



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par **Najat KHALIL**

**L'activation des récepteurs activés par les proliférateurs de
peroxysomes β/δ , stimule l'expression de Siah-1L et entraîne la
prolifération et la migration de cellules de glioblastomes**

Le 13 Décembre 2013

Membres du jury :

Rapporteurs : Madame Patricia SIMON-ASSMANN, Directeur de Recherche CNRS,
Université de Strasbourg, Strasbourg

Monsieur Mustapha CHERKAOUI MALKI, Professeur, Université de
Bourgogne, Dijon

Examineurs : Monsieur Jean-Pol FRIPPIAT, Professeur, Université de Lorraine, Nancy

Monsieur Lionel DOMENJOUR, Docteur HDR, Université de Lorraine,
Nancy, Directeur de thèse

**Laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement et de Recherche en Cancérologie, CRAN –
CNRS – UMR 7039, Université de Lorraine - Faculté des Sciences et Technologies, BP 239 54506
Vandœuvre-les-Nancy Cedex France**

Remerciements

Au terme de ce travail, c'est avec profond bonheur que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet.

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements les plus sincères à Monsieur le Professeur Philippe BECUWE, pour m'avoir accueillie au sein de son Laboratoire et pour ses conseils qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude.

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans la confiance accordée par mon directeur de thèse, le Docteur Lionel DOMENJOU, qui a su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en y gardant un œil critique et avisé. Les discussions que j'ai pu avoir avec lui tout au long de mon parcours, ses conseils et ses remarques, ont orienté mes recherches et consolidé mes connaissances. Merci pour avoir cru en moi et pour le soutien permanent.

A Madame le Docteur Patricia SIMON-ASSMANN, pour avoir accepté de juger cette thèse en qualité de rapporteur. Qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance et l'expression de mes remerciements les plus respectueux.

A Monsieur le Professeur Mustapha CHERKAOUI MALKI, pour avoir accepté également de juger ce travail de thèse en qualité de rapporteur. Qu'il trouve ici l'assurance de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean-Pol FRIPPIAT, pour avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examineur. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie également Mesdames les Docteurs Stéphanie Grandemange et Nadège Touche pour leur sympathie, leur amitié, et leurs conseils et remarques au cours des discussions au sein du laboratoire.

Un grand merci également à tous les membres du Laboratoire, en particulier Vanessa BESANCENOT, Emilie BRUNNER, mes collègues doctorants, Rémi KLOTZ, Claire Barbieux. Merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur, et pour tout les moments agréables et les discussions autour d'un caf.

Je pense également à Vanessa MINIG, j'ai gardée de très bons souvenirs des moments partagés ensemble. Mes pensées vont également à Zilal KATTAN, une amie très agréable que je n'oublierai jamais, tu m'as fait découvrir la culture et la cuisine syrienne, merci zilal pour ta générosité, ta sympathie et pour les nombreux bons moments passés ensembles.

Je remercie également les membres de l'équipe de la faculté de Médecine, en particulier le docteur Marie-Claire LANHERS pour son aide pour la PCR quantitative et pour les discussions enrichissantes que nous avons eu sur le projet.

Je voudrais remercier Sylvie et Nathalie pour leur sympathie et leur efficacité dans l'organisation et la résolution des problèmes administratifs, mais aussi pour les bons moments lors des pauses café, merci également à Murielle GUILLAUME.

Je remercie sincèrement mon cher mari, avec qui j'ai pu souvent discuter et échanger des idées sur mon projet de thèse. Ces discussions ont joué un rôle important dans l'avancement de mes travaux, merci Mohamed pour ton soutien quotidien indéfectible et pour ton enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme dans la vie en général.

Un grand merci à un mon Ange Laeith qui a changé ma vie, la prunelle de mes yeux; Je t'aime très très fort, je te dédie cette thèse ainsi qu'à ton frère qui sera né en Juin.

Je ne remercierai jamais assez mes parents, mes frères (Soufiane, Simohamed, Aissam) et mes soeurs (Fatima , Btissam et Hanane) pour leur soutien et encouragements sans relâche au cours de toutes ces années d'études. Malgré mon éloignement depuis de (trop) nombreuses années, leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Je vous aime.

A mon adorable Papa, qui a toujours tout fait pour que tout aille bien pour nous, je te remercie pour tout.

Mes remerciements vont aussi à tout le reste de ma famille et à celle de mon mari ainsi qu'à nos amis, qu'ils soient en France ou ailleurs, et je sais qu'ils sont nombreux. Merci pour votre amour et vos encouragements.

Enfin, j'adresse toute mon affection à la famille Bourhim, et en particulier à Mustapha et sa femme Séverine pour leur soutien et leur amitié.

A mes parents

A mes frères et sœurs

A Loeith et Mohamed

A tous ceux qui me sont chers

Sommaire	5
Liste des abreviations.....	9
Introduction bibliographique	
Les Glioblastomes	
I. Les gliomes: Classification et gradation	14
II. Les glioblastomes.....	15
II. 1. Incidence des glioblastomes.....	15
II. 2. Histologie.....	17
II. 3. Immunohistochimie.....	17
II. 4. Les facteurs de risques	18
II. 4. 1. Allergies et maladies auto-immunes.....	18
II. 4. 2. Polymorphisme génétique.....	19
II. 4. 3. Altérations génétiques.....	20
II. 4. 3. 1. La voie RTK/Ras/ NF1/PTEN/PI3K.....	20
II. 4. 3. 2. La voie TP53/MDM2/MDM4/p14.....	21
II. 4. 3. 3. La voie p16INK4a/CDK4/RB1.....	22
II. 5. Glioblastomes primaires et secondaires.....	23
II.6. Prise en charge des glioblastomes et stratégies thérapeutiques.....	25
II.6. 1. Chimiothérapie et radiothérapies.....	25
II.6. 2. Les thérapies ciblées.....	25
II.6. 2. 1. Inhibiteur de RTK et des kinases.....	25
II.6. 2. 2. Agonistes de PPAR γ	26
Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes	
I. Généralités.....	28
II. Isotypes.....	28
III. Mécanisme d'action des PPAