration : elles vont se détacher les unes des autres, migrer, traverser la membrane basale puis se déplacer dans la MEC pour rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique (Takeichi, 1993).

L'acquisition des propriétés migratoires et invasives des cellules épithéliales ou TEM, est conditionnée par la rupture des contacts qui lient les cellules les unes aux autres. C'est la perte d'expression de la cadhérine E qui est l'élément initiateur de la TEM. En effet, la cadhérine E est considérée comme un suppresseur de tumeur. D'ailleurs, la ré-expression de la cadhérine E inhibe les propriétés d'invasion de plusieurs types de cellules dérivées de cancer (Chen et Obrink, 1991 ; Christofori et Semb, 1999 ; Frixen *et al.,* 1991 ; Mbalaviele *et al.,* 1996 ; Navarro *et al.,* 1991).

Ainsi, la répression de l'expression de la cadhérine E, mais aussi la perte de fonction de cette protéine, sa dégradation, ou sa relocalisation vont conditionner la mise en place de la TEM qui est caractérisée par l'acquisition de marqueurs cellulaires spécifiques du phénotype mésenchymateux, tels que la cadhérine N, la vimentine, la ténascine C (Cavallaro et Christofori, 2004). La perte d'expression de la cadhérine E va aussi conditionner l'activation de la voie de signalisation de la caténine β, que nous avons décrite précédemment. L'activation de cette voie va permettre la transcription de gènes impliqués dans la TEM, tels que les gènes codant des MMP, des composants de la MEC, des protéines du cytosquelette comme la vimentine ainsi que le facteur angiogénique VEGF ou encore des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire comme la cycline D1 (Crawford *et al.,* 1999 ; Easwaran *et al.,* 2003 ; Gilles *et al.,* 2003 ; Gradl *et al.,* 1999 ; Shtutman *et al.,* 1999). La transcription de ces gènes est aussi favorisée par l'activation de la voie de la caténine p120 nucléaire (van Roy et McCrea, 2005 ; Zhang *et al*., 2011). D'autre part, la perte d'expression de la cadhérine E sera associée à l'activation de voies de signalisation impliquant soit, Wnt,

soit des protéines kinases cytosoliques ou des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase impliqués dans la perte de polarité des cellules épithéliales (Jeanes *et al.,* 2008).

La conversion phénotypique caractéristique de la TEM est aussi le résultat de l'action de la caténine p120 libre qui conduit à l'inactivation de Rho A et/ou à l'activation de Rac 1, protéines responsables de l'augmentation de la motilité cellulaire, donc de l'acquisition du potentiel invasif des cellules tumorales (Anastasiadis et Reynolds, 2001 ; Yilmaz et Christofori, 2009).

L'acquisition du phénotype mésenchymateux, lors de la TEM, est associée à la perte d'expression de la cadhérine E et à l'expression *de novo* de cadhérines exprimées normalement par les fibroblastes ou les tissus conjonctifs normaux, telles que la cadhérine N : c'est le « switch » des cadhérines.

En effet, la cadhérine N est associée à un caractère agressif de la tumeur, puisqu'elle est impliquée dans les processus de migration et d'invasion. Etant exprimée par les cellules fibroblastiques constituant le stroma proche de la tumeur, cette cadhérine N va permettre aux cellules tumorales d'interagir avec les cellules du stroma, et de faciliter leur migration dans la MEC (Hazan *et al.,* 2000 ; Li *et al.,* 2001 ; Tran *et al.,* 1999).

4. Régulation de la TEM

La réussite de la transition épithélio-mésenchymateuse est vraisemblablement conditionnée par une perte d'expression ou de fonction de la cadhérine E.

Le taux de synthèse de cette protéine est sous la dépendance de la régulation du promoteur du gène *cdh1* (gène codant la cadhérine E) *via* des mécanismes complexes. Le gène *cdh1* est localisé dans la région chromosomique 16q22.1 et peut être inactivé par mutation ou perte d'hétérozygotie. D'ailleurs, l'inactivation du gène par mutation semble être caractéristique de certains types de cancer, puisque les cancers gastriques diffus héréditaires et les cancers du sein lobulaires sont associés à la mutation du gène *cdh1* qui va exprimer une cadhérine E anormale (Berx *et al.,* 1998 ; Machado *et al.,* 2001). La perte de fonction du gène *cdh1* suite à la perte d'hétérozygotie dans la région 16q22.1 semble être fréquente et caractéristique de tumeurs à haut potentiel métastatique.

L'inhibition de l'expression de la cadhérine E peut être le fait de l'hyperméthylation des îlots CpG présents dans le promoteur de la cadhérine E (Auerkari, 2006). L'hyperméthylation

du promoteur du gène de la cadhérine E est associée à la progression tumorale et la dissémination métastatique (Nass *et al.,* 2000). Dans des lignées cellulaires de cancer du col de l'utérus, le promoteur du gène de la cadhérine E est méthylé à 60% (Chen *et al.,* 2003).

D'autre part, différents facteurs de transcription peuvent réguler l'expression de la protéine par une répression transcriptionnelle. En effet, Snail et Twist, qui sont des facteurs de trancription, sont capables de bloquer la transcription de la cadhérine E (Batlle *et al.,* 2000 ; Cano *et al.,* 2000). D'autres facteurs qui induisent une répression de la transcription de la cadhérine E ont été identifiés : il s'agit de Slug, SIP1 (Smad-Interacting Protein 1), δEF1 (δ-cristallin Enhancer Factor 1) (Comijn *et al.,* 2001 ; Hajra *et al.,* 2002 ; Remacle *et al.,* 1999).

D'autres mécanismes contrôlent la TEM puisque la fonction de la protéine peut être inhibée par des modifications post-traductionnelles. En effet, la cadhérine E peut être clivée par des MMP. D'ailleurs, une forme clivée de 80 kDa a été identifiée avec des taux élevés dans le sérum et les urines de patients atteints de cancer (Banks *et al.,* 1995 ; Griffiths *et al.,* 1996). D'autres formes clivées ont été identifiées, une forme de 97 kDa et de 100 kDa, qui sont des formes incapables de lier la caténine β (Rios-Doria *et al.,* 2003 ; Vallorosi *et al.,* 2000). Il semble donc que les domaines issus du clivage de la cadhérine E participeraient au processus d'invasion tumorale.

Les interactions de la caténine β avec ses différents partenaires sont aussi régulées par des processus de phosphorylation et de déphosphorylation. La phosphorylation de la caténine β provoque une dissociation des complexes cadhérine E/caténine β/caténine α, ce qui entraîne une diminution de la cohésion cellulaire et la mise en place des processus d'invasion tumorale (Behrens *et al.,* 1993 ; Matsuyoshi *et al.,* 1992). De plus, des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase, activés par leur ligand respectif, sont capables de s'associer au complexe cadhérine E/caténine β/caténine α et de phosphoryler la caténine β, ce qui aura pour conséquence de diminuer son affinité pour la cadhérine E et par la même de déstabiliser la cohésion cellulaire (Hoschuetzky *et al.,* 1994).

5. Valeur pronostique des cadhérines dans les cancers

La dissémination métastatique est souvent synonyme de mauvais pronostic ; c'est pourquoi, il est si important d'identifier des marqueurs de progression tumorale. Un des premiers événements qui conduit au développement des métastases est la modification de

l'adhérence intercellulaire. De nombreuses études réalisées à partir d'échantillons tumoraux ont démontré que la perte d'expression de la cadhérine E est corrélée à l'augmentation de l'agressivité tumorale (Bailey *et al.,* 1998 ; Bringuier *et al.,* 1993 ; Carico *et al.,* 2001 ; Conacci-Sorrell *et al.,* 2002). Dans des cancers transitionnels de vessie, plusieurs études ont montré une corrélation entre la diminution d'expression de la cadhérine E, un grade élevé et un stade avancé (Ross *et al.,* 1995 ; Syrigos *et al.,* 1995). La diminution d'expression de la cadhérine E a aussi été corrélée à une faible survie des patients et à un taux élevé de récidive de la maladie (Bringuier *et al.,* 1993 ; Lipponen et Eskelinen, 1995). Ainsi, une perte d'expression de la cadhérine E et de la caténine β est un marqueur de mauvais pronostic pour les patients atteints de carcinomes de vessie (Garcia del Muro *et al.,* 2000). Cette inhibition de l'expression de la cadhérine E est souvent associée à une augmentation du taux de facteurs de transcription tels que Snail et slug, à une expression nucléaire de la caténine β et aussi à une expression *de novo* de la cadhérine N consécutive au « switch » des cadhérines. L'expression de ces cadhérines a été étudiée dans des lignées cellulaires dérivées de cancer de vessie. L'expression de la cadhérine E est diminuée dans des lignées peu différenciées et invasives et la cadhérine N est présente dans les lignées très agressives (Mialhe *et al.,* 2000). La cadhérine N semble donc liée au phénotype invasif des tumeurs. D'ailleurs, la transfection stable de la cadhérine N dans des cellules de carcinome de vessie qui exprimaient la cadhérine E, a conduit à une augmentation de la capacité invasive des cellules *in vitro* (Rieger-Christ *et al.,* 2004). Une autre étude réalisée à partir d'échantillons provenant de patients atteints de tumeurs urothéliales infiltrantes a révélé une diminution de l'expression de la cadhérine E et des caténines et une expression *de novo* de la cadhérine N en fonction du grade de la tumeur (Rieger-Christ *et al.,* 2001). Ce « switch » des cadhérines a été décrit dans de nombreux cancers tels que les cancers cutanés, de la prostate, du sein (Cavallaro *et al.,* 2002, Cavallaro et Christofori, 2004), du pancréas (Wheelock *et al.,* 2008), de l'estomac, du rein (Tani *et al.,* 1995) et de la vessie (Bryan et Tselepis, 2010). D'ailleurs, des travaux précédents réalisés dans notre laboratoire ont montré, suite à une analyse par immunohistochimie à partir de 101 échantillons de tumeurs de vessie, une diminution du marquage de la cadhérine E et une expression *de novo* de la cadhérine N en fonction du stade de la tumeur (Clairotte *et al.,* 2006; Lascombe *et al.,* 2006). Ces études ont permis d'identifier la cadhérine N mais aussi la caténine γ comme des marqueurs pronostiques de progression tumorale des tumeurs de vessie n'infiltrant pas le plan musculaire.

Cadre

&

But du travail

Les tumeurs épithéliales (ou carcinomes) sont les plus fréquentes et leur dissémination métastatique constitue la cause majeure de mortalité liée à ces cancers. Le développement d'un carcinome métastatique est un processus long et complexe. En effet, la progression tumorale comprend une cascade d'événements permettant, entre autres, la croissance de la tumeur primaire *via* l'angiogenèse tumorale et l'invasion des tissus normaux environnants suite à l'acquisition par les cellules épithéliales tumorales de capacités migratoires et invasives impliquant des changements phénotypiques regroupés sous le terme de transition épithélio – mésenchymateuse (TEM).

Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la progression tumorale devrait permettre de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement du cancer et conduire à l'amélioration de la prise en charge des patients. L'identification de marqueurs moléculaires pronostiques de la progression tumorale des cancers épithéliaux est un enjeu capital dans le domaine de la cancérologie.

Dans le Groupe de Recherche en Urologie de l'EA3181, nous avons travaillé à partir de deux modèles de carcinomes :

- Le cancer de la vessie, un modèle de carcinogenèse non viro – induite.
- Le cancer de col de l'utérus, un modèle de carcinogenèse viro – induite.

Les tumeurs urothéliales de la vessie représentent 95% des tumeurs vésicales et se répartissent en deux grands groupes : les tumeurs n'infiltrant pas le muscle vésical ou TVNIM (70%) et les tumeurs infiltrant le plan musculaire ou TVIM (30%). Les TVIM requièrent un traitement chirurgical radical par cystectomie et les TVNIM sont, pour la plupart, traitées par résection endoscopique associée ou non à des instillations endovésicales de Bacille Calmette-Guérin. L'évolution des TVNIM est capricieuse, dominée par les risques de récidive et de progression vers l'invasion musculaire : ces risques sont corrélés à la fois au stade et au grade. Les TVNIM de stade et grade élevés constituent un ensemble très hétérogène à haut risque : si certaines d'entre elles peuvent être contrôlées par un traitement conservateur, plus de 50% évoluent vers l'invasion du plan musculaire et nécessitent une cystectomie totale (Soloway *et al.*, 2002) et 30% des patients décèdent de leur tumeur (Herr, 1997). Donc le problème posé par ces tumeurs est d'identifier celles qui deviendront infiltrantes et envahissantes.

Des résultats antérieurs obtenus au laboratoire ont permis d'identifier des marqueurs pronostiques de progression tumorale des TVNIM de stade et grade élevés :

- Un facteur angiogénique, le VEGF

- Le VEGF sérique (Bernardini *et al.*, 2001) : en effet, un taux sérique de VEGF d'une valeur supérieure à 450 ng/ml a permis d'identifier des cancers vésicaux métastatiques.

- Le VEGF tissulaire (Fauconnet *et al.*, 2009) : ainsi, trois isoformes du VEGF ($VEGF_{121}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{189}$) sont surexprimées dans les tumeurs infiltrantes comparativement aux tumeurs n'infiltrant pas le plan musculaire.

- Une protéine impliquée dans l'adhérence cellulaire *via* les cadhérines

- La cadhérine N : en effet, l'expression atypique de la cadhérine N dans les TVNIM de stade et grade élevés (Clairotte *et al.*, 2006, Lascombe *et al.*, 2006) est associée à une diminution de l'expression de la cadhérine E (Clairotte *et al.*, 2006) reflétant ainsi un « cadherin switch » caractéristique d'une TEM. Les tumeurs urothéliales de mauvais pronostic expriment donc la cadhérine N.

Après l'identification de marqueurs de progression tumorale des TVNIM de stade et grade élevés, il nous ait apparu intéressant de rechercher des molécules capables d'inhiber leur expression pour bloquer le développement tumoral.

Notre intérêt s'est porté, dans un premier temps, sur la régulation de l'expression du VEGF par les récepteurs nucléaires PPAR et notamment par l'isotype β. PPARβ est un facteur de transcription inductible par des agonistes naturels (acides gras, prostacycline, …) et aussi synthétiques dont certains sont en cours d'évaluation clinique. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la différenciation, la prolifération cellulaire et la régulation du métabolisme lipidique. Quelques études ont montré que PPARβ pouvait être une cible thérapeutique intéressante pour le traitement du syndrome métabolique. Il est aussi impliqué dans la carcinogenèse et notamment dans l'angiogenèse où il aurait un rôle pro- ou anti-angiogénique. Dans une étude précédente réalisée au laboratoire (Fauconnet *et al.*, 2002), notre équipe a montré, dans des lignées cellulaires dérivées de cancer de la vessie, une surexpression du VEGF par un agoniste de PPARβ, le L-165041. De plus, cette étude a démontré que :

- L'effet du ligand de PPARβ sur l'expression du VEGF est dépendant de PPARβ.

- La régulation de l'expression du VEGF se fait au niveau transcriptionnel.

- La synthèse *de novo* d'une protéine intermédiaire est nécessaire à cette régulation.

- L'activation de la voie ERK1/2 est impliquée.

Compte – tenu des résultats obtenus dans le modèle du cancer de la vessie, nous nous sommes interrogés sur l'effet de l'activation de PPARβ dans un modèle de carcinogenèse viro-induit tel que le cancer du col de l'utérus dans lequel l'agent étiologique est l'infection par certains types de papillomavirus humains ou HPV du genre α, et notamment les HPV16 et 18 à haut risque carcinogène. Il est maintenant établi qu'en plus de leur rôle dans l'immortalisation et la transformation des cellules hôtes, les oncoprotéines virales E6 et E7 sont capables d'induire une néovascularisation en modulant l'expression de facteurs pro- et anti-angiogéniques tels que le VEGF. De plus, E6 et E7 d'HPV18 peuvent interagir avec certains récepteurs nucléaires (ER, AR, TR) par des interactions protéines/protéines et ainsi réguler leur activité. Pourquoi ces protéines n'interagiraient-elles pas avec PPARβ ?

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons eu pour objectifs :

- d'étudier l'effet de l'activation de PPARβ sur l'expression du VEGF (ARNm et protéine) dans des cellules dérivées de cancer du col de l'utérus.
- de déterminer l'implication potentielle de l'oncoprotéine virale E6 et du statut de la protéine suppressive de tumeur p53 sur l'action de PPARβ.
- d'élucider les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la régulation du VEGF (mécanisme dépendant ou indépendant de PPARβ, régulation au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel, voies de signalisation intracellulaires impliquées).

La modulation de l'angiogenèse *via* la régulation de l'expression du VEGF devrait avoir un impact sur l'invasion tumorale. PPARβ régule l'expression du VEGF. Par ailleurs, une étude rapporte que le VEGF diminue l'adhérence homotypique de cellules de carcinomes hépatocellulaires en association avec une diminution de l'expression de la cadhérine E (Mao *et al.*, 2001).

C'est pourquoi, dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- Dans les deux modèles de cancers épithéliaux étudiés, PPARβ a-t-il un rôle dans l'altération de l'adhérence cellulaire en contrôlant l'expression des cadhérines E et N ?

- Si oui, quels sont les mécanismes moléculaires mis en jeu (mécanisme dépendant ou indépendant de PPARβ, voies de signalisation impliquées) ?
- PPARβ augmente l'expression du VEGF et le VEGF peut réguler l'initiation de la

TEM. Existe-t-il un « cross – talk » entre le VEGF, PPARβ et l'expression des cadhérines E et N ?

Matériel

&

méthodes

I. Culture cellulaire

1. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires ont été achetées auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC).

La lignée cellulaire **C-33A** (n° ATCC : HTB-31) est issue d'un carcinome épidermoïde du col de l'utérus. Elle n'abrite pas d'HPV mais exprime une p53 mutée.

La lignée cellulaire **CaSki** (n° ATCC : CRL-1550) est dérivée d'un carcinome épidermoïde du col de l'utérus, métastase d'un cancer primitif du mésentère. Elle est infectée par un HPV16 et exprime une p53 sauvage.

La lignée cellulaire **HeLa** (n° ATCC : CCL-2) est dérivée d'un adénocarcinome du col de l'utérus. Elle est infectée par un HPV18 et exprime une p53 sauvage.

La lignée cellulaire **RT4** (n° ATCC : HTB-2) est dérivée d'un carcinome urothélial papillaire récidivant de grade 1 dans lequel p53 et H-ras sont sauvages.

La lignée cellulaire **T24** (n° ATCC : HTB-4) est dérivée d'un carcinome urothélial indifférencié de grade 3 pour lequel p53 et H-ras sont mutés.

2. Maintien des lignées cellulaires en culture

Les cellules HeLa et CaSki sont cultivées dans du milieu DMEM, la lignée C-33A dans du milieu EMEM et les cellules T24 et RT4 dans du milieu McCoy's 5A. Chaque milieu de culture est additionné de 15 mM d'Hépès et supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVFd) (Invitrogen), 2 mM de glutamine, 1% (v/v) d'un mélange d'antibiotiques/antimycotiques (10 000 U/ml de pénicilline, 10 mg/ml de streptomycine et 25 µg/ml d'amphotéricine B) (Sigma). Les cellules sont placées en atmosphère humide et contrôlée (5% CO_2, 95% O_2) dans une étuve à 37°C et des tests mycoplasmes sont réalisés tous les mois.

Les cellules C-33A, CaSki, HeLa ($3{,}2.10^3$ cellules/cm^2), RT4 ($4{,}2.10^4$ cellules/cm^2) et T24 ($5{,}2.10^3$ cellules/cm^2) sont ensemencées en plaques de culture 6, 12 ou 24 puits dans les milieux précédemment décrits supplémentés de 5% (v/v) de SVFd pour les différentes expériences.

3. Traitements des cellules

Les cellules sont stimulées par différents traitements dans un milieu dépourvu de sérum.

Tableau I : Traitements et concentrations utilisés pour stimuler les cellules

Traitement		Concentration	Durée	Fournisseur
WY14,643	Ligand de PPARα	50 µM	24 h	Chemsyn Science Laboratories
L-165041	Ligand de PPARβ	25 µM	24 h	Calbiochem
BRL49653	Ligand de PPARγ	10 µM	24 h	Cayman Chemical
Pifithrine-α (PFT-α)	Inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de p53	20 µM	24 h	Tebu-Bio
LG10068	Ligand du RXR	1-10 µM	24 h	Park Davis
Acide 9 cis-rétinoïque	Ligand du RXR	1-10 µM	24 h	Sigma
GW501516	Ligand de PPARβ	25 µM	24 h	Cayman Chemical
GSK0660	Inhibiteur spécifique de PPARβ	10 µM	24 h	Santa Cruz
Actinomycine D	Inhibiteur de transcription	5 µg/ml	0 h à 6 h	Sigma
Staurosporine	Inhibiteur des PKC	10^{-8} M	24 h	Sigma
Rapamycine	Inhibiteur de la voie Akt/mTOR	10 µM	24 h	Sigma
Wortmannin	Inhibiteur de la voie PI 3 kinase	10 µM	24 h	Sigma
PD98059	Inhibiteur de voie ERK MAPK	20 µM	24 h	Calbiochem
SB203580	Inhibiteur de la voie p38 MAPK	10 µM	24 h	Calbiochem
Cycloheximide (CHX)	Inhibiteur de synthèse protéique	10 µg/ml	2 h	Sigma

II. Etude par cytométrie de flux

La distribution des cellules dans les phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2/M) et e pourcentage des cellules en sub-G1 sont analysés par cytométrie de flux. La quantité d'ADN d'une cellule est déterminée par un marquage à l'iodure de propidium, agent intercalant de l'ADN et fluorescent (λ excitation : 488 nm, λ émission : 610 nm). Cette fluorescence est détectée à l'aide d'un cytomètre de flux (FC500). Après traitement, les cellules sont récoltées grâce à de la trypsine/EDTA (Lonza) puis centrifugées (300 g, 10 min, 4°C). Les culots cellulaires sont fixés dans de l'éthanol à 70% (v/v) glacé ajouté goutte à goutte. Après une nuit de fixation à 4°C, ils sont centrifugés (300 g, 10 min, 4°C) puis lavés 2 fois au PBS 1X. Les cellules sont ensuite marquées avec 1 mg/ml d'iodure de propidium dans 50 µl de PBS 1X additionné de 1 mg/ml de RNAse A DNAse-free (Sigma) pendant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité. L'analyse du cycle cellulaire et du pic Sub-G1 est réalisée par le logiciel Multicycle Analysis (Beckman Coulter).

III. Etude de l'expression des ARNm

1. Extraction des ARN totaux

Les cellules contenues dans chaque puits sont lavées avec du PBS 1X (Na_2HPO_4 8 mM ; KH_2PO_4 1,5 mM ; KCl 2,7 mM ; NaCl 0,137 mM ; pH 7,2) puis lysées avec 1 ml de réactif TRI-REAGENT® (Euromedex) par puits pendant 10 minutes. Le lysat cellulaire est transféré dans des tubes de 1,5 ml et 200 µl de chloroforme sont ajoutés. Les tubes sont agités vigoureusement, incubés 15 minutes à température ambiante puis centrifugés (12 000 g, 15 min, 4°C). Les ARN contenus dans la phase aqueuse supérieure sont prélevés, transférés dans de nouveaux tubes et précipités par un volume équivalent d'isopropanol. Les tubes sont incubés 10 minutes à température ambiante puis centrifugés (12 000 g, 10 min, 4°C). Les culots d'ARN sont ensuite lavés à l'éthanol 75% (v/v), centrifugés (12 000 g, 5 min, 4°C), séchés puis resolubilisés dans de l'eau stérile. Les ARN sont quantifiés par spectrophotométrie d'absorption à 260 nm. La contamination protéique est évaluée par lecture de l'absorbance à 280 nm et la pureté jugée satisfaisante si le rapport des absorbances à 260 et 280 nm est supérieur ou égal à 1,8.

2. Traitement des ARN à la DNase I et transcription inverse

Afin d'éviter une éventuelle contamination des ARN par de l'ADN génomique, un traitement à la DNase I (Desoxyribonucléase I, Amplification Grade) (Invitrogen) est réalisé selon le protocole décrit par le fournisseur. Trois µg d'ARN sont incubés 15 minutes à température ambiante dans du tampon 1X (200 mM Tris-HCl pH 8,4 ; 20 mM $MgCl_2$ et 500 mM KCl) (Invitrogen) en présence de 1 U d'enzyme. La DNase I est ensuite inactivée par incubation à 65°C pendant 10 minutes en présence de 2,5 mM d'EDTA.

La transcription inverse permet la synthèse d'ADNc simple brin grâce à une transcriptase inverse qui réalise la transcription de tous les ARNm par élongation d'oligomères poly-dT préalablement hybridés sur la queue polyadénylée des ARNm. Les ARN sont ainsi incubés à 65°C pendant 5 minutes avec 500 ng d'oligo$(dT)_{12\text{-}18}$ (Invitrogen) et 0,5 mM de dNTPs (Invitrogen) afin de permettre l'hybridation des oligo(dT). Les échantillons sont traités par 10 mM de DTT et 40 U de RNAse-OUT dans du First-Strand Buffer 1X (250 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 375 mM KCl ; 15 mM $MgCl_2$) (Invitrogen) et incubés 2 minutes à 37°C. Enfin, 200 U de

MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Invitrogen) sont ajoutés. Après une incubation à 37°C pendant 50 minutes, la réaction est stoppée par chauffage à 70°C pendant 15 minutes.

3. PCR (Polymerase Chain Reaction) PPARα, β et γ et GAPDH

Les ADNc sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces oligonucléotidiques spécifiques. La réaction a lieu dans un mélange réactionnel de 20 µl contenant 2 µl d'ADNc, du tampon de PCR 1X (200 mM Tris-HCl pH 8,4 ; 500 mM KCl), du $MgCl_2$ (1,5 mM pour les PCR PPAR et 4 mM pour la PCR GAPDH), 200 µM de dNTPs, 100 pmol d'amorces sens et antisens (Tableau II) et 5 U de Taq DNA polymérase. Les conditions de PCR sont indiquées dans le Tableau III.

Tableau II: Séquences des amorces sens et antisens utilisées lors des PCR

ARNm	Amorce sens (5'→3')	Amorce antisens (5'→3')	Taille de l'amplifiat
PPARα	actctgcccccctctcgccactc	gccaaagcttccagaactatcctc	125 pb
PPARβ	gagcagccacaggaggaagcc	gctgtggtcccccattgagct	100 pb
PPARγ	agagatgccattctggcccac	gtggagtagaaatgctggaga	130 pb
GAPDH	catctctgcccccctctgctga	ggatgaccttgcccacagcct	304 pb

Tableau III : Conditions de PCR

PCR	Dénaturation		Amplification : 30 cycles						Arrêt	
			Dénaturation		Hybridation		Elongation			
PPARα, β et γ	94°C	5 min	94°C	30 sec	65°C	30 sec	72°C	20 sec	72°C	10 min
GAPDH	94°C	5 min	94°C	30 sec	60°C	30 sec	72°C	1 min	72°C	10 min

Les produits d'amplification et un marqueur de taille (100 pb DNA ladder, Invitrogen) sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 2 % (p/v) dans du TBE 1X (Tris 0,1 M ; acide borique 0,09 M ; EDTA 1 mM), visualisés par coloration au bromure d'éthidium et analysés après lecture sur plaque UV (Gel Doc, Biorad).

4. PCR en temps réel

4.1. qPCR ciblant les transcrits des isoformes 121, 165 et 189 du VEGF

Les PCR en temps réel sont réalisées dans un volume final de 20 µl contenant 5 µl d'ADNc dilué au 1/20ème, du tampon « Fast Start DNA Master Hybridation probe » 1X

(Roche Diagnostics) contenant la *Taq* polymérase, 7,5 mM de $MgCl_2$, 100 nM de sonde Taqman et 0,25 µM d'amorces sens et antisens. La sonde utilisée est commune aux 3 isoformes ainsi que l'amorce sens. L'amplification spécifique des transcrits des différentes isoformes est possible grâce à des amorces antisens ciblant la jonction de 2 exons spécifiques d'une isoforme (Figure 18).

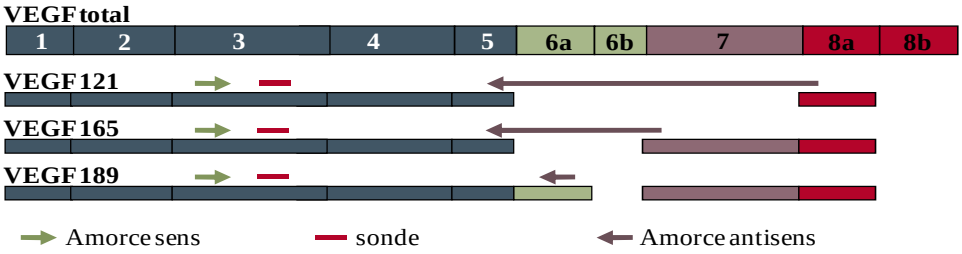

Figure 18 : Position des amorces et de la sonde Taqman pour la quantification spécifique des transcrits des isoformes du VEGF (VEGF 121, 165 et 189).

Tableau IV : Séquences des amorces et de la sonde utilisées lors des qPCR

PCR	Amorce sens (5'→3')	Amorce antisens (5'→3')	Sonde (5'→3')
VEGF121	exon 3 ccctgatgagatcgagtacatctt	Jonction exon 5/8 gcctcggcttgtcacatttt	exon 3 6-FAM-atcctgtgtgcccctgatgcgatgcggt-BHQ-1
VEGF165		Jonction exon 5/7 agcaaggcccacagggattt	
VEGF189		Exon 6 aacgctccaggacttataccg	

Les PCR sont réalisées à l'aide du LightCycler 1.0 (Roche Diagnostics). Les conditions de PCR sont les suivantes : une étape permettant l'activation de la Taq polymérase (95°C, 10 min), suivie de 50 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation (95°C, 10 sec) et une étape d'hybridation/élongation (70°C, 30 sec). Le gène *atp5β* est utilisé comme gène de référence.

4.2. qPCR ciblant les transcrits e6 d'HPV18, de la cadhérine E et de la cadhérine N

Ces PCR en temps réel sont réalisées dans un volume final de 25 µl contenant 5 µl d'ADNc dilué au 1/20ème, du Taqman Gene Expression Master Mix 1X (Applied Biosystems), la sonde Taqman et les amorces spécifiques.

Tableau V : Concentrations et séquences des amorces et des sondes utilisées lors des qPCR

	Concentrations		
	Amorce sens	Amorce anti-sens	sonde
E6 HPV18	0,5 µM	0,5 µM	50 nM
Cadhérine E	0,5 µM	0,5 µM	0,1 µM
Cadhérine N	1 µM	1 µM	0,1 µM
VEGF165b	0,5 µM	0,5 µM	0,1 µM
A-FABP	0,9 µM	0,9 µM	0,2 µM
ATP5β	0,5 µM	0,5 µM	0,3 µM
	Séquences (5'→3')		
	Amorce sens	Amorce anti-sens	Sonde
E6 HPV18	ggcgcgctttgaggat	ttcagttccgtgcacagatc	JOE-caacacggcgaccctgcaagctacc-BHQ-1
Cadhérine E	aaatctgaaagcggctgatactg	cggaaccgcttccttcatag	6-FAM-ccccacagccccgccttatga-BHQ-1
Cadhérine N	tgggaatccgacgaatgg	gcagatcggaccggatactg	6-FAM-tgaaagacccatccacgctgagcc-BHQ-1
VEGF165b	aacacagactcgcgtgcaa	tcctggtgagagatctgcaagtac	
A-FABP	ctggtggtggaatgcgtcatga	caacgtcccttggcttatgctctct	6-FAM-aggcgtcacttccacgagagttt-BHQ-1
ATP5β	tactgtcgcgtgccattgct	cacgggcaacatcgtaatgc	6-FAM-atcccaacattgttggcagt-BHQ-1

Nous avons utilisé la PCR en temps réel pour faire de la quantification relative selon les formules suivantes :

Normalisation par rapport au gène de référence (*atp5β*) :

ΔCt = Ct gène cible – Ct contrôle endogène

Normalisation par rapport au standard (cellules non traitées) :

ΔΔCt = ΔCt échantillon – ΔCt standard

Facteur d'induction (FI) : $\mathbf{FI = 2^{-\Delta\Delta Ct}}$

Ces PCR sont réalisées à l'aide du thermocycleur Applied 7500 (Applied Biosystems). Les conditions de PCR sont les suivantes : une première étape (50°C, 2 min), une étape de dénaturation (95°C, 10 min), suivie de 40 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation (95°C, 15 sec) et une étape d'hybridation/élongation (60°C, 60 sec). Le gène *atp5β* est utilisé comme gène de référence.

IV. Etude de l'expression des protéines

1. Extraction et quantification des protéines totales

Après traitement par les différents agents, les cellules sont décollées dans du tampon RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,4 ; NaCl 150 mM ; NP-40 1% (v/v) ; désoxycholate de sodium 0,5% (p/v) ; EDTA 1 mM) contenant 30 µl/ml d'une solution d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche Diagnostics). Les lysats obtenus sont solubilisés par sonication et centrifugés (10 000 g, 10 min, 4°C). Les protéines contenues dans le surnageant sont quantifiées à l'aide du kit Protein Assay (Bio-Rad) par mesure de l'absorbance à 595 nm.

2. Extraction des protéines cytosoliques et nucléaires

Après traitement par les différents agents, les cellules sont lavées puis décollées dans du PBS 1X froid. Après centrifugation (1 000 g, 10 min, 4°C), les culots sont repris dans du Tampon A pH 7,4 (10 mM Hépès ; 1 mM EDTA ; 0,5 mM DTT ; 0,25 mM PMSF ; 50 mM NaF ; 2 mM Na métavanadate ; cocktail anti-protéases) puis homogénéisés à l'aide d'un Dounce. Après centrifugation (1 000 g, 10 min, 4°C), les surnageants correspondant aux extraits cytosoliques sont récupérés et les culots correspondant aux extraits nucléaires sont lavés 2 fois dans du tampon A contenant 250 mM de sucrose. Les culots sont ensuite repris dans du tampon A contenant du NaCl 0,5 mM puis incubés 1 h sur la glace. Après centrifugation (8 000 g, 30 min, 4°C), les surnageants correspondant aux extraits nucléaires sont récupérés.

3. Western-blotting

3.1. Migration et électrotransfert

Les extraits protéiques sont dénaturés dans du tampon de Laemmli (Bio-Rad) supplémenté de 5% (v/v) de β-mercaptoéthanol (Bio-Rad) puis séparés par un gel d'électrophorèse dénaturant (SDS-PAGE) à l'aide du système Mini Protean Gel II® (Bio-Rad). Le gel est constitué d'un gel de concentration (25% (v/v) de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ; acrylamide/bis-acrylamide 37,5/1 à 4% (v/v); SDS 0,1% (v/v); persulfate d'ammonium 0,1% (p/v) ; TEMED

0,08% (v/v)) et d'un gel de séparation (25% (v/v) de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 ; acrylamide/bis-acrylamide 37,5/1 à 7,5-15% (v/v) ; SDS 0,1% (v/v) ; persulfate d'ammonium 0,1% (p/v) ; TEMED 0,08% (v/v)). Après le dépôt des extraits protéiques dans les puits, parallèlement à un marqueur de poids moléculaire (Bio-Rad), la migration s'effectue dans un tampon de migration (Tris-HCl 25 mM ; Glycine 192 mM ; SDS 0,1% (v/v)) sous une tension de 120 V jusqu'à l'entrée des échantillons dans le gel de séparation puis de 180 V jusqu'à la sortie du front de migration. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (Hybond®, Amersham) en présence de tampon de transfert (Tris 48 mM ; glycine 39 mM ; méthanol 10% (v/v)) sous une tension de 100 V pendant 1 h à l'aide du système Mini Trans Blot® (Bio-Rad).

3.2. Hybridation et révélation

Les sites aspécifiques de la membrane de PVDF sont saturés 1 h à température ambiante dans un tampon TBS-T (Tris-HCl 200 mM pH 7,4 ; NaCl 1,36 mM ; Tween 0,1% (v/v)) supplémenté de 5% (p/v) de lait. La membrane est ensuite mise en contact avec l'anticorps primaire approprié (Tableau) pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages dans du TBS-T, la membrane est mise en contact pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire spécifique conjugué à la peroxydase de Raifort (Tableau VI). Après 6 lavages de 5 min, la présence des protéines d'intérêt est révélée en appliquant sur la membrane le réactif ECL (Enhanced ChemiLuminescence®, Amersham) selon les recommandations du fournisseur et la membrane est mise au contact d'un film photosensible (Hyperfilm ECL®, Amersham).

Tableau VI : Anticorps utilisés en western-blotting

Anticorps	Clone	Animal d'origine	Dilution	Fournisseur
primaires				
PPARβ	H-74 (polyclonal)	lapin	1/500	Tebu-bio
p53	DO-1 (monoclonal)	souris	1/500	BD Pharmingen
p21	6B6 (monoclonal)	souris	1/1 000	BD Pharmingen
p38	9212 (polyclonal)	lapin	1/1 000	Cell Signaling
p38-P (Thr 180/Tyr 182)	sc-17852-R (polyclonal)	lapin	1/200	Tebu-bio
caspase 3	AAP-113 (polyclonal)	lapin	1/1900	Stressgen
PARP	AC-15 (monoclonal)	souris	1/1 000	BD Pharmingen
HuR	H-280 (polyclonal)	lapin	1/200	Tebu-bio
TIS11b	Pab0195 (polyclonal)	lapin	1/500	covalab
Cadhérine E	HECD-1 (monoclonal)	souris	1/1 000	Invitrogen
Cadhérine N	3B9 (monoclonal)	souris	1/2 000	Invitrogen
A-FABP	AF1443 (polyclonal)	chèvre	1/1 000	R&D Systems
VEGFR-1 (flt-1)	C-17 (sc-316) (polyclonal)	lapin	1/200	Tebu-bio

VEGFR-2 (flk-1)	A-3 (sc-6251) (monoclonal)	souris	1/200	Tebu-bio
β-actine	AC-15 (monoclonal)	souris	1/8000	Sigma
secondaires				
Anti-IgG de lapin HRP conjugué	Ref. 554021	chèvre	1/5 000	BD Pharmingen
Anti-IgG de souris HRP conjugué	Ref. 554002	chèvre	1/10 000 1/40 000	BD Pharmingen
Anti-IgG de chèvre HRP conjugué	Ref. AP106P	Lapin	1/10 000	Chemicon

4. Dosage du VEGF total par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Après stimulation ou non des cellules, les milieux conditionnés sont prélevés, centrifugés (7 500 g, 10 min, 4°C) et les surnageants sont récupérés. La protéine VEGF est dosée par une technique ELISA (kit Quantikine, R & D Systems) selon les recommandations du fournisseur. Les quantités de VEGF obtenues sont exprimées en pg/ml.

V. Etude de l'activité luciférase

1. Transfection transitoire

Les cellules sont ensemencées dans le milieu approprié en présence de 5% (v/v) de SVFd dans des plaques 24 puits à raison de 100 000 cellules par puits, pour atteindre 70% de confluence 24 h après, au moment de la transfection. Chaque réaction de transfection contient 0,5 µg de plasmide pRL-CMV (contrôle interne qui permet de normaliser l'expérience) et 1,5 µg de vecteur rapporteur Cyp2XPal-Luc (contenant 2 copies de la séquence PPRE en amont du gène codant la luciférase) ou VEGF-1-Luc (contenant la région -2279 à +56 du promoteur du VEGF en amont du gène codant la luciférase).

L'ADN est dilué dans un tube en polystyrène dans 50 µl d'une solution de NaCl 150 mM et mélangé à l'aide d'un vortex. Dans un autre tube en polystyrène, 2 µl de réactif de transfection jetPEI™ (PolyPLUS Transfection) sont dilués dans 50 µl d'une solution de NaCl 150 mM et mélangés à l'aide d'un vortex. Puis les 2 solutions sont mélangées et incubées 25 minutes à température ambiante. Les 100 µl du mélange jetPEI/ADN sont ajoutés dans

chaque puits contenant le milieu de culture approprié en présence de 5% (v/v) de SVFd et les cellules sont incubées 16 h (37°C, 95% O_2, 5% CO_2). Le milieu est ensuite éliminé et les cellules sont stimulées 24 h par le ligand de PPARβ.

2. Préparation des lysats cellulaires

Après 24 h de stimulation et afin de doser les activités luciférase, les cellules sont lavées dans du PBS 1X puis lysées dans 100 µl/cupule de tampon de lyse PLB 1X (Passive Lysis Buffer). Les lysats sont alors incubés 15 minutes à température ambiante puis centrifugés (10 000 rpm, 30 sec, 4°C). Les surnageants sont récupérés pour l'analyse de l'activité luciférase.

3. Détermination de l'activité luciférase

L'activité luciférase de chacun des lysats est déterminée à l'aide de la trousse « Dual-Luciferase Reporter Assay System » (Promega) à partir de 20 µl de lysat et 100 µl de réactif LAR II, selon les recommandations du fournisseur. La mesure de l'activité luciférase se fait à l'aide d'un luminomètre, pendant 10 sec toutes les 3 sec. Un signal luminescent est produit en oxydant la luciférine en oxyluciférine grâce à la luciférase en présence d'ATP et de Mg^{2+}. L'activité luciférase est exprimée en unités relatives de luminescence (URL).

VI. Interférence à l'ARN

Les siRNA utilisés pour cette étude sont des siRNA duplex contenant 2 nucléotides désoxythymidine non appariés aux extrémités 3'. Le siRNA ciblant e6 HPV18 (NC8001357) utilisé a été décrit dans une étude de Koivusalo *et al.* (brin sens : 5'-cuaacacuggguuauacaadTdT-3' ; brin antisens : 5'-uuguauaacccaguguuagdTdT-3'). Les siRNA PPARβ (sc-36305), p38 (sc-29433) et HuR (sc-35619) proviennent de chez Santa Cruz Biotechnology.

Les cellules sont ensemencées dans du milieu DMEM en présence de 5% (v/v) de SVFd en plaque 24 puits à raison de 100 000 cellules par puits. Après 24 h, les cellules sont

transfectées par différentes concentrations de siRNA duplex à l'aide du réactif de transfection GeneEraser (Stratagene). Les complexes siRNA/GeneEraser se forment dans un milieu DMEM sans antibiotique et sans sérum selon le protocole du fournisseur. Le siRNA e6 HPV18 (5 nM) est transfecté pendant 24 h, les siRNA PPARβ (25, 50, 70 ou 100 nM), p38 (100 nM) et HuR (20 ou 100 nM) pendant 48 h. Après cette période, le milieu de culture contenant les siRNA est éliminé et les cellules sont stimulées ou non par le L-165041 pendant 24 h.

Résultats

I. Effet du ligand de PPARβ sur l'expression du VEGF-A

Dans une étude précédente, notre équipe a montré que l'activation du PPARβ augmente l'expression du VEGF (ARNm et protéine) dans deux lignées cellulaires dérivées de cancer de la vessie, la lignée RT4 (représentative d'une tumeur non agressive) et la lignée T24 (représentative d'une tumeur à haut potentiel métastatique). Pour mettre en évidence la régulation de l'expression des ARNm du VEGF, les techniques de northern-blotting et de southern-blotting à partir d'ADNc ont été utilisées ; c'est pourquoi, récemment, une technique de quantification des transcrits par PCR en temps réel a été mise au point. En effet, en utilisant 3 couples d'amorces spécifiques des ARNm des VEGF121, 165 et 189 et une sonde Taqman commune, nous avons montré que l'activation du PPARβ augmente l'expression de ces 3 isoformes du VEGF dans les cellules RT4 mais aussi dans les cellules T24, confirmant de ce fait, les résultats précédemment publiés (Fauconnet *et al.*, 2002).

A l'heure d'aujourd'hui, les agonistes de PPARβ semblent être des molécules prometteuses pour le traitement de maladies associées à un syndrome métabolique et sont en cours d'évaluation clinique pour le traitement des dyslipidémies, du diabète de type II ou des maladies cardio-vasculaires. Pourtant, ce sont des molécules angiogéniques capables d'augmenter l'expression du VEGF dans des cellules dérivées de cancer de la vessie et ce quel que soit le phénotype des cellules.

Le cancer de vessie est un modèle de carcinogenèse non viro-induite. Nous nous sommes alors posé la question suivante : qu'en est-il de l'effet des ligands de PPARβ sur l'expression du VEGF dans un modèle de carcinogenèse viro-induite tel que le cancer du col de l'utérus ?

Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication soumise à « *Oncogene* » présentée p119 et peuvent être résumés comme suit :

Suite à l'analyse par RT-qPCR de l'expression des différentes isoformes du VEGF-A, nous montrons que le L-165041, ligand de PPARβ, augmente le taux des transcrits 121, 165 et 189 du VEGF dans les cellules HeLa, dérivées de cancer du col de l'utérus, infectées par HPV18 et exprimant une protéine p53 non mutée (publication, figure 1).

Dans ces cellules, le maximum d'expression des différents transcrits est observé avec un traitement de 24 h en présence de 25 µM de L-165041. De plus, l'augmentation des ARNm du VEGF est corrélée à une augmentation protéique de VEGF. Par contre, dans d'autres cellules dérivées de cancer du col de l'utérus telles que les cellules C-33A n'abritant pas d'HPV, le ligand n'a aucun effet sur l'expression du VEGF.

Les cellules HeLa étant infectées par HPV18, nous nous sommes donc interrogés sur le rôle potentiel que pourrait jouer l'oncoprotéine virale E6 sur l'action du ligand sur l'expression du VEGF. Dans ces cellules, en surexprimant la protéine E6 d'HPV18, suite à la transfection d'un plasmide pCG-E6, ou en réprimant l'expression de l'ARNm E6 en utilisant une technique d'interférence à l'ARN (siRNA), l'effet du ligand sur l'expression du VEGF n'est pas modifié. De plus, lorsqu'on induit l'expression de la protéine E6 dans les C-33A (HPV-), suite à la transfection du plasmide pCG-E6, le ligand L-165041 ne modifie pas l'expression du VEGF (publication, figure 2). Selon nos résultats, l'oncoprotéine virale E6 n'intervient pas dans l'effet du L-165041 sur la surexpression du VEGF. De plus, nous avons montré que le L-165041 ne modifie pas le taux d'expression des ARNm E6 d'HPV18 dans nos cellules.

Une des différences caractéristiques entre ces 2 types cellulaires est pourtant la présence ou non de l'oncoprotéine virale E6. C'est pourquoi, nous nous sommes interrogés sur l'effet du ligand sur l'expression du VEGF dans un autre modèle cellulaire de cancer du col de l'utérus, la lignée CaSki abritant HPV16. Les résultats obtenus ne sont pas présentés dans la publication mais décrits ci-après.

Les cellules CaSki ont été stimulées dans les mêmes conditions, c'est-à-dire 25 µM de L-165041 pendant 24 h. Nous montrons que le ligand ne modifie pas le taux des transcrits des isoformes 121, 165 et 189, ni le taux de protéine VEGF dans les milieux conditionnés (Figure 19).

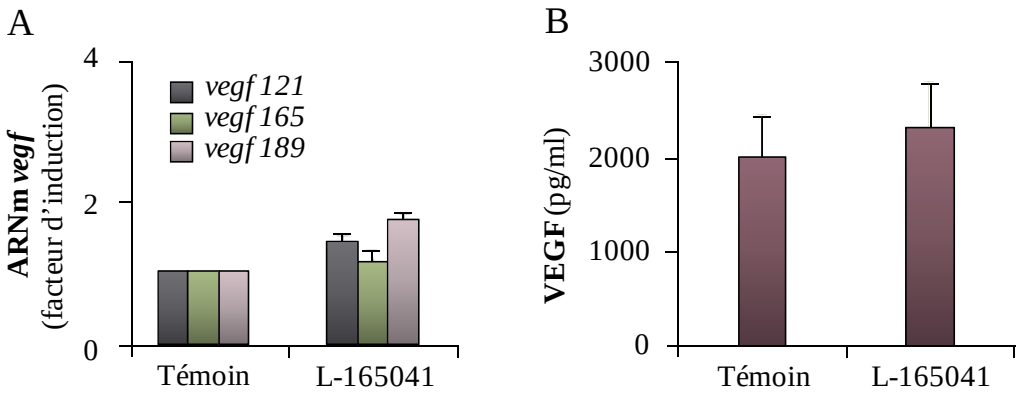

Figure 19 : Analyse, par RT-qPCR et dosage ELISA dans les milieux conditionnés, de l'effet du L-165041, ligand de PPARβ sur l'expression du VEGF dans les cellules CaSki. A) Les cellules CaSki ont été traitées pendant 24 h avec 25 µM de L-165041. Les ARN totaux ont été extraits puis 3 µg d'ARN ont été soumis à une analyse par RT-qPCR ciblant les transcrits des gènes *vegf121*, *vegf165*, *vegf189* et *atp5β* (gène de référence). B) Les cellules CaSki ont été traitées pendant 24 h avec 25 µM de L-165041 puis les concentrations de VEGF total présent dans les milieux conditionnés ont été déterminées par dosage ELISA. Le taux de VEGF obtenu est exprimé en pg/ml.

Ces résultats permettent de conclure que la présence de l'oncoprotéine E6 d'HPV18 ou E6 d'HPV16 dans les cellules, n'intervient pas dans l'effet du L-165041 sur l'expression du VEGF.

Bien évidemment, la présence et la fonctionnalité du récepteur PPARβ ont été vérifiées dans les lignées HeLa, CaSki et C-33A, prouvant que les cellules étaient bien sensibles au ligand. En effet, ces différentes lignées expriment le récepteur PPARβ et nous avons démontré qu'il était bien fonctionnel, suite à la transfection des cellules par un plasmide contenant 2 copies de la séquence consensus PPRE placées en amont du gène *luciférase*. Seul les résultats concernant les cellules CaSki sont présentés ci-après ; ceux concernant les cellules HeLa et C-33A sont présentés dans la publication (publication, figures 2 (C-33A) & 4 (HeLa)). Les résultats de l'immunoblot présenté dans la Figure 20 montrent que les cellules CaSki expriment PPARβ (les cellules HeLa ont été utilisées comme témoin positif) et que la stimulation des cellules par le ligand de PPARβ augmente l'activité luciférase du plasmide rapporteur.

Par conséquent, selon nos résultats, le récepteur PPARβ est bien fonctionnel dans les 3 types cellulaires dérivés de cancer du col de l'utérus.

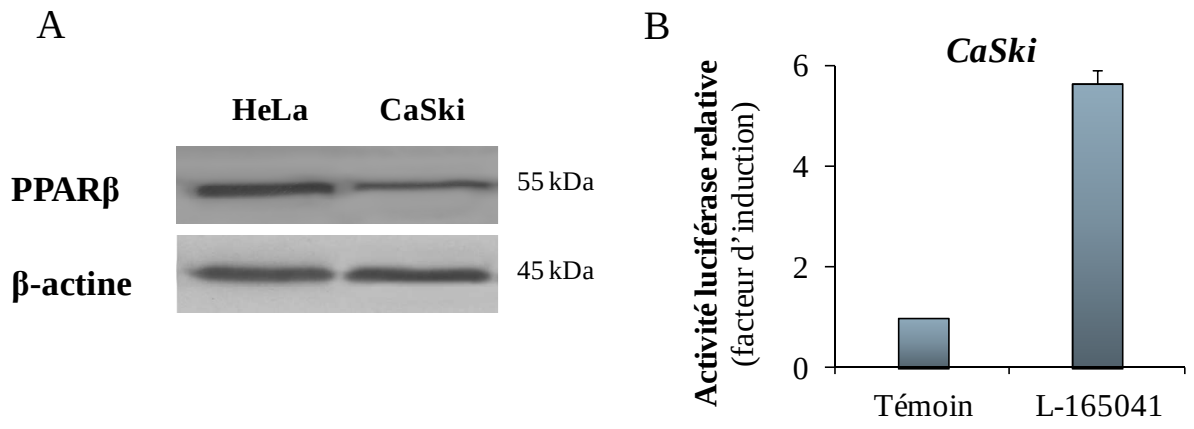

Figure 20 : Analyse de la présence du récepteur PPARβ par western-blotting et de sa fonctionnalité par mesure de l'activité luciférase dans les cellules CaSki. A) Une quantité de 40 µg de protéines provenant de cellules CaSki et HeLa et extraites à l'aide du tampon Ripa, est soumise à une électrophorèse puis transferée sur une membrane de PVDF. Cette membrane est ensuite hybridée avec l'anticorps anti-PPARβ (1/200) et anti-β-actine (1/8000). B) Les cellules CaSki ont été transfectées par un plasmique Cyp2XPal-Luc contenant 2 copie de PPRE consensus placées en amont du gène *luciférase* puis stimulées pendant 24 h par 25 µM de L-165041. Les cellules ont été lysées et 20 µl de lysat cellulaire ont été utilisés pour mesurer l'activité luciférase. Cette activité a été déterminée en divisant les valeurs arbitraires de luminescence obtenues avec le plasmide rapporteur par les valeurs arbitraires de luminescence obtenues avec le plasmide pRL-CMV pour chaque condition expérimentale. L'activité luciférase relative est exprimée en Unités Relatives de Luminescence (URL).

Nous nous sommes donc posés la question suivante : pourquoi l'effet du ligand de PPARβ sur l'expression du VEGF n'est-il observé que dans les cellules HeLa ?

Dans les lignées HeLa et C-33A, une des caractéristiques des cellules est que le statut de p53 diffère. En effet, les cellules HeLa abritent une protéine p53 sauvage alors que les cellules C-33A abritent une p53 mutée. De plus, selon les données de la littérature, p53 est capable de contrôler l'expression du VEGF selon le modèle cellulaire étudié. Nous avons donc vérifié l'implication potentielle du statut de p53 dans la surexpression du VEGF induite par le L-165041 dans les cellules HeLa. Les résultats sont présentés dans la publication, figure 3. Par immunoblotting, nous avons observé que, dans les cellules HeLa, en plus d'augmenter l'expression du VEGF, le L-165041 augmente le taux de protéine p53 ainsi que celui de sa cible, la protéine p21. Par contre, lorsque l'activité transcriptionnelle de p53 dans ces cellules est inhibée, en utilisant un inhibiteur spécifique, la pifithrine-α, aucune modification de l'effet du L-165041 sur l'expression du VEGF n'est observée ; pourtant, p53 n'est plus transcriptionnellement active puisqu'elle ne contrôle plus le taux de p21. Ces différents résultats nous permettent de conclure que, dans les cellules HeLa, l'oncoprotéine E6

d'HPV18 ou la protéine p53 n'interviennent pas dans l'action du ligand de PPARβ sur l'expression du VEGF.

