

Université de Sherbrooke

IMPLICATION DU RÉCEPTEUR-RELIÉ À L'ŒSTROGÈNE ALPHA DANS LA PROLIFÉRATION DES CELLULES CANCÉREUSES COLIQUES

Par **Thomas Lassalle**

Département d'Anatomie et Biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la santé

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M. Sc.)

En biologie cellulaire

Mémoire évalué par :

Dre Julie Carrier, programme de Biologie cellulaire

Dre Nathalie Rivard, programme de Biologie cellulaire

Dre Marie-France Langlois, programme de Biochimie

Août 2008



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-53402-1
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-53402-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	II
LISTE DES ILLUSTRATIONS	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET SYMBOLES	IX
RÉSUMÉ.....	XIII
I-INTRODUCTION	1
1. LE SYSTÈME DIGESTIF	1
1.1. <i>Caractéristiques générales</i>	1
1.2. <i>Le gros intestin</i>	2
2. LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE.....	4
2.1. <i>Le cycle cellulaire</i>	4
2.1.1. <i>La régulation du cycle cellulaire</i>	7
2.2. <i>Le cancer colorectal</i>	9
3. LES RÉCEPTEURS-RELIÉS À L'ŒSTROGÈNE (ERRs)	12
3.1. <i>Découverte et structure</i>	12
3.2. <i>La liaison à l'ADN</i>	16
3.2.1. <i>Les ERRs et les différentes séquences consensus</i>	16
3.2.2. <i>Les ERRs et la voie oestrogénique</i>	17
3.3. <i>Les variants d'épissage</i>	19
3.3.1. <i>L'importance de la phénylalanine 329</i>	20
3.4. <i>L'expression des ERRs</i>	21

3.4.1.	L'expression dans les différents tissus et modèles murins	21
3.4.2.	L'implication des ERRs dans les cancers.....	24
3.4.2.1.	Cancers hormonaux-dépendants.....	24
3.4.2.2.	Cancer du côlon.....	27
4.	LES CO-ACTIVATEURS DE LA FAMILLE PGC-1	28
4.1.	<i>Découverte et structure</i>	28
4.2.	<i>L'expression dans les tissus</i>	30
4.3.	<i>L'interaction entre PGC-1α et ERRα</i>	32
4.4.	<i>Le co-activateur PRC</i>	35
5.	HYPOTHÈSE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS	35
II-MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		38
1.	CULTURE CELLULAIRE	38
1.1.	<i>Cellules 293T</i>	38
1.2.	<i>Cellules HIEC et IEC-6</i>	38
1.3.	<i>Cellules DLD-1 et HCT-116</i>	39
2.	EXTRACTION DE PROTÉINES ET IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN	39
2.1.	<i>Extraction des protéines (Méthode Laemmli)</i>	40
2.2.	<i>Extraction des protéines (Méthode Triton)</i>	40
2.3.	<i>Immunobuvardage de type Western</i>	41
3.	IMMUNOLOCALISATION EN FLUORESCENCE.....	43
4.	IMMUNOHISTOCHIMIE.....	44
4.1.	<i>Fixation des tissus</i>	44
4.2.	<i>Immunohistochimie</i>	45

5. DÉTACHEMENT SÉQUENTIEL DES CELLULES ÉPITHÉLIALES LE LONG DE LA CRYPTÉ COLIQUE DE SOURIS ADULTE	46
6. CLONAGE DU SHERR α	47
7. ÉTABLISSEMENT DES LIGNÉES STABLES	49
7.1. <i>Production des lentivirus</i>	49
7.2. <i>Récolte des virus</i>	50
7.3. <i>Infection des lignées cellulaires</i>	50
7.4. <i>La sélection des cellules</i>	51
7.5. <i>Les courbes de croissance</i>	51
8. ANALYSE DE FACS.....	52
9. INJECTION DANS LES SOURIS.....	53
9.1. <i>Commande des souris</i>	53
9.2. <i>Préparation des cellules pour l'injection</i>	54
9.3. <i>Injection des cellules dans les souris</i>	54
9.4. <i>Mesure des tumeurs</i>	54
9.5. <i>Sacrifice des souris et mesure du poids des tumeurs</i>	55
10. CLONAGE DE PEYFP-ERR α ET PECFP-ERR α Δ EXON5	55
10.1. <i>Préparation des cellules et transfection transitoire</i>	56
10.2. <i>Préparation des cellules et microscopie à fluorescence</i>	57
11. IMMUNOPRÉCIPITATION	57
11.1. <i>Préparation des cellules et transfection transitoire</i>	57
11.2. <i>Extraction des protéines totales et immunoprécipitation</i>	58
12. CLONAGE HA-PRC	59

12.1. Mutation ponctuelle dans le vecteur pSVsportPRC	59
12.2. Insertion de l'étiquette HA à l'extrémité amino-terminale de PRC	60
13. ESSAI LUCIFÉRASE	61
13.1. Préparation des cellules et transfection transitoire	61
13.2. Essais luciférases	62
14. ANALYSE DES RÉSULTATS	63
III-RÉSULTATS	65
1. IMPLICATION DE $ERR\alpha$ DANS LA PROLIFÉRATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES COLIQUES	65
1.1. Expression de $ERR\alpha$ dans le côlon humain	65
1.2. Expression de $ERR\alpha$ dans le côlon murin	69
1.3. Effet d'une baisse d'expression de $ERR\alpha$ sur la croissance cellulaire et tumorale	71
2. CARACTÉRISATION DU VARIANT D'ÉPISSAGE ALTERNATIF $ERR\alpha\Delta EXON5$	77
2.1. Expression de $ERR\alpha\Delta exon5$ dans le côlon humain	77
2.2. Interaction directe entre $ERR\alpha$ et $ERR\alpha\Delta exon5$	81
2.3. Effet d'une surexpression de $ERR\alpha\Delta exon5$ sur la croissance cellulaire et tumorale	83
3. CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION ENTRE $ERR\alpha$ ET LE CO-ACTIVATEUR PRC	87
IV-DISCUSSION	90

OBJECTIF 1 : ÉTUDIER L'IMPLICATION D'ERR α DANS LA CROISSANCE DES CELLULES CANCÉREUSES DU CÔLON	90
OBJECTIF 2 : CARACTÉRISER LE VARIANT D'ÉPISSAGE ALTERNATIF ERR α Δ EXON5 DANS L'ÉPITHÉLIUM DU CÔLON.....	96
OBJECTIF 3 : DOCUMENTER ET CARACTÉRISER L'INTERACTION ENTRE ERR α ET LE CO-ACTIVATEUR PRC.....	100
V. CONCLUSIONS	102
REMERCIEMENTS.....	103
BIBLIOGRAPHIE.....	104

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1.	Le tube digestif et la structure de la muqueuse colonique.....	3
Figure 2.	Le cycle cellulaire.....	6
Figure 3.	La cascade génétique de la carcinogenèse colorectale.....	11
Figure 4.	Les récepteurs à l'œstrogène et les récepteurs-reliés à l'œstrogène	14
Figure 5.	Les co-activateurs de la famille PGC-1.....	31
Figure 6.	Expression d'ERR α dans les lignées cellulaires intestinales.....	66
Figure 7.	Expression des isoformes ERR α et γ dans le tissu sain et cancéreux de côlon.....	68
Figure 8.	Expression d'ERR α chez la souris.....	70
Figure 9.	Effet de la baisse d'expression d'ERR α sur la prolifération des cellules DLD-1 et HCT116.....	74
Figure 10.	Effet de la baisse d'expression d'ERR α sur la croissance tumorale dans les souris immunodéficientes CD-1.....	76
Figure 11.	Expression d'ERR α Δ exon5 dans les lignées cellulaires intestinales.	80
Figure 12.	Interaction entre ERR α et ERR α Δ exon5.....	82

Figure 13.	Effet d'une surexpression d'ERR α Δ exon5 sur la prolifération des cellules DLD-1.....	85
Figure 14.	Effet de la surexpression d'ERR α Δ exon5 humain sur la croissance tumorale dans les souris immunodéficientes CD-1.....	86
Figure 15.	Effet potentiel de PRC sur la transcription génique médiée par ERR α	88

Tableaux

Tableau 1.	Liste des anticorps utilisés.....	43
Tableau 2.	Séquence des amorces utilisées.....	49

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET SYMBOLES

a.a.	<u>a</u> cide <u>a</u> miné
ADN	<u>a</u> cide <u>d</u> éoxyribo <u>n</u> ucléique
ADN _c	<u>a</u> cide <u>d</u> éoxyribo <u>n</u> ucléique <u>c</u> omplémentaire
AF	fonction de transactivation (<u>a</u> ctivation <u>f</u> unction)
APC	<u>a</u> denomatous polyposis <u>c</u> oli
ApoAIV	<u>A</u> polipoprotein <u>A</u> IV
ARN	<u>a</u> cide <u>r</u> ibo <u>n</u> ucléique
ARN _m	<u>a</u> cide <u>r</u> ibo <u>n</u> ucléique <u>m</u> essenger
BSA	albumine de sérum bovin (<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumine)
Cdk	<u>c</u> yclin- <u>d</u> ependent <u>k</u> inase
CIN	voie d'instabilité chromosomique (<u>c</u> hromosomal <u>i</u> nstability)
Cytc	<u>c</u> ytochrome <u>c</u>
DAB	<u>d</u> iaminobenzidine
DBD	domaine de liaison à l'ADN (<u>D</u> NA- <u>b</u> inding <u>d</u> omain)
DEPC	<u>d</u> iéthyl pyro <u>c</u> arbonate

DKK1	<u>D</u> ick <u>k</u> opf-1
DMEM	milieu de Eagle modifié par Dulbecco (<i><u>D</u>ulbecco <u>m</u>odified <u>E</u>agle's <u>m</u>edium</i>)
dNTP	désoxy <u>n</u> ucléotide <u>t</u> riphosphate
DTT	d <u>i</u> thio <u>t</u> hréitol
EDTA	<i><u>e</u>thylene<u>d</u>iamine<u>t</u>etra<u>a</u>cetic <u>a</u>cid</i>
ER	récepteur à l'œstrogène (<i><u>E</u>strogen <u>r</u>eceptor</i>)
ERE	élément de réponse à l'œstrogène (<i><u>e</u>strogen <u>r</u>esponse <u>e</u>lement</i>)
ERR	récepteur-relié à l'œstrogène (<i><u>E</u>strogen-<u>r</u>elated <u>r</u>eceptor</i>)
ERRE	élément de réponse aux ERRs (<i><u>E</u>RR <u>r</u>esponse <u>e</u>lement</i>)
EST	étiquettes des séquences exprimées (<i><u>E</u>xpressed <u>S</u>equence <u>T</u>ags</i>)
FABP	<i><u>f</u>atty <u>a</u>cid <u>b</u>inding <u>p</u>rotein</i>
FACS	trieuse fluorescence-activée de cellules (<i><u>f</u>luorescence <u>a</u>ctivated <u>c</u>ell <u>s</u>orter</i>)
FBS	sérum bovin foetal (<i><u>f</u>etal <u>b</u>ovine <u>s</u>erum</i>)
HEPES	4-(2- <u>h</u> ydroxy <u>e</u> thyl)-1-pipérazine <u>e</u> thane <u>s</u> ulfonate

HIEC	cellules épithéliales intestinales cryptales humaines (<i>human intestinal epithelial cells</i>)
IEC-6	cellules épithéliales intestinales de rat (<i>intestinal epithelial cell-6</i>)
Kb	kilobases
kDa	kilodaltons
LBD	domaine de liaison au ligand (<i>ligand binding domain</i>)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCF-7	cellules d'adénocarcinome de sein humain (<i>Michigan cancer foundation-7</i>)
MHRE	<i>multi-hormone response element</i>
MKK	MAP kinase kinase
MSI	voie d'instabilité des microsatellites (<i>microsatellite instability</i>)
NLS	signal de localisation nucléaire (<i>nuclear localization signal</i>)
NRF	<i>nuclear respiratory factor</i>
PBS	tampon de phosphate salin (<i>phosphate-buffered saline</i>)

PCR	réaction de polymérisation en chaîne (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDK	pyruvate dehydrogenase kinase
PGC-1	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonate (<i>phenylmethylsulphonyl fluoride</i>)
PRC	PGC-1-related coactivator
PVDF	polyfluorure de vinylidène (<i>Polyvinylidene Difluoride</i>)
RIE	rat intestinal epithelial cell
rpm	rotation par minute
SDS	sodium dodecyl sulphate
Src-1	steroid receptor coactivator-1
TBS	tampon de tris salin (<i>Tris-buffered saline</i>)
TEMED	NNN'-tétraméthyléthylène diamine
T.P.	température pièce
Wt	wild type

RÉSUMÉ

IMPLICATION DU RÉCEPTEUR-RELIÉ À L'ŒSTROGÈNE ALPHA DANS LA PROLIFÉRATION DES CELLULES CANCÉREUSES COLIQUES

Thomas Lassalle

Département d'anatomie de biologie cellulaire, Département de médecine-Service de gastroentérologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

Le récepteur-relié à l'œstrogène alpha ($ERR\alpha$) est un récepteur nucléaire orphelin ayant une forte homologie de séquence avec les récepteurs à l'œstrogène, en particulier dans son domaine de liaison à l'ADN. Dans l'intestin, $ERR\alpha$ est principalement exprimé dans l'épithélium et ce du duodénum jusqu'au côlon, et une plus grande expression génique est observée dans les tissus cancéreux de côlon comparés aux tissus sains adjacents. Plusieurs études ont de plus documenté le rôle majeur de la forme complète de $ERR\alpha$ dans le contrôle du métabolisme énergétique et mitochondrial. Dans ces fonctions, les partenaires d'interaction $PGC-1\alpha$ et $PGC-1\beta$ semblent nécessaires à l'activation transcriptionnelle de $ERR\alpha$. Un troisième membre de cette famille des PGC-1, le co-activateur PRC, est induit lors de la prolifération cellulaire mais son recrutement auprès de $ERR\alpha$ n'a pas été étudié. Un variant d'épissage alternatif de $ERR\alpha$, ne possédant pas le cinquième exon, a été rapporté dans la littérature lors d'une analyse

génomique à large échelle. L'expression génique de ce variant semblait restreinte aux tissus sains non cancéreux mais son expression détaillée et sa caractérisation ne furent pas effectuées.

L'objectif principal de ma maîtrise est d'étudier le rôle et l'implication de $ERR\alpha$ dans la prolifération des cellules cancéreuses coliques. Comme premier objectif, nous avons voulu déterminer l'implication de $ERR\alpha$ dans la croissance des cellules cancéreuses du côlon. Nous avons par la suite voulu caractériser le variant d'épissage alternatif $ERR\alpha\Delta\text{exon}5$ dans l'épithélium du côlon. Finalement, nous avons amorcé l'étude d'une possible interaction entre $ERR\alpha$ et PRC, un nouveau co-activateur de la famille des PGC-1.

Selon nos résultats, la forme complète de $ERR\alpha$, qui est exprimée plus fortement dans les cellules et tissus cancéreux de côlon en comparaison à leurs homologues sains, confère un avantage prolifératif aux cellules cancéreuses. En effet, en réduisant l'expression de ce récepteur nucléaire par interférence d'ARN, nous avons remarqué un ralentissement de la croissance cellulaire de certaines lignées cellulaires cancéreuses coliques. De plus, le variant d'épissage alternatif de $ERR\alpha$, qui agit comme un dominant négatif de la forme complète, est faiblement exprimé dans les cellules cancéreuses de côlon comparativement aux cellules saines. Une surexpression de ce variant dans les mêmes lignées cellulaires cancéreuses coliques diminue aussi considérablement la croissance de ces cellules. Finalement, PRC semble être

un nouveau partenaire d'interaction de $ERR\alpha$, co-activant l'activité transcriptionnelle de celui-ci.

Ces résultats suggèrent un rôle important de la forme complète de $ERR\alpha$ dans la prolifération des cellules cancéreuses du côlon. Cette protéine pourrait s'avérer être une nouvelle cible potentielle pour le traitement du cancer colorectal.

I-INTRODUCTION

1. Le système digestif

1.1. *Caractéristiques générales*

Le tube digestif a pour principales fonctions de digérer la nourriture, d'absorber les nutriments dans le sang ou la lymphe et d'évacuer les résidus indigestibles (MARIEB et LACHAÎNE, 2005). Il est composé de plusieurs organes divisés en 2 groupes, soit les organes du tube digestif, la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin, se terminant par l'anus, et les organes annexes, les dents, la langue, la vésicule biliaire, les glandes salivaires, le foie et le pancréas (Figure 1.A.). Histologiquement, le tube digestif se compose de 4 couches tissulaires : la muqueuse, soit la couche la plus interne donnant sur la lumière du tube digestif, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse, la couche la plus externe (Fig 1.B.). Ces différentes couches tissulaires possèdent des fonctions bien distinctes. La muqueuse, comprenant l'épithélium reposant sur un tissu conjonctif, le chorion, va permettre l'absorption des produits de digestions et assurer une protection contre les agents infectieux. La sous-muqueuse, qui est composée de tissu conjonctif lâche renfermant entre autre des vaisseaux sanguins et lymphatiques, va permettre d'irriguer les autres tissus. La musculuse, qui est responsable du mouvement de péristaltisme,

est généralement composée de 2 couches musculaires bien distinctes, soit une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe. Finalement, la séreuse est composée de tissu conjonctif lâche recouvert d'une couche unique de cellules épithéliales squameuses, le mésothélium. Son rôle principal est un rôle de protection et elle sert à maintenir l'intégrité du tube digestif (MARIEB et LACHAÎNE, 2005).

1.2. *Le gros intestin*

Le gros intestin, ou côlon, est composé de plusieurs segments, selon l'axe proximal-distal : le caecum, situé à la jonction avec l'intestin grêle, l'appendice vermiforme, le côlon ascendant, transverse, descendant, sigmoïde, le rectum et le canal anal (MARIEB et LACHAÎNE, 2005). Sa principale fonction est d'absorber l'eau des résidus alimentaires indigestibles afin de les solidifier et de les évacuer hors de l'organisme sous forme de fèces. La muqueuse colonique est constituée d'un épithélium simple prismatique formant de longues cryptes ou glandes (Fig 1.C.) (SANCHO et al., 2004). À la base de ces cryptes se trouve le compartiment des cellules souches qui, avec leur caractère pluripotent, vont donner naissance à différentes cellules progénitrices multipotentes. Ces cellules progénitrices vont se déterminer en cellules progénitrices monopotentes qui vont migrer dans les deux tiers inférieurs de la crypte et, suite à l'arrêt du cycle cellulaire, vont se

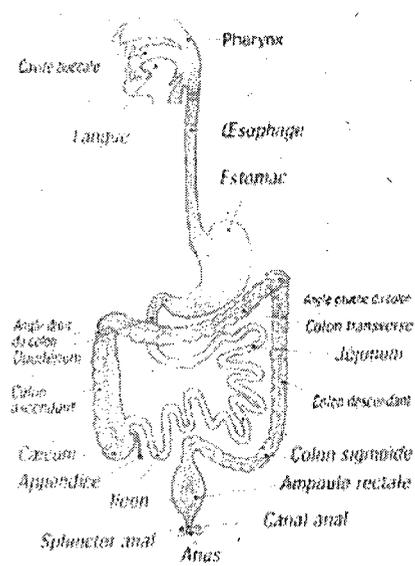
Figure 1. Le tube digestif et la structure de la muqueuse colonique. (A) Le système digestif est composé des organes du tube digestif (la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin se terminant par l'anus) et des organes annexes (les dents, la langue, la vésicule biliaire, les glandes salivaires, le foie et le pancréas). **(B)** Les 4 couches tissulaires de la muqueuse du côlon sont la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. **(C)** L'épithélium colonique est composé de longues cryptes et d'un épithélium simple prismatique. Les cellules souches, localisées dans le fond de la crypte, vont subir plusieurs divisions cellulaires et donner naissance aux cellules progénitrices. Ces cellules vont effectuer une migration ascendante et progressivement entamer un processus de différenciation cellulaire. Les 3 types cellulaires différenciés présents dans la crypte du côlon sont les cellules absorbantes (colonocytes), les cellules à mucus et les cellules entéroendocrines.

A : Adapté de http://www.acreunion.fr/pedagogie1/circons/port1/site_web/fonctionnutrition/tubedigestif.htm

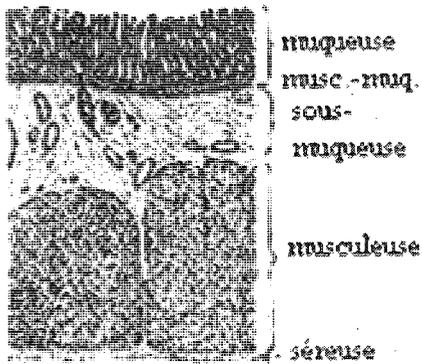
B : Adapté de <http://www.ac-orleans-tours.fr/svt/theme3/extissu.htm>

C : Adapté de Sancho et al., 2004

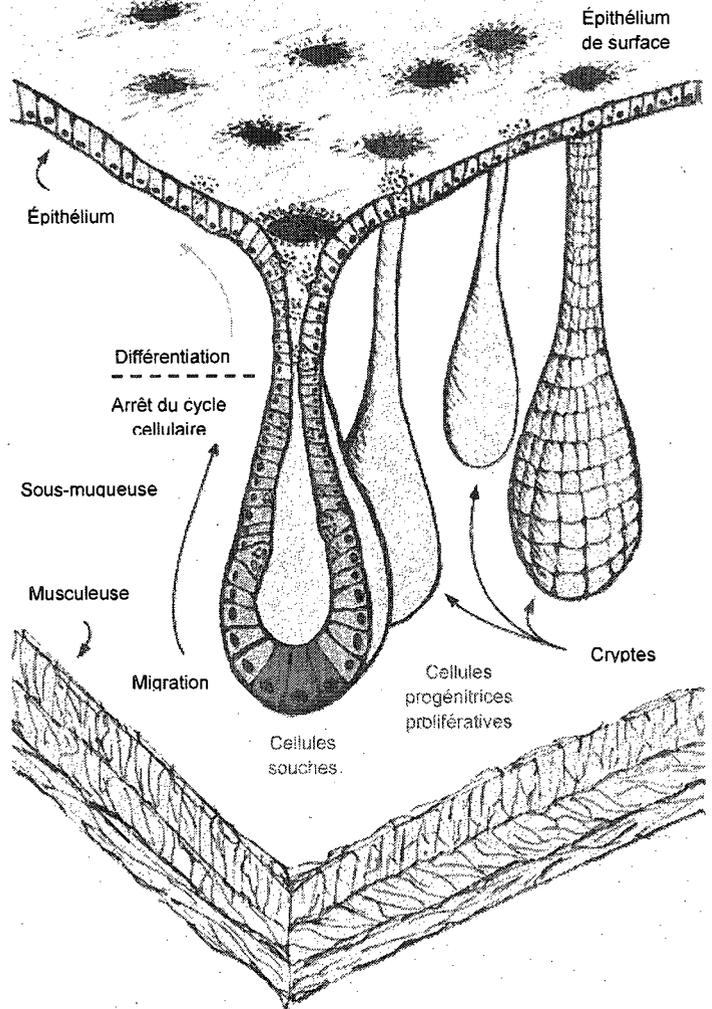
A



B



C



différencier et donner naissance aux trois types cellulaires différenciés retrouvés dans l'épithélium colonique : les colonocytes ou cellules absorbantes, les cellules caliciformes ou cellules à mucus et les cellules entéroendocrines ou cellules sécrétant différentes hormones. Ces cellules sont retrouvées dans le tiers supérieur de la crypte colonique et vont continuer leur migration jusqu'à la surface épithéliale avant de se détacher et mourir par anoïkose dans la lumière du tube digestif (SANCHO et al., 2004).

2. La prolifération cellulaire

Au niveau du côlon sain, la prolifération cellulaire est un événement qui a lieu dans les cellules retrouvées au bas de la crypte colique. Les cellules qui cherchent ainsi à se multiplier vont suivre différentes étapes compilées dans ce qu'on appelle le cycle cellulaire.

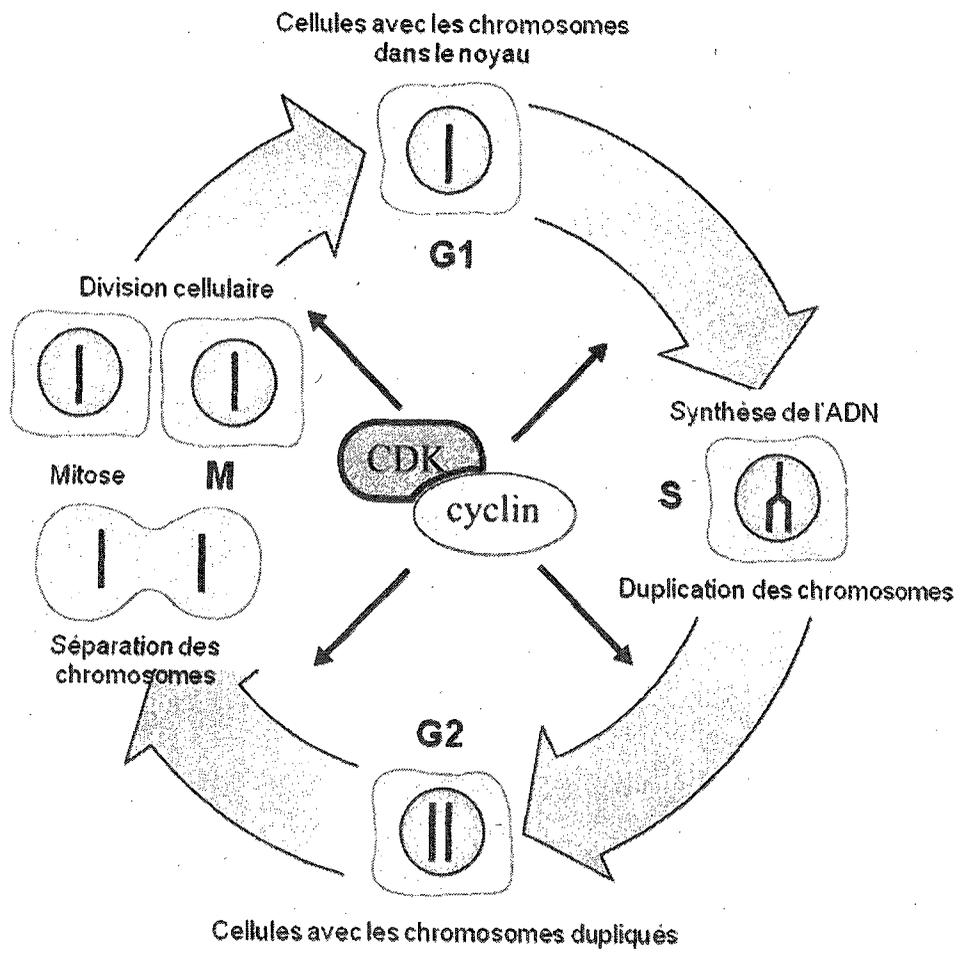
2.1. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire, dont les différentes étapes mènent à la division cellulaire, est constitué de deux stades principaux : l'interphase et la mitose (Fig 2). Ces différents stades vont varier dans le temps majoritairement selon le type cellulaire. L'interphase est composée de 3 phases distinctes, soit G1, S et G2, avec une phase possible de quiescence cellulaire, G0. Les cellules qui sont dans cette phase, dont la durée est très variable, vont entrer dans le cycle cellulaire en réponse à différents stimuli, comme des facteurs de

croissance ou des hormones mitogéniques. La phase G1, ou phase de doublement du contenu protéique, peut durer de dix heures à quelques jours. Suit ensuite la phase S ou phase de synthèse d'ADN où il y a duplication de la chromatine. Cette phase dure environ six heures. Finalement, la phase G2, ou phase de préparation à la division cellulaire, la mitose. Durant cette phase, qui dure environ quatre heures, il y aura une condensation de la chromatine en chromosomes, ainsi qu'une duplication des centrioles et des centrosomes (Notes de cours Dre Rivard H06). La mitose quant à elle est composée de quatre phases distinctes, soit la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Lors de la prophase, la membrane nucléaire se dissout et il y a la formation du fuseau mitotique à partir des deux centrioles placés aux extrémités de la cellule. Les microtubules qui projettent vers le centre de la cellule vont aller s'attacher aux kinétochores des chromatides sœurs qui sont reliées par leur centromère. Lors de la prochaine phase, la métaphase, il y aura un positionnement des chromosomes par les microtubules sur un plan équatorial. Par la suite, lors de l'anaphase, il y aura séparation des deux chromatides sœurs qui vont migrer aux sens opposés de la cellule vers les centrioles. Finalement, lors de la télophase, il y a la division cellulaire ou cytotélorèse au cours de laquelle une nouvelle enveloppe nucléaire va se former et il y aura l'apparition de deux nouvelles cellules filles (Notes de cours Dre Rivard H06).

Figure 2. Le cycle cellulaire. (A) Schéma représentatif du cycle cellulaire qui est constitué de 2 stades principaux : l'interphase et la mitose. L'interphase possède 3 phases distinctes : G1, S et G2. La mitose est composée de 4 phases : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Les différentes phases du cycle cellulaire sont régulées par les complexes cyclines-cdks.

Adapté de http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2001/press.html



2.1.1. La régulation du cycle cellulaire

Tout au long de la progression du cycle cellulaire, plusieurs points de contrôle sont présents afin de vérifier et de contrôler au moment présent l'état de la cellule ainsi que son environnement immédiat. Ainsi, les quatre points de contrôles majeurs sont situés avant l'entrée en phase S, pendant la phase S, avant l'entrée en phase M et pendant la phase M. Lors du premier point de contrôle, la cellule s'assure d'avoir un environnement favorable à la poursuite du cycle cellulaire. Le deuxième point de contrôle est utile afin que la cellule s'assure que la réplication de l'ADN se passe correctement. Lors du troisième point de contrôle, avant l'entrée en mitose, la cellule vérifie que son ADN est bien répliqué. Finalement, le dernier point de contrôle pendant la mitose sert à contrôler que tous les chromosomes soit bien attachés et bien alignés au fuseau mitotique afin d'obtenir une séparation adéquate de ceux-ci. L'environnement de la cellule est toujours vérifié lors de ces trois derniers points de contrôle (Notes de cours Dre Rivard H06). Derrière ce système de régulation du cycle cellulaire se trouve deux familles de protéines, les cdks (*cyclin-dependent kinase*) et les cyclines. Les cdks sont des sérine/thréonine kinases ayant une expression constitutive. Cependant, leur activité va osciller tout au long du cycle cellulaire permettant ainsi une régulation de la phosphorylation de protéines importantes pour la poursuite du cycle cellulaire. Cette variation d'activation est régulée par une famille de protéines, les cyclines, dont l'expression cyclique des membres de cette famille à différentes phases du cycle cellulaire va permettre de réguler l'activité des cdks. En effet,

il existe quatre cyclines principales chez les vertébrés, les cyclines A, B, D et E, ayant chacune une expression distincte lors du cycle cellulaire. Il existe aussi quatre cdks majeures chez les vertébrés, les cdks 1, 2, 4 et 6. Les cyclines vont ainsi s'associer aux cdks pour former un complexe cycline-cdk afin de réguler différentes protéines du cycle cellulaire. Il existe aussi différents inhibiteurs du cycle cellulaire agissant soit en empêchant la formation des complexes cycline-cdk, soit en inhibant l'activité de ces derniers. Ces inhibiteurs sont regroupés en deux familles, la famille des INK ($p15^{\text{INK4B}}$, $p16^{\text{INK4A}}$, $p18^{\text{INK4C}}$ et $p19^{\text{INK4D}}$), qui inhibe la formation des complexes cycline D-cdk 4/6, et la famille des CIP/KIP ($p21^{\text{CIP}}$, $p27^{\text{KIP1}}$ et $p57^{\text{KIP2}}$), qui inhibe l'activité des complexes cycline E-cdk2, cycline A-cdk2 et cycline B-cdk1 (Notes de cours Dre Rivard H06).

Si on se concentre sur la régulation du cycle cellulaire et la prolifération des cellules épithéliales intestinales, on se rend compte que plusieurs voies de signalisation y sont impliquées, telles les voies de signalisation des MAP Kinases ERK 1/2 (ALIAGA et al., 1999, RIVARD et al., 1999), Wnt/ β -caténine (PINTO et al., 2003), PI3K/Akt (SHENG et al., 2003) et Notch (FRE et al., 2005). En effet, il a été montré en utilisant une souris transgénique surexprimant l'inhibiteur de wnt sécrété DKK1, et ce sous le contrôle du promoteur de la villine, que le nombre et la taille des cryptes et des villosités de l'intestin grêle étaient grandement diminués (PINTO et al., 2003). Une autre étude a montré qu'un traitement avec l'inhibiteur sélectif de la PI3K, le LY-294002, réduisait de 80% la croissance des cellules épithéliales

intestinales de rat (RIE) et résultait en une accumulation de ces cellules en phase G1 du cycle cellulaire (SHENG et al., 2003). De plus, la surexpression d'un mutant dominant négatif de PI3K dans les cellules RIE amenait une baisse des niveaux de Akt phosphorylé ainsi que de cycline D1. Au niveau de la voie de signalisation des MAP kinases ERK 1/2, une étude a répertorié l'importance de cette voie pour l'entrée en phase S des cellules épithéliales intestinales de rat IEC-6 (RIVARD et al., 1999). Un traitement des cellules IEC-6 avec l'inhibiteur des MKK-1/2, le PD-98059, amène une augmentation de l'expression de l'inhibiteur p27^{KIP1}, alors que la surexpression de ras dans les cellules IEC-6 amène une diminution de l'expression de ce même inhibiteur ainsi qu'une augmentation de l'activité transcriptionnelle dépendante de E2F.

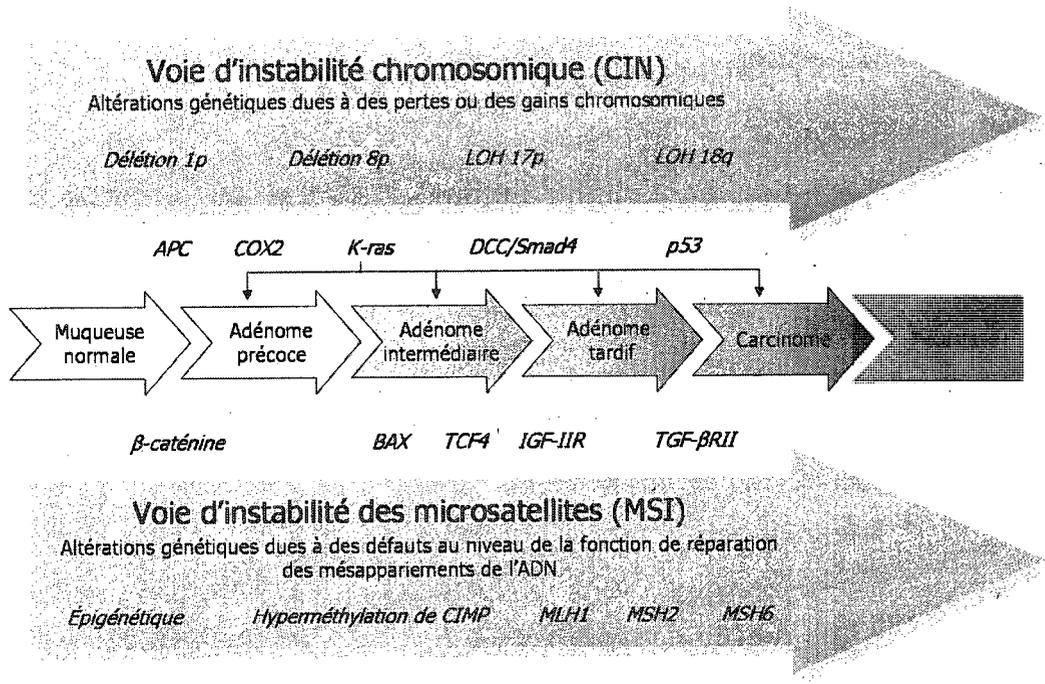
2.2. *Le cancer colorectal*

Le cancer colorectal est la troisième cause de décès par cancer au Canada, et ce autant chez l'homme que chez la femme, après le cancer de la prostate et des poumons chez l'homme et des poumons et des seins chez la femme (http://www.statcan.ca/francais/studies/82-003/archive/2001/12-2-c_f.pdf). Le cancer colorectal va se caractériser par différents stades histologiques, allant de bien différencié à peu différencié. En premier lieu, il y aura la formation de cryptes aberrantes hyperprolifératives, menant par la suite au stade d'adénome, ou tumeur bénigne, alors que plusieurs cryptes vont s'embrancher (CARDOSO et al., 2007). À ce stade, la membrane basale

n'est pas encore traversée par les cellules cancéreuses. Ensuite vient le stade d'adénome tardif puis carcinome précoce, alors que les cellules cancéreuses vont pénétrer dans le stroma à travers la membrane basale, et elles pourront ainsi atteindre la circulation lymphatique et sanguine et se développer en métastase (CARDOSO et al., 2007, VAN LEEUWEN et al., 2007). Dans le cancer colorectal, ces changements histologiques peuvent s'expliquer par des changements génétiques répertoriés sous deux voies principales : la voie d'instabilité chromosomique (CIN) et la voie d'instabilité des microsatellites (MSI), la première voie engendrant environ 85% des cancers colorectaux (SOREIDE et al., 2006) (Fig 3). Cette voie, qui se caractérise par des modifications de parties ou de chromosomes entiers, affecte plusieurs gènes. La mutation du gène suppresseur de tumeur APC (*adenomatous polyposis coli*) semble d'ailleurs être l'étape clé et initiatrice à la formation d'un adénome précoce dans les cas de cancer colorectaux (CARDOSO et al., 2007, SOREIDE et al., 2006). Ces altérations du gène APC font en sorte que la β -caténine n'est plus dégradée et ainsi accumulée, menant à une activation exagérée de la prolifération cellulaire. D'autres mutations de gènes sont retrouvées à des stades plus avancés dans la carcinogénèse colorectale, citant les mutations de l'oncogène K-ras important dans la voie de signalisation des ERK MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), alors que cette voie, qui régule la prolifération cellulaire, est activée de façon constitutive. Il y a aussi la mutation du gène suppresseur de tumeur p53, qui permet le passage d'adénome à carcinome, étant muté dans 45%

Figure 3. La cascade génétique de la carcinogenèse colorectale. Les altérations génétiques observées dans le cancer colorectal peuvent être séparées en 2 voies, soit la voie d'instabilité chromosomique (CIN) et la voie d'instabilité des microsatellites (MSI). Le cancer est le résultat d'une accumulation de mutations qui vont fournir un potentiel prolifératif et invasif aux cellules tumorales.

Adapté de Soreide et al., 2006



des cancers colorectaux (CARDOSO et al., 2007). Ainsi, la mutation entraîne des erreurs de réplication et des mutations dans l'ADN étant bénéfiques à la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses, car p53, considéré normalement comme le gardien du génome en repérant ces erreurs et en recrutant les enzymes importantes à la réparation, n'est plus fonctionnel. Concernant l'autre voie impliquée dans le développement de la carcinogénèse colorectale, la voie d'instabilité des microsatellites, il s'agit de défauts au niveau des enzymes responsables de la réparation des mésappariements de l'ADN, qui mènent à des erreurs dans la réplication de l'ADN (SOREIDE et al., 2006). Certains gènes seront ainsi mutés, comme par exemple encore une fois la β -caténine, qui aura ce même effet pro-prolifératif, alors que la protéine ne pourra pas être ciblée et dégradée par le protéasome. Toutes ces altérations génétiques vont ainsi mener à des changements histologiques et morphologiques et seront responsables du développement du cancer colorectal.

3. Les récepteurs-reliés à l'œstrogène (ERRs)

3.1. Découverte et structure

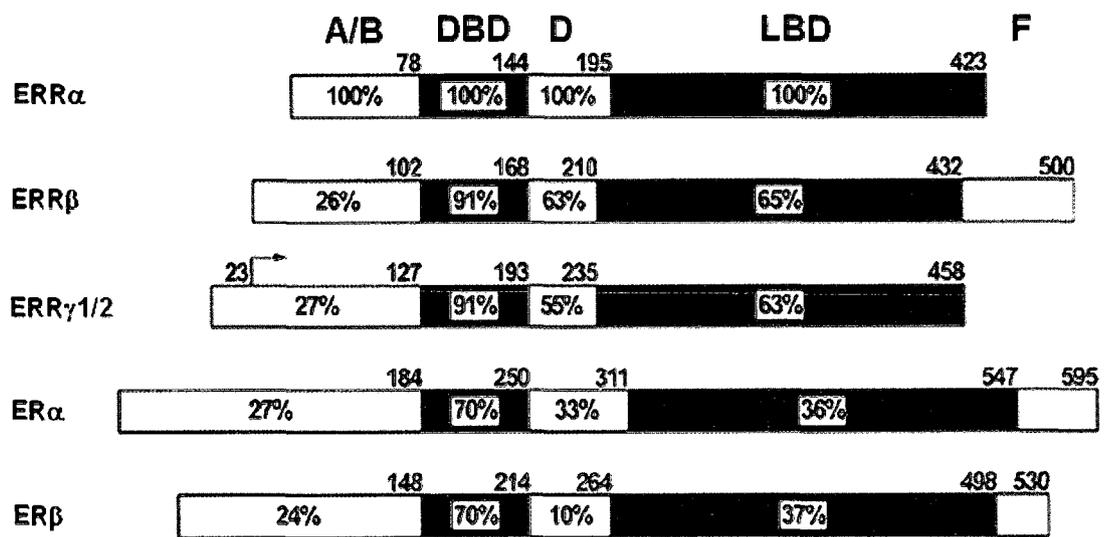
Les ERRs sont des récepteurs nucléaires orphelins n'ayant pas à ce jour de ligand naturel connu. Ils font partie du troisième groupe de l'arbre phylogénétique des récepteurs nucléaires qui comprend aussi les récepteurs

des androgènes (ARs), progestérones (PRs), minéralocorticoïdes (MRs), glucocorticoïdes (GRs) et estrogènes (ERs) (GIGUERE, 2002). La famille des ERRs est composée de trois membres, soit $ERR\alpha$ (NR3B1), β (NR3B2) et γ (NR3B3). $ERR\alpha$ et β furent découverts en 1988 lorsqu'un groupe de recherche a utilisé l'ADN_c du domaine de liaison à l'ADN (DBD) de $ER\alpha$ et l'a pris comme sonde d'hybridation sur une bibliothèque d'ADN_c de testicule humain (GIGUERE et al., 1988). Ils ont ainsi identifié deux nouveaux gènes encodant pour deux nouveaux récepteurs nucléaires ayant une similitude structurelle dans leur DBD avec les ERs : ERR1 ou $ERR\alpha$ humain ($hERR\alpha$) et ERR2 ou $ERR\beta$ humain ($hERR\beta$). $ERR\gamma$ humain ($hERR\gamma$), quant à lui, a été cloné en 2000 par Heard et collaborateurs alors que ce groupe de recherche a criblé une banque d'EST et effectué une recherche BLAST pour des séquences similaires à certains récepteurs nucléaires (HEARD et al., 2000). Les gènes des différents isoformes des ERRs sont localisés sur les chromosomes 11q12-q13, 14q24.3 et 1q41 pour $hERR\alpha$, β et γ respectivement (EUDY et al., 1998, SHI et al., 1997).

Lorsque l'on regarde l'organisation structurelle des récepteurs ERRs, on voit qu'elle est semblable à celle des autres récepteurs nucléaires de la superfamille, soit composée de 5 domaines principaux (Fig 4). À l'extrémité amino-terminale se retrouve la région A/B contenant normalement la fonction de transactivation ligand-indépendante AF-1, qui est cependant présente uniquement sur l'isoforme γ . Certains co-activateurs interagissent de façon spécifique avec ce domaine (HENTSCHKE et BORGMEYER, 2003). Suit

Figure 4. Les récepteurs à l'œstrogène et les récepteurs-reliés à l'œstrogène. Représentation schématique de la séquence d'acides aminés des différents récepteurs. Le domaine A/B comprend une fonction de transactivation ligand indépendante, AF-1. Le DBD comprend 2 doigts de zinc responsables de la liaison du récepteur à l'ADN. Le domaine D est un domaine charnière et comprend un signal de localisation nucléaire (NLS). Le LBD comprend la fonction de transactivation ligand dépendante AF-2 ainsi que des sites de liaisons aux co-activateurs. Le domaine F lorsque présent est responsable de l'interaction avec les co-répresseurs.

Adapté de Ariazi et al., 2006



ensuite la région C ou DBD qui contient deux motifs en doigts de zinc permettant la reconnaissance et la liaison de séquence spécifique sur l'ADN ainsi qu'une séquence de dimérisation des récepteurs, une autre étant située dans le domaine de liaison à l'ADN (LBD) (PERLMANN et al., 1996). Le DBD est d'ailleurs la région possédant le plus d'homologie de séquence entre les ERRs et les ERs. Cette forte homologie va permettre aux ERRs de lier la séquence consensus palindromique inversée ERE (AGGTCAnnnTGACCT) (HENTSCHKE et al., 2002, PETTERSSON et al., 1996, VANACKER et al., 1999) mais lier avec plus de spécificité la séquence ERRE (TnAAGGTCA) (GEARHART et al., 2003, GIGUERE, 2002). Par la suite, on retrouve le domaine charnière D qui contribue au repliement de la protéine et qui contient aussi un signal de localisation nucléaire présent chez les différents ERs et ERRs (ZHOU et al., 2006). On retrouve ensuite le domaine E ou LBD qui contient aussi la fonction de transactivation ligand-dépendante AF-2. Ce domaine est responsable de la liaison des co-activateurs transcriptionnels et possède aussi une fonction de dimérisation (ROLLEROVA et URBANCIKOVA, 2000). Le LBD comprend une poche de liaison au ligand qui, pour $ERR\alpha$, est la plus petite poche de liaison au ligand répertoriée à travers les différents récepteurs nucléaires. Étant remplie de chaîne latérale d'a.a., le volume restant de cette poche est de 100 Å, faisant en sorte qu'un ligand possible ne pourrait pas dépasser 4-5 atomes non-hydrogène (KALLEN et al., 2004). Il est cependant répertorié dans la littérature la présence d'un antagoniste synthétique sélectif de $ERR\alpha$, le XCT790, qui

pourrait être utilisé afin d'élucider les rôles physiologiques de $ERR\alpha$ (BUSCH et al., 2004). Finalement, en C-terminal se situe le domaine F qui n'est pas retrouvé chez tous les récepteurs nucléaires et qui est absent chez $ERR\alpha$.

3.2. *La liaison à l'ADN*

3.2.1. Les ERRs et les différentes séquences consensus

Le DBD est le domaine ayant le plus d'homologie entre les récepteurs ERRs et ERs, soit 70% entre $ERR\alpha$ et les ERs (ARIAZI et JORDAN, 2006). Ce fort degré d'homologie va permettre aux ERRs de lier la séquence consensus ERE reconnue par les ERs. En effet, $ERR\alpha$ (VANACKER et al., 1999a), $ERR\beta$ (PETTERSSON et al., 1996) et $ERR\gamma$ (HENTSCHKE et al., 2002) vont lier la séquence consensus ERE sous forme d'homodimère. Les ERRs vont cependant reconnaître avec plus d'affinité la séquence consensus ERRE qui consiste en la moitié de la séquence palindromique inversée ERE avec un ajout de trois nucléotides en 5' (**TnAAGGTCA**). Cette séquence a préalablement été découverte comme étant liée par le récepteur nucléaire orphelin important dans le métabolisme endocrinien, SF-1 (HAMMER et al., 1999), et porte aussi le nom de SF-1 response element (SFRE). $ERR\alpha$ va lier ERRE sous forme de monomère (JOHNSTON et al., 1997) et aussi sous forme d'homodimère (VANACKER et al., 1999b). D'ailleurs, une étude a montré que le deuxième nucléotide en 5' de la séquence consensus ERRE

est important pour la spécificité de liaison d'ERR α à ERRE (BARRY et al., 2006). La présence d'un nucléotide C ou G à cette position va mener à la liaison d'ERR α sous forme de monomère alors que la présence d'un nucléotide A ou T va faire en sorte qu'ERR α se liera à ERRE sous forme d'homodimère. ERR β va quant à lui se lier à ERRE sous forme de monomère (GEARHART et al., 2003) et ERR γ va s'y lier sous forme d'homodimère (HENTSCHKE et al., 2002). Une étude a documenté l'interaction possible *in vitro* entre ERR α et ERR γ , l'hétérodimère formé agissant cependant comme répresseur de l'activité transcriptionnelle d'ERR α et ERR γ sur un promoteur contenant la séquence ERRE (HUPPUNEN et AARNISALO, 2004).

3.2.2. Les ERRs et la voie oestrogénique

Comme mentionné précédemment, les ERRs et les ERs ont un haut degré d'homologie dans leur DBD, et les ERRs peuvent lier la séquence ERE. ER α et β ont été documentés comme liant la séquence ERE sous forme d'homo ou hétérodimère (ROLLEROVA et URBANCIKOVA, 2000). À l'inverse, une étude a aussi rapporté qu'ER α , mais pas ER β , pouvait lier ERRE sous forme d'homodimère (VANACKER et al., 1999b). De plus, il a été montré qu'ERR α et ER α pouvaient interagir *in vitro* par essais de protéines GST (JOHNSTON et al., 1997). Avec toutes ces données, il n'est pas surprenant de voir qu'ERR α et ER α vont réguler l'expression de mêmes gènes cibles dont l'expression est induite par l'oestrogène. Il a ainsi été rapporté, dans un modèle murin, qu'ERR α régulait à la hausse l'expression du

gène de l'ostéopontine dans les ostéoblastes, cette protéine servant de molécule d'adhésion permettant un meilleur remodelage osseux, et ce en se liant à des séquences ERRE présentes sur le promoteur de ce gène (VANACKER et al., 1998). Au niveau des cellules de l'endomètre, une étude a rapporté la liaison d'ERR α sur le promoteur du gène de la lactoferrine (ZHANG et TENG, 2000), qui est une glycoprotéine liant le fer et possédant de multiples fonctions. ERR α va lier différentes séquences ERE et ERRE présente sur le promoteur de ce gène et le transactiver de façon constitutive. ERR α a aussi été répertorié comme régulant plusieurs gènes ayant un effet direct sur la production d'oestrogène. Ainsi, dans le sein, ERR α régule l'expression de l'aromatase, une enzyme impliquée dans la conversion des androgènes en œstrogène (YANG et al., 1998). De plus, ERR α va lier le promoteur et activer l'expression de la SULT2A1 (*dehydroepiandrosterone (DHEA) sulfotransferase*), qui sert à stabiliser le DHEA, précurseur de la testostérone, cette dernière étant le substrat de l'aromatase (SEELY et al., 2005). Aussi, ERR α va activer la transcription du gène de pS2, un marqueur de cancer du sein (LU et al., 2001). Une étude a aussi répertorié une compétition de liaison à l'ADN et aux co-activateurs pour ERR α et ER α , et ce sur le promoteur de la lactoferrine dans les cellules de l'endomètre (ZHANG et TENG, 2001). En effet, les deux récepteurs compétitionnent pour la liaison aux sites ERE présents sur le promoteur mais aussi pour la liaison au co-activateur SRC-1 (*steroid receptor co-activator 1*) *in vitro*. Il a aussi été rapporté que le gène d'ERR α était une cible directe d'ER α (LIU et al., 2003).

Sur le promoteur du gène $ERR\alpha$, il y a la présence de multiples séquences consensus reconnues par les récepteurs stéroïdiens (MHRE), soit trois séquences ERRE et deux séquences ERE, ces motifs ayant une orientation telle qu'ils peuvent être reconnus par différents récepteurs nucléaires (LIU et al., 2005). Les MHRE sont d'ailleurs très bien conservés autant sur le promoteur d' $ERR\alpha$ murin qu'humain. Ainsi, dans les cellules MCF-7 provenant de carcinomes de sein, un traitement à l'œstrogène augmente la liaison d' $ER\alpha$ sur le promoteur d' $ERR\alpha$ *in vivo* et augmente l'expression de ce dernier.

3.3. Les variants d'épissage

Il est connu que plusieurs récepteurs nucléaires ou facteurs de transcription possèdent différents variants d'épissage alternatif qui peuvent posséder une expression différentielle spécifique à un tissu. D'autres aussi auront une différence d'expression entre le tissu sain et cancéreux. Un groupe de recherche a ainsi documenté un différentiel d'expression de variants d'épissage entre le tissu sain et cancéreux en effectuant une étude sur plus de 2 millions de marqueurs de séquences exprimées (EST) (XU et LEE, 2003). Ils ont ainsi documenté la présence d'un variant d'épissage d' $ERR\alpha$ ayant une délétion de l'exon 5 ($ERR\alpha\Delta$ exon5), présent dans le tissu sain et absent dans le tissu cancéreux. L'épissage de l'exon 5 amène une délétion de 57 a.a. se retrouvant à la jonction du domaine charnière D et du LBD. La

région de dimérisation présente dans le LBD d'ERR α reste intacte mais la délétion amène la perte d'un aa important, la Phénylalanine 329 (Phe329).

3.3.1. L'importance de la phénylalanine 329

L'importance de cet a.a. a été montrée dans une étude utilisant un mutant d'ERR α ayant une mutation de la Phe329 en une Alanine (F329A) (CHEN et al., 2001). Par analyse cristallographique, ils ont documenté que la chaîne latérale de la Phe329 était située dans la poche de liaison au ligand, mimant ainsi la liaison constante d'un ligand sur ERR α . La douzième hélice alpha du LBD (H12) va ainsi se placer en position active en recouvrant l'ouverture de la poche de liaison au ligand, libérant la fonction de transactivation AF-2 pour permettre la liaison des co-activateurs transcriptionnels, la liaison se faisant sur les hélices 3, 4 et 12. Ainsi, avec le mutant F329A, ce groupe de recherche a montré que l'hélice H12 n'allait plus se placer en position active sur la poche de liaison au ligand, ne libérant pas la fonction de transactivation AF-2 et ne permettant pas la liaison des co-activateurs transcriptionnels. Ils ont donc observé un effet dominant négatif du mutant F329A sur la forme complète d'ERR α et ce en diminuant considérablement l'activation transcriptionnelle de la forme complète. De plus, ils ont montré que le co-activateur GRIP1 (*glutamate receptor interacting protein 1*) n'avait plus d'effet de potentialisation sur le mutant F329A, comparé à son effet marqué sur la forme complète. Le mutant ne semblait donc pas être lié et activé par le co-activateur.

3.4. L'expression des ERRs

3.4.1. L'expression dans les différents tissus et modèles murins

Chez l'humain adulte, une étude a répertorié l'expression de l'ARN_m d'ERR α dans différents tissus (SHI et al., 1997). Ainsi, ERR α est fortement exprimé dans le cœur et le muscle squelettique, avec une forte mais moindre expression dans le rein, le pancréas, le petit intestin et le côlon. Dans un modèle murin adulte, une autre étude a montré une forte expression de l'ARN_m d'ERR α dans le cœur, le cerveau, le muscle et le rein (SLADEK et al., 1997). Au niveau du tube intestinal murin, une étude a montré l'expression d'ERR α et ce de l'estomac au côlon, avec une forte expression dans les différents segments de l'intestin, soit le duodénum, le jéjunum et l'iléon (CARRIER et al., 2004). La forte expression d'ERR α est donc observée dans les tissus ayant un métabolisme énergétique cellulaire élevé et nous laisserait présager un rôle d'ERR α dans le métabolisme lipidique et énergétique.

Un groupe de recherche a ainsi généré une souris déficiente pour ERR α , la souris ERR α ^{-/-}, afin d'étudier le rôle de cette protéine (LUO et al., 2003). Ils ont observé premièrement que la souris était viable, fertile et qu'aucune anomalie morphologique n'était apparente, suggérant qu'ERR α ne semble pas avoir de rôle significatif dans le développement murin. Cependant, ils ont répertorié que le poids et la masse graisseuse des souris ERR α ^{-/-} étaient inférieurs à ceux des souris de type sauvage, soit ERR α ^wt

(*wild type*). Ils ont ainsi remarqué que le nombre d'adipocytes ne variait pas entre les deux souris, mais que leur taille était réduite chez les souris $ERR\alpha^{-/-}$. Ils ont de plus montré que les souriceaux $ERR\alpha^{-/-}$ étaient résistants à l'obésité induite par une diète riche en gras en les comparant avec les souriceaux $ERR\alpha^{wt}$, laissant présager un rôle d' $ERR\alpha$ dans le métabolisme énergétique et lipidique. Sachant que l'intestin est le premier organe impliqué dans le métabolisme des lipides alimentaires, une étude s'est penchée sur le rôle d' $ERR\alpha$ dans l'intestin, utilisant le modèle murin $ERR\alpha^{-/-}$ (LUO et al., 2003). Ils ont effectué une analyse de type micropuce sur des tissus d'intestin des souris $ERR\alpha^{-/-}$ et $ERR\alpha^{wt}$ afin de vérifier s'il y avait une expression différentielle de gènes entre les deux groupes. Ils ont répertorié une diminution dans l'expression de gènes importants dans le métabolisme énergétique mitochondrial, plus précisément dans la chaîne de transport des électrons. Les gènes dont l'expression est diminuée codent pour la NADH déshydrogénase et la cytochrome c oxydase, impliqués dans la formation d'un gradient électrochimique en couplant le transfert d'électrons à la pompe à protons, ainsi que l'ATP synthase, qui, en utilisant le gradient électrochimique va permettre la synthèse d'ATP. Ils ont de plus montré que chez les souris $ERR\alpha^{-/-}$ comparées aux souris $ERR\alpha^{wt}$, il y avait une diminution de la β -oxydation mitochondriale dans les cellules épithéliales intestinales et ce en mesurant la capacité d'oxydation de l'acide palmitique. On peut donc observer un rôle potentiel d' $ERR\alpha$ dans le métabolisme mitochondrial. À partir de ces mêmes analyses de micropuce, le groupe de

recherche a aussi observé une modulation à la baisse, dans les souris $ERR\alpha^{-/-}$ comparées aux souris $ERR\alpha^{wt}$, de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique intestinal. L'expression des gènes codant pour la PLRP2 (*pancreatic lipase-related protein 2*), la L et I-FABP (*liver et intestinal fatty acid binding protein*) ainsi que la apoA-IV (*apolipoprotein A-IV*) sont régulés à la baisse chez les souris $ERR\alpha^{-/-}$ comparées aux souris $ERR\alpha^{wt}$. La PLRP2 est une lipase pancréatique, alors que la L et I-FABP sont des protéines liant les lipides et permettant le transport de ces derniers. ApoA-IV, quant à elle, est une composante des lipoprotéines riches en triglycérides tels les chylomicrons qui sont sécrétés par les entérocytes et qui sont importants dans le transport lipidique. Ce groupe a, de plus, montré que le gène d'apoA-IV était une cible directe d' $ERR\alpha$ alors que celui-ci interagit avec le promoteur d'apoA-IV et qu'il en active la transcription. De plus, suite à un gavage riche en lipides des souris $ERR\alpha^{-/-}$ et $ERR\alpha^{wt}$, ils ont remarqué que l'expression d'apoA-IV était augmentée dans les souris contrôles mais pas dans les souris mutantes, permettant ainsi de bien documenter le rôle d' $ERR\alpha$ dans le métabolisme lipidique intestinal.

Chez l'humain adulte, $ERR\beta$ est exprimé dans le cerveau et l'intestin, et très faiblement dans le rein, le cœur et les testicules (GIGUERE et al., 1988). L'ARN_m de $ERR\beta$ n'est cependant pas détecté dans le côlon humain (CAVALLINI et al., 2005). Le rôle le plus important d' $ERR\beta$ se situe principalement au niveau du développement embryonnaire, une étude ayant montré que les souris déficientes pour $ERR\beta$, les souris $ERR\beta^{-/-}$, mourraient in

utero aux jours embryonnaires 9.5 à 10.5, et ce suite à un développement placentaire anormal (LUO et al., 1997).

ERR γ quant à lui est fortement exprimé chez l'adulte dans le cœur, le cerveau, le placenta, le rein et le pancréas, avec des niveaux plus faibles dans la rate, la prostate et l'intestin grêle (HEARD et al., 2000).

3.4.2. L'implication des ERRs dans les cancers

3.4.2.1. Cancers hormonaux-dépendants

Comme mentionné précédemment, ERR α peut réguler l'expression de plusieurs gènes cibles d'ER α tels que pS2, l'aromatase, l'osteopontine et la lactoferrine. Ainsi, on vient de voir qu'ERR α peut moduler la voie de signalisation de l'œstrogène. Plusieurs études se sont donc intéressées à l'expression et l'implication d'ERR α dans différents cancers hormonaux-dépendants. Il a ainsi été montré par immunohistochimie que l'expression et la localisation nucléaire d'ERR α était augmentée dans les tissus de carcinomes de sein comparés aux tissus sains adjacents (SUZUKI et al., 2004). De plus, un groupe de recherche s'est intéressé à l'implication d'ERR α dans le cancer du sein. Ils ont remarqué que les tumeurs ERR α -positives étaient généralement ER α -négatives et ErbB2-positives, ce dernier étant un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase dont l'expression est associée avec une agressivité tumorale accrue (ARIAZI et al., 2002). Il a

aussi été montré qu'ERR α pouvait moduler à la baisse la transcription de gènes cibles suite à un traitement à l'estradiol en effectuant une répression active sur ER α , et ce dans les cellules de carcinome de sein MCF-7. Cependant, ces cellules expriment très faiblement le récepteur ErbB2, une autre étude ayant montré qu'ERR α allait agir comme un activateur de la transcription de gènes cibles dans les cellules de carcinome de sein SK-BR-3 surexprimant ErbB2 (KRAUS et al., 1987, KRAUS et al., 2002). En résumé, ERR α agit comme un mauvais facteur pronostique dans le cancer du sein. Son expression dans les tumeurs est majoritairement associée à une absence d'expression d'ER α et une expression du mauvais facteur pronostique ErbB2. Celui-ci pourrait contribuer à la phosphorylation d'ERR α , qui agirait à son tour sur différents gènes cibles d'ER α . Ainsi, ERR α serait une cible thérapeutique distincte de ER α dans les cancers hormonaux-dépendants, alors que le traitement anti-œstrogénique usuel n'aurait pas d'effet sur l'activité constitutive de ERR α .

ERR γ quant à lui, avec une expression augmentée dans les tissus cancéreux comparés aux tissus sains adjacents, a été montré comme étant un bon facteur pronostique pour le cancer du sein. ERR γ est associé avec l'expression positive de ER α et ErbB4, autre membre de la famille des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase, qui est cependant un facteur de bon pronostique (ARIAZI et al., 2002).

Si on regarde maintenant l'expression d'ERR α dans le cancer de l'ovaire, un groupe de recherche a montré qu'il y avait une augmentation de

l'expression d'ERR α dans les lignées cellulaires et les tissus cancéreux comparés à leurs homologues sains (SUN et al., 2005). Cependant, dans ce cas, les cancers expriment aussi des hauts niveaux d'ER α , mais répondent mal à un traitement hormonal. Il est ainsi envisagé qu'ERR α agirait sur les gènes cibles d'ER α et ne répondrait pas à un traitement avec des anti-œstrogènes. Ils ont aussi, par une analyse de Kaplan-Meier, documenté que le taux de survie des patients avec un cancer positif pour ERR α était moindre que ceux n'exprimant pas ERR α . ERR α est donc aussi un mauvais facteur pronostique dans le cancer ovarien.

Dans le cas du cancer de l'endomètre, deux études ont montré une augmentation de l'expression d'ERR α dans les tissus et lignées cellulaires cancéreuses comparés à leurs homologues sains (GAO et al., 2006, WATANABE et al., 2006). Tout comme dans le cancer du sein, une corrélation négative a été répertoriée entre l'expression d'ERR α et d'ER α dans les tissus cancéreux de l'endomètre (GAO et al., 2006). De plus, une surexpression d'ERR α dans les cellules Ishikawa de cancer de l'endomètre diminue l'activité transcriptionnelle induite par l'œstrogène sur l'élément de réponse ERE couplé à la luciférase (WATANABE et al., 2006). Ils ont aussi répertorié qu'une baisse d'expression d'ERR α par ARN interférence (siRNA) dans cette lignée cellulaire augmentait l'activité transcriptionnelle induite par l'œstrogène sur le même élément de réponse.

En ce qui concerne le cancer de la prostate, les avis sont partagés. En effet, une première étude a montré une localisation nucléaire de $ERR\alpha$ dans les tissus cancéreux de prostate alors que le stroma ne présentait pas d'expression de ce récepteur (FUJIMURA et al., 2007). Cependant, une étude qui cherchait à vérifier l'implication d' $ERR\alpha$ dans le cancer de la prostate a montré que cette fois-ci, il y avait une baisse d'expression d' $ERR\alpha$ dans les tissus cancéreux prostatiques en comparaison aux tissus sains (CHEUNG et al., 2005). De plus, une surexpression d' $ERR\alpha$ dans les cellules PC-3 de cancer de la prostate diminue la prolifération de cette lignée cellulaire.

3.4.2.2. Cancer du côlon

Ainsi, plusieurs études ont répertorié l'expression et l'implication d' $ERR\alpha$ dans les cancers hormonaux dépendants, augmentant ainsi la perspective pour $ERR\alpha$ d'être impliqué dans la voie de signalisation à l'œstrogène (SUZUKI et al., 2004, ARIAZI et al., 2002, KRAUS et al., 1987, KRAUS et al., 2002, SUN et al., 2005, GAO et al., 2006, WATANABE et al., 2006, CHEUNG et al., 2005). Cependant, qu'en est-il d' $ERR\alpha$ dans d'autres cancers, comme le cancer du côlon? Une seule étude a répertorié l'expression d' $ERR\alpha$ dans le côlon (CAVALLINI et al., 2005). Dans cette étude, il est documenté que l'expression de l' ARN_m d' $ERR\alpha$ est augmentée dans le tissu cancéreux comparé au tissu sain de côlon, alors que celui d' $ERR\gamma$, qui est plus faiblement exprimé, n'est pas modulé. De plus, l' ARN_m d' $ERR\beta$ n'a pas été

défecté, alors que celui de PGC-1 α (un co-activateur) n'est pas modulé entre le tissu sain et cancéreux. Il a aussi été montré que l'expression de l'ARN_m d'ERR α augmentait avec le grade histologique du cancer, de bien à peu différencié, ainsi que le stade d'envahissement tumoral, alors que celles d'ER α et ER β étaient inverses et diminuées selon les mêmes critères. Il s'agit cependant de la seule étude qui a répertorié l'expression d'ERR α dans le cancer du côlon.

4. Les co-activateurs de la famille PGC-1

4.1. Découverte et structure

Les PGC-1 sont des co-activateurs transcriptionnels agissant directement sur plusieurs récepteurs nucléaires et facteurs de transcription. Cette famille comprend trois membres, soit PGC-1 α , PGC-1 β et PRC (Fig 5.A.). PGC-1 α fut découvert en 1998 alors qu'un groupe de recherche a utilisé la technique de double-hybride dans des levures afin d'identifier des protéines interagissant avec PPAR γ dans les cellules adipeuses brunes murines (PUIGSERVER et al., 1998). Ils ont ainsi répertorié pour la première fois ce co-activateur et ont remarqué que l'expression de son ARN_m était augmentée dans le tissu adipeux brun de souris exposées au froid. De plus, l'expression de PGC-1 α était en corrélation avec l'expression de protéines clés du métabolisme mitochondrial (ATP synthase, cytochrome c oxydase). Par la

suite, en 2002, ce même groupe a effectué une recherche dans une bibliothèque d'EST afin de trouver des transcrits similaires à la région amino-terminale de PGC-1 α , qui est conservé chez les humains et les rongeurs (LIN et al., 2002). Ils ont ainsi répertorié PGC-1 β , le deuxième membre de cette famille de co-activateurs. Finalement, toujours en 2001, un autre groupe de recherche a documenté la présence d'un troisième membre de la famille de co-activateurs PGC-1, PRC, alors qu'ils ont effectué une recherche dans des banques de données pour des nouvelles protéines ayant une similarité de séquence avec PGC-1 α (ANDERSSON et SCARPULLA, 2001).

Au niveau structurel, la majorité des études ont été effectuées sur le co-activateur PGC-1 α , en relation avec ses différents partenaires d'interaction. Ainsi, ce dernier est composé principalement d'un domaine d'activation à son extrémité amino-terminale, d'un domaine central agissant comme domaine de répression de son activité et d'un domaine en carboxy-terminal possédant différents motifs responsables de la liaison à des facteurs d'épissage des ARN_m, soit le motif riche en sérine et arginine et le motif de reconnaissance de l'ARN. Ainsi, le domaine d'activation contient un certain nombre de motifs riches en leucine, les motifs LXXLL, trois au total pour PGC-1 α , deux pour PGC-1 β et un pour PRC (FINCK et KELLY, 2006) qui sont responsables de la liaison du co-activateur aux récepteurs nucléaires. Une fois lié aux récepteurs nucléaires sur les promoteurs cibles, le co-activateur, via son domaine amino-terminal, peut recruter d'autres co-activateurs tels que SRC-1 ou CBP/p300 possédant un domaine, absent chez les PGC-1, responsable de l'acétylation

des histones. Cela permet une ouverture de la chromatine afin que la machinerie transcriptionnelle soit recrutée afin d'amorcer la transcription des gènes cibles. Lorsque PGC-1 α n'est pas lié aux récepteurs nucléaires et facteurs de transcription, sa conformation est telle que le domaine de répression va agir sur le domaine d'activation afin d'empêcher sa liaison aux co-activateurs tels que SRC-1 et CBP/p300 (PUIGSERVER et al., 1999). PGC-1 α est aussi connu comme interagissant avec l'ARN polymérase II afin de permettre la transcription des gènes cibles (WALLBERG et al., 2003). De plus, PGC-1 α peut lier l'ARN_m et recruter différents facteurs importants à l'épissage (MONSALVE et al., 2000).

4.2. *L'expression dans les tissus*

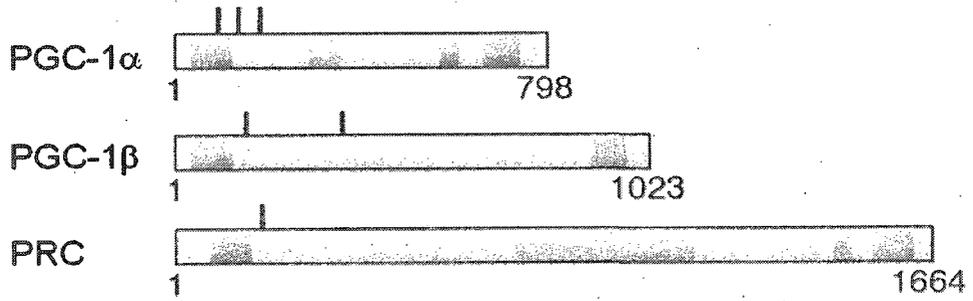
L'ARN_m de PGC-1 α , dans les tissus murins, est fortement exprimé dans le cœur, le rein, le tissu adipeux brun et le cerveau (PUIGSERVER et al., 1998). Chez l'humain, l'expression de l'ARN_m de PGC-1 α est élevée dans le cœur, le rein, le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux brun, alors qu'il est peu exprimé dans le tissu adipeux blanc, l'intestin grêle et le côlon (LARROUY et al., 1999). De plus, certaines études ont montré que l'expression de PGC-1 α pouvait être induite lors d'un besoin énergétique et ce après une stimulation par le froid ou un jeûne (PUIGSERVER et al., 1998, SCHREIBER et al., 2003).

Figure 5. Les co-activateurs de la famille PGC-1. (A) Représentation schématique de la séquence d'acides aminés des différents co-activateurs. Le domaine en rose correspond au domaine d'activation, celui en jaune correspond au domaine riche en proline. Les barres noires correspondent aux motifs riches en leucine LXXLL, et les domaines vert turquoise correspondent au motif riche en sérine et arginine et au motif de reconnaissance de l'ARN. **(B)** Schéma représentatif de l'implication de PGC-1 α , en partie avec ERR α , dans la biogénèse mitochondriale et dans l'oxydation des acides gras. L'expression de PGC-1 α est augmentée suite à une demande énergétique. Ce dernier va en synergie avec les différents récepteurs, NRF-1, PPAR α et ERR α notamment, activer la transcription de gènes cibles importants pour la phosphorylation oxydative et la β -oxydation des acides gras.

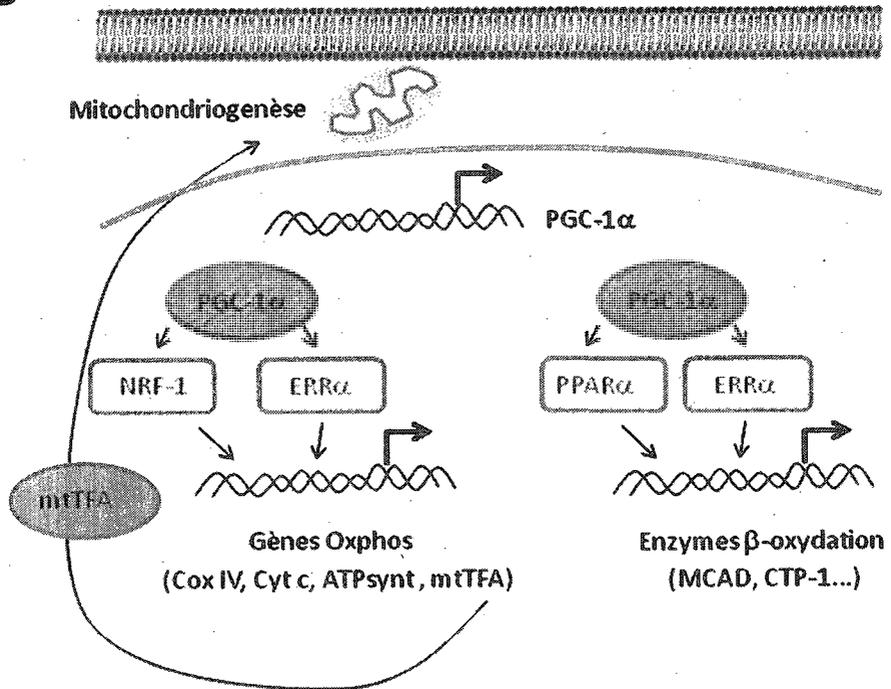
A : Adapté de Finck et al., 2006

B : Adapté de Tiraby et al., 2005

A



B



Pour ce qui est de PGC-1 β , l'expression de son ARN_m chez l'humain est presque similaire à celle de PGC-1 α , étant exprimé dans le foie et le muscle et à des niveaux plus élevés dans le cœur et le tissu adipeux brun. Ces tissus ont une haute capacité oxydative et un haut métabolisme énergétique (LIN et al., 2002).

L'expression de l'ARN_m de PRC chez l'humain possède cependant moins de fluctuations à travers les différents tissus avec une expression plus ubiquitaire. On observe cependant une légère prédominance dans les poumons, le placenta, le muscle squelettique et le cœur (ANDERSSON et SCARPULLA, 2001).

4.3. *L'interaction entre PGC-1 α et ERR α*

Comme je viens de le décrire dans les chapitres précédents, PGC-1 α et ERR α sont conjointement exprimés dans les tissus à haute capacité oxydative et à haut métabolisme énergétique. Une étude a montré que PGC-1 α induit l'activité du promoteur du gène d'ERR α , et ce via ERR α lui-même, augmentant ainsi son expression (LAGANIERE et al., 2004). Une autre étude a par la suite montré que PGC-1 α , et via ERR γ cette fois, augmentait l'activation du promoteur du gène d'ERR α (LIU et al., 2005). Finalement, il a été montré qu'ERR α et ERR γ compétitionnaient pour la liaison au promoteur du gène d'ERR α (ZHANG et TENG, 2007). ERR α et PGC-1 α sont de plus

des acteurs directs dans la régulation du métabolisme énergétique (Fig 5.B.). Ainsi, une première étude a répertorié l'interaction *in vitro* entre PGC-1 α et ERR α , et ce via le troisième motif LXXLL sur PGC-1 α (L3) et le domaine de transactivation AF-2 de ERR α (HUSS et al., 2004). De plus, une étude a spécifiquement démontré que PGC-1 α interagissait avec ERR α lorsque ce dernier était présent sous forme de dimère sur le promoteur du gène pS2, la phosphorylation de ERR α augmentant la formation du dimère (BARRY et GIGUERE, 2005). Plusieurs études se sont ensuite penchées sur la coopération d'ERR α et PGC-1 α dans la régulation du métabolisme énergétique. Ainsi, une étude a montré que PGC-1 α , via ERR α , induisait la biogénèse mitochondriale et ce en augmentant l'expression de l'ARN_m de différents acteurs du métabolisme mitochondrial, tel que le facteur de transcription mitochondrial mtTFA, important pour la réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial (SCHREIBER et al., 2004). Comme autres gènes régulés à la hausse, ils ont documenté l'isocitrate déshydrogenase (IDH3A), ainsi que l'ATP synthase beta (ATPsyn β) et cytochrome c (Cyt c), ces derniers étant impliqués dans la phosphorylation oxydative. Dans cette même étude, ils ont répertorié qu'ERR α se liait directement sur les promoteurs des gènes ATPsyn β et Cyt c dans les cellules SAOS2. Une autre étude a sensiblement obtenu les mêmes résultats, mais cette fois dans les cellules de myoblastes C2C12 (MOOTHA et al., 2004). Il est donc bien établi qu'ERR α et PGC-1 α régulent à la hausse l'expression de gènes importants dans le métabolisme mitochondrial. Il a aussi été montré

que PGC-1 α , via ERR α , régulaient la transcription du gène de la mitofusine 2 (Mfn2), une protéine membranaire mitochondriale (SORIANO et al., 2006). PGC-1 α et ERR α ont été répertoriés comme ayant des rôles tout aussi importants dans d'autres mécanismes responsables du métabolisme énergétique cellulaire. Ainsi, ERR α lie *in vitro* et active avec PGC-1 α le promoteur de la MCAD (*Medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase*), qui est une enzyme clé de la β -oxydation des acides gras dans la mitochondrie (SLADEK et al., 1997). D'ailleurs, il est connu que l'expression de MCAD est élevée dans les tissus utilisant préférentiellement les lipides comme source d'énergie, comme le cœur, les reins et le tissu adipeux brun. Ces tissus expriment aussi des niveaux élevés d'ERR α et PGC-1 α . De plus, ERR α et PGC-1 α sont aussi recrutés sur le promoteur du gène de la PDK4 (*pyruvate dehydrogenase 4*) afin de moduler à la hausse son expression (WENDE et al., 2005). La PDK4 est une enzyme qui a comme substrat le PDC (*pyruvate dehydrogenase complex*), dont l'activité est inhibée suite à sa phosphorylation. Le PDC est responsable de l'oxydation du glucose, menant par la suite à l'inhibition de la β -oxydation des acides gras. Ainsi, en inhibant le PDC, la PDK4 se voit inhiber l'oxydation du glucose et activer la β -oxydation des acides gras dans les mitochondries. Ceci est consistant avec le rôle de ERR α et PGC-1 α dans l'utilisation préférentielle des acides gras en tant que substrat énergétique.

4.4. Le co-activateur PRC

Lorsque l'on regarde les co-activateurs PGC-1 α et PGC-1 β , on se rend compte que leur rôle principal est au niveau de la régulation du métabolisme énergétique. Peu est cependant connu sur le dernier membre de cette famille de co-activateurs, PRC. Une étude, qui a répertorié pour la première fois l'existence de PRC, a montré que ce co-activateur lie *in vitro* le NRF-1 (*nuclear respiratory factor 1*), qui est un facteur de transcription activant le promoteur de nombreux gènes mitochondriaux (ANDERSSON et SCARPULLA, 2001). Cette étude a révélé dans les tissus humains une expression de PRC relativement ubiquitaire, mais avec une légère prédilection dans les poumons, le placenta, le muscle squelettique et le cœur. Par contre, il y a une franche augmentation de l'expression de PRC suite à la stimulation de la prolifération des cellules BALB/3T3 quiescentes (ANDERSSON et SCARPULLA, 2001). En effet, en comparaison avec l'expression stable de PGC-1 α lors de la stimulation de la prolifération, celle de PRC est augmentée après seulement une heure de stimulation au sérum, alors que les niveaux de PRC sont très faibles dans les mêmes cellules à confluence, ce qui laisse présager un rôle clé du co-activateur PRC dans la progression du cycle cellulaire.

5. Hypothèse de recherche et objectifs

Avec toutes les études que je viens de vous exposer et qui démontrent:

- a. qu'ERR α possède un rôle important dans la voie de signalisation de l'estrogène et le métabolisme énergétique cellulaire.
- b. qu'ERR α est plus fortement exprimé dans le cancer du côlon comparé au côlon sain et est un facteur de mauvais pronostic pour plusieurs autres cancers
- c. qu'ERR α Δ exon5, qui ne possède pas la phénylalanine 329 important pour l'activité constitutive d'ERR α , mais dont le domaine de dimérisation est encore présent, est exprimé principalement dans le tissu sain.
- d. qu'une interaction entre PRC et ERR α pourrait contribuer au rôle de ERR α dans la carcinogénèse.

L'hypothèse de mon projet de recherche était que le récepteur nucléaire ERR α , dans sa forme complète, amène un avantage prolifératif aux cellules cancéreuses du côlon.

Pour ce faire, nous avons trois objectifs principaux afin de vérifier notre hypothèse de recherche :

- 1) Étudier l'implication d'ERR α dans la croissance des cellules cancéreuses du côlon.

- 2) Caractériser le variant d'épissage alternatif ERR α Δ exon5 dans les cellules épithéliales intestinales normales et cancéreuses et son rôle dans la croissance des cellules cancéreuses colorectales.

- 3) Documenter et caractériser l'interaction entre ERR α et le co-activateur PRC.

II-MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

1.1. Cellules 293T

La lignée cellulaire 293T est une lignée fœtale humaine transformée de reins qui nous a été fournie par le Dr. Fernand-Pierre Gendron (Département d'anatomie et biologie Cellulaire, Université de Sherbrooke, QC, Canada). Les cellules ont été cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Wisent, Saint-Bruno, Québec) en présence de 10% de sérum fœtal bovin (FBS) (Wisent), 2mM de L-glutamine (Invitrogen, Burlington, Ontario), 10mM HEPES (Wisent) et 100U/ml pénicilline-100ug/ml streptomycine (Wisent) à 37 °C dans une atmosphère à 95% air et 5% CO₂. Le milieu a été changé aux trois jours et les cellules ont été réensemencées dans un ratio de 1 :12 à l'atteinte de la confluence.

1.2. Cellules HIEC et IEC-6

La lignée cellulaire HIEC est une lignée non immortalisée humaine qui provient de l'isolement de cellules épithéliales d'intestin grêle fœtal (PERREAULT et BEAULIEU, 1996). Cette lignée cellulaire a été gracieusement donnée par le Dr. Jean-François Beaulieu (Département

d'anatomie et biologie Cellulaire). Les cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM (Wisent) en présence de 5% de FBS (Wisent), 2mM de L-glutamine (Invitrogen), 10mM HEPES (Wisent) et 100U/ml pénicilline-100ug/ml streptomycine (Wisent) à 37 °C dans une atmosphère à 95% air et 5% CO₂. Le milieu a été changé aux trois jours et les cellules ont été réensemencées dans un ratio de 1 :4 à l'atteinte de la confluence. La lignée IEC-6 est une lignée immortalisée issue de la crypte de l'iléon de rat (QUARONI et al., 1979). Les extraits protéiques totaux des cellules IEC-6 ont été donnés par la Dre. Nathalie Rivard (Département d'anatomie et biologie Cellulaire).

1.3. Cellules DLD-1 et HCT-116

Les cellules des lignées DLD-1 et HCT-116 sont des cellules cancéreuses provenant d'adénocarcinome de côlon humain et ont été gracieusement fournies par la Dre. Nathalie Rivard (Département d'anatomie et biologie cellulaire). Les cellules ont été cultivées dans le même milieu et les mêmes conditions que la lignée cellulaire 293T. Le milieu a été changé aux trois jours et les cellules ont été réensemencées dans un ratio de 1 :12 à l'atteinte de la confluence.

2. Extraction de protéines et immunobuvardage de type Western

2.1. *Extraction des protéines (Méthode Laemmli)*

Les cellules sont rincées une fois avec du PBS 1X. Elles sont récoltées avec un grattoir et transférées dans un tube eppendorf puis centrifugées à 6000 rpm à T. P. dans une microcentrifugeuse de table. Les cellules sous forme de culot sont resuspendues dans du Laemmli 1X (62.5mM Tris-HCl pH 6.8 (Invitrogen), 2.3% SDS (Laboratoire MAT, Beauport, Québec, Canada), 10% glycérol (Fisher, Pittsburg, PA, États-Unis), 0.005% bleu de bromophénol (VWR, Mississauga, ON, Canada), 5% β -mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)), dans un volume relatif à la grosseur du culot. Les échantillons sont ensuite dénaturés en les bouillant pendant 5 minutes à 95-100 °C puis dosés par la méthode de Lowry. Les échantillons sont conservés à -80 °C jusqu'à leur migration sur gel pour l'immunobuvardage de type Western.

2.2. *Extraction des protéines (Méthode Triton)*

Les tissus humains, qui proviennent de différents patients de la Dre. Julie Carrier, sont réduits en poudre dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier, puis resuspendus dans un tampon de lyse Triton (50mM Tris-HCL (Invitrogen) pH 7.5, 1% Triton X-100 (ICN Biomedicals, Aurora, OH), 100mM NaCl (Fisher), 5mM EDTA pH 8 (Fisher), 40mM β -glycérophosphate (Sigma-Aldrich), 5% glycérol (Fisher)) auquel nous ajoutons différents inhibiteurs de protéases (aprotinine 1 :1000 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, États-

Unis), leupeptine 1 :1000 (Sigma-Aldrich), pepstatine 1 :1000 (Sigma-Aldrich) et PMSF 1 :100 (Sigma-Aldrich)). Les échantillons sont ensuite homogénéisés à l'aide d'un polytron jusqu'à opacité du mélange. Ils sont ensuite incubés sur glace pendant 20 minutes puis centrifugés à 13500 rpm à 4 °C pour 10 minutes. Le surnageant contenant les protéines est ainsi récupéré puis dosé par la méthode de Bradford. Les échantillons sont conservés à -80 °C jusqu'à leur migration sur gel pour l'immunobuvardage de type Western.

2.3. *Immunobuvardage de type Western.*

On utilise de 30 à 100µg de protéines, dépendamment de la concentration de nos échantillons, que nous avons dilués dans du Laemmli 1X pour un volume final total de 50µl. Nous les avons ensuite dénaturés en les bouillant pendant 5 minutes à 95-100 °C puis fait migrer avec notre marqueur de poids moléculaire Rainbow (Invitrogen) sur un gel d'acrylamide 10% (375mM Tris-HCl pH 8.8 (Invitrogen), 33% d'une solution d'acrylamide/Bis 30% (Bio-Rad), 0.1% SDS (Laboratoire MAT), 0.1% persulfate d'ammonium (EM Science, Toronto, ON, Canada), 0.04% TEMED (EM Science)) en conditions dénaturantes. La migration est effectuée à 20mA (PowerPac Universal, Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) pendant environ 1h15 dans du tampon de migration (25mM Tris (Invitrogen), 190mM glycine (Roche Diagnostics), 0.1% SDS (Laboratoire MAT)). Une fois la séparation des protéines terminée, elles sont transférées sur une membrane de PVDF 0.45µm (GE Healthcare), préalablement activée dans du méthanol. Le

transfert est effectué à 250mA pendant 1h30 dans du tampon de transfert (25mM Tris (Invitrogen), 190mM glycine (Roche Diagnostics), 20% méthanol (EMD, San Diego, CA, États-Unis)). Par la suite, la membrane est colorée au rouge de Ponceau 0.2% (Sigma-Aldrich) pour visualiser les protéines et vérifier l'efficacité de notre migration et de notre transfert. La membrane est décolorée dans de l'eau et saturée subséquemment dans une solution contenant 10% de lait en poudre (Carnation, Nestlé) dilué dans du TBS/T (20mM Tris-HCl pH 7.6 (Invitrogen), 140mM NaCl (Fisher), 0.3% Tween-20 (EMD)) (blotto). Le blocage de la membrane est effectué durant 1h et la membrane est par la suite incubée toute la nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire dilué dans du blotto. La membrane est ensuite lavée sous agitation 3 fois 10 minutes dans du TBS/T avant d'être incubée 1h à T.P. avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP) dilué dans du blotto. À la fin de l'incubation, la membrane est à nouveau lavée 3 fois 10 minutes dans du TBS/T. Afin de révéler les protéines présentes sur la membrane, cette dernière est incubée pendant 1 minute avec un mélange réactionnel de la trousse de révélation ECL™ Western Blotting Detection (GE Healthcare, Buckinghamshire, Angleterre). Un film radiographique Biomax Light (Kodak, Toronto, ON, Canada) est placé sur la membrane pendant un certain temps et ensuite révélé dans une chambre noire.

Tableau 1. Liste des anticorps utilisés

	Expérience	Protéine reconnue	Espèce	Dilution	No de catalogue / Compagnie
Anticorps primaire	WB	ERR α	Lapin	1/10 000	Généré Dr Giguère
	WB; IF; IHC	ERR α	Lapin	1/3 000; 1/200; 1/125	NLS5402 / Novus Biologicals
	WB	ERR γ	Lapin	1/8 000	Généré Dr Giguère
	WB	PRC	Lapin	1/ 1 000	Généré Dr Scarpulla
	WB	β -actine	Souris	1/10 000	MAB1501R / Chemicon International
	IP	Flag	Souris	3 μ l	200472-21 / Stratagene
	IP	HA	Souris	3 μ l	Sc7392 / Santa Cruz
	IP	(IgG souris)	Souris	3 μ l	12-371 / Upstate
Anticorps secondaire	WB	IgG lapin (couplé à HRP)	Âne	1/5 000	NA934 / GE Healthcare
	WB	IgG souris (couplé à HRP)	Mouton	1/10 000	NA931 / GE Healthcare
	IF	IgG lapin (couplé à Alexa Fluor 488)	Âne	1/500	A21206 / Molecular Probes
	IHC	IgG souris (couplé à la biotine)	Chèvre	1/1 000	12-445 / Upstate

3. Immunolocalisation en fluorescence

Les cellules sontensemencées 24 heures avant l'expérience dans des chambres Labtek (VWR). Par la suite, elles sont lavées rapidement dans du PBS 1X, puis fixées avec du paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich) 4%/PBS 20 minutes à T.P. Une première série de 3 lavages de 5 minutes est effectuée puis les cellules sont perméabilisées avec du Triton (ICN Biochemicals) 0.1%/PBS 10 minutes à T.P. Après 3 autres lavages de 5 minutes, les cellules

sont bloquées avec du BSA (Sigma-Aldrich) 2%/PBS 15 minutes à T.P., puis incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du BSA 2%/PBS 2 heures à T.P. Les cellules sont encore lavées 3 fois 5 minutes et incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la FITC dilué dans la même solution et ce 30 minutes à T.P. dans le noir. À la fin de l'incubation, les cellules sont lavées 3 fois 5 minutes puis le contour des puits est décollé et la lamelle est montée avec du Vectashield contenant du DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, États-Unis). Les lames sont ensuite observées sur le microscope à fluorescence Leica DMRXA disponible au département d'anatomie et biologie cellulaire.

4. Immunohistochimie

4.1. Fixation des tissus

Les tissus sont incubés toute la nuit à 4°C sous agitation dans une solution de paraformaldéhyde 4%, puis rincés 2 fois dans de l'éthanol 70% avant d'être placés dans des histo-cassettes (Fisher). Les tissus sont conservés dans l'éthanol 70% à 4°C jusqu'à ce qu'ils soient cirulés dans la paraffine au service de pathologie du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. Les tissus sont ensuite inclus dans des blocs de paraffine afin d'être utilisés pour des coupes histologiques de 5µm à l'aide d'un microtome Spencer 820 (American Optical Company).

4.2. *Immunohistochimie*

Les coupes histologiques sont séchées à 60°C pendant 45 minutes et elles sont déparaffinées dans des bains de xylène (EMD) 3 fois 5 minutes. Les lames sont ensuite déshydratées dans des bains à gradients décroissants d'EtOH, soit 3 fois 3 minutes dans l'EtOH 100%, 2 fois 3 minutes dans l'EtOH 95%, 1 fois 3 minutes dans l'EtOH 80% et finalement 1 fois 5 minutes dans l'eau distillée. Pour permettre la réactivation des antigènes, les lames sont portées à ébullition 20 minutes dans une solution d'acide citrique 10mM pH 6.0 (Fisher). Les lames sont ensuite refroidies pendant 20 minutes puis rincées 1 fois 1 minute avec du PBS 1X. Les tissus sont ensuite délimités à l'aide d'un crayon gras Pap Pen (Invitrogen) puis les lames sont saturées en protéines avec du Protein Blocking Agent (Beckman-Coulter) pendant 20 minutes. Elles sont par la suite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du PBT (PBS, 0.1% BSA (Sigma-Aldrich), 0.2% Triton X-100 (ICN Biochemicals)) toute la nuit à 4°C dans une chambre humide. Les lames sont ensuite lavées 1 fois 1 minute dans du PBS et incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la biotine dilué dans du PBT pendant 30 minutes à T.P. dans une chambre humide. Les lames sont à nouveau lavées 1 fois 1 minute dans du PBS et incubées 30 minutes à T.P. avec un complexe streptavidine :HRP (Vector Laboratories) dilué 1/1 000 dans du PBT. Les lames sont lavées 1 fois 1 minute dans du PBS puis elles sont mises en contact avec une solution DAB (Vector Laboratories) jusqu'à coloration brune. Le DAB va réagir avec l'enzyme HRP et ainsi permettre une coloration brune

des protéines reconnues par l'anticorps primaire. Suite à l'atteinte de la coloration brune, la réaction est arrêtée par une incubation de 5 minutes dans l'eau distillée. Les lames sont ensuite colorées à l'hématoxyline afin de colorer les noyaux des cellules en bleu. Pour ce faire, les lames sont plongées rapidement 10 fois dans une solution d'hématoxyline Harris (VWR) préalablement filtrée puis elles sont incubées 5 minutes dans une solution 1% HCl 1N (Fisher) dans l'eau. Les lames sont ensuite rincées 2 minutes dans l'eau distillée puis déshydratées dans un gradient croissant d'EtOH, soit 2 fois 1 minute dans l'EtOH 80%, 2 fois 1 minute dans l'EtOH 95%, 3 fois 1 minute dans l'EtOH 100% et 3 fois 1 minute dans le xylène (EMD). Les lames sont ensuite montées avec du médium à montage Cytoseal™ 60 (VWR) et des lamelles en verres 24x60mm N°1 (VWR).

5. Détachement séquentiel des cellules épithéliales le long de la crypte colique de souris adulte

La procédure est basée sur la technique de Weiser réadaptée de l'étude effectuée par Ménard et collaborateurs (MENARD et al., 1987). Le côlon d'une souris adulte est inversé sur un tube de polyéthylène Tubing PE 240 (BD Biosciences) puis ligaturé en segments d'environ 4cm avec du fil à coudre. Les différents segments sur le tube sont ensuite coupés puis lavés 2 par 2 dans des erlenmeyers de 50ml 2 fois avec 20ml de solution de Krebs pH 7.5 (5mM KCl (Fisher), 1.2mM MgSO₄ (Sigma-Aldrich), 1.2mM KH₂PO₄ (Fisher), 118nM NaCl (Fisher) et 100mM Na₂HPO₄ (Fisher)). La dissociation

cellulaire est ensuite effectuée en ajoutant 10ml de solution EDTA pH 7.5 (2.5mM EDTA (Sigma-Aldrich), 0.25M NaCl (Fisher) et 0.5mM DTT (Sigma-Aldrich)) aux erlenmeyers de 50ml contenant les segments. Par la suite, les segments sont agités pendant 5 minutes avec des intervalles de repos sur glace comme suit : 1 minute agitation, 1 minute repos, 1 minute agitation, 1 minute repos, 1 minute agitation. La suspension cellulaire est récoltée dans un tube Falcon de 15ml puis conservée sur glace. 10ml de solution EDTA pH 7.5 est à nouveau ajouté et le même patron d'agitation est effectué. Ces étapes sont recommencées jusqu'à ce que l'épithélium ne se détache plus et que la solution d'EDTA soit ainsi limpide. Les tubes Falcon de 15ml contenant les différentes fractions épithéliales sont centrifugés à 1000rpm pendant 5 minutes à 4°C puis les fractions sont lavées 1 fois avec 10ml de solution de Krebs et recentrifugées avec les mêmes conditions. Les protéines totales sont ensuite extraites selon la méthode triton comme décrit précédemment.

6. Clonage du shERR α

À partir des siARNs ciblés contre ERR α documentés dans la littérature (SCHREIBER et al., 2003), nous avons généré un shARN ciblé contre ERR α (Tableau 2. Séquences 1 et 2). Nous avons hybridé les deux oligonucléotides ensemble. Pour ce faire, nous avons utilisé 20 μ g de chaque oligonucléotide à 1 μ g/ μ l, donc 20 μ l, auquel nous avons rajouté 5 μ l de tampon d'hybridation 10X (0.1M Tris-HCl pH 7.5 (Sigma-Aldrich), 1M NaCl (Fisher), 0.01M EDTA

(Sigma-Aldrich)) et 5 μ l d'eau. Nous avons incubé le mélange à 65°C pendant 10 minutes puis laissé la température de l'eau descendre tranquillement jusqu'à T.P. Nous avons digéré le vecteur d'expression plentiU6/V6 par les enzymes de restrictions BamHI (Roche Diagnostics) et XhoI (Roche Diagnostics), et nous avons effectué la ligation des oligonucléotides hybridés dans le vecteur d'expression en utilisant la T4 DNA ligase (New England Biolabs) selon les indications du manufacturier. La ligation a été transformée dans les bactéries compétentes Stable 3 (Invitrogen) et les clones positifs ont été déterminés par digestion avec l'enzyme de restriction BSTXI (Roche Diagnostics). N'ayant pas d'expression suffisante de notre shERR α , nous avons décidé de changer le promoteur U6 par le promoteur H1. Pour ce faire, nous avons digéré notre vecteur d'expression comprenant le shERR α ainsi que le vecteur pLP-H1 par les enzymes de restrictions EcoRI (Roche Diagnostics) et BamHI (Roche Diagnostics) afin d'extraire les fragments du promoteur U6 et H1 respectivement. Nous avons mis sur gel d'agarose 1% les produits de digestion et nous avons extrait du gel la bande correspondant au vecteur plenti shERR α sans le promoteur U6 et la bande correspondant au promoteur H1, et ce avec la trousse QIAEX gel extraction kit (Qiagen, Maryland, États-Unis) en suivant les instructions du manufacturier. Nous avons ensuite ligué les deux fragments en utilisant la T4 DNA ligase (New England Biolabs) en suivant les instructions du manufacturier. La ligation a été transformée dans les bactéries compétentes Stable 3 (Invitrogen) et les

clones positifs ont été déterminés par une digestion avec l'enzyme de restriction NdeI (Roche Diagnostics).

Tableau 2. Séquences des amorces utilisées

	Nom	Séquence
1	shERR α sens	5' GATCCCTGAGAAGCCTGGGATGCTCTTTTCAAGAGAAAGAGCAT CCCAGGCTTCTCATTTTTT 3'
2	shERR α A/S	5' TCGAGTTCCAAAAATGAGAAGCCTGGGATGCTCTTTCTCTTGA AAAGAGCATCCCAGGCTTC 3'
3	hERR α sens	5' CCGAGATCTCCAGCCAGGTGGTGGGCATTGAGCCT 3'
4	hERR α A/S	5' CCGGAATTCGTCCATCATGGCCTCGAGCATCTCCAA 3'
5	PRC XhoI sens	5' CCGGAATCCCGGCTCGAGGCCGCCGGGCAGG 3'
6	PRC XhoI A/S	5' CCTGCCCGGGCGGCCTCGAGCCGGAATCCGG 3'
7	PRC-HA sens	5' CCGGTCGACATGTATGATGTTCTGATTATGCTAGCCTCCGGC GGCGCGCCGGGACGGAGAGACGGAGTC 3'
8	PRC-HA A/S	5' CCGAGATCTCCGTCAGAGCCGTGAGCAGCG 3'

7. Établissement des lignées stables

7.1. Production des lentivirus

10 μ g de l'ADN lentiviral contenant les gènes nécessaires à la formation des capsides virales (PLP1, PLP2 et VSVG) et 10 μ g de nos ADN cibles séparément (plentiH1shERR α , plentiU6shEGFP, plentiadapteurhERR α Δ exon5 (cloné par Gérald Bernatchez) et plentiadapteur) ont été mélangés sous la hotte dans la salle de culture. Le mélange d'ADN a été transfecté sur des cellules 293Tensemencées la veille

dans des boîtes de pétris de 100mm. Pour ce faire, 60 μ l/puit de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) a été pré-incubé à 750 μ l/puit de milieu Opti-MEM (Invitrogen) pendant 5 minutes à T.P. L'ADN a aussi été pré-incubé à 750 μ l d'Opti-MEM. 750 μ l de Lipofectamine 2000 mélangé à l'Opti-MEM est ensuite rajouté à chaque tube d'ADN et le mélange est incubé pendant 30 minutes à T.P.. Le 1.5ml de chaque mélange est combiné avec 3.5ml d'Opti-MEM pour un volume final de 5ml. Le milieu de culture des cellules 293T est enlevé et le 5ml de chaque tube contenant l'ADN et la Lipofectamine 2000 est lentement ajouté aux différentes boites de pétris de cellules. Les cellules sont ensuite incubées pendant 4 heures à 37°C et le mélange est remplacé par 7ml de milieu frais DMEM 10% FBS. Les cellules sont ensuite incubées pendant 2 jours à 37°C dans un incubateur désigné présent dans la salle de virus.

7.2. Récolte des virus

Le milieu de culture contenant les virus est prélevé à l'aide d'une seringue de 10ml (BD Biosciences) puis filtré sur un filtre de 0.45 μ m (Pall Corporation, Ann Harbor, MI, États-Unis). Les particules virales sont aliquotées dans des tubes eppendorf de 1.5ml et conservées à -80°C.

7.3. Infection des lignées cellulaires

La veille de l'infection, les cellules DLD-1 et HCT116 sontensemencées dans des boites de pétris de 60mm afin d'obtenir une confluence cellulaire d'environ 50% le lendemain. Les cellules sont ensuite infectées comme suit :

1.5ml de suspension virale, à laquelle nous avons ajouté 1.5µl de polybrène (Sigma-Aldrich) 4µg/µl (concentration finale de 4µg/ml) a été ajouté sur les cellules DLD-1 et HCT116 auxquelles nous avons retiré le milieu de culture. Les cellules sont incubées 1 heure à 37°C et 2ml de milieu frais DMEM 10% FBS contenant 2µl de polybrène 4µg/µl ont été ajouté à chacune des boites de pétris. Les cellules sont ainsi incubées pendant 2 jours à 37°C. Suite à ces 2 jours d'incubation, le milieu est retiré et remplacé par 5ml de milieu frais approprié. Les cellules sont incubées pendant 1 jour.

7.4. *La sélection des cellules*

Les cellules, décollées par méthode enzymatique avec de la trypsine (Invitrogen, NY, États-Unis), sont diluées pour un ratio de 1 :2 puis transférées dans des boites de pétris de 100mm. La sélection est effectuée avec les antibiotiques appropriés, soit la blasticidine (Invitrogen), soit le G418 (Sigma-Aldrich), à des concentrations respectives de 5 µg/ml et 400 µg/ml. La sélection est maintenue pendant quelques jours et les cellules sontensemencées à un ratio de 1 :3 à l'atteinte de la confluence.

7.5. *Les courbes de croissance*

Les cellules sont récoltées puis dénombrées avec le *Particle counter Z1* (Coulter Beckman, Mississauga, Ontario) disponible dans le laboratoire de la

Dre Rivard. Les cellules sont ensuiteensemencées dans des plaques 12 puits (Sigma-Aldrich) à raison de 15 000 cellules par puits au départ et ce en triplicata. Elles sont par la suite récoltées et dénombrées à nouveau aux différents jours d'incubation.

8. Analyse de FACS

Les cellules sont récoltées puis dénombrées avec un hémacymètre (Hausser Scientific, Horsham, PA, États-Unis). Elles sont ensuiteensemencées dans des plaques de 6 puits (Corning, New-York, États-Unis) à 250 000 ϕ /puits. 24 heures suivant l'ensemencement, les cellules sont synchronisées par la méthode de double blocage à la thymidine (HOSONO et al., 2005). L'excès de thymidine a pour effet de bloquer le cycle cellulaire à la transition G1/S en inhibant la ribonucléotide réductase, empêchant ainsi la production de nucléotides précurseurs au dCTP. Ainsi, les cellules qui se trouvent en phase S ne peuvent la compléter, alors que celles qui sont en G1 ne peuvent pas amorcer la synthèse d'ADN. Pour ce faire, les cellules sont incubées 16h avec du milieu adéquat contenant une concentration finale de 2mM de thymidine (Sigma). Ce premier blocage donne une population hétérogène contenant des cellules en phase S et des cellules en transition G1/S. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS et incubées pendant 10h avec du milieu frais. Les cellules sont ensuite bloquées une deuxième fois en étant incubées à nouveau avec du milieu contenant une concentration finale de 2mM thymidine pendant 14h. À la fin de ce second blocage, on obtient une

population cellulaire homogène en transition G1/S. La réinitiation du cycle cellulaire est effectuée en incubant les cellules avec du milieu frais. À différents temps (0, 1, 2, 4, 8, 12 et 24h), les cellules sont récoltées et dénombrées. Pour ce faire, les cellules sont décollées par méthode enzymatique avec de la trypsine (Gibco BRL) puis resuspendues dans 5ml de milieu frais. Elles sont ensuite dénombrées avec un hémacymètre (Hausser Scientific) et environ 1×10^6 ϕ sont placées dans un tube falcon 15ml puis centrifugées pendant 5 minutes à 1700rpm à 4 °C. Le culot de cellules est lavé une fois avec 1ml de PBS 1X froid. Il est resuspendu dans 1ml de PBS 1X froid puis 3ml d'EtOH 100% froid est ajouté goutte-à-goutte au falcon placé sur un vortex à vitesse maximale. Les cellules sont ainsi fixées O/N à 4 °C. Elles sont ensuite centrifugées pendant 5 minutes à 1700rpm à 4 °C, puis lavées une fois avec 1 ml de PBS 1X froid. Le culot est resuspendu dans 500 μ l de solution de coloration (460 μ l d'eau, 38 μ l Na citrate (Fisher) 50mM, 0.25 μ l de RNase A 1mg/ml, 1.75 μ l de iodure de propidium (Sigma-Aldrich) 1mg/ml) et les cellules sont analysées avec le FACS calibur (Becton-Dickenson).

9. Injection dans les souris

9.1. Commande des souris

Des souris femelles CD-1 nues âgées de 6 à 8 semaines ont été commandées (Charles Rivers, Saint-Constant, Québec). Toutes les souris reçoivent une diète normale, en plus d'avoir accès à l'eau osmosée et à la

nourriture *ad libitum*. Toutes les expériences sont conduites sous les recommandations du conseil canadien de protection des animaux ainsi que du comité éthique pour l'expérimentation animale de l'Université de Sherbrooke

9.2. *Préparation des cellules pour l'injection*

Les cellules à injecter sont décollées par méthode enzymatique avec de la trypsine (Invitrogen), puis dénombrées avec le *Particle counter Z1* (Coulter Beckman). Les cellules sont resuspendues dans du milieu de culture cellulaire approprié afin d'obtenir une concentration de 2 millions de cellules dans 100µl, puis gardées sur glace jusqu'à l'injection.

9.3. *Injection des cellules dans les souris*

Les souris sont anesthésiées (injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine (87mg/ml) –xylazine (13mg/ml) (Rogar STB, Pointe Claire-Dorval, Qc, Canada). L'injection de 2 millions de cellules est ensuite effectuée au scapula des souris avec une seringue 1ml et une aiguille 27G ½ (Beckman-Coulter, Mississauga, ON, Canada).

9.4. *Mesure des tumeurs*

Sur une période de 2 ½ semaines, les tumeurs sont mesurées à l'aide d'une règle électronique digitale de précision (VWR) à défaut de 2 jours par

semaine à intervalles réguliers. La longueur et la largeur des tumeurs sont mesurées.

9.5. *Sacrifice des souris et mesure du poids des tumeurs*

Sous anesthésie, les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale. Les tumeurs sont alors prélevées puis pesées à l'aide d'une balance Mettler AE 166 (Fisher). Le volume des tumeurs a été calculé selon la formule : $(\text{Longueur} \times (2 \times \text{Largeur}))/2$.

10. **Clonage de pEYFP-ERR α et pECFP-ERR α Δ exon5**

Nous avons effectué une réaction de PCR avec l'ADN des vecteurs pCMXhERR α et plentihERR α Δ exon5 et les oligonucléotides commandés (Tableau 2. Séquences 3 et 4). Le mélange réactionnel était de 5 μ l de tampon 10X fourni avec l'enzyme (1X), 1 μ l de l'oligonucléotide sens (100ng), 1 μ l de l'oligonucléotide anti-sens (100ng), 1 μ l de dNTP (25mM), 40 μ l d'eau, 1 μ l de l'enzyme Pfu (Stratagene) et finalement 1 μ l de l'ADN de l'un ou l'autre de nos vecteurs (500ng). La réaction de PCR a été effectuée comme suit : 1 cycle initial de 1 minute à 95°C, suivi de 35 cycles de 1 minute à 95°C, 1 minute à 60°C et 1 minute à 72°C. Le produit final a été mis sur gel d'agarose 1%, migré par courant électrique, extrait avec la trousse QIAEX gel extraction kit (Qiagen) selon les indications du manufacturier, puis digéré par les enzymes Bgl II (Roche Diagnostics) et Eco RI (Roche Diagnostics). Nous avons, par la

suite, digéré les vecteurs pEYFP-C1 et pECFP-C1 par les mêmes enzymes de restrictions. Les vecteurs digérés ainsi que les produits de PCR digérés ont été mis sur gel d'agarose 1%, migrés avec un courant électrique puis extraits du gel avec la trousse QIAEX gel extraction kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Par la suite, nous avons utilisé la T4 DNA ligase (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant afin de liguer le fragment correspondant à $ERR\alpha$ dans le vecteur pEYFP-C1 digéré et le fragment correspondant à $ERR\alpha\Delta exon5$ dans le vecteur pECFP-C1. Les produits des ligations ont été transformés dans les bactéries compétentes Top Ten (Clontech) et les clones positifs ont été démontrés selon différents patrons de digestion enzymatique. L'intégrité des clones n'ont cependant pas été vérifiée par séquençage.

10.1. Préparation des cellules et transfection transitoire

Les cellules DLD-1 ont étéensemencées sur des lamelles 18X18mm d'épaisseur 1 (Fisher), préalablement placées stérilement dans des plaques 6 puits (Corning), afin d'obtenir 70% de confluence le lendemain. Nous avons transfecté 1 μ g des 2 différents ADN dans les plaques 6 puits (Corning), soit seul, soit les 2 ensembles. L'ADN a été incubé dans 250 μ l d'Opti-MEM. Un volume de 2 μ l/ μ g d'ADN de Lipofectamine 2000 a été incubé dans 250 μ l/puits d'Opti-MEM. Le tout est incubé 5 minutes à T.P. et 250 μ l du mélange Lipofectamine 2000/Opti-MEM est ajouté à l'ADN, pour être ensuite incubé

pendant 30 minutes à T.P. Le 0.5ml de chaque mélange est rajouté directement au milieu de culture des cellules, qui sont ensuite incubées une journée à 37°C.

10.2. Préparation des cellules et microscopie à fluorescence

Le milieu des cellules est enlevé, puis elles sont lavées avec du PBS 1X. Les cellules sont par la suite fixées et perméabilisées par un traitement avec de l'EtOH 70% pendant 30 minutes, puis rincées avec du PBS 1X. Par la suite, dans la noirceur, on rajoute une dilution 1/100 dans l'eau d'iodure de propidium (Sigma-Aldrich) 0.1mg/ml et on laisse incuber pendant 30 minutes. Les lamelles contenant les cellules sont ensuite inversées et montées sur des lames (VWR) avec du médium à montage Cytoseal™ 60 (VWR). Les cellules sont ensuite observées avec le microscope motorisé Olympus BX61.

