

Université de Sherbrooke

**Régulation de l'expression de l'ostéopontine par le récepteur nucléaire orphelin
relié au récepteur à l'estrogène alpha dans le cancer colorectal.**

Par
Salah Boudjadi
Programme de biologie cellulaire

Mémoire présenté à la faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de
l'obtention du grade de maître en sciences (M. Sc.) en biologie cellulaire

Sherbrooke, Canada
Décembre 2011

Membres du jury d'évaluation
Pre Julie Carrier, département de médecine
Pr Jean-François Beaulieu, département d'anatomie et de biologie cellulaire
Pre Caroline Saucier, département d'anatomie et de biologie cellulaire
Pr Benoit Paquette, département de médecine nucléaire et biologie

© Salah Boudjadi, 2011.



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: 978-0-494-90972-0

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-90972-0

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

*À Dieu, qui m'a donné la
faculté de penser et à mes
parents Aziz et Fatma qui
m'ont toujours soutenu dans
mes études.*

Table des matières

Table des matières	I
Résumé	III
Liste des figures.....	V
Liste des tableaux	VI
Liste des abréviations	VII
Liste des communications	IX
I. Introduction.....	1
A. Le cancer colorectal	1
1. Statistiques	1
2. Morphologie.....	1
a. L'adénome.....	1
b. L'adénocarcinome.....	2
3. Classification anatomoclinique (TNM et regroupement en stades)	3
4. Cancérogenèse colorectale	4
a. Voie de l'instabilité chromosomique (cancers LOH+).....	4
b. Voie de l'instabilité des microsatellites (MSI)	5
c. Méthylation des ilots CpG	5
d. L'adénome dentelé.....	6
B. L'ostéopontine.....	6
1. Structure : gène et protéine	6
2. Expression dans le cancer	8
3. Rôle dans la progression tumorale	9
4. Régulation de l'expression de l'OPN dans le cancer	12
C. Le récepteur nucléaire orphelin $ERR\alpha$	16
1. Structure d' $ERR\alpha$	16
a. Le domaine aminoterminal	17
b. Le domaine de liaison à l'ADN	17
c. Le domaine charnière	17
d. Le domaine de liaison au ligand	18
2. Régulation de l'activité d' $ERR\alpha$	21
3. Expression et rôle physiologique d' $ERR\alpha$ dans les tissus	21
4. Implication dans le cancer	22
D. Hypothèse et Objectifs du projet de recherche	24
II. Matériels et méthodes	25
1. Confection des micromatrices tissulaires (MMT)	25
2. Immunohistochimie et analyse statistique de l'expression d' $ERR\alpha$ et de l'OPN.	25
3. Culture cellulaire	27

4.	Transfections transitoires et essais luciférase	28
4-1.	Transfections transitoires	28
4-2.	Essai luciférase	29
5.	Analyse bioinformatique du promoteur de l'OPN	29
6.	Mutagenèse dirigée	30
7.	Génération des virus Sh5 (anti-ERR α) et ShC (contrôle)	31
8.	Infection des cellules tumorales coliques HT29.....	32
9.	Extraction des ARNs	32
10.	Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc).....	33
11.	PCR standard	33
12.	PCR Quantitatif en temps réel (RT qPCR).....	34
13.	Extraction des protéines totales	35
14.	Extraction des protéines nucléaires	36
15.	Dosage des protéines	36
16.	Immunobuvardage	36
17.	Immunoprécipitation de la chromatine (CHIP).....	38
III.	Résultats	42
1.	Validation de la micromatrice tissulaire	42
2.	Profil d'expression immunohistochimique d'ERR α et de l'OPN dans le cancer colorectal	42
3.	Modulation de l'expression de l'OPN par ERR α dans la lignée tumorale colique HT29 : analyse en RT qPCR et en immunobuvardage	43
4.	Analyse de l'effet de la surexpression d'ERR α sur l'activité du promoteur de l'OPN	57
5.	Identification des éléments de réponse pour ERR α sur le promoteur de l'OPN	66
6.	Recherche de lien direct d'ERR α sur le promoteur de l'OPN par immunoprécipitation de la chromatine dans la lignée HT29.....	72
IV.	Discussion	75
1.	Corrélation et profils d'expression de l'OPN et d'ERR α dans le cancer colorectal	75
2.	Modulation de l'expression de l'OPN par ERR α dans la lignée tumorale colique HT29	80
3.	Effet d'ERR α sur l'activité du promoteur de l'OPN	81
4.	Analyse des éléments de réponse pour ERR α sur le promoteur de l'OPN	82
V.	Conclusions et perspectives	86
VI.	Remerciements	88
VII.	Bibliographie	89

Régulation de l'expression de l'ostéopontine par le récepteur nucléaire orphelin relié au récepteur à l'estrogène alpha dans le cancer colorectal.

Salah BOUDJADI

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

Le cancer colorectal (CCR) représente une des premières causes de mortalité par cancer au Canada. Des analyses d'expression différentielles ont démontré que le gène codant pour l'ostéopontine (OPN) était plus exprimé dans les tumeurs colorectales par rapport au tissu sain adjacent, en corrélation avec l'agressivité tumorale. L'OPN est une glycophosphoprotéine non collagénique de la matrice extracellulaire membre de la famille SIBLING, caractérisée par un domaine RGD (arginine, glycine, aspartate) liant les intégrines. De plus, le clivage de l'OPN peut activer le récepteur CD44 et induire un signal pro-tumorigénique. Plusieurs études expérimentales suggèrent des voies par lesquelles l'OPN participe à la progression tumorale, l'angioinvasion et la métastase. L'expression de l'OPN chez les rongeurs est reconnue dans certains modèles pour être sous le contrôle de facteurs de transcription impliqués dans le cancer, dont c-jun, c-myc, PEA3, Sp1, Nurr1, $ERR\alpha$, $PPAR\gamma$ et VDR. $PPAR\gamma$, corrélant à un bon pronostic du cancer colorectal, réprime l'expression de l'OPN dans des lignées monocytaires leucémique alors que le récepteur à la vitamine D entraîne une surexpression de l'OPN dans la lignée tumorale mammaire RAMA37 de rat. Par ailleurs des résultats du laboratoire suggèrent qu' $ERR\alpha$ est impliqué dans la croissance tumorale colorectale. Notre objectif est de déterminer si $ERR\alpha$ régule l'expression de l'OPN dans ce contexte.

Nous avons réalisé une étude immunohistochimique sur une micromatrice tissulaire (MMT) comportant 85 échantillons de CCR et 8 adénomes avec les marges de résections correspondantes. On a observé que l'expression nucléaire d' $ERR\alpha$ était significativement augmentée ($p < 0.001$) dans 61,2 % des tumeurs avec un score deux fois supérieur à celui de la marge de résection non tumorale. L'expression de l'OPN était augmentée dans 58,8 % des tumeurs avec un score d'immunoréactivité cytoplasmique de 1,5 fois plus intense ($p < 0.001$) que le tissu non tumoral. Dans 55,3% des cas, l'expression d' $ERR\alpha$ était en corrélation avec celle de l'OPN (Kappa pondéré=0.27, $p = 0.0117$) incluant une augmentation synergique dans 40% des adénocarcinomes étudiés. Cependant nous n'avons pas observé de corrélation d'expression des deux protéines en fonction du stade des tumeurs. Le marquage des deux protéines était faible dans les adénomes et comparable à celui du tissu de la marge de résection. En conditions expérimentales, l'infection de la lignée tumorale colique HT29 par un ARN interférent de type sh dirigé contre $ERR\alpha$ (sh5)

entraîne une baisse de l'expression de l'OPN au niveau messager et protéique. En essai luciférase, nous avons observé qu'ERR α , en présence de son coactivateur préféré PGC1 α , augmente l'activité du promoteur de l'OPN alors que la transfection concomitante de l'sh5 ou le traitement des cellules par le XCT790, un agoniste inverse d'ERR α , entraîne dans les deux cas une baisse significative de l'activité luciférase comparée à leurs contrôles respectifs, shC et DMSO. Nous avons identifié par analyse bioinformatique du promoteur de l'OPN trois éléments de réponse incomplets (ERRE-S1, ERRE-S2 et ERRE-S3) pouvant lier ERR α . La mutation différentielle de ces éléments a montré qu'ERR α se lie principalement à l'élément de réponse ERRE-S2, alors que sa liaison au site ERRE-S1 est plus faible. Par contre il ne se lie pas au 3^{ème} site du promoteur de l'OPN. *In vivo*, dans la lignée HT29, l'immunoprécipitation de la chromatine a confirmé qu'ERR α se lie bien au promoteur de l'OPN.

Les résultats d'immunohistochimie indiquant une augmentation synergique d'ERR α et de l'OPN dans 40% des adénocarcinomes étudiés, la modulation de l'expression de l'OPN par ERR α dans la lignée tumorale colique HT29 ainsi que les résultats de biologie moléculaire identifiant au moins un élément de réponse pour ERR α dans le promoteur de l'OPN, suggèrent qu'ERR α serait un régulateur transcriptionnel de l'expression de l'OPN dans le cancer colorectal. La régulation de l'expression de l'OPN pourrait être un des mécanismes par lesquels ERR α favorise la progression tumorale. ERR α et l'OPN pourraient donc être utilisés comme marqueurs diagnostiques et pronostiques et constituer des cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement du cancer colorectal.

Mots clés : ostéopontine, cancer colorectal, ERR α , micromatrice tissulaire.

Liste des figures :

Figure 1. Structure protéique de l'ostéopontine montrant ses différents domaines, et les molécules de liaison correspondantes 10

Figure 2. Représentation schématique du promoteur de l'ostéopontine avec ses principaux régulateurs transcriptionnels 15

Figure 3. Structure du récepteur nucléaire orphelin $ERR\alpha$ 19

Figure 4. Lame de MMT colorée à l'hématoxyline et à l'éosine 45

Figure 5. Illustration de l'expression, en immunohistochimie, d' $ERR\alpha$ et l'OPN dans le cancer colorectal en comparaison avec le tissu de la marge de résection correspondante... 47

Figure 6. Modulation de l'expression de l'OPN par $ERR\alpha$ dans la lignée tumorale colique HT29 55

Figure 7. $ERR\alpha$ coactivé par $PGC1\alpha$ augmente, en essai luciférase, l'activité du promoteur de l'OPN 58

Figure 8. Effet dose dépendant d' $ERR\alpha$ sur le promoteur de l'OPN 60

Figure 9. Effet du XCT790, agoniste inverse d' $ERR\alpha$, sur l'activité du promoteur de l'OPN 62

Figure 10. Effet de l'inhibition de l'expression d' $ERR\alpha$ par le SH5 sur l'activité du promoteur de l'OPN 64

Figure 11. Éléments de réponse pour $ERR\alpha$ sur le promoteur de l'OPN 68

Figure 12. Effet de la mutation d'éléments de réponse potentiels pour $ERR\alpha$ sur l'activité du promoteur de l'OPN 70

Figure 13. Identification, par immunoprécipitation de la chromatine, de l'occupation du promoteur de l'OPN par $ERR\alpha$ dans la lignée tumorale colique 73

Liste des tableaux :

Tableau I. Critères de différenciation de l'adénocarcinome colorectal.....	3
Tableau II. Tumeur primitive (T) dans la classification TNM.....	3
Tableau III. Métastases ganglionnaires (N) dans la classification TNM	4
Tableau IV. Localisation dans d'autres organes (M) dans la classification TNM	4
Tableau V. Groupement par stade	4
Tableau VI. Liste des vecteurs plasmidiques	29
Tableau VII. Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée	31
Tableau VIII. Amorces utilisées pour le PCR et le qPCR en temps réel	35
Tableau IX. Anticorps utilisées pour l'immunobuvardage et l'immunohistochimie	38
Tableau X. Séquences des amorces utilisées pour l'immunoprécipitation de la chromatine	41
Tableau XI. Expression immunohistochimique d'ERR α et de l'OPN dans une série de 85 échantillons de cancer colorectal par rapport à la marge de résection saine	51
Tableau XII. Corrélation entre le score d'expression de l'OPN et d'ERR α dans le cancer colorectal	53

Liste des abréviations :

AKT : phospho-inositide-3-kinase
APC : adenomatosis poliposis coli.
B-raf : v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1.
BRCA1 : breast cancer type 1 susceptibility protein.
CCR : cancer colorectal
ChIP : immunoprécipitation de la chromatine.
COX2 : cyclo-oxygénase 2.
DBD : domaine de liaison à l'ADN.
DMEM : Dulbecco's modification eagle's medium.
Dusp1 : dual specificity protein phosphatase 1
ECL : enhanced chemiluminescence.
EGF : epidermal growth factor.
ERE : estrogen-receptor response element.
ERK : extracellular signal-regulated kinases.
ERRE : estrogen-related receptor response element.
ERR α : estrogen-related receptor alpha
ER α : estrogen-receptor alpha.
FBS : fetal bovine serum.
FXR : farnesoid X receptor.
GSK β : Glycogen synthase kinase 3 beta
HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.
HRP : horseradish peroxidase.
k-ras : v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LB : Luria-Bertani.
LBD : domaine de liaison au ligand.
MCAD : medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene.
MKP-1 : MAPK phosphatase 1
MMT : micromatrice tissulaire
MSI : instabilité des microsatellites.
NTD : domaine aminoterminal
Nurr1 : nuclear receptor related 1 protein.
OPN : ostéopontine
PBS : tampon phosphate salin.
PBT : PBS, BSA, Triton.
PCR : amplification par réaction de polymérisation en chaîne.
PGC1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha.
PGE $_2$: prostaglandines E $_2$.
PMSF : phenylmethanesulfonylfluoride.

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RGD : arginine-glycine-aspartate.
RIP1 :receptor interacting protein (RIP1).
RPM : rotation per minute.
RT qPCR : PCR quantitatif en temps réel.
SDS : sodium dodecyl sulfate.
shRNA : small hairpin RNA.
SIBLING : small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins.
siRNA : small interfering RNA.
SOC : super optimal broth with catabolite repression.
SRC : steroid receptor coactivator.
TBS : tris buffered saline
TEMED : tetramethylethylenediamine.
TP : température de la pièce.
uPA : urokinase plasminogène.
VEGF : vascular endothelial growth factor.
Wnt : wingless intégration site.

Liste des communications

Interventions par communications orales et affichées au cours de la maîtrise :

Salah Boudjadi, Gérald Bernatchez, Jean-François Beaulieu, Julie carrier.

Activation du promoteur humain de l'ostéopontine par le récepteur nucléaire orphelin relié au récepteur à l'œstrogène alpha dans le cancer colorectal.

1. Rencontre de l'Initiation de Recherche en Oncologie Clinique (IROC), 2010
2. Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ) 2010.
3. Canadian Connective Tissue Conference (CTCC) 2011.
4. Association francophone pour le savoir (ACFAS) 2011.
5. 1st International Symposium on the Physiology and Diseases of the Digestive Tract
June 2011.
6. Canadian Digestive Disease Week (CDDW) : association canadienne de gastroentérologie, 2012.

I- Introduction :

A. Le cancer colorectal

1. Statistiques

Selon l'organisation mondiale de la santé, le cancer colorectal (CCR) représente la quatrième cause de mortalité par cancer dans le monde après le cancer du poumon, de l'estomac et du foie. Au Canada le cancer représente la première cause de décès. En 2011, la société canadienne du cancer estime que 22000 personnes recevront le diagnostic de CCR et que 8900 en mourront (<http://www.colorectal-cancer.ca/fr/les-faits-detour/statistiques/>). Le taux de mortalité est de 25% pour les hommes et 15% pour les femmes. La survie à 5 ans est estimée à 65% pour les deux sexes. Du point de vue clinique, le CCR peut être totalement asymptomatique durant les premiers stades de développement, ou peut être marqué par des signes cliniques non spécifiques comme des douleurs abdominales vagues, diarrhées et/ou constipations, amaigrissement et saignements digestifs. Des complications tardives plus graves de type occlusion et perforation digestives peuvent survenir.

2. Morphologie :

a. L'adénome :

Il est bien connu que le cancer colorectal, à part le cancer dit *de-novo* qui représente moins de 5 % des adénocarcinomes colorectaux détectés par endoscopie (Mueller et al, 2002), se développe à partir de lésions précancéreuses dites adénomes. Il s'agit de lésions polyploïdes ou planes, sessiles ou pédiculées. Histologiquement, la lésion est faite de formations tubulaires, villosités ou mixtes avec hyperprolifération des cryptes glandulaires soulevant la muqueuse colique et aboutissant à la formation d'un adénome. Les adénomes sont divisés en deux catégories selon le degré de dysplasie. Dans la dysplasie de bas grade, les cellules ont un noyau hyperchromatique et oblong confiné au pôle basal. Le cytoplasme est éosinophile et conserve une mucosécrétion plus ou moins abondante. Dans la dysplasie de haut grade, il n'y a plus de mucosécrétion et les noyaux sont hyperchromatiques, allongés et disposés n'importe où dans les cellules, donnant donc un aspect pseudostratifié.

L'adénome avec dysplasie de haut grade peut évoluer, en plusieurs années, vers un adénocarcinome authentique. Le risque de transformation cancéreuse d'un adénome augmente avec sa taille et seulement 25 à 30 % des adénomes se transforment en cancer (Bosset et Rouanet, 2005).

b. L'adénocarcinome :

Il s'agit le plus souvent d'un adénocarcinome Lieberkühnien (80%), se développant à partir des cryptes glandulaires. La tumeur est faite de structures tubulaires ou glandulaires de forme et de taille variables (tubulaires, acineuses ou papillaires) avec des atypies discrètes voir marquées en fonction de la différenciation de la tumeur. La cellule tumorale est de grande taille, cubique à cylindrique et a souvent un cytoplasme abondant éosinophile peu mucosécrétant et à limites nettes. Le noyau des cellules est souvent vitreux, mais peut avoir une chromatine dense, avec un nucléole proéminent et des contours irréguliers. Les tumeurs épithéliales du colon et du rectum sont classées en adénocarcinomes bien, moyennement, peu différenciés et indifférenciés. Ces classes sont aussi regroupées en adénocarcinomes de haut grade (bien et moyennement différenciés) et en adénocarcinomes de bas grade (peu différenciés et indifférenciés) (Tableau I, Hamilton et al, 2000).

Dans 20 % des cas, l'adénocarcinome est dit mucineux ou colloïde muqueux en raison de la présence de plages étendues de mucus dans lesquelles se trouvent des formations glandulaires rompues et des cellules tumorales plus petites et dont le cytoplasme est occupé par une grande vacuole de mucus refoulant le noyau en périphérie donnant un aspect de bague à chaton. Ce type de tumeur est considéré comme un adénocarcinome peu différencié (Hamilton et al, 2000).

Tableau I. Critères de différenciation de l'adénocarcinome colorectal.
(Hamilton et al, 2000)

Grade	Différenciation
1	Bien différencié : Formations glandulaires représentant plus de 95% de la tumeur
2	Moyennement différencié : 50-95% de formations glandulaires
3	Peu différencié : glandes entre 5-50% de la tumeur
4	Indifférencié : moins de 5% de formations glandulaires

3. Classification anatomoclinique (TNM et regroupement en stades) :

L'adénocarcinome colorectal est classé sur la pièce opératoire selon l'extension dans la paroi et l'atteinte éventuelle de ganglions lymphatiques, en utilisant des classifications internationalement reconnues (classifications de Dukes, d'Astler Coller et TNM). La classification TNM de l'organisation mondiale de la santé (OMS) est la plus utilisée. Elle regroupe les tumeurs en fonction de leur taille ou du degré d'envahissement pariétal (T, voir tableau II), du statut des ganglions régionaux (N, voir tableau III) et de la présence ou non de métastases (M, voir tableau IV). Pour exemple, une tumeur T2N2M1 correspond à un envahissement de la musculuse avec métastases dans plus de trois ganglions péri-tumoraux et la présence de localisation dans un organe à distance de la tumeur. Dans un but de prise en charge thérapeutique, les tumeurs sont ensuite regroupées en stade (voir tableau V). Les classifications de Dukes et d'Astler Coller sont de moins en moins utilisées.

Tableau II. Tumeur primitive (T) dans la classification TNM.

T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
T2	Tumeur envahissant la musculuse
T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péri-coliques ou péri-rectaux non péritonisés
T4	Tumeur envahissant directement d'autres organes ou d'autres structures et/ou perforant le péritoine viscéral

Tableau III. Métastases ganglionnaires (N) dans la classification TNM.

N0	Pas de métastase ganglionnaire régionale
N1	Métastases dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
N2	Métastases dans plus de 4 ganglions lymphatiques régionaux

Tableau IV. Localisation dans d'autres organes (M) dans la classification TNM.

M0	Pas de métastase.
M1	Présence de métastases.

Tableau V. Groupement par stade

	TNM		
Sade 0	Tis (in situ)	N0	M0
Stade I	T1, T2	N0	M0
Stade II	T3, T4	N0	M0
Stade III	Quelque soit T	N1, N2	M0
Stade VI	Quelque soit T	Quelque soit N	M1

4. Cancérogenèse colorectale

A l'échelon moléculaire, le développement d'un adénome puis d'un cancer colorectal correspond à l'accumulation progressive de nombreuses anomalies comme l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs qui surviennent à différents stades de la séquence adénome-cancer.

L'évolution vers le CCR peut suivre plusieurs voies :

- a. Voie de l'instabilité chromosomique (cancers LOH+) :

Cette voie est associée à de nombreuses altérations incluant l'aneuploïdie, gain ou perte de régions chromosomiques. La mutation la plus connue et la plus précoce est celle du gène APC (Jen J et al, 1994) responsable de la polypose adénomateuse familiale quand la

mutation est germinale, alors que la mutation somatique est à l'origine de 50 % des adénomes sporadiques et elle est présente dans 85% des adénocarcinomes colorectaux (Kerr D, 2003). Il s'agit d'une mutation du gène APC sur le chromosome 5, entraînant une perte de fonction de la protéine APC, connue pour son rôle de régulation du têt de la β -caténine dans la voie Wnt. La deuxième étape de carcinogèneèse colorectale est marquée par la mutation activatrice du proto-oncogène K-ras. Elle survient dans 50% des adénomes de taille supérieure à 1 cm (Vogelstein et al, 1988) et elle représente actuellement un marqueur de non-réponse thérapeutique au Cetuximab© dans le traitement du cancer colorectal métastatique. La mutation du gène de la protéine 53 (p53) survient à partir de la dysplasie de haut grade (pathologyoutlines.com). La perte de p53 est un marqueur prédictif de résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie. La mutation inactivatrice de SMAD4, membre de la famille SMAD impliqué dans la voie du TGF β , survient plus tard dans la séquence adénome cancer et indique un stade avancé de carcinome.

b. Instabilité des microsatellites (MSI)

Il s'agit dans ce cas de l'inactivation de gènes réparateurs de l'ADN en rapport avec des erreurs de réplication et il en résulte une accumulation de nombreuses mutations. Dans le CCR sporadique le phénotype MSI résulte de la méthylation du promoteur du gène MLH1, alors que dans le syndrome HNPCC (hereditary non polyposis colorectal cancer) le phénotype résulte de la mutation d'un des gènes réparateurs de l'ADN. Les CCR avec MSI ont souvent une mutation activatrice de B-raf (Kambara et al, 2004) et comportent morphologiquement un infiltrat lymphocytaire dense. Les cancers MSI sporadiques sont souvent peu différenciés, mucineux et de localisation proximale dans le cadre colique.

c. Méthylation des ilots CpG

Il s'agit d'un mécanisme d'instabilité chromosomique associé au cancer avec hyperméthylation épigénétique au niveau des répétitions du motif cytosine-guanine des régions promotrices de nombreux gènes. La méthylation des ilots CpG affecte souvent le promoteur du gène de réparation des mésappariement d'ADN MLH1, résultant en une carcinogèneèse de type instabilité des microsatellites

(<http://www.pathologyoutlines.com/topic/colontumoradenomacarcinoma.html>).

d. L'Adénome dentelé :

Considéré auparavant sans évolution vers la malignité, le polype dentelé avec des erreurs de réplication, MLH1 notamment, peut évoluer vers le CCR et peut comporter les mutations de B-raf et K-ras.

B. L'ostéopontine :

L'ostéopontine (OPN) est une glycophosphoprotéine de la matrice extracellulaire membre de la famille SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins), découverte pour la première fois par Singer en 1979 comme une phosphoprotéine sécrétée par les cellules épithéliales malignes (Senger et al, 1979). Elle fut également isolée dans l'os par des méthodes biochimiques comme une protéine riche en aspartate, en glutamate et en résidus d'acide sialique. Elle fut isolée de façon indépendante par plusieurs chercheurs dans plusieurs tissus et fut donc nommée de différentes façons : bone sialoprotein, secreted phosphoprotein 1, uropontin mais aussi T lymphocyte activation-1. Il s'agit d'une protéine multidomaines aux fonctions pléiotropiques. Elle joue un rôle structural dans l'os en faisant le lien entre les cellules osseuses et la matrice extracellulaire, mais aussi dans différents processus physiologiques et pathologiques : remodelage osseux, processus dysimmunitaires, états infectieux, cicatrisation et les processus tumoraux malins, avec un rôle important dans la croissance, la migration, l'invasion tumorale et le développement de métastases (Bellahcène et al, 2008).

1. Structure, gène et protéine :

Le gène :

Tous les gènes de la famille SIBLING dont celui de l'OPN sont situés dans la même région sur le bras long du chromosome 4. Le gène de l'OPN est long de 5 kilobases et comporte 6 exons dont le premier et le deuxième sont communs aux membres de

la famille SIBLING. L'exon 1 est toujours non codant, le deuxième comporte le codon START, le peptide signal et les deux premiers acides aminés de la protéine. Les exons 3 et 5 comportent la séquence consensus pour la phosphorylation par la caséine kinase II, avec un site de liaison au glycosaminoglycane. L'exon suivant code pour la séquence riche en proline qui confère une charge positive à la molécule (Bellahcène et al, 2008). L'exon 6 comporte la séquence correspondant au motif RGD (arginine-glycine-aspartate) et code pour la majeure partie de la protéine mature.