Ce qui a particulièrement retenu notre attention, c'est que lorsque les cellules HeLa sont stimulées par le L-165041, nous observons une augmentation du taux de p53 et de p21 et un blocage des cellules en phase G0/G1, accompagné d'une diminution du pourcentage de cellules en phases S et G2/M (publication, figure 3). Par contre, le ligand n'est pas toxique car aucune mort cellulaire par apoptose n'est observée. D'autre part, nous avons montré que l'effet du ligand sur l'augmentation de p53 est bien dépendant de la présence du récepteur PPARβ, puisqu'en diminuant l'expression de ce dernier par l'utilisation d'un siRNA PPARβ, l'effet du L-165041 sur l'augmentation de p53 n'est plus observé.

Dans ces cellules, le ligand L-165041 augmente l'expression de p53 *via* son récepteur.

Par contre, l'effet du ligand sur la surexpression du VEGF ne semble pas faire intervenir le récepteur PPARβ (publication, figure 4). En effet, l'association du L-165041 avec des ligands du RXR (partenaire d'hétérodimérisation de PPARβ) tels que l'acide 9-cis rétinoïque ou le LG10068, ne potentialise aucunement l'effet du L-165041 sur l'induction du VEGF. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur chimique de l'activité transcriptionnelle du récepteur (GSK0660) et de siRNA PPARβ, montre que l'effet du L-165041 sur l'expression du VEGF est indépendant de l'activité transcriptionnelle et de la présence du récepteur PPARβ. Ce résultat n'est pas spécifique du L-165041. En effet, un autre agoniste de PPARβ, le GW501516, augmente lui aussi l'expression des transcrits des 3 isoformes du VEGF et un traitement combinatoire associant l'antagoniste GSK0660 au GW501516 ne réprime pas l'effet du GW501516.

Selon nos résultats, le ligand n'agit pas par l'intermédiaire de son récepteur ni par l'intermédiaire des récepteurs PPARα et γ (Figure 21). En effet, lorsque les cellules sont stimulées par le WY14,643 (ligand de PPARα) ou le BRL49653 (ligand de PPARγ), aucune augmentation de l'expression des différentes isoformes du VEGF est observée. D'autre part, suite à la transfection des cellules par un plasmide contenant 2 copies de la séquence consensus PPRE placées en amont du gène *luciférase*, la stimulation des cellules par les ligands des PPARα et γ n'augmente pas l'activité luciférase du plasmide rapporteur, suggérant que les récepteurs PPARα et γ ne sont pas fonctionnels dans les cellules HeLa.

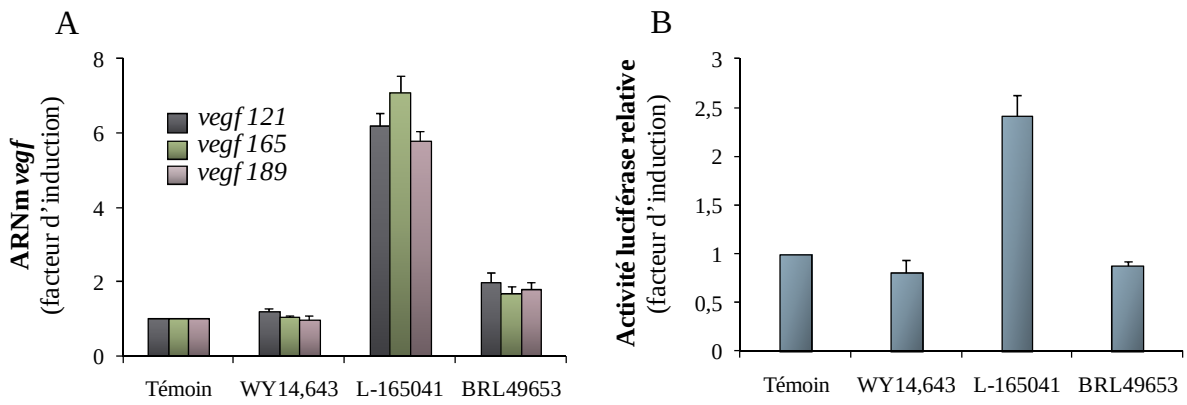

Figure 21 : Analyse de l'effet des ligands de PPARα, β et γ sur l'expression du VEGF par RT-qPCR, et de sa fonctionnalité par mesure de l'activité luciférase dans les cellules HeLa. A) Les cellules HeLa ont été traitées pendant 24 h avec 50 µM de WY14,643, 25 µM de L-165041 et 10 µM de BRL49653, ligands des PPARα, β et γ respectivement. Les ARN totaux ont été extraits puis 3 µg d'ARN ont été soumis à une analyse par RT-qPCR ciblant les transcrits des gènes *vegf121*, *vegf165*, *vegf189* et *atp5β* (gène de référence). B) Les cellules HeLa ont été transfectées par un plasmique Cyp2XPal-Luc contenant 2 copie de PPRE consensus placées en amont du gène *luciférase* puis stimulées pendant 24 h avec 50 µM de WY14,643, 25 µM de L-165041 et 10 µM de BRL49653, ligands des PPARα, β et γ respectivement. Les cellules ont été lysées et 20 µl de lysat cellulaire ont été utilisés pour mesurer l'activité luciférase. Cette activité a été déterminée en divisant les valeurs arbitraires de luminescence obtenues avec le plasmide rapporteur par les valeurs arbitraires de luminescence obtenues avec le plasmide pRL-CMV pour chaque condition expérimentale. L'activité luciférase relative est exprimée en Unités Relatives de Luminescence (URL).

Donc, dans les cellules HeLa, nous montrons d'une part, un effet du L-165041 dépendant de son récepteur (expression de la p53), et d'autre part, un effet indépendant du récepteur PPARβ (expression du VEGF).

Ce qui est à noter, c'est que le ligand L-165041 augmente l'expression de p53, bloque les cellules en phase G0/G1 et augmente l'expression du VEGF. Pourtant, le VEGF est un facteur qui permet entre autres la prolifération des cellules endothéliales. De plus, selon les données de la littérature, le VEGF peut agir sur les cellules tumorales puisque ces dernières expriment les récepteurs au VEGF à leur surface. Le VEGF sécrété par les cellules HeLa pourrait donc avoir un effet autocrine sur ces cellules.

Selon nos résultats, les cellules HeLa expriment à leur surface les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2, et le ligand de PPARβ augmente le taux de VEGFR-1 (Figure 22).

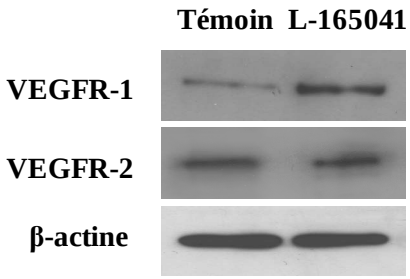

Figure 22 : Analyse par western-blotting de l'expression des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Une quantité de 20 µg de protéines provenant de cellules HeLa, et extraites à l'aide du tampon Ripa, est soumise à une électrophorèse puis transférée sur des membranes de PVDF. Ces membranes sont ensuite hybridées avec les anticorps anti-VEGFR-1 (1/500), anti-VEGFR-2 (1/500) et anti-β-actine (1/8000).

Nous pouvons donc supposer que le VEGF pourrait agir sur les cellules HeLa par une boucle autocrine, et au lieu d'induire une prolifération cellulaire, pourrait bloquer les cellules en phase G0/G1.

En effet, il a été décrit que selon le contexte et l'environnement cellulaire, la surexpression du VEGF pourrait conduire les cellules à la mort par apoptose, expliquant ainsi ces résultats apparemment contradictoires. Cependant, pour conclure sur le rôle du VEGF dans l'arrêt de prolifération des cellules HeLa, d'autres expériences seront nécessaires.

Dans la suite de notre travail, nous avons recherché par quel mécanisme moléculaire l'expression du VEGF pouvait être augmentée par le L-165041.

Après des expériences de transfection des cellules HeLa par un plasmide contenant le promoteur du VEGF (- 2279 à + 56) placé en amont du gène *luciférase*, et par des expériences réalisées en présence d'actinomycine D, nous avons montré que le L-165041 n'active pas la transcription mais stabilise les messagers du VEGF (publication, figure 5). Dans les cellules HeLa, le temps de demi-vie des transcrits des 3 isoformes du VEGF est d'environ 3 h alors qu'en présence du ligand, les temps de demi-vie des transcrits des 3 isoformes sont augmentés. En effet, ils sont de 10 h pour le VEGF121 et 165 et de plus de 16 h pour le VEGF189.

Selon les données de la littérature, le contrôle de la stabilité des messagers du VEGF est souvent le fait de l'activation de voies de signalisation impliquant des protéines kinases, telles que la p38 MAPK. D'ailleurs, dans les cellules HeLa, lorsque certaines voies de signalisation sont inhibées, en présence du L-165041, seule l'inhibition de la voie impliquant la p38 MAPK

diminue l'effet du ligand sur l'expression du VEGF. En effet, lorsque la phosphorylation de la protéine p38 est inhibée, l'effet du L-165041 sur la stabilisation des ARNm des différents isoformes du VEGF est significativement diminué (publication, figure 6). Nous avons confirmé que la protéine p38 était bien impliquée dans cet effet, puisqu'en bloquant son expression par la technique d'interférence à l'ARN (siRNA p38 MAPK), l'effet du L-165041 sur l'augmentation du VEGF est diminué. De plus, lorsque la synthèse *de novo* de protéines est inhibée, par l'utilisation de cycloheximide, l'effet du L-165041 sur l'expression du VEGF est inhibé. L'inhibition de l'effet du L-165041 est très rapide puisque 5 minutes d'incubation des cellules avec la cycloheximide suffisent. Ces résultats suggèrent l'intervention d'une protéine intermédiaire de demi-vie très courte. Cette protéine n'est pas la protéine p38 puisqu'elle est toujours exprimée alors que l'effet du L-165041 sur le VEGF est inhibé. Nous pouvons supposer qu'il s'agit peut-être de la MAPKK2, une protéine kinase nécessaire à la phosphorylation de la p38 MAPK. Cependant, d'autres expériences devront être réalisées pour confirmer cette hypothèse.

Selon nos résultats, le L-165041 augmente la stabilité des messagers du VEGF-A, par l'intermédiaire de la phosphorylation de la protéine p38. Cette stabilité des transcrits du VEGF peut être sous le contrôle de protéines stabilisantes telles que HuR ou de protéines déstabilisantes telles que TIS11b. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés au rôle que pourrait jouer ces protéines dans l'effet du L-165041 sur l'expression du VEGF.

Par western-blotting, TIS11b n'a pu être mise en évidence dans notre modèle. Cependant, nous avons montré que lorsque l'expression de HuR est inhibée (siRNA HuR), l'effet du ligand sur la surexpression du VEGF est significativement diminué (publication, figure 7). De plus, en présence du ligand, la protéine HuR s'accumule dans le cytoplasme et son taux diminue dans le noyau, et la translocation cytoplasmique de la protéine HuR est diminuée lorsque la voie p38 MAPK est inhibée. Ces résultats suggèrent que le L-165041 conduit à la phosphorylation de la p38 MAPK, qui facilite la translocation de HuR du noyau vers le cytoplasme, où elle pourra stabiliser les ARNm des VEGF121, 165 et 189.

En résumé, nous avons montré, pour la première fois, que dans un modèle dérivé de cancer du col de l'utérus, un ligand de PPARβ augmente le taux de VEGF en augmentant le temps de ½ vie des messagers du VEGF, et ce, sans l'intervention du récepteur PPARβ.

Selon les données de la littérature, l'acquisition d'un potentiel angiogénique conduit à l'acquisition d'un potentiel métastatique, caractérisé entre autre par une modification de l'expression de molécules d'adhérence (les cadhérines E et N).

La question suivante s'est donc posée : puisque le ligand du PPARβ contrôle le taux d'un facteur clef de l'angiogenèse, peut-il contrôler l'invasion tumorale en régulant l'expression des cadhérines E et N ? Si oui, quel est le rôle du VEGF ?

Article

The PPARβ agonist L-165041 stabilizes VEGF mRNA in HPV18-harboring HeLa cells through a PPARβ-independent mechanism

E Roche, I Lascombe, H Bittard, C Mougin and S Fauconnet

Article soumis pour publication

II. Effet du L-165041 sur l'expression des cadhérines

1. Distribution des cadhérines E et N

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence par RT-qPCR et par western-blotting, l'expression des cadhérines E et N dans les cellules dérivées de cancer du col de l'utérus (C-33A, CaSki et HeLa) ou dérivées de cancer de la vessie (RT4 et T24).

Pour quantifier les taux des différents transcrits des cadhérines E et N dans nos cellules, nous avons mis au point une technique de RT-PCR en temps réel, qui permet une analyse quantitative de l'expression des gènes, en utilisant la technologie Taqman ciblant les cadhérines E et N. Grâce à la détermination des conditions optimales de PCR (choix des couples d'amorces et de la sonde, concentrations des amorces et de la sonde, cycles de température, nombre de cycles de PCR…), nous avons développé une méthode de quantification relative des ARNm de la cadhérine E et de la cadhérine N, précise, reproductible et sensible.

Suite à l'analyse par RT-qPCR, nous avons montré d'une part, que les cellules C-33A n'expriment aucun des transcrits des cadhérine E et N, que les cellules CaSki expriment l'ARNm de la cadhérine E et faiblement l'ARNm de la cadhérine N et que les cellules HeLa n'expriment pas l'ARNm de la cadhérine E mais l'ARNm de la cadhérine N. D'autre part, que les cellules RT4 expriment l'ARNm de la cadhérine E mais pas celui de la cadhérine N et à l'inverse, que les cellules T24 n'expriment pas l'ARNm de la cadhérine E mais celui de la cadhérine N (Figure 23).

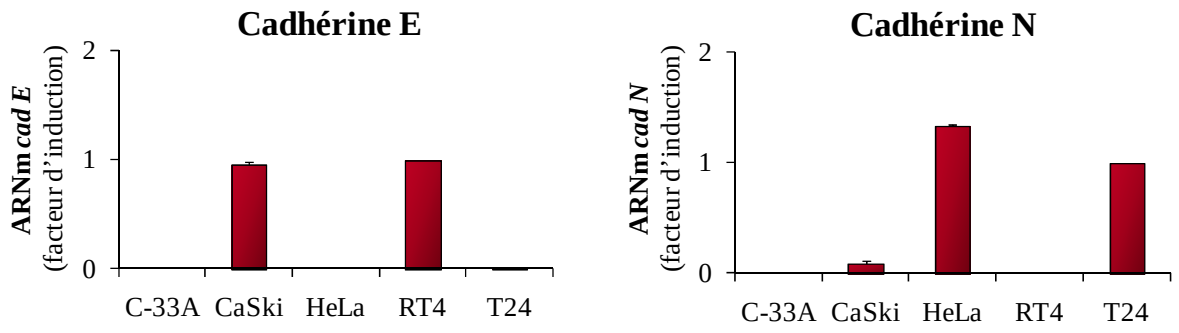

Figure 23 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de la cadhérine E et de la cadhérine N. Les ARN totaux de cellules C-33A, CaSki et HeLa, dérivées de cancer du col de l'utérus et de cellules RT4 et T24, dérivées de cancer de la vessie ont été extraits. Trois µg d'ARN ont été soumis à une RT-qPCR ciblant les transcrits des gènes *cadhérine E*, *cadhérine N* et *atp5β* (gène de référence).

Par une technique de western-bloting, nous avons ensuite montré une corrélation entre la quantité des ARNm et celle des protéines cadhérines E et N (Figure 24).

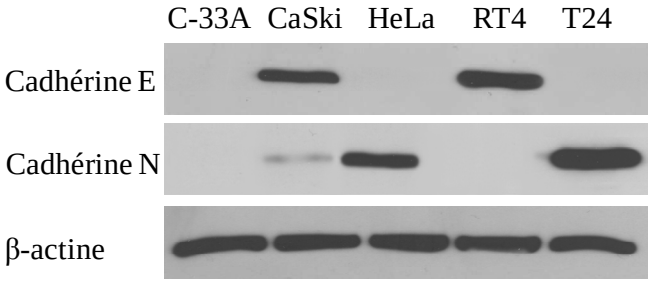

Figure 24 : Analyse par western-blotting de l'expression de la cadhérine E et de la cadhérine N. Une quantité de 10 µg de protéines de cellules C-33A, CaSki et HeLa, dérivées de cancer du col de l'utérus et de cellules RT4 et T24, dérivées de cancer de la vessie, extraites à l'aide du tampon Ripa, est soumise à une électrophorèse puis transférée sur des membranes de PVDF. Ces membranes sont ensuite hybridées avec les anticorps anti-cadhérine E (1/1000), anti-cadhérine N (1/2000) et anti-β-actine (1/8000).

Nous nous sommes ensuite posés la question suivante : est-ce que le ligand de PPARβ (L-165041) régule l'expression des cadhérines E et N dans nos différents modèles cellulaires ?

2. Effet du L-165041 sur l'expression des cadhérines E et N

Les différents modèles cellulaires ont été traités ou non pendant 24 h par 25 µM de L-165041. Après extraction des ARN, nous avons quantifié les transcrits des cadhérines E et N par RT-qPCR. Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme dans la Figure 25.

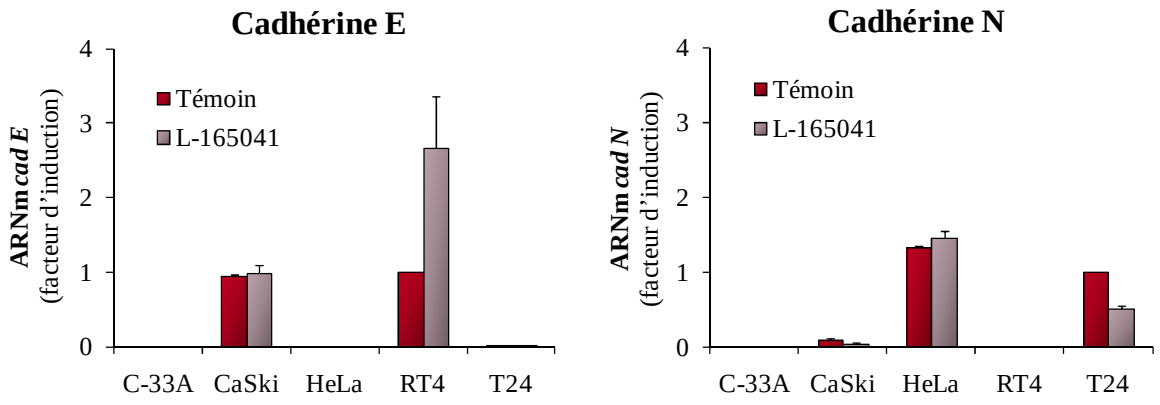

Figure 25 : Analyse par RT-qPCR de l'effet du L-165041 sur l'expression des transcrits de la cadhérine E et de la cadhérine N. Les cellules C-33A, CaSki et HeLa, dérivées de cancer du col de l'utérus et RT4 et T24, dérivées de cancer de la vessie ont été traitées pendant 24 h par 25 µM de L-165041 puis les ARN totaux ont été extraits. Trois µg d'ARN ont été soumis à une analyse par RT-qPCR ciblant les transcrits des gènes *cadhérine E*, *cadhérine N* et *atp5β* (gène de référence).

Pour les cellules C-33A, qui n'expriment aucune des 2 cadhérines, le traitement par le L-165041 ne ré-induit pas l'expression des transcrits des cadhérines.

Pour les cellules CaSki, qui expriment beaucoup plus de cadhérine E que de cadhérine N, le traitement par le L-165041 ne modifie pas la quantité d'ARNm des cadhérines.

En ce qui concerne les cellules HeLa, qui expriment uniquement la cadhérine N, le taux des transcrits n'est pas modifié suite au traitement par le L-165041.

Par contre, dans les cellules RT4, le traitement par le L-165041 augmente la quantité des transcrits de la cadhérine E.

Et dans les cellules T24, suite au traitement par le L-165041, la quantité d'ARNm de la cadhérine N est diminuée.

Les résultats obtenus suite à l'analyse des ARNm des cadhérines ont été corrélés au niveau protéique par un western-blotting (Figure 26). En effet, aucune modification de la quantité des cadhérines n'est observée suite à la stimulation des cellules issues de cancer de col de l'utérus par le L-165041. Par contre, dans les cellules RT4, le taux de la cadhérine E est augmenté suite au traitement par le L-165041 et dans les cellules T24, le taux de cadhérine N est diminué.

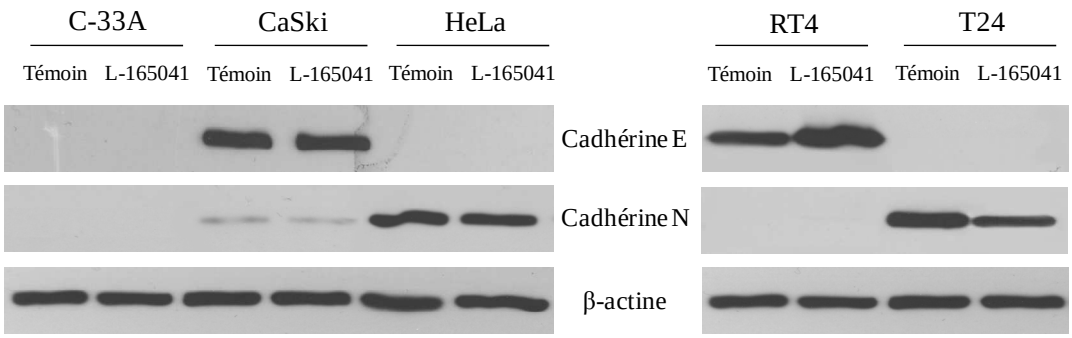

Figure 26 : Analyse par western-blotting de l'effet du L-165041 sur l'expression de la cadhérine E et de la cadhérine N. Les cellules C-33A, CaSki et HeLa, dérivées de cancer du col de l'utérus et de cellules RT4 et T24, dérivées de cancer de la vessie ont été traitées pendant 24 h par 25 µM de L-165041. Une quantité de 10 µg de protéines, extraites à l'aide du tampon Ripa, est soumise à une électrophorèse puis transférée sur des membranes de PVDF. Ces membranes sont ensuite hybridées avec les anticorps anti-cadhérine E (1/1000), anti-cadhérine N (1/2000) et anti-β-actine (1/8000).

Nous montrons que le ligand de PPARβ est capable de réguler la quantité de cadhérine N dans les cellules T24. Ce résultat est particulièrement intéressant. En effet, le comportement des cellules T24 peut mimer celui d'une tumeur de vessie agressive à haut potentiel métastasique. En effet, les cellules T24 ont la capacité de proliférer rapidement, la possibilité de migrer et sont résistantes à des inducteurs d'apoptose. De plus, les cellules T24 expriment la cadhérine N et des études antérieures dans notre laboratoire ont montré que la cadhérine N était un marqueur de progression des tumeurs de vessie.

A l'heure d'aujourd'hui, il est bien établi que les ligands de PPARβ interviennent dans la différenciation cellulaire. C'est pourquoi, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle, il serait possible de bloquer la capacité invasive des cellules T24 en diminuant l'expression de la cadhérine N par un traitement avec le L-165041.

D'ores et déjà, nous avons montré que le taux de cadhérine N dans ces cellules, peut être contrôlé par le ligand de PPARβ. Il nous semble donc nécessaire de mieux comprendre le mécanisme moléculaire mis en jeu dans la régulation de cette cadhérine.

C'est pourquoi, les cellules T24 ont été stimulées pendant 24 h par des doses croissantes de L-165041 puis l'expression de la cadhérine N a été étudiée par western-blotting (Figure 27). Une diminution du taux de la cadhérine N n'est observée qu'à partir d'une concentration de 25 µM de L-165041.

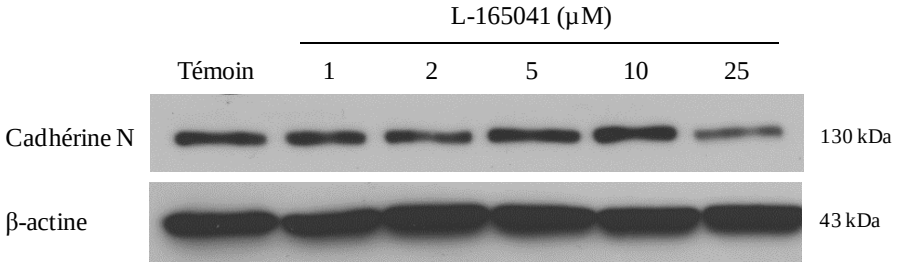

Figure 27 : Analyse par western-blotting de l'effet de concentrations croissantes de L-165041 sur l'expression de la cadhérine N. Les cellules T24 ont été traitées pendant 24 h par des concentrations croissantes de L-165041 (1, 2, 5, 10 et 25 µM). Une quantité de 10 µg de protéines, extraites à l'aide du tampon Ripa, est soumise à une électrophorèse puis transférée sur des membranes de PVDF. Ces membranes sont ensuite hybridées avec les anticorps anti-cadhérine N (1/2000) et anti-β-actine (1/8000).

La quantité de protéine cadhérine N est diminuée suite à un traitement par 25 µM de L-165041 : qu'en est-il de la quantité des transcrits ?

Les cellules T24 ont été stimulées ou non 24 h par 10 et 25 µM de L-165041. L'expression des transcrits de la cadhérine N a été analysée par RT-qPCR et le taux d'expression de ces transcrits a été représenté sous forme d'histogramme (Figure 28). Comparativement au témoin, une diminution d'environ 50 % du taux des transcrits de la cadhérine N est obtenue à partir d'une concentration de 25 µM de ligand.

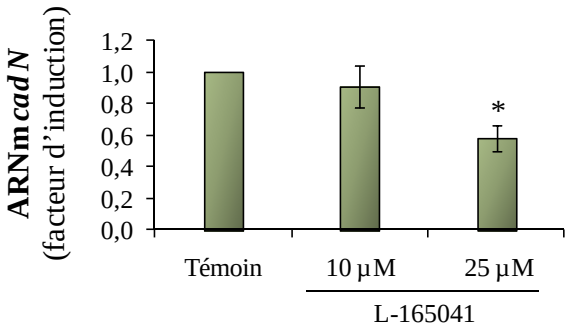

Figure 28 : Analyse par RT-qPCR de l'effet de différentes concentrations de L-165041 sur l'expression des transcrits de la cadhérine N. Les cellules T24 ont été traitées pendant 24 h par deux concentrations de L-165041 (10 et 25 µM) puis les ARN totaux ont été extraits. Trois µg d'ARN ont été soumis à une analyse par RT-qPCR ciblant les transcrits des gènes *cadhérine E*, *cadhérine N* et *atp5β* (gène de référence).

Vraisemblablement, il est nécessaire d'utiliser une concentration de 25 µM de L-165041 pour obtenir une diminution de la quantité d'ARNm et de protéine cadhérine N. Nous avons ensuite déterminé si des voies de signalisation intracellulaires impliquant des protéines

kinases intervenaient dans l'effet du L-165041 sur la régulation de l'expression de la cadhérine N.

3. Voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'effet du L-165041 sur l'expression de la cadhérine N

Les cellules T24 ont donc été traitées 24 h par 25 µM de L-165041 seul ou en association avec des inhibiteurs de voies de signalisation intracellulaires tels que le SB203580 (inhibiteur de la voie p38 MAPK, 20 µM), le PD98059 (inhibiteur de la voie ERK1/2, 20 µM), la wortmannin (inhibiteur de la voie PI3K, 10 µM) et la rapamycine (inhibiteur de la voie Akt/mTOR, 10 µM). Le taux de cadhérine N a ensuite été analysé par western-blotting (Figure 29).