11. Immunoprécipitation

11.1. Préparation des cellules et transfection transitoire

Les cellules 293T sontensemencées dans des boites de pétris 100mm afin d'obtenir 70% de confluence le lendemain. Nous avons transfecté un total de 10µg d'ADN par boite de pétri. Pour l'expérience d'interaction entre les 2 formes d'ERR α , 5µg du vecteur pCMXhERR α et 5µg du vecteur

plentihERR α Δ Exon5-flag ont été mélangés. Pour les expériences d'interaction entre les formes d'ERR α et les co-activateurs, 5 μ g des vecteurs pCMXhERR α ou plentihERR α Δ Exon5 et 5 μ g des vecteurs pcDNA3PGC-1 α -HA ou pSVsportPRC-HA ont été mélangés. L'ADN a été incubé dans 250 μ l d'Opti-MEM. Un volume de 2 μ l/ μ g d'ADN de Lipofectamine 2000 a été incubé dans 250 μ l/boîte de pétri d'Opti-MEM. Le tout est incubé 5 minutes à T.P. et 250 μ l du mélange Lipofectamine 2000/Opti-MEM est ajouté à l'ADN, pour être ensuite incubé pendant 30 minutes à T.P. Le 0.5ml de chaque mélange est combiné avec 4.5ml d'Opti-MEM pour un volume final de 5ml. Le milieu de culture des cellules 293T est enlevé et le 5ml de chaque tube contenant l'ADN et la Lipofectamine 2000 est lentement ajouté sur les cellules. Les cellules sont ensuite incubées pendant 4 heures à 37°C et le mélange est remplacé par 10ml de milieu frais DMEM 10% FBS. Les cellules sont ensuite incubées pendant 2 jours à 37°C.

11.2. Extraction des protéines totales et immunoprécipitation

Les protéines sont extraites par méthode de lyse triton puis dosées par méthode de Bradford comme décrit précédemment. Les billes protéine A Sépharose (GE Healthcare) sont préalablement gonflées dans du tampon de lyse Triton contenant les inhibiteurs de protéases comme décrit précédemment. Le volume de tampon ajouté correspond à 100 μ l de tampon pour 0.01g de billes. Les billes sont ainsi incubées pendant 1 heure à 4°C sous agitation. 500 μ g de protéines totales sont ensuite dilués dans le tampon

triton contenant les inhibiteurs de protéases pour un volume total de 800 μ l, auxquels nous rajoutons 50 μ l de billes gonflées. Le mélange est ensuite incubé pendant 45 minutes à 4°C sous agitation, avant d'être centrifugé à 5000rpm 5 minutes à 4°C. On a rajouté au surnageant 3 μ l de l'anticorps anti-HA, de l'anticorps anti-flag ou des IgG de souris et nous avons agité pendant 2 heures à 4°C. Par la suite, nous avons ajouté 50 μ l de billes gonflées et nous avons agité pendant 1 heure à 4°C, avant de centrifuger le tout à 5000rpm pendant 5 minutes à 4°C. Les billes déposées sont ensuite lavées 3 fois avec du tampon triton contenant les inhibiteurs de protéases puis centrifugées à 3000rpm 30 secondes à T.P. Les billes sont ensuite resuspendues dans 60 μ l de laemmli 2X, puis elles sont amenées à ébullition pendant 5 minutes, avant d'être centrifugées à 5000rpm 5 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et les protéines sont conservées à -80°C jusqu'à leur migration sur gel pour immunobuvardage de type Western.

12. Clonage HA-PRC

12.1. Mutation ponctuelle dans le vecteur pSVsportPRC

Lors du clonage de PRC dans le vecteur pSVsport (ANDERSSON et SCARPULLA, 2001), le fragment de PRC avec les sites de restrictions Sal I et Not I aux extrémités a été inséré dans le vecteur digéré Xho I et Not I, les sites de Sal I et de Xho I étant compatibles, mais pas complémentaires. Il en

résulte que ni le site Sal I ni le site Xho I sont maintenant disponible. Nous avons donc en premier lieu recréé le site Xho I afin de pouvoir y insérer une étiquette HA par la suite. Pour ce faire, nous avons utilisé la trousse Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (Invitrogen) nous permettant d'insérer une mutation ponctuelle dans notre séquence. Nous avons donc effectué un mélange de 5 μ l de tampon 10X fourni dans la trousse (1X), 1.25 μ l de l'oligonucléotide sens (125ng) (Tableau 2. Séquence 5), 1.25 μ l de l'oligonucléotide anti-sens (125ng) (Tableau 2. Séquence 6), 1 μ l de dNTP (25mM), 39.5 μ l d'eau, 1 μ l d'enzyme Pfu Ultra fournis dans la trousse, et finalement 1 μ l de notre ADN (500ng). La réaction de PCR a été effectuée comme suit : 1 cycle initial de 30 secondes à 95°C, suivie de 12 cycles de 30 secondes à 95°C, 1 minute à 55°C et 8 minutes à 68°C. Le produit final a été digéré par l'enzyme Dpn I fournie dans la trousse, puis transformé dans les bactéries compétentes Top Ten (Clontech). Les clones positifs ont été démontrés par une digestion avec les enzymes Xho I (Roche Diagnostics) et Bgl II (Roche Diagnostics).

12.2. Insertion de l'étiquette HA à l'extrémité amino-terminale de PRC

Nous avons par la suite effectué une réaction de PCR avec l'ADN de notre vecteur pSVsportPRC et les oligonucléotides commandés (Tableau 2. Séquences 7 et 8). Le mélange réactionnel était de 5 μ l de tampon 10X fourni avec l'enzyme (1X), 1 μ l de l'oligonucléotide sens (100ng), 1 μ l de l'oligonucléotide anti-sens (100ng), 1 μ l de dNTP (25mM), 40 μ l d'eau, 1 μ l de

l'enzyme Taq polymérase (New England Biolabs) et finalement 1µl de notre ADN (500ng). La réaction de PCR a été effectuée comme suit : 1 cycle initial de 1 minute à 95°C, suivie de 35 cycles de 30 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C et 1 minute à 72°C. Le produit final a été mis sur gel d'agarose 1%, migré par courant électrique, extrait avec la trousse QIAEX gel extraction kit (Qiagen) selon les indications du fabricant, puis digéré par les enzymes Sal I (Roche Diagnostics) et Bgl II (Roche Diagnostics). Nous avons par la suite digéré le vecteur pSVsportPRC nouvellement muté pour le site Xho I par les enzymes Xho I (Roche Diagnostics) et Bgl II (Roche Diagnostics). Le vecteur digéré ainsi que le produit de PCR digéré ont été mis sur gel d'agarose 1%, migrés avec un courant électrique puis extraits du gel avec la trousse QIAEX gel extraction kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Par la suite, nous avons utilisé la T4 DNA ligase (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant afin de liguer le fragment de PCR au vecteur digéré. Le produit de la ligation a été transformé dans les bactéries compétentes Top Ten (Clontech) et les clones positifs ont été démontrés selon différents patrons de digestion enzymatique.

13. Essai luciférase

13.1. Préparation des cellules et transfection transitoire

Les cellules 293T ont étéensemencées dans des plaques 12 puits afin d'obtenir environ 50-60% de confluence cellulaire le jour de la transfection.

Chaque condition a été réalisée en triplicata. Les expériences ont été répétées au moins 3 fois. Les différents ADN sont mélangés, soit 0 ou 0.2 μ g du vecteur d'expression pCMXhERR α ; 0, 0.2, 0.4 ou 0.8 μ g du vecteur d'expression plentihERR α Δ exon5; 0 ou 0.4 μ g du vecteur d'expression pcDNA3PGC-1 α HA; 0 ou 0.4 μ g du vecteur d'expression pSVsportPRC. À chaque mélange est ajouté 0.4 μ g du vecteur d'expression pS2-Luc et 0.1 μ g du vecteur d'expression pCMX β -galactosidase. Les mélanges d'ADN sont incubés dans 750 μ l d'Opti-MEM (Invitrogen) pendant 5 minutes. En parallèle, 2 μ l/ μ g d'ADN de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) sont incubés dans 750 μ l/condition d'Opti-MEM et ce pendant 5 minutes. 750 μ l du mélange Lipofectamine 2000/Opti-MEM est ensuite rajouté à chaque mélange d'ADN puis incubé pendant 30 minutes. Le milieu des cellules est enlevé et 500 μ l de chaque mélange ADN/Lipofectamine 2000/Opti-MEM est déposé délicatement sur les cellules. Le tout est incubé pendant 4 heures à 37°C. Le mélange est ensuite remplacé par du milieu frais approprié puis incubé pour toute la nuit.

13.2. *Essais luciférases*

Les cellules sont d'abord lysées dans un volume de 300 μ l de tampon de lyse (25mM Gly-Gly (Sigma-Aldrich), 15mM MgSO₄ (Sigma-Aldrich), 14mM EGTA pH 7.8 (Sigma-Aldrich), 1% Triton X-100 (ICN Biomedicals), 2mM DTT (Sigma-Aldrich)) pendant 30 minutes sous agitation. À 100 μ l des cellules

lysées, on ajoute ensuite 100 μ l de tampon d'essai (25mM Gly-Gly (Sigma-Aldrich), 15mM MgSO₄ (Sigma-Aldrich), 14mM EGTA pH 7.8 (Sigma-Aldrich), 19mM K₂HPO₄ (Fisher), 6mM ATP (Sigma-Aldrich) et 3mM DTT (Sigma-Aldrich)) et 100 μ l d'une solution de luciférine (25mM Gly-Gly (Sigma-Aldrich), 15mM MgSO₄ (Sigma-Aldrich), 16mM EGTA pH 7.8 (Sigma-Aldrich), 0.023% luciférine (Invitrogen)). On effectue ensuite la lecture de luciférase avec un luminomètre MinitLumat LB9506 (Berthold Technologies, Guelph, ON, Canada). Pour l'essai β -galactosidase, on incube 20 μ l de lysat de cellules avec 150 μ l d'une solution de β -galactosidase (60mM Na₂HPO₄ (Fisher), 40mM NaH₂PO₄ (Sigma-Aldrich), 10mM KCl (Fisher), 1mM MgCl₂ (Fisher), 0.35% β -mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich), 0.1% ONPG (Sigma-Aldrich)) jusqu'à l'obtention d'une coloration jaune. On lie ensuite l'absorbance à 420nm avec un spectrophotomètre à plaques Benchmark Plus™ (Bio-Rad). Pour l'analyse des résultats, on divise la valeur de luciférase par la valeur de β -galactosidase pour obtenir l'activité relative de l'activité luciférase.

14. Analyse des résultats

Pour les analyses d'expression des différents isoformes de ERR, un total de 16 tissus humains sains et cancéreux paires provenant de différents patients de la Dre Julie Carrier ont été analysés. Dans ce mémoire, les résultats présentés sont représentatifs de 4 expériences indépendantes

effectuées. En ce qui concerne les échantillons sains et de polypes de souris, un total de 12 échantillons pairés ont été analysés et les résultats présentés sont représentatifs de 3 expériences effectuées indépendamment. Pour les expériences nécessitant des souris immunodéficientes nues CD-1, un total de 8 souris a été utilisé.

III-RÉSULTATS

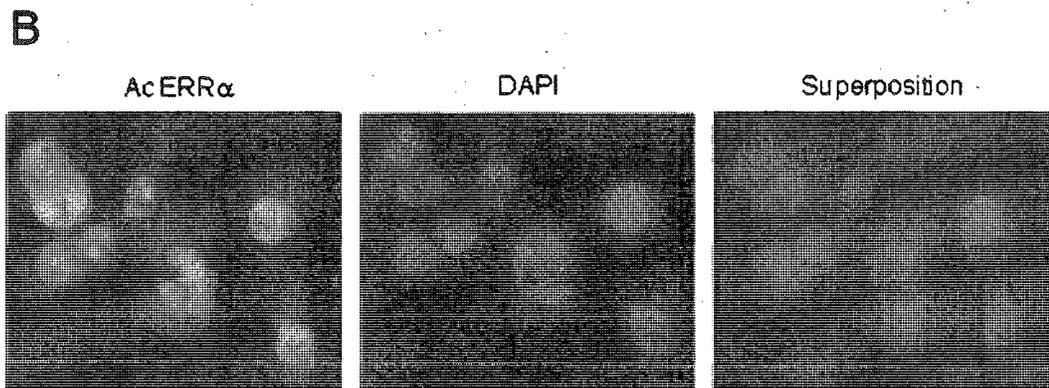
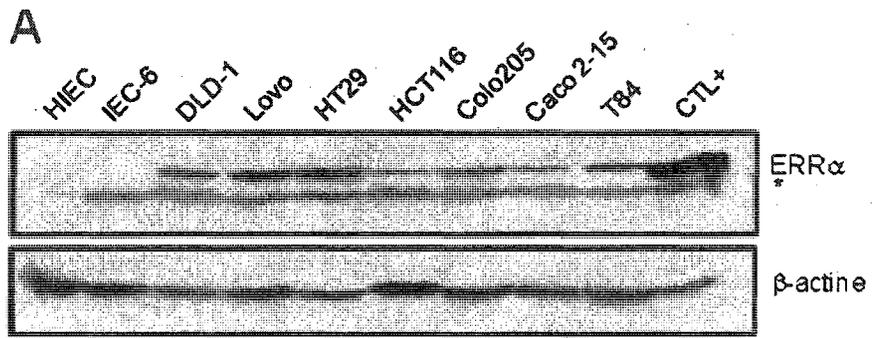
1. Implication de $ERR\alpha$ dans la prolifération des cellules épithéliales coliques

1.1. *Expression de $ERR\alpha$ dans le côlon humain*

Cavallini et collaborateurs ont documenté dans la muqueuse du côlon humain la présence d'ARN_m codant pour $ERR\alpha$ et $ERR\gamma$, et l'absence de $ERR\beta$ (CAVALLINI et al., 2005). De plus, cette équipe a observé une expression génique plus importante de $ERR\alpha$ dans les échantillons de cancer en comparaison avec le côlon sain, l'expression de $ERR\gamma$ n'étant pas modulée. Nous avons donc vérifié par immunobuvardage de type Western l'expression protéique de $ERR\alpha$ dans des lignées cellulaires d'origine intestinale disponibles localement. Nous avons remarqué une expression d' $ERR\alpha$ définitivement plus forte dans les lignées cancéreuses colorectales humaines, en comparaison avec les lignées HIEC et IEC-6 (Fig 6.A.). En fait, sur cet immunobuvardage, $ERR\alpha$ n'est pas détecté dans la population de cellules saines intestinales humaines non-immortalisées HIEC et la lignée saine épithéliale intestinale de rat IEC-6. De plus, nous avons déterminé que $ERR\alpha$ était localisé principalement au noyau des cellules de la lignée HCT116, tel que visualisé par immunofluorescence et contre-coloration nucléaire au DAPI, avec un léger marquage cytoplasmique (Fig 6.B.).

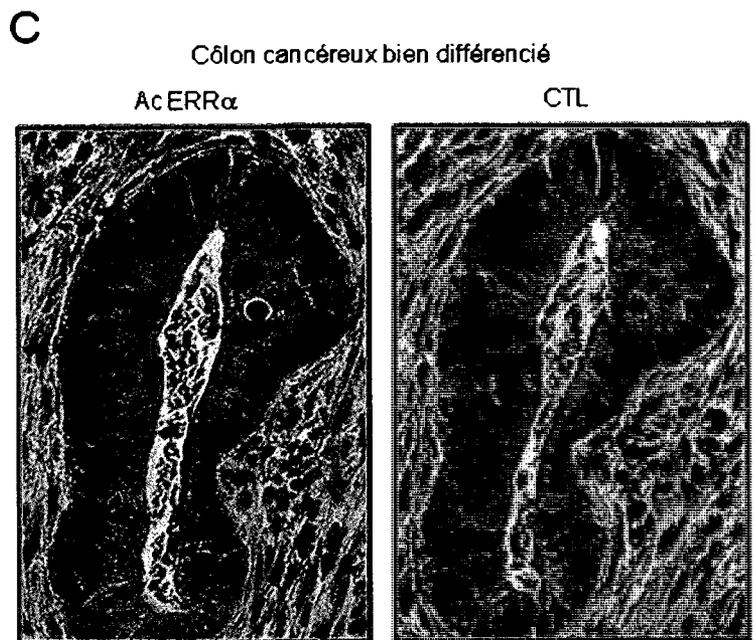
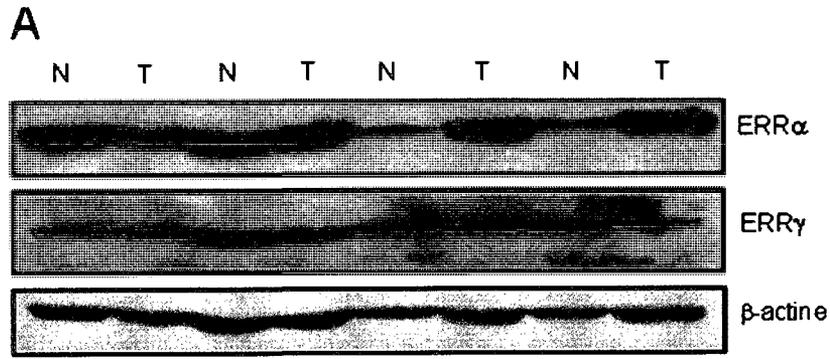
Figure 6. Expression d'ERR α dans les lignées cellulaires intestinales. (A)

Immunobuvardage de type Western sur des extraits protéiques totaux d'une lignée saine intestinale humaine(HIEC), d'une lignée saine intestinale de rat (IEC-6) et de sept lignées cancéreuses coliques humaines (DLD-1, Lovo, HT29, HCT116, Colo205, Caco 2-15 et T84) ainsi qu'un contrôle positif de cellules 293T transfectées transitoirement avec la construction pCMXhERR α (CTL+). Un anticorps polyclonal pour ERR α humain (1/10 000) généré dans le laboratoire du Dr Giguère ainsi qu'un anticorps polyclonal commercial pour β -actine (Chemicon 1/10 000) ont été utilisés (* : bande non-spécifique). **(B)** Immunofluorescence sur des cellules HCT116. Un anticorps polyclonal commercial pour ERR α (Novus 1/3 000) a été utilisé et les lames ont été montées avec un milieu de montage contenant du DAPI puis visualisées à un grossissement de 40X.



Par la suite, afin de compléter les observations publiées faites sur l'expression génique de $ERR\alpha$, nous avons investigué l'expression protéique de $ERR\alpha$ dans les tissus sains et cancéreux de côlon humain. Par immunobuvardage de type Western, nous avons ainsi analysé l'expression de $ERR\alpha$ dans du lysat provenant d'une banque interne de tissus cancéreux de côlon, apparié au côlon sain du même patient. Ainsi, malgré une expression plutôt hétérogène de $ERR\alpha$ entre les différents échantillons, nous remarquons une augmentation de l'expression protéique d' $ERR\alpha$ dans les tissus cancéreux de côlon en comparaison avec les tissus sains adjacents (Fig 7.A.). Puisque l'expression génique de $ERR\gamma$ fut déjà rapportée (CAVALLINI et al., 2005) son expression protéique fut déterminée par immunobuvardage de type Western dans les mêmes échantillons de tissus cancéreux et sain du côlon (Fig 7.A.). Comme nous pouvons le voir avec cet immunobuvardage de type Western représentatif, nous n'observons pas de modulation de l'expression de $ERR\gamma$ entre le tissu sain et le tissu cancéreux de côlon apparié. Afin de caractériser la localisation de $ERR\alpha$ selon l'axe crypte-intercrypte du côlon, nous avons procédé à des évaluations immunohistochimiques de côlon humain. Dans l'épithélium non cancéreux, $ERR\alpha$ est détecté principalement dans le noyau des cellules épithéliales du deux-tiers inférieur de la crypte.(Fig. 7.B.). Dans les cellules du haut de la crypte et de la région inter-crypte, l'expression de $ERR\alpha$ est surtout cytoplasmique. Il est connu que ces cellules sont différenciées et non prolifératives. Une hypothèse à cette observation sera exposée plus loin dans

Figure 7. Expression des isoformes ERR α et γ dans le tissu sain et cancéreux de côlon. (A) Exemple d'immunobuvardage de type Western sur des extraits protéiques totaux de tissus cancéreux (T : tumoral) et de tissus sains adjacents (N : normal) de côlon. Des anticorps polyclonaux commerciaux pour ERR α (Novus, 1/3 000) et β -actine (Chemicon, 1/10 000) ainsi qu'un anticorps polyclonal pour ERR γ humain (1/8 000) généré dans le laboratoire du Dr Giguère ont été utilisés. (B, C) Immunohistochimie sur des tissus sains et de cancer de côlon bien différencié. Les tissus ont été colorés à l'hématoxyline et un anticorps polyclonal commercial pour ERR α (Novus, 1/125) a été utilisé. Pour le contrôle (CTL), nous avons utilisé un tissu de côlon cancéreux bien différencié sans anticorps primaire. Les tissus ont été visualisés à un grossissement de 40X.



le mémoire. L'immunolocalisation de $ERR\alpha$ fut aussi effectuée sur du tissu provenant d'un spécimen de cancer du côlon bien différencié (Fig 7.C.). Il est à noter que l'expression de $ERR\alpha$ y est restreinte aux cellules épithéliales avec une expression dans les cellules du stroma très faible. De plus, l'expression de $ERR\alpha$ est fortement nucléaire, tel qu'attendu d'un récepteur nucléaire sous sa forme active.

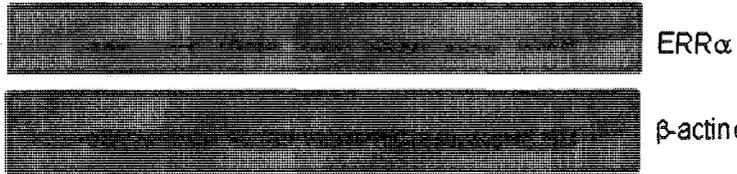
1.2. *Expression de $ERR\alpha$ dans le côlon murin*

Bien que mon projet concerne principalement le côlon humain, la perspective d'études sur l'animal nous a stimulé à déterminer l'expression de $ERR\alpha$ dans le côlon murin. Nous avons ainsi remarqué qu' $ERR\alpha$ possède une forte localisation nucléaire dans les cellules épithéliales tout au long de l'axe vertical de la crypte colique (Fig 8.B). Afin de valider la localisation uniforme de $ERR\alpha$ le long de cet axe dans la crypte, nous avons effectué une isolation épithéliale en séquence de type Weiser qui a été mise au point dans le laboratoire du Dr Jean-François Beaulieu, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada. Brièvement, cette technique consiste à inverser un segment de côlon sur un tube et à le ligaturer avec du fil à coudre, afin d'exposer l'épithélium, pour ensuite l'agiter à intervalles définis dans une solution d'EDTA. Ceci permet la récolte des différentes fractions épithéliales, allant des cellules se détachant facilement du haut de la crypte colique aux cellules du bas de la crypte moins exposées. Nous avons par la suite

Figure 8. Expression d'ERR α chez la souris. (A) Immunobuvardage de type Western sur des extraits protéiques totaux de côlon sain (N : normal) et de polypes (P : polype) de souris ainsi qu'un contrôle positif de cellules 293T transfectées transitoirement avec la construction pCMXhERR α (CTL+). Des anticorps polyclonaux commerciaux pour ERR α (Novus 1/3 000) et β -actine (Chemicon 1/10 000) ont été utilisés. **(B)** Immunohistochimie sur des tissus sains de côlon de souris. Les tissus ont été colorés à l'hématoxyline et un anticorps polyclonal commercial pour ERR α (Novus 1/3 000) a été utilisé. Le contrôle (CTL) étant un tissu sans anticorps primaire. Les tissus ont été visualisés à un grossissement de 40X.

A

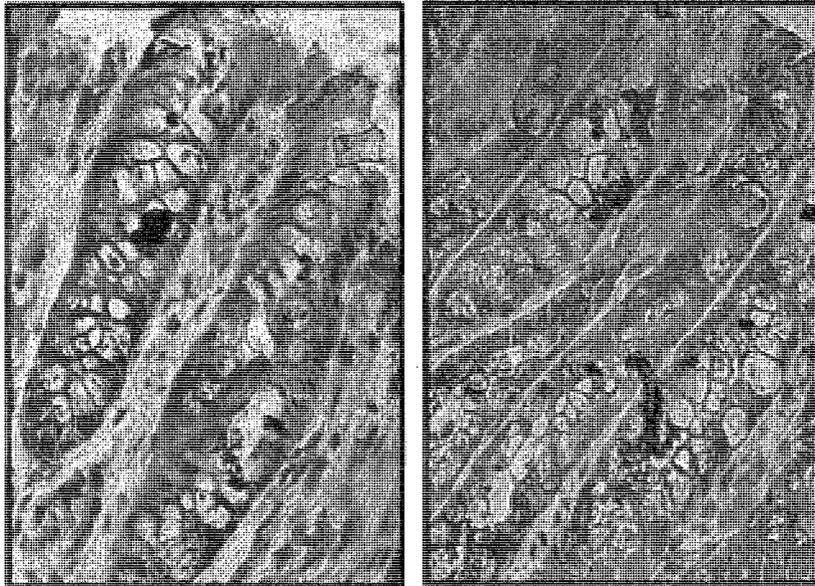
N P N P N P N P CTL+



B

AcERR α

CTL



déterminé par immunobuvardage de type Western que l'expression protéique de $ERR\alpha$ le long de l'axe vertical de la crypte colique était homogène (non illustré). Ceci est conforme aux études immunohistochimiques précédemment effectuées. Par la suite, nous avons déterminé, par immunobuvardage de type Western, l'expression de $ERR\alpha$ dans la muqueuse du colon normal et celle provenant d'adénome du côlon de souris déficientes pour le gène APC (souris APC^{Min+}). Tel qu'observé à la figure 8.A., l'expression de $ERR\alpha$ est sensiblement la même dans les échantillons de côlon normal et d'adénome.

1.3. Effet d'une baisse d'expression de $ERR\alpha$ sur la croissance cellulaire et tumorale

Afin d'étudier plus en détail le rôle et l'implication de $ERR\alpha$ dans la prolifération des cellules cancéreuses colorectales, nous avons choisi comme première stratégie celle d'une diminution forcée de $ERR\alpha$. L'expression d'un shARN ciblant $ERR\alpha$ dans des cellules exprimant de hauts niveaux de notre protéine d'intérêt devrait nous permettre de mettre en évidence un phénotype cellulaire différent et attribuable à la diminution de $ERR\alpha$. De plus, nous avons opté pour une approche de modification stable de l'expression de $ERR\alpha$. Pour se faire, plusieurs shARN ciblant différentes régions de l'ARN_m d' $ERR\alpha$ ont été clonés dans un vecteur d'expression lentiviral et sous le contrôle du promoteur Pol III U6 (Xia 2003). En raison d'insuccès de tous les shRNA-

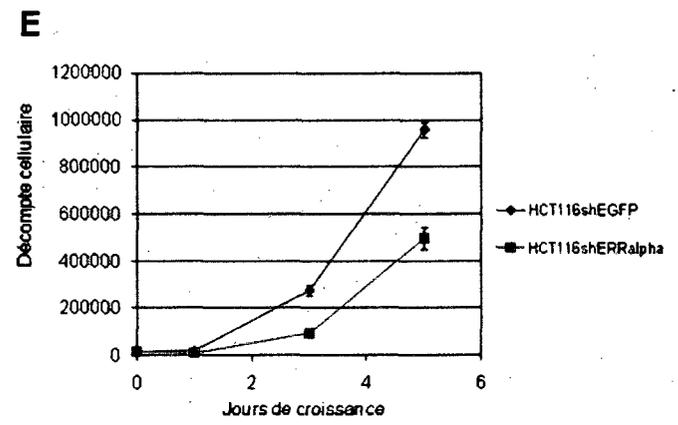
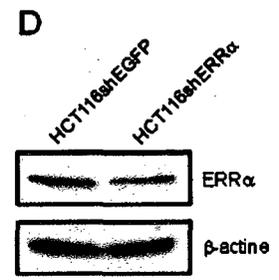
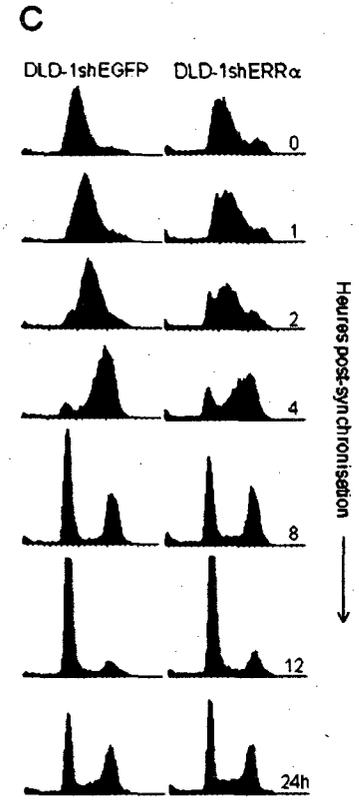
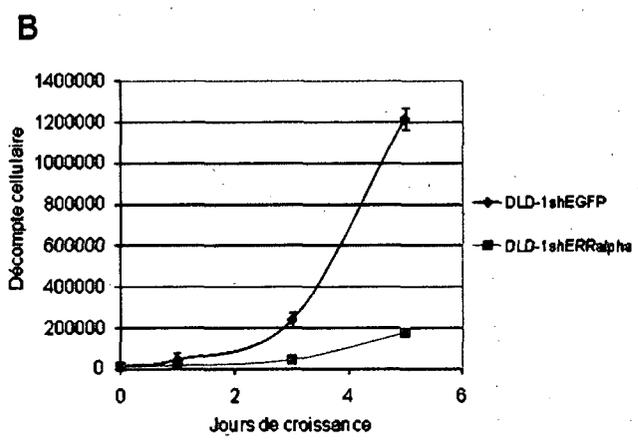
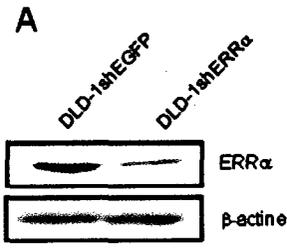
lentivirus testés à diminuer l'expression protéique de $ERR\alpha$, nous avons plutôt opté pour l'utilisation de vecteurs d'expression sous le contrôle du promoteur H1. Ce promoteur étant probablement plus puissant à induire l'expression de nos différents shARN ciblant $ERR\alpha$, nous avons obtenu une construction lentivirale qui diminue efficacement l'expression de $ERR\alpha$, tel qu'observé par immunobuvardage de type Western d'un résultat représentatif (Fig 9.A.).