L'analyse de l'ADN complémentaire du messager de l'OPN a montré qu'il existe trois variants d'épissage alternatif (Young et al, 1990). OPNa code pour la forme complète de la protéine, le variant OPNb présente une délétion de l'exon 5 et le variant OPNc ne comporte pas l'exon 4. Le rôle exact de ces deux variants est encore malconnu. Le variant OPNc est plus exprimé par les cellules tumorales mammaires (He et al, 2006) par rapport au tissu adjacent, mais aussi par les cellules tumorales hépatiques hautement invasives (Takafuji et al, 2007). En agar mou, ce variant augmente la formation de colonie de cellules tumorales mammaires MCF-7 (He et al, 2006). Les trois variants sont plus exprimés dans les gliomes de haut grade par rapport aux gliomes de bas grade (Yan et al, 2010). Dans les lignées tumorales gliales U251 et U87 le variant OPNb a un effet anti-apoptotique mais sans action sur l'invasion alors que les variants OPNa et OPNc ont un effet majeur sur l'invasion des cellules gliales tumorales (Yan et al, 2010).

La protéine :

Chez l'humain, l'OPN comporte 314 acides aminés et a un poids moléculaire variant entre 41 et 70 kDa selon l'épissage alternatif et les modifications post traductionnelles par glycosylation et phosphorylation variables. La molécule comporte plusieurs domaines fonctionnels (figure 1) dont le premier du côté N-terminal est riche en aspartate et permet la liaison à l'hydroxyapatite au niveau de l'os. Le deuxième domaine, le plus important dans la protéine, est fait de la séquence RGD ou arginine-glycine-aspartate. Cette séquence est présente dans tous les membres de la famille SIBLING et elle est particulièrement importante, après phosphorylation, pour la liaison aux intégrines $\alpha\beta3$, $\alpha\beta1$, $\alpha5\beta1$ et

$\alpha 8\beta 1$. Cette liaison est rendue possible après clivage de la protéine par la thrombine. Suit le domaine RGD, une séquence de 6 acides aminés permettant la liaison à d'autres intégrines dont la plus importante est l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ qui est surexprimée dans 50 % des cancers colorectaux. La protéine comporte un site de liaison au calcium et un dernier domaine, au côté C terminal, qui permet la liaison par un pont héparine au variant 6 du CD44(CD44v6) mais aussi le variant 3 (Wai et al, 2004).

2. Expression dans le cancer

L'OPN est exprimée de façon ubiquitaire dans de nombreux tissus dont l'os, le cementum de la dent, le cartilage hypertrophique, les vaisseaux, le rein, le tissu cérébral et le tissu mammaire. Dans le tube digestif, l'OPN est rapportée exprimée à la surface des cellules entérocytaires (Brown et al 1992). Elle est également détectée dans les liquides biologiques comme la bile, l'urine, le plasma (Senger et al, 1988), le liquide séminal et le lait maternel (Senger et al, 1989).

En pathologie tumorale, l'OPN est rapportée exprimée dans de nombreux carcinomes mais aussi dans les tumeurs cérébrales comme les gliomes, les tumeurs osseuses et les mélanomes. Une étude immunohistochimique portant sur 310 cas de différents cancers humains avait montré que l'OPN est exprimée dans 100% des adénocarcinomes gastriques, 85% des adénocarcinomes colorectaux, 82 % des carcinomes transitionnels de la vessie, 81% des cancers pancréatiques, 72% des carcinomes à cellules rénales, 71% des adénocarcinomes du poumon et de l'endomètre, 70% des carcinomes épidermoïdes de l'œsophage et 59% des carcinomes ovariens (Coppola et al, 2004), reflétant donc l'importance de cette protéine en pathologie tumorale. Dans une autre étude, les auteurs ont démontré que le messenger de l'OPN augmente avec le stade tumoral et dans les métastases du cancer colorectal (Agrawal et al, 2002). Dans la même étude, il a été démontré que parmi les 107 gènes sélectionnés et analysés sur micromatrice d'ADN l'OPN est un candidat comme marqueur de progression tumorale dans le CCR. Une autre étude, plus récente, a montré en immunohistochimie et au niveau messenger que l'OPN est plus exprimée dans la tumeur colorectale par rapport au tissu sain et que la survie globale est

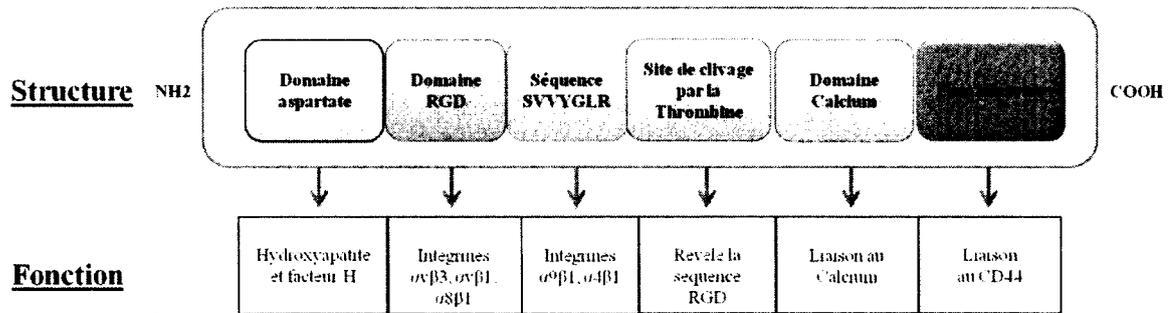
moindre chez les patients dont la tumeur exprime des niveaux élevés d'OPN par rapport aux tumeurs de patients qui en expriment moins (Likui et al, 2009).

3. Rôle dans la progression tumorale.

Plusieurs études récentes s'accordent à rapporter que l'OPN joue un rôle important dans les différentes étapes de la progression tumorale. Des cellules issues d'une lignée tumorale gastrique surexprimant l'OPN entraînent, après injection aux souris nues immunodéficientes, des tumeurs de taille plus grande par rapport à celles issues de cellules exprimant de faibles quantités de cette protéine, suggérant donc un rôle de l'OPN dans la croissance tumorale (Song et al, 2008). Dans cette étude, les auteurs rapportent également que, *in vitro*, les cellules surexprimant l'OPN avaient un potentiel invasif plus important que les cellules tumorales qui en expriment moins. Dans un autre modèle de lignée tumorale mammaire de souris, l'inhibition de l'action de l'OPN par un anticorps spécifique entraîne non seulement une baisse de la croissance de la tumeur primitive et des métastases, mais aussi un retard dans le développement tumoral par rapport au groupe contrôle (Dai et al, 2010). Ce rôle de l'OPN dans la progression tumorale se fait par liaison aux intégrines et au récepteur CD44. La liaison à l'intégrine $\alpha\beta3$ entraîne la production de métalloprotéases matricielles et de l'urokinase plasminogène (uPA) par activation des voies de signalisation des MAP Kinases, voie associée à la mitogenèse, phosphorylation d'AKT, associé à la survie cellulaire, et activation du facteur nucléaire Nf- κ B. L'OPN entraîne également l'activation du récepteur à l'EGF par l'intermédiaire de C-src, active la phosphorylation d'ERK, active AP-1 et régule négativement la relation entre les voies NIK/ERK et MEKK1/JNK1, cela va promouvoir la motilité cellulaire, la croissance tumorale et la métastase (Rangaswami et al, 2006). Cela entraîne donc une promotion de la croissance, la motilité et le potentiel métastatique des cellules tumorales. La liaison de l'OPN au CD44 entraîne aussi une phosphorylation d'AKT, mais cette fois par PLC γ /PKC et donc une augmentation de la motilité et la survie cellulaire. L'inhibition de l'expression de l'OPN dans la lignée tumorale endométriale ISK résulte en la réduction des vaisseaux sanguins intra tumoraux, détectés en immunohistochimie par l'anticorps anti-CD31, par rapport aux tumeurs issues de cellules exprimant l'OPN (Du et al, 2009). Cet effet sur

Figure 1. Structure protéique de l'ostéopontine montrant ses différents domaines et les molécules de liaison correspondantes.

La molécule comporte plusieurs domaines fonctionnels dont le premier du côté N-terminal qui est riche en aspartate et permet la liaison à l'hydroxyapatite au niveau de l'os et au facteur H qui agit sur la dissociation de la C3/C5 convertase. Suit ce domaine la séquence RGD (arginine-glycine-aspartate) particulièrement importante, après phosphorylation, pour la liaison aux intégrines. Cette liaison est possible après clivage de la protéine au site de clivage par la thrombine. Entre ces deux domaines se trouve une séquence de 6 acides aminés permettant la liaison à d'autres types d'intégrines dont $\alpha 9\beta 1$ exprimée dans 50 % des cancers colorectaux. La protéine comporte un site de liaison au calcium pour la minéralisation de l'os et un dernier domaine qui permet la liaison au CD44.



l'angiogenèse a également été étudié dans une lignée de cellules endothéliales de la veine ombilicale de l'humain (HUVEC) où l'augmentation des niveaux du transcrit du facteur de croissance endothélial VEGF augmente avec les doses croissantes de l'OPN (Dai et al, 2009). La même étude suggère que cet effet est médié par l'activation de PI3K/AKT et ERK1/2. L'OPN favorise donc la croissance tumorale par l'activation des voies de prolifération et de facteurs impliqués dans l'angiogenèse. Cette protéine assure aux cellules tumorales, une fois dans le courant circulatoire, une protection supplémentaire car sa présence à leur surface leur permet de séquestrer et d'activer le facteur H et de ce fait d'inhiber leur dégradation par le système du complément (Fedarko et al, 2000).

4. Régulation de l'expression de l'OPN dans le cancer.

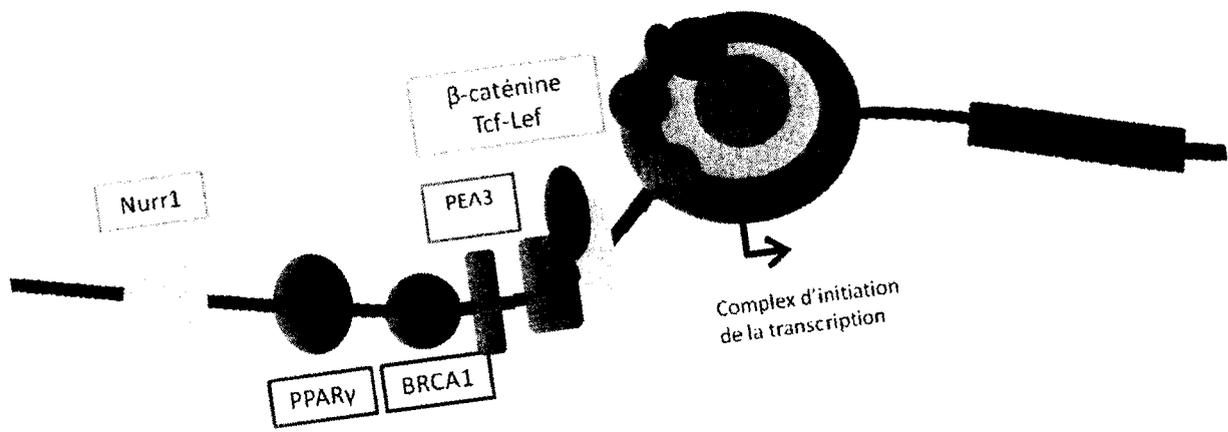
Considérant le rôle de l'OPN dans les différentes étapes de la progression tumorale, la régulation de son expression est actuellement le sujet de nombreux travaux de recherche. La plupart ont porté sur le promoteur de l'OPN murin et peu de travaux ont été réalisés sur le promoteur humain. En figure 2 sont illustrés quelques facteurs de transcription connus pour réguler l'activité du promoteur de l'OPN. Dans la lignée tumorale mammaire RAMA37 de rat, le messager de l'OPN augmente avec la transfection transitoire concomitante des facteurs de transcription PEA3, c-jun, Lef1, et la β -caténine (El-Tanani et al, 2004) connus pour leur implication dans la progression tumorale. La relation entre la voie Wnt/ β -caténine et l'expression de l'OPN a été étudiée sous l'angle de l'effet des anti-inflammatoires non stéroïdiens sur cette voie. Ces derniers sont connus non seulement pour leur rôle protecteur contre le cancer colorectal mais aussi pour leur effet sur la régression des adénomes en entraînant une baisse des prostaglandines E2 (PGE2). Ces dernières inactivent la GSK3 β augmentant ainsi la concentration de la β -caténine cytoplasmique et nucléaire et donc l'expression de ses gènes cibles comme c-myc et la cycline D1. L'administration d'anti-inflammatoires non stéroïdiens et notamment les COX-2 (cyclo-oxygénase 2) sélectifs comme le parecoxib dans des souris $Apc^{\Delta14/+}$ entraîne une baisse de l'expression de l'OPN dans les adénomes colorectaux par inactivation de la voie Wnt et de ce fait diminue l'expression de cibles de cette voie (Rohde et al, 2007). Le complexe β -caténine-Tcf-4, de la voie Wnt, favorise l'invasion des cellules de la lignée MDA-MB231

par liaison directe au promoteur de l'OPN (Ravindranath et al, 2011). De plus, la mutation de l'élément de réponse de c-myc sur le promoteur de l'OPN entraîne une baisse de l'activité luciférase par rapport au promoteur non muté (Martinez et al, 2010). Chez la souris, la β -caténine contrôle donc de façon directe l'expression de l'OPN mais aussi de façon indirecte par l'intermédiaire de c-myc. Par sa coactivation du complexe TCF/LEF, la β -caténine entraîne la surexpression du récepteur CD44 (Wielenga et al, 1999) ce qui représente un autre moyen pour la voie de Wnt d'augmenter l'activité de l'OPN. Les PGE2 ont également pour cible le récepteur nucléaire Nurr1 qui est connu pour son rôle dans l'expression de l'OPN dans les cellules ostéoblastiques (Lammi et al, 2004) mais aussi dans les cellules épithéliales intestinales (Holla et al, 2006). L'administration du parecoxib aux souris $Apc^{\Delta14/+}$ entraîne une baisse importante et précoce de l'expression de Nurr1 dans les polypes intestinaux, accompagnée d'une baisse de l'expression de l'OPN dans les mêmes polypes.

D'autres facteurs de transcription sont rapportés comme répresseurs de l'expression de l'OPN. En immunohistochimie, l'OPN est rapportée fortement exprimée dans les adénocarcinomes mammaires comportant la forme mutée du gène réparateur de l'ADN BRCA1, alors qu'elle est très faible dans les tumeurs sporadiques où BRCA1 n'est pas muté (El-Tanani et al, 2006). Le récepteur nucléaire PPAR γ , rapporté exprimé dans le cancer colorectal de bon pronostic (Ogino et al, 2009) entraîne en présence de la Troglitazone, ligand de PPAR γ , une baisse de l'expression de l'OPN dans la lignée cellulaire TPH-1 dérivée de monocytes leucémiques humains (Oyama et al, 2002). Le mécanisme par lequel PPAR γ régule l'expression de l'OPN n'est pas encore connu. Chez la souris le récepteur nucléaire orphelin relié au récepteur de l'estrogène (ERR α) entraîne, en essai luciférase, l'activation du promoteur murin de l'OPN dans des lignées tumorales osseuses et non dans les cellules fibroblastiques embryonnaires humaines (Vanacker et al, 1998). Le lien entre ERR α et le promoteur de l'OPN serait dépendant du contexte cellulaire. Dans la littérature, un tel lien n'a pas été rapporté dans le cancer colorectal.

Figure 2. Représentation schématique du promoteur de l'ostéopontine avec ses principaux régulateurs transcriptionnels.

Le promoteur de l'OPN est sous le contrôle de plusieurs facteurs de transcription impliqués dans le cancer. Le complexe β -caténine-Tcf-Lef et la famille Ets dont PEA3 activent le promoteur de l'OPN dans un modèle de tumeur osseuse chez le rat. L'expression de l'OPN est réprimée par le facteur suppresseur de tumeurs BRCA1, dont le gène est le plus souvent muté dans les cancers mammaires héréditaires. Dans la famille des récepteurs nucléaires, PPAR γ entraîne une baisse de l'expression de l'OPN dans les cellules monocytaires leucémiques chez l'humain. Nurr1 est un récepteur nucléaire orphelin qui augmente l'expression de l'OPN dans les cellules ostéoblastiques et intestinales.



C. Le récepteur nucléaire orphelin ERR α

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription dont l'activité dépend de la présence d'un ligand. Ce dernier peut être un dérivé de lipide alimentaire ou une hormone incluant les hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes (corticostéroïdes, hormones sexuelles). Le premier récepteur nucléaire identifié et cloné en 1985 a été le récepteur aux glucocorticoïdes (Hollenberg et al, 1985). Par la suite, d'autres récepteurs ont été identifiés essentiellement par clonage en raison de la forte homologie de séquence dans le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires. Actuellement la famille de ces récepteurs comporte 48 membres et on les classe en récepteurs endocriniens comme le récepteur à l'œstrogène (ER) α et β , le récepteur des glucocorticoïdes et le récepteur aux androgènes. La deuxième catégorie est celle des récepteurs aux lipides alimentaires comme le récepteur de l'acide farnésioïde X (FXR) et PPAR γ . La troisième catégorie correspond aux récepteurs nucléaires orphelins, identifiés par clonage, qui seraient soit constitutivement actifs ou auraient un ligand actuellement inconnu. Le récepteur nucléaire relié au récepteur à l'œstrogène alpha et gamma (ERR α , ERR γ) sont les premiers récepteurs orphelins identifiés (Giguère et al, 1988). Ils constituent avec ERR β , identifié une dizaine d'années plus tard, le sous groupe des récepteurs nucléaires reliés aux récepteurs de l'œstrogène. Ces récepteurs présentent une homologie de séquence avec les récepteurs à l'œstrogène. Dans le domaine de liaison à l'ADN (DBD) l'homologie de séquence est de 68% pour ERR α et de 71% pour ERR β par rapport au DBD d'ER α . Dans le domaine de liaison au ligand (LBD) l'homologie de séquence est moins de 40% pour les deux récepteurs orphelins sus cité par rapport à ER α (Stein and McDonnell, 2006). C'est donc sans surprise qu'ERR α et ERR β ne lient pas l'estrogène.

1. Structure d'ERR α

La structure générale d'ERR α est semblable à celle de tout récepteur nucléaire avec un domaine aminoterminal de transactivation (NTD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine charnière et un domaine de liaison au ligand (LBD), (figure3).

a. Le domaine aminoterminal :

C'est un domaine modulateur, qui peut contenir le site d'activation AF-1 souvent sujet à des modifications post traductionnelles pouvant jouer un rôle dans la régulation de l'activité d'ERR α .

b. Le domaine de liaison à l'ADN :

Il permet au récepteur nucléaire de se lier à l'ADN soit en monomère, homodimère ou en hétérodimère avec un autre récepteur nucléaire ou un autre isoforme. Dans le cas d'ERR α il s'agit souvent d'ERR γ . Cette liaison à l'ADN est possible grâce à deux doigts de zinc qui reconnaissent la séquence consensus ou le demi-site TNAAGGTCA spécifique pour ERR α , connu sous le nom de ERRE (estrogen related receptor response element). Cette séquence comporte une partie reconnue par tous les récepteurs nucléaires qui est AGGTCA précédée de trois bases nucléotidiques spécifiques pour ERR α . Le N peut être n'importe quelle base pyrimidique. Le DBD d'ERR α présente 68% d'homologie de séquence avec le récepteur à l'œstrogène alpha (Stein and McDonnell, 2006). Ce dernier reconnaît préférentiellement l'élément de réponse de type palindromique AGGTCAnnnTGACCT nommé ERE qui est fait de deux demi-sites inversés séparés par trois bases nucléotidiques. Il est décrit qu'ER α peut reconnaître et se lier à des éléments de réponse imparfaits composés de demi-sites (Vanacker et al, 1999). Cela veut dire que des sites EREs peuvent être des éléments de réponse pour ERR α mais aussi un site ERRE peut servir comme élément de réponse pour ER α . Une étude récente avait montré, malgré ce fait, qu'il existe très peu de gènes régulés conjointement par ces deux récepteurs nucléaires (Deblois et al, 2009).

c. Le domaine charnière :

C'est le domaine charnière qui a pour rôle principal de permettre le mouvement du DBD et du LBD de façon indépendante. Une rotation de 180 degrés permettrait la fixation du dimère de récepteurs sur des éléments de réponses de type DR (répétition directe) ou IR (répétition inverse). Ce domaine permet aussi la fixation des corépresseurs en l'absence de

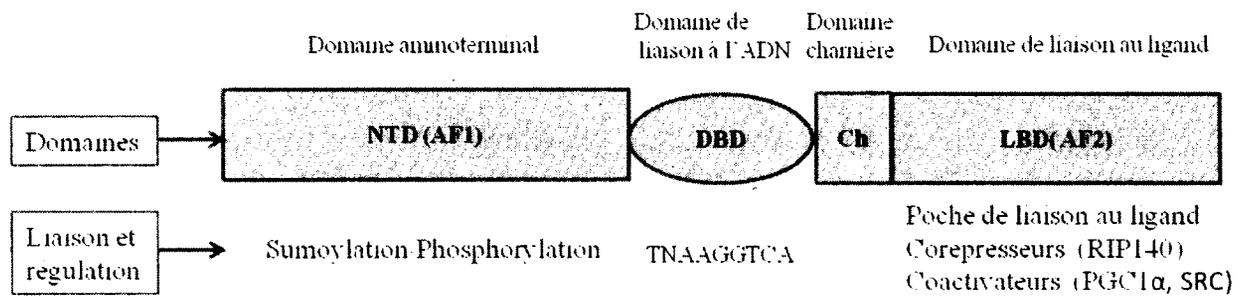
ligand empêchant ainsi la transcription (Horlein et al. 1995 ; Chen et Evans 1995). Le mode de fonction de ce domaine pour ERR α n'est pas décrit dans la littérature.

d. Le domaine de liaison au ligand :

Le LBD d'ERR α présente seulement 33 % d'homologie de séquence avec celui d'ER α . Ce domaine est fait de 12 hélices alpha identiques arrangées en trois couches avec deux feuillets β formant ainsi une poche hydrophobe pour accueillir le ligand. La présence de ce dernier dans la poche permet le réarrangement des hélices 11 et 10 en une hélice unique et l'activation de la fonction AF-2 située sur l'hélice 12. Cette hélice est alors réorientée vers l'intérieur de la poche tel un couvercle qui va sceller la poche et renforcer ainsi la liaison ligand-LBD permettant ainsi le recrutement de coactivateurs. Pour ERR α , cette poche est trop petite pour accueillir un ligand naturel et la fonction AF-2 est toujours en configuration active indépendamment de la présence de ligand (Greschik et al, 2002. Wang et al, 2006). A date, il existe plusieurs répresseurs pour ERR α . Le premier identifié est le XCT790 qui agit comme agoniste inverse (Busch et al, 2004). Il peut s'introduire partiellement dans la poche du LBD et va empêcher sa fermeture et entraîner l'inactivation du récepteur et l'amorçage de sa dégradation par le protéasome. Le Kaempferol®, un flavonoïde alimentaire, est un autre agoniste inverse décrit également comme répresseur de l'activité d'ERR α mais aussi d'ERR γ en empêchant leur liaison avec PGC1 α (Wang et al, 2009). Récemment une équipe de chercheur a rapporté qu'une molécule tricyclique nommée composant A agit comme antagoniste sur l'activité transcriptionnelle d'ERR α et entraîne une diminution de l'expression de ses cibles comme PDK4 et pS2 dans la lignée tumorale mammaire MCF-7 (Chisamore et al, 2009). Le caractère spécifique de ce composant pour ERR α n'a pas été démontré dans cette étude.

Figure 3. Structure du récepteur nucléaire orphelin ERR α

ERR α est composé d'un domaine aminoterminal (NTD) comportant le site d'activation AF1 et les sites de phosphorylation et de sumoylation régulatrices, d'un domaine de liaison à l'ADN (DBD), comportant deux doigts de zinc pour lier l'élément de réponse TNAGGTCA, un domaine charnière, et d'un domaine de liaison au ligand (LBD) permettant la liaison aux coactivateurs (PGC1 α , SRC) et corépresseurs (RIP1). Comme ERR α n'a pas de ligand connu, sa régulation se fait essentiellement par phosphorylation et sumoylation et par sa liaison aux coactivateurs et corépresseurs.



2. Régulation de l'activité d'ERR α .

Du moment qu'ERR α n'a pas de ligand connu et qu'il est constitutivement actif, la régulation de son activité doit se faire de façon ligand-indépendante. Cette régulation se fait d'une part par modifications post-traductionnelles du domaine amino-terminal au niveau du site AF-1 tel que par phosphorylation/sumoylation de ce même domaine (Tremblay et al, 2008). L'activité des récepteurs nucléaires est potentialisée ou inhibée par une famille de protéines corégulatrices. ERR α via son domaine d'activation AF2 recrute PGC1 α et PGC1 β qui jouent un rôle important dans le métabolisme énergétique. Ces deux derniers participent au contrôle de l'expression de gènes importants pour les fonctions mitochondriales, le métabolisme oxydatif et la glyconéogenèse. PGC1 α possède trois motifs LXXLL-like (L1, L2 et L3), L2 et L3 permettent la liaison aux récepteurs nucléaires (Giguère et al, 2008). Le troisième motif est dédié spécifiquement à la liaison à ERR α (Greschik H et al, 2008), suggérant que ce dernier n'a pas de compétiteur pour la liaison avec PGC1 α sur ce site. L'introduction de PGC1 α dans des cellules exprimant peu ce corégulateur, entraîne une augmentation significative de l'activité d'ERR α (Schreiber et al, 2003). De plus, PGC1 α augmente les niveaux d'expression d'ERR α par le biais de l'autoactivation d'ERR α sur son propre promoteur (Laganiere et al, 2004), qui comporte trois ERREs fonctionnels. L'activité transcriptionnelle d'ERR α peut être réprimée par le RIP140, qui possède plusieurs motifs LXXLL et peut agir comme compétiteur avec PGC1 α (Castet et al, 2006).