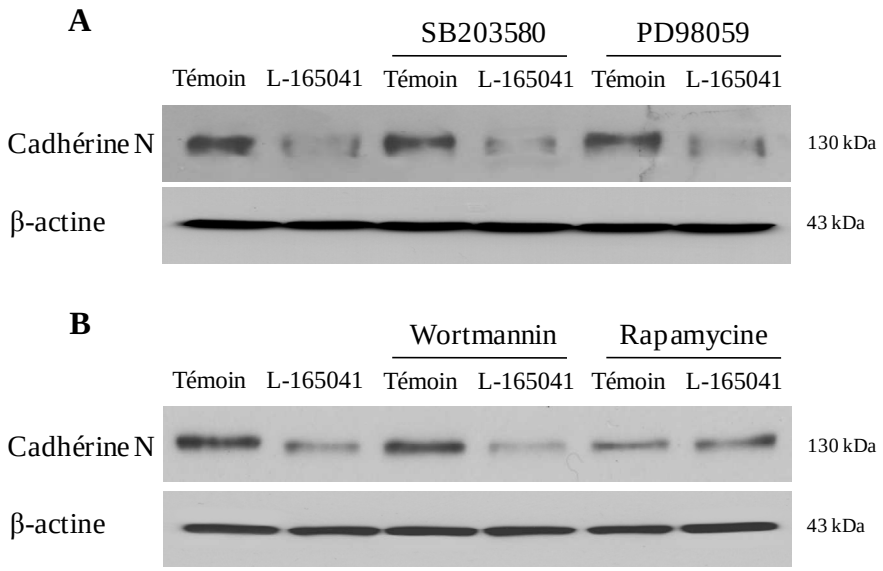

Figure 29 : Analyse par western-blotting de l'effet d'inhibiteurs de voies de signalisation sur la diminution de l'expression de la cadhérine N induite par le L-165041. A) Les cellules T24 ont été traitées pendant 24 h par 25 µM de L-165041, seul ou en association avec 20 µM de SB203580 (inhibiteur de la voie p38 MAPK), ou 20 µM de PD98059 (inhibiteur de la voie ERK1/2 MAPK). B) Les cellules T24 ont été traitées pendant 24 h par 25 µM de L-165041, seul ou en association avec 10 µM de wortmannin (inhibiteur de la voie PI3K), ou 10 µM de rapamycine (inhibiteur de la voie Akt/mTOR). A-B) Une quantité de 10 µg de protéines, extraites à l'aide du tampon Ripa, est soumise à une électrophorèse puis transférée sur des membranes de PVDF. Ces membranes sont ensuite hybridées avec les anticorps anti-cadhérine N (1/2000) et anti-β-actine (1/8000).

L'association des inhibiteurs SB203580, PD98059 et wortmannin avec le L-165041, ne perturbe pas l'effet inhibiteur de l'agoniste de PPARβ sur le taux de cadhérine N. Par contre, en présence de rapamycine, le ligand de PPARβ ne diminue plus le taux de cadhérine N

comparativament au témoin rapamycine. Par contre, lorsque les cellules T24 sont mises en présence de rapamycine seule, nous observons un taux moins important de cadhérine N comparativement à celui obtenu lorsque les cellules sont incubées avec le solvant, ce qui laisse supposer que la rapamycine agit sur le taux basal de l'expression de la cadhérine N et que la rapamycine n'interviendrait pas sur l'effet du ligand L-165041 sur l'expression de la cadhérine N. Ces résultats suggèrent que seule la voie Akt/mTOR est impliquée dans le contrôle de l'expression de la cadhérine N et que l'effet du L-165041 sur la diminution de l'expression de la molécule d'adhérence ne fait pas intervenir les voies de signalisation ERK1/2, p38 MAPK et PI3K.

4. L'effet du L-165041 est-il dépendant de l'activité du récepteur PPARβ ?

Pour déterminer si l'effet du L-165041 est dépendant de l'activation transcriptionnelle du récepteur, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de PPARβ (GSK0660).

Les cellules T24 ont été traitées par le L-165041, seul ou en association avec 10 µM de GSK0660, un antagoniste du récepteur PPARβ. L'expression de la cadhérine N a été analysée par western-blotting (Figure 30).

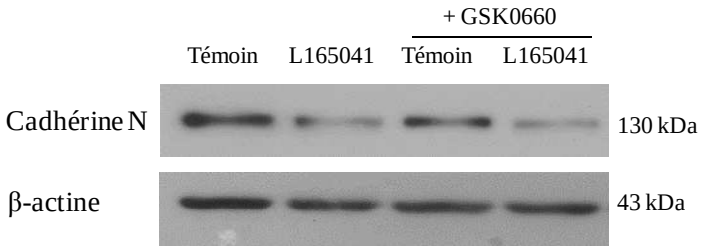

Figure 30 : Analyse par western-blotting de l'effet d'un antagoniste de PPARβ sur la diminution de l'expression de la cadhérine N par le L-165041. Les cellules T24 ont été traitées ou non 24 h par 25 µM de L-165041, seul ou en association avec 10 µM de GSK0660. Une quantité de 10 µg de protéines, extraites à l'aide du tampon Ripa, est soumise à une électrophorèse puis transférée sur des membranes de PVDF. Ces membranes sont ensuite hybridées avec les anticorps anti-cadhérine N (1/2000) et anti-β-actine (1/8000).

En présence de 25 µM de L-165041, la quantité de cadhérine N diminue comparativement à celle observée dans le témoin confirmant nos résultats précédents. Cependant, l'association de l'antagoniste de PPARβ avec le L-165041 ne perturbe par l'effet de L-165041 sur le taux

de protéine suggérant un effet de l'agoniste sur l'expression de la cadhérine N indépendant de l'activation transcriptionnelle du récepteur PPARβ.

Bien évidemment, l'efficacité de l'antagoniste GSK0660 a été testée. Pour cela, dans les cellules T24, nous avons contrôlé l'efficacité du récepteur PPARβ sur le contrôle de l'expression de l'une de ces cibles, la A-FABP (Adipocyte-Fatty Acid Binding Protein).

Les cellules T24 ont été traitées 24 h par différentes concentrations de ligand, et l'expression des transcrits et de la protéine A-FABP a été étudiée par RT-qPCR et par western-blotting (Figure 31).

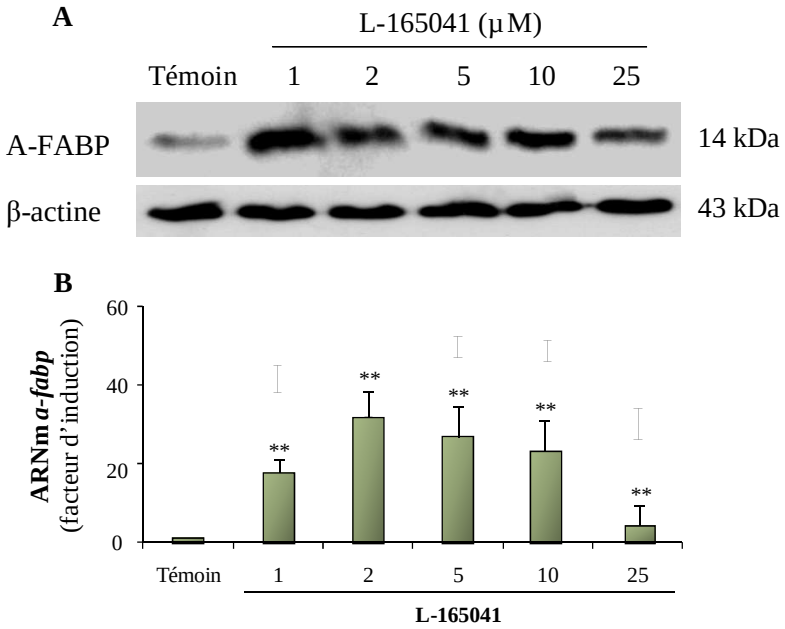

Figure 31 : Analyse de l'effet de concentrations croissantes de L-165041 sur l'expression de la A-FABP. Les cellules T24 ont été traitées pendant 24 h par des concentrations croissantes de L-165041 (1, 2, 5, 10 et 25 µM). A) Une quantité de 15 µg de protéines, extraites à l'aide du tampon Ripa, est soumise à une électrophorèse puis transférée sur des membranes de PVDF. Ces membranes sont ensuite hybridées avec les anticorps anti-A-FABP (1/1000) et anti-β-actine (1/8000). B) Trois µg d'ARN totaux extraits ont été soumis à une RT-qPCR ciblant les transcrits des gènes *a-fabp* et *atp5β* (gène de référence).

Une augmentation du taux de la protéine mais aussi de la quantité d'ARNm A-FABP est observée quelle que soit la concentration de L-165041 utilisée (Figure 30). Cette protéine est bien régulée par le ligand agoniste de PPARβ, et cet effet est bien dépendant du récepteur PPARβ puisque l'association de l'antagoniste GSK0660 avec le ligand L-165041 bloque l'effet du ligand sur l'augmentation de l'expression de la A-FABP (Figure 32).

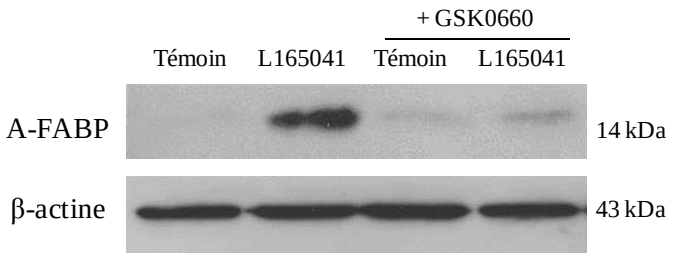

Figure 32 : Analyse par western-blotting de l'effet d'un antagoniste de PPARβ sur la surexpression de la A-FABP par le L-165041. Les cellules T24 ont été traitées ou non 24 h par 25 µM de L-165041, seul ou en association avec 10 µM de GSK0660. Une quantité de 15 µg de protéines, extraites à l'aide du tampon Ripa, est soumise à une électrophorèse puis transférée sur des membranes de PVDF. Ces membranes sont ensuite hybridées avec les anticorps anti-A-FABP (1/1000) et anti-β-actine (1/8000).

Cette expérience confirme l'efficacité de l'antagoniste, ce qui nous permet de conclure que l'effet du L-165041 sur l'expression de la cadhérine N est indépendant de l'activité transcriptionnelle du récepteur PPARβ.

Afin de vérifier que la diminution du taux de cadhérine N, due à la stimulation par le ligand de PPARβ, n'est pas le résultat d'une toxicité du produit, nous avons analysé par cytométrie en flux le pourcentage de cellules en sub-G1.

5. Analyse par cytométrie de flux de l'effet du L-165041 sur le cycle cellulaire des cellules T24

Les cellules T24 ont été traitées pendant 24 h en absence ou en présence de concentrations croissantes de L-165041. Après un marquage à l'iodure de propidium, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (Figure 33).

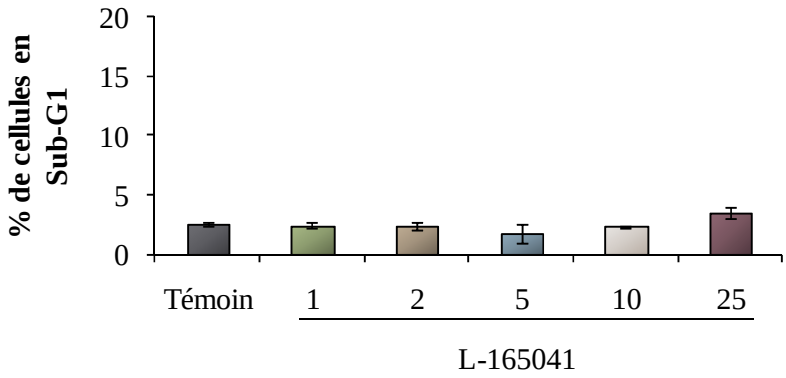

Figure 33 : Analyse par cytométrie de flux de l'effet de concentrations croissantes de L-165041 sur la mort cellulaire des cellules T24. Les cellules T24 ont été traitées pendant 24 h par des concentrations croissantes de L-165041 (1, 2, 5, 10 et 25 µM) et analysées par cytométrie de flux après un marquage à l'iodure de propidium.

Quelle que soit la concentration de L-165041 utilisée, aucune mort cellulaire n'est observée. En effet, il n'y a pas d'augmentation du pourcentage de cellules en sub-G1. En revanche, le traitement par des doses croissantes de L-165041 entraîne une augmentation du pourcentage de cellules en phase G0/G1 comparativement aux cellules témoins. Ce résultat est associé à une diminution du pourcentage de cellules en phase S attestant d'une diminution de la synthèse d'ADN (Figure 34).

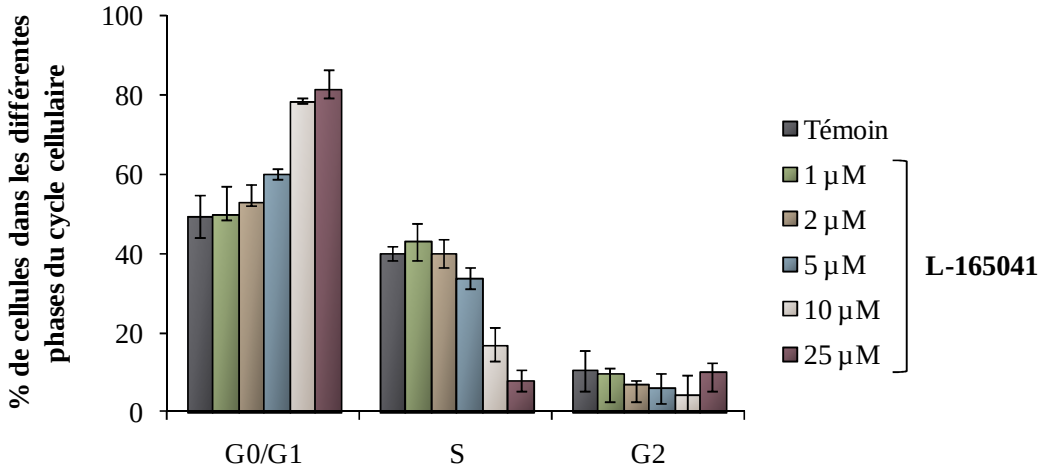

Figure 34 : Analyse par cytométrie de flux de l'effet de concentrations croissantes de L-165041 sur le cycle cellulaire des cellules T24. Les cellules T24 ont été traitées pendant 24 h par des concentrations croissantes de L-165041 (1, 2, 5, 10 et 25 µM) et analysées par cytométrie de flux après un marquage à l'iodure de propidium.

Ces résultats suggèrent que le traitement par le L-165041 provoque l'arrêt des cellules T24 en phase G0/G1 donc l'arrêt de leur prolifération mais n'induit pas la mort de ces cellules. Ce résultat est particulièrement intéressant. En effet, comme dans le cas des cellules HeLa, dérivées de cancer du col de l'utérus, le ligand L-165041 provoque un arrêt des cellules T24, dérivées de cancer de la vessie, en phase G0/G1 alors qu'il augmente l'expression du VEGF, mais à la différence des cellules HeLa, le ligand diminue l'expression de la cadhérine N.

Etant donné que le VEGF peut réguler l'expression de certaines molécules d'adhérence et intervenir dans le processus de TEM, nous nous sommes posés la question suivante : la diminution de l'expression de la cadhérine N observée suite au traitement par le ligand est-elle la conséquence de la surexpression du VEGF dans les milieux conditionnés ?

6. Rôle du VEGF dans l'effet du L-165041 sur l'expression des cadhérines E et N

Dans un premier temps, nous avons déterminé si nos lignées dérivées de cancer de la vessie exprimaient les récepteurs au VEGF, condition pour que le VEGF agisse de façon autocrine sur les cellules.

6.1. Expression des récepteurs au VEGF dans les cellules RT4 et T24

Les cellules RT4 et T24 ont été stimulées pendant 24 h par 25 µM de L-165041 puis l'expression des récepteurs au VEGF, le VEGF-R1 et le VEGF-R2, a été étudiée par western-blotting (Figure 35).

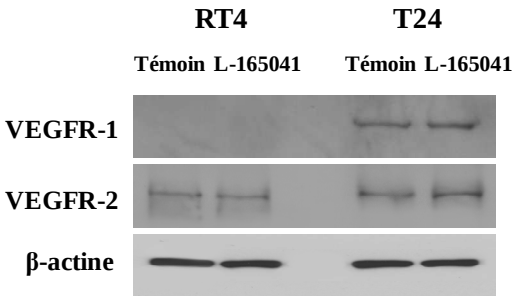

Figure 35 : Analyse par western-blotting de l'expression des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Une quantité de 20 µg de protéines de cellules RT4 et T24, dérivées de cancer de la vessie extraites à l'aide du tampon Ripa, est soumise à une électrophorèse puis transférée sur des membranes de PVDF. Ces membranes sont ensuite hybridées avec les anticorps anti-VEGFR-1 (1/500), anti-VEGFR-2 (1/500) et anti-β-actine (1/8000).

Vraisemblablement, selon nos résultats, les cellules T24 expriment les VEGFR-1 et VEGFR-2 alors que les cellules RT4 expriment uniquement le VEGFR-2. Ces résultats sont en faveur d'une boucle autocrine du VEGF. Par contre, la stimulation par le L-165041 ne modifie pas le taux des récepteurs au VEGF, contrairement à ce que nous avons observé pour les cellules HeLa.

Selon un certain nombre d'études, le VEGF, par l'intermédiaire de l'activation de ces récepteurs contrôlerait l'expression de certaines molécules d'adhérence. C'est pourquoi, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le VEGF régulerait l'expression des cadhérines E et N dans nos modèles de cancer de la vessie.

6.2. Effet du VEGF exogène sur l'expression des cadhérines E et N

Les cellules RT4 et T24 ont été stimulées par différentes concentrations de VEGF exogène puis une analyse de l'expression des cadhérines E et N par RT-qPCR a été réalisée (Figure 36).

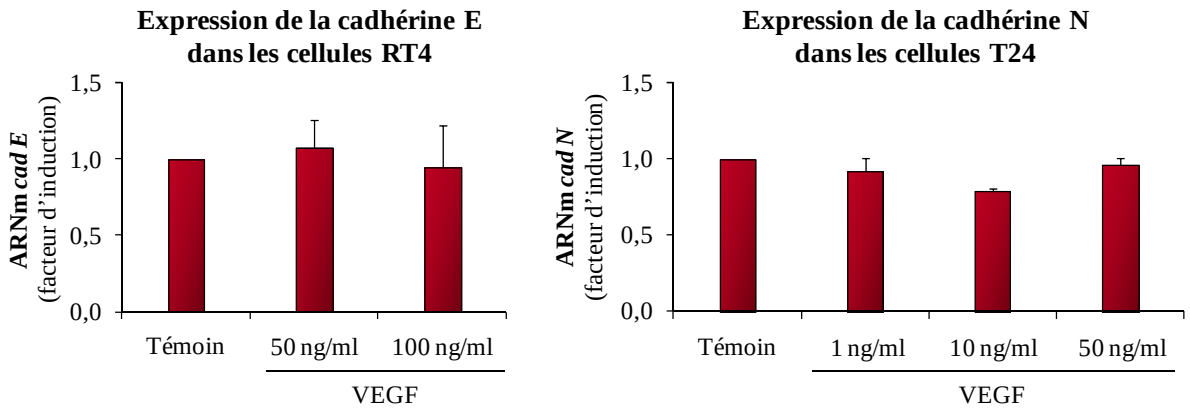

Figure 36 : Analyse par RT-qPCR de l'effet du VEGF sur l'expression des transcrits de la cadhérine E et de la cadhérine N. Les cellules RT4 et T24 ont été traitées pendant 24 h par des concentrations croissantes de VEGF exogène puis les ARN totaux ont été extraits. Trois µg d'ARN ont été soumis à une analyse par RT-qPCR ciblant les transcrits des gènes *cadhérine E*, *cadhérine N* et *atp5β* (gène de référence).

Lorsque les cellules RT4 et T24 ont été stimulées par différentes concentrations de VEGF exogène, aucune modification de l'expression des transcrits de la cadhérine E et de la cadhérine N n'a été observée. Par contre, lorsque l'expression des protéines a été étudiée par western-blotting, nous avons observé un effet du VEGF exogène sur l'expression des cadhérines E et N (Figure 37).

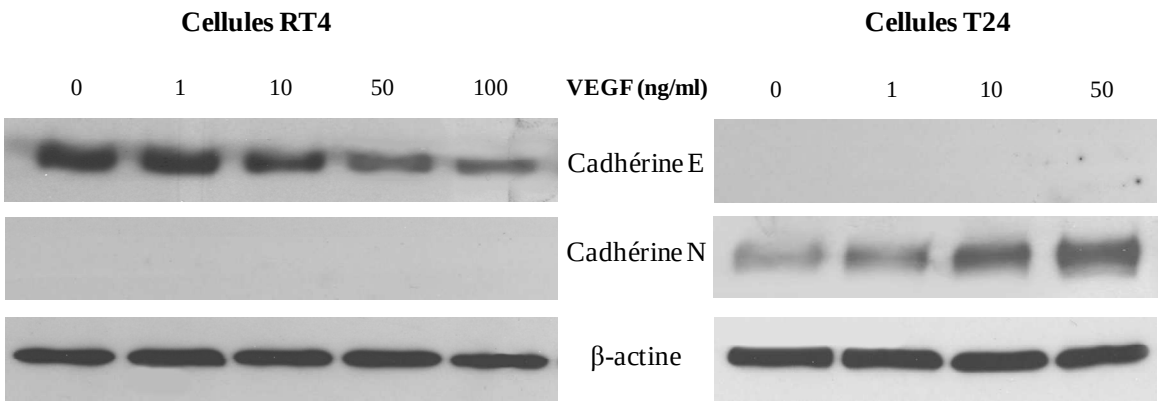

Figure 37 : Analyse par western-blotting de l'effet du VEGF sur l'expression de la cadhérine E et de la cadhérine N. Les cellules RT4 et T24 ont été traitées pendant 24 h par des concentrations croissantes de VEGF exogène. Une quantité de 10 µg de protéines, extraites à l'aide du tampon Ripa, est soumise à une électrophorèse puis transférée sur des membranes de PVDF. Ces membranes sont ensuite hybridées avec les anticorps anti-cadhérine E (1/1000), anti-cadhérine N (1/2000) et anti-β-actine (1/8000).

Dans les cellules RT4, l'expression de la cadhérine E diminue à partir d'une concentration de 50 ng/ml de VEGF. Par contre, dans les cellules T24, l'expression de la cadhérine N est augmentée à partir d'une concentration de 10 ng/ml de VEGF. L'expression de la cadhérine N, pour les cellules RT4, et de la cadhérine E, pour les cellules T24, n'est pas induite suite à la stimulation par le VEGF exogène.

Finalement, le L-165041 a un effet opposé à celui du VEGF sur l'expression des cadhérines. Par exemple, dans les cellules T24, le L-165041 diminue l'expression de la cadhérine N alors que le VEGF exogène augmente son expression. C'est pourquoi, nous avons étudié l'effet de l'association de ces 2 molécules sur l'expression des cadhérines.

6.3. Effet de l'association du L-165041 et du VEGF sur l'expression des cadhérines E et N

Les cellules RT4 et T24 ont été stimulées 24 h par 25 µM de L-165041, seul ou en association avec 100 ng/ml de VEGF exogène pour les cellules RT4 et 50 ng/ml pour les cellules T24. L'effet du co-traitement sur l'expression des cadhérine E et N a ensuite été étudié par western-blotting (Figure 38).

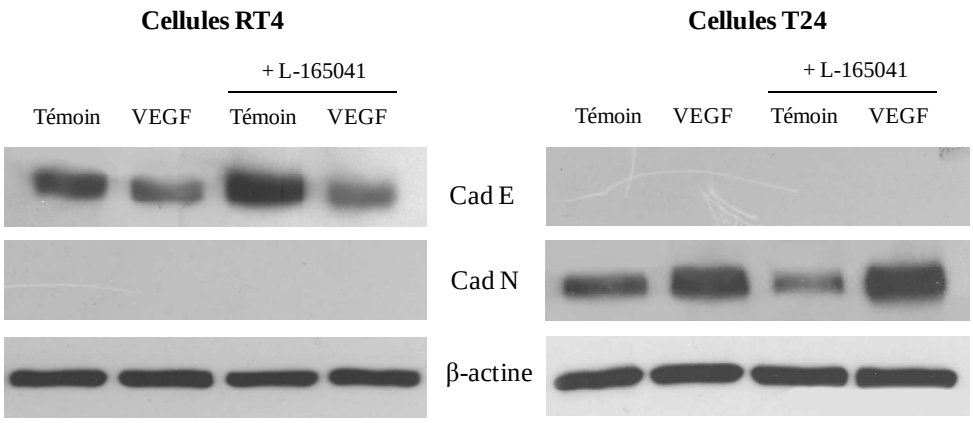

Figure 38 : Analyse par western-blotting de l'effet du co-traitement VEGF + L-165041 sur l'expression de la cadhérine E et de la cadhérine N. Les cellules RT4 ont été traitées pendant 24 h par 25 µM de L-165041, seul ou en association avec 100 ng/ml de VEGF exogène. Les cellules T24 ont été traitées pendant 24 h par 25 µM de L-165041, seul ou en association avec 50 ng/ml de VEGF exogène. Une quantité de 10 µg de protéines, extraites à l'aide du tampon Ripa, est soumise à une électrophorèse puis transférée sur des membranes de PVDF. Ces membranes sont ensuite hybridées avec les anticorps anti-cadhérine E (1/1000), anti-cadhérine N (1/2000) et anti-β-actine (1/8000).

Dans les cellules RT4, la stimulation par le L-165041 augmente le taux de cadhérine E. Cependant, l'association du VEGF exogène avec le L-165041 bloque l'effet du L-165041 sur l'augmentation du taux de cadhérine E. De façon similaire, dans les cellules T24, le L-165041 diminue le taux de cadhérine N. Cependant, l'association du VEGF exogène avec le L-165041 bloque l'effet inhibiteur de l'agoniste de PPARβ sur l'expression de la cadhérine N.

Selon nos résultats, l'effet du L-165041 sur la régulation du taux de cadhérine E ou N est inhibé par la présence d'une forte concentration de VEGF. Pourtant, le L-165041 augmente l'expression des isoformes VEGF121, 165 et 189 dans des cellules RT4 et T24 et régule toujours l'expression des cadhérines E dans les cellules RT4 et N dans les cellules T24. Nous pouvons supposer que le taux de VEGF sécrété suite à la stimulation par le L-165041 n'est pas suffisant pour contrecarrer l'effet du VEGF exogène sur l'expression des cadhérines. Nous pouvons aussi imaginer que, dans notre modèle, quelque chose empêche le VEGF sécrété sous l'action du L-165041, d'activer ses récepteurs. En effet, des formes anti-angiogéniques VEGFxxxb ont été décrites ; elles pourraient empêcher l'action des formes VEGFxxx sur la régulation de l'expression des cadhérines et pourraient expliquer pourquoi le VEGF sécrété ne contrecarre pas l'effet du L-165041 sur l'expression des cadhérines.

C’est pourquoi, nous avons étudié si le L-165041 régulait l’expression d’isoformes anti-angiogéniques VEGFxxxb.

6.4. Effet du L-165041 sur l’expression du VEGF165b

En effet, nous nous sommes intéressés à l’effet du L-165041 sur l’expression d’une isoforme anti-angiogénique, le VEGF165b. Pour ce faire, nous avons mis au point une technique de RT-PCR en temps réel spécifique de cette isoforme, en utilisant la technologie SybrGreen. Pour être discriminant entre le VEGF165 et VEGF165b, nous avons choisi une amorce anti-sens ciblant la jonction des exons 7/8a, pour la PCR spécifique du VEGF165 et ciblant la jonction 7/8b, pour la PCR spécifique du VEGF165b (Figure 39).