Suite à ces études de validation, nous avons infecté les cellules cancéreuses d'origine colique DLD-1 et HCT116 avec ce shARN lentivirus et obtenu des populations cellulaires stables modifiées. Les résultats obtenus dans ces deux lignées cellulaires sont sensiblement similaires, mais nous avons observé un effet plus prononcé dans la lignée DLD-1 (Fig 9.A. et 9.D.). Nous avons donc effectué la majorité de nos expériences avec cette lignée cellulaire. En premier lieu, nous avons effectué une cinétique de croissance comparant les cellules DLD-1shEGFP (contrôle) et DLD-1sh $ERR\alpha$. Nous avons constaté une diminution très significative de la croissance des cellules DLD-1 sh $ERR\alpha$ à 3 et 5 jours post ensemencement (Fig 9.B.), cette diminution de croissance étant aussi observée avec la lignée cellulaire HCT116 (Fig 9.E.). Il est à noter que dans nos boîtes de pétris de cellules, nous n'avons pas observé d'augmentation quant au nombre de cellules flottantes entre les DLD-1shEGFP et les cellules DLD-1sh $ERR\alpha$. De plus, en effectuant une coloration au bleu Trypan afin de dénombrer le nombre de cellules en mort cellulaire en comparaison aux cellules saines, nous n'avons

pas observé d'augmentation dans les pourcentages de cellules mortes sur les cellules saines.

Afin d'évaluer plus en détail l'effet d'une réduction d'expression de $ERR\alpha$ sur la prolifération cellulaire, nous avons effectué une analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux. En synchronisant au préalable les cellules étudiées, cette analyse nous permet d'évaluer leur contenu en ADN et ainsi leur progression dans le cycle cellulaire. Ultiment, cette technique vise à documenter un blocage ou un ralentissement d'une phase du cycle cellulaire qui serait responsable de la baisse de croissance cellulaire des DLD-1 sous-exprimant $ERR\alpha$. Afin de synchroniser les cellules DLD-1 en phase S, nous avons utilisé la méthode de double blocage à la thymidine. Les cellules furent par la suite libérées du blocage et recueillies aux temps 0, 1, 2, 4, 8, 12 et 24 heures. Suite à la fixation et au marquage de l'ADN par l'iodure de propidium, les cellules furent soumises à une analyse FACS utilisant les équipements disponibles dans le laboratoire du Dr Steimle (FACS calibre Becton Dickenson). Tel qu'illustré à la Figure 9.C., il y a un ralentissement à 2 et 4 heures post-synchronisation du passage du contenu en ADN de $2n$ à $4n$ dans les cellules DLD-1sh $ERR\alpha$, en comparaison avec les cellules DLD-1shEGFP, même si la synchronisation des cellules DLD-1sh $ERR\alpha$ semble légèrement incomplète. D'ailleurs, la mesure du pourcentage de cellules DLD-1 shEGFP dans chaque phase du cycle cellulaire démontre qu'à 2 heures post-synchronisation, environ 28% des cellules ont un contenu d'ADN de $2n$, donc consistant avec la phase G1, 65% sont en transition entre l'état $2n$ et $4n$, donc

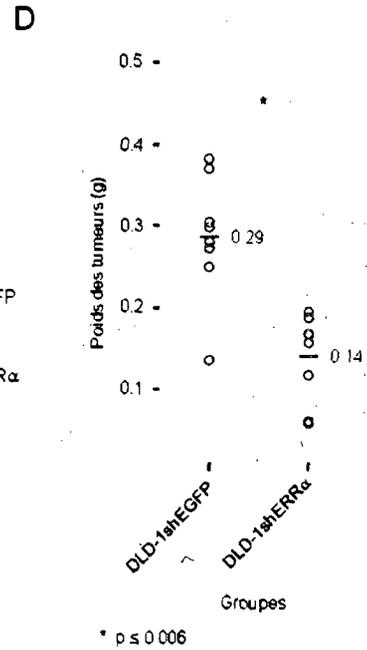
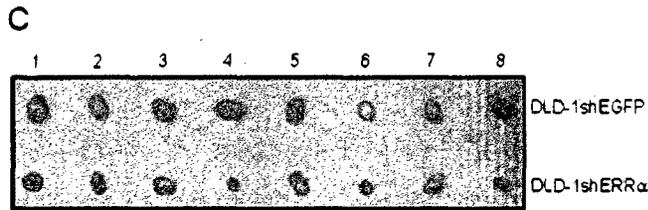
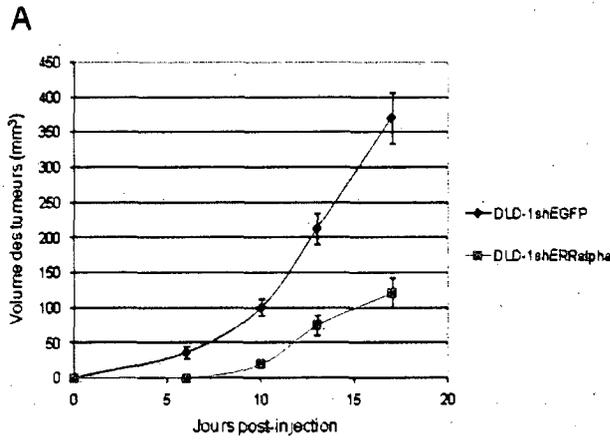
Figure 9. Effet de la baisse d'expression d'ERR α sur la prolifération des cellules DLD-1 et HCT116. (A) Immunobuvardage de type Western sur des extraits protéiques totaux des lignées cellulaires stables DLD-1shEGFP et DLD-1shERR α . Des anticorps polyclonaux commerciaux pour ERR α (Novus 1/3 000) et β -actine (Chemicon 1/10 000) ont été utilisés. **(B)** Courbe de croissance des cellules DLD-1shEGFP et DLD-1shERR α . Les cellules ont été dénombrées en utilisant un compteur de cellules. **(C)** Analyse de FACS sur les cellules DLD-1shEGFP et DLD-1shERR α après synchronisation par la méthode de double blocage à la thymidine. Les cellules ont été traitées avec de l'iodure de propidium puis analysées. **(D)** Immunobuvardage de type Western sur des extraits protéiques totaux des lignées cellulaires stables HCT116shEGFP et HCT116shERR α . Des anticorps polyclonaux commerciaux pour ERR α (Novus 1/3 000) et β -actine (Chemicon 1/10 000) ont été utilisés. **(B)** Courbe de croissance des cellules HCT116shEGFP et HCT116shERR α . Les cellules ont été dénombrées en utilisant le compteur de cellules du laboratoire de la Dre Rivard.



en phase S, et 6% sont en état 4n, donc en phases G2/M. Par comparaison, les pourcentages dans les cellules DLD-1shERR α sont de 45, 42 et 10%, pour les phases G1, S et G2/M, respectivement. Il semble donc y avoir un léger retard des cellules DLD-1 sous exprimant ERR α à passer de la phase G1 à la phase G2/M. Ce retard est plus notable pour l'analyse en cytométrie de flux à 4 heures post-synchronisation où ces pourcentages sont de 8, 21 et 70%, pour les cellules DLD-1shEGFP et de 20, 26 et 50% pour les cellules DLD-1shERR α . Cette expérience fut cependant réalisée qu'à une occasion et d'autres expériences doivent être effectuées afin de confirmer ce premier résultat.

Nous avons par la suite voulu voir si cette prolifération cellulaire moindre *in vitro*, associée à une réduction d'expression de ERR α , était aussi observable en essai de tumorigénèse *in vivo*. Nous avons donc injecté les cellules DLD-1shERR α et DLD-1shEGFP sous la peau de souris nues CD-1 et avons documenté la croissance tumorale subséquente. Ainsi, sur une période de deux semaines et demie, nous avons observé une croissance tumorale inférieure pour les tumeurs DLD-1shERR α , comparées aux tumeurs DLD-1shEGFP, et ce en mesurant le volume des tumeurs à différents temps post injection (Fig 10.A.). Nous pouvons par ailleurs visualiser cette différence de taille des tumeurs sur la photographie représentative d'une souris (Fig 10.B.) et sur celle représentant les tumeurs des huit souris analysées (Fig 10.C.). Lors du sacrifice des souris, nous avons recueilli et pesé les tumeurs.

Figure 10. Effet de la baisse d'expression d'ERR α sur la croissance tumorale dans les souris immunodéficientes CD-1. (A) Courbe de croissance des tumeurs après injection sous-cutanée de 2 000 000 de cellules DLD-1shEGFP et DLD-1shERR α dans les souris immunodéficientes nues CD-1. **(B)** Photo représentative d'une souris immunodéficiente nue CD-1 précédant l'extraction tumorale. La couleur des étoiles est en relation avec la couleur des courbes du graphique en A. **(C)** Photo des tumeurs des huit souris expérimentales. **(D)** Graphique représentatif du poids des tumeurs.



Comme on peut le voir sur le graphique représentatif du poids des tumeurs, les tumeurs DLD-1shERR α avaient un poids moindre de moitié en comparaison avec le poids des tumeurs DLD-1shEGFP (Fig 10.D.). De manière inattendue, l'immunobuvardage de type Western effectué avec les extraits protéiques de tumeurs représentatives n'a pas confirmé la persistance de la sous expression de ERR α dans les tumeurs associées aux cellules DLD-1shERR α , alors que ceci avait été confirmé peu avant l'injection cellulaire (non illustré). Cette observation peut être secondaire à la perte relative des cellules exprimant de fort niveaux de shERR α , tel que discuté ultérieurement.

2. Caractérisation du variant d'épissage alternatif ERR α Δ exon5

2.1. Expression de ERR α Δ exon5 dans le côlon humain

Il a été répertorié dans la littérature la présence d'un variant d'épissage alternatif de ERR α , ERR α Δ exon5, dont l'expression génique était restreinte au tissu sain, donc absente des tissus cancéreux étudiés (XU et LEE, 2003). Cet exon 5 contient entre autre la région codante pour la phénylalanine 329 présente dans la poche de liaison au ligand et responsable de l'activité constitutivement active de ERR α . D'ailleurs, la mutation de cet a. a. confère au mutant des propriétés de dominant négatif sur la forme complète (CHEN et al., 2001). Nous avons donc voulu documenter l'expression de ce variant

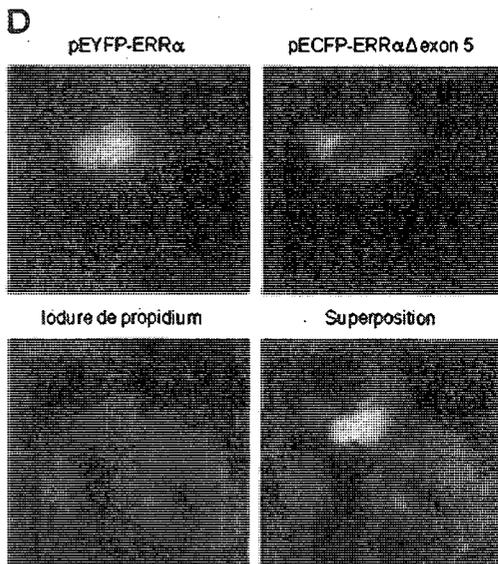
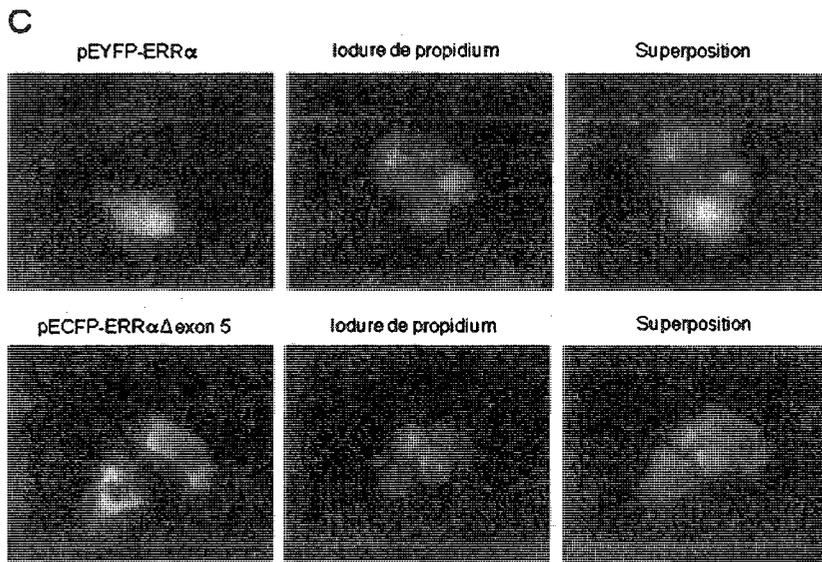
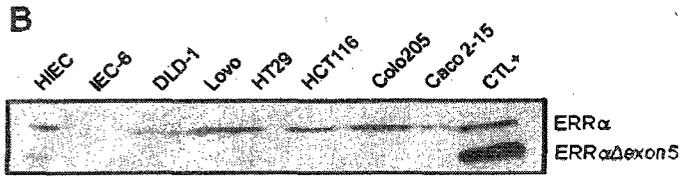
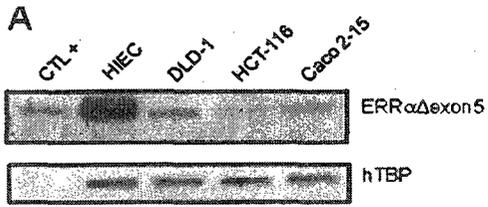
dans le côlon humain. Pour ce faire, Gérald Bernatchez a effectué sur l'ADNc de lignées cellulaires d'origine intestinale un essai d'amplification par PCR en temps réel, utilisant des amorces reconnaissant des régions adjacentes à l'exon 5, des temps d'élongation favorisant l'amplification d'un segment d'ADN complémentaire correspondant à $ERR\alpha\Delta exon5$ et un arrêt de l'amplification en phase exponentielle. Dans le résultat préliminaire illustré à la figure 11.A., l'expression génique de $ERR\alpha\Delta exon5$ fut documentée à des niveaux évidents dans les cellules HIEC (correspondant à un faible nombre de cycle d'amplification). Bien que plus faiblement exprimé, l'expression de $ERR\alpha\Delta exon5$ est aussi observable dans certaines lignées cellulaires cancéreuses. Il est à noter que l'expression différentielle de $ERR\alpha$ et $ERR\alpha\Delta exon5$ ne peut être évaluée dans cet essai. Seule l'expression génique de ce variant avait été répertorié dans la littérature et nous avons donc effectué un immunobuvardage de type Western afin de vérifier si une protéine correspondant au $ERR\alpha\Delta exon5$ était belle et bien exprimée dans des lignées cellulaires d'origine intestinale. Bien que la faible expression de ce variant rende sa détection ardue, nous avons documenté l'expression de $ERR\alpha\Delta exon5$ dans du lysat provenant de la lignée cellulaire saine HIEC, mais non dans ceux provenant de lignées cellulaires cancéreuses d'origine colorectale (Fig 11.B.). Il est à noter que dans cet échantillon de HIEC, la forme complète est aussi observable.

Par la suite, nous avons vérifié la localisation cellulaire du variant d'épissage $ERR\alpha\Delta exon5$ (Fig 11.C et D.). À défaut de posséder un anticorps

capable de différencier la forme complète de la forme épissée de $ERR\alpha$, nous avons cloné les deux formes dans des vecteurs permettant l'expression de protéines fusionnées à leur extrémité amino-terminale avec une étiquette fluorescente distincte. Nous avons ainsi généré deux protéines fluorescentes, soit $ERR\alpha$ fusionnée à la protéine jaune EYFP, mais reconnue par le filtre vert du microscope, et $ERR\alpha\Delta exon5$ fusionnée à la protéine bleu cyan ECFP. Ces vecteurs d'expression furent séparément et transitoirement transfectés dans des cellules DLD-1 et la localisation des protéines fut documentée par microscopie à fluorescence. Tel que décrit précédemment dans la section 1.1., il y a une localisation nucléaire de la protéine fluorescente correspondant à la forme complète, et ce en se basant sur la fluorescence de l'iodure de propidium qui colore les noyaux des cellules en rouge (Fig 11.C.). Cependant, la fluorescence correspondante au variant d'épissage $ERR\alpha\Delta exon5$ est principalement cytoplasmique (Fig 11.C.). Nous avons par la suite vérifié si une co-transfection des deux constructions résulterait en une relocalisation cellulaire partielle de l'une ou l'autre des deux protéines. Ceci ne fut pas observé, la forme complète restant localisée au noyau et la forme épissée au cytoplasme (Fig 11.D.). Ce résultat observé par microscopie à fluorescence soutient l'hypothèse que la localisation cytoplasmique observée dans les cellules humaine du haut de la crypte colique (Fig 7.B.) résulte de l'expression du variant d'épissage alternatif $ERR\alpha\Delta exon5$, aussi reconnu par l'anticorps utilisé. Nous observons donc une expression de $ERR\alpha\Delta exon5$ dans les cellules à prolifération lente, non-différenciées et non-cancéreuses HIEC,

Figure 11. Expression d'ERR α Δ exon5 dans les lignées cellulaires intestinales.

(A) L'ARN total de la lignée saine intestinale ainsi que des lignées cancéreuses coliques DLD-1, HCT116 et Caco 2-15 a été extrait. L'ADNc a été généré par RT-PCR et une expérience de PCR quantitatif en temps réel a été effectuée. L'expérience a été interrompue avant l'atteinte de la phase plateau et les produits ont été mis sur gel d'agarose 1% et migré par courant électrique. Le contrôle (CTL+) consiste en un produit de PCR fait à partir d'une dilution de notre construction plentihERR α Δ exon5. Brièvement, la construction a été générée dans notre laboratoire par Gérald Bernatchez en utilisant des oligonucléotides complémentaires aux extrémités de la séquence de ERR α , comprenant les sites de restriction des enzymes BamHI en N-terminal et EcoRI en C-terminal, ainsi que d'autres complémentaires à la séquence correspondant à la fin de l'exon 4 et au début de l'exon 6. Une succession de trois PCR a permis de générer un produit correspondant à ERR α Δ exon5 qui a été inséré dans le vecteur d'expression lentiviral plentiadaptateur. **(B)** Immunobuvardage de type Western sur des extraits protéiques totaux d'une lignée saine intestinale humaine (HIEC), d'une lignée saine intestinale de rat (IEC-6) et de six lignées cancéreuses coliques humaines (DLD-1, Lovo, HT29, HCT116, Colo205 et Caco 2-15) ainsi qu'un contrôle positif de cellules 293T transfectées transitoirement avec la construction plentihERR α Δ exon5 (CTL+). Un anticorps polyclonal commercial pour ERR α (Novus 1/3 000) reconnaissant ERR α Δ exon5 a été utilisé. **(C, D)** Microscopie à fluorescence sur des cellules DLD-1 transfectées transitoirement avec les différentes constructions de pEYFP-ERR α et pECFP-ERR α Δ exon5. Les cellules ont préalablement été traitées avec de l'iodure de propidium puis visualisées à un grossissement de 40X.



ainsi qu'une expression d'une forme de $ERR\alpha$, que nous suggérons être le variant d'épissage, dans le cytoplasme des cellules du haut de la crypte de côlon, ces cellules étant non-prolifératives, différenciées et non-cancéreuses. Il serait intéressant de vérifier l'expression protéique du variant d'épissage alternatif dans les cellules Caco-2/15 à différents stades de différenciation, cette détection pourrait être possible avec un anticorps plus spécifique à $ERR\alpha\Delta exon5$. Nous pouvons cependant observer que l'expression de la protéine de $ERR\alpha\Delta exon5$ est restreinte à des cellules non-cancéreuses.

2.2. *Interaction directe entre $ERR\alpha$ et $ERR\alpha\Delta exon5$*

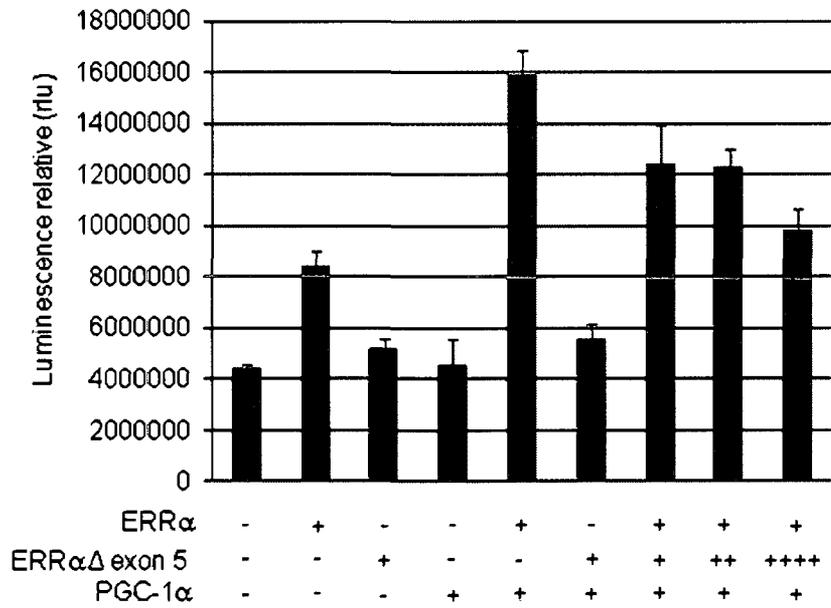
Un aspect intéressant de l'expression de $ERR\alpha\Delta exon5$ est son potentiel de dominant négatif sur l'activation transcriptionnelle de la forme complète. Cette action est plausible puisque le mutant pour la phénylalanine 329 de $ERR\alpha$, encodé par l'exon 5, possède cette caractéristique (XU et LEE, 2003). Nous avons donc voulu caractériser l'activité dominante négative de ce variant. Pour ce faire, nous avons tout d'abord déterminé si l'interaction caractéristique des homodimères de $ERR\alpha$ était préservée avec le variant $ERR\alpha\Delta exon5$. Tel qu'illustré à la Figure 12.A., un essai d'immunoprécipitation utilisant des extraits cellulaires de cellules 293T transfectées avec $ERR\alpha$ et $ERR\alpha\Delta exon5$ a démontré une interaction entre les formes complètes et épissées de $ERR\alpha$. Ceci était attendu considérant la présence du domaine de

Figure 12. Interaction entre ERR α et ERR α Δ exon5. (A) Immunobuvardage de type Western représentant une immunoprécipitation effectuée sur des cellules 293T transfectées transitoirement avec les deux constructions pCMXhERR α et plentiERR α Δ exon5-flag. 500 μ g d'extrait de protéines totales des cellules transfectées ont été immunoprécipités avec 3 μ l d'un anticorps polyclonal commercial pour l'épitope flag (Stratagene) ou des IgG de souris commerciaux (Upstate). Un anticorps polyclonal pour ERR α humain (1/10 000) généré dans le laboratoire du Dr Giguère a été utilisé pour l'immunobuvardage de type western. **(B)** Essai luciférase effectué sur le promoteur de pS2 couplé à la luciférase dans des cellules 293T. Les cellules 293T ont été co-transfectées transitoirement avec 0 et 0.2 μ g du vecteur d'expression pCMXhERR α ; 0, 0.2, 0.4 et 0.8 μ g du vecteur d'expression plentiERR α Δ exon5; 0 et 0.4 μ g du vecteur d'expression pcDNA3PGC-1 α HA; 0.4 μ g du vecteur d'expression de la luciférase sous le contrôle du promoteur de pS2 et 0.1 μ g du vecteur d'expression pCMX β -galactosidase. Les essais ont été effectués en triplicata et les cellules ont été récoltées 48 heures après la transfection et analysées pour leur activité luciférase. Les données ont été normalisées avec les valeurs de la β -galactosidase.

A



B



dimérisation de $ERR\alpha$ dans le variant d'épissage. Nous avons par la suite effectué des essais luciférase à l'aide du promoteur du gène de pS2 couplé à la luciférase, celui-ci étant une cible directe de $ERR\alpha$. On peut ainsi remarquer qu'en comparaison avec la forme complète de $ERR\alpha$, la forme épissée n'active pas le promoteur de pS2 (Fig 12.B.). De plus, l'ajout du principal co-activateur de $ERR\alpha$, PGC-1 α , n'augmente pas l'activité luciférase associée à la transfection de $ERR\alpha\Delta exon5$, bien qu'une induction soit manifeste en présence de la forme complète. Aussi, l'ajout de concentration croissante de $ERR\alpha\Delta exon5$ réduit proportionnellement l'activation du promoteur de pS2 engendrée par $ERR\alpha$ et PGC-1 α .

2.3. Effet d'une surexpression de $ERR\alpha\Delta exon5$ sur la croissance cellulaire et tumorale

Ayant en main un autre outil d'étude des fonctions de $ERR\alpha$ (un dominant négatif), nous avons déterminé l'effet d'une surexpression stable de ce variant d'épissage alternatif de $ERR\alpha$ sur la croissance des cellules cancéreuses DLD-1, celles-ci n'exprimant pas de niveaux protéiques détectables de $ERR\alpha\Delta exon5$. Ce variant fut donc cloné dans un vecteur d'expression lentiviral afin de générer les virus nécessaires à l'infection de cellules DLD-1, ainsi qu'à l'obtention de populations cellulaires stables surexprimant $ERR\alpha\Delta exon5$. La fonctionnalité du modèle fut premièrement

vérifiée par immunobuvardage de type Western et nous avons bel et bien observé l'expression de $ERR\alpha\Delta exon5$, en comparaison avec les cellules DLD-1 infectées avec le vecteur lentiviral seul (Fig 13.A.). Par la suite, nous avons, tout comme précédemment pour les cellules DLD-1sh $ERR\alpha$ et DLD-1shEGFP, effectué une courbe de croissance. Tel qu'observé à la Figure 13.B., les cellules DLD-1 $ERR\alpha\Delta exon5$ ont une croissance moins rapide que les cellules DLD-1plentiadaptateur contrôles. Ces deux populations cellulaires furent soumises à une analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux et nous avons constaté que les cellules surexprimant le variant d'épissage alternatif avaient un cycle cellulaire ralenti comparé au contrôle. Cet effet était similaire à celui observé avec les cellules DLD-1sh $ERR\alpha$ (section 1.3.). En effet, à 2 heures post-synchronisation, les pourcentages des cellules en G1, S, et G2/M étaient de 29, 64 et 7% pour les cellules contrôles comparées à 48, 36 et 13% pour les cellules DLD-1 $ERR\alpha\Delta exon5$ (Fig 13.C.). Au temps 4 heures post-synchronisation, les différents pourcentages de cellules dans les différentes phases étaient de 8, 27 et 64% pour les cellules contrôles et de 21, 29 et 46% pour les cellules exprimant le variant d'épissage alternatif.