3. Expression et rôle physiologique d'ERR α dans les tissus :

ERR α est retrouvé dans les tissus humains en plus grandes quantités par rapport à ERR β et ERR γ . Parallèlement à PGC1 α , ERR α est exprimé dans de nombreux tissus à forte demande en énergie comme le cœur et le muscle squelettique mais aussi dans les tissus à renouvellement rapide comme le tractus gastro-intestinal. Son expression est stimulée pour répondre à différentes situations de stress tel que le froid dans le tissu adipeux, l'exercice dans le muscle et le jeune dans le foie (Villena et al, 2007). ERR α possède trois éléments de réponse sur son propre promoteur ce qui engendre une boucle d'autorégulation positive médiée par PGC1 α (Laganiere et al, 2004). L'ARNm de ce

dernier est augmenté dans des situations de stress ou de forte demande en énergie impliquant une augmentation du nombre des mitochondries et de la respiration mitochondriale comme au cours de l'exercice physique, le jeûne prolongé et dans le cœur en surcharge volumique (Russell et al, 2003, Puigserver et al, 1998, Lehman et al, 2000). ERR α , coactivé par PGC1 α , va donc entraîner la stimulation de l'expression de ses gènes cibles impliqués dans différentes voies métaboliques. Il augmente l'expression du gène MCAD (Sladek et al, 1997) impliqué dans l'oxydation des acides gras, le gène Atp5b dans la phosphorylation oxydative, mais aussi d'autres gènes impliqués dans le cycle de Krebs, les fonctions mitochondriales, le transport des lipides et la glycogénogénèse. Plusieurs études s'accordent à rapporter d'une part que la surexpression d'ERR α dans des cellules exprimant PGC1 α et PGC1 β entraîne une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique. D'autre part, l'inhibition de son messenger diminue l'expression de ses gènes cibles même en présence de ses coactivateurs. Dans un modèle de souris n'exprimant pas d'ERR α , une équipe de chercheurs avait montré que ces souris ne parvenaient plus à maintenir une température corporelle normale après exposition au froid (Luo et al, 2003). Chez ces souris, les cellules du tissu adipeux brun comportaient une accumulation de lipide dans leur cytoplasme et montraient une expression faible des gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative et le cycle de Krebs (Villena et al, 2007). Cela démontre le rôle d'ERR α dans la thermogénèse. D'autre part, une étude récente rapporte qu'ERR α est impliqué dans la différenciation cellulaire (Murray et Huss, 2011). La surexpression de ce dernier dans la lignée myocytaire C2C12 entraîne une accélération de leur différenciation alors que leur traitement par le XCT790, agoniste inverse d'ERR α , la retarde et entraîne une augmentation de la phosphorylation d'ERK. Les auteurs ont démontré qu'ERR α intervient dans la différenciation myocytaire de façon indirecte en régulant l'expression du gène *Dusp1* qui contrôle l'expression de MKP-1. Ce dernier permet alors la déphosphorylation d'ERK et l'induction de la différenciation myocytaire.

4. Implication dans le cancer

De plus en plus de publications sur ERR α rapportent que son expression est associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers. L'une rapporte que les patientes dont les tumeurs mammaires réséquées expriment ERR α en immunohistochimie ont une survie

plus faible par rapport aux patientes dont les tumeurs n'expriment pas ERR α (Suzuki et al, 2004). Une autre étude rapporte ce même constat dans les cancers de l'ovaire exprimant des niveaux élevés du messager d'ERR α par rapport aux tumeurs l'exprimant faiblement (Fujimoto et al, 2007). De plus, l'augmentation de l'expression d'ERR α corrèle avec le stade tumoral dans les cas de cancers de l'ovaire (Fujimoto et al, 2007) et de l'endomètre (Fujimoto and Eriko, 2009). Cavallini et son équipe rapportent que le messager d'ERR α augmente seulement du stade II au stade IV du cancer colorectal (Cavallini et al, 2005). Du point de vue moléculaire, l'implication d'ERR α dans la progression tumorale a été étudiée dans plusieurs lignées tumorales. L'équipe de McDonnell a démontré que la croissance tumorale était plus faible dans les lignées HCT116 et MDA-MB-231 où le messager d'ERR α a été inhibé par rapport aux cellules contrôles (Dwyer et al, 2008). Une autre équipe a montré que le traitement des cellules tumorales mammaires MCF-7, MDA-MB-231 et prostatiques PC3 par un agoniste inverse d'ERR α , le XCT790, entraîne une inhibition de la prolifération cellulaire et un blocage du cycle cellulaire en phase G₁ (Bianco et al, 2009). Cette équipe a montré également, dans un modèle de xénogreffe, que la répression de l'expression d'ERR α par le XCT790 entraîne un retard dans la croissance tumorale. Aussi la répression d'ERR α entraîne une baisse de la migration cellulaire dans la lignée tumorale MAD-MB-231 (Stein et al, 2008). La même équipe a également démontré qu'ERR α peut se lier à la β -caténine induisant de ce fait une augmentation de l'expression du facteur Wnt11 (Dwyer et al, 2010), connu pour son activité promigratoire (Ouko et al, 2004). ERR α a donc un rôle important dans la croissance tumorale. Un autre rôle d'ERR α dans le cancer consiste en l'augmentation de l'expression du VEGF, car la mutation de l'élément de réponse pour ERR α sur le promoteur du VEGF annule son induction dans la lignée tumorale mammaire MDA-MB-231 (Stein et al, 2009).

Au laboratoire, nous avons observé que la répression de l'expression du messager d'ERR α par un sh réprimant l'expression d'ERR α entraîne une baisse de la prolifération et de la croissance en indépendance d'ancrage des lignées tumorales coliques HT29, HCT116 et DLD1. Dans un modèle de xénogreffe, les cellules HCT116 infectées avec ce même sh et injectées en sous cutané aux souris CD1 immunodéficientes, forment des tumeurs plus petites par rapport aux cellules HCT116 infectées par un sh contrôle, ou non infectées. Ces

résultats suggèrent qu'ERR α pourrait avoir un rôle important dans la croissance tumorale dans le cancer colorectal.

L'implication d'ERR α dans la progression tumorale fait de lui une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la maladie cancéreuse. Malgré le fait qu'aucun ligand n'est connu actuellement pour ce récepteur, l'inhibition pharmacologique par les agonistes inverses pourrait constituer une alternative thérapeutique. Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme d'action de ce récepteur.

D. Hypothèse et objectifs du projet de recherche:

Durant le développement d'une tumeur, la cellule cancéreuse a besoin de synthétiser des molécules et des facteurs lui permettant de survivre, de se diviser, d'envahir les tissus adjacents et d'engendrer une néovascularisation nourricière. L'expression de telles molécules est stimulée par des facteurs de transcription dont les récepteurs nucléaires. Le récepteur nucléaire orphelin ERR α est surexprimé dans les cancers du sein, de l'ovaire et de l'endomètre et contrôle la division cellulaire et l'expression de facteurs impliqués dans le cancer comme Wnt11 et le VEGF. L'OPN est une glycophosphoprotéine de la matrice extracellulaire pouvant activer les intégrines et le récepteur CD44 et jouer un rôle dans la progression tumorale, l'angioinvasion et la métastase dans de nombreux cancers dont le cancer colorectal. Cette protéine constitue une cible du récepteur nucléaire ERR α dans l'os, chez le rat. Nous postulons donc qu'ERR α participe à la carcinogenèse colorectale entre autre par l'induction de l'expression de l'OPN. Le premier objectif de mon projet était d'analyser, en immunohistochimie, le profil d'expression d'ERR α et de l'OPN dans des échantillons de CCR et d'évaluer si l'expression de ces deux protéines corrélait entre elles et selon le stade tumoral. Le deuxième objectif consistait à caractériser la régulation transcriptionnelle de l'expression de l'OPN par ERR α dans un modèle de lignée tumorale colique.

II- MATERIELS ET METHODES

1- Confection des micromatrices tissulaires (MMT)

Les échantillons de CCR et les tissus sains correspondant ont été obtenus de la banque des tissus de l'équipe IRSC sur l'épithélium digestif. A partir de bloc de paraffine, une coupe de 5 μm est effectuée, étalée sur lame puis colorée à l'hématoxyline et à l'éosine afin de pouvoir marquer les zones où les prélèvements seront effectués. Grâce à un punch de biopsie dermatologique de 2 mm de diamètre (Miltex Inc York, PA, USA), un prélèvement sous forme de carotte est effectué au niveau de la zone marquée et transféré par la suite dans un moule de paraffine. L'ordre dans lequel les carottes sont mises dans le moule est marqué au fur et à mesure sur une matrice de localisation. Le fond du moule est préalablement couvert d'un double adhésif permettant de tenir les carottes à la bonne position. Une fois toutes les carottes déposées au fond du moule, de la paraffine chaude est coulée pour remplir le moule et donc créer un nouveau bloc après incubation d'environ une heure à 4°C. À partir du nouveau bloc, des coupes de 4 μm d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un microtome Spencer 820 (American Optical Company, NY, USA). Chaque coupe est étalée sur lame de verre et conservée à température de la pièce pour coloration immunohistochimique.

2- Immunohistochimie et analyse statistique de l'expression d'ERR α et de l'OPN

Les coupes montées sur lame sont déparaffinées deux fois 5 minutes dans des bains de xylène (EMD Chemicals, San Diego, CA, USA) puis réhydratées deux fois 3 minutes dans des bains d'éthanol puis dans l'eau distillée pendant 5 minutes. Par la suite, la réactivation antigénique est effectuée. Pour cela, le portoir comportant les lames est mis dans un presto (Nordic Ware, Minneapolis, USA) rempli d'acide citrique 10 mM pH 6.0 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Le presto est chauffé dans un four à micro-ondes pendant 27 minutes afin d'amener l'acide citrique à ébullition. Les lames refroidies dans l'eau pendant 15 minutes sont par la suite immergées durant 30 minutes dans l' H_2O_2

(Fisher Scientific) 0,2 % méthanol (EMD) afin de bloquer les peroxydases endogènes, puis elles sont lavées à deux reprises dans du PBS (Fisher Scientific) sous faible agitation pendant 5 minutes. Par la suite, les tissus sont incubés dans la streptavidine (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) pendant 15 minutes suivi, après lavage au PBS deux fois 5 minutes, d'un blocage par la biotine pendant 5 minutes. Un blocage des sites antigéniques non spécifiques est effectué pendant 30 minutes avec un sérum de la même espèce que celle de l'anticorps secondaire utilisé. Les lames sont directement incubées toute la nuit à 4°C dans une chambre humide avec une solution de PBT [PBS, 0.1% BSA (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 0.2% Triton X-100 (ICN Biochemicals, Aurora, OH, USA)] comportant l'anticorps primaire anti-OPN (Research and Development, Minneapolis, MN, USA) dilué 1:200 ou anti-ERR α (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) à la dilution 1:100. L'anticorps dirigé contre l'OPN, reconnaît la forme complète de la protéine.

Le lendemain, les lames sont lavées dans du PBS deux fois 5 minutes sous agitation puis incubées pendant une heure à la température de la pièce (TP) dans du PBT comportant l'anticorps secondaire anti chèvre biotinylé 1:1000 (Millipore, Billerica, MA, USA) ou anti lapin biotinylé 1:1000 (GE Healthcare, Ipswich, MA, USA). Après lavage au PBS, 5 minutes à deux reprises, les lames sont incubées dans une chambre humide 1 heure à TP avec de la streptavidine-HRP (Vector Laboratories) diluée 1:1000 dans du PBT. Après rinçage des lames 2 fois 5 minutes avec du PBS, les tissus sont mis en réaction avec le complexe DAB (Vector Laboratories) jusqu'à coloration brune puis rincés 5 minutes dans l'eau distillée. Une contre coloration par l'hématoxyline de Harris (VWR International, LLC, USA) est réalisée dans le but de mettre en évidence l'architecture des tissus. Les lames sont incubées 1 minutes et 30 secondes dans l'hématoxyline et ensuite rapidement rincées 2 minutes dans l'eau courante, puis plongées 4 fois dans une solution d'éthanol 70% (Fisher Scientific) HCl 1 N puis à nouveau rincées dans l'eau 2 minutes et ensuite plongées 4 fois dans le carbonate de lithium 2% (Fisher Scientific). Les tissus sont ensuite déshydratés en plongeant les lames 2 fois dans l'éthanol 50%, 2 fois dans l'éthanol 70%, 2 fois dans l'éthanol 80%, 4 fois dans l'éthanol 95% et 4 fois dans l'éthanol 100%. Les lames sont ensuite plongées dans le xylène à deux reprises pendant une minute. Le

montage est effectué avec du medium Cytoseal (VWR) et des lamelles en verre 24x60 mm (VWR).

L'étude immunohistochimique a été effectuée avec un microscope optique Leika (Leika microsystems, Wetzlar, Allemagne). L'analyse a porté sur l'observation de l'intensité du marquage nucléaire pour ERR α et cytoplasmique pour l'OPN. Pour comparer l'expression de l'OPN et d'ERR α dans le cancer par rapport au tissu non tumoral, et en fonction du stade du CCR, une échelle d'intensité de 0 à 4 a été utilisée pour classer les niveaux d'expression en négative (0), intensité faible (1), modérée (2), forte (3) et très forte (4). Ces valeurs ont été comparées par le test de Wilcoxon de façon appariée entre le tissu sain et le tissu cancéreux pour chaque patient. Par la suite un score de (-1) a été attribué quand ERR α ou l'OPN diminuent dans le cancer par rapport au tissu non tumoral, un score de (0) si pas de différence entre les deux et un score (+1) quand les deux protéines augmentent dans le cancer. Un test kappa pondéré, avec mesure du pourcentage d'accord, a été utilisé pour apprécier la concordance des scores d'expression de l'OPN et d'ERR α dans le CCR.

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel SPSS, version 18.0 (SPSS, Chicago, I11, USA) et le logiciel StatXact, version 6 (Cytel Software Corporation).

3- Culture cellulaire

La lignée cellulaire tumorale colique HT29 bien différenciée, isolée à partir d'un adénocarcinome humain de grade II, a été mise en culture dans le milieu Dulbecco's Modification Eagle's Medium (DMEM) (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) complémenté de 10% de FBS (Wisent), 2 mM de L-Glutamine (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 10 mM HEPES (Wisent) et 100 μ g/ml de Streptomycine et 100 U/ml pénicilline (Wisent). Cette lignée surexprime p53, c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, fos et Myb. Elle comporte une mutation du gène APC et exprime très bien ERR α et l'OPN.

La lignée cellulaire HEK 293T (A. Nepveu, Université McGill, Montréal, Qc, Canada) issue de cellules embryonnaires rénales immortalisées a été cultivée dans un milieu identique à celui de la lignée HT29.

4- Transfections transitoires et essais luciférase :

Les transfections transitoires et les essais luciférase ont été effectués pour analyser l'effet du récepteur nucléaire $ERR\alpha$ sur l'activité du promoteur de l'OPN.

4-1 Transfection transitoire :

Les cellules 293T arrivées à pré-confluence dans un Pétri de 100 mm ont été trypsinisées (Invitrogen), comptées avec le compteur à cellules Beckman-Coulter Z1 (Beckman-Coulter Inc, Brea, CA, USA) puis réparties dans des plaques à 12 puits, à raison de 500 000 cellules par puits. Le lendemain, les constructions plasmidiques d' $ERR\alpha$, OPN-Luc, $PGC1\alpha$ et Plenti (Voir liste des vecteurs plasmidiques au tableau I) ont été transfectées à l'aide de la lipofectamine 2000 (Invitrogen). Pour chaque puits d'une plaque à 12 puits, selon le protocole du manufacturier, 4 μ l de Lipofectamine ont été ajoutés à 100 μ l de milieu de culture sans sérum Opti-MEM (Invitrogen), le mélange est ainsi incubé 5 minutes à TP. En parallèle, à 100 μ l d'Opti-MEM a été ajouté un total de 1,6 μ g d'ADN par puits. Les deux solutions comportant l'ADN et la lipofectamine ont été mélangées, bien agitées et incubées à TP pendant 25 minutes. Par la suite le mélange est ajouté directement au milieu de culture dans les puits. Le milieu a été changé (DMEM 10% FBS) 4 heures après la transfection et la lyse effectuée après 36 à 48 heures.

4-2 Essai luciférase :

Après 36 à 48 heures suivant la transfection, les cellules ont été lavées avec 250 μ l de PBS puis lysées dans 250 μ l de tampon de lyse (Promega corporation, Madison, WI, USA) pendant 15 minutes sous agitation à TP. Un volume de 10 μ l du lysat a été transféré sur plaque à 96 puits. La lecture a été faite avec un luminomètre (Orion Microplate luminometer, Berthold detection Systems, Huntsville, Alabama, USA) utilisant deux révélateurs LARII et Stop and GLO (Promega).

Tableau VI. Liste des vecteurs plasmidiques

Plasmide	Vecteur	source
Promoteur OPN-Luc	pSGG	SwitchGear Genomics
ERR α	Plenti	Laboratoire Carrier
PGC1 α	Plenti	Laboratoire Carrier
PLENTI (vide)	Plenti	Laboratoire Carrier
sh5 ERR α	PLK0.1	Sigma Aldrich
shC (contrôle)	PLK0.1	Laboratoire JP Gendron
pLP1	pLP	Invitrogen
pLP2	pLP	Invitrogen
VSVG	pLP	Invitrogen

5- Analyse bioinformatique du promoteur de l'OPN

La recherche d'éléments de réponse pour ERR α sur le promoteur de l'ostéopontine a été faite manuellement et à l'aide des logiciels Match (<http://www.gene-regulation.com>) et Matinspector (<http://www.genomatix.de/en/index.html>).

6- Mutagenèse dirigée :

La technique de mutagenèse dirigée permet d'induire des mutations ciblées (délétion, insertion, substitution de nucléotides) afin d'étudier les effets subséquents. Tout d'abord des amorces sont confectionnées de façon à comporter des modifications de séquences nucléotidiques ciblées sur le promoteur de l'OPN (liste des amorces au tableau II) monté sur le vecteur pSGG (Switch Gear Genomics, Menlo Park, CA, USA). Ensuite, en utilisant le kit Geneart Site Directed Mutagenesis System (Invitrogen), une réaction de PCR (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, CA) est effectuée. Cette réaction comprend une étape de méthylation du plasmide suivie d'une étape d'amplification/mutagenèse utilisant la polymérase AccuPrime™ Pfx (Invitrogen) et les amorces sens et antisens. Ensuite une réaction de recombinaison est effectuée à TP puis stoppée après 10 minutes par l'ajout d'1 µl d'EDTA 0,5 M. Immédiatement, une transformation des bactéries est effectuée. 2 µl du produit de recombinaison sont transférés dans des tubes comportant des bactéries DH5α (One Shot ® MAX Efficiency® DH5α™ -T1^R, Invitrogen) fraîchement décongelées. Celles-ci sont incubées sur glace 12 minutes puis 30 secondes dans un bain à 42°C puis 2 minutes sur glace. 250 µl de milieu de culture SOC (Invitrogen) sont alors ajoutés aux tubes avec les bactéries avant de les incuber une heure à 37°C sous agitation. Le produit de réaction est dilué 1:10 dans le milieu de culture SOC. 100 µl de ce milieu sont étalés sur un pétrole préchauffé comportant le milieu de culture LB Agar [Agar-agar (EMD) Bacto Trypton (Bacton Dickson and co), Yeast Extra (Oxoid LTD, Hampshire, England), NaCl (Fisher Scientific)] supplémenté d'ampicilline (Wisent) à 100 µg/ml. Les pétries sont incubés à 37°C pendant 16 à 20 heures. 5 à 10 colonies sont prélevées des pétries puis mises en culture dans 1 ml de milieu LB avec Ampicilline (100 µg/ml) pendant 16 heures à 37°C sous agitation. Ensuite 200 µl sont gardées à 4°C et 800 µl sont prélevées pour extraction et purification de l'ADN en utilisant le kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen). L'ADN est dosé par un spectrophotomètre (SmartSpec™) avant de l'envoyer pour séquençage à la plateforme de séquençage et de génotypage des génomes du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CRCHUL Québec, QC, Canada). La mutation validée, les 200 µl de bactéries gardés à 4°C sont mis

en culture dans 150 ml de milieu LB avec Ampicilline (100µg/ml) pendant 16 à 20 heures sous agitation et à 37°C. L'ADN est alors extrait des bactéries avec le kit PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen) puis dosé au spectrophotomètre (SmartSpec™).

Tableau VII. Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée.

Nom	Amorce
OPN MUT-S1	Sens 5'-ccctcaaaaaccccaccatttgggtaatagtattgcatt-3'
	Anti-sens 5'-aatgcaatactattacccaaatggtggggttttgaggg-3'
OPN MUT-S2	Sens 5'-gccccaaagttgcacatatttgcagtacacagcgga-3'
	Anti-sens 5'-tccgctgtgcactgcaaatatgtgcaaccttgggc-3'
OPN MUT-S3	Sens 5'-aaagctaagcttgagtagtagaccagtgaggcaagtttctg-3'
	Anti-sens 5'-cagaaaacttgccctcatggtctactactcaagcttagctt-3'

7- Génération des virus sh5 (anti ERRα) et shC (contrôle):

Les lentivirus ont été générés par transfection transitoire de la lignée 293T. La veille de la transfection, un Pétri à 100% de confluence est passé à un rapport de 1 dans 5. Le jour suivant, 10 µg des vecteurs d'encapsidation VSVG, pLP1, et pLP2, du vecteur sh5 (anti-ERRα) ou shC (contrôle), ont été ajoutés à 500 µl de milieu de culture Opti-MEM (Invitrogen). Parallèlement, 40 µl de lipofectamine (Invitrogen) sont incubés 5 minutes à TP dans 500 µl d'Opti-MEM. Les deux solutions sont combinées et après une incubation de 25 minutes, le volume est complété à 5 ml avec l'Opti-MEM. Le tout est ajouté aux Pétris après avoir enlevé le milieu de culture DMEM 10% FBS. Le surnageant comportant les lentivirus est récupéré 48 heures après la transfection, filtré avec un filtre de 45µm (Millipore) puis conservé à -80°C.

8- Infection des cellules tumorales coliques HT29 :

Pour réaliser les infections lentivirales, des Pétris de 100 mm comportant les cellules HT29 portées à 60% de confluence ont été utilisés. Un ml de milieu comprenant les virus est ajouté aux pétries comportant 4 ml de milieu DMEM10% FBS en présence de polybrène à 4 µg/ml (Sigma-Aldrich) afin d'augmenter l'efficacité de l'infection virale des cellules en culture. Après une incubation de 48 heures, le milieu de culture est changé et les cellules infectées sont sélectionnées avec un milieu DMEM10% FBS comportant 1,5 µg/ml de puromycine (Sigma-Aldrich). La sélection par la puromycine est portée à seulement 48 heures afin de réaliser les expériences sans qu'il y ait de différence de prolifération entre les deux populations de cellules infectées par les sh5 ou shC. Un passage est effectué chaque fois que les cellules atteignent la confluence.

9- Extraction des ARNs :

Le culot cellulaire est tout d'abord ressuspendu dans un volume de 600 µl de solution dénaturante (Ambion, Life Technologies Corporation) à laquelle est ajouté un volume équivalent de phenol:chloroforme:IAA (Ambion). Le mélange est mélangé à l'aide d'un vortex à puissance maximale pendant une minute, incubé sur glace pendant 5 minutes puis centrifugé à 13300 rpm pendant 5 minutes à 4°C. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et un dixième de volume de sodium acétate y est ajouté (Ambion). Après avoir effectué un mélange par inversion des tubes, 600 µl de phenol:chloroforme:acide (Ambion) y sont ajoutés. Après un autre mélange par vortex à pleine puissance d'une minute, les tubes sont incubés sur glace pendant 5 minutes puis centrifugés 5 minutes à 13300rpm à 4°C. La phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube et un volume équivalent d'isopropanol (Fisher Scientific) est ajouté. Le tout est ensuite incubé à -80°C pour une durée minimale de 30 minutes. Il s'en suit une centrifugation de 10 minutes à 13300 rpm à 4°C, le surnageant est retiré et le culot d'ARN est alors lavé avec un volume

de 300 µl d'éthanol. Après une centrifugation de 13300 rpm pendant 5 minutes à 4°C, l'éthanol est aspiré et le culot est séché quelques minutes puis ressuspendu dans un volume d'eau PCR (Wisent) ou équivalent. La concentration de l'ARN est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (SmartSpec™).

10- Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) :

A partir de l'ARN extrait, un ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé par une réaction utilisant une rétro-transcriptase. On prépare pour chaque échantillon un mélange comportant 2 µg d'ARN, 1 µl de polydT 500 µg/ml (GE Healthcare), 1 µl de dNTP 10 mM (GE Healthcare) et par la suite on complète le volume à 12 µl avec de l'eau sans RNase et DNase (Wisent). Les tubes sont incubés 5 minutes à 65°C puis 5 minutes sur glace. Après une centrifugation rapide on ajoute 4 µl d'AMV buffer 5X (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), 2 µl de DTT 0.1M (Invitrogen) et 1 µl de RNAGuard 40U/µl (GE Healthcare). Après un mélange et une incubation à 42°C de 2 minutes on ajoute aux tubes 1 µl de transcriptase inverse AMV RT (Roche diagnostics) et on continue l'incubation à 42°C pendant 50 minutes. Il s'en suit une incubation à 70°C pendant 50 minutes, suivie d'une brève incubation sur glace. L'ADNc est conservé à -20°C.

11- PCR standard :

Afin de comparer les niveaux d'expression des gènes, une amplification par réaction de polymérisation en chaîne est réalisée à partir de l'ADNc qui a été synthétisé à partir de l'ARN extrait des cellules. Chaque tube de PCR comporte 1 µl d'ADNc, 2,5 µl de tampon d'amplification 10 x (100mM Tris-HCl (Invitrogen) pH 8, 500 mM KCl (Fisher Scientific), 15 mM MgCl₂), 1 µl de dNTP (GE Healthcare), 1 µl de chaque amorce et 1 µl de Taq polymérase (Roche Diagnostics). Le volume est complété à 25 µl par l'eau PCR (sans RNase et sans DNase). Le produit de PCR est alors migré sur gel d'agarose (EMD) à 120 volts (PowerPac Universal, model 200/2.0 power supply, Bio-Rad) pendant 25 minutes

puis la lecture est immédiatement faite sous lumière ultra violet (MBI Lab Equipments, Montréal, Canada).