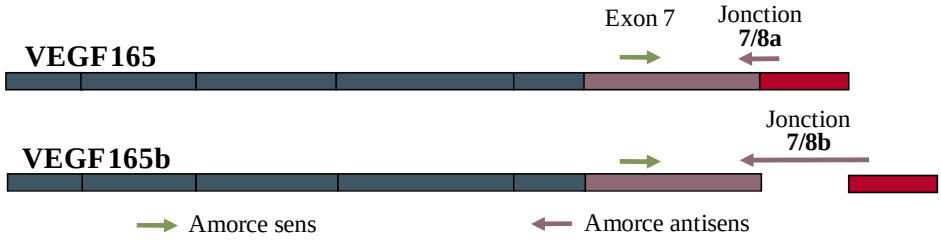

Figure 39 : Position des amorces pour la quantification spécifique des transcrits des isoformes du VEGF165 et VEGF165b.

Les conditions optimales (concentration d’amorces, conditions de PCR) ont été déterminées pour ces 2 PCR et la spécificité des amorces pour l’amplification de ces 2 isoformes a été vérifiée par séquençage. Ces RT-qPCR ont ensuite été réalisées sur 3 µg d’ARN totaux extraits de cellules T24, stimulées ou non 24 h par 25 µM de L-165041 (Figure 40).

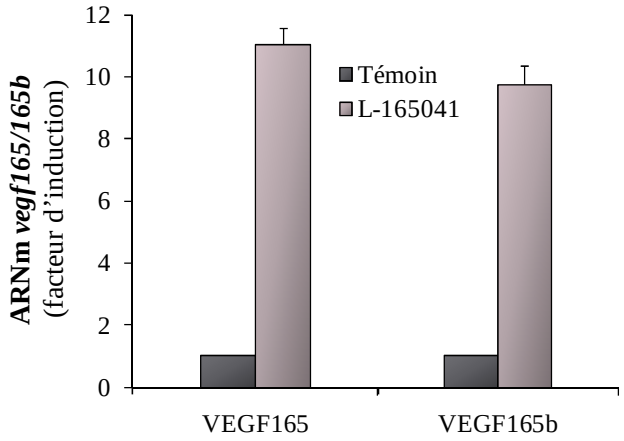

Figure 40 : Analyse par RT-qPCR de l'effet du L-165041 sur l'expression des transcrits du VEGF165 et VEGF165b. Les cellules T24, dérivées de cancer de la vessie ont été traitées pendant 24 h par 25 µM de L-165041 puis les ARN totaux ont été extraits. Trois µg d'ARN ont été soumis à une analyse par RT-qPCR ciblant les transcrits des gènes *vegf165*, *vegf165b* et *atp5β* (gène de référence).

Selon nos résultats, le L-165041 augmente d'un facteur 11 le transcrit de l'isoforme VEGF165 et d'un facteur 10 le transcrit de l'isoforme VEGF165b.

Vraisemblablement, dans les cellules T24, le ligand contrôle aussi l'expression du transcrit du VEGF165b. Ce résultat est particulièrement intéressant lorsque l'on sait que cette isoforme à une action anti-angiogénique. Pour vérifier cette hypothèse selon laquelle les formes VEGFxxxb peuvent être synthétisées et sécrétées par les cellules T24, empêchant ainsi l'activité des VEGFxxx (Bates *et al*., 2002), d'autres expériences devront être réalisées et il sera particulièrement intéressant d'étudier les différents mécanismes moléculaires mis en jeu dans la régulation de cette isoforme par le ligand de PPARβ, afin de déterminer si le ligand régule l'expression de l'isoforme anti-angiogénique de la même façon que l'isoforme angiogénique.

Discussion

&

perspectives

Avec environ 357 000 nouveaux cas en France en 2010, le cancer est un véritable enjeu de santé publique. La principale cause de complications, d'échecs thérapeutiques et de décès est la formation de métastases. La dissémination des cellules cancéreuses repose entre autres sur la mise en place du processus angiogénique et l'acquisition par les cellules tumorales d'un phénotype invasif. C'est pourquoi, il est nécessaire d'identifier des marqueurs moléculaires de progression permettant de cartographier la tumeur afin d'adapter la thérapeutique précocément en fonction de chaque patient. Comme nous l'avons décrit précédemment, nous nous sommes intéressés à deux marqueurs biologiques, le VEGF, facteur clef de l'angiogenèse et les cadhérines E et N, qui sont des protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire.

D'ailleurs, des travaux antérieurs de notre équipe ont montré que le VEGF et la cadhérine N sont des marqueurs de progression des tumeurs urothéliales (Lascombe *et al*., 2006 ; Fauconnet *et al*., 2009). D'autre part, l'expression de ces marqueurs biologiques est dérégulée lors de l'acquisition du phénotype angiogénique et invasif de la tumeur. C'est pourquoi, au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes attachés à mieux comprendre les mécanismes de régulation de ces marqueurs, et à déterminer si, des récepteurs nucléaires de la famille de PPAR, sont capables de contrôler leur expression.

Les PPAR sont des facteurs de transcription ligand-dépendants impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que le métabolisme lipidique et glucidique ainsi que dans certaines pathologies telles que le diabète, l'obésité ou le cancer. Parmi ces récepteur, c'est le PPARβ qui a retenu notre attention ; d'ailleurs, à l'heure d'aujourd'hui, des agonistes spécifiques de ce récepteur sont en cours d'évaluation clinique dans le traitement de pathologies associées à des désordres métaboliques.

Cependant, d'après les données de la littérature, le rôle du PPARβ dans la carcinogenèse et dans l'angiogenèse n'est pas encore élucidé. En effet, soit PPARβ a une action protumorale (Park *et al*., 2001 ; Glinghammar *et al*., 2003 ; Pedchenko *et al*., 2008), soit il a une action antitumorale (Marin *et al*., 2006 ; Fukumoto *et al.*, 2005, Bility *et al*., 2008).

De plus, PPARβ favoriserait l'angiogenèse ou n'interviendrait pas dans le processus angiogénique (Abdollahi *et al*., 2007 ; Muller-brusselbach *et al.*, 2007b). La surexpression du VEGF par l'activation de PPARβ a été montrée dans le cancer du côlon (wang *et al.*, 2006a ;

Rohrl *et al*., 2011), dans le cancer du sein et de la prostate (Stephen *et al*., 2004). D'ailleurs, dans un travail antérieur, notre équipe a montré, à partir de cellules dérivées de cancer de la vessie, que le VEGF est contrôlé par les récepteurs PPAR, en particulier l'isotype PPARβ (Fauconnet *et al.,* 2002). Par contre, à partir de cellules dérivées de cancer du côlon, HT29, HCT119 et LS174T, il a été montré que l'activation de PPARβ ne contrôlait aucunement l'expression du VEGF (Hollingshead *et al*., 2007a).

A notre connaissance, aucune étude dans la littérature n'a décrit d'effet du PPARβ sur l'expression du VEGF dans des cellules dérivées de cancer du col de l'utérus. Dans ce travail, et ce pour la première fois dans des lignées dérivées du cancer du col de l'utérus, nous montrons que le ligand L-165041, agoniste de PPARβ, régule l'expression de 3 isoformes du VEGF, le VEGF121, 165 et 189, uniquement dans la lignée HeLa, infectée par un HPV18. Ce ligand n'a aucun effet sur la régulation du VEGF dans les lignées C-33A (HPV-) et CaSki (HPV16+). Le cancer du col de l'utérus est la conséquence de la persistance d'une infection par un HPV à haut risque (zur Hausen, 1999). Dans ces cellules, l'oncoprotéine virale E6 contrôle la dégradation de p53 (Scheffner *et al.,* 1993) et cette protéine virale interfère aussi dans la régulation de l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF (Lopez-Ocero *et al*., 2000 ; Clere *et al.,* 2007). La protéine p53 a un rôle de gardien du génome mais pas seulement. En effet, cette protéine pourrait inhiber les fonctions des récepteurs nucléaires ER, AR et TR (Liu *et al.,* 1999 ; Shenk *et al.,* 2001 ; Bhat *et al.,* 1997). De plus, la protéine E6 d'HPV18 est un corégulateur transcriptionnel de certains récepteurs nucléaires, mais contrairement à p53, elle serait un co-activateur de leur activité transcriptionnelle (Wang *et al.,* 2003).

Nous nous sommes posés la question suivante : les protéines E6 et p53 peuvent-elles intervenir dans l'effet du ligand de PPARβ sur l'expression du VEGF ? Dans notre étude, nous montrons sans ambiguïté que la protéine E6 et que l'activité transcriptionnelle de p53 n'ont aucun rôle à jouer dans l'augmentation de l'expression du VEGF suite à la stimulation par l'agoniste de PPARβ.

Dans les différentes lignées dérivées de cancer du col de l'utérus que nous avons utilisées, nous avons montré que le récepteur PPARβ était présent et bien fonctionnel. Par contre, la régulation de l'expression du VEGF par le L-165041 n'est pas dépendante de la transactivation du récepteur PPARβ. En effet, l'absence de potentialisation de l'action du

ligand de PPARβ par un ligand de RXR, nous a permis de supposer que le complexe RXR/PPARβ n'intervenait pas sur la régulation du VEGF. De plus, en utilisant d'autres techniques (inhibiteur de l'activité transcriptionnelle du PPARβ, et invalidation de l'expression de PPARβ), nous avons montré que l'effet du L-165041 sur l'expression du VEGF ne fait pas intervenir le récepteur PPARβ, ce qui revient à dire que l'agoniste de PPARβ augmente l'expression du VEGF par un mécanisme autre que l'activation du récepteur PPARβ.

Quelques études ont montré que les ligands des récepteurs PPARα et γ agissent par un mécanisme indépendant de leur récepteur. Par exemple, un agoniste spécifique de PPARα induit l'expression de gènes dans des cellules qui, pourtant n'expriment pas le récepteur PPARα (Pauley *et al.*, 2002). La ciglitazone et la troglitazone, deux ligands spécifiques de PPARγ, inhibent la croissance cellulaire des cellules PPAR$\gamma^{+/+}$ et des cellules PPAR$\gamma^{-/-}$ (Palakurthi *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que dans ces cellules, les ligands ont une action biologique indépendante de la présence de leur récepteur. L'effet de ces ligands serait permis grâce à l'activation des voies de signalisation impliquant les protéines kinases ERK (extracellular signal regulated kinase), p38 MAPK, JNK (c-jun N-terminal kinase) et ERK-5 (Gardner *et al.*, 2005). Vraisemblablement, la phosphorylation des protéines kinases serait dûe à l'intervention de récepteurs membranaires tels que EGFR ou au calcium intracellulaire dont l'accumulation déclencherait l'activation de nombreuses protéines kinases. D'ailleurs, la ciglitazone et la troglitazone contrôlent le taux de calcium intracellulaire puisqu'elles permettent sa libération à partir du réticulum endoplasmique. L'augmentation de calcium dans le cytoplasme va initier un stress oxydatif qui va conduire à l'activation de protéines kinases dont la JNK ou la p38 MAPK (Palakurthi *et al.*, 2001).

Par contre, à notre connaissance, des effets du ligand de PPARβ indépendants du récepteur ont été peu décrits dans la littérature. Nous pouvons citer quelques exemples. Dans des cellules épithéliales dérivées de cancer du côlon, le GW501516, ligand de PPARβ, diminue significativement la prolifération de ces cellules alors que ces dernières ne possèdent pas de récepteur PPARβ (Matthiessen *et al.*, 2005). De plus, l'extinction de l'expression de PPARβ dans des kératinocytes n'empêche pas l'effet du L-165041, sur la régulation de l'expression du VEGF (Schiefelbein *et al.*, 2008). D'autres expériences seront nécessaires pour élucider le mécanisme moléculaire mis en jeu par le L-165041 pour contrôler l'expression du VEGF.

Cependant, nous pouvons, d'ores et déjà, affirmé que ce ligand n'utilise pas les récepteurs PPARα et γ puisque ces derniers ne sont pas fonctionnels dans les cellules HeLa.

Dans le promoteur humain du VEGF à la position -443 bp, une séquence PPRE a été identifiée (Peeters *et al.,* 2005). Pourtant, lors de nos expériences de transfection d'un plasmide contenant la totalité du promoteur du VEGF, aucun effet du L-165041 sur l'activation de ce promoteur n'a été observé, suggérant que l'effet du L-165041 n'intervient pas au niveau de la transcription du gène *vegf*. De plus, nous avons démontré qu'en présence de l'actinomycine D, le ligand stabilise les ARNm des différentes isoformes du VEGF. Un certain nombre de protéines ont été décrites comme intervenant dans la stabilisation des messagers du VEGF (Pages *et al*., 2000). D'ailleurs, dans notre modèle, nous avons montré que la voie de signalisation impliquant la p38 MAPK intervenait dans la stabilisation des ARNm du VEGF induite par le L-165041.

Selon les données de la littérature, les protéines RBP (RNA binding protein) stabilisent des ARNm présentant des séquences riches en A et U dans la région 3'UTR des gènes (Levy *et al.,* 1996). Parmi ces protéines, il y a les protéines HuR qui ont un rôle dans la stabilisation des ARNm (Levy *et al.,* 1998) et les protéines TTP (Tristetraproline) qui ont un rôle dans la dégradation des ARNm (Lai *et al.,* 1999).

Dans nos différentes lignées cellulaires, suite à une analyse par western-blotting, nous n'avons pas observé d'expression de TTP ; ce résultat peut s'expliquer par le fait que dans les cellules tumorales, l'expression de TTP est en règle générale inhibée (Sully *et al.,* 2004). Par contre, dans les cellules HeLa, nous avons montré que le L-165041 augmente l'accumulation cytoplasmique de HuR. De plus, l'inhibition de l'expression de HuR dans ces cellules est associée à une diminution significative de l'effet du L-165041 sur l'expression du VEGF. Ces résultats suggèrent que ce ligand augmente la stabilité des messagers du VEGF par l'intermédiaire de l'activation de HuR. Vraisemblablement, c'est dans le cytoplasme que HuR stabilise les messagers. C'est pourquoi, pour exercer son action, il lui est nécessaire de quitter le noyau pour rejoindre le cytoplasme. D'ailleurs, il a été montré que dans des cellules tumorales soumises à des conditions d'hypoxie, le taux de VEGF est fortement augmenté et qu'il est associé à une accumulation cytoplasmique de HuR. De plus, empêcher la translocation de HuR du noyau vers le cytoplasme, entraîne une diminution de l'expression du

VEGF (Sakuma *et al.,* 2008). L'implication de HuR dans la stabilisation des messagers du VEGF a été mise en évidence dans les cellules dérivées de glioblastomes, de cancer du rein et du sein, et dans des cellules endothéliales tumorales (Basu *et al,* 2010 ; Gubin *et al*., 2010 ; Ido *et al.,* 2008 ; Kurosu *et al.,* 2011). D'autre part, selon nos résultats, le traitement des cellules HeLa avec un inhibiteur de la phosphorylation de la p38 MAPK diminue l'effet du L-165041 sur l'expression du VEGF et cela est associé à une diminution du taux de HuR dans le cytoplasme et une accumulation de HuR dans le noyau. Ces résultats indiquent que, dans nos cellules, la forme phosphorylée de la p38 MAPK intervient dans le mouvement de HuR du noyau vers le cytoplasme permettant à cette protéine d'exercer son action stabilisatrice des ARNm VEGF. D'autres études ont décrit l'intervention de la voie de signalisation impliquant la p38 MAPK dans l'activité de HuR (Farooq *et al.,* 2009 ; Pages *et al.,* 2000). D'ailleurs, dans certains cas, c'est la phosphorylation de la MK2, cible de la p38 MAPK, qui interviendrait dans l'activation de HuR (Dean *et al*., 2004 ; Subbaramaiah *et al.,* 2003 ; Tran *et al*., 2003). Cette cascade de phosphorylation conduit à la phosphorylation de HuR, permettant son accumulation dans le cytoplasme, lieu où la protéine stabiliserait les ARNm cibles (Lafarga *et al*., 2009).

D'ailleurs, selon l'étude de Lafarga *et al*. (2009), l'ARNm p21 serait une cible de HuR cytoplasmique. Ainsi, la stabilisation de l'ARNm de p21 conduirait à l'accumulation de la protéine p21 et à un arrêt des cellules en phase G1. De manière intéressante, nous montrons aussi que l'agoniste de PPARβ (L-165041) provoque un arrêt des cellules HeLa en phase G0/G1 qui est associé à un taux élevé de p53 et de sa cible p21. Selon nos résultats, le L-165041 augmente le taux de la protéine p53, or nous savons que dans les cellules HeLa, l'expression de p53 est faible puisque l'oncoprotéine virale E6 conduit à la dégradation de p53. Cependant, l'accumulation de p53 dans les cellules n'est pas due à l'inhibition de l'expression de la protéine E6 puisque l'agoniste de PPARβ ne modifie pas le taux de E6. Nous pouvons supposer que le ligand *via* le promoteur, augmente la transcription de p53. A notre connaissance, un effet de l'agoniste de PPARβ sur la régulation de l'expression de p53 n'a pas encore été décrit dans la littérature. Par contre, si nous nous référons à ce qui a été décrit pour la rosiglitazone, ligand de PPARγ, cette thiazolidinedione (TZD) augmente *via* son récepteur, la transcription de p53 dans les cellules MCF-7, et de ce fait, celle de p21 (Bonofiglio *et al.,* 2006). Dans notre étude, nous montrons aussi que l'agoniste de PPARβ augmente l'expression de p53 par un mécanisme dépendant de la présence de son récepteur

puisque lorsque PPARβ n'est plus exprimé, l'effet du L-165041 sur la surexpression de p53 est inhibé.

Dans notre étude, à partir d'un modèle de cellules HeLa, dérivées de cancer du col de l'utérus, nous avons mis en évidence un effet dépendant (p53) et indépendant de PPARβ (VEGF).

Le VEGF est un facteur qui déclenche une cascade de signalisation *via* ses récepteurs localisés à la surface des cellules. Or, nous avons mis en évidence que les cellules HeLa expriment les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Ces résultats suggèrent que le VEGF pourrait, par une boucle autocrine, activer ses récepteurs et contrôler certains mécanismes biologiques des cellules HeLa. En règle générale, l'activation des récepteurs au VEGF augmente la prolifération, la survie, la migration des cellules endothéliales. De manière surprenante, dans notre modèle, le L-165041 augmente l'expression du VEGF et cet effet est associé à un arrêt de prolifération des cellules. D'après les données de la littérature, quelques articles sont en faveur d'un effet apoptotique du VEGF dans certaines cellules tumorales. De plus, il a été montré que dans un modèle animal dans lequel sont inoculées des cellules tumorales, inhiber l'expression du VEGF dans les cellules myéloïdes augmente la densité tumorale (Stockmann *et al.*, 2008).

Dans des cellules endothéliales, inhiber la cascade de signalisation initiée par le récepteur VEGFR activé par le VEGF, inhibe l'effet du TGF-β1 sur l'apoptose des cellules. En absence de TGF-β1, le VEGF, *via* son récepteur, active la voie de signalisation impliquant la p38 MAPK et permet la survie des cellules endothéliales alors qu'en présence de TGF-β1, le VEGF, *via* son récepteur, conduit à l'apoptose des cellules. Ces données suggèrent que le VEGF peut, selon l'environnement cellulaire, être un facteur apoptotique (Ferrari *et al.*, 2006). Le celecoxib, un inhibiteur de la COX, provoque l'apoptose des cellules ; pourtant, cela est associé à un taux de VEGF élevé (Du *et al.*, 2011). Dans des cellules dérivées de cancer du poumon, les thiazolidinediones, ligands de PPARγ, inhibent la prolifération de ces cellules pourtant ces molécules augmentent aussi l'expression du VEGF et de la neuropiline-1. Ces études suggèrent que le VEGF interviendrait dans l'arrêt de prolifération de ces cellules (Yoshizaki *et al.*, 2010). D'ailleurs, récemment, il a été montré que des cellules dérivées de cancer du sein subissant un stress oxydatif, associé à un taux de VEGF189 élevé vont mourir par apoptose. L'effet apoptotique du VEGF189 ne se révèlerait qu'en présence de la NRP-1 (Vintonenko *et al.*, 2011). Selon nos résultats, en présence de L-165041, un arrêt

des cellules HeLa en phase G0/G1 est observé et cet arrêt de prolifération est associé à une augmentation de la stabilisation des ARNm VEGF ; d'ailleurs, la ½ vie du transcrit VEGF189 est beaucoup plus augmentée que celle des autres isoformes.

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse selon laquelle le VEGF189 jouerait un rôle dans l'effet du L-165041 sur l'arrêt de prolifération des cellules HeLa. Cependant, un contexte de stress oxydant serait nécessaire pour que le VEGF induise un arrêt de cycle. Nous pouvons imaginer, que dans notre modèle, ce contexte de stress oxydant soit présent puisque nous avons montré que l'activation de p38 MAPK est nécessaire à l'effet du ligand sur le VEGF et qu'il a été décrit que dans les cellules souches embryonnaires de souris, le L-165041 augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène par le biais de la p38 MAPK (Jeong *et al.*, 2009).

Nous pouvons donc envisager que dans notre modèle de cellules HeLa, le L-165041 induise un stress cellulaire, qui permet la libération d'espères réactives de l'oxygène, qui vont activer plusieurs protéines kinases dont la p38 MAPK, conduisant à l'augmentation de l'expression du VEGF associée à un arrêt de prolifération cellulaire. Cet environnement de stress oxydant serait propice à la conversion de l'activité anti-apoptotique/proliférative du VEGF en une activité antiproliférative.

C'est pourquoi, dans la suite de ce travail, il sera intéressant de déterminer le rôle des différentes isoformes du VEGF sur la prolifération de nos lignées cellulaires, et de déterminer si les différents VEGF ont un rôle pro- ou antitumoral.

En règle générale, la progression tumorale est favorisée par la mise en place d'une angiogenèse tumorale mais aussi par l'acquisition du phénotype métastatique où les cellules vont subir le processus de TEM ou transition épithélio-mésenchymateuse. La TEM est un processus caractérisé par la perte d'expression ou de fonction de marqueurs épithéliaux (cadhérine E) en faveur de l'acquisition de marqueurs mésenchymateux (cadhérine N) (Cavallaro *et al*., 2002 ; Cavallaro et Christofori, 2004).

D'ailleurs, nous avons à notre disposition deux modèles de cellules dérivées de cancer de la vessie, de phénotype différent. En effet, d'après nos résultats, les cellules RT4, représentatives d'une tumeur de la vessie non agressive, expriment la cadhérine E et les

cellules T24, représentatives d'une tumeur de la vessie agressive à haut potentiel métastasique, expriment la cadhérine N. Ces résultats sont similaires à ceux qui ont été décrits dans d'autres études (Mialhe *et al.,* 2000 ; Lascombe *et al.,* 2006). Par contre, peu de choses sont connues quant à l'expression des cadhérines dans les cellules dérivées de cancer du col de l'utérus. Des études montrent que les lignées HT3, ME18, C41 et CaSki exprimeraient la cadhérine E et que cette protéine ne serait pas exprimée dans les lignées HeLa, SiHa et C-33A (Vessey *et al.,* 1995). En revanche, les cellules HeLa exprimeraient la cadhérine N (Prozialeck *et al.,* 2002). Nos résultats révèlent que les cellules CaSki (HPV16) expriment la cadhérine E et faiblement la cadhérine N, que les cellules HeLa (HPV18) expriment uniquement la cadhérine N et que les cellules C-33A (HPV-) n'expriment aucune de ces deux cadhérines.

Compte-tenu du rôle de la cadhérine N dans la progression tumorale, empêcher l'expression de cette protéine serait une stratégie thérapeutique intéressante afin d'inhiber le développement tumoral. D'ailleurs, un inhibiteur pharmacologique ciblant la cadhérine N a été développé par Adherex, l'ADH1. C'est un pentapeptide cyclique, qui a une forte spécificité pour la cadhérine N (Mariotti *et al*., 2007) et qui est actuellement en essai clinique (Beasley *et al.,* 2009) .

Précédemment, nous avons montré dans nos modèles de culture que les ligands de PPARβ contrôlaient l'expression du VEGF. Or, l'acquisition du potentiel angiogénique est associée à l'acquisition du potentiel métastatique. Nous nous sommes donc posés la question suivante : les ligands de PPARβ sont-ils capables de réguler l'expression des cadhérines ?

PPARβ intervient dans le processus de cicatrisation en régulant la prolifération et la migration des kératinocytes (Tan *et al.,* 2007). A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur le rôle que peut jouer PPARβ dans la régulation de l'expression des cadhérines dans un modèle de cellules tumorales. Néanmoins, nous avons à notre disposition certaines données sur le rôle de PPARγ dans la régulation des molécules d'adhérence. Dans des cellules HepG2, dérivées de cancer du foie, un traitement par les TZD (rosiglitazone et troglitazone), ligands de PPARγ, augmente l'expression de la cadhérine E, ce qui a pour conséquence de diminuer la mobilité des cellules (Lee *et al.,* 2009). De plus, dans des cellules NSCLC, dérivées de cancer du poumon, un traitement par la rosiglitazone diminue l'expression d'un répresseur transcriptionnel de la cadhérine E ; il s'en suivra, entre autres, une augmentation du taux de

cadhérine E (Choudhary *et al.,* 2010). De plus, les TZD semblent empêcher l'effet du TGF-β1 sur l'induction de la TEM. En effet, suite au traitement de cellules dérivées de cancer du poumon par les TZD, il y a ré-induction de la cadhérine E et les marqueurs mésenchymateux (vimentine, cadhérine N, fibronectine) ne sont plus exprimés (Reka *et al.,* 2010). Les TZD semblent agir sur l'expression des cadhérines selon deux mécanismes distincts. En effet, la régulation de l'expression de la cadhérine E serait dépendante du récepteur PPARγ alors que celle de la cadhérine N serait indépendante du récepteur (Tan *et al.,* 2010). Dans notre étude, le L-165041 ne modifie pas le taux des cadhérines E et N dans les cellules dérivées de cancer du col de l'utérus, mais a un effet dans les cellules dérivées de cancer de vessie. Dans les cellules RT4, le L-165041 augmente l'expression de la cadhérine E et dans les cellules T24, le L-165041 diminue l'expression de la cadhérine N. Cependant, inhiber l'activité transcriptionnelle de PPARβ par un antagoniste n'inhibe pas l'effet du L-165041 sur l'expression de la cadhérine N. Ces résultats suggèrent que l'effet du ligand serait indépendant de l'activité de son récepteur ; bien évidemment, d'autres expériences seront nécessaires pour confirmer ces résultats.

Par contre, nous avons montré que le ligand de PPARβ inhibe l'expression de la cadhérine N par l'intermédiaire d'une voie de signalisation impliquant Akt/mTOR. Cette voie de signalisation est souvent activée dans les cancers, notamment dans les carcinomes urothéliaux, et est généralement associée à une augmentation de l'agressivité de la tumeur (Hansel *et al.,* 2010), à une augmentation de la migration des cellules et à une diminution de l'expression de la cadhérine E (Wang *et al.,* 2011). Vraisemblablement, le L-165041 diminuerait le pouvoir de migration des cellules T24 puisqu'il diminue l'expression de la cadhérine N. Cependant, d'autres expériences devront être réalisées pour mieux comprendre le rôle du ligand de PPARβ sur la migration et l'invasion des cellules T24.