Ces populations cellulaires de DLD-1 furent aussi injectées sous la peau de souris immunodéficientes nues CD-1. En concordance avec les analyses *in vitro*, nous avons constaté une moindre croissance des tumeurs DLD-1 $ERR\alpha\Delta exon5$ en comparaison aux tumeurs DLD-1plentiadaptateur, ainsi qu'un poids moindre des tumeurs au sacrifice des souris (Fig 14.A., B., C. et D.). Nous avons aussi extrait les protéines d'échantillons de tumeurs et

Figure 13. Effet d'une surexpression d'ERR α Δ exon5 sur la prolifération des cellules DLD-1. (A) Immunobuvardage de type Western sur des extraits protéiques totaux des lignées cellulaires stables DLD-1plentiadapteur et DLD-1ERR α Δ exon5. Des anticorps polyclonaux commerciaux pour ERR α (Novus 1/3 000) et β -actine (Chemicon 1/10 000) ont été utilisés. **(B)** Courbe de croissance des cellules DLD-1plentiadapteur et DLD-1ERR α Δ exon5. Les cellules ont été dénombrées en utilisant le compteur de cellules du laboratoire de la Dre Rivard. **(C)** Analyse de FACS sur les cellules DLD-1plentiadapteur et DLD-1ERR α Δ exon5 après synchronisation par la méthode de double blocage à la thymidine. Les cellules ont été traitées avec de l'iodure de propidium puis analysées.

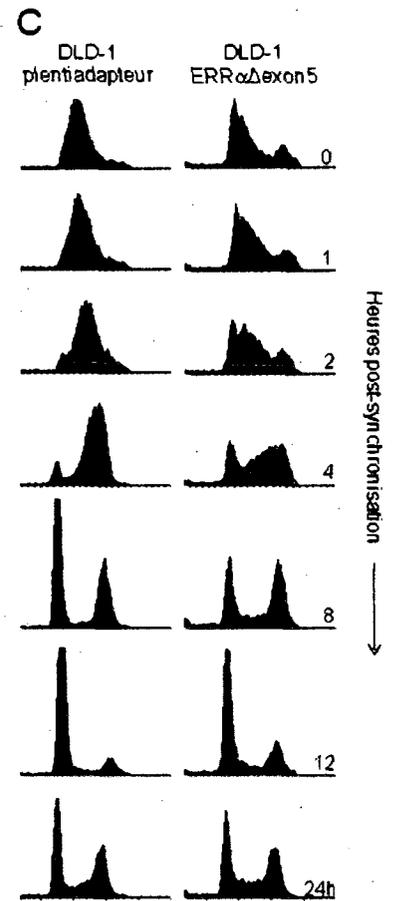
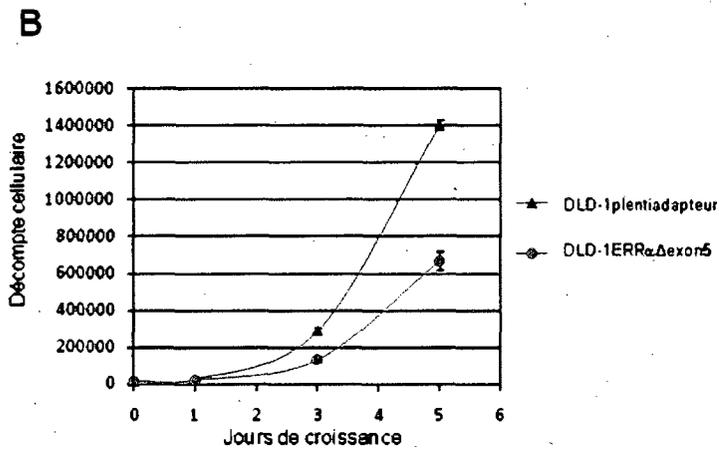
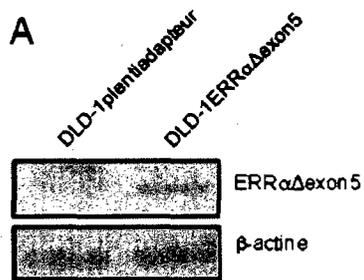
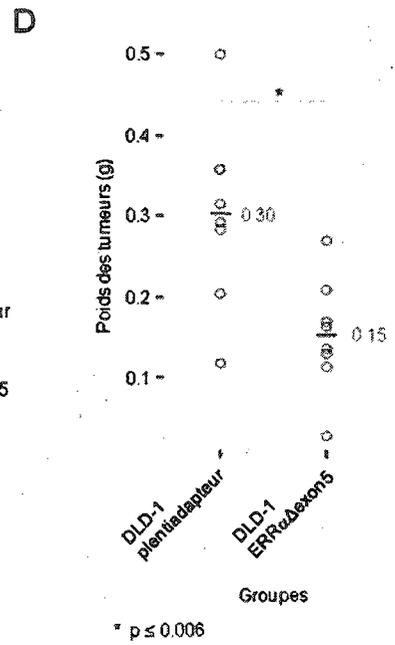
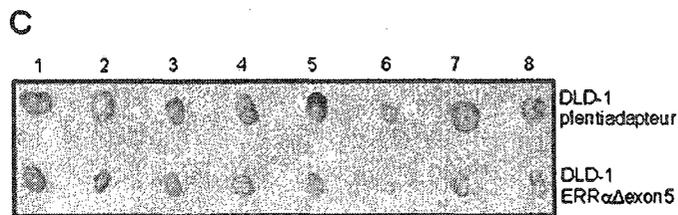
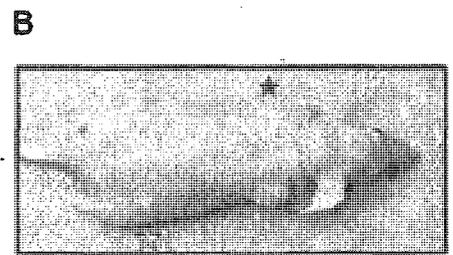
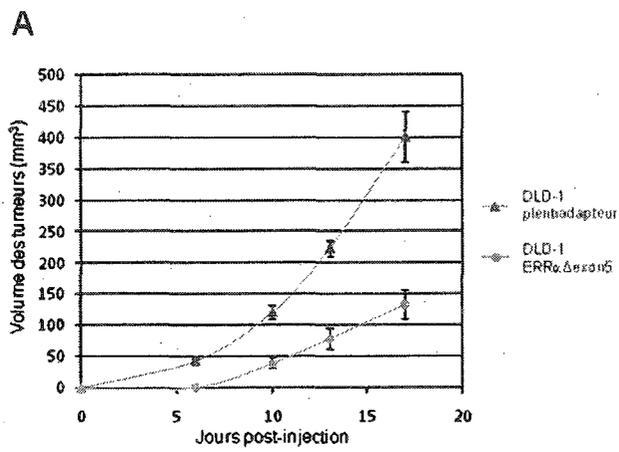


Figure 14. Effet de la surexpression d'ERR α Δ exon5 humain sur la croissance tumorale dans les souris immunodéficientes CD-1. (A) Courbe de croissance des tumeurs après injection sous-cutanée de 2 000 000 de cellules DLD-1plentiadapteur et DLD-1ERR α Δ exon5 dans les souris immunodéficientes nues CD-1. **(B)** Photo représentative d'une souris immunodéficiente nue CD-1 précédant l'extraction tumorale. La couleur des étoiles est en relation avec la couleur des courbes du graphique en A. **(C)** Photo des tumeurs des huit souris expérimentales. **(D)** Graphique représentatif du poids des tumeurs.

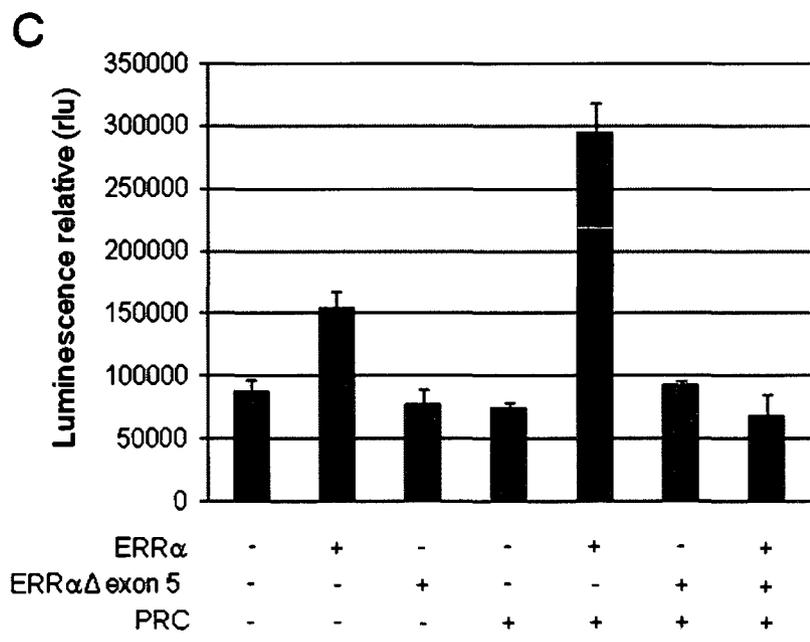
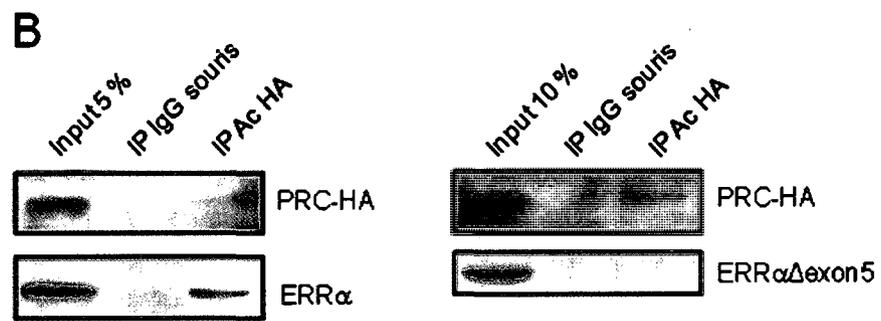
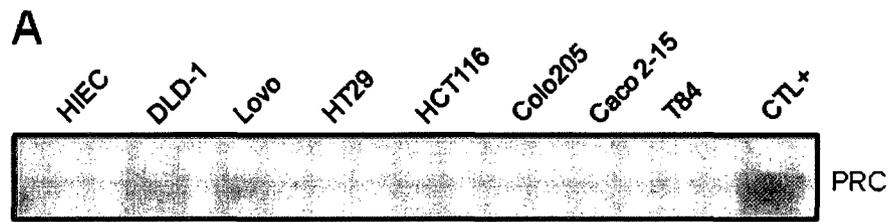


n'avons pas observé l'expression du variant d'épissage alternatif de $ERR\alpha$ par immunobuvardage de type Western (non illustré). Nous sommes cependant convaincus que les cellules injectées possédaient bel et bien cette surexpression car $ERR\alpha\Delta exon5$ fut observé dans l'extrait de cellules DLD-1 préparées pour l'injection et la cinétique de croissance effectuée avec cette population de cellules $DLD-1ERR\alpha\Delta exon5$ a confirmé leur habituelle faible croissance comparée aux cellules contrôles.

3. Caractérisation de l'interaction entre $ERR\alpha$ et le co-activateur PRC

Il est reconnu dans la littérature que $PGC-1\alpha$ et $PGC-1\beta$ sont des co-activateurs transcriptionnels de $ERR\alpha$ (FINCK et KELLY, 2006). Ces deux co-activateurs font partie de la famille des $PGC-1$ qui contient aussi un troisième membre, PRC. Celui-ci semble impliqué dans la prolifération cellulaire mais aucune étude n'a documenté son interaction avec $ERR\alpha$. Nous avons tout d'abord démontré l'expression de PRC dans plusieurs lignées cellulaires intestinales humaines, par immunobuvardage de type Western (Fig 15.A.). Le but principal de cet objectif était de documenter une possible interaction entre PRC et $ERR\alpha$. Un anticorps commercial pour PRC n'étant pas disponible, nous avons obtenu par collaboration des anticorps développés dans le laboratoire du Dr. Scarpulla (VERCAUTEREN et al., 2006). La quantité étant très limitée et l'anticorps ne nous permettant pas une détection claire de PRC,

Figure 15. Effet potentiel de PRC sur la transcription génique médiée par $ERR\alpha$. (A) Immunobuvardage de type Western sur des extraits protéiques totaux des différentes lignées cellulaires intestinales. Le contrôle (CTL+), consiste en des cellules 293T transfectées transitoirement avec la construction pSVsportPRC. Un anticorps polyclonal pour PRC (1/1 000) généré dans le laboratoire du Dr Scarpulla a été utilisé. (B) Immunobuvardage de type Western représentant une immunoprécipitation effectuée sur des cellules 293T transfectées transitoirement avec les constructions pCMXh $ERR\alpha$ ou plentih $ERR\alpha\Delta$ exon5-flag puis pSVsportPRC-HA. 500 μ g d'extrait de protéines totales des cellules transfectées ont été immunoprécipités avec 3 μ l d'un anticorps polyclonal commercial pour l'épitope HA (Sigma) ou des IgG de souris commerciaux (Upstate). Un anticorps polyclonal commercial pour $ERR\alpha$ (Novus 1/3 000) ainsi qu'un anticorps polyclonal généré dans le laboratoire du Dr Scarpulla ont été utilisés. (C) Essai luciférase effectué sur le promoteur de pS2 couplé à la luciférase dans des cellules 293T. Les cellules 293T ont été co-transfectées transitoirement avec 0 et 0.2 μ g du vecteur d'expression pCMXh $ERR\alpha$; 0 et 0.2 μ g du vecteur d'expression plentih $ERR\alpha\Delta$ exon5; 0 et 0.4 μ g du vecteur d'expression pSVsportPRC; 0.4 μ g du vecteur d'expression de la luciférase sous le contrôle du promoteur de pS2 et 0.1 μ g du vecteur d'expression pCMX β -galactosidase. Les essais ont été effectués en triplicata et les cellules ont été récoltées 48 heures après la transfection et analysées pour leur activité luciférase. Les données ont été normalisées avec les valeurs de la β -galactosidase.



nous avons décidé d'étiqueter la construction de PRC, reçue du même laboratoire, avec une étiquette HA. Nous avons ainsi pu effectuer des essais de co-immunoprécipitation entre cette nouvelle construction et la forme complète de $ERR\alpha$, ainsi qu'avec la forme épissée de la protéine. Dans les cellules 293T transfectées avec PRC-HA et $ERR\alpha$ (ou $ERR\alpha\Delta exon5$), l'immunoprécipitation de PRC-HA résulte en la détection de $ERR\alpha$, mais non du variant d'épissage alternatif (Fig 15.B.). Afin de déterminer si cette interaction est fonctionnelle, nous avons effectué des essais luciférase à l'aide du promoteur pS2 couplé à la luciférase. Nous observons un effet positif de PRC sur l'activation transcriptionnelle du promoteur médiée par la forme complète d' $ERR\alpha$, alors qu'aucun effet de PRC n'est remarqué sur $ERR\alpha\Delta exon5$ (Fig 15.C.).

IV-DISCUSSION

Les travaux effectués dans le cadre de ma maîtrise ont permis de montrer l'importance de la forme complète d'ERR α dans la prolifération des cellules cancéreuses du côlon. Nous avons aussi documenté pour la première fois la présence d'un variant d'épissage alternatif d'ERR α dans le côlon, que nous avons caractérisé comme interagissant directement avec la forme complète et se comportant comme un dominant négatif de cette dernière. Nous avons aussi montré que PRC était un nouveau co-activateur transcriptionnel d'ERR α .

Objectif 1 : Étudier l'implication d'ERR α dans la croissance des cellules cancéreuses du côlon

L'importance d'ERR α et son rôle majeur dans le métabolisme mitochondrial sont très bien documentés dans la littérature (MOOTHA et al., 2004, SCHREIBER et al., 2004, SLADEK et al., 1997, SORIANO et al., 2006). Cette protéine régule l'expression de différents gènes important pour la biogenèse et les fonctions mitochondriales (chaîne de transport des électrons, la transcription de l'ADN mitochondrial, la β -oxydation des acides gras, etc...). Nous venons de documenter une baisse de prolifération des cellules cancéreuses coliques DLD-1 suite à la baisse d'expression de ERR α par shARN ou à la surexpression d'un dominant négatif de cette protéine.

L'analyse des résultats de FACS nous permet de suggérer que c'est bel et bien la prolifération qui est modulée. En effet, autant dans l'analyse des cellules DLD-1shERR α que des cellules DLD-1ERR α Δ exon5 en comparaison avec leurs contrôles respectifs, nous n'observons pas d'augmentation marquée du nombre de cellules en phase sub-G1, représentant les cellules apoptotiques dans ces analyses. De plus, par essais de coloration au bleu trypan, nous n'avons pas observé d'augmentation du pourcentage de cellules mortes.

La mitochondrie, dans son rôle d'usine énergétique cellulaire, génère l'ATP nécessaire aux fonctions cellulaires mais aussi des espèces d'oxygène réactif (ROS, *reactive oxygen species*) (FRUEHAUF et MEYSKENS, 2007). Ces ROS, à concentrations non toxiques dans la cellule, donnent un avantage prolifératif à plusieurs types cellulaires (BURDON, 1995). Nous suggérons ainsi que la baisse de croissance des cellules DLD-1shERR α et DLD-1ERR α Δ exon5, en comparaison avec nos cellules DLD-1shEGFP et DLD-1plentiadapteur, pourrait être attribuable au fait que ces cellules possèdent un métabolisme mitochondrial grandement diminué, ce qui entraîne de part le fait même une concentration de ROS générés tellement faible qu'ils ne pourraient plus amener cet avantage prolifératif aux cellules. En effet, la baisse d'expression de ERR α par shRNA, ou l'utilisation d'un dominant négatif réduisant l'activité transcriptionnelle de cette protéine, ont pu résulter en une moindre induction de plusieurs gènes importants pour la fonction mitochondriale et donc une réduction du métabolisme mitochondrial. Cette

avenue reste cependant à être plus étudiée en effectuant différentes expériences complémentaires à partir des modèles cellulaires générés, notamment en évaluant leur respiration mitochondriale, leur production de ROS, comme documenté (HAVENS et al., 2006), ainsi qu'en analysant l'expression de certains composants du métabolisme mitochondrial.

Il est aussi possible que $ERR\alpha$ module directement l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire. Par contre, la liste des gènes fréquemment modulés par des facteurs de transcription favorisant la tumorigenèse est relativement longue. De plus, l'analyse préliminaire de cytométrie de flux ne nous permet pas pour le moment de nous orienter avec précision sur un point de contrôle du cycle cellulaire affecté par $ERR\alpha$. Cette expérience de FACS devra être répétée et complétée par l'immunodétection de plusieurs protéines impliquées dans le cycle cellulaire. Pour le moment, l'hypothèse d'une modulation relativement spécifique de l'expression de certaines protéines du cycle cellulaire n'est pas supportée par la littérature. En effet, une analyse d'immunoprécipitation de la chromatine par $ERR\alpha$ suivie d'hybridation sur micropuces d'ADN de promoteur, n'a pas révélé d'enrichissement pour des promoteurs de gène du cycle cellulaire (DUFOUR et al., 2007). Par contre, cette expérience a confirmé le rôle de $ERR\alpha$ dans la régulation de gènes mitochondriaux et associés au métabolisme énergétique. Cependant, il a été montré, et ce dans le cancer de la prostate, que autant $ERR\beta$ que $ERR\gamma$ diminuaient la croissance des cellules cancéreuses via une induction des inhibiteurs $p21^{WAF1/CIP1}$ pour $ERR\beta$ et $p21^{WAF1/CIP1}$ ainsi que

p27^{KIP1} pour ERR γ , ces inhibiteurs intervenant au niveau de la transition G1/S du cycle cellulaire (YU et al., 2007, YU et al., 2008). Il y a été montré aussi que ces deux récepteurs nucléaires pouvaient se lier directement sur le promoteur de ces inhibiteurs et en activer leur transcription. Ces études nous montrent donc l'importance de certains membres de la famille des récepteurs ERR dans la régulation du cycle cellulaire et plus précisément à la transition G1/S. Il s'agirait cependant vraisemblablement de l'effet inverse que nous obtenons avec ERR α et les cellules cancéreuses du côlon, où nous observons une augmentation de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses suite à la baisse d'expression de ERR α . Il n'est cependant pas exclu qu'ERR α puisse jouer un rôle dans la transition G1/S du cycle cellulaire en interagissant avec différents intervenants de ce point de restriction.

De façon intéressante, plusieurs études ont documenté une augmentation de l'expression de ERR α dans différents cancers lorsque comparés à leurs tissus sains respectifs (ARIAZI et al., 2002, GAO et al., 2006, SUN et al., 2005, SUZUKI et al., 2004, WATANABE et al., 2006). De plus, l'étude de Cavallini et collaborateurs (CAVALLINI et al., 2005) a démontré qu'il y avait une augmentation de l'expression de l'ARN_m codant pour ERR α proportionnelle à la progression tumorale. Cette plus grande expression est aussi observée dans les lignées cellulaires provenant de cancer du côlon tel que démontré par nos immunobuvardages de type Western. De plus, dans nos échantillons de tissus sains et cancéreux humains, nous avons observé une expression relativement hétérogène de

l'expression de $ERR\alpha$, mais avec une tendance à la hausse dans le tissu cancéreux. L'essence de notre hypothèse est que cette plus grande expression de la protéine $ERR\alpha$ serait suffisante pour amener un avantage prolifératif à ces cellules. Il est à noter cependant que nous n'observons pas de modulation de l'expression de $ERR\gamma$ dans les différents tissus sains et cancéreux de côlon, laissant présager un rôle spécifique de l'isoforme α dans la carcinogénèse colorectale. L'activité d'un facteur de transcription est fréquemment déterminée par la localisation nucléaire. En accord avec la littérature, nous avons documenté la localisation nucléaire de $ERR\alpha$ dans nos cellules et tissus cancéreux. Cette distribution subcellulaire était attendue de part le rôle de $ERR\alpha$ en tant que récepteur nucléaire. L'analyse immunohistochimique de $ERR\alpha$ fut effectuée sur un échantillon de cancer du côlon bien différencié. La corrélation observée par Cavallini et collaborateurs (CAVALLINI et al., 2005) entre l'expression génique de $ERR\alpha$ et des marqueurs de progression tumorale nous fait spéculer qu'une analyse immunohistochimique effectuée dans un échantillon de cancer de côlon mal différencié aurait peut-être révélé une expression nucléaire de $ERR\alpha$ encore plus forte. L'évaluation et la validation de la valeur pronostique de $ERR\alpha$ dans le cancer du côlon requièrent un plus grand nombre d'échantillons, qui sont actuellement non disponibles. Il est à noter que nous n'avons pas observé de modulation similaire de $ERR\alpha$ dans les tissus des souris, ou du moins que cette modulation était moins évidente. Il se pourrait que $ERR\alpha$ soit impliqué majoritairement dans des étapes plus tardives de la carcinogénèse,

expliquant cette modulation moins évidente dans les polypes de souris, en se rappelant l'augmentation de l'expression de $ERR\alpha$ avec le grade histologique du cancer de côlon humain (CAVALLINI et al., 2005). Nous observons cependant la même localisation nucléaire et épithéliale de $ERR\alpha$ le long de l'axe vertical de la crypte du côlon, une étude précédente ayant montré par hybridation *in situ* chez la souris la localisation presque exclusive de $ERR\alpha$ dans les cellules épithéliales de l'axe crypte-villosité intestinale (CARRIER et al., 2004). Les résultats de cet objectif montrent que la forme complète d' $ERR\alpha$, dont l'expression est augmentée dans le cancer du côlon, amène un avantage prolifératif aux cellules cancéreuses coliques. Nous avons documenté la baisse de cet avantage prolifératif grâce à 2 techniques différentes, soit l'utilisation d'un shARN ou d'un dominant négatif. Une autre approche tout aussi intéressante aurait été d'utiliser un antagoniste de $ERR\alpha$, par exemple le XCT790, et ainsi vérifier la baisse d'avantage prolifératif des cellules cancéreuses coliques observée. L'avantage apporté par cette technique pourrait aussi s'extrapoler dans un modèle murin *in vivo*, alors que les 2 approches précédentes ne sont pas utilisables. Par contre, cet antagoniste de $ERR\alpha$ possède une sélectivité limitée et inhibe faiblement le récepteur $PPAR\gamma$ (BUSCH et al., 2004), bien exprimé dans le côlon humain et murin.

Objectif 2 : Caractériser le variant d'épissage alternatif $ERR\alpha\Delta exon5$ dans l'épithélium du côlon.

Comme nous venons de le montrer, la forme complète de $ERR\alpha$ semble être importante pour la prolifération des cellules cancéreuses. Une étude a documenté l'existence d'un variant d'épissage alternatif de $ERR\alpha$ exprimé dans le tissu sain mais non dans le tissu cancéreux (XU et LEE, 2003). De par le fait que ce variant possède une délétion de l'exon5 contenant la phénylalanine 329, et qu'une étude ait répertorié l'importance de cet a. a. pour l'activité constitutive de la protéine (CHEN et al., 2001), l'équipe de recherche a émis l'hypothèse que ce variant constituait un dominant négatif de la forme complète. Nous avons donc cherché à savoir premièrement si ce variant était exprimé dans les cellules intestinales. Effectivement, $ERR\alpha\Delta exon5$ est exprimé dans les cellules saines plus fortement que dans les cellules cancéreuses. Considérant les travaux antérieurs de Xu et collaborateurs en 2003, la présence, même faible, du variant $ERR\alpha\Delta exon5$ dans les cellules cancéreuses du côlon était inattendue. Afin de valider et mieux documenter la présence de ce variant dans le côlon, des études de RPA (RNase protection assay) vont être effectuées sur les extraits d'ARN de nos différents tissus sains et cancéreux. Cette technique va nous permettre, et ce de façon très sensible, de quantifier l'expression de l'ARN_m de la forme complète et du variant d'épissage dans les différents tissus sains et

cancéreux à notre disposition, l'anticorps disponible ne reconnaissant pas assez le variant pour l'expression protéique.