12- PCR quantitatif en temps réel :

La réaction en chaîne par polymérase en temps réel est une technique qui permet de mesurer à chaque cycle d'amplification la quantité d'ADNc total ou d'amplicon grâce à un marqueur fluorescent. La cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible. Les RT qPCR ont été réalisées avec le thermocycleur Mx3000P de Stratagene (Agilent technologies, Mississauga, ON, Canada). Chaque tube à PCR comporte 12 µl de Syber Green (Agilent), 0,38 µl de marqueur de référence ROX (Agilent) dilué 1:500, 1 µl de l'amorce sens, 1 µl de l'amorce anti-sens, 2 µl de l'ADNc (10 ng d'ARN) à amplifier et le volume est complété à 20 µl par de l'eau sans ARNase et sans DNase (Wisent). La réaction d'amplification commence par un premier segment de chauffage à 95°C pendant 10 minutes dans le but de déshybrider les doubles brins d'ADN, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique et d'activer les polymérases. Cette étape est suivie d'un deuxième segment de 40 cycles comprenant pour chaque cycle une première phase de dénaturation de l'ADN (95°C pendant 30 secondes), une phase d'hybridation ou d'appariement des amorces (55 à 60°C pendant 1 minute) et une troisième phase d'élongation (72°C pendant une minute). Le troisième segment est un cycle de trois phases (95°C une minute, 55°C 30 secondes et 95°C 30 secondes) permettant de réaliser des courbes de dissociation afin de vérifier que l'on a bien amplification d'un seul amplicon et que l'on n'a pas de formation de dimères d'amorces. Pour vérifier l'efficacité des amorces utilisées, une courbe standard est réalisée à partir d'ADNc d'échantillon n'ayant subi aucun traitement. Une réaction de PCR est alors réalisée avec des dilutions croissantes de cet ADN (1: 10, 1: 100, 1: 500 et 1: 1000) et les amorces des différents gènes ciblés. Une bonne efficacité est comprise entre 95 et 105 %. La quantification d'un gène de référence a été faite pour normaliser les quantités d'ADNc dans les différents échantillons. Nous avons choisi le gène RPLPO qui ne devrait pas subir de modification suite aux différents

traitements effectués sur les cellules (Dydensborg et al, 2006). Après amplification des gènes d'intérêt, OPN et ERR α , ainsi que le gène de référence (voir liste des amorces utilisées dans le tableau VIII), la quantification de l'ADN était effectuée par un logiciel informatique fourni avec l'appareil de PCR Mx3000P de Stratagene (Agilent). Ce logiciel utilise le ratio suivant :

$$\text{Ration} = E_{(\text{gène cible})}^{\Delta\text{CT gène cible (contrôle-traité)}} / E_{(\text{gène contrôle})}^{\Delta\text{CT gène de référence (contrôle-traité)}}$$

(Pflaffl W M. 2001), où E est l'efficacité de l'amplification (souvent près de 2) et où le CT est le nombre de cycle pour que l'amplification soit exponentielle.

Tableau VIII. Amorces utilisées pour le PCR et le qPCR en temps réel.

Nom	Amorce	
Ostéopontine (forme complète)	Sens	5'-ttgcagtgatttgcttttgc-3'
	Anti-sens	5'-gtcatggcttccgttgact-3'
ERR α	Sens	5'-cgagaggagtatgttcta-3'
	Anti-sens	5'-cccgcccgccgctcagca-3'
RPLPO	Sens	5'-gcaatgttgccagtgctg-3'
	Anti-sens	5'-gccttgacctttcagcaca-3'

13-Extraction des protéines totales:

Après avoir aspiré le milieu de culture des Pétris, les cellules sont grattées et récupérées avec un volume de 1 ml de PBS dans un tube de 1,5 ml (Progene, New York, NY, USA). Un culot cellulaire est obtenu après 5 minutes de centrifugation à 4000 rpm à 4°C, le PBS est alors aspiré.

Le culot cellulaire est ensuite ressuspendu dans un tampon de lyse Triton [50 mM Tris-HCl (Invitrogen) pH 7.5, 1% Triton X-100 (ICN Biomedicals), 100 mM NaCl (Fisher Scientific), 5 mM EDTA pH 8 (Fisher Scientific), 40 mM p-glycérophosphate (Sigma-Aldrich), 50 mM NaF (Sigma-Aldrich), 200 μ M orthovanadate de sodium (Sigma-Aldrich),

5% glycérol (Fisher Scientific)] supplémenté d'inhibiteurs de protéases [aprotinine 1:1000 (Roche Diagnostics), leupeptine 1:1000 (Sigma-Aldrich), pepstatine 1:1000 (Sigma-Aldrich) et PMSF 1:100 (Sigma-Aldrich)]. Le mélange est alors mis à 4°C sous agitation pendant 15 à 20 minutes. Ensuite, après une centrifugation à 13500 rpm à 4°C durant 5 minutes, le surnageant est transféré dans un nouveau tube identifié et gardé à -80 °C.

14- Extraction des protéines nucléaires :

Les premières étapes d'extraction des protéines nucléaires sont semblables à celle de l'extraction des protéines totales. Après avoir effectué la lyse cellulaire, le mélange est mis à 4°C sous agitation pendant 5 minutes. Le lysat est mis dans l'azote liquide pendant deux minutes puis immédiatement transféré au bain marie à 37°C suivie d'une agitation (vortex) de quelques secondes. Cette dernière étape est répétée trois fois. Le lysat est par la suite centrifugé à 13500rpm à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et gardé à -80 °C.

15- Dosage des protéines :

Les protéines sont dosées selon la technique Bradford (BioRad Protein Assay Kit, Biorad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) et sont ensuite conservées à -80 °C.

16- Immunobuvardage :

Une quantité de 50 µg de protéines est diluée dans du Laemmli 2X [62,5 mM Tris-HCl pH 6.8 (Invitrogen), 2.3% SDS (Invitrogen), 10% glycérol (Fisher Scientific), 0.005% bleu de bromophenol (VWR), 5% β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)]. Par la suite un

montage est réalisé afin de séparer les protéines selon leur poids moléculaire par migration sur gel d'acrylamide 10% (375 mM Tris-HCl pH 8.8 (Invitrogen), 33% d'une solution d'acrylamide/Bis 30% (Bio-Rad), 0.1% SDS (Invitrogen), 0.1% persulfate d'ammonium [EM Science, Toronto, ON, Canada), 0.04% TEMED (EMD)]. Après une dénaturation dans l'eau bouillante pendant 7 minutes, la migration est effectuée à un ampérage de 20 mA par gel (PowerPac Universal, Bio-Rad) pendant environ 1h30 dans un tampon de migration (25 mM Tris (Invitrogen), 190 mM glycine (Roche Diagnostics), 0.1% SDS (Invitrogen)). Par la suite, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène fluorure (PVDF) 0.45 µm (GE Healthcare) à 250 mA pendant 1h30 dans un bain comportant un tampon de transfert (25 mM Tris (Invitrogen), 190 mM glycine (Roche Diagnostics), 20% méthanol (EMD)). Pour vérifier l'efficacité du transfert, la membrane contenant les protéines est colorée au rouge ponceau 0.2% (Sigma-Aldrich). La membrane est alors découpée aux endroits comportant les bandes de protéines à analyser. Elle est ensuite décolorée dans l'éthanol puis incubée sous agitation pour blocage, pendant une heure dans 2,5 % de blotto [lait en poudre (Carnation, Nestlé) dilué dans du TBST (20mM Tris-HCl pH 7.6 (Invitrogen), 140 mM NaCl (Fisher Scientific), 0.1% Tween-20 (EMD)]. La membrane est ensuite incubée, sous agitation, pendant la nuit dans une solution de blotto comportant l'anticorps primaire (voir tableau IX pour les dilutions utilisées). Le lendemain, la membrane est rincée 3 fois durant 10 minutes dans du TBST puis incubée une heure dans du blotto comportant l'anticorps secondaire conjugué à une peroxydase (HRP). Un autre lavage est effectué 3 fois 10 minutes dans du TBST. La révélation des protéines est effectuée par le kit ECL™ Western Blotting Detection (GE Healthcare) et par la suite la détection est réalisée par radiographie sur des films Biomax Light (Kodak, Toronto, ON, Canada).

Tableau IX. Anticorps utilisées pour l'immunobuvardage et l'immunohistochimie.

Référence de l'Anticorps	Espèce	Protéine reconnue	Dilution		Source
			WB	IHC	
AF1433	Chèvre	ostéopontine	1/2000	1:100	R&D Systems
NLS5402	Lapin	ERR α	1/3000	1:100	Novus Biologicals
AP106B	Lapin	IgG chèvre (couplé à l'HRP)	1/500	-	Millipore
LNA931V/AF	Souris	IgG	1/2000	-	ECL

17- Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

L'immunoprécipitation de la chromatine est une technique qui permet de déterminer les sites de liaison de l'ADN génomique pour une protéine donnée. Les cellules amenées à confluence sont tout d'abord traitées avec du formaldéhyde 1% (Fisher Scientific), pendant 15 minutes sous faible agitation, dans le but de réticuler les protéines liées à l'ADN. La réaction est stoppée par l'ajout de glycine 2,5 M (Roche Diagnostics). Par la suite, les cellules sont lavées à deux reprises avec du PBS comportant des inhibiteurs de protéases (aprotinine 1:1000, leupeptine 1:1000, pepstatine 1:1000 et PMSF 1:100), puis récoltées dans du PBS froid avec inhibiteurs de protéases et transférées dans un tube de 2 ml (Progene). Après centrifugation de 4000 rpm à 4°C, pendant 5 minutes, le culot cellulaire est ressuspendu dans 1 ml de tampon de lyse cellulaire [HEPES 1 M(Wisent), KCl 1 M(Fisher Scientific), NP40 (Roche Diagnostics)] supplémenté d'inhibiteurs de protéases, mis sous agitation pendant 20 minutes à 4°C suivi d'une centrifugation à 2000 rpm pendant 5 minutes, puis le surnageant est jeté. Un lavage du culot est effectué dans du PBS froid supplémenté d'inhibiteurs de protéases et après centrifugation à 2000 rpm à 4°C le surnageant est retiré. Ce lavage est répété une deuxième fois et le culot est ressuspendu dans un tampon de lyse nucléaire [Tris-HCl pH 8 (Invitrogen), EDTA 0,5 M pH 8 (Fisher Scientific), SDS (Invitrogen) 10%, H₂O] supplémenté d'inhibiteurs de protéases et mis sous agitation pendant 20 minutes à 4°C. Le lysat est ensuite soniqué dans le but de

découper l'ADN en fragments de 500 à 1000 paires de bases (sonicateur : Branson Sonifer 250) selon des conditions optimisées pour chaque lignée cellulaire utilisée. Pour la lignée HT29 la sonication était de neuf fois 10 secondes espacées d'une incubation sur glace de 30 secondes. Le produit est alors centrifugé à 13000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est divisé en 3 fractions de 200 µl correspondant aux conditions de précipitation tel que A : avec anticorps d'intérêt (ERR α), B : sans anticorps et C : avec anticorps contrôle de lapin (IgG). Chaque fraction est diluée en ajoutant 1800 µl de tampon de dilution pour CHIP [SDS 10%, Triton 100x (ICN Biochemicals), EDTA 0,5 M pH 8, Tris HCl 1 M pH 8 (Invitrogen), NaCl 5 M, H₂O] supplémenté d'inhibiteurs de protéases. L'étape suivante (pre-clear) consiste à incuber les échantillons avec des billes d'agarose sous agitation, pendant une heure à 4°C, afin d'enlever toute impureté. Ensuite, 1% du volume total, qui servira comme ADN total de chargement (input), est prélevé des tubes et gardé à -80°C. L'anticorps d'intérêt anti-ERR alpha (Novus Biologicals) et l'IgG (Upstate) sont ensuite ajoutés respectivement aux tubes A et C à la concentration optimale de 1% du volume total. Les trois tubes A, B et C sont incubés toute la nuit sous agitation à 4°C. Le lendemain, 80 µl de protein A agarose/salmon sperm DNA (Upstate) sont ajoutés à chaque tube. Ces tubes sont ensuite incubés 1 heure sous agitation à 4°C. Cela a pour effet de récolter le complexe anticorps-protéine-ADN. L'agarose est culoté par centrifugation à 6000 rpm pendant 3 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite doucement retiré. Une série de lavage est effectuée avec plusieurs tampons. 1 ml du premier tampon TSE1 (SDS 10%, Triton X-100, EDTA 0,5 M pH 8, Tris-HCl pH 8, 3% NaCl 5 M) est ajouté aux tubes, suivi d'une incubation de 5 minutes sous agitation à 4°C, puis centrifugation à 3000 rpm à 4°C et le surnageant est doucement enlevé. Un deuxième lavage avec le TSE1 est réalisé. De la même manière, deux cycles de lavage sont effectués avec les tampons TSE2 (SDS 10%, Triton X-100, EDTA 0,5 M pH 8, Tris HCl pH 8, 10% NaCl 5 M), TSE3 (LiCl 1 M, NP 40, Na deoxycholate, EDTA 0,5 M pH 8, Tris HCl pH 8) et le tampon d'élution TE (EDTA 0,5 M pH 8, Tris HCl pH 8). Aux tubes sont ajouté 200 µl de tampon d'élution (SDS 10%, NaHCO₃ 1 M) suivi d'une incubation à 65°C pendant 20 minutes entrecoupée d'une agitation (vortex) toute les 2 minutes. Après centrifugation à 13000 rpm pendant une minute, le surnageant est transféré dans un nouveau tube et y est ajouté 10µl de NaCl 5 M. L'input est dégelé et on y ajoute 198 µl de TE et 10 µl de NaCl 5 M. Les tubes A, B, C et

l'input sont incubés pendant 16h à 65°C. En suite, on ajoute à chacun des tubes 2 µl d'RNase A (Roche Diagnostics) puis on les incube pendant 30 minutes à 37°C. Par la suite on ajoute 2 µl de protéinase K (Roche Diagnostics) puis on réincube les tubes 2h à 42°C. Les échantillons sont alors purifiés (QIAquick, PCR purification Kit) et sont prêt pour la réaction PCR afin d'amplifier l'ADN immunoprécipité. Les amorces sont fabriquées de façon à amplifier l'ADN comportant les éléments de réponse pour ERR α sur son propre promoteur, qui servira donc comme contrôle positif, et pour amplifier l'ADN correspondant à la partie du promoteur de l'OPN comportant les éléments de réponse supposés pour ERR α . Comme contrôle négatif, un autre set d'amorce est synthétisé de façon à amplifier une séquence d'ADN ne comportant aucun élément de réponse pour ERR α (liste des amorces au Tableau X). Pour le calcul de l'enrichissement de l'ADN, la valeur du produit d'amplification de l'ADN immunoprécipité par l'anticorps anti ERR α obtenu par l'amorce ciblant la région d'intérêt sur le promoteur de l'OPN et la région contrôle, est soustraite de la valeur du produit d'enrichissement de l'ADN de chargement (Input). Le log₂ de la différence entre les deux valeurs résultantes correspondra au produit d'enrichissement de l'ADN de la région promotrice de l'OPN immunoprécipitée par l'anticorps anti ERR α comparé à l'ADN de chargement et de la région contrôle. Le même calcul est effectué pour l'expérience C utilisant l'IgG comme anticorps non spécifique et l'expérience B n'utilisant aucun anticorps afin de les comparer avec la première condition.

Tableau X. Séquences des amorces utilisées pour l'immunoprécipitation de la chromatine.

Nom	Amorce	Élément de réponse ciblé
OPN CHIP-site1	Sens 5'-gtccttaagatacgagagcatttg-3' Anti-sens 5'-aaatgccccagcctacctatcctt-3'	ERRE-S1 : TGACCTAGG
OPN CHIP-site2	Sens 5'-ataggtaggctgggcgattgc-3' Anti-sens 5'-ttcaggagccagaccgtggtt-3'	ERRE-S2 :CACAGGTCA
OPN CHIP-site3	Sens 5'-gctactgcatacaaatcacaagc-3' Anti-sens 5'-tgttcaagcctgcaaggagttcag-3'	ERRE-S3 : TAAAGGACA
ERR α CHIP	Sens 5'-gaaccgtagaccagtagccccacac-3' Anti-sens 5'-ccatccgagtggaatttgagtcctaa-3'	ERRE : TNAAGGTCA
Contrôle génomique négatif	Sens 5'-ggatgcagtgctcttctccccagat-3' Anti-sens 5'-gtcgcccacaggtgctcgctcaagtct- 3'	Pas de séquence cible

III- Résultats

1. Validation de la micromatrice tissulaire.

La première approche dans mon projet de recherche a consisté à analyser le profil d'expression d'ERR α et de l'OPN dans le cancer colorectal. Nous avons donc réalisé une micromatrice tissulaire (MMT) par une technique manuelle qui permet d'obtenir un bloc de paraffine comportant 50 échantillons de 2 mm de diamètre. Au total 25 tumeurs et les 25 marges de résection correspondantes ont été regroupées sur le même bloc de paraffine à partir duquel plusieurs niveaux de coupe ont été montés sur lame. Au total 3 blocs de MMT ont été réalisés. Cela a permis de standardiser les résultats et de faire une bonne économie d'anticorps. Les échantillons de mauvaise qualité ou ne comportant pas de tissu tumoral ont été éliminés. Après la coupe du bloc final et coloration par l'hématoxyline et l'éosine, la vérification au microscope optique a démontré que tous les tissus prélevés sont présents dans l'ordre correspondant à la matrice de localisation (figure 4). Selon le niveau de coupe et la taille initiale des tissus sélectionnés, certains échantillons ont été éliminés car trop petits pour avoir une signification statistique dans l'interprétation des résultats de l'immunohistochimie.

2. Profil d'expression immunohistochimique d'ERR α et de l'OPN dans le cancer colorectal.

Nous avons étudié l'expression d'ERR α et de l'OPN dans le CCR en immunohistochimie dans 85 tumeurs et 8 adénomes avec leur marge de résection correspondante. Il y avait 8 tumeurs de stade I, 25 de stade 2, 27 de stade 3 et 13 de stade 4. Au moment de l'analyse, il n'y avait pas de données pour le stade concernant 12 tumeurs. L'expression nucléaire d'ERR α et cytoplasmique de l'OPN a été observée dans la plupart des tissus tumoraux ainsi que dans les tissus de la marge de résection. ERR α et l'OPN ont été très faiblement exprimés dans les adénomes (figure 5, E page 50). Nous avons observé une augmentation de l'expression d'ERR α dans 61,2 % (51 tumeurs parmi 85 étudiées) des tumeurs par rapport à la marge de résection correspondant à chaque

tumeur (figure 5, A et B page 48). Le score de cette expression était significativement ($p < 0,001$) plus élevé dans la tumeur par rapport à la marge de résection, avec un score médian de 2 dans le tissu tumoral (Tableau XI, test de Wilcoxon). $ERR\alpha$ a été observé au niveau cytoplasmique dans les tumeurs l'exprimant fortement reflétant une production accrue ou un dérèglement dans la localisation ou la dégradation. Une baisse de l'expression d' $ERR\alpha$ a été constatée dans seulement 8 cas parmi les 85 adénocarcinomes étudiés. L'expression de l'OPN a été observée dans le cytoplasme des cellules épithéliales mais aussi au niveau de la membrane apicale et latérobasale (figure 5, A et B). Elle a été observée également dans le cytoplasme des cellules conjonctives et endothéliales (figure 5, A). L'OPN était augmentée dans 49 tumeurs parmi les 85 étudiées (58,8 %) par rapport au tissu non tumoral, avec un score médian de 1,5 dans la tumeur ($p < 0,001$, voir Tableau XI). Une baisse du marquage immunohistochimique de l'OPN dans le cancer a été observée dans 6 cas seulement. Dans 55,3% des cas, l'expression d' $ERR\alpha$ était en corrélation avec celle de l'OPN (Kappa pondéré=0.27, $p=0.0117$). L'expression immunohistochimique des deux protéines ensembles était augmentée dans 40% des adénocarcinomes étudiées (Tableau XII). Nous n'avons pas observé de corrélation statistiquement significative dans l'expression d' $ERR\alpha$ et de l'OPN en fonction du stade tumoral.

3. Modulation de l'expression de l'OPN par $ERR\alpha$ dans la lignée tumorale colique HT29 : analyse en RT qPCR et en immunobuvardage.

Afin de réaliser mon deuxième objectif, qui consistait à étudier la régulation transcriptionnelle de l'expression de l'OPN par $ERR\alpha$ dans un modèle de lignée tumorale colique, nous avons étudié la modulation de l'expression de l'OPN par le récepteur nucléaire $ERR\alpha$ dans la lignée tumorale colique HT29. Après infection des cellules par des virus incorporant des vecteurs d'expression codant pour l'ARN interférant sh5 dirigée contre $ERR\alpha$, puis une sélection de 48 heures par la puromycine, nous avons observé en RT qPCR une baisse de l'ARN messager d' $ERR\alpha$ de près de 90% par rapport à la population des cellules infectées par des virus comportant une séquence codante pour un

shc (sh contrôle). Cette réduction était accompagnée d'une diminution du messenger de l'OPN de plus de 60 % par rapport au contrôle (figure 6A). Cette observation a été confirmée également au niveau protéique par immunobuvardage avec baisse d'ERR α et de l'OPN après 48 heures et jusqu'à 10 jours de sélection (figure 6B).

Figure 4. Lame de MMT colorée à l'hématoxyline et à l'éosine.

On observe sur la lame de MMT que les échantillons prélevés et transférés au bloc receveur sont présents sur la lame, sauf un échantillon représenté par un carré. Cet échantillon est bien visible sur le bloc de paraffine, il apparaîtra après des niveaux de coupe supplémentaires. Les deux premiers cercles en noir représentent un espace volontairement laissé vide pour servir de repère dans le classement des échantillons prélevés. Les deux échantillons entourés d'une accolade correspondent au tissu sain (S31) et au tissu cancéreux (C31) du patient numéro 31 dans la banque de tissu et les deux suivants correspondent au numéro 32 et ainsi de suite jusqu'à la fin de la lame. Le tissu entouré d'un cercle, est enroulé et correspond à un artéfact de coupe.

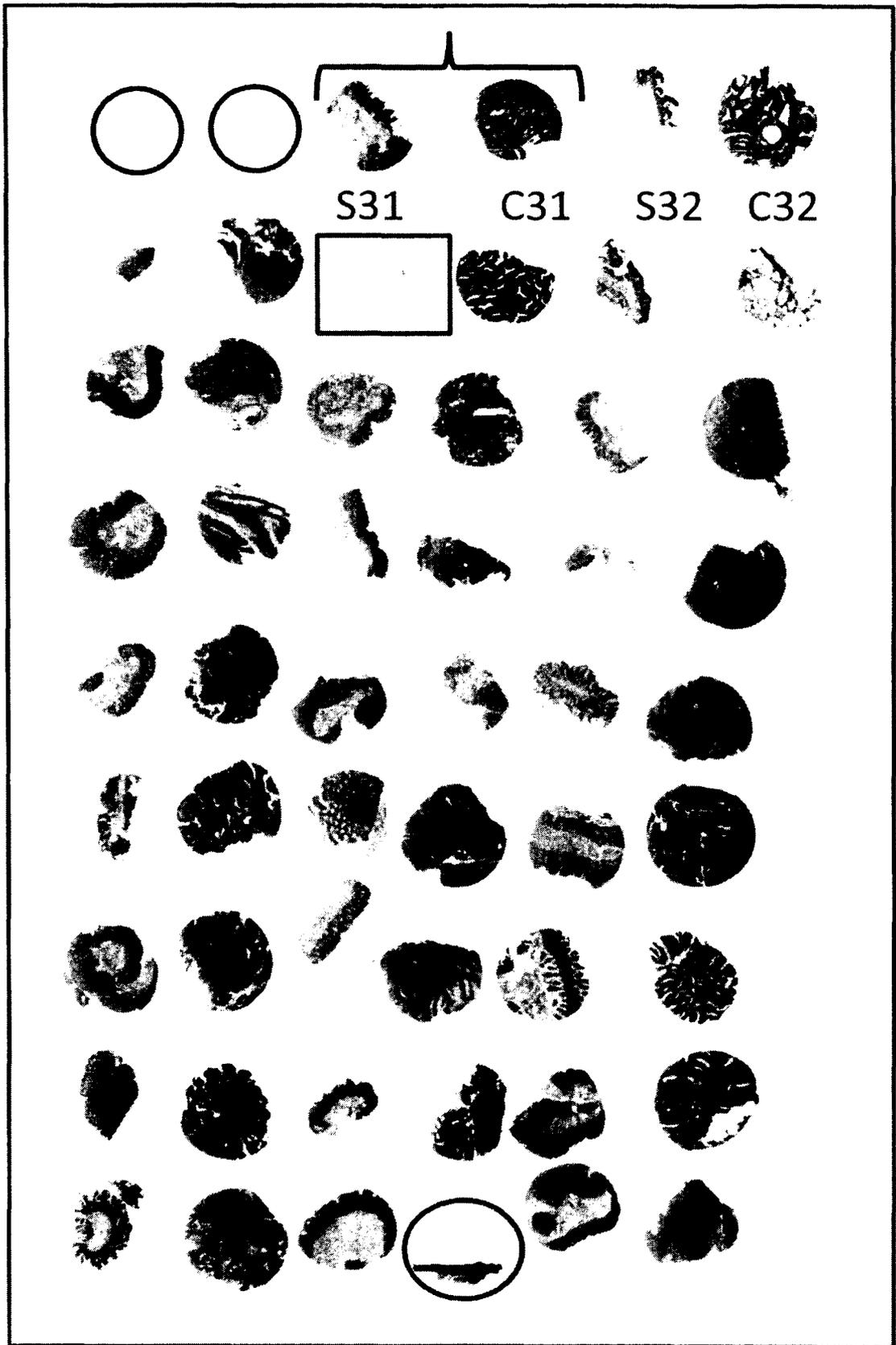
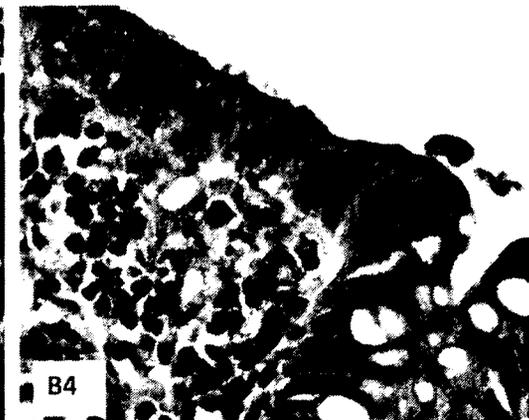
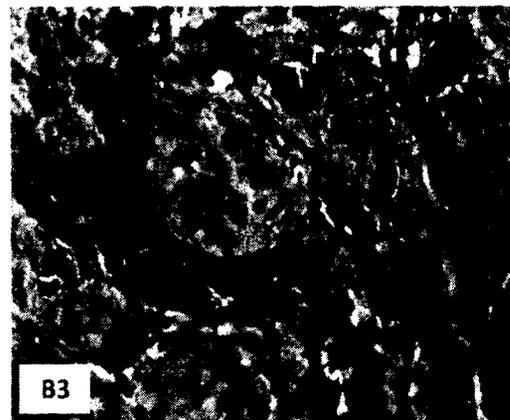
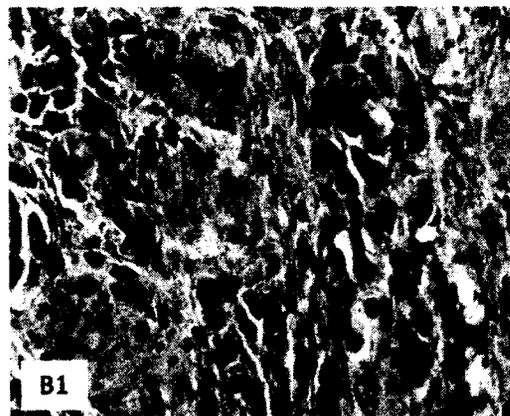
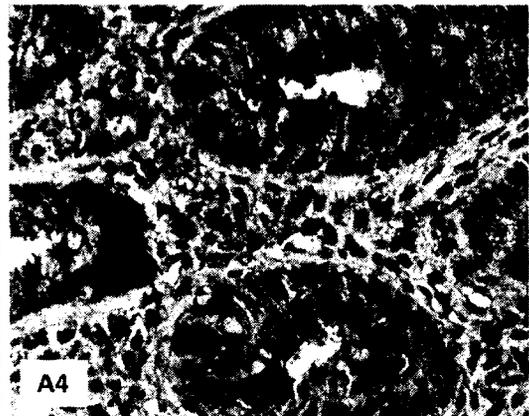
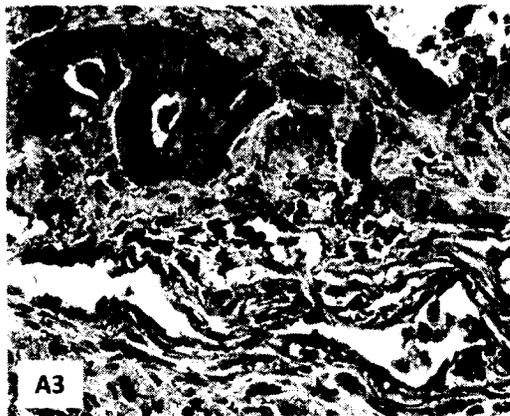
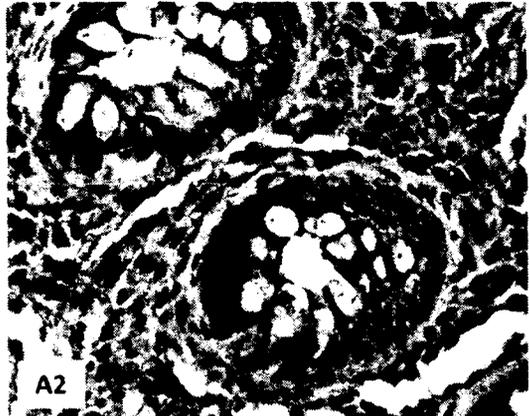
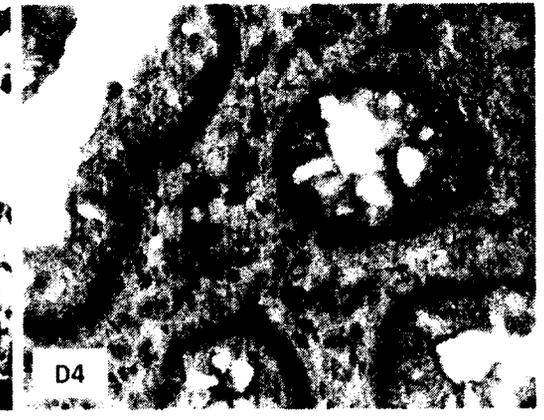
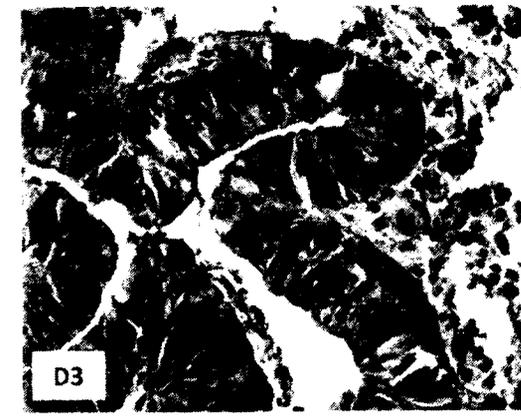
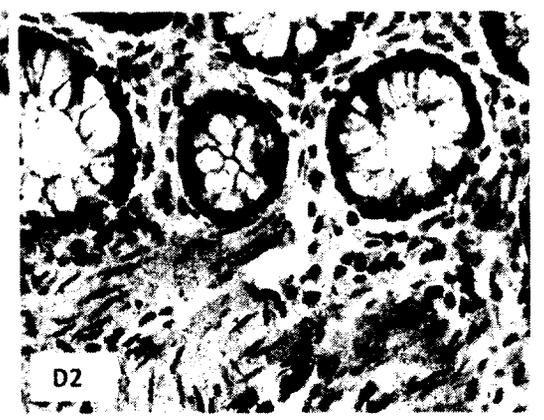
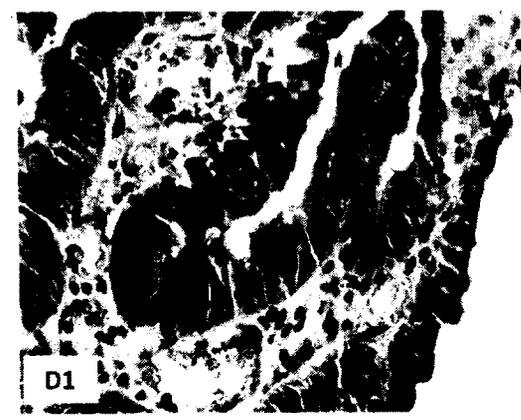
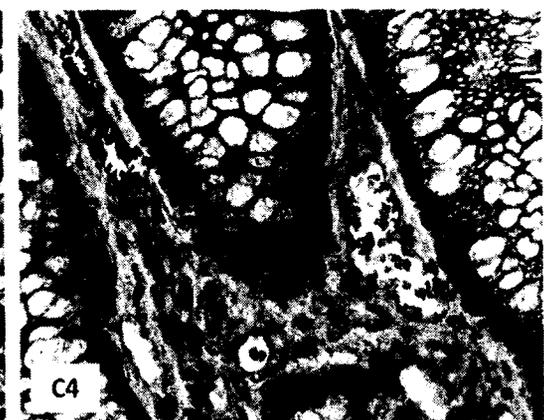
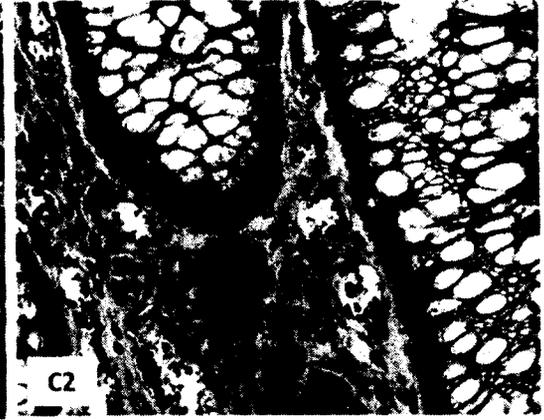
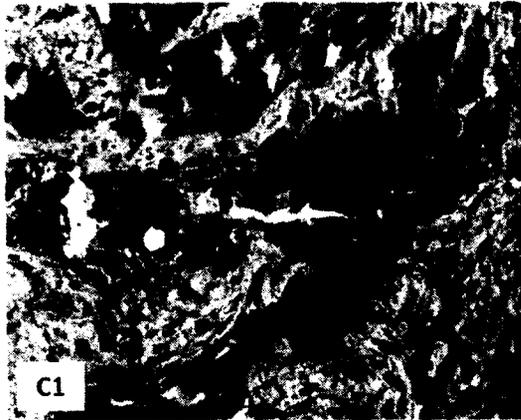


Figure 5. Illustration de l'expression, en immunohistochimie, d'ERR α et l'OPN dans le cancer colorectal en comparaison avec le tissu de la marge de résection correspondante.

En A : il s'agit d'un adénocarcinome moyennement différencié montrant une forte expression nucléaire d'ERR α (A1, B1 page 48) comparée au tissu non tumoral (A2, B2). Sur le niveau de coupe suivant sont montrées les mêmes formations glandulaires (A3, B3) exprimant fortement l'OPN par rapport aux glandes non tumorales (A4, B4). En C (page 49) il s'agit d'adénocarcinomes montrant une faible expression d'ERR α (C1) par rapport à la marge de résection (C2) et de l'OPN (C3) par rapport au tissu non tumoral (C4). En D, page 49, est représenté un ca de discordance entre ERR α et l'OPN. L'expression des deux protéines dans l'adénome (E1 et E3, page 50) n'est pas augmentée par rapport au tissu non tumoral (E2, E4).





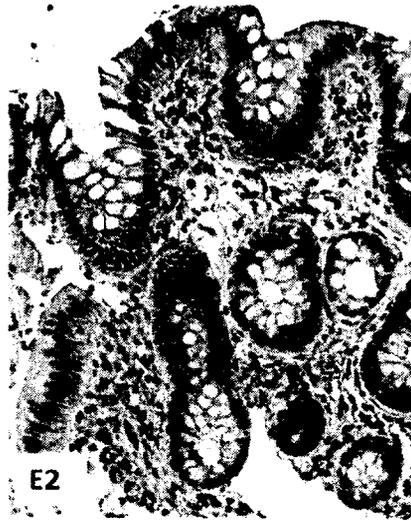


Tableau XI. Expression immunohistochimique d'ERR α et de l'OPN dans une série de 85 échantillons de cancer colorectal par rapport à la marge de résection saine.

Le tableau montre le résultat de l'analyse statistique de l'expression nucléaire d'ERR α et cytoplasmique de l'OPN dans un échantillon de 85 tumeurs par rapport à la marge de résection correspondant à chaque tumeur. Une échelle de 0 à 4 a été utilisée pour classer l'intensité d'expression de ces deux protéines, en négative (0), faible (1), modérée (2), forte (3) et très forte (4). Le test d'analyse statistique (test de Wilcoxon) a montré une augmentation significative ($p < 0,0001$) de l'expression d'ERR α dans la tumeur (N=85) avec une valeur médiane (intensité de marquage) de 2, par rapport à une médiane de 1 dans le tissu de la marge de résection. Une médiane de 1,5 a été attribuée à l'expression de l'OPN dans les cancers alors que la médiane était de 1 dans le tissus non tumoral ($p < 0,0001$).

		Immunoréactivité pour ERRA		Immunoréactivité pour l'OPN	
		Sain	Cancer	Sain	Cancer
N	Valide	85	85	85	85
Moyenne		0,99	1,73	0,95	1,61
Écart-type		0,587	0,961	0,364	0,778
Minimum		0	0	0	0
Maximum		2	4	2	4
Centiles	25	1,00	1,00	1,00	1,00
	50	1,00	2,00	1,00	1,50
	75	1,00	2,00	1,00	2,00

***p<0,0001

***p<0,0001

Tableau XII. Corrélation entre le score d'expression de l'OPN et d'ERR α dans le cancer colorectal.

Le tableau montre la corrélation entre les indices immunohistochimiques de l'expression d'ERR α et de l'OPN dans le cancer rapportés au tissu non tumoral (indice 0 = pas d'augmentation, 1= augmentation et -1= diminution). L'expression des deux protéines était significativement concordante dans 55,3 % des cas ($\kappa= 0.27$, $p=0.0117$). ERR α et l'OPN augmentent tout les deux dans 40% des tumeurs étudiées.

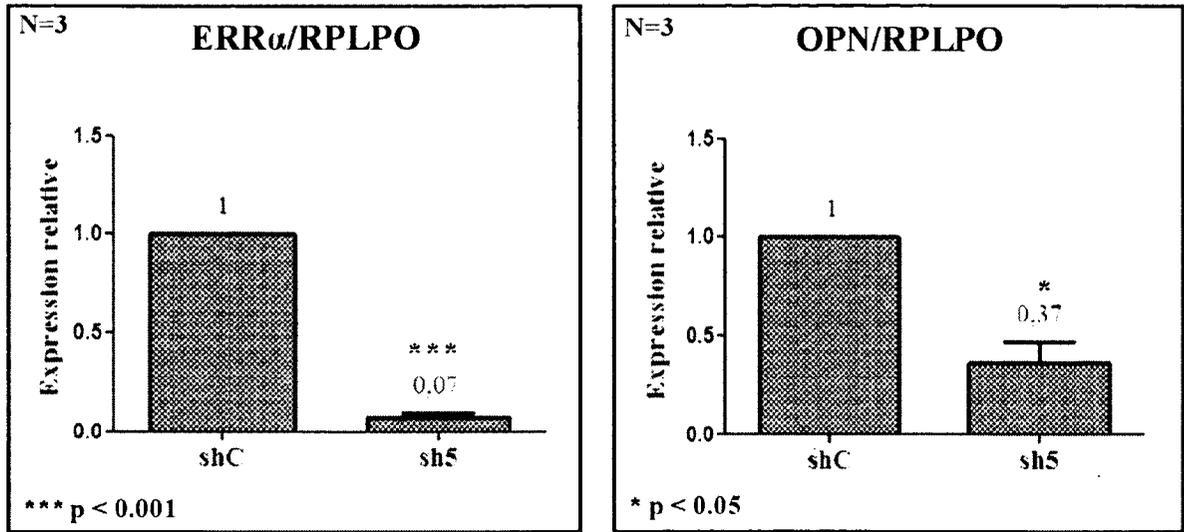
		Score OPN			Total
		-1	0	1	
Score ERR α	-1	2	3	3	8
	0	1	11	13	25
	1	0	18	34	52
Total		3	32	50	85

% accord	Kappa	Erreur standard	Intervalle de confiance 95%		Valeur de p
55,3	0.27	0.1184	0.03745	0.5016	0.0117

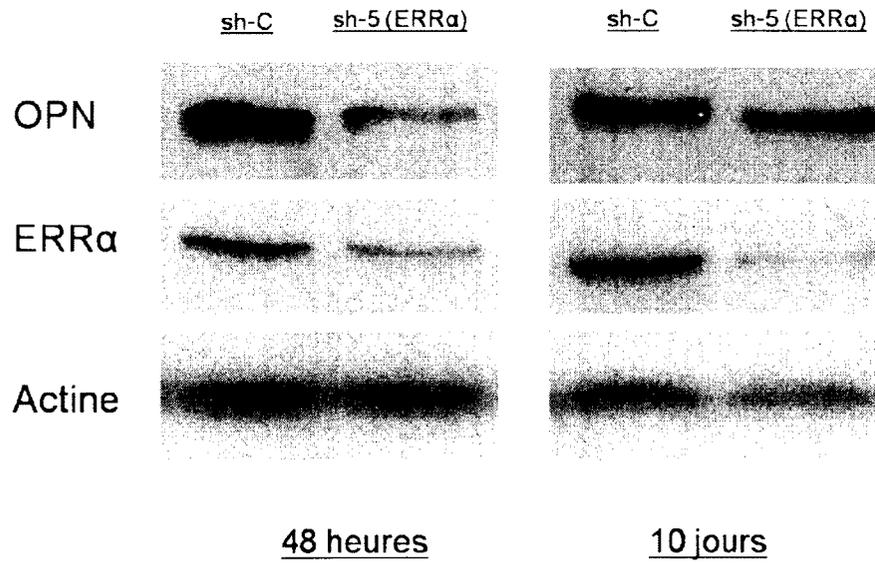
Figure 6. Modulation de l'expression l'OPN par $ERR\alpha$ dans la lignée tumorale colique HT 29.

Le graphique en A illustre le résultat de l'expression de l'ARN messager d' $ERR\alpha$ et de l'OPN, normalisées au gène de référence RPLPO, après infection virale de la lignée tumorale colique HT29 par le sh5 ciblant $ERR\alpha$ comparé au contrôle shC, pendant 48 heures. On observe que l'infection par le sh5 entraîne une baisse du messager d' $ERR\alpha$ et en conséquence une baisse du messager de l'OPN de plus de 60% par rapport aux cellules infectées par le contrôle shC. Les expériences ont été faites séparément et répétées trois fois en triplicatas. La figure B représente un immunobuvardage, représentatif de trois expériences séparées, montrant que la diminution de l'expression de l'OPN est également observée au niveau protéique après 48 heures et qu'elle est maintenue jusqu'à 10 jours de sélection par la puromycine (5 mg/ml).

A : RT qPCR



B : Immunobuvardage.



4. Analyse de l'effet de la surexpression d'ERR α sur l'activité du promoteur de l'OPN.

Après avoir montré que l'expression de l'OPN est influencée par la modulation de l'expression d'ERR α dans la lignée tumorale colique HT29, nous avons évalué le contrôle du récepteur nucléaire ERR α sur le promoteur de l'OPN en essai promoteur-gène rapporteur. La construction plasmidique, comportant le promoteur de l'OPN couplé au gène rapporteur de la luciférase, a été transfectée dans les cellules 293T. Ces cellules ont été choisies pour leur efficacité de transfection avoisinant les 70% par rapport à celles des lignées tumorales coliques qui est beaucoup plus faible. Les activateurs utilisés sont le récepteur nucléaire ERR α et/ou son coactivateur préféré PGC1 α (Huss et al, 2002). La transfection du gène de la Renilla a été faite afin de normaliser les activités luciférase à l'efficacité de la transfection. Les quantités d'ADN dans chaque puits ont été égalisées par l'ajout des quantités nécessaires du vecteur vide Plenti, qui a servi de véhicule pour ERR α et PGC1 α . Les histogrammes en figure 7 montrent que la transfection transitoire d'ERR α seul n'avait pas d'effet significatif par rapport au vecteur Plenti, et ce même en augmentant les doses d'ERR α (figure 8). PGC1 α seul entraîne une activité luciférase 4 fois plus grande que le contrôle vide à la dose de 200 ng (figure 7), vraisemblablement en coactivant un ERR α endogène présent dans les cellules 293T. ERR α et PGC1 α ensembles entraînent une activité du promoteur de l'OPN plus de 13 fois le contrôle. Cette activité augmente avec les doses croissantes d'ERR α et de PGC1 α (figure 8). Dans une autre expérience (figure 9), nous avons observé que l'inhibition de l'activité d'ERR α entraîne une baisse significative ($p < 0,05$) de plus de 50% de l'activité du promoteur de l'OPN en utilisant le XCT790 à 5 μ M, un agoniste inverse d'ERR α , comparée au contrôle DMSO. De plus, l'inhibition de l'ARN messager d'ERR α par le sh5 entraîne une baisse de près de 65% de l'activité luciférase induite par le promoteur de l'OPN (figure 10). Les constructions OPN-Luc (100 ng/puits), ERR α (200 ng/puits) et PGC1 α (200 ng/puits) ont été transfectées en même temps que l'ajout de l'XCT790 ou du DMSO et en même temps que la transfection des sh5 et shC.

Figure 7. ERR α coactivé par PGC1 α augmente, en essai luciférase, l'activité du promoteur de l'OPN

Cette figure montre le résultat d'un essai luciférase effectué après transfection de la lignée 293T par un vecteur plasmidique comportant la construction OPN-Luc. A été transfecté également soit le vecteur Plenti vide (PV), le vecteur codant pour ERR α seul, PGC1 α seul ou les deux derniers vecteurs ensembles. Dans cette expérience nous avons observé qu'ERR α seul n'a pas d'effet significatif sur l'activité du promoteur de l'OPN par rapport au véhicule vide Plenti (PV). PGC1 α seul entraîne une augmentation de 4 fois le contrôle vide vraisemblablement par coactivation d'un ERR α endogène. Les deux ensembles entraînent une augmentation de l'activité luciférase induite par le promoteur de l'OPN de plus de 13 fois le véhicule vide Plenti. Les résultats sont présentés comme des moyennes avec erreur type. Cette expérience a été effectuée trois fois de façon indépendante, chaque fois en triplicata.

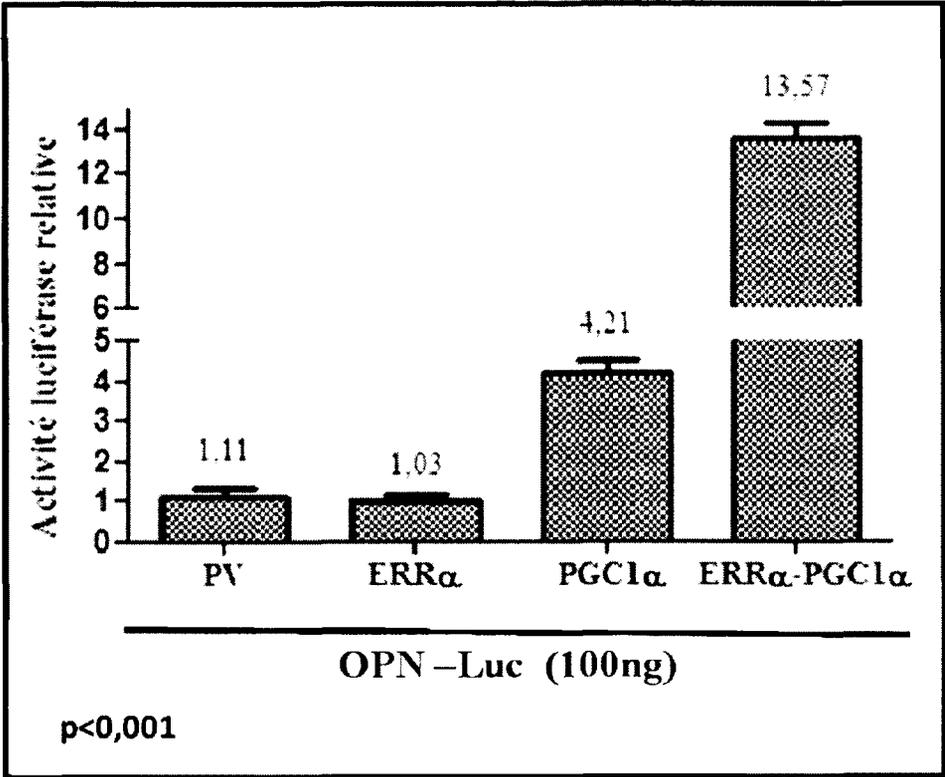


Figure 8. Effet dose dépendant d'ERR α sur le promoteur de l'OPN

La figure montre un résultat représentatif de la mesure de l'activité luciférase induite par le promoteur de l'OPN. Ce promoteur a été couplé au gène de la luciférase et le vecteur a été transfecté aux cellules 293T. Le vecteur codant pour ERR α a été transfecté à doses croissantes, soit seul, soit accompagnée de son coactivateur préféré PGC1 α . L'histogramme montre que le récepteur nucléaire ERR α seul n'a pas d'effet significatif sur le promoteur de l'OPN même en augmentant sa dose de 100 à 400ng alors que l'ajout de PGC1 α entraîne une augmentation dose dépendante de l'activité du promoteur de l'OPN. PGC1 α seul entraîne une activité luciférase de deux fois le vecteur vide vraisemblablement par coactivation d'un ERR α endogène présent dans les cellules 293T. Les résultats sont présentés comme des moyennes avec erreur type. Cette expérience représente le résultat de trois expériences effectuées séparément et chaque fois en triplicata.

**** $p < 0,0001$ (one way Annova).

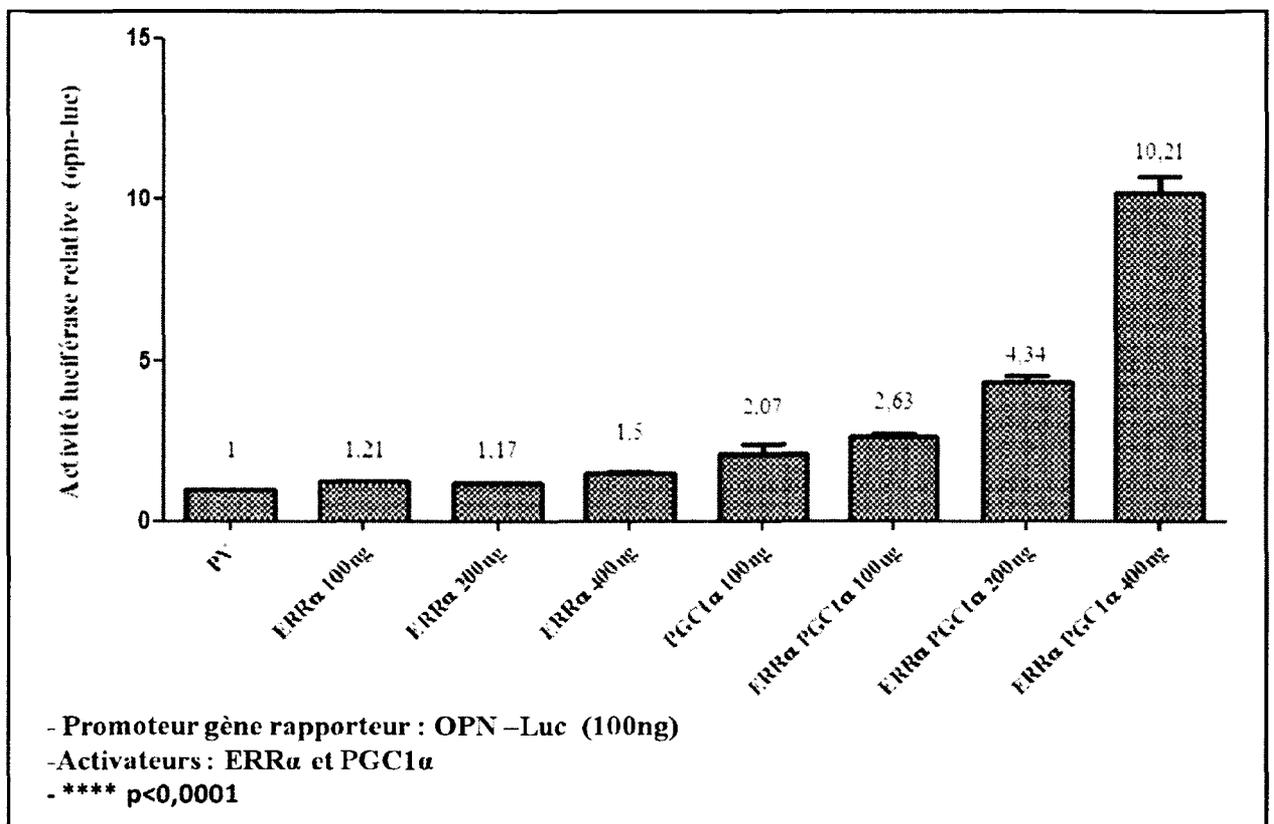


Figure 9. Effet du XCT790, agoniste inverse d'ERR α , sur l'activité du promoteur de l'OPN.