D'ores et déjà, nous avons montré que le ligand n'est pas toxique pour les cellules puisqu'il n'induit pas l'apoptose. Par contre, il provoque un arrêt des cellules T24 en phase G0/G1 avec une diminution du nombre de cellules en phase S. Apparemment, le L-165041 semble bloquer la prolifération des cellules T24, dérivées de cancer de vessie et celle des cellules HeLa, dérivées de cancer du col de l'utérus. En effet, le L-165041 arrête les cellules T24 et les cellules HeLa en G0/G1. Ces études particulièrement intéressantes, devront être reprises et développées afin d'élucider les différents mécanismes moléculaires mis en jeu, et

déterminer si l'effet du L-165014 est dépendant ou non de la présence ou de l'activité transcriptionnelle du PPARβ.

Comme dans le cas des cellules HeLa, dans les cellules RT4 et T24, le L-165041 augmente l'expression des isoformes 121, 165 et 189 du VEGF. Selon les données de la littérature, nous savons que le VEGF contrôle la migration cellulaire des cellules tumorales *via* ses récepteurs. Ces données suggèrent que dans notre modèle, le VEGF sécrété sous l'effet du L-165041, pourrait agir sur les cellules selon une boucle autocrine, à condition que les cellules expriment des récepteurs au VEGF à leur surface. En effet, nous avons montré que les cellules RT4 expriment les récepteurs VEGFR-2, alors que les cellules T24 expriment les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. De plus, nous avons montré que dans des cellules stimulées en présence de VEGF exogène, le taux des cadhérines E et N est modifié. En effet, dans les cellules RT4, exprimant normalement la cadhérine E, le traitement par du VEGF diminue l'expression de la cadhérine E. Dans les cellules T24, le traitement par du VEGF augmente l'expression de la cadhérine N. A notre connaissance, très peu d'études ont décrit un rôle du VEGF dans l'acquisition, par les cellules tumorales, du potentiel métastatique. Une étude a montré que, dans des cellules dérivées de cancer du pancréas, l'activation des récepteurs VEGFR-1 par le VEGF-A ou le VEGF-B conduit à des changements cellulaires caractéristiques de la TEM. Ces modifications de la morphologie cellulaire sont associées à une diminution du taux des marqueurs épithéliaux (cadhérine E et plakoglobine), et à une augmentation du taux de marqueurs mésenchymateux (cadhérine N et vimentine). De plus, les facteurs de transcription snail, twist et slug qui sont impliqués dans la TEM, voient leur taux augmenter (Yang *et al.*, 2006).

Vraisemblablement, le VEGF favorise la TEM puisque cela a été confirmé à partir d'un modèle *in vivo* de souris xénogreffées par des cellules dérivées de cancer de la prostate. En effet, dans les tumeurs, une augmentation de la prolifération cellulaire est observée et la présence des récepteurs au VEGF à la surface des cellules tumorales suggèrent un effet autocrine du VEGF. L'acquisition du phénotype invasif par les cellules est associée à une perte de l'expression de la cadhérine E et une augmentation du taux de la vimentine et de la cadhérine N (Gonzalez-Moreno *et al.*, 2010). De plus, l'augmentation de la concentration en VEGF est associée à l'activation de la voie de signalisation contrôlée par le TGF-β1 qui est un inducteur de TEM (Xu *et al.*, 2009). Dans notre étude, seul le taux des protéines est modifié

suite à la stimulation des cellules par le L-165041, ce qui suggère une régulation traductionnelle ou post-traductionnelle.

D'après nos résultats, dans les cellules dérivées du cancer de la vessie, le L-165041 et le VEGF exogène ont des effets contraires sur l'expression des cadhérines. De plus, lorsque ces deux molécules sont associées, c'est l'effet du VEGF exogène sur la régulation des cadhérines qui est observé. Pourtant, dans ces cellules, le L-165041 augmente l'expression des isoformes du VEGF. Ces résultats suggèrent d'une part, que le VEGF sécrété par les cellules n'aurait pas le même effet que le VEGF exogène, et d'autre part, que la concentration du VEGF sécrété est insuffisante pour activer les récepteurs au VEGF. Nous pouvons aussi imaginer que les cellules stimulées par le L-165041 sécrètent des isoformes du VEGF, ayant un rôle différent ou opposé à celui des VEGF121, 165 et 189. En effet, nous avons montré que dans les cellules T24, le L-165041 augmente l'expression de l'isoforme anti-angiogénique VEGF165b dans les mêmes proportions que le VEGF165. Or, cette isoforme est un inhibiteur de l'effet du VEGF165 (Bates *et al*., 2002). Il est possible que dans notre modèle, les autres isoformes VEGFxxxb soient également exprimées. C'est pourquoi, nous pouvons supposer que l'effet des isoformes VEGF121, 165 et 189 induites par le L-165041 est inhibé en présence des VEGFxxxb, que ces isoformes anti-angiogéniques bloquent les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2, empêchant l'effet des VEGF121, 165 et 189 sur l'expression des cadhérines.

Ces différents résultats posent de nombreuses questions quant au rôle du ligand de PPARβ sur l'expression de nos différents marqueurs de progression. En effet, d'autres expériences seront nécessaires pour déterminer, si le L-165041 agit par l'intermédiaire de son récepteur, quels sont les rôles des isoformes des VEGFxxx et VEGFxxxb sur la prolifération et la migration de nos cellules, et si PPARβ a un rôle pro- ou antitumoral dans nos modèles cellulaires. Nos résultats suggèrent que le L-165041 *via* PPARβ aurait un rôle antitumoral puisqu'il conduit les cellules en arrêt de cycle, bien qu'il permette d'augmenter le taux de VEGF. Vraisemblablement, ce VEGF n'aurait peut-être pas le rôle qu'on lui assigne habituellement.

Bibliographie

Aase K, Lymboussaki A, Kaipainen A, Olofsson B, Alitalo K, Eriksson U (1999). Localization of VEGF-B in the mouse embryo suggests a paracrine role of the growth factor in the developing vasculature. *Dev Dyn* **215:** 12-25.

Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, Lal A, Kim HH, Kuwano Y *et al* (2009). Ubiquitin-mediated proteolysis of HuR by heat shock. *EMBO J* **28:** 1271-1282.

Abdelmohsen K, Gorospe M (2010). Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1:** 214-229.

Abdollahi A, Schwager C, Kleeff J, Esposito I, Domhan S, Peschke P *et al* (2007). Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104:** 12890-12895.

Adamkiewicz J, Kaddatz K, Rieck M, Wilke B, Muller-Brusselbach S, Muller R (2007). Proteomic profile of mouse fibroblasts with a targeted disruption of the peroxisome proliferator activated receptor-beta/delta gene. *Proteomics* **7:** 1208-1216.

Akiri G, Nahari D, Finkelstein Y, Le SY, Elroy-Stein O, Levi BZ (1998). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene* **17:** 227-236.

Akiyama TE, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Peters JM, Brewer HB, Jr. *et al* (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta regulates very low density lipoprotein production and catabolism in mice on a Western diet. *J Biol Chem* **279:** 20874-20881.

Ali FY, Hall MG, Desvergne B, Warner TD, Mitchell JA (2009). PPARbeta/delta agonists modulate platelet function via a mechanism involving PPAR receptors and specific association/repression of PKCalpha--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29:** 1871-1873.

Allen E, Walters IB, Hanahan D (2011). Brivanib, a dual FGF/VEGF inhibitor, is active both first and second line against mouse pancreatic neuroendocrine tumors developing adaptive/evasive resistance to VEGF inhibition. *Clin Cancer Res* **17:** 5299-5310.

Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E (1995). Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* **1:** 1024-1028.

Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M *et al* (2002). Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* **16:** 1066-1076.

Anastasiadis PZ, Moon SY, Thoreson MA, Mariner DJ, Crawford HC, Zheng Y *et al* (2000). Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat Cell Biol* **2:** 637-644.

Anastasiadis PZ, Reynolds AB (2001). Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol* **13:** 604-610.

Anthony FW, Wheeler T, Elcock CL, Pickett M, Thomas EJ (1994). Short report: identification of a specific pattern of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human placenta and cultured placental fibroblasts. *Placenta* **15:** 557-561.

Antic D, Keene JD (1997). Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation, and posttranscriptional gene expression. *Am J Hum Genet* **61:** 273-278.

Asnaghi L, Vass WC, Quadri R, Day PM, Qian X, Braverman R *et al* (2010). E-cadherin negatively regulates neoplastic growth in non-small cell lung cancer: role of Rho GTPases. *Oncogene* **29:** 2760-2771.

Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP *et al* (1997). Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* **46:** 1319-1327.

Auerkari EI (2006). Methylation of tumor suppressor genes p16(INK4a), p27(Kip1) and E-cadherin in carcinogenesis. *Oral Oncol* **42:** 5-13.

Bailey T, Biddlestone L, Shepherd N, Barr H, Warner P, Jankowski J (1998). Altered cadherin and catenin complexes in the Barrett's esophagus-dysplasia-adenocarcinoma sequence: correlation with disease progression and dedifferentiation. *Am J Pathol* **152:** 135-144.

Baki L, Marambaud P, Efthimiopoulos S, Georgakopoulos A, Wen P, Cui W *et al* (2001). Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:** 2381-2386.

Banks RE, Porter WH, Whelan P, Smith PH, Selby PJ (1995). Soluble forms of the adhesion molecule E-cadherin in urine. *J Clin Pathol* **48:** 179-180.

Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM *et al* (2002). Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99:** 303-308.

Barger PM, Browning AC, Garner AN, Kelly DP (2001). p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha: a potential role in the cardiac metabolic stress response. *J Biol Chem* **276:** 44495-44501.

Barish GD, Narkar VA, Evans RM (2006). PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* **116:** 590-597.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* **87:** 3336-3343.

Baselga J (2002). Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist* **7 Suppl 4:** 2-8.

Basu A, Datta D, Zurakowski D, Pal S (2010). Altered VEGF mRNA stability following treatments with immunosuppressive agents: implications for cancer development. *J Biol Chem* **285:** 25196-25202.

Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD *et al* (2002). VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* **62:** 4123-4131.

Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J *et al* (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* **2:** 84-89.

Bazan-Socha S, Bukiej A, Marcinkiewicz C, Musial J (2005). Integrins in pulmonary inflammatory diseases. *Curr Pharm Des* **11:** 893-901.

Beasley GM, McMahon N, Sanders G, Augustine CK, Selim MA, Peterson B *et al* (2009). A phase 1 study of systemic ADH-1 in combination with melphalan via isolated limb infusion in patients with locally advanced in-transit malignant melanoma. *Cancer* **115:** 4766-4774.

Becker PM, Waltenberger J, Yachechko R, Mirzapoiazova T, Sham JS, Lee CG *et al* (2005). Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor-mediated endothelial permeability. *Circ Res* **96:** 1257-1265.

Bedu E, Wahli W, Desvergne B (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta as a therapeutic target for metabolic diseases. *Expert Opin Ther Targets* **9:** 861-873.

Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel MM *et al* (1993). Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol* **120:** 757-766.

Bello E, Colella G, Scarlato V, Oliva P, Berndt A, Valbusa G *et al* (2011). E-3810 is a potent dual inhibitor of VEGFR and FGFR that exerts antitumor activity in multiple preclinical models. *Cancer Res* **71:** 1396-1405.

Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD *et al* (2000). CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* **68:** 1-8.

Benckert C, Jonas S, Cramer T, Von Marschall Z, Schafer G, Peters M *et al* (2003). Transforming growth factor beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer Res* **63:** 1083-1092.

Berger J, Leibowitz MD, Doebber TW, Elbrecht A, Zhang B, Zhou G *et al* (1999). Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *J Biol Chem* **274:** 6718-6725.

Bergers G, Benjamin LE (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **3:** 401-410.

Bernardini S, Fauconnet S, Chabannes E, Henry PC, Adessi G, Bittard H (2001). Serum levels of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor in bladder cancer. *J Urol* **166:** 1275-1279.

Berx G, Becker KF, Hofler H, van Roy F (1998). Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat* **12:** 226-237.

Bhat MK, Yu C, Yap N, Zhan Q, Hayashi Y, Seth P *et al* (1997). Tumor suppressor p53 is a negative regulator in thyroid hormone receptor signaling pathways. *J Biol Chem* **272:** 28989-28993.

Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125:** 1111-1124.

Bility MT, Devlin-Durante MK, Blazanin N, Glick AB, Ward JM, Kang BH *et al* (2008). Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPAR beta/delta) inhibits chemically induced skin tumorigenesis. *Carcinogenesis* **29:** 2406-2414.

Billin AN (2008). PPAR-beta/delta agonists for Type 2 diabetes and dyslipidemia: an adopted orphan still looking for a home. *Expert Opin Investig Drugs* **17:** 1465-1471.

Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes. *J Biol Chem* **277:** 37254-37259.

Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85:** 267-273.

Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS (1997). Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* **390:** 404-407.

Bohman S, Matsumoto T, Suh K, Dimberg A, Jakobsson L, Yuspa S *et al* (2005). Proteomic analysis of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell differentiation reveals a role for chloride intracellular channel 4 (CLIC4) in tubular morphogenesis. *J Biol Chem* **280:** 42397-42404.

Bonofiglio D, Aquila S, Catalano S, Gabriele S, Belmonte M, Middea E *et al* (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activates p53 gene promoter binding to the nuclear factor-kappaB sequence in human MCF7 breast cancer cells. *Mol Endocrinol* **20:** 3083-3092.

Borland MG, Foreman JE, Girroir EE, Zolfaghari R, Sharma AK, Amin S *et al* (2008). Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta inhibits cell proliferation in human HaCaT keratinocytes. *Mol Pharmacol* **74:** 1429-1442.

Bornes S, Boulard M, Hieblot C, Zanibellato C, Iacovoni JS, Prats H *et al* (2004). Control of the vascular endothelial growth factor internal ribosome entry site (IRES) activity and translation initiation by alternatively spliced coding sequences. *J Biol Chem* **279:** 18717-18726.

Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* **137:** 354-366.

Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W (2006). Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* **16:** 51-59.

Brennan SE, Kuwano Y, Alkharouf N, Blackshear PJ, Gorospe M, Wilson GM (2009). The mRNA-destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis. *Cancer Res* **69:** 5168-5176.

Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE, Karthaus HF, Debruyne FM, Schalken JA (1993). Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res* **53:** 3241-3245.

Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF *et al* (1993). Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* **143:** 1255-1262.

Bryan RT, Tselepis C (2010). Cadherin switching and bladder cancer. *J Urol* **184:** 423-431.

Burdick AD, Bility MT, Girroir EE, Billin AN, Willson TM, Gonzalez FJ *et al* (2007). Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta(PPARbeta/delta) inhibits cell growth of human N/TERT-1 keratinocytes. *Cell Signal* **19:** 1163-1171.

Burns KA, Vanden Heuvel JP (2007). Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1771:** 952-960.

Butz S, Kemler R (1994). Distinct cadherin-catenin complexes in Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion. *FEBS Lett* **355:** 195-200.

Byun JH, Park BW, Kim JR, Lee JH (2007). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors after mandibular distraction osteogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg* **36:** 338-344.

Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG *et al* (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* **2:** 76-83.

Carico E, Atlante M, Bucci B, Nofroni I, Vecchione A (2001). E-cadherin and alpha-catenin expression during tumor progression of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* **80:** 156-161.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M *et al* (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380:** 435-439.

Carmeliet P (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6:** 389-395.

Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernolle V, De Mol M *et al* (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* **7:** 575-583.

Cavallaro U, Schaffhauser B, Christofori G (2002). Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett* **176:** 123-128.

Cavallaro U, Christofori G (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* **4:** 118-132.

Cebe-Suarez S, Zehnder-Fjallman A, Ballmer-Hofer K (2006). The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci* **63:** 601-615.

Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL (2000). Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97:** 14608-14613.

Charrasse S, Meriane M, Comunale F, Blangy A, Gauthier-Rouviere C (2002). N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts. *J Cell Biol* **158:** 953-965.

Chen CL, Liu SS, Ip SM, Wong LC, Ng TY, Ngan HY (2003). E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. *Eur J Cancer* **39:** 517-523.

Chen CY, Shyu AB (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* **20:** 465-470.

Chen WC, Obrink B (1991). Cell-cell contacts mediated by E-cadherin (uvomorulin) restrict invasive behavior of L-cells. *J Cell Biol* **114:** 319-327.

Cherradi N, Lejczak C, Desroches-Castan A, Feige JJ (2006). Antagonistic functions of tetradecanoyl phorbol acetate-inducible-sequence 11b and HuR in the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid stability by adrenocorticotropin. *Mol Endocrinol* **20:** 916-930.

Chinn AM, Ciais D, Bailly S, Chambaz E, LaMarre J, Feige JJ (2002). Identification of two novel ACTH-responsive genes encoding manganese-dependent superoxide dismutase (SOD2) and the zinc finger protein TIS11b [tetradecanoyl phorbol acetate (TPA)-inducible sequence 11b]. *Mol Endocrinol* **16:** 1417-1427.

Cho NP, Han HS, Soh Y, Son HJ (2007). Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with cytoplasmic HuR expression in salivary mucoepidermoid carcinoma but not in pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med* **36:** 297-303.

Chopra B, Hinley J, Oleksiewicz MB, Southgate J (2008). Trans-species comparison of PPAR and RXR expression by rat and human urothelial tissues. *Toxicol Pathol* **36:** 485-495.

Chopra B, Georgopoulos NT, Nicholl A, Hinley J, Oleksiewicz MB, Southgate J (2009). Structurally diverse peroxisome proliferator-activated receptor agonists induce apoptosis in human uro-epithelial cells by a receptor-independent mechanism involving store-operated calcium channels. *Cell Prolif* **42:** 688-700.

Choudhary R, Li H, Winn RA, Sorenson AL, Weiser-Evans MC, Nemenoff RA (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits transformed growth of non-small cell lung cancer cells through selective suppression of Snail. *Neoplasia* **12:** 224-234.

Christofori G, Semb H (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* **24:** 73-76.

Ciais D, Cherradi N, Bailly S, Grenier E, Berra E, Pouyssegur J *et al* (2004). Destabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the zinc-finger protein TIS11b. *Oncogene* **23:** 8673-8680.

Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, Anand-Apte B, Soker S, Zetter B *et al* (1998). Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:** 5579-5583.

Claffey KP, Senger DR, Spiegelman BM (1995). Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. *Biochim Biophys Acta* **1246:** 1-9.

Claffey KP, Shih SC, Mullen A, Dziennis S, Cusick JL, Abrams KR *et al* (1998). Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. *Mol Biol Cell* **9:** 469-481.

Clairotte A, Lascombe I, Fauconnet S, Mauny F, Felix S, Algros MP *et al* (2006). Expression of E-cadherin and alpha-, beta-, gamma-catenins in patients with bladder cancer: identification of gamma-catenin as a new prognostic marker of neoplastic progression in T1 superficial urothelial tumors. *Am J Clin Pathol* **125:** 119-126.

Clement SL, Scheckel C, Stoecklin G, Lykke-Andersen J (2011). Phosphorylation of tristetraprolin by MK2 impairs AU-rich element mRNA decay by preventing deadenylase recruitment. *Mol Cell Biol* **31:** 256-266.

Clere N, Bermont L, Fauconnet S, Lascombe I, Saunier M, Vettoretti L *et al* (2007). The human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces Vascular Endothelial Growth Factor 121 (VEGF121) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism. *Exp Cell Res* **313:** 3239-3250.

Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ (1996). Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **271:** 736-741.

Coll T, Rodriguez-Calvo R, Barroso E, Serrano L, Eyre E, Palomer X *et al* (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: a new potential therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome. *Curr Mol Pharmacol* **2:** 46-55.

Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E *et al* (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* **7:** 1267-1278.

Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A (2002). The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* **109:** 987-991.

Costantino CL, Witkiewicz AK, Kuwano Y, Cozzitorto JA, Kennedy EP, Dasgupta A *et al* (2009). The role of HuR in gemcitabine efficacy in pancreatic cancer: HuR Up-regulates the expression of the gemcitabine metabolizing enzyme deoxycytidine kinase. *Cancer Res* **69:** 4567-4572.

Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P *et al* (1999). The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* **18:** 2883-2891.

Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* **28:** 488-494.

Daniel JM, Reynolds AB (1999). The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol* **19:** 3614-3623.

Darland DC, D'Amore PA (2001). TGF beta is required for the formation of capillary-like structures in three-dimensional cocultures of 10T1/2 and endothelial cells. *Angiogenesis* **4:** 11-20.

Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* **163:** 525-534.

Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V *et al* (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87:** 1161-1169.

de Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JP (1998). Expression of growth factors, growth inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. I: An inventory in search of autocrine and paracrine loops. *J Pathol* **184:** 44-52.

de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT (1992). The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255:** 989-991.

Dean JL, Sully G, Clark AR, Saklatvala J (2004). The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal* **16:** 1113-1121.

Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ *et al* (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* **274:** 32048-32054.

Denkert C, Koch I, von Keyserlingk N, Noske A, Niesporek S, Dietel M *et al* (2006). Expression of the ELAV-like protein HuR in human colon cancer: association with tumor stage and cyclooxygenase-2. *Mod Pathol* **19:** 1261-1269.

Deroanne CF, Hajitou A, Calberg-Bacq CM, Nusgens BV, Lapiere CM (1997). Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* **57:** 5590-5597.

Derycke L, Morbidelli L, Ziche M, De Wever O, Bracke M, Van Aken E (2006). Soluble N-cadherin fragment promotes angiogenesis. *Clin Exp Metastasis* **23:** 187-201.

Desvergne B, Wahli W (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* **20:** 649-688.

Di-Poi N, Tan NS, Michalik L, Wahli W, Desvergne B (2002). Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Mol Cell* **10:** 721-733.

Dikov MM, Ohm JE, Ray N, Tchekneva EE, Burlison J, Moghanaki D *et al* (2005). Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J Immunol* **174:** 215-222.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399:** 601-605.

DiRenzo J, Soderstrom M, Kurokawa R, Ogliastro MH, Ricote M, Ingrey S *et al* (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol Cell Biol* **17:** 2166-2176.

Doller A, Huwiler A, Muller R, Radeke HH, Pfeilschifter J, Eberhardt W (2007). Protein kinase C alpha-dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2. *Mol Biol Cell* **18:** 2137-2148.

Dressel U, Allen TL, Pippal JB, Rohde PR, Lau P, Muscat GE (2003). The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol* **17:** 2477-2493.

Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W (1992). Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* **68:** 879-887.

Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W (1993). Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol Cell* **77:** 67-76.

Du H, Li W, Wang Y, Chen S, Zhang Y (2011). Celecoxib induces cell apoptosis coupled with up-regulation of the expression of VEGF by a mechanism involving ER stress in human colorectal cancer cells. *Oncol Rep* **26:** 495-502.

Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K *et al* (1998). Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* **282:** 946-949.

Easwaran V, Lee SH, Inge L, Guo L, Goldbeck C, Garrett E *et al* (2003). beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res* **63:** 3145-3153.

Eberhardt W, Doller A, Akool el S, Pfeilschifter J (2007). Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther* **114:** 56-73.

Ebos JM, Bocci G, Man S, Thorpe PE, Hicklin DJ, Zhou D *et al* (2004). A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res* **2:** 315-326.

Ehrenborg E, Krook A (2009). Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Pharmacol Rev* **61:** 373-393.

Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* **4:** 915-924.

Eliceiri BP, Cheresh DA (2001). Adhesion events in angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **13:** 563-568.

Erkinheimo TL, Lassus H, Sivula A, Sengupta S, Furneaux H, Hla T *et al* (2003). Cytoplasmic HuR expression correlates with poor outcome and with cyclooxygenase 2 expression in serous ovarian carcinoma. *Cancer Res* **63:** 7591-7594.

Escher P, Wahli W (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res* **448:** 121-138.

Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C *et al* (2007). Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* **370:** 2103-2111.

Essafi-Benkhadir K, Onesto C, Stebe E, Moroni C, Pages G (2007). Tristetraprolin inhibits Ras-dependent tumor vascularization by inducing vascular endothelial growth factor mRNA degradation. *Mol Biol Cell* **18:** 4648-4658.

Eto M, Naito S (2006). Molecular targeting therapy for renal cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* **11:** 209-213.

Evans RM (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240:** 889-895.

Fakhari M, Pullirsch D, Abraham D, Paya K, Hofbauer R, Holzfeind P *et al* (2002). Selective upregulation of vascular endothelial growth factor receptors neuropilin-1 and -2 in human neuroblastoma. *Cancer* **94:** 258-263.

Fan F, Wey JS, McCarty MF, Belcheva A, Liu W, Bauer TW *et al* (2005). Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene* **24:** 2647-2653.

Fan XC, Steitz JA (1998). HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:** 15293-15298.

Farooq F, Balabanian S, Liu X, Holcik M, MacKenzie A (2009). p38 Mitogen-activated protein kinase stabilizes SMN mRNA through RNA binding protein HuR. *Hum Mol Genet* **18:** 4035-4045.

Fauconnet S, Lascombe I, Chabannes E, Adessi GL, Desvergne B, Wahli W *et al* (2002). Differential regulation of vascular endothelial growth factor expression by peroxisome proliferator-activated receptors in bladder cancer cells. *J Biol Chem* **277:** 23534-23543.

Fauconnet S, Bernardini S, Lascombe I, Boiteux G, Clairotte A, Monnien F *et al* (2009). Expression analysis of VEGF-A and VEGF-B: relationship with clinicopathological parameters in bladder cancer. *Oncol Rep* **21:** 1495-1504.

Feige JN, Gelman L, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B (2005). Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J Biol Chem* **280:** 17880-17890.

Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W (2006). From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res* **45:** 120-159.

Ferrara N, Henzel WJ (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **161:** 851-858.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS *et al* (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380:** 439-442.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9:** 669-676.

Ferrari G, Pintucci G, Seghezzi G, Hyman K, Galloway AC, Mignatti P (2006). VEGF, a prosurvival factor, acts in concert with TGF-beta1 to induce endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103:** 17260-17265.

Ferre P (2004). The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* **53 Suppl 1:** S43-50.

Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* **133:** 275-288.

Folkman J (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1:** 27-31.

Folkman J (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* **29:** 15-18.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376:** 66-70.

Ford LP, Watson J, Keene JD, Wilusz J (1999). ELAV proteins stabilize deadenylated intermediates in a novel in vitro mRNA deadenylation/degradation system. *Genes Dev* **13:** 188-201.

Foreman JE, Sharma AK, Amin S, Gonzalez FJ, Peters JM (2010). Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) inhibits cell growth in a mouse mammary gland cancer cell line. *Cancer Lett* **288:** 219-225.

Forman BM, Chen J, Evans RM (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94:** 4312-4317.

Frater-Schroder M, Risau W, Hallmann R, Gautschi P, Bohlen P (1987). Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84:** 5277-5281.

Frisch SM (1997). The epithelial cell default-phenotype hypothesis and its implications for cancer. *Bioessays* **19:** 705-709.

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A *et al* (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* **113:** 173-185.

Fukumoto K, Yano Y, Virgona N, Hagiwara H, Sato H, Senba H *et al* (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor delta as a molecular target to regulate lung cancer cell growth. *FEBS Lett* **579:** 3829-3836.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K *et al* (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399:** 597-601.

Fyffe SA, Alphey MS, Buetow L, Smith TK, Ferguson MA, Sorensen MD *et al* (2006). Recombinant human PPAR-beta/delta ligand-binding domain is locked in an activated conformation by endogenous fatty acids. *J Mol Biol* **356:** 1005-1013.

Garcia del Muro X, Torregrosa A, Munoz J, Castellsague X, Condom E, Vigues F *et al* (2000). Prognostic value of the expression of E-cadherin and beta-catenin in bladder cancer. *Eur J Cancer* **36:** 357-362.

Gardner OS, Dewar BJ, Graves LM (2005). Activation of mitogen-activated protein kinases by peroxisome proliferator-activated receptor ligands: an example of nongenomic signaling. *Mol Pharmacol* **68:** 933-941.

Gasent JM, Grande E, Casinello J, Provencia M, Laforga JB, Alberola V (2011). [Experience with sunitinib in hormone-resistant metastatic prostate cancer that is unresponsive to docetaxel]. *Actas Urol Esp* **35:** 57-60.

Geiger TR, Peeper DS (2009). Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1796:** 293-308.

Genini D, Catapano CV (2007). Block of nuclear receptor ubiquitination. A mechanism of ligand-dependent control of peroxisome proliferator-activated receptor delta activity. *J Biol Chem* **282:** 11776-11785.

George-Weinstein M, Gerhart J, Blitz J, Simak E, Knudsen KA (1997). N-cadherin promotes the commitment and differentiation of skeletal muscle precursor cells. *Dev Biol* **185:** 14-24.

Gerber HP, Dixit V, Ferrara N (1998). Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **273:** 13313-13316.

Gerhardt H, Liebner S, Redies C, Wolburg H (1999). N-cadherin expression in endothelial cells during early angiogenesis in the eye and brain of the chicken: relation to blood-retina and blood-brain barrier development. *Eur J Neurosci* **11:** 1191-1201.

Gervois P, Vu-Dac N, Kleemann R, Kockx M, Dubois G, Laine B *et al* (2001). Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem* **276:** 33471-33477.

Ghosh M, Ai Y, Narko K, Wang Z, Peters JM, Hla T (2009). PPARdelta is pro-tumorigenic in a mouse model of COX-2-induced mammary cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **88:** 97-100.

Gilles C, Polette M, Mestdagt M, Nawrocki-Raby B, Ruggeri P, Birembaut P *et al* (2003). Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res* **63:** 2658-2664.

Girroir EE, Hollingshead HE, Billin AN, Willson TM, Robertson GP, Sharma AK *et al* (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) ligands inhibit growth of UACC903 and MCF7 human cancer cell lines. *Toxicology* **243:** 236-243.

Glinghammar B, Skogsberg J, Hamsten A, Ehrenborg E (2003). PPARdelta activation induces COX-2 gene expression and cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **308:** 361-368.

Goldberg-Cohen I, Furneauxb H, Levy AP (2002). A 40-bp RNA element that mediates stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by HuR. *J Biol Chem* **277:** 13635-13640.

Gonzalez-Moreno O, Lecanda J, Green JE, Segura V, Catena R, Serrano D *et al* (2010). VEGF elicits epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate intraepithelial neoplasia (PIN)-like cells via an autocrine loop. *Exp Cell Res* **316:** 554-567.

Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J (1989). Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86:** 7311-7315.

Gradl D, Kuhl M, Wedlich D (1999). The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. *Mol Cell Biol* **19:** 5576-5587.

Gray JP, Burns KA, Leas TL, Perdew GH, Vanden Heuvel JP (2005). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by protein kinase C. *Biochemistry* **44:** 10313-10321.

Griffiths TR, Brotherick I, Bishop RI, White MD, McKenna DM, Horne CH *et al* (1996). Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence. *Br J Cancer* **74:** 579-584.

Grosskreutz CL, Anand-Apte B, Duplaa C, Quinn TP, Terman BI, Zetter B *et al* (1999). Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc Res* **58:** 128-136.

Guan Y, Zhang Y, Davis L, Breyer MD (1997). Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in urinary tract of rabbits and humans. *Am J Physiol* **273:** F1013-1022.

Guan Y (2002). Targeting peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in kidney and urologic disease. *Minerva Urol Nefrol* **54:** 65-79.

Gubin MM, Calaluce R, Davis JW, Magee JD, Strouse CS, Shaw DP *et al* (2010). Overexpression of the RNA binding protein HuR impairs tumor growth in triple negative breast cancer associated with deficient angiogenesis. *Cell Cycle* **9:** 3337-3346.

Gupta RA, Tan J, Krause WF, Geraci MW, Willson TM, Dey SK *et al* (2000). Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97:** 13275-13280.

Gupta RA, Wang D, Katkuri S, Wang H, Dey SK, DuBois RN (2004). Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-delta accelerates intestinal adenoma growth. *Nat Med* **10:** 245-247.

Haggstrom S, Lissbrant IF, Bergh A, Damber JE (1999). Testosterone induces vascular endothelial growth factor synthesis in the ventral prostate in castrated rats. *J Urol* **161:** 1620-1625.

Hajra KM, Chen DY, Fearon ER (2002). The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* **62:** 1613-1618.

Han JK, Lee HS, Yang HM, Hur J, Jun SI, Kim JY *et al* (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor-delta agonist enhances vasculogenesis by regulating endothelial progenitor cells through genomic and nongenomic activations of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Circulation* **118:** 1021-1033.

Han S, Ritzenthaler JD, Sun X, Zheng Y, Roman J (2009). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta induces lung cancer growth via peroxisome proliferator-activated receptor coactivator gamma-1alpha. *Am J Respir Cell Mol Biol* **40:** 325-331.

Hansel DE, Platt E, Orloff M, Harwalker J, Sethu S, Hicks JL *et al* (2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates cellular proliferation and tumor growth in urothelial carcinoma. *Am J Pathol* **176:** 3062-3072.

Hansen JB, Zhang H, Rasmussen TH, Petersen RK, Flindt EN, Kristiansen K (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. *J Biol Chem* **276:** 3175-3182.

Harman FS, Nicol CJ, Marin HE, Ward JM, Gonzalez FJ, Peters JM (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis. *Nat Med* **10:** 481-483.

Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B *et al* (2002). Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* **8:** 841-849.

Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM (2000). Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem* **275:** 18527-18533.

Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* **148:** 779-790.

He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW (1999). PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* **99:** 335-345.

He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* **131:** 1663-1677.

Heinonen M, Bono P, Narko K, Chang SH, Lundin J, Joensuu H *et al* (2005). Cytoplasmic HuR expression is a prognostic factor in invasive ductal breast carcinoma. *Cancer Res* **65:** 2157-2161.

Hellemans K, Michalik L, Dittie A, Knorr A, Rombouts K, De Jong J *et al* (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-beta signaling contributes to enhanced proliferation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **124:** 184-201.

Herbst RS, Johnson DH, Mininberg E, Carbone DP, Henderson T, Kim ES *et al* (2005). Phase I/II trial evaluating the anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody bevacizumab in combination with the HER-1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **23:** 2544-2555.

Hermiston ML, Gordon JI (1995). In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* **129:** 489-506.

Herr HW (1997). Tumour progression and survival in patients with T1G3 bladder tumours: 15-year outcome. *Br J Urol* **80:** 762-765.

Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:** 9349-9354.

Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D *et al* (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284:** 1994-1998.

Hollingshead HE, Killins RL, Borland MG, Girroir EE, Billin AN, Willson TM *et al* (2007a). Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) ligands do not potentiate growth of human cancer cell lines. *Carcinogenesis* **28:** 2641-2649.

Hollingshead HE, Morimura K, Adachi M, Kennett MJ, Billin AN, Willson TM *et al* (2007b). PPARbeta/delta protects against experimental colitis through a ligand-independent mechanism. *Dig Dis Sci* **52:** 2912-2919.

Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ (2007). Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* **19:** 2003-2012.

Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C, Hagerkvist R, Rahimi N, Matsumoto T *et al* (2004). The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem* **279:** 22267-22275.

Homsi J, Daud AI (2007). Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. *Cancer Control* **14:** 285-294.

Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R (1994). Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* **127:** 1375-1380.

Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* **267:** 26031-26037.

Huang K, Andersson C, Roomans GM, Ito N, Claesson-Welsh L (2001). Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int J Biochem Cell Biol* **33:** 315-324.

Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Lin MT, Kuo ML *et al* (2004). Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci* **11:** 517-527.

Huber O, Kemler R, Langosch D (1999). Mutations affecting transmembrane segment interactions impair adhesiveness of E-cadherin. *J Cell Sci* **112 (Pt 23):** 4415-4423.

Huez I, Creancier L, Audigier S, Gensac MC, Prats AC, Prats H (1998). Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol Cell Biol* **18:** 6178-6190.

Huez I, Bornes S, Bresson D, Creancier L, Prats H (2001). New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. *Mol Endocrinol* **15:** 2197-2210.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W *et al* (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **350:** 2335-2342.

Hyder SM, Nawaz Z, Chiappetta C, Stancel GM (2000). Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* **60:** 3183-3190.

Ido K, Nakagawa T, Sakuma T, Takeuchi H, Sato K, Kubota T (2008). Expression of vascular endothelial growth factor-A and mRNA stability factor HuR in human astrocytic tumors. *Neuropathology* **28:** 604-611.

IJpenberg, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B (1997). Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* **272:** 20108-20117.

IJpenberg, Tan NS, Gelman L, Kersten S, Seydoux J, Xu J *et al* (2004). In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J* **23:** 2083-2091.

Imamura Y, Itoh M, Maeno Y, Tsukita S, Nagafuchi A (1999). Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. *J Cell Biol* **144:** 1311-1322.

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

Izquierdo JM (2008). Hu antigen R (HuR) functions as an alternative pre-mRNA splicing regulator of Fas apoptosis-promoting receptor on exon definition. *J Biol Chem* **283:** 19077-19084.

Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS (2008). Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* **27:** 6920-6929.

Jeong AY, Lee MY, Lee SH, Park JH, Han HJ (2009). PPARdelta agonist-mediated ROS stimulates mouse embryonic stem cell proliferation through cooperation of p38 MAPK and Wnt/beta-catenin. *Cell Cycle* **8:** 611-619.

Jonas BA, Privalsky ML (2004). SMRT and N-CoR corepressors are regulated by distinct kinase signaling pathways. *J Biol Chem* **279:** 54676-54686.

Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E *et al* (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **15:** 290-298.

Juge-Aubry C, Pernin A, Favez T, Burger AG, Wahli W, Meier CA *et al* (1997). DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem* **272:** 25252-25259.

Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D *et al* (1995). Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92:** 3566-3570.

Kanno S, Oda N, Abe M, Terai Y, Ito M, Shitara K *et al* (2000). Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene* **19:** 2138-2146.

Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C *et al* (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438:** 820-827.

Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV *et al* (2004). Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* **5:** 74-80.

Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y (1995). Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* **55:** 5687-5692.

Kawaguchi M, Akagi M, Gray MJ, Liu W, Fan F, Ellis LM (2004). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human gastric cancer cells by interleukin-1beta. *Surgery* **136:** 686-692.

Kawai H, Li H, Chun P, Avraham S, Avraham HK (2002). Direct interaction between BRCA1 and the estrogen receptor regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) transcription and secretion in breast cancer cells. *Oncogene* **21:** 7730-7739.

Kawakami T, Tokunaga T, Hatanaka H, Kijima H, Yamazaki H, Abe Y *et al* (2002). Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* **95:** 2196-2201.

Kendall RL, Thomas KA (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90:** 10705-10709.

Kendall RL, Wang G, Thomas KA (1996). Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* **226:** 324-328.

Kersten S, Desvergne B, Wahli W (2000). Roles of PPARs in health and disease. *Nature* **405:** 421-424.

Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R *et al* (1996). The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* **271:** 7788-7795.

Kim DJ, Akiyama TE, Harman FS, Burns AM, Shan W, Ward JM *et al* (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor beta (delta)-dependent regulation of ubiquitin C expression contributes to attenuation of skin carcinogenesis. *J Biol Chem* **279:** 23719-23727.

Kim DJ, Bility MT, Billin AN, Willson TM, Gonzalez FJ, Peters JM (2006). PPARbeta/delta selectively induces differentiation and inhibits cell proliferation. *Cell Death Differ* **13:** 53-60.

Kim KB, Chesney J, Robinson D, Gardner H, Shi MM, Kirkwood JM (2011). Phase I/II and Pharmacodynamic Study of Dovitinib (TKI258), an Inhibitor of Fibroblast Growth Factor Receptors and VEGF Receptors, in Patients with Advanced Melanoma. *Clin Cancer Res*.

Kino T, Rice KC, Chrousos GP (2007). The PPARdelta agonist GW501516 suppresses interleukin-6-mediated hepatocyte acute phase reaction via STAT3 inhibition. *Eur J Clin Invest* **37:** 425-433.

Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM (1992). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358:** 771-774.

Kondo K, Hiratsuka S, Subbalakshmi E, Matsushime H, Shibuya M (1998). Genomic organization of the flt-1 gene encoding for vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 suggests an intimate evolutionary relationship between the 7-Ig and the 5-Ig tyrosine kinase receptors. *Gene* **208:** 297-305.

Kramer DK, Al-Khalili L, Perrini S, Skogsberg J, Wretenberg P, Kannisto K *et al* (2005). Direct activation of glucose transport in primary human myotubes after activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Diabetes* **54:** 1157-1163.

Kranz A, Mattfeldt T, Waltenberger J (1999). Molecular mediators of tumor angiogenesis: enhanced expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer. *Int J Cancer* **84:** 293-298.

Krejsgaard T, Vetter-Kauczok CS, Woetmann A, Lovato P, Labuda T, Eriksen KW *et al* (2006). Jak3- and JNK-dependent vascular endothelial growth factor expression in cutaneous T-cell lymphoma. *Leukemia* **20:** 1759-1766.

Krey G, Braissant O, L'Horset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG *et al* (1997). Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* **11:** 779-791.

Krogsdam AM, Nielsen CA, Neve S, Holst D, Helledie T, Thomsen B *et al* (2002). Nuclear receptor corepressor-dependent repression of peroxisome-proliferator-activated receptor delta-mediated transactivation. *Biochem J* **363:** 157-165.

Kullmann M, Gopfert U, Siewe B, Hengst L (2002). ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes Dev* **16:** 3087-3099.

Kurosu T, Ohga N, Hida Y, Maishi N, Akiyama K, Kakuguchi W *et al* (2011). HuR keeps an angiogenic switch on by stabilising mRNA of VEGF and COX-2 in tumour endothelium. *Br J Cancer* **104:** 819-829.

Lafarga V, Cuadrado A, Lopez de Silanes I, Bengoechea R, Fernandez-Capetillo O, Nebreda AR (2009). p38 Mitogen-activated protein kinase- and HuR-dependent stabilization of p21(Cip1) mRNA mediates the G(1)/S checkpoint. *Mol Cell Biol* **29:** 4341-4351.

Lai WS, Carballo E, Strum JR, Kennington EA, Phillips RS, Blackshear PJ (1999). Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol Cell Biol* **19:** 4311-4323.

Lambert M, Choquet D, Mege RM (2002). Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **157:** 469-479.

Lang L (2008). FDA approves sorafenib for patients with inoperable liver cancer. *Gastroenterology* **134:** 379.

Langer I, Vertongen P, Perret J, Fontaine J, Atassi G, Robberecht P (2000). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in human neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol* **34:** 386-393.

Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S, Bernardini S, Wallerand H, Kantelip B *et al* (2006). N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clin Cancer Res* **12:** 2780-2787.

Lazennec G, Canaple L, Saugy D, Wahli W (2000). Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol Endocrinol* **14:** 1962-1975.

Leaver MJ, Boukouvala E, Antonopoulou E, Diez A, Favre-Krey L, Ezaz MT *et al* (2005). Three peroxisome proliferator-activated receptor isotypes from each of two species of marine fish. *Endocrinology* **146:** 3150-3162.

Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM *et al* (2003). Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science* **302:** 453-457.

Lee HJ, Su Y, Yin PH, Lee HC, Chi CW (2009). PPAR(gamma)/PGC-1(alpha) pathway in E-cadherin expression and motility of HepG2 cells. *Anticancer Res* **29:** 5057-5063.

Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML (2005). Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol* **169:** 681-691.

Leibowitz MD, Fievet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Bergera J *et al* (2000). Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett* **473:** 333-336.

Levkau B, Herren B, Koyama H, Ross R, Raines EW (1998). Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* **187:** 579-586.

Levy AP, Levy NS, Goldberg MA (1996). Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* **271:** 2746-2753.

Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* **273:** 6417-6423.

Li CY, Shan S, Huang Q, Braun RD, Lanzen J, Hu K *et al* (2000a). Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. *J Natl Cancer Inst* **92:** 143-147.

Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M (2001). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* **61:** 3819-3825.

Li H, Park S, Kilburn B, Jelinek MA, Henschen-Edman A, Aswad DW *et al* (2002). Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR, an mRNA-stabilizing protein, by CARM1. Coactivator-associated arginine methyltransferase. *J Biol Chem* **277:** 44623-44630.

Li M, Pascual G, Glass CK (2000b). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* **20:** 4699-4707.

Lim H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD *et al* (1999). Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev* **13:** 1561-1574.

Lim H, Dey SK (2000). PPAR delta functions as a prostacyclin receptor in blastocyst implantation. *Trends Endocrinol Metab* **11:** 137-142.

Lim HJ, Moon I, Han K (2004). Transcriptional cofactors exhibit differential preference toward peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta in uterine cells. *Endocrinology* **145:** 2886-2895.

Linask KK, Knudsen KA, Gui YH (1997). N-cadherin-catenin interaction: necessary component of cardiac cell compartmentalization during early vertebrate heart development. *Dev Biol* **185:** 148-164.

Liou JY, Lee S, Ghelani D, Matijevic-Aleksic N, Wu KK (2006). Protection of endothelial survival by peroxisome proliferator-activated receptor-delta mediated 14-3-3 upregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26:** 1481-1487.

Liou JY, Ghelani D, Yeh S, Wu KK (2007). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce colorectal cancer cell apoptosis by suppressing 14-3-3epsilon. *Cancer Res* **67:** 3185-3191.

Lipponen PK, Eskelinen MJ (1995). Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrence in bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **121:** 303-308.

Liu G, Schwartz JA, Brooks SC (1999). p53 down-regulates ER-responsive genes by interfering with the binding of ER to ERE. *Biochem Biophys Res Commun* **264:** 359-364.

Liu T, Bohlken A, Kuljaca S, Lee M, Nguyen T, Smith S *et al* (2005). The retinoid anticancer signal: mechanisms of target gene regulation. *Br J Cancer* **93:** 310-318.

Lobov IB, Brooks PC, Lang RA (2002). Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99:** 11205-11210.

Lopez-Ocejo O, Viloria-Petit A, Bequet-Romero M, Mukhopadhyay D, Rak J, Kerbel RS (2000). Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene* **19:** 4611-4620.

Lopez de Silanes I, Fan J, Yang X, Zonderman AB, Potapova O, Pizer ES *et al* (2003). Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene* **22:** 7146-7154.

Loviscach M, Rehman N, Carter L, Mudaliar S, Mohadeen P, Ciaraldi TP *et al* (2000). Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action. *Diabetologia* **43:** 304-311.

Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* **352:** 497-505.

Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Fredenrich A, Melki J, Rassoulzadegan M *et al* (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J* **17:** 2299-2301.

Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ (1994). Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* **68:** 84-92.

Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C *et al* (2001). E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene* **20:** 1525-1528.

Makinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ *et al* (2001). Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med* **7:** 199-205.

Malik S, Guermah M, Yuan CX, Wu W, Yamamura S, Roeder RG (2004). Structural and functional organization of TRAP220, the TRAP/mediator subunit that is targeted by nuclear receptors. *Mol Cell Biol* **24:** 8244-8254.

Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J *et al* (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* **155:** 739-752.

Mao H, Lai Z, Zhao M, Yuan A, Zhou D (2001). [Effects of vascular endothelial growth factor on adhesion molecular expression of hepatocellular carcinoma HepG]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* **9 Suppl:** 37-39.

Marambaud P, Wen PH, Dutt A, Shioi J, Takashima A, Siman R *et al* (2003). A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* **114:** 635-645.

Marchese FP, Aubareda A, Tudor C, Saklatvala J, Clark AR, Dean JL (2010). MAPKAP kinase 2 blocks tristetraprolin-directed mRNA decay by inhibiting CAF1 deadenylase recruitment. *J Biol Chem* **285:** 27590-27600.

Marie PJ (2002). Role of N-cadherin in bone formation. *J Cell Physiol* **190:** 297-305.

Marin HE, Peraza MA, Billin AN, Willson TM, Ward JM, Kennett MJ *et al* (2006). Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta inhibits colon carcinogenesis. *Cancer Res* **66:** 4394-4401.

Mariotti A, Perotti A, Sessa C, Ruegg C (2007). N-cadherin as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Investig Drugs* **16:** 451-465.

Matsusue K, Peters JM, Gonzalez FJ (2004). PPARbeta/delta potentiates PPARgamma-stimulated adipocyte differentiation. *FASEB J* **18:** 1477-1479.

Matsusue K, Miyoshi A, Yamano S, Gonzalez FJ (2006). Ligand-activated PPARbeta efficiently represses the induction of LXR-dependent promoter activity through competition with RXR. *Mol Cell Endocrinol* **256:** 23-33.

Matsuyoshi N, Hamaguchi M, Taniguchi S, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M (1992). Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol* **118:** 703-714.

Matthiessen MW, Pedersen G, Albrektsen T, Adamsen S, Fleckner J, Brynskov J (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor expression and activation in normal human colonic epithelial cells and tubular adenomas. *Scand J Gastroenterol* **40:** 198-205.

Mauri D, Polyzos NP, Salanti G, Pavlidis N, Ioannidis JP (2008). Multiple-treatments meta-analysis of chemotherapy and targeted therapies in advanced breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **100:** 1780-1791.

Mazroui R, Di Marco S, Clair E, von Roretz C, Tenenbaum SA, Keene JD *et al* (2008). Caspase-mediated cleavage of HuR in the cytoplasm contributes to pp32/PHAP-I regulation of apoptosis. *J Cell Biol* **180:** 113-127.

Mbalaviele G, Dunstan CR, Sasaki A, Williams PJ, Mundy GR, Yoneda T (1996). E-cadherin expression in human breast cancer cells suppresses the development of osteolytic bone metastases in an experimental metastasis model. *Cancer Res* **56:** 4063-4070.

McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B (1991). A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* **254:** 1359-1361.

Meadows KN, Bryant P, Pumiglia K (2001). Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J Biol Chem* **276:** 49289-49298.

Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M *et al* (1999). A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **18:** 363-374.

Mialhe A, Levacher G, Champelovier P, Martel V, Serres M, Knudsen K *et al* (2000). Expression of E-, P-, n-cadherins and catenins in human bladder carcinoma cell lines. *J Urol* **164:** 826-835.

Michalik L, Desvergne B, Tan NS, Basu-Modak S, Escher P, Rieusset J *et al* (2001). Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *J Cell Biol* **154:** 799-814.

Michiels JF, Perrin C, Leccia N, Massi D, Grimaldi P, Wagner N (2010). PPARbeta activation inhibits melanoma cell proliferation involving repression of the Wilms' tumour suppressor WT1. *Pflugers Arch* **459:** 689-703.

Mineur P, Colige AC, Deroanne CF, Dubail J, Kesteloot F, Habraken Y *et al* (2007). Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. *J Cell Biol* **179:** 1261-1273.

Misra P, Owuor ED, Li W, Yu S, Qi C, Meyer K *et al* (2002). Phosphorylation of transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein (PBP). Stimulation of transcriptional regulation by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **277:** 48745-48754.

Miyata KS, McCaw SE, Meertens LM, Patel HV, Rachubinski RA, Capone JP (1998). Receptor-interacting protein 140 interacts with and inhibits transactivation by, peroxisome proliferator-activated receptor alpha and liver-X-receptor alpha. *Mol Cell Endocrinol* **146:** 69-76.

Molnar F, Matilainen M, Carlberg C (2005). Structural determinants of the agonist-independent association of human peroxisome proliferator-activated receptors with coactivators. *J Biol Chem* **280:** 26543-26556.

Moses MA (1997). The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* **15:** 180-189.

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O *et al* (2007). Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **356:** 115-124.

Mukherjee R, Davies PJ, Crombie DL, Bischoff ED, Cesario RM, Jow L *et al* (1997). Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* **386:** 407-410.

Muller-Brusselbach S, Ebrahimsade S, Jakel J, Eckhardt J, Rapp UR, Peters JM *et al* (2007a). Growth of transgenic RAF-induced lung adenomas is increased in mice with a disrupted PPARbeta/delta gene. *Int J Oncol* **31:** 607-611.

Muller-Brusselbach S, Komhoff M, Rieck M, Meissner W, Kaddatz K, Adamkiewicz J *et al* (2007b). Deregulation of tumor angiogenesis and blockade of tumor growth in PPARbeta-deficient mice. *EMBO J* **26:** 3686-3698.

Muller R, Komhoff M, Peters JM, Muller-Brusselbach S (2008). A Role for PPARbeta/delta in Tumor Stroma and Tumorigenesis. *PPAR Res* **2008:** 534294.

Murray LJ, Abrams TJ, Long KR, Ngai TJ, Olson LM, Hong W *et al* (2003). SU11248 inhibits tumor growth and CSF-1R-dependent osteolysis in an experimental breast cancer bone metastasis model. *Clin Exp Metastasis* **20:** 757-766.

Nabors LB, Gillespie GY, Harkins L, King PH (2001). HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer Res* **61:** 2154-2161.

Nadra K, Anghel SI, Joye E, Tan NS, Basu-Modak S, Trono D *et al* (2006). Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *Mol Cell Biol* **26:** 3266-3281.

Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ *et al* (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* **196:** 1497-1506.

Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE *et al* (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* **89:** 373-380.

Nagy VM, Buiga R, Brie I, Todor N, Tudoran O, Ordeanu C *et al* (2011). Expression of VEGF, VEGFR, EGFR, COX-2 and MVD in cervical carcinoma, in relation with the response to radio-chemotherapy. *Rom J Morphol Embryol* **52:** 53-59.

Nass SJ, Herman JG, Gabrielson E, Iversen PW, Parl FF, Davidson NE *et al* (2000). Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. *Cancer Res* **60:** 4346-4348.

Navarro P, Gomez M, Pizarro A, Gamallo C, Quintanilla M, Cano A (1991). A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J Cell Biol* **115:** 517-533.

Negrier S, Raymond E (2011). Antiangiogenic treatments and mechanisms of action in renal cell carcinoma. *Invest New Drugs*.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* **13:** 9-22.

Niesporek S, Kristiansen G, Thoma A, Weichert W, Noske A, Buckendahl AC *et al* (2008). Expression of the ELAV-like protein HuR in human prostate carcinoma is an indicator of disease relapse and linked to COX-2 expression. *Int J Oncol* **32:** 341-347.

Nollet F, Kools P, van Roy F (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* **299:** 551-572.

Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R *et al* (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* **395:** 137-143.

Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Hayashi Y, Yamashima T, Yamashita J *et al* (1995). Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem* **270:** 28316-28324.

Noren NK, Liu BP, Burridge K, Kreft B (2000). p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* **150:** 567-580.

Novello S, Scagliotti GV, Rosell R, Socinski MA, Brahmer J, Atkins J *et al* (2009). Phase II study of continuous daily sunitinib dosing in patients with previously treated advanced non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* **101:** 1543-1548.

Oh JS, Kucab JE, Bushel PR, Martin K, Bennett L, Collins J *et al* (2002). Insulin-like growth factor-1 inscribes a gene expression profile for angiogenic factors and cancer progression in breast epithelial cells. *Neoplasia* **4:** 204-217.

Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Ohsugi M, Kubota T, Fujiu K *et al* (2008). SUMOylation of Kruppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR-delta. *Nat Med* **14:** 656-666.

Oliver WR, Jr., Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL *et al* (2001). A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:** 5306-5311.

Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O *et al* (1996). Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93:** 2576-2581.

Ozawa M, Baribault H, Kemler R (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* **8:** 1711-1717.

Ozawa M, Kemler R (1998). The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. *J Cell Biol* **142:** 1605-1613.

Paavonen K, Horelli-Kuitunen N, Chilov D, Kukk E, Pennanen S, Kallioniemi OP *et al* (1996). Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively. *Circulation* **93:** 1079-1082.

Pages G, Berra E, Milanini J, Levy AP, Pouyssegur J (2000). Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability. *J Biol Chem* **275:** 26484-26491.

Pages G, Pouyssegur J (2005). Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovasc Res* **65:** 564-573.

Palakurthi SS, Aktas H, Grubissich LM, Mortensen RM, Halperin JA (2001). Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res* **61:** 6213-6218.

Paradies NE, Grunwald GB (1993). Purification and characterization of NCAD90, a soluble endogenous form of N-cadherin, which is generated by proteolysis during retinal development and retains adhesive and neurite-promoting function. *J Neurosci Res* **36:** 33-45.

Park BH, Vogelstein B, Kinzler KW (2001). Genetic disruption of PPARdelta decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:** 2598-2603.

Park JE, Keller GA, Ferrara N (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* **4:** 1317-1326.

Pauley CJ, Ledwith BJ, Kaplanski C (2002). Peroxisome proliferators activate growth regulatory pathways largely via peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent mechanisms. *Cell Signal* **14:** 351-358.

Pece S, Gutkind JS (2000). Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J Biol Chem* **275:** 41227-41233.

Pedchenko TV, Gonzalez AL, Wang D, DuBois RN, Massion PP (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta expression and activation in lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* **39:** 689-696.

Peeters LL, Vigne JL, Tee MK, Zhao D, Waite LL, Taylor RN (2005). PPAR gamma represses VEGF expression in human endometrial cells: implications for uterine angiogenesis. *Angiogenesis* **8:** 373-379.

Pellet-Many C, Frankel P, Jia H, Zachary I (2008). Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem J* **411:** 211-226.

Peluso JJ (1997). Putative mechanism through which N-cadherin-mediated cell contact maintains calcium homeostasis and thereby prevents ovarian cells from undergoing apoptosis. *Biochem Pharmacol* **54:** 847-853.

Pepper MS (1997). Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* **8:** 21-43.

Perissi V, Aggarwal A, Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG (2004). A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* **116:** 511-526.

Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J (1999). A new crystal structure, Ca2+ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J* **18:** 1738-1747.

Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C *et al* (2000). Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol* **20:** 5119-5128.

Peters JM, Aoyama T, Burns AM, Gonzalez FJ (2003). Bezafibrate is a dual ligand for PPARalpha and PPARbeta: studies using null mice. *Biochim Biophys Acta* **1632:** 80-89.

Piqueras L, Reynolds AR, Hodivala-Dilke KM, Alfranca A, Redondo JM, Hatae T *et al* (2007). Activation of PPARbeta/delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27:** 63-69.

Planel S, Salomon A, Jalinot P, Feige JJ, Cherradi N (2010). A novel concept in antiangiogenic and antitumoral therapy: multitarget destabilization of short-lived mRNAs by the zinc finger protein ZFP36L1. *Oncogene* **29:** 5989-6003.

Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I *et al* (1997). VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* **272:** 7151-7158.

Potgens AJ, Lubsen NH, van Altena MC, Vermeulen R, Bakker A, Schoenmakers JG *et al* (1994). Covalent dimerization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from Cys to Ser mutations. *J Biol Chem* **269:** 32879-32885.

Pourcet B, Pineda-Torra I, Derudas B, Staels B, Glineur C (2010). SUMOylation of human peroxisome proliferator-activated receptor alpha inhibits its trans-activity through the recruitment of the nuclear corepressor NCoR. *J Biol Chem* **285:** 5983-5992.

Prozialeck WC, Fay MJ, Lamar PC, Pearson CA, Sigar I, Ramsey KH (2002). Chlamydia trachomatis disrupts N-cadherin-dependent cell-cell junctions and sequesters beta-catenin in human cervical epithelial cells. *Infect Immun* **70:** 2605-2613.

Qian X, Karpova T, Sheppard AM, McNally J, Lowy DR (2004). E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **23:** 1739-1748.

Rabbany SY, Heissig B, Hattori K, Rafii S (2003). Molecular pathways regulating mobilization of marrow-derived stem cells for tissue revascularization. *Trends Mol Med* **9:** 109-117.

Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO (1997). Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol* **181:** 64-78.

Reed KR, Sansom OJ, Hayes AJ, Gescher AJ, Winton DJ, Peters JM *et al* (2004). PPARdelta status and Apc-mediated tumourigenesis in the mouse intestine. *Oncogene* **23:** 8992-8996.

Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper B, Hartmann D *et al* (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* **24:** 742-752.

Reka AK, Kurapati H, Narala VR, Bommer G, Chen J, Standiford TJ *et al* (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits tumor metastasis by antagonizing Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cancer Ther* **9:** 3221-3232.

Remacle JE, Kraft H, Lerchner W, Wuytens G, Collart C, Verschueren K *et al* (1999). New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. *EMBO J* **18:** 5073-5084.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391:** 79-82.

Rieck M, Wedeken L, Muller-Brusselbach S, Meissner W, Muller R (2007). Expression level and agonist-binding affect the turnover, ubiquitination and complex formation of peroxisome proliferator activated receptor beta. *FEBS J* **274:** 5068-5076.

Rieger-Christ KM, Cain JW, Braasch JW, Dugan JM, Silverman ML, Bouyounes B *et al* (2001). Expression of classic cadherins type I in urothelial neoplastic progression. *Hum Pathol* **32:** 18-23.

Rieger-Christ KM, Lee P, Zagha R, Kosakowski M, Moinzadeh A, Stoffel J *et al* (2004). Novel expression of N-cadherin elicits in vitro bladder cell invasion via the Akt signaling pathway. *Oncogene* **23:** 4745-4753.

Rios-Doria J, Day KC, Kuefer R, Rashid MG, Chinnaiyan AM, Rubin MA *et al* (2003). The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells. *J Biol Chem* **278:** 1372-1379.

Riserus U, Sprecher D, Johnson T, Olson E, Hirschberg S, Liu A *et al* (2008). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)delta promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. *Diabetes* **57:** 332-339.

Rival Y, Beneteau N, Taillandier T, Pezet M, Dupont-Passelaigue E, Patoiseau JF *et al* (2002). PPARalpha and PPARdelta activators inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappaB and expression of VCAM-1 in EAhy926 endothelial cells. *Eur J Pharmacol* **435:** 143-151.

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM *et al* (1986). Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83:** 4167-4171.

Rock EP, Goodman V, Jiang JX, Mahjoob K, Verbois SL, Morse D *et al* (2007). Food and Drug Administration drug approval summary: Sunitinib malate for the treatment of gastrointestinal stromal tumor and advanced renal cell carcinoma. *Oncologist* **12:** 107-113.

Roeder RG (2005). Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett* **579:** 909-915.

Rohrl C, Kaindl U, Koneczny I, Hudec X, Baron DM, Konig JS *et al* (2011). Peroxisome-proliferator-activated receptors gamma and beta/delta mediate vascular endothelial growth factor production in colorectal tumor cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **137:** 29-39.

Ross JS, del Rosario AD, Figge HL, Sheehan C, Fisher HA, Bui HX (1995). E-cadherin expression in papillary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol* **26:** 940-944.

Rossi L, Zoratto F, Papa A, Iodice F, Minozzi M, Frati L *et al* (2010). Current approach in the treatment of hepatocellular carcinoma. *World J Gastrointest Oncol* **2:** 348-359.

Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* **15:** 2169-2177.

Rowan BG, Weigel NL, O'Malley BW (2000). Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* **275:** 4475-4483.

Ruohola JK, Valve EM, Karkkainen MJ, Joukov V, Alitalo K, Harkonen PL (1999). Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* **149:** 29-40.

Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Weich HA, Kohno K *et al* (1996). Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol Chem* **271:** 28220-28228.

Sakuma T, Nakagawa T, Ido K, Takeuchi H, Sato K, Kubota T (2008). Expression of vascular endothelial growth factor-A and mRNA stability factor HuR in human meningiomas. *J Neurooncol* **88:** 143-155.

Sato K, Sasaki R, Ogura Y, Shimoda N, Togashi H, Terada K *et al* (1998). Expression of vascular endothelial growth factor gene and its receptor (flt-1) gene in urinary bladder cancer. *Tohoku J Exp Med* **185:** 173-184.

Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T *et al* (2001). Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* **97:** 785-791.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75:** 495-505.

Schiefelbein D, Seitz O, Goren I, Dissmann JP, Schmidt H, Bachmann M *et al* (2008). Keratinocyte-derived vascular endothelial growth factor biosynthesis represents a pleiotropic side effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist troglitazone but not rosiglitazone and involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase: implications for diabetes-impaired skin repair. *Mol Pharmacol* **74:** 952-963.

Schmuth M, Haqq CM, Cairns WJ, Holder JC, Dorsam S, Chang S *et al* (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *J Invest Dermatol* **122:** 971-983.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1996). Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* **37:** 907-925.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219:** 983-985.

Serini G, Valdembri D, Bussolino F (2006). Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Exp Cell Res* **312:** 651-658.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML *et al* (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376:** 62-66.

Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA (1998). Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature* **396:** 377-380.

Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G *et al* (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374:** 327-337.

Shaw N, Elholm M, Noy N (2003). Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem* **278:** 41589-41592.

Shearer BG, Steger DJ, Way JM, Stanley TB, Lobe DC, Grillot DA *et al* (2008). Identification and characterization of a selective peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (NR1C2) antagonist. *Mol Endocrinol* **22:** 523-529.

Shearer BG, Wiethe RW, Ashe A, Billin AN, Way JM, Stanley TB *et al* (2010). Identification and characterization of 4-chloro-N-(2-{[5-trifluoromethyl)-2-pyridyl]sulfonyl}ethyl)benzamide (GSK3787), a selective and irreversible peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) antagonist. *J Med Chem* **53:** 1857-1861.

Shenk JL, Fisher CJ, Chen SY, Zhou XF, Tillman K, Shemshedini L (2001). p53 represses androgen-induced transactivation of prostate-specific antigen by disrupting hAR amino- to carboxyl-terminal interaction. *J Biol Chem* **276:** 38472-38479.

Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ (1993). cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* **32:** 5598-5604.

Shi Y, Hon M, Evans RM (2002). The peroxisome proliferator-activated receptor delta, an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99:** 2613-2618.

Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H *et al* (1990). Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* **5:** 519-524.

Shibuya M (2001). Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol* **33:** 409-420.

Shibuya M, Claesson-Welsh L (2006). Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* **312:** 549-560.

Shimizu M, Yamashita D, Yamaguchi T, Hirose F, Osumi T (2006). Aspects of the regulatory mechanisms of PPAR functions: analysis of a bidirectional response element and regulation by sumoylation. *Mol Cell Biochem* **286:** 33-42.

Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R *et al* (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96:** 5522-5527.

Siemeister G, Marme D, Martiny-Baron G (1998). The alpha-helical domain near the amino terminus is essential for dimerization of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **273:** 11115-11120.

Simpson KJ, Dugan AS, Mercurio AM (2004). Functional analysis of the contribution of RhoA and RhoC GTPases to invasive breast carcinoma. *Cancer Res* **64:** 8694-8701.

Sinha S, Dutta S, Datta K, Ghosh AK, Mukhopadhyay D (2009). Von Hippel-Lindau gene product modulates TIS11B expression in renal cell carcinoma: impact on vascular endothelial growth factor expression in hypoxia. *J Biol Chem* **284:** 32610-32618.

Smalley WE, DuBois RN (1997). Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* **39:** 1-20.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* **92:** 735-745.

Solomon C, White JH, Kremer R (1999). Mitogen-activated protein kinase inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D3-dependent signal transduction by phosphorylating human retinoid X receptor alpha. *J Clin Invest* **103:** 1729-1735.

Soloway MS, Sofer M, Vaidya A (2002). Contemporary management of stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* **167:** 1573-1583.

Soto E, Yanagisawa M, Marlow LA, Copland JA, Perez EA, Anastasiadis PZ (2008). p120 catenin induces opposing effects on tumor cell growth depending on E-cadherin expression. *J Cell Biol* **183:** 737-749.

Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA *et al* (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389:** 194-198.

Sprecher DL, Massien C, Pearce G, Billin AN, Perlstein I, Willson TM *et al* (2007). Triglyceride:high-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor delta agonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27:** 359-365.

Spyridopoulos I, Brogi E, Kearney M, Sullivan AB, Cetrulo C, Isner JM *et al* (1997). Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha: balance between growth and death signals. *J Mol Cell Cardiol* **29:** 1321-1330.

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R *et al* (2001). VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* **7:** 186-191.

Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouche A, Yuce A *et al* (2002). Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest* **109:** 327-336.

Stephen RL, Gustafsson MC, Jarvis M, Tatoud R, Marshall BR, Knight D *et al* (2004). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines. *Cancer Res* **64:** 3162-3170.

Stephenson JM, Banerjee S, Saxena NK, Cherian R, Banerjee SK (2002). Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in preneoplastic and neoplastic human breast: a possible marker for the progression of breast cancer. *Int J Cancer* **101:** 409-414.

Stockmann C, Doedens A, Weidemann A, Zhang N, Takeda N, Greenberg JI *et al* (2008). Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature* **456:** 814-818.

Stoecklin G, Gross B, Ming XF, Moroni C (2003). A novel mechanism of tumor suppression by destabilizing AU-rich growth factor mRNA. *Oncogene* **22:** 3554-3561.

Stoner M, Wormke M, Saville B, Samudio I, Qin C, Abdelrahim M *et al* (2004). Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor alpha and SP proteins. *Oncogene* **23:** 1052-1063.

Subbaramaiah K, Marmo TP, Dixon DA, Dannenberg AJ (2003). Regulation of cyclooxgenase-2 mRNA stability by taxanes: evidence for involvement of p38, MAPKAPK-2, and HuR. *J Biol Chem* **278:** 37637-37647.

Sugano Y, Matsuzaki K, Tahashi Y, Furukawa F, Mori S, Yamagata H *et al* (2003). Distortion of autocrine transforming growth factor beta signal accelerates malignant potential by enhancing cell growth as well as PAI-1 and VEGF production in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* **22:** 2309-2321.

Sully G, Dean JL, Wait R, Rawlinson L, Santalucia T, Saklatvala J *et al* (2004). Structural and functional dissection of a conserved destabilizing element of cyclo-oxygenase-2 mRNA: evidence against the involvement of AUF-1 [AU-rich element/poly(U)-binding/degradation factor-1], AUF-2, tristetraprolin, HuR (Hu antigen R) or FBP1 (far-upstream-sequence-element-binding protein 1). *Biochem J* **377:** 629-639.

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S *et al* (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87:** 1171-1180.

Syrigos KN, Krausz T, Waxman J, Pandha H, Rowlinson-Busza G, Verne J *et al* (1995). E-cadherin expression in bladder cancer using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: correlation with histopathological grade, tumour stage and survival. *Int J Cancer* **64:** 367-370.

Sznaidman ML, Haffner CD, Maloney PR, Fivush A, Chao E, Goreham D *et al* (2003). Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)--synthesis and biological activity. *Bioorg Med Chem Lett* **13:** 1517-1521.

Takada I, Yu RT, Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Kliewer SA *et al* (2000). Alteration of a single amino acid in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR alpha) generates a PPAR delta phenotype. *Mol Endocrinol* **14:** 733-740.

Takahashi H, Shibuya M (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* **109:** 227-241.

Takahashi T, Ueno H, Shibuya M (1999). VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* **18:** 2221-2230.

Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J* **20:** 2768-2778.

Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, Kitadai Y, Bucana CD, Ellis LM (1996). Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res* **2:** 1679-1684.

Takeichi M (1993). Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* **5:** 806-811.

Tan NS, Michalik L, Noy N, Yasmin R, Pacot C, Heim M *et al* (2001). Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev* **15:** 3263-3277.

Tan NS, Icre G, Montagner A, Bordier-ten-Heggeler B, Wahli W, Michalik L (2007). The nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta potentiates cell chemotactism, polarization, and migration. *Mol Cell Biol* **27:** 7161-7175.

Tan X, Dagher H, Hutton CA, Bourke JE (2010). Effects of PPAR gamma ligands on TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells. *Respir Res* **11:** 21.

Tanaka H, Shan W, Phillips GR, Arndt K, Bozdagi O, Shapiro L *et al* (2000). Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity. *Neuron* **25:** 93-107.

Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y *et al* (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100:** 15924-15929.

Tani T, Laitinen L, Kangas L, Lehto VP, Virtanen I (1995). Expression of E- and N-cadherin in renal cell carcinomas, in renal cell carcinoma cell lines in vitro and in their xenografts. *Int J Cancer* **64:** 407-414.

Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D *et al* (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **187:** 1579-1586.

Tran H, Maurer F, Nagamine Y (2003). Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol Cell Biol* **23:** 7177-7188.

Tran NL, Nagle RB, Cress AE, Heimark RL (1999). N-Cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines. An epithelial-mesenchymal transformation mediating adhesion withStromal cells. *Am J Pathol* **155:** 787-798.

Tran NL, Adams DG, Vaillancourt RR, Heimark RL (2002). Signal transduction from N-cadherin increases Bcl-2. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by homophilic adhesion and actin cytoskeletal organization. *J Biol Chem* **277:** 32905-32914.

Uemura K, Kihara T, Kuzuya A, Okawa K, Nishimoto T, Bito H *et al* (2006). Activity-dependent regulation of beta-catenin via epsilon-cleavage of N-cadherin. *Biochem Biophys Res Commun* **345:** 951-958.

Utton MA, Eickholt B, Howell FV, Wallis J, Doherty P (2001). Soluble N-cadherin stimulates fibroblast growth factor receptor dependent neurite outgrowth and N-cadherin and the fibroblast growth factor receptor co-cluster in cells. *J Neurochem* **76:** 1421-1430.

Vallorosi CJ, Day KC, Zhao X, Rashid MG, Rubin MA, Johnson KR *et al* (2000). Truncation of the beta-catenin binding domain of E-cadherin precedes epithelial apoptosis during prostate and mammary involution. *J Biol Chem* **275:** 3328-3334.

van der Veen JN, Kruit JK, Havinga R, Baller JF, Chimini G, Lestavel S *et al* (2005). Reduced cholesterol absorption upon PPARdelta activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1. *J Lipid Res* **46:** 526-534.

van Roy FM, McCrea PD (2005). A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer? *Nat Rev Cancer* **5:** 956-964.

Vessey CJ, Wilding J, Folarin N, Hirano S, Takeichi M, Soutter P *et al* (1995). Altered expression and function of E-cadherin in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol* **176:** 151-159.

Vinals F, Chambard JC, Pouyssegur J (1999). p70 S6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* **274:** 26776-26782.

Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G (1996). Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* **93:** 1493-1495.

Vintonenko N, Pelaez-Garavito I, Buteau-Lozano H, Toullec A, Lidereau R, Perret GY *et al* (2011). Overexpression of VEGF189 in breast cancer cells induces apoptosis via NRP1 under stress conditions. *Cell Adh Migr* **5:** 332-343.

Viswakarma N, Jia Y, Bai L, Vluggens A, Borensztajn J, Xu J *et al* (2010). Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Res* **2010**.

Vlodavsky I, Miao HQ, Medalion B, Danagher P, Ron D (1996). Involvement of heparan sulfate and related molecules in sequestration and growth promoting activity of fibroblast growth factor. *Cancer Metastasis Rev* **15:** 177-186.

Vosper H, Patel L, Graham TL, Khoudoli GA, Hill A, Macphee CH *et al* (2001). The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. *J Biol Chem* **276:** 44258-44265.

Walczak R, Joseph SB, Laffitte BA, Castrillo A, Pei L, Tontonoz P (2004). Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors. *J Biol Chem* **279:** 9905-9911.

Wang D, Wang H, Guo Y, Ning W, Katkuri S, Wahli W *et al* (2006). Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and VEGF stimulates cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103:** 19069-19074.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92:** 5510-5514.

Wang LH, Yang XY, Zhang X, Huang J, Hou J, Li J *et al* (2004a). Transcriptional inactivation of STAT3 by PPARgamma suppresses IL-6-responsive multiple myeloma cells. *Immunity* **20:** 205-218.

Wang Y, Sheng Q, Spillman MA, Behbakht K, Gu H (2011). Gab2 regulates the migratory behaviors and E-cadherin expression via activation of the PI3K pathway in ovarian cancer cells. *Oncogene*.

Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H *et al* (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* **113:** 159-170.

Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR *et al* (2004b). Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol* **2:** e294.

Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS (1997). Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem* **272:** 20230-20235.

Wheelock MJ, Johnson KR (2003). Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol* **15:** 509-514.

Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR (2008). Cadherin switching. *J Cell Sci* **121:** 727-735.

Williams E, Williams G, Gour BJ, Blaschuk OW, Doherty P (2000). A novel family of cyclic peptide antagonists suggests that N-cadherin specificity is determined by amino acids that flank the HAV motif. *J Biol Chem* **275:** 4007-4012.

Woo CH, Massett MP, Shishido T, Itoh S, Ding B, McClain C *et al* (2006). ERK5 activation inhibits inflammatory responses via peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) stimulation. *J Biol Chem* **281:** 32164-32174.

Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO *et al* (2004). VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* **64:** 7822-7835.

Wu J, Richer J, Horwitz KB, Hyder SM (2004). Progestin-dependent induction of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells: preferential regulation by progesterone receptor B. *Cancer Res* **64:** 2238-2244.

Xia G, Kumar SR, Hawes D, Cai J, Hassanieh L, Groshen S *et al* (2006). Expression and significance of vascular endothelial growth factor receptor 2 in bladder cancer. *J Urol* **175:** 1245-1252.

Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ *et al* (1999). Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* **3:** 397-403.

Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Plunket KD, Moore LB, Collins JL *et al* (2001). Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:** 13919-13924.

Xu J, Lamouille S, Derynck R (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* **19:** 156-172.

Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y (1997). Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics* **42:** 483-488.

Yang AD, Camp ER, Fan F, Shen L, Gray MJ, Liu W *et al* (2006). Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* **66:** 46-51.

Yang L, Zhou ZG, Zheng XL, Wang L, Yu YY, Zhou B *et al* (2008). RNA interference against peroxisome proliferator-activated receptor delta gene promotes proliferation of human colorectal cancer cells. *Dis Colon Rectum* **51:** 318-326; discussion 326-318.

Yilmaz M, Christofori G (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* **28:** 15-33.

Yin Y, Russell RG, Dettin LE, Bai R, Wei ZL, Kozikowski AP *et al* (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma agonists differentially alter tumor differentiation and progression during mammary carcinogenesis. *Cancer Res* **65:** 3950-3957.

Yoshikawa T, Brkanac Z, Dupont BR, Xing GQ, Leach RJ, Detera-Wadleigh SD (1996). Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics* **35:** 637-638.

Yoshimura R, Matsuyama M, Segawa Y, Hase T, Mitsuhashi M, Tsuchida K *et al* (2003). Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human urinary bladder carcinoma and growth inhibition by its agonists. *Int J Cancer* **104:** 597-602.

Yoshizaki T, Motomura W, Tanno S, Kumei S, Yoshizaki Y, Okumura T (2010). Thiazolidinediones enhance vascular endothelial growth factor expression and induce cell growth inhibition in non-small-cell lung cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* **29:** 22.

Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT (1996). The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* **10:** 1443-1454.

Zachary I, Gliki G (2001). Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* **49:** 568-581.

Zaveri NT, Sato BG, Jiang F, Calaoagan J, Laderoute KR, Murphy BJ (2009). A novel peroxisome proliferator-activated receptor delta antagonist, SR13904, has anti-proliferative activity in human cancer cells. *Cancer Biol Ther* **8:** 1252-1261.

Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC (2002). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* **8:** 994-998.

Zhang L, Yu D, Hu M, Xiong S, Lang A, Ellis LM *et al* (2000). Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* **60:** 3655-3661.

Zhang PX, Wang Y, Liu Y, Jiang GY, Li QC, Wang EH (2011). p120-catenin isoform 3 regulates subcellular localization of Kaiso and promotes invasion in lung cancer cells via a phosphorylation-dependent mechanism. *Int J Oncol* **38:** 1625-1635.

Zhang Y, Furumura M, Morita E (2008). Distinct signaling pathways confer different vascular responses to VEGF 121 and VEGF 165. *Growth Factors* **26:** 125-131.

Zhao C, Yang H, Shi H, Wang X, Chen X, Yuan Y *et al* (2011). Distinct contributions of angiogenesis and vascular co-option during the initiation of primary microtumors and micrometastases. *Carcinogenesis* **32:** 1143-1150.

Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK (1997). Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* **272:** 25500-25506.

zur Hausen H (1999). Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians* **111:** 581-587.

Annexes

Publications

Boiteux G, **Lascombe I**, **Roche E**, **Plissonnier ML**, **Clairotte A**, **Bittard H**, **Fauconnet S** (2009) A-FABP, a candidate progression marker of human transitional cell carcinoma of the bladder, is differentially regulated by PPAR in urothelial cancer cells. *Int J Cancer*, **124:** 1820-1828.

Communications orales

Régulation de l'expression du VEGF par PPARβ dans des lignées cellulaires dérivées de cancer du col de l'utérus, HPV18 positives

Roche Emmanuelle, Fauconnet Sylvie & Lascombe Isabelle

XXXVème Forum des jeunes chercheurs de la SFBBM – La Grande Motte – septembre 2008

Techniques utilisées pour l'analyse au niveau cellulaire et moléculaire de mécanismes contrôlant la prolifération et la mort cellulaires

Emilie Gaiffe, Emmanuelle Roche

Séminaire du Conseil Scientifique de l'IFR – Besançon – 24 novembre 2008

PPARβ contribue à l'angiogenèse tumorale en augmentant l'expression du VEGF dans les cellules HeLa (HPV18 positives).

Emmanuelle Roche, Sylvie Fauconnet, Christiane Mougin, Isabelle Lascombe

Forum des Jeunes Chercheurs – Dijon – 25/26 juin 2009

Régulation d'un facteur clé de l'angiogenèse tumorale, le VEGF, par PPARβ dans des cellules dérivées de cancer du col de l'utérus

Roche E, Lascombe I, Mougin C, Fauconnet S

Journée de l'IFR – Besançon – 06 novembre 2009

Implication de protéines kinases dans la régulation de l'expression du VEGF par un agoniste de PPARβ dans des cellules dérivées de cancer du col de l'utérus

Roche E, Lascombe I, Mougin C, Fauconnet S

Société de Biologie de Besançon – 15 décembre 2010

Implication d'un nouveau mécanisme de régulation de l'expression du VEGF dans des cellules dérivées de cancer du col de l'utérus traitées par un agoniste du récepteur PPARβ

Roche E, Lascombe I, Mougin C, Bittard H, Fauconnet S

Journée de l'IFR – Besançon – 27 mai 2011

Communications affichées

Régulation de l'expression du VEGF par PPARβ dans des lignées cellulaires dérivées de cancer du col de l'utérus, HPV18 positives

Roche Emmanuelle, Fauconnet Sylvie & Lascombe Isabelle

Congrès annuel sifrARN – La Grande Motte – septembre 2008

Nuclear receptor PPARβ contributes to tumor angiogenesis by inducing VEGF expression through a HPV18 E6-independent mechanism in HeLa cells

Emmanuelle Roche , Sylvie Fauconnet , Isabelle Lascombe

2è Forum du CGE – Vittel – 17 octobre 2008

PPARβ could contribute to tumor angiogenesis by inducing vegf expression in HeLa cells through a HPV18 E6 oncoprotein-independent mechanism

Emmanuelle Roche, Sylvie Fauconnet, Christiane Mougin, Isabelle Lascombe

ONCOTRANS 2009, 1er Colloque Inter-Régional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie – Nancy – 19-20 mars 2009

Potential role of PPARβ in epithelial cancer progression

S Fauconnet, E Roche, G Boiteux, N Clere, C Mougin, H Bittard, I Lascombe

AERES visiting committee – Besançon – 2 mars 2011