Par la suite, nous avons cherché à caractériser ce variant et sa relation avec la forme complète de $ERR\alpha$. Nous avons documenté par essais de co-immunoprécipitation que $ERR\alpha\Delta exon5$ interagissait avec la forme complète de $ERR\alpha$. Cependant, en déterminant la localisation cellulaire des deux formes de la protéine, nous avons remarqué qu'elles ne co-localisaient pas au sein des mêmes compartiments cellulaires. En effet, la forme complète est exprimée au noyau alors que la forme épissée est majoritairement observable dans le cytoplasme. N'étant pas dans le même compartiment cellulaire, il est difficile d'imaginer comment le variant $ERR\alpha\Delta exon5$ dimérise avec $ERR\alpha$ et agit tel un dominant négatif par non recrutement de co-activateurs. Cet évènement fut toutefois déjà répertorié dans la littérature pour un variant d'un facteur de transcription, CIITA, qui agissait comme dominant négatif en étant majoritairement localisé au cytoplasme (CAMACHO-CARVAJAL et al., 2004). Travaillant de plus en surexpression, il est fort possible que la majorité du variant d'épissage possède une localisation cytoplasmique mais que le peu localisé au noyau soit suffisant pour agir comme dominant négatif sur la forme complète. Il est à noter de plus qu'une autre étude a documenté la localisation de différents mutants de CIITA (HAKE et al., 2000). Il y est documenté que dans des cellules exprimant de forts niveaux des mutants au cytoplasme, le signal soit tel qu'on ne puisse détecter la fluorescence du signal nucléaire provenant des mutants qui y sont pourtant exprimés. On peut donc croire que

notre variant d'épissage de $ERR\alpha$ est majoritairement exprimé au cytoplasme mais qu'il possède aussi une localisation nucléaire, certes plus faible, mais lui permettant d'interagir avec la forme complète et de constituer un dominant négatif. Il serait intéressant de produire un anticorps spécifique ciblant un peptide provenant de la nouvelle séquence exon 4-exon 6, et ce afin de mieux documenter la localisation cellulaire du variant d'épissage alternatif. Il est cependant intéressant de noter que nous observons une localisation majoritairement cytoplasmique du variant considérant que le NLS est encore présent, et ce en étudiant la séquence du variant en comparaison avec la séquence des récepteurs $ERR\beta$ et $ER\alpha$ (ZHOU et al., 2006). Il est fort possible que le NLS ne soit pas obligatoirement nécessaire à maintenir le récepteur au noyau, mais que ce maintien soit plutôt régulé par l'interaction avec d'autres protéines, cette interaction n'étant plus possible avec la perte de l'exon 5. De plus, nous avons montré que $ERR\alpha\Delta exon5$ n'active pas la transcription du promoteur pS2, cible de $ERR\alpha$, et ce en comparaison avec la forme complète. De plus, par immunoprécipitation, nous avons montré que le principal co-activateur de $ERR\alpha$, $PGC-1\alpha$, interagissait avec la forme complète mais pas avec le variant d'épissage alternatif (donnée non montrée). Cette observation est consistante avec l'étude effectuée sur le mutant F329A de $ERR\alpha$ dans laquelle celui-ci ne recrutait plus les co-activateurs transcriptionnels en raison d'un changement de conformation (CHEN et al., 2001). Cette observation est aussi consistante avec nos résultats obtenus par essais luciférase où $ERR\alpha\Delta exon5$ n'était pas activé par

le co-activateur PGC-1 α , alors que la forme complète l'était. De plus, nous avons observé l'effet dominant négatif du variant sur la forme complète alors que le variant diminue significativement l'activation de la transcription du promoteur pS2 par ERR α .

Comme mentionné précédemment, nous avons montré qu'une surexpression de ERR α Δ exon5 dans les cellules DLD-1 diminuait leur prolifération. Nous avons aussi montré qu'une surexpression de ce variant d'épissage alternatif résultait en sa localisation majoritairement cytoplasmique dans les cellules DLD-1. On sait de plus que les cellules du haut de la crypte colique sont des cellules différenciées non-prolifératives. Or, une localisation nucléaire et cytoplasmique de ERR α est observable dans les cellules du haut de la crypte colique. Cette double immuno-localisation pourrait résulter de l'expression et de la reconnaissance par l'anticorps utilisé des deux formes de la protéine ERR α . Il se pourrait ainsi que le variant d'épissage ERR α Δ exon5 soit exprimé dans le processus de différenciation terminale des colonocytes, afin de réguler et de contrôler, en conjonction avec différents facteurs, l'arrêt de prolifération cellulaire. Cette possible implication de ERR α Δ exon5 dans la différenciation des colonocytes mérite d'être approfondie. Nous avons par contre documenté dans cette étude que ERR α Δ exon5, exprimé dans le côlon, interagissait avec ERR α mais pas le co-activateur transcriptionnel PGC-1 α et qu'il agissait comme un dominant négatif de la forme complète, malgré sa localisation majoritairement cytoplasmique.

Objectif 3 : Documenter et caractériser l'interaction entre ERR α et le co-activateur PRC.

Le co-activateur PRC, faisant partie de la famille des co-activateurs PGC-1, interagit avec le facteur NRF-1, permettant ainsi l'activation de gènes importants dans le métabolisme mitochondrial. Cependant, l'expression de PRC n'est pas augmentée suite à l'induction de la thermogénèse adaptative, comme le sont PGC-1 α et PGC-1 β . Par contre, suite à la stimulation par l'ajout de sérum de l'entrée dans le cycle cellulaire après quiescence cellulaire, il fut démontré que l'expression de PRC était grandement augmentée, mais pas celle de PGC-1 α (ANDERSSON et SCARPULLA, 2001, VERCAUTEREN et al., 2006). Cette observation suggère un rôle de PRC dans la prolifération cellulaire. Nous avons donc premièrement documenté la présence de la protéine PRC dans certaines lignées cancéreuses du côlon. Une étude plus exhaustive devra cependant être effectuée à plus grande échelle, par PRC quantitatif en temps réel, afin de quantifier la présence de PRC dans les tissus sains et cancéreux. Cet objectif visait à amorcer l'étude d'une interaction possible entre PRC et ERR α . Ainsi, nous avons documenté que ces deux protéines interagissaient entre elles et que le co-activateur ne liait pas le variant d'épissage alternatif ERR α Δ exon5, tel que mentionné précédemment pour le co-activateur PGC-1 α . ERR α est donc d'une nouvelle cible pour ce co-activateur jouant un rôle

dans la régulation mitochondriale et dont l'expression est induite suite à la reprise du cycle cellulaire. De plus, nous avons montré que PRC majorait l'activation transcriptionnelle de $ERR\alpha$ sur le promoteur de pS2, alors qu'il n'avait aucun effet sur le variant d'épissage alternatif. Cependant, il faut mentionner que l'activation de PRC sur $ERR\alpha$ est légèrement plus faible que celle de $PGC-1\alpha$ sur $ERR\alpha$. Il est documenté dans la littérature que $PGC-1\alpha$ est recruté sur le LBD de $ERR\alpha$ via son troisième motif LXXLL, soit le motif L3. Lorsque la structure de $PGC-1\alpha$ et PRC est comparée, on se rend compte qu'un seul motif LXXLL est conservé entre $PGC-1\alpha$ et PRC, soit le motif L3. Il serait donc intéressant d'investiguer plus en détail la liaison entre PRC et $ERR\alpha$. Des études de protéines GST sont présentement en cours dans notre laboratoire avec les différents domaines de $ERR\alpha$ afin de cibler le domaine responsable de l'interaction entre $ERR\alpha$ et PRC. De plus, il est tentant de spéculer une fonction de cette interaction dans la prolifération cellulaire et ultimement le cancer. Entre autre, des études d'immunoprécipitation de la chromatine nous permettraient d'approfondir sur les possibles gènes cibles régulés par $ERR\alpha$ via le co-activateur PRC. Ceci devra être abordé dans des études fonctionnelles ultérieures. Nous venons cependant de montrer que le co-activateur PRC est un nouveau co-activateur de $ERR\alpha$ en interagissant avec celui-ci et en activant la transcription de promoteur cible d' $ERR\alpha$.

V. CONCLUSIONS

Les résultats obtenus dans le cadre de ma maîtrise ont permis de révéler l'importance de la protéine $ERR\alpha$ dans la prolifération des cellules cancéreuses colorectales. En effet, par l'utilisation de deux techniques distinctes, soit le shARN ciblé contre la forme complète de $ERR\alpha$, ainsi que l'utilisation d'un variant d'épissage dominant négatif de la forme complète, nous avons documenté qu'une diminution de l'expression et de l'activité transcriptionnelle de la forme complète réduisait la croissance cellulaire, la tumorigenèse *in vivo* et la progression dans le cycle cellulaire. Plusieurs expériences restent encore à faire afin de préciser le rôle et l'implication de $ERR\alpha$ dans la prolifération cellulaire et le cancer. Nous avons de plus caractérisé le variant d'épissage alternatif $ERR\alpha\Delta\text{exon}5$ et son interaction avec la forme complète de la protéine. Nous avons montré que $ERR\alpha\Delta\text{exon}5$ agissait comme un dominant négatif de la forme complète et qu'il était incapable de recruter les co-activateurs transcriptionnels. Finalement, nous avons identifié un nouveau partenaire d'interaction de $ERR\alpha$, PRC, membre de la famille des co-activateurs PGC-1, et documenté son activité co-activatrice de $ERR\alpha$. Le laboratoire est présentement à compléter l'analyse de la liaison entre PRC et $ERR\alpha$, afin de pouvoir mieux caractériser cette liaison et explorer sa fonction dans les cellules épithéliales intestinales humaines normales et cancéreuses.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Dre Julie Carrier, pour m'avoir offert la chance d'effectuer mes études graduées dans son laboratoire. Merci pour ta patience et ta confiance au cours de ces deux dernières années.

J'aimerais ensuite remercier les membres du laboratoire, principalement Gérald Bernatchez, Véronique Giroux et Yolaine Robitaille, ainsi que tous ceux qui y sont passés. Merci Gérald pour ton encadrement technique, pour ton expertise et tes conseils. Merci aux filles pour leur amitié, leurs discussions pas toujours scientifiques. Ce fut deux belles années en votre compagnie.

Merci à ma famille et à mes amis qui ont toujours été là dans les bons et les moins bons moments. Merci à mon père et à ma mère (et les lutins...) pour m'avoir toujours supporté et encouragé, merci pour votre amour. Merci à mon frère et ma sœur pour être mes deux meilleurs amis, je serai toujours là pour vous comme vous avez été là pour moi. Merci à ma femme pour son amour, sa confiance et son support, merci pour tous les encouragements grandement appréciés.

Merci aux membres du département d'Anatomie et biologie cellulaire pour ce séjour passé en votre compagnie, j'ai développé de belles amitiés.

Finalement, merci à Dre Nathalie Rivard et Dre Marie-France Langlois pour avoir accepté de réviser ce mémoire.

BIBLIOGRAPHIE

Aliaga, J. C., Deschenes, C., Beaulieu, J. F., Calvo, E. L. et Rivard, N. (1999) **Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells.** *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 277:631-641.

Andersson, U. et Scarpulla, R. C. (2001) **Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells.** *Mol.Cell.Biol.* 21:3738-3749.

Ariazi, E. A. et Jordan, V. C. (2006) **Estrogen-related receptors as emerging targets in cancer and metabolic disorders.** *Curr.Top.Med.Chem.* 6:203-215.

Ariazi, E. A., Clark, G. M. et Mertz, J. E. (2002) **Estrogen-related receptor alpha and estrogen-related receptor gamma associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer.** *Cancer Res.* 62:6510-6518.

Barry, J. B., Laganier, J. et Giguere, V. (2006) **A single nucleotide in an estrogen-related receptor alpha site can dictate mode of binding and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha activation of target promoters.** *Mol.Endocrinol.* 20:302-310.

Barry, J. B. et Giguere, V. (2005) **Epidermal growth factor-induced signaling in breast cancer cells results in selective target gene activation by orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha.** *Cancer Res.* 65:6120-6129.

Burdon, R. H. (1995) **Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation.** *Free Radic.Biol.Med.* 18:775-794.

Busch, B. B., Stevens, W. C., Jr, Martin, R., Ordentlich, P., Zhou, S., Sapp, D. W., Horlick, R. A. et Mohan, R. (2004) **Identification of a selective inverse agonist for the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha.** *J.Med.Chem.* 47:5593-5596.

Camacho-Carvajal, M. M., Klingler, S., Schnappauf, F., Hake, S. B. et Steimle, V. (2004) **Importance of class II transactivator leucine-rich repeats for dominant-negative function and nucleo-cytoplasmic transport.** *Int.Immunol.* 16:65-75.

Cardoso,J., Boer,J., Morreau,H. et Fodde,R. (2007) **Expression and genomic profiling of colorectal cancer.** *Biochim.Biophys.Acta.* 1775:103-137.

Carrier,J. C., Deblois,G., Champigny,C., Levy,E. et Giguere,V. (2004) **Estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) is a transcriptional regulator of apolipoprotein A-IV and controls lipid handling in the intestine.** *J.Biol.Chem.* 279:52052-52058.

Cavallini,A., Notarnicola,M., Giannini,R., Montemurro,S., Lorusso,D., Visconti,A., Minervini,F. et Caruso,M. G. (2005) **Oestrogen receptor-related receptor alpha (ERRalpha) and oestrogen receptors (ERalpha and ERbeta) exhibit different gene expression in human colorectal tumour progression.** *Eur.J.Cancer.* 41:1487-1494.

Chen,S., Zhou,D., Yang,C. et Sherman,M. (2001) **Molecular basis for the constitutive activity of estrogen-related receptor alpha-1.** *J.Biol.Chem.* 276:28465-28470.

Cheung,C. P., Yu,S., Wong,K. B., Chan,L. W., Lai,F. M., Wang,X., Suetsugi,M., Chen,S. et Chan,F. L. (2005) **Expression and functional study of estrogen receptor-related receptors in human prostatic cells and tissues.** *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 90:1830-1844.

Dufour,C. R., Wilson,B. J., Huss,J. M., Kelly,D. P., Alaynick,W. A., Downes,M., Evans,R. M., Blanchette,M. et Giguere,V. (2007) **Genome-wide orchestration of cardiac functions by the orphan nuclear receptors ERRalpha and gamma.** *Cell.Metab.* 5:345-356.

Eudy,J. D., Yao,S., Weston,M. D., Ma-Edmonds,M., Talmadge,C. B., Cheng,J. J., Kimberling,W. J. et Sumegi,J. (1998) **Isolation of a gene encoding a novel member of the nuclear receptor superfamily from the critical region of Usher syndrome type IIa at 1q41.** *Genomics.* 50:382-384.

Finck,B. N. et Kelly,D. P. (2006) **PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease.** *J.Clin.Invest.* 116:615-622.

Fre,S., Huyghe,M., Mourikis,P., Robine,S., Louvard,D. et Artavanis-Tsakonas,S. (2005) **Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine.** *Nature.* 435(7044):964-968.

Fruehauf,J. P. et Meyskens,F. L.,Jr. (2007) **Reactive oxygen species: a breath of life or death?** *Clin.Cancer Res.* 13:789-794.

Fujimura,T., Takahashi,S., Urano,T., Kumagai,J.,Ogushi,T., Horie-Inoue,K., Ouchi,Y., Kitamura,T., Muramatsu,M. et Inoue,S. (2007) **Increased expression of estrogen-related receptor α (ERR α) is a negative**

prognostic predictor in human prostate cancer. *Int.J.Cancer.* 120:2325-2330

Gao,M., Sun,P., Wang,J., Zhao,D. et Wei,L. (2006) **Expression of estrogen receptor-related receptor isoforms and clinical significance in endometrial adenocarcinoma.** *Int.J.Gynecol.Cancer.* 16:827-833.

Gearhart,M. D., Holmbeck,S. M., Evans,R. M., Dyson,H. J. et Wright,P. E. (2003) **Monomeric complex of human orphan estrogen related receptor-2 with DNA: a pseudo-dimer interface mediates extended half-site recognition.** *J.Mol.Biol.* 327:819-832.

Giguere,V. (2002) **To ERR in the estrogen pathway.** *Trends Endocrinol.Metab.* 13:220-225.

Giguere,V., Yang,N., Segui,P. et Evans,R. M. (1988) **Identification of a new class of steroid hormone receptors.** *Nature.* 331:91-94.

Hake,S. B., Masternak,K., Kammerbauer,C., Janzen,C., Reith,W. et Steimle,V. (2000) **CIITA leucine-rich repeats control nuclear localization, in vivo recruitment to the major histocompatibility complex (MHC) class II enhanceosome, and MHC class II gene transactivation.** *Mol.Cell.Biol.* 20:7716-7725.

Hammer,G. D., Krylova,I., Zhang,Y., Darimont,B. D., Simpson,K., Weigel,N. L. et Ingraham,H. A. (1999) **Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress.** *Mol.Cell.* 3:521-526.

Havens,C. G., Ho,A., Yoshioka,N. et Dowdy,S. F. (2006) **Regulation of late G1/S phase transition and APC Cdh1 by reactive oxygen species.** *Mol.Cell.Biol.* 26:4701-4711.

Heard,D. J., Norby,P. L., Holloway,J. et Vissing,H. (2000) **Human ERRgamma, a third member of the estrogen receptor-related receptor (ERR) subfamily of orphan nuclear receptors: tissue-specific isoforms are expressed during development and in the adult.** *Mol.Endocrinol.* 14:382-392.

Hentschke,M. et Borgmeyer,U. (2003) **Identification of PNR2 and TLE1 as activation function-1 cofactors of the orphan nuclear receptor ERRgamma.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 312:975-982.

Hentschke,M., Susens,U. et Borgmeyer,U. (2002) **Domains of ERRgamma that mediate homodimerization and interaction with factors stimulating DNA binding.** *Eur.J.Biochem.* 269:4086-4097.

Hosono,T., Fukao,T., Ogihara,J., Ito,Y., Shiba,H., Seki,T. et Ariga,T. (2005) **Diallyl trisulfide suppresses the proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cells through oxidative modification of beta-tubulin.** *J.Biol.Chem.* 280:41487-41493.

Huppunen,J. et Aarnisalo,P. (2004) **Dimerization modulates the activity of the orphan nuclear receptor ERRgamma.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 314:964-970.

Huss,J. M., Torra,I. P., Staels,B., Giguere,V. et Kelly,D. P. (2004) **Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle.** *Mol.Cell.Biol.* 24:9079-9091.

Johnston,S. D., Liu,X., Zuo,F., Eisenbraun,T. L., Wiley,S. R., Kraus,R. J. et Mertz,J. E. (1997) **Estrogen-related receptor alpha 1 functionally binds as a monomer to extended half-site sequences including ones contained within estrogen-response elements.** *Mol.Endocrinol.* 11:342-352.

Kallen,J., Schlaeppli,J. M., Bitsch,F., Filipuzzi,I., Schilb,A., Riou,V., Graham,A., Strauss,A., Geiser,M. et Fournier,B. (2004) **Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha): crystal structure of ERRalpha ligand binding domain in complex with peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha.** *J.Biol.Chem.* 279:49330-49337.

Kraus,M. H., Popescu,N. C., Amsbaugh,S. C. et King,C. R. (1987) **Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms.** *EMBO J.* 6:605-610.

Kraus,R. J., Ariazi,E. A., Farrell,M. L. et Mertz,J. E. (2002) **Estrogen-related receptor alpha 1 actively antagonizes estrogen receptor-regulated transcription in MCF-7 mammary cells.** *J.Biol.Chem.* 277:24826-24834.

Laganriere,J., Tremblay,G. B., Dufour,C. R., Giroux,S., Rousseau,F. et Giguere,V. (2004) **A polymorphic autoregulatory hormone response element in the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) promoter dictates peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha control of ERRalpha expression.** *J.Biol.Chem.* 279:18504-18510.

Larrouy,D., Vidal,H., Andreelli,F., Laville,M. et Langin,D. (1999) **Cloning and mRNA tissue distribution of human PPARgamma coactivator-1.** *Int.J.Obes.Relat.Metab.Disord.* 23:1327-1332.

Lin,J., Puigserver,P., Donovan,J., Tarr,P. et Spiegelman,B. M. (2002) **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta**

(PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J.Biol.Chem.* 277:1645-1648.

Liu,D., Zhang,Z. et Teng,C. T. (2005) **Estrogen-related receptor-gamma and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha regulate estrogen-related receptor-alpha gene expression via a conserved multi-hormone response element. *J.Mol.Endocrinol.* 34:473-487.**

Liu,D., Zhang,Z., Gladwell,W. et Teng,C. T. (2003) **Estrogen stimulates estrogen-related receptor alpha gene expression through conserved hormone response elements. *Endocrinology.* 144:4894-4904.**

Lu,D., Kiriyaama,Y., Lee,K. Y. et Giguere,V. (2001) **Transcriptional regulation of the estrogen-inducible pS2 breast cancer marker gene by the ERR family of orphan nuclear receptors. *Cancer Res.* 61:6755-6761.**

Luo,J., Sladek,R., Carrier,J., Bader,J. A., Richard,D. et Giguere,V. (2003) **Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *Mol.Cell.Biol.* 23:7947-7956.**

Luo,J., Sladek,R., Bader,J. A., Matthyssen,A., Rossant,J. et Giguere,V. (1997) **Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta. *Nature.* 388:778-782.**

Marieb,E. N. et Lachaîne,R. (2005) **Anatomie et physiologie humaines.1288.**

Menard,D., Pothier,P. et Gallo-Payet,N. (1987) **Epidermal growth factor receptors during postnatal development of the mouse colon. *Endocrinology.* 121:1548-1554.**

Monsalve,M., Wu,Z., Adelmant,G., Puigserver,P., Fan,M. et Spiegelman,B. M. (2000) **Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol.Cell.* 6:307-316.**

Mootha,V. K., Handschin,C., Arlow,D., Xie,X., St Pierre,J., Sihag,S., Yang,W., Altshuler,D., Puigserver,P., Patterson,N., Willy,P. J., Schulman,I. G., Heyman,R. A., Lander,E. S. et Spiegelman,B. M. (2004) **Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:6570-6575.**

Perlmann,T., Umesono,K., Rangarajan,P. N., Forman,B. M. et Evans,R. M. (1996) **Two distinct dimerization interfaces differentially modulate target gene specificity of nuclear hormone receptors. *Mol.Endocrinol.* 10:958-966.**

Perreault,N. et Beaulieu.J. F. (1996) **Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures.** *Exp. Cell Res.* 224(2):354-364

Pettersson,K., Svensson,K., Mattsson,R., Carlsson,B., Ohlsson,R. et Berkenstam,A. (1996) **Expression of a novel member of estrogen response element-binding nuclear receptors is restricted to the early stages of chorion formation during mouse embryogenesis.** *Mech.Dev.* 54:211-223.

Puigserver,P., Adelmant,G., Wu,Z., Fan,M., Xu,J., O'Malley,B. et Spiegelman,B. M. (1999) **Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking.** *Science.* 286:1368-1371.

Puigserver,P., Wu,Z., Park,C. W., Graves,R., Wright,M. et Spiegelman,B. M. (1998) **A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis.** *Cell.* 92:829-839.

Quaroni,A., Wands,J., Trelstad,R.L. et Isselbacher,K.J. (1979) **Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria.** *J. Cell. Biol.* 80(2):248-265

Rivard,N., Boucher,M. J., Asselin,C. et L'Allemain,G. (1999) **MAP kinase cascade is required for p27 down-regulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells.** *Am.J.Physiol.Cell.Physiol.* 277 :652-664

Rivard,N. (2006) **Notes du cours Biologie cellulaire-BCL726**, cours suivit la session d'hiver 2006 au département d'Anatomie et biologie cellulaire.

Rollerova,E. et Urbancikova,M. (2000) **Intracellular estrogen receptors, their characterization and function (Review).** *Endocr.Regul.* 34:203-218.

Sancho,E., Batlle,E. et Clevers,H. (2004) **Signaling pathways in intestinal development and cancer.** *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 20:695-723.

Schreiber,S. N., Emter,R., Hock,M. B., Knutti,D., Cardenas,J., Podvinec,M., Oakeley,E. J. et Kralli,A. (2004) **The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:6472-6477.

Schreiber,S. N., Knutti,D., Brogli,K., Uhlmann,T. et Kralli,A. (2003) **The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha).** *J.Biol.Chem.* 278:9013-9018.

Seely,J., Amigh,K. S., Suzuki,T., Mayhew,B., Sasano,H., Giguere,V., Laganriere,J., Carr,B. R. et Rainey,W. E. (2005) **Transcriptional regulation**

of dehydroepiandrosterone sulfotransferase (SULT2A1) by estrogen-related receptor alpha. *Endocrinology*. 146:3605-3613.

Sheng,H., Shao,J., Townsend,C. M. Jr. et Evers,B. M. (2003) **Phosphatidylinositol 3-kinase mediates proliferative signals in intestinal epithelial cells.** *Gut*. 52(10):1472-1478.

Shi,H., Shigeta,H., Yang,N., Fu,K., O'Brian,G. et Teng,C. T. (1997) **Human estrogen receptor-like 1 (ESRL1) gene: genomic organization, chromosomal localization, and promoter characterization.** *Genomics*. 44:52-60.

Sladek,R., Bader,J. A. et Giguere,V. (1997) **The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene.** *Mol.Cell.Biol*. 17:5400-5409.

Soreide,K., Janssen,E. A., Soiland,H., Korner,H. et Baak,J. P. (2006) **Microsatellite instability in colorectal cancer.** *Br.J.Surg*. 93:395-406.

Soriano,F. X., Liesa,M., Bach,D., Chan,D. C., Palacin,M. et Zorzano,A. (2006) **Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2.** *Diabetes*. 55:1783-1791.

Sun,P., Sehouli,J., Denkert,C., Mustea,A., Konsgen,D., Koch,I., Wei,L. et Lichtenegger,W. (2005) **Expression of estrogen receptor-related receptors, a subfamily of orphan nuclear receptors, as new tumor biomarkers in ovarian cancer cells.** *J.Mol.Med*. 83:457-467.

Suzuki,T., Miki,Y., Moriya,T., Shimada,N., Ishida,T., Hirakawa,H., Ohuchi,N. et Sasano,H. (2004) **Estrogen-related receptor alpha in human breast carcinoma as a potent prognostic factor.** *Cancer Res*. 64:4670-4676.

van Leeuwen,I. M., Edwards,C. M., Ilyas,M. et Byrne,H. M. (2007) **Towards a multiscale model of colorectal cancer.** *World J.Gastroenterol*. 13:1399-1407.

Vanacker,J. M., Bonnelye,E., Chopin-Delannoy,S., Delmarre,C., Cavailles,V. et Laudet,V. (1999a) **Transcriptional activities of the orphan nuclear receptor ERR alpha (estrogen receptor-related receptor-alpha).** *Mol.Endocrinol*. 13:764-773.

Vanacker,J. M., Pettersson,K., Gustafsson,J. A. et Laudet,V. (1999b) **Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta.** *EMBO J*. 18:4270-4279.

Vanacker, J. M., Delmarre, C., Guo, X. et al. (1998) **Activation of the osteopontin promoter by the orphan nuclear receptor estrogen receptor related alpha.** *Cell Growth Differ.* 9:1007-1014.

Vercauteren, K., Pasko, R. A., Gleyzer, N., Marino, V. M. et al. (2006) **PGC-1-related coactivator: immediate early expression and characterization of a CREB/NRF-1 binding domain associated with cytochrome c promoter occupancy and respiratory growth.** *Mol. Cell. Biol.* 26:7409-7419.

Wallberg, A. E., Yamamura, S., Malik, S., Spiegelman, B. M. et al. (2003) **Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1alpha.** *Mol. Cell.* 12:1137-1149.

Watanabe, A., Kinoshita, Y., Hosokawa, K., Mori, T., Yamaguchi, T. et al. (2006) **Function of estrogen-related receptor alpha in human endometrial cancer.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91:1573-1577.

Wende, A. R., Huss, J. M., Schaeffer, P. J., Giguere, V. et al. (2005) **PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism.** *Mol. Cell. Biol.* 25:10684-10694.

Xu, Q. et al. (2003) **Discovery of novel splice forms and functional analysis of cancer-specific alternative splicing in human expressed sequences.** *Nucleic Acids Res.* 31:5635-5643.

Yang, C., Zhou, D. et al. (1998) **Modulation of aromatase expression in the breast tissue by ERR alpha-1 orphan receptor.** *Cancer Res.* 58:5695-5700.

Yu, S., Wang, X., Ng, C. F., Chen, S. et al. (2007) **ERR γ suppresses cell proliferation and tumor growth of androgen-sensitive and androgen-insensitive prostate cancer cells and its implication as a therapeutic target for prostate cancer.** *Cancer Res.* 67(10):4904-4914.

Yu, S., Wong, Y. C., Wang, X. H., Ling, M. T., Ng, C. F., Chen, S. et al. (2008) **Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor- β suppresses in vitro and in vivo growth of prostate cancer cells via p21WAF1/CIP1 induction and as a potential therapeutic target in prostate cancer.** *Oncogene.* 27:3313-3328.

Zhang, Z. et al. (2007) **Interplay between estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) and gamma (ERRgamma) on the regulation of ERRalpha gene expression.** *Mol. Cell. Endocrinol.* 264:128-141.

Zhang,Z. et Teng,C. T. (2001) **Estrogen receptor alpha and estrogen receptor-related receptor alpha1 compete for binding and coactivator.** *Mol.Cell.Endocrinol.* 172:223-233.

Zhang,Z. et Teng,C. T. (2000) **Estrogen receptor-related receptor alpha 1 interacts with coactivator and constitutively activates the estrogen response elements of the human lactoferrin gene.** *J.Biol.Chem.* 275:20837-20846.

Zhou,W., Liu,Z., Wu,J., Liu,J. H., Hyder,S. M., Antoniou,E. et Lubahn,D. B. (2006) **Identification and characterization of two novel splicing isoforms of human estrogen-related receptor beta.** *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 91:569-579.