Cet histogramme montre le résultat d'un essai promoteur gène rapporteur effectué après transfection de la lignée 293T par le plasmide comportant la construction OPN-Luc (100 ng) et les vecteurs plasmidiques comportant le gène d'ERR α (200 ng) et celui de PGC1 α (200 ng). Dès le début de la transfection, les cellules ont été traitées soit par le XCT790 soit par le contrôle DMSO pendant 48 heures. On observe que l'inhibition pharmacologique d'ERR α par un agoniste inverse, le XCT790, entraîne une baisse significative de l'activité luciférase induite par le promoteur de l'ostéopontine suite à son activation par ERR α et son coactivateur PGC1 α comparée au contrôle DMSO. Cette expérience a été répétée trois fois de façon indépendante, chaque fois en triplicata. Les résultats sont présentés comme des moyennes avec erreur type.

* $p < 0,05$

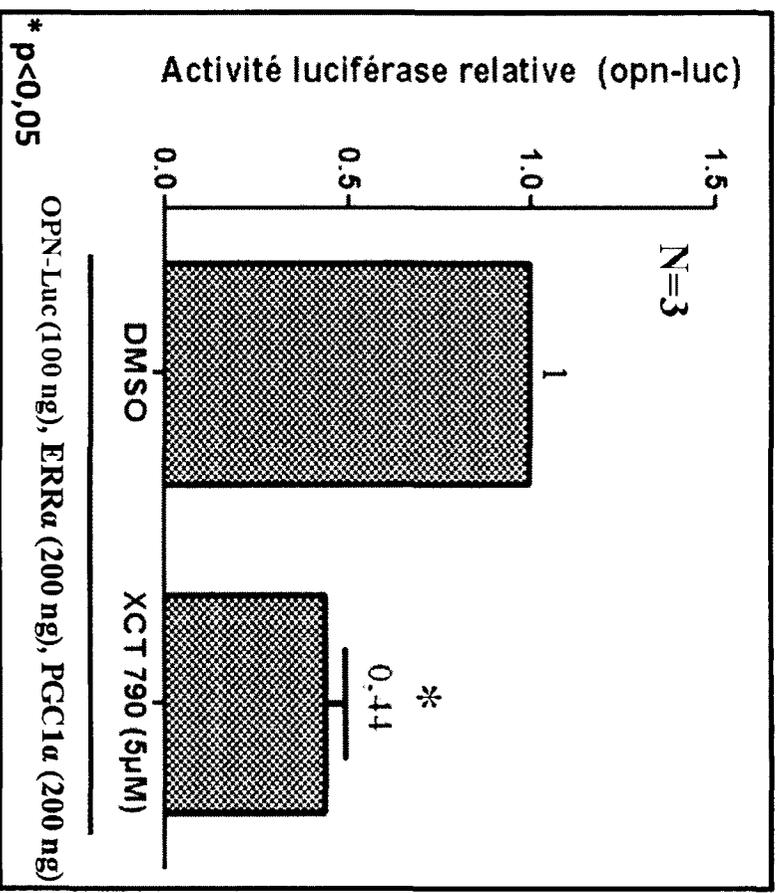
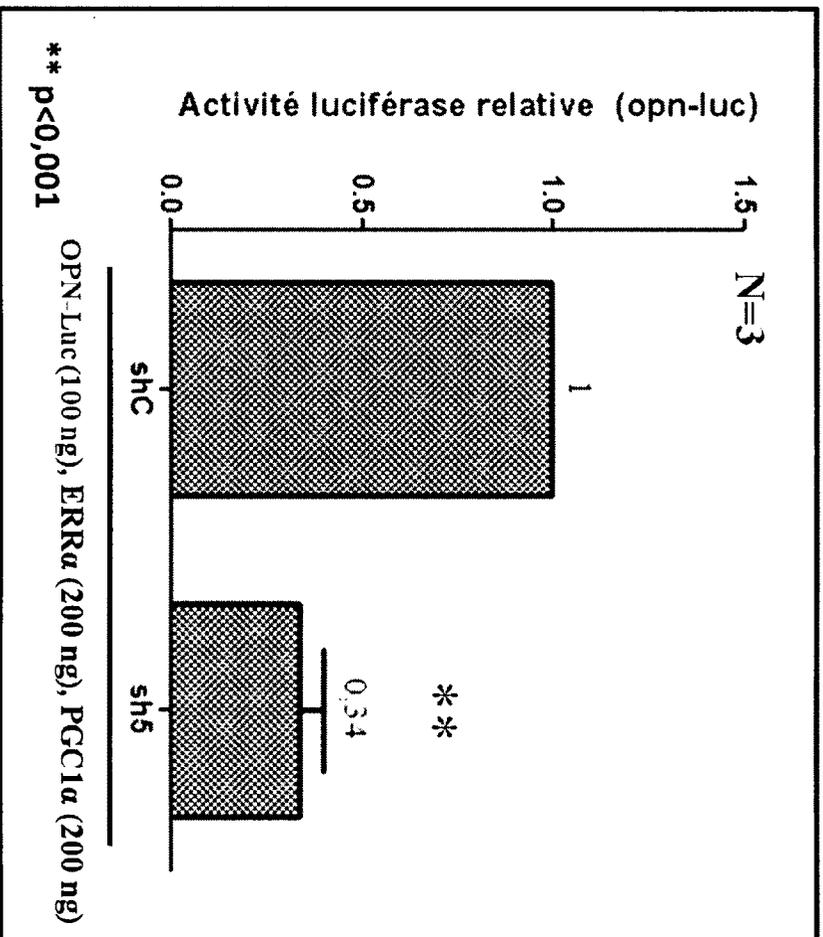


Figure 10. Effet de l'inhibition de l'expression d'ERR α par le sh5 sur l'activité du promoteur de l'OPN.

Cette figure montre le résultat d'un essai promoteur gène rapporteur après transfection transitoire de la lignée 293T par un vecteur plasmidique comportant le sh5 ciblant le messenger d'ERR α comparé au contrôle shC en présence des vecteurs plasmidiques suivant : OPN-Luc (100 ng), ERR α (200 ng) et PGC1 α (200 ng). L'inhibition d'ERR α par le sh5 entraîne une baisse significative de l'activité du promoteur de l'OPN comparée au contrôle shC. Cette expérience a été effectuée trois fois de façon indépendante, chaque fois en triplicata.

** $p < 0,001$.



5. Identification des éléments de réponse pour $ERR\alpha$ sur le promoteur de l'OPN.

Après avoir démontré, en essai promoteur-gène rapporteur qu' $ERR\alpha$, coactivé par $PGC1\alpha$, active le promoteur de l'OPN, nous avons étudié les 1000 paires de bases du promoteur de l'OPN, insérées dans le vecteur plasmidiques pSGG, dans le but d'identifier des éléments de réponse pour $ERR\alpha$, dont l'élément de réponse complet est TNAAGGTCA où le N peut représenter n'importe quelle base. Cette analyse a été faite à l'aide des logiciels informatiques MatInspector (genomatix.de) et Match (gene-regulation.com). Nous avons identifié trois séquences nucléotidiques pouvant lier $ERR\alpha$ (figure 11). La première que nous avons dénommé ERRE-S1, située à -942 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription, est la séquence *GACCTAGG*. La 2^{ème} ERRE-S2 est située à 80 paires de bases du premier site et comporte la séquence *CACAGGTCA*. Le troisième site ERRE-S3 *TAAAGGACA*, plus loin des deux premiers, est à -637 paires de bases du site d'initiation de la transcription. On note que ces trois éléments de réponses sont incomplets. Les sites ERRE-S1 et ERRE-S2 comportent la séquence complète AGGTCA commune aux récepteurs nucléaires. Par contre, aucun des deux ne possède le TNA précédant la séquence AGGTCA. Quant au site ERRE-S3, il possède la séquence typique pour le récepteur nucléaire $ERR\alpha$ mais imparfaite puisque il y a un A à la place du T de TCA.

Nous avons étudié la fonctionnalité de ces trois éléments de réponse par mutation sélective de chacun d'entre eux sur le promoteur de l'OPN couplé au gène de la luciférase. L'analyse a été faite par essai promoteur-gène rapporteur. La mutation des sites ERRE-S1 et ERRE-S2 séparément et en présence d' $ERR\alpha$ et de $PGC1\alpha$ entraîne une baisse de près de 70 % de l'activité luciférase par rapport aux mêmes conditions pour le promoteur non muté (figure 12 : A, B et C). La mutation conjointe de ces deux sites entraîne une baisse légèrement plus importante qui était de 75% (figure 12 : A, B, C et D). Aux mêmes conditions, la mutation du troisième site entraîne seulement une baisse de 22,4 % d'activité luciférase par rapport au promoteur non muté (figure 12 : A et E). L'activité luciférase mesurée après transfection du coactivateur $PGC1\alpha$ seul est diminuée seulement de 20% quand le site ERRE-S1 est muté par rapport au promoteur non muté (figure 12 : A et B). Cette activité baisse de près de 70% à la mutation du site ERRE-S2 (figure 12 : A, C et D),

alors qu'elle reste inchangée avec la mutation du site ERRE-S3 (figure12 : E). Il est à noter que l'activité luciférase de base (transfection de Plenti vide seul) est diminuée de 60 % par mutation du site ERRE-S2, de 30% par mutation du site ERRE-S1 et de 20 % par mutation de ERRE-S3, par rapport au promoteur non muté. Ces résultats suggèrent qu'ERR α peut se lier au site ERRE-S1 mais de façon moins forte par rapport au site ERRE-S2. Ce dernier serait plus spécifique pour ERR α car sa mutation annule l'effet d'ERR α et de PGC1 α . Le site ERRE-S3 ne semble pas être un élément de réponse fonctionnel pour ERR α .

Figure 11. Éléments de réponse pour ERR α sur le promoteur de l'OPN.

Représentation schématique du promoteur humain de l'OPN montrant les éléments de réponse pouvant lier le récepteur nucléaire ERR α dont la séquence consensus est TNAAGGTCA. Il s'agit de trois éléments incomplets, identifiés par analyse bioinformatique, qu'on a nommé ERRE-S1, ERRE-S2 et ERRE-S3 situés respectivement à -942, -862 et -637 paires de bases par rapport au site d'initiation de la transcription. En rouge sont colorées les bases communes et en noir les bases non communes entre l'élément de réponse complet pour ERR α et les éléments de réponse sur le promoteur de l'OPN.

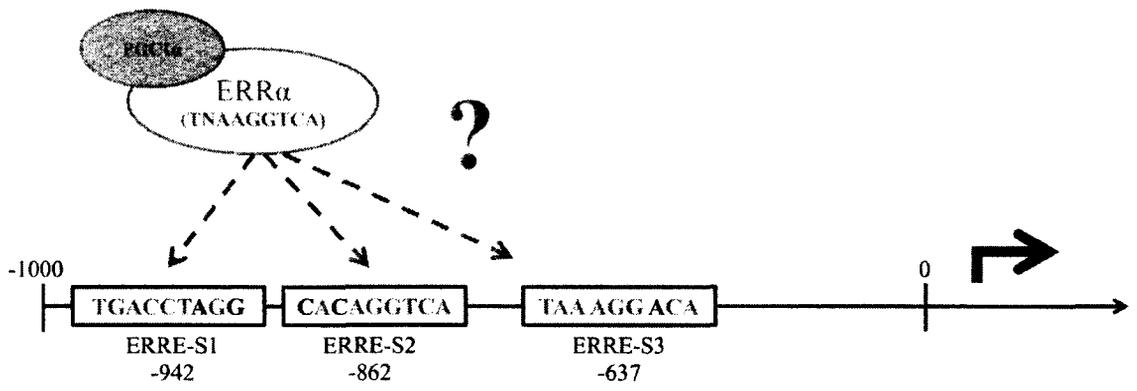
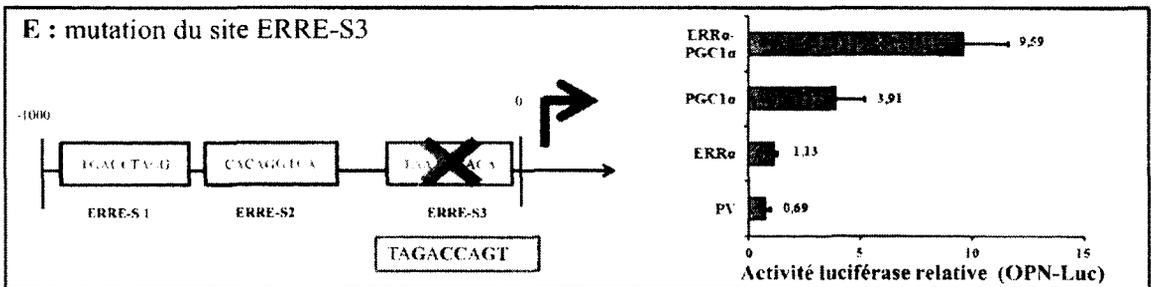
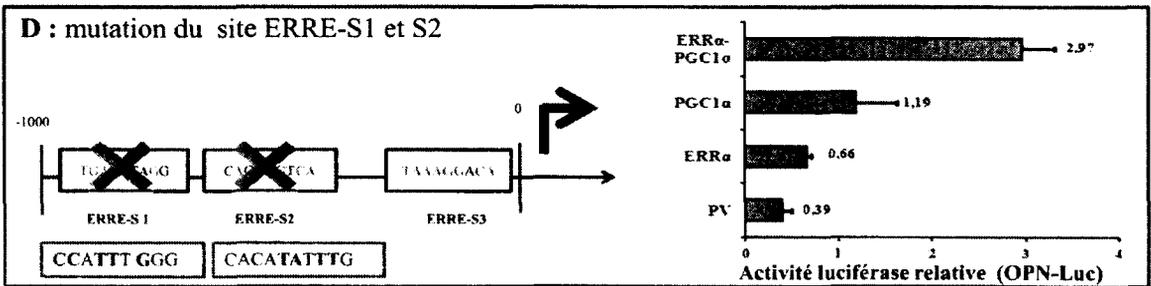
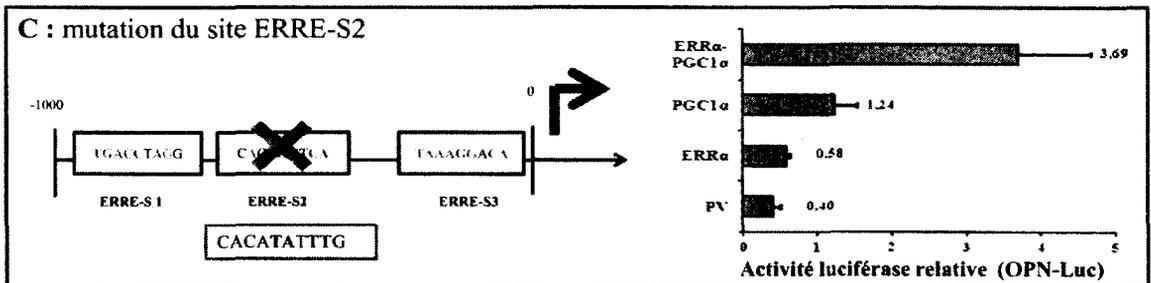
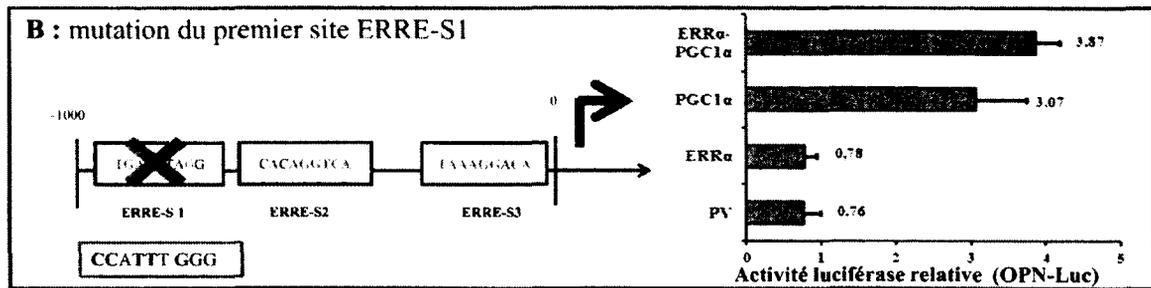
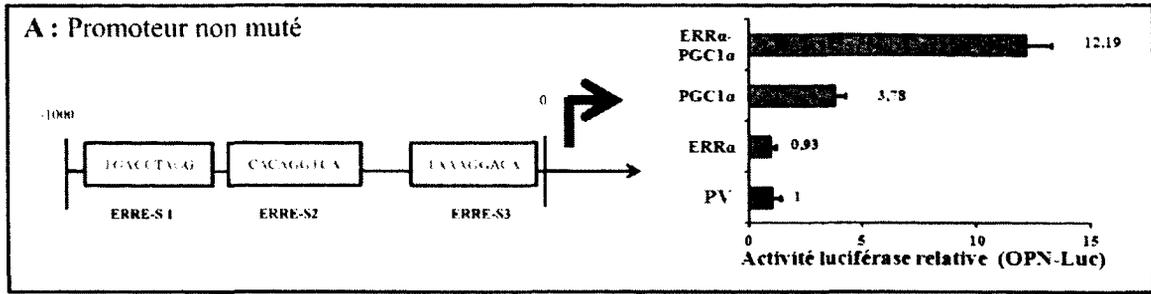


Figure 12. Effet de la mutation d'éléments de réponse potentiels pour ERR α sur l'activité du promoteur de l'OPN.

Essai promoteur gène rapporteur effectué après transfection transitoire des cellules 293T par la construction OPN-Luc non muté (A), avec mutation d'ERRE-S1 seul (B), ERRE-S2 seul (C), ERRE-S1 et ERRE-S2 ensembles (D) et de ERRE-S3 seul (E). Pour chaque expérience, les activateurs transfectés étaient soit le vecteur vide Plenti (PV) qui a servi comme contrôle, soit le vecteur codant pour ERR α (200ng) seul, PGC1 α (200ng) seul ou ERR α (200ng) et PGC1 α (200ng) ensemble. Les bases mutées sont surlignées en jaune dans les cadres rouges. Les figures montrent que la mutation du site 1 (ERRE-S1) entraîne une baisse de près de 60% de l'activité luciférase induite par ERR α et PGC1 α , celle du site 2 (ERRE-S2) entraîne une baisse de plus de 70% et la mutation des deux ensemble entraîne une baisse de près de 80%. Par contre, la mutation du troisième site n'entraîne pas de différence significative dans l'activité luciférase du promoteur de l'OPN induite par ERR α et PGC1 α comparée au promoteur non muté. La baisse de l'activité luciférase induite par PGC1 α seul n'est affaiblie que par la mutation du site 2 par rapport aux autres mutations. ERR α seul induit une activité luciférase plus faible par mutation du site 2 par rapport aux mutations des sites 1 et 3. En présence du vecteur PV, On observe une baisse importante de l'activité luciférase de base par mutation des deux premiers sites comparée à la mutation du troisième site. Dans cette expérience, la valeur de l'activité luciférase dans chaque condition a été rapportée à l'activité luciférase induite par le promoteur de l'OPN non muté, en présence de PV seul (colonne en rouge). Cette expérience représente le résultat de trois expériences effectuées trois fois de façon indépendante, chaque fois en triplicata.



6. Recherche de lien direct d'ERR α sur le promoteur de l'OPN par immunoprécipitation de la chromatine dans la lignée HT29.

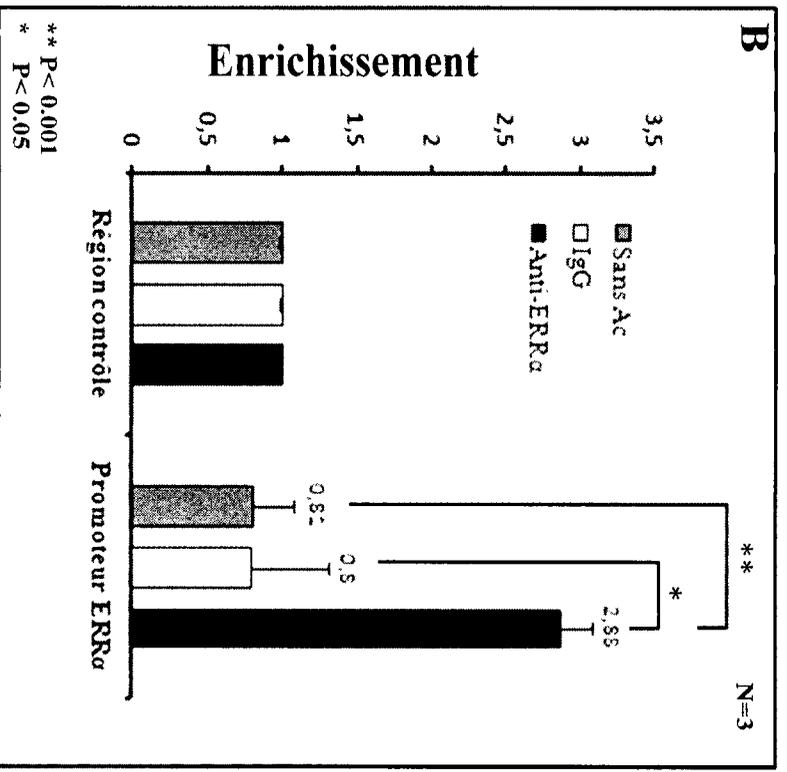
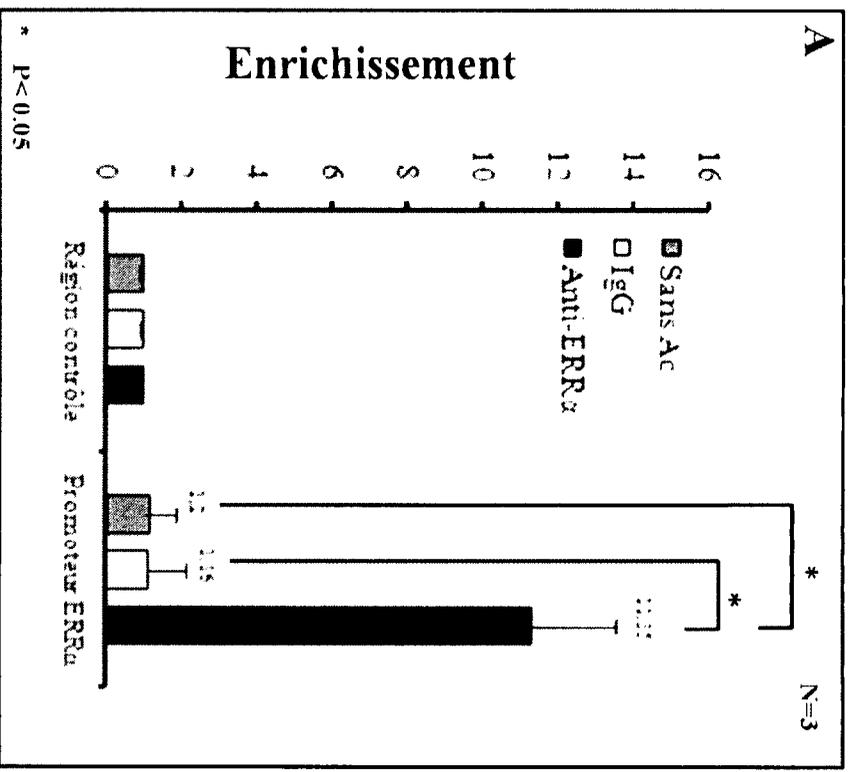
Nous avons démontré, par une stratégie de perte de fonction, qu'il existe une modulation de l'expression de l'OPN par le récepteur nucléaire ERR α dans la lignée tumorale colique HT29 et par mutagenèse dirigée qu'ERR α avec PGC1 α perd l'activation, en essai luciférase, du promoteur de l'OPN avec mutation des sites ERRE-S1 et ERRE-S2. Par la suite, la technique d'immunoprécipitation de la chromatine a été utilisée pour voir, *in vivo* dans la lignée HT29, s'il existe ou non une occupation par ERR α au niveau de la région du promoteur de l'OPN comportant les éléments de réponse ERRE-S1 et ERRE-S2. La région promotrice d'ERR α a été utilisée comme contrôle positif de l'expérience d'immunoprécipitation, car ce récepteur nucléaire possède 3 éléments de réponse complets sur son propre promoteur. Comme contrôle négatif, une région d'ADN ne comportant aucun élément de réponse pour ERR α a été utilisée. Les résultats de PCR montrent qu'il existe un enrichissement de la région promotrice d'ERR α près de 12 fois la région contrôle en utilisant les anticorps anti-ERR α par rapport aux conditions anticorps IgG et sans aucun anticorps (figure 13, A). Ce résultat significatif ($p=0,002$) a permis de valider la partie technique de l'expérience. Pour le promoteur de l'OPN, on a observé un enrichissement de 2,88 fois la région comportant les deux éléments de réponses ERRE-S1 et ERRE-S2 dans la condition ciblant ERR α par rapport aux contrôles avec IgG et sans anticorps (figure 13, B). Ces résultats suggèrent que, dans la lignée tumorale colique HT29, le récepteur nucléaire ERR α occupe la région promotrice de l'OPN comportant les deux éléments de réponse sus cité.

Figure 13. Identification, par immunoprécipitation de la chromatine, de l'occupation du promoteur de l'OPN par $ERR\alpha$ dans la lignée tumorale colique HT29.

L'histogramme en figure A montre l'enrichissement par immunoprécipitation de la chromatine du promoteur d' $ERR\alpha$, comportant trois éléments de réponse pour $ERR\alpha$, rapporté à la quantité de chromatine d'une région contrôle ne comportant pas d'élément de réponse pour ce récepteur nucléaire. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre $ERR\alpha$ (colonnes noires) entraîne un enrichissement du promoteur d' $ERR\alpha$ près de 12 fois supérieure à la région contrôle. Il n'y a pas de différence d'enrichissement entre ces deux régions d'ADN quand l'immunoprécipitation se fait avec un anticorps non spécifique IgG (colonnes en blanc) ou en l'absence d'anticorps (colonnes en gris).

L'histogramme en figure B, utilisant les mêmes échantillons qu'en A, montre l'enrichissement par immunoprécipitation de la chromatine d'un segment du promoteur de l'OPN (comportant les deux éléments de réponse ERRE-S1 et ERRE-S2) rapporté à la quantité de chromatine d'une région contrôle ne comportant pas d'élément de réponse pour $ERR\alpha$. Nous observons un enrichissement de la région promotrice de l'OPN (plus de 2,5 fois) dans les échantillons immunoprécipités par un anticorps dirigé contre $ERR\alpha$, alors qu'il n'y a pas d'enrichissement dans les échantillons comportant les anticorps IgG ou sans anticorps.

Ce résultat représente la moyenne de trois expériences indépendantes, et les qPCR ont été effectués en triplicata.



IV- DISCUSSION

1. Corrélation et profils d'expression de l'OPN et d'ERR α dans le cancer colorectal.

Le récepteur nucléaire orphelin ERR α , membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, est rapidement surexprimé dans de nombreux tissus à forte demande en énergie dont le cœur, le muscle squelettique et le foie en réponse à des situations de stress comme le froid ou le jeûne (Villena JA et al, 2008). Il agit alors comme un activateur transcriptionnel de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et les fonctions mitochondriales. Il est rapporté qu'une forte expression d'ERR α est associée à un mauvais pronostic dans le cancer de l'ovaire (Fujimoto et al, 2007) et du sein (Suzuki et al, 2004). Du point de vue moléculaire, les données récentes suggèrent qu'ERR α joue un rôle dans la croissance tumorale et la division cellulaire dans le CCR (Bernadchez et al, en préparation) et dans le cancer du sein (Stein et al, 2008). Ce récepteur nucléaire est également exprimé dans le tissu osseux où il contribue à la différenciation des ostéoblastes et au remodelage osseux. L'inhibition de l'expression d'ERR α entraîne une importante baisse de l'expression de l'OPN dans ces cellules (Delhon et al, 2009). L'ostéopontine, une glycoprophosphoprotéine non collagénique de la matrice extracellulaire, est bien connue pour son rôle dans la minéralisation osseuse mais aussi comme marqueur de progression tumoral de nombreux cancers (Furger et al, 2001) dont le cancer colorectal (Timothy J et al, 2003). Ces évidences suggèrent qu'ERR α pourrait jouer un rôle dans la progression du CCR par la modulation de l'expression de l'OPN.

Dans mon projet, j'ai commencé par analyser l'expression de ces deux protéines dans un échantillon de 85 adénocarcinomes et 8 adénomes colorectaux ainsi que les marges de résection correspondantes. Une MMT a été confectionnée dans le but d'uniformiser les conditions de l'immunohistochimie. Chaque section de tissu avait une surface d'environ 3,14 mm², ce qui était suffisant pour examiner le marquage d'un grand nombre de cellules tumorales. J'ai donc réalisé la première étude immunohistochimique de l'expression d'ERR α dans le cancer colorectal sur MMT. Un faible marquage nucléaire et uniforme d'ERR α a été observé dans les 8 adénomes, alors que ce marquage était de faible à très forte intensité dans les tumeurs. Seulement 4 tumeurs n'exprimaient pas ERR α .

L'expression faible dans les adénomes suggère qu'ERR α n'aurait pas d'effet majeur dans la dysplasie colorectale. Un marquage cytoplasmique était présent seulement dans les tumeurs exprimant fortement ERR α au niveau nucléaire reflétant donc soit une production accrue soit une baisse de la dégradation de ce récepteur au niveau du cytoplasme des cellules tumorales. Une seule étude avait montré une localisation seulement péri nucléaire et cytoplasmique d'ERR α dans 62% des adénocarcinomes mammaires analysés (Jarzabek et al, 2009). Une autre étude avait montré qu'ERR α était exprimé dans 55% des adénocarcinomes mammaires (Suzuki et al, 2004). Dans cette étude, l'expression par rapport au tissu sain n'a pas été étudiée en immunohistochimie. Nous avons observé une augmentation de l'expression de ce récepteur dans 61,2 % des adénocarcinomes par rapport à la marge de résection correspondante alors qu'il n'y avait pas de différence dans son expression entre le tissu non tumoral et l'adénome. Le score médian du marquage d'ERR α dans la tumeur était le double dans les tumeurs par rapport au score médian des tissus contrôles ($p < 0,001$). De façon intéressante, le marquage d'ERR α était également observé dans le stroma tumoral, notamment les noyaux des cellules inflammatoires, des fibroblastes et des cellules endothéliales. Son expression dans les macrophages peut s'expliquer par son rôle potentiel dans la défense immunitaire par l'induction de l'expression de l'IFN γ , résultant en une production accrue de radicaux libres (ROS) impliqués dans la défense contre les agents pathogènes (Giguère, 2008). En situation cancéreuse, il est possible que la présence de macrophages dans le tissu tumoral représente une réponse immunitaire à l'invasion des cellules tumorales.

La plupart des études publiées sur l'expression d'ERR α ont porté sur les niveaux de son messager et ont montré une discrète augmentation de ce messager dans le cancer du sein (Suzuki et al, 2004) et dans le CCR (Cavallini et al, 2005) par rapport au tissu non tumoral. Cavallini et son équipe ont montré que l'expression d'ERR α augmente avec le stade TNM du CCR, mais seulement du stade II au stade IV. Nous n'avons pas observé cette association dans notre étude immunohistochimique. Il est à noter que l'étude du messager d'ERR α , bien qu'elle soit plus précise en PCR quantitatif, reflète son expression dans tout le tissu tumoral y compris les cellules du stroma et peut inclure également du tissu épithélial non tumoral adjacent à la tumeur mais aussi du tissu non épithélial comme les cellules musculaires, inflammatoires et vasculaires. Par contre, l'étude

immunohistochimique que nous avons réalisé n'a tenu compte que du marquage d'ERR α dans les cellules épithéliales tumorales par rapport aux cellules non tumorales. Cela peut expliquer la différence entre nos résultats et ceux de Cavallini, bien que les deux études soient en un sens complémentaires.

L'OPN a été observée au niveau cytoplasmique et membranaire avec un score d'expression de 1,5 ($p < 0.001$) par rapport à un score de 1 pour son expression dans le tissu non tumoral. Cette augmentation était présente dans 58,8% des tumeurs par rapport au tissu non tumoral correspondant, alors qu'il n'y avait pas de différence dans l'expression de cette protéine dans les 8 adénomes étudiés par rapport au tissu non tumoral. Le résultat observé pour les adénomes rejoint celui constaté pour l'expression d'ERR α . L'expression cytoplasmique reflèterait la production de l'OPN alors que sa présence au niveau membranaire est en rapport avec son activité paracrine et autocrine et le siège membranaire de ses récepteurs exprimés dans le CCR (intégrines et CD44). Une étude rapporte, sur une série de 303 tissus montés sur MMT (185 tumeurs, 67 adénomes et 51 tissus sains), que l'OPN était exprimée dans 95% des tumeurs en corrélation avec le stade d'Astler Collier, alors qu'elle ne l'était pas dans 92,2% des tissus sains (Agrawal et al, 2002). Une troisième étude qui avait porté cette fois sur de nombreux types de cancer, rapporte un marquage positif de l'OPN dans 85% des 20 adénocarcinomes colorectaux étudiés (Coppola et al, 2004). Dans notre série nous avons comparé l'expression protéique de l'OPN dans chaque tissu tumoral par rapport au tissu non tumoral du même patient, alors que dans les études sus mentionnées les échantillons n'ont pas été comparés au tissu sain apparié. Dans notre série, nous avons démontré que l'OPN augmente dans le cancer, plus forte intensité, par rapport au tissu non tumoral apparié mais sans corrélation avec le stade tumoral.

Dans notre série l'OPN et ERR α étaient faiblement exprimés dans les adénomes sans augmentation notable par rapport au tissu sain correspondant. Ce résultat suggère que ces deux protéines n'ont pas de rôle ou joueraient un rôle minime dans l'état dysplasique et auraient une action plus importante quand les cellules atteignent l'état cancéreux. Une étude immunohistochimique sur un échantillon plus large incluant différents types

d'adénome pourrait apporter plus de renseignement sur l'expression de l'OPN et d'ERR α dans les adénomes colorectaux.

Nos résultats suggèrent que l'expression de l'OPN concorde avec celle d'ERR α dans 55% des 85 adénocarcinomes étudiés en immunohistochimie sur MMT. 40% des tumeurs montrait une augmentation synergique de l'expression de l'OPN et d'ERR α dans les tissus tumoraux. Dans 21% des tumeurs, la surexpression d'ERR α n'était pas associée à une surexpression de l'OPN, alors que dans 15% des tumeurs l'augmentation de l'OPN ne l'était pas avec celle d'ERR α . Ces évidences suggèrent donc qu'ERR α serait un des régulateurs transcriptionnels de l'expression de l'OPN dans le CCR et que d'autres facteurs peuvent intervenir dans la régulation de son expression. En effet, il est bien connu que l'expression de l'OPN est sous le contrôle du facteur de transcription TFC4 (El-Tanani et al, 2004) qui est une cible de la β -caténine dans la voie Wnt, une voie majeure dans le CCR. ERR α pourrait aussi subir une compétition par d'autres récepteurs nucléaires comme PPAR γ dont l'expression serait associée à un bon pronostic dans le CCR (Ogino et al, 2009). D'autre part, l'OPN pourrait subir une dégradation ou une sécrétion extracellulaire accrue, ce qui refléterait une faible quantité intracellulaire de cette protéine.

Malgré le fait que l'expression d'ERR α et de l'OPN augmente dans l'adénocarcinome par rapport au tissu sain, nous n'avons pas observé, par immunohistochimie, de corrélation dans l'expression de ces deux protéines avec le stade TNM. L'expression d'ERR α au niveau protéique, en fonction du stade tumoral du CCR, n'a pas été rapportée dans la littérature. Pour le messager de ce récepteur nucléaire, une seule équipe rapportait une augmentation seulement entre les stades II et IV du cancer colorectal (Cavallini et al, 2005). L'expression de l'OPN corrélant avec le stade tumoral était rapportée dans la littérature au niveau messager par plusieurs auteurs (Agrawal et al, 2002, Likui et al, 2009, Rohde, 2007) alors que la corrélation au niveau protéique par IHC n'a été rapportée que par Agrawal (Agrawal et al, 2002). Dans cette étude, les échantillons ont été comparés à des tissus sains non appariés alors que dans notre série chaque échantillon était comparé au tissu de la marge de résection correspondante. La classification utilisée dans la série d'Agrawal est celle d'Astler Collier alors que la

stadification TNM de l'OMS a été utilisée dans notre série. La taille de l'échantillon peut être un facteur limitant dans notre étude car la plupart des tumeurs étaient de stade 2 et 3 et il n'y avait que 13 tumeurs de stade 4 et 8 de stade 1. Une étude sur un nombre plus important de tumeurs colorectales pourrait résoudre cette limitation.

La taille des prélèvements de la banque des tissus peut constituer un autre facteur limitant dans notre étude. En effet, ces prélèvements sont effectués sur la tumeur à l'état frais et ont toujours une taille beaucoup plus petite par rapport à la taille totale de la tumeur. Ces prélèvements sont souvent pratiqués à la surface de la muqueuse, qui comporte souvent une zone d'adénome résiduel ou de carcinome intra muqueux, et ratent souvent les zones profondes où se trouve la composante la plus invasive de la tumeur. Toutes ces limitations font que les échantillons de la banque des tissus peuvent ne pas être représentatifs de toute la tumeur. D'autre part, il est bien connu que la cellule peut exprimer des gènes différents en fonction de sa différenciation mais aussi du micro environnement et selon qu'il s'agisse de cellules dysplasiques, de carcinome in situ, invasif ou de cellules du front d'invasion. $ERR\alpha$ et l'OPN, de part leur rôle dans la progression tumorale, peuvent être parmi ces gènes. Une étude sur des sections de tumeur plus larges, incluant toute l'épaisseur de la tumeur et le front d'invasion, et donc plus représentatifs de la différenciation et du stade tumoral apporterait probablement plus d'information sur l'expression de nombreuses protéines dont $ERR\alpha$ et l'OPN. Une autre stratégie par microdissection laser permettrait aussi une analyse sélective de cette différence d'expression au niveau messager.

Nos résultats d'immunohistochimie montrent une corrélation entre l'expression protéique d' $ERR\alpha$ et de l'OPN et suggèrent donc que le récepteur nucléaire $ERR\alpha$ serait un des modulateurs transcriptionnels de l'expression de l'OPN dans le cancer colorectal.

2. Modulation de l'expression de l'OPN par ERR α dans la lignée tumorale colique HT29

Afin de supporter nos résultats d'immunohistochimie, nous avons étudié la régulation de l'expression de l'OPN par ERR α dans un modèle de lignée tumorale colique. Nous avons observé que l'inhibition de l'expression d'ERR α dans la lignée HT29 entraîne une baisse significative de l'expression de l'OPN au niveau messager et en protéine. Ce résultat suggère donc un rôle, direct ou indirect, d'ERR α dans l'expression de l'OPN dans cette lignée tumorale. La seule étude rapportant des constatations similaires à nos résultats l'avait montré dans la lignée macrophagique non tumorale dérivée des ostéoclastes de souris RAW264.7, après infection de ces cellules par un siRNA dirigé contre ERR α ou par la compétition d'un dominant négatif ne comportant pas le domaine AF2 de transactivation, ERR α Δ AF2 (Bonnelye et al, 2010). Cet effet était accompagné d'une baisse de l'expression de la sous unité β 3 des intégrines, un des récepteurs membranaires de l'OPN, d'une désorganisation du cytosquelette d'actine et d'une baisse de l'adhésion et la migration de ces cellules. Dans le modèle tumoral, les résultats de notre laboratoire suggèrent que la répression d'ERR α entraîne une baisse de la croissance en indépendance d'ancrage des cellules HT29, HCT116 et DLD1 (Bernatchez et al, en préparation). L'injection sous cutanée aux souris CD1 immunodéficientes de cellules HCT116 infectées par un lentivirus médiant l'expression d'un shARN ciblant ERR α entraîne la formation de tumeurs de plus petite taille par rapport aux cellules HCT116 infectées par un lentivirus médiant un shARN contrôle (Bernatchez et al, en préparation). Une étude avait rapporté, dans le même type d'expérience de xénogreffe, que les cellules tumorales gastriques SGC7901 exprimant fortement l'OPN forment des tumeurs plus grandes par rapport aux cellules qui en expriment moins, suggérant donc un rôle de l'OPN dans la croissance tumorale (Gang et al, 2008). Le rôle d'ERR α dans la croissance tumorale colorectale pourrait donc, en partie, être médié par l'augmentation de l'expression de l'OPN. Par exemple, un ajout de l'OPN recombinante dans le milieu de culture résulterait en une reprise de fonctions perdues par l'inhibition de l'expression d'ERR α . Des investigations supplémentaires sur l'effet d'ERR α sur le comportement des cellules tumorales coliques apporteraient d'autres informations sur l'implication d'ERR α dans la progression tumorale à travers ses différentes cibles dont l'OPN. Néanmoins, la réduction de l'expression de

l'OPN suite à la diminution de l'expression d'ERR α suggère une régulation transcriptionnelle de l'OPN par ERR α dans le CCR.

3. Effet d'ERR α sur l'activité du promoteur de l'OPN :

Suite à nos résultats, montrant une régulation de l'expression de l'OPN par ERR α dans un modèle de lignée tumorale colique, nous avons étudié le contrôle du promoteur de l'OPN par ce récepteur nucléaire. Les résultats de nos expériences ont montré que le récepteur nucléaire orphelin ERR α , en présence de son coactivateur préféré PGC1 α , entraîne une activation dose dépendante du promoteur humain de l'OPN. Cet effet était de deux fois et demi plus élevé en activité luciférase par rapport au vecteur vide (PV) lorsque le rapport activateurs (ERR α et PGC1 α)/rapporteur (OPN-Luc) était 1/1. L'effet était 4 fois le vecteur PV quand le rapport était de 2/1 et de 10 fois quand le rapport était de 4/1. Cet effet dose dépendant a été aussi observé dans la lignée tumorale osseuse ROS 17/2.8 de rat (Vanacker et al, 1998), où la transfection d'un ERR α de souris seul avait un effet significatif sur le promoteur de l'OPN de souris seulement à partir d'un rapport activateur/rapporteur de 5/1. Cet effet était seulement de 5 fois le contrôle au rapport de 10/1. Dans notre expérience ERR α seul n'avait pas d'effet sur l'activité luciférase couplée au promoteur humain de l'OPN même au rapport activateur/rapporteur de 4/1, alors que l'ajout de PGC1 α entraîne une augmentation de l'activité luciférase même à un rapport activateur/rapporteur de 1/1. Ce résultat s'explique par le fait que l'activité d'ERR α , en l'absence d'un ligand connu, est fortement liée à la disponibilité de ses coactivateurs. PGC1 α possède 3 motifs LXXLL, dont un est spécifiquement dédié à l'interaction avec ERR α (Schreiber et al 2003, Huss et al 2002). PGC1 α peut donc potentialiser l'effet de ce récepteur nucléaire sur ses cibles, dont l'OPN, mais aussi augmenter son expression par boucle d'autocontrôle positif puisque le promoteur d'ERR α possède trois éléments de réponse pour ERR α . PGC1 α , comme son nom l'indique (peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 α) coactive le récepteur nucléaire PPAR γ . Ce dernier est rapporté comme facteur de bon pronostic dans le CCR (Ogino et al, 2009), bien que des études

expérimentales cellulaires et animales n'aient pas toujours confirmé son rôle anti tumoral. Son ligand, la troglitazone, est rapporté comme répresseur de l'expression de l'OPN dans la lignée monocyttaire leucémique humaine THP-1 (Oyama et al, 2002). Ainsi, il est peu probable que l'induction de l'activité luciférase sous le contrôle du promoteur de l'OPN en présence de PGC1 α seul résulte d'une coactivation de PPAR γ par PGC1 α ou une compétition entre ERR α et PPAR γ pour le recrutement de PGC1 α . PGC1 α coactive d'autres récepteurs nucléaires tel que PPAR α , ER α , le récepteur des glucocorticoïdes (GR), LXR α (liver X receptor), le récepteur de l'acide rétinoïque RXR α , les récepteurs des hormones thyroïdiennes (Puigserver et Spiegelman, 2003), et FXR (farnesoid X receptor) (Zhang et al, 2004). En fait, la séquence du promoteur humain de l'OPN qu'on a étudié comporte également un élément de réponse imparfait pour le récepteur GR, pour PPAR γ et pour ER α mais aucun pour les autres récepteurs sus cités. Le fait que l'inhibition de l'expression d'ERR α par un shARN interférant ou son inactivation par son agoniste inverse spécifique, le XCT790, entraînait une baisse significative de l'activité du promoteur de l'OPN suggère, dans ce contexte, que PGC1 α coactive ERR α et non ER α ou le récepteur aux glucocorticoïdes.

4. Analyse des éléments de réponse pour ERR α sur le promoteur de l'OPN.

L'élément de réponse pour le récepteur nucléaire ERR α a été initialement identifié dans la région promotrice du gène MCAD (Sladek et al, 1997) et du gène de la lactoferrine (Zhang et Teng, 2000). Il s'agit de la séquence consensus ou l'hémi-site TNAAGGTCA nommée ERRE. La séquence AGGTCA représente l'élément commun entre la plupart des récepteurs nucléaires. ERR α lie cette séquence lorsqu'elle est précédée des trois bases TNA, où le N peut représenter n'importe quelle base. ERR α présente une forte homologie de séquence dans le DBD avec le récepteur à l'estrogène ER α . Ce dernier lie une séquence de type IR3 (répétition inverse 3) $\overleftarrow{\text{TGACCT}}\text{Nnn}\overrightarrow{\text{AGGTCA}}$ nommée ERE, où les trois N peuvent être n'importe quelle base. ERR α peut donc lier un site ER α parfait ou incomplet. Il est rapporté également qu'ER α peut lier seulement un demi-site, et donc possiblement lier un site ERRE. L'analyse bioinformatique du promoteur humain de l'OPN (les 1000

paires de bases qu'on a étudié) a montré qu'il existe trois éléments de réponse imparfaits pour $ERR\alpha$. Il s'agit d'ERRE-S1 ; TGACCTAGG (ou CCTAGGTCA), ERRE-S2 ; CACAGGTCA et ERRE-S3 TAAAGGACA. Pour $ERR\alpha$ de souris, 25 séquences différentes ont été analysées dans l'étude ayant déterminé la séquence consensus sur le promoteur du gène MCAD (Sladek et al, 1997) afin de caractériser les bases composant l'élément ERRE. La première base était une thymidine (T) dans 15 séquences sur 25, la deuxième ne correspondait pas à une base particulière (N) et la troisième base était une adénine dans 16 séquences parmi 25. La séquence AGGTCA était présente dans 23 des 25 séquences étudiées. L'étude du promoteur humain de l'ostéopontine démontre que ERRE-S1 et ERRE-S2 possèdent la séquence AGGTCA parfaite alors que ERRE-S3 ne la possède pas. Par contre, les trois premières bases précédant la séquence AGGTCA étaient CCT pour ERRE-S1 et CAC pour ERRE-S2, alors que pour ERRE-S3 ces bases étaient TNA, identiques à celle de la séquence consensus. La séquence AGGTCA semble être essentielle à la liaison avec $ERR\alpha$ puisque nos résultats de mutagenèse montraient, en essai luciférase, qu'il n'y avait pas de différence significatives dans l'activité du promoteur de l'OPN non muté et le promoteur muté pour ERRE-S3. L'analyse bioinformatique a montré que la séquence TAAAGGACAGAGGCAAG comportant le site ERRE-S3 peut être un élément imparfait pour $PPAR\gamma$. La séquence AGGTCA_nAGGTCA est l'élément de réponse complet pour ce récepteur qui doit hétérodimériser avec le récepteur nucléaire RXR pour activer ses cibles. $PPAR\gamma$ est rapporté associé à un bon pronostic dans le CCR (Ogino et al, 2009). En présence de son ligand, la troglitazone, il entraîne une baisse de l'expression de l'OPN dans la lignée leucémique humaine THP-1 (Oyama et al, 2002). La régulation directe ou indirecte de l'expression de l'OPN par $PPAR\gamma$ n'est pas encore connue. Avec ces constatations, des études supplémentaires du promoteur de l'OPN pourraient démontrer que $PPAR\gamma$ aurait une action anti tumorale par la régulation de l'expression de l'OPN. Le site ERRE-S3 ne serait donc pas un élément de réponse pour $ERR\alpha$ car cet élément de réponse ne comporte pas la séquence AGGTCA complète. Cette séquence est bien présente dans les sites ERRE-S1 et ERRE-S2. De ce fait, la mutation de ces deux sites a induit une baisse importante de l'activité luciférase de plus de 70% par rapport au promoteur non muté de l'OPN. De plus, on note une légère réduction de l'activité luciférase de base, possiblement liée à la présence endogène d' $ERR\alpha$ et de

PGC1 α dans les cellules 293T. Le site ERRE-S1 sur le promoteur de l'OPN chevauche avec la séquence cctAGGTCAatggGGtttt qui comporte, selon Matinspector (Genomatix.de) un élément de réponse imparfait pour les ERs. Comme nous avons muté la séquence AGGTCA présente dans le site ERRE-S1, empêchant donc toute liaison à un récepteur nucléaire, il est peu probable qu'un ER se lierait à cette séquence. PGC1 α coactive aussi ER α (Tiraby et al, 2005) et ER α peut se lier sur un élément ERRE, mais il n'y a pas d'élément de réponse complet pour ER α sur la séquence du promoteur de l'OPN qu'on a étudiée. Dans nos expériences, la mutation du site ERRE-S1 entraîne une activité luciférase plus faible, en présence d'ERR α et de PGC1 α , par rapport au promoteur non muté, alors qu'il n'y a aucun changement en présence de PGC1 α seul, vraisemblablement par coactivation d'un ERR α endogène sur le site ERRE-S2 non muté. ERRE-S1 ne serait donc pas l'élément de réponse principale pour ERR α .

A l'encontre du site ERRE-S1, la mutation du site ERRE-S2 entraîne une baisse de l'activité luciférase par rapport au promoteur non muté en présence de PGC1 α seul ou avec ERR α . Le site ERRE-S1 ne semble donc pas être aussi fort pour palier à la baisse de l'activité du promoteur de l'OPN suite à la mutation de l'élément de réponse ERRE-S2. La mutation conjointe de ces deux éléments de réponse n'entraîne pas un effet significativement plus fort par rapport à la mutation du site ERRE-S2 seul. Ces deux éléments de réponse ne sont séparés que par 80 paires de bases, suggérant une possible coordination entre ces deux récepteurs dans l'activation du promoteur de l'OPN par ERR α . ERRE-S2 représente aussi un élément de réponse incomplet sur lequel peut se lier le récepteur à la vitamine D (VDR), RXR et PPAR γ (Matinspector, genomatix.de). PGC1 α n'est pas connu comme un coactivateur de VDR. L'effet observé (augmentation de l'activité luciférase avec PGC1 α seul) ne serait pas en rapport avec PPAR γ , car ce dernier entraînerait plutôt une baisse de l'activité du promoteur de l'OPN. Tenant en compte les résultats de mutagenèses, nous suggérons que le récepteur nucléaire ERR α lie ERRE-S2 et que le site ERRE-S1 est important pour potentialiser l'effet d'ERR α sur la régulation de l'activité du promoteur de l'OPN.

Il est à noter que les essais promoteur gène rapporteur sont effectués en condition de surexpression et les résultats peuvent donc être différents par rapport aux conditions physiologiques. En effet, la séquence d'ADN insérée dans le vecteur plasmidique et utilisée pour les essais luciférase n'a pas la même configuration tridimensionnelle que l'ADN génomique et ne comporte pas certains éléments de la chromatine comme les histones dont la méthylation et l'acétylation peuvent jouer un rôle dans l'accessibilité des facteurs de transcription à la région promotrices des différents gènes. Une étude récente avait démontré que l'activité du promoteur de l'OPN peut être réprimée par le TSA (Trichostatin), un puissant inhibiteur de la déacétylation des histones, dans la lignée HeLa de cancer du col de l'utérus (Priyanka et al, 2010). Cet inhibiteur agit en tant que répresseur de l'acétylation des histones H3 et H4 réduisant ainsi le recrutement de composants du complexe d'initiation de la transcription (ARN polymérase II). Il entraîne également une diminution de l'expression de c-jun et d'AP1, facteurs qui augmentent l'expression de l'OPN. C'est pour cette raison que nous avons évalué l'occupation par $ERR\alpha$ de segments du promoteur de l'OPN, dans la lignée HT29 par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine. Ces évidences peuvent expliquer, au moins en partie, le fait que l'enrichissement de fragments du promoteur de l'OPN, incluant ERRE-S1 et ERRE-S2, immunoprécipités par l'anticorps anti $ERR\alpha$ soit seulement de 2,88 fois la condition contrôle, alors que l'enrichissement de fragments de la région promotrice d' $ERR\alpha$, comportant trois ERRE parfaits, est de 11 fois par rapport à la condition d'immunoprécipitation contrôle. L'expérience de CHIP ne peut à elle seule confirmer l'occupation *in vivo* d' $ERR\alpha$ sur le site ERRE-S1 versus ERRE-S2 ou même ERRE-S3, car les deux premiers éléments ne sont séparés que par 80 paires de bases et moins de 200 paires de bases séparent ERRE-S2 de ERRE-S3. La sonication de l'ADN pour l'expérience de CHIP ne peut générer des fragments plus petits que 300 paires de bases. Par contre, ces expériences confirment qu' $ERR\alpha$ occupe bien le promoteur de l'OPN dans la lignée tumorale colique HT29. De plus, les données de la mutagenèse démontrent qu' $ERR\alpha$ lie le promoteur de l'OPN sur le site ERRE-S2 et sur le site ERRE-S1. Le caractère incomplet des sites ERRE-S2 et ERRE-S1 pour $ERR\alpha$ et le résultat de l'expérience de CHIP suggèrent qu' $ERR\alpha$ ne serait pas le seul régulateur transcriptionnel de l'expression de l'OPN dans le cancer colorectal. En effet, d'autres facteurs de

transcription pourraient jouer un rôle synergique avec $ERR\alpha$. D'une part, dans la lignée tumorale mammaire RAMA 37 de souris, la β -caténine est connue pour coopérer avec Tcf-Lef afin d'activer le promoteur de l'OPN (El-Tanani et al, 2004). D'autre part, une publication récente rapporte qu' $ERR\alpha$ interagit avec le complexe β -caténine-Tcf-4 pour augmenter l'expression du facteur WNT11 dans la lignée tumorale mammaire MDA-MB-231 (Dwyer et al, 2010). $ERR\alpha$ pourrait donc collaborer avec la voie de signalisation Wnt/ β -caténine à l'activation du promoteur de l'OPN dans la lignée tumorale colique HT29. Une autre étude récente a montré que le complexe β -caténine-Tcf-4 favorise l'invasion des cellules de la lignée tumorale mammaire MDA-MB-231 via la régulation de l'expression de l'OPN (Ravindranath et al, 2011). Les auteurs ont montré que le site Tcf-4 est situé entre -2142 et -2126 en amont du site d'initiation de la transcription, et donc au-delà des 1000 paires de bases étudiées. Ce site est donc à 1084 bases en amont du site ERRE-S1 et à 1264 bases d'ERRE-S2. En tenant compte de ces données, le fait que la voie Wnt/ β -caténine soit active dans la lignée adénocarcinomeuse colique HT29 par mutation d'APC, et que $ERR\alpha$ lie le complexe β -caténine-Tcf-4 pour induire l'expression du facteur WNT11, on ne peut écarter, dans une conformation tridimensionnelle de l'ADN, l'existence d'une coordination entre $ERR\alpha$ et le complexe β -caténine-Tcf-4 sur le promoteur humain de l'OPN pour induire l'expression de cette protéine qui joue un rôle non négligeable dans la progression du cancer colorectal. Des expériences supplémentaires pourraient démontrer l'existence de ce lien.

V- Conclusions et perspectives:

Dans cette étude nous avons observé une expression immunohistochimique nucléaire d' $ERR\alpha$ et cytoplasmique de l'OPN dans la quasi-totalité des tumeurs colorectales. Les deux protéines étaient augmentées dans plus de la moitié des adénocarcinomes colorectaux par rapport au tissu de la marge de résection sans corrélation avec le stade TNM des tumeurs colorectales. L'expression de l'OPN était concordante avec celle d' $ERR\alpha$ dans 55% des cas avec une augmentation synergique des deux protéines dans 40% des adénocarcinomes. Une analyse sur un échantillon plus grand pourrait apporter des résultats supplémentaires sur le profil d'expression de ces deux protéines en fonction du stade et du

grade des tumeurs, qui jouent l'une comme l'autre des rôles importants dans la progression du cancer colorectal. Dans le modèle de lignée cellulaire colique adénocarcinomateuse HT29, nous avons démontré qu'ERR α module l'expression de l'OPN par liaison directe sur le promoteur de cette protéine. Nous avons identifié deux éléments de réponse qu'on a appelé ERRE-S1 et ERRE-S2 sur lesquels ERR α , coactivé par PGC1 α , se lie pour activer le promoteur de l'OPN. Le deuxième site serait le principal élément de réponse potentialisé par le premier. Non loin des sites que nous avons identifié, la région promotrice de l'OPN comporte un élément de réponse pour Tcf-4, qui est une cible de la β -caténine dans la voie Wnt, voie importante dans la carcinogenèse colorectale. Des études supplémentaires pourraient apporter des informations plus complètes sur l'expression d'ERR α , de la β -caténine et de l'OPN dans le cancer colorectal mais aussi identifier le lien entre ERR α et le complexe β -caténine–Tcf-4 dans la régulation de l'activité du promoteur de l'OPN.

VI- Remerciements :

Je tiens à remercier tout d'abord mes directeurs de recherche, Pr Julie Carrier et Pr Jean-François Beaulieu pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de travailler sur un projet très intéressant. Je les remercie pour leur aide et pour leurs précieux conseils qui ont été pertinents pour mener à terme mon projet de recherche. Je remercie également tout les membres des deux laboratoires pour leur disponibilité, leurs commentaires et suggestions.

J'exprime toute ma gratitude envers mon père, que Dieu agrée son âme, et ma mère qui ont beaucoup donné et sacrifié tout au long de mes études mais également pour leur présence, malgré l'éloignement, et leur soutien inconditionnel. Je remercie également ma femme Chahrazed, qui a embarqué dans ma vie durant ma maîtrise, pour sa présence et son soutien pour arriver à bon port.

Je remercie également Pr Caroline Saucier et Pr Benoît Paquette pour avoir accepté de réviser mon mémoire.

VII- Bibliographie :

Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D, Yeatman TJ. Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Apr 3;94(7):513-21.

American Joint Committee on Cancer, 2009. Colon and Rectum Cancer Staging. <http://www.cancerstaging.org/staging/index.html>

Association canadienne du cancer colorectal (<http://www.colorectal-cancer.ca/fr/les-faits-detour/statistiques/>).

Bellahcène A, Castronovo V, Ogbureke KU, Fisher LW, Fedarko NS. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008 Mar;8(3):212-26.

Bianco S, Lanvin O, Tribollet V, Macari C, North S, Vanacker JM. Modulating estrogen receptor-related receptor- α activity inhibits cell proliferation. *J Biol Chem.* 2009 Aug 28;284(35):23286-92.

Bonnelye E, Saltel F, Chabadel A, Zirngibl RA, Aubin JE, Jurdic P. Involvement of the orphan nuclear estrogen receptor-related receptor α in osteoclast adhesion and transmigration. *J Mol Endocrinol.* 2010 Dec;45(6):365-77.

Bosset Jf et Rouanet p, 2005. polycopie national de cancerologie. <http://www.umvf.org/>

Briese J, Cheng S, Ezzat S, Liu W, Winer D, Wagener C, Bamberger AM, Asa SL. Osteopontin (OPN) expression in thyroid carcinoma. *Anticancer Res.* 2010 May;30(5):1681-8.

Busch BB, Stevens WC Jr, Martin R, Ordentlich P, Zhou S, Sapp DW, Horlick RA, Mohan R. Identification of a selective inverse agonist for the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor α . *J Med Chem.* 2004 Nov 4;47(23):5593-6.

Castet, A. et al. (2006) Receptor-interacting protein 140 differentially regulates estrogen receptor-related receptor transactivation depending on target genes. *Mol. Endocrinol.* 20, 1035–1047

Cavallini A, Notarnicola M, Giannini R, Montemurro S, Lorusso D, Visconti A, Minervini F, Caruso MG. Oestrogen receptor-related receptor α (ERR α) and oestrogen receptors (ER α and ER β) exhibit different gene expression in human colorectal tumour progression. *Eur J Cancer.* 2005 Jul;41(10):1487-94.

- Chabas D. Osteopontin, a multi-faceted molecule. *Med Sci (Paris)*. 2005 Oct;21(10):832-8.
- Chen JD et Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, 1995. 377(6548): p. 454-7.
- Chisamore MJ, Cunningham ME, Flores O, Wilkinson HA, Chen JD. Characterization of a novel small molecule subtype specific estrogen-related receptor alpha antagonist in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One*. 2009 May 20;4(5):e5624.
- Cho H, Hong SW, Oh YJ, Kim MA, Kang ES, Lee JM, Kim SW, Kim SH, Kim JH, Kim YT, Lee K. Clinical significance of osteopontin expression in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 Aug;134(8):909-17.
- Coppola D, Szabo M, Boulware D, Muraca P, Alsarraj M, Chambers AF, Yeatman TJ. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies. *Clin Cancer Res*. 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):184-90.
- Dai J, Li B, Shi J, Peng L, Zhang D, Qian W, Hou S, Zhao L, Gao J, Cao Z, Zhao J, Wang H, Guo Y. A humanized anti-osteopontin antibody inhibits breast cancer growth and metastasis in vivo. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Mar;59(3):355-66.
- Dai J, Peng L, Fan K, Wang H, Wei R, Ji G, Cai J, Lu B, Li B, Zhang D, Kang Y, Tan M, Qian W, Guo Y. Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells. *Oncogene*. 2009 Sep 24;28(38):3412-22.
- Das R, Philip S, Mahabeleshwar GH, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: its role in regulation of cell motility and nuclear factor kappa B-mediated urokinase type plasminogen activator expression. *IUBMB Life*. 2005 Jun;57(6):441-7.
- Deblois G, Hall JA, Perry MC, Laganière J, Ghahremani M, Park M, Hallett M, Giguère V. Genome-wide identification of direct target genes implicates estrogen-related receptor alpha as a determinant of breast cancer heterogeneity. *Cancer Res*. 2009 Aug 1;69(15):6149-57.
- Delhon I, Gutzwiller S, Morvan F, Rangwala S, Wyder L, Evans G, Studer A, Kneissel M, Fournier B. Absence of estrogen receptor-related-alpha increases osteoblastic differentiation and cancellous bone mineral density. *Endocrinology*. 2009 Oct;150(10):4463-72.
- Du XL, Jiang T, Sheng XG, Gao R, Li QS. Inhibition of osteopontin suppresses in vitro and in vivo angiogenesis in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2009 Dec;115(3):371-6.

Dwyer MA, Joseph JD, Wade HE, Eaton ML, Kunder RS, Kazmin D, Chang CY, McDonnell DP. WNT11 expression is induced by estrogen-related receptor alpha and beta-catenin and acts in an autocrine manner to increase cancer cell migration. *Cancer Res.* 2010 Nov 15;70(22):9298-308.

Dydensborg AB, Herring E, Auclair J, Tremblay E, Beaulieu JF. Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006 May;290(5):G1067-74.

El-Tanani M, Platt-Higgins A, Rudland PS, Campbell FC. Ets gene PEA3 cooperates with beta-catenin-Lef-1 and c-Jun in regulation of osteopontin transcription. *J Biol Chem.* 2004 May 14;279(20):20794-806.

El-Tanani MK, Campbell FC, Crowe P, Erwin P, Harkin DP, Pharoah P, Ponder B, Rudland PS. BRCA1 suppresses osteopontin-mediated breast cancer. *J Biol Chem.* 2006 Sep 8;281(36):26587-601.

Fedarko NS, Fohr B, Robey PG, Young MF, Fisher LW. Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem.* 2000 Jun 2;275(22):16666-72.

Fujimoto J, Alam SM, Jahan I, Sato E, Sakaguchi H, Tamaya T. Clinical implication of estrogen-related receptor (ERR) expression in ovarian cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007 May;104(3-5):301-4.

Fujimoto Jiro and Eriko Sato. Clinical implication of estrogen-related receptor (ERR) expression in uterine endometrial cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009 Aug;116(1-2):71-5.

Furger KA, Menon RK, Tuck AB, Bramwell VH, Chambers AF. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. *Curr Mol Med.* 2001 Nov;1(5):621-32.

Giguère V, Yang N, Segui P, Evans RM. Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature.* 1988 Jan 7;331(6151):91-4.

Giguère V. Transcriptional Control of Energy Homeostasis by the Estrogen-Related Receptors (ERRs). *Endocr Rev.* 2008 Oct;29(6):677-96. Epub 2008 Jul 29.

Greschik H, Wurtz JM, Sanglier S, Bourguet W, van Dirsselaer A, Moras D, Renaud JP 2002 Structural and functional evidence for ligand-independent

transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol Cell* 9:303-313

Greschik H, Althage M, Flaig R, Sato Y, Peluso-Iltis C, Chavant V, Choulier L, Cronet P, Rochel N, Schule R, Stromstedt PE, Moras D 2008
Communication between the ERR alpha homodimer interface and the PGC-1alpha binding surface via the helix 8-9 loop. *J Biol Chem*

Hamilton SR. Carcinoma of the colon and rectum. *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. International Agency for Research on Cancer, 2000 reprinted 2006.

He B, Mirza M, Weber GF. An osteopontin splice variant induces anchorage independence in human breast cancer cells. *Oncogene*. 2006 Apr 6;25(15):2192-202.

Holla VR, Mann JR, Shi Q, DuBois RN. Prostaglandin E2 regulates the nuclear receptor NR4A2 in colorectal cancer. *J Biol Chem*. 2006 Feb 3;281(5):2676-82.

Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*. 1985 Dec 19-1986 Jan 1;318(6047):635-41.

Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B., Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, 1995. 377(6548): p. 397-404.

Huss JM, Kopp RP, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 α (PGC-1 α) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor- α and - γ . Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1 α . *J Biol Chem*. 2002 Oct 25;277(43):40265-74.

Imano M, Satou T, Itoh T, Sakai K, Ishimaru E, Yasuda A, Peng YF, Shinkai M, Akai F, Yasuda T, Imamoto H, Okuno K, Ito H, Shiozaki H, Ohyanagi H. Immunohistochemical expression of osteopontin in gastric cancer. *J Gastrointest Surg*. 2009 Sep;13(9):1577-82. Epub 2009 Jul 7.

Jain S, Chakraborty G, Bulbule A, Kaur R, Kundu GC. Osteopontin: an emerging therapeutic target for anticancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 Jan;11(1):81-90.

Jarzabek K, Koda M, Kozlowski L, Sulkowski S, Kottler ML, Wolczynski S. The significance of the expression of ERRalpha as a potential biomarker in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009 Jan;113(1-2):127-33.

Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res.* 1994 Nov 1;54(21):5523-6.

Johnston NI, El-Tanani MK. Osteopontin: a new role for a familiar actor. *Breast Cancer Res.* 2008;10(6):306.

Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, McGivern A, Matsubara N, Tanaka N, Higuchi T, Young J, Jass JR, Leggett BA. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut.* 2004 Aug;53(8):1137-44.

Ke HL, Chang LL, Yang SF, Lin HH, Li CC, Wu DC, Wu WJ. Osteopontin overexpression predicts poor prognosis of upper urinary tract urothelial carcinoma. *Urol Oncol.* 2011 Nov;29(6):703-9.

Kerr D. Clinical development of gene therapy for colorectal cancer, *nature reviews cancer*, volume 3, august 2003.

Kim JY, Bae BN, Kim KS, Shin E, Park K. Osteopontin, CD44, and NFkappaB expression in gastric adenocarcinoma. *Cancer Res Treat.* 2009 Mar;41(1):29-35.

Laganière J, Tremblay GB, Dufour CR, Giroux S, Rousseau F, Giguère V. 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.* 2004 Apr 30;279(18):18504-10.

Lammi J, Huppunen J, Aarnisalo P. Regulation of the osteopontin gene by the orphan nuclear receptor NURR1 in osteoblasts. *Mol Endocrinol.* 2004 Jun;18(6):1546-57. Epub 2004 Feb 26.

Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest.* 2000 Oct;106(7):847-56.

Likui W, Hong W, Shuwen Z. Clinical significance of the upregulated osteopontin mRNA expression in human colorectal cancer. *J Gastrointest Surg.* 2010 Jan;14(1):74-81.

Luo J, Sladek R, Carrier J, Bader JA, Richard D, Giguère V. Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *Mol Cell Biol.* 2003 Nov;23(22):7947-56.

Martinez C, Churchman M, Freeman T, Ilyas M. Osteopontin provides early proliferative drive and may be dependent upon aberrant c-myc signalling in murine intestinal tumours. *Exp Mol Pathol*. 2010 Apr;88(2):272-7

Mi Z, Guo H, Kuo PC. Identification of osteopontin-dependent signaling pathways in a mouse model of human breast cancer. *BMC Res Notes*. 2009 Jul 1;2:119.

Mole DJ, O'Neill C, Hamilton P, Olabi B, Robinson V, Williams L, Diamond T, El-Tanani M, Campbell FC. Expression of osteopontin coregulators in primary colorectal cancer and associated liver metastases. *Br J Cancer*. 2011 Mar 15;104(6):1007-12.

Mueller JD, Bethke B, Stolte M. Colorectal de novo carcinoma: a review of its diagnosis, histopathology, molecular biology, and clinical relevance. *Virchows Arch*. 2002 May;440(5):453-60.

Murray J, Huss JM. Estrogen-related receptor α regulates skeletal myocyte differentiation via modulation of the ERK MAP kinase pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011 Sep;301(3):C630-45.

Ogino S, Shima K, Baba Y, Nosho K, Irahara N, Kure S, Chen L, Toyoda S, Kirkner GJ, Wang YL, Giovannucci EL, Fuchs CS. Colorectal cancer expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG, PPARgamma) is associated with good prognosis. *Gastroenterology*. 2009 Apr;136(4):1242-50.

O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol*. 2000 Dec;81(6):373-90.

Organisation mondiale de la santé <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.

Ouko L, Ziegler TR, Gu LH, Eisenberg LM, Yang VW. Wnt11 signaling promotes proliferation, transformation, and migration of IEC6 intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2004 Jun 18;279(25):26707-15. Epub 2004 Apr 14.

Oyama Y, Akuzawa N, Nagai R, Kurabayashi M. PPARgamma ligand inhibits osteopontin gene expression through interference with binding of nuclear factors to A/T-rich sequence in THP-1 cells. *Circ Res*. 2002 Feb 22;90(3):348-55.

PathologyOutlines.com, Inc.

<http://www.pathologyoutlines.com/topic/colontumoradenomacarcinoma.html>.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.

Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.* 2003 Feb;24(1):78-90.

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 1998 Mar 20;92(6):829-39.

Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.* 2006 Feb;16(2):79-87.

Ravindranath A, Yuen HF, Chan KK, Grills C, Fennell DA, Lappin TR, El-Tanani M. Wnt- β -catenin-Tcf-4 signalling-modulated invasiveness is dependent on osteopontin expression in breast cancer. *Br J Cancer.* 2011 Aug 9;105(4):542-51

Rodrigues LR, Teixeira JA, Schmitt FL, Paulsson M, Lindmark-Månsson H. The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Jun;16(6):1087-97.

Rohde F, Rimkus C, Friederichs J, Rosenberg R, Marthen C, Doll D, Holzmann B, Siewert JR, Janssen KP. Expression of osteopontin, a target gene of de-regulated Wnt signaling, predicts survival in colon cancer. *Int J Cancer.* 2007 Oct 15;121(8):1717-23.

Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, Meier CA, Bell DR, Kralli A, Giacobino JP, Dériaz O. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes.* 2003 Dec;52(12):2874-81.

Schreiber SN, Knutti D, Brogli K, Uhlmann T, Kralli A. The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor (ERR alpha). *J Biol Chem* 2003 Mar 14; 278:9013-9013-8.

Senger DR, Perruzzi CA, Gracey CF, Papadopoulos A, Tenen DG. Secreted phosphoproteins associated with neoplastic transformation: close homology with plasma proteins cleaved during blood coagulation. *Cancer Res.* 1988 Oct 15;48(20):5770-4.

Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos A, Tenen DG. Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. *Biochim Biophys Acta.* 1989 Jun 13;996(1-2):43-8.

Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell.* 1979 Apr;16(4):885-93.

- Sharma P, Kumar S, Kundu GC. Transcriptional regulation of human osteopontin promoter by histone deacetylase inhibitor, trichostatin A in cervical cancer cells. *Mol Cancer*. 2010 Jul 7;9:178.
- Sladek R, Bader JA, And Giguère V. The Orphan Nuclear Receptor Estrogen-Related Receptor α Is a Transcriptional Regulator of the Human Medium-Chain Acyl Coenzyme A Dehydrogenase Gene. *Mol Cell Biol.*, 1997 Sep. 17(9) : 5400–5409.
- Sladek R, Bader JA, Giguère V. The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor α is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Mol Cell Biol*. 1997 Sep;17(9):5400-9.
- Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(3):279-303.
- Song G, Ouyang G, Mao Y, Ming Y, Bao S, Hu T. Osteopontin promotes gastric cancer metastasis by augmenting cell survival and invasion through Akt-mediated HIF-1 α up-regulation and MMP9 activation. *J Cell Mol Med*. 2009 Aug;13(8B):1706-18.
- Stein RA, Chang CY, Kazmin DA, Way J, Schroeder T, Wergin M, Dewhirst MW, McDonnell DP. Estrogen-related receptor α is critical for the growth of estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2008 Nov 1;68(21):8805-12.
- Stein RA, Gaillard S, McDonnell DP. Estrogen-related receptor α induces the expression of vascular endothelial growth factor in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009 Mar;114(1-2):106-12.
- Stein RA, McDonnell DP. Estrogen-related receptor α as a therapeutic target in cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Dec;13 Suppl 1:S25-32.
- Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Shimada N, Ishida T, Hirakawa H, Ohuchi N, Sasano H. Estrogen-related receptor α in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Res*. 2004 Jul 1;64(13):4670-6.
- Takafuji V, Forgues M, Unsworth E, Goldsmith P, Wang XW. An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2007 Sep 27;26(44):6361-71. Epub 2007 Apr 23.
- Timothy J. Yeatman & Ann F. Chambers. Osteopontin and colon cancer progression. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20(1):85-90.
- Tiraby C, Langin D, PGC-1 α , un co-activateur transcriptionnel impliqué dans le métabolisme. *MEDECINE/SCIENCES* 2005 Jan ; 21(1) : 49-54.

Tremblay AM, Wilson BJ, Yang XJ, Giguère V. Phosphorylation-dependent sumoylation regulates estrogen-related receptor-alpha and -gamma transcriptional activity through a synergy control motif. *Mol Endocrinol*. 2008 Mar;22(3):570-84.

Vanacker JM, Delmarre C, Guo X, Laudet V. Activation of the osteopontin promoter by the orphan nuclear receptor estrogen receptor related alpha. *Cell Growth Differ*. 1998 Dec;9(12):1007-14.

Vanacker JM, Pettersson K, Gustafsson JA, Laudet V. Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta. *EMBO J*. 1999 Aug 2;18(15):4270-9.

Villena JA, Hock MB, Chang WY, Barcas JE, Giguère V, Kralli A. Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is essential for adaptive thermogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 23;104(4):1418-23.

Villena JA, Kralli A. ERRalpha: a metabolic function for the oldest orphan. *Trends Endocrinol Metab*. 2008 Oct;19(8):269-76. Epub 2008 Sep 6.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-532. Wai PY, Kuo PC. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2008 Mar;27(1):103-18.

Wai PY, Kuo PC. The role of Osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res*. 2004 Oct;121(2):228-41.

Wang J, Fang F, Huang Z, Wang Y, Wong C. Kaempferol is an estrogen-related receptor alpha and gamma inverse agonist. *FEBS Lett*. 2009 Feb 18;583(4):643-7.

Warburg O, 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956 Aug 10, 124:269-270.

Wang L, Zuercher WJ, Consler TG, Lambert MH, Miller AB, Orband-Miller LA, McKee DD, Willson TM, Nolte RT 2006 X-ray crystal structures of the estrogen-related receptor-gamma ligand binding domain in three functional states reveal the molecular basis of small molecule regulation. *J Biol Chem* 281:37773- 37781

Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H, Pals ST. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol*. 1999 Feb;154(2):515-23.

Yan W, Qian C, Zhao P, Zhang J, Shi L, Qian J, Liu N, Fu Z, Kang C, Pu P, You Y. Expression pattern of osteopontin splice variants and its functions on cell apoptosis and invasion in glioma cells. *Neuro Oncol.* 2010 Aug;12(8):765-75. Epub 2010 Feb 8.

Young MF, Kerr JM, Termine JD, Wewer UM, Wang MG, McBride OW, Fisher LW. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics.* 1990 Aug;7(4):491-502.

Zagani R, Hamzaoui N, Cacheux W, de Reyniès A, Terris B, Chaussade S, Romagnolo B, Perret C, Lamarque D. Cyclooxygenase-2 inhibitors down-regulate osteopontin and Nr4A2-new therapeutic targets for colorectal cancers. *Gastroenterology.* 2009 Oct;137(4):1358-66.e1-3.

Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ, Edwards PA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev.* 2004 Jan 15;18(2):157-69. Epub 2004 Jan 16.

Zhang Z, Teng CT. Teng. Estrogen Receptor-related Receptor α Interacts with Coactivator and Constitutively Activates the Estrogen Respons Elements of the Human Lactoferrin Gene. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 275, 2000, No. 27, pp 20837–20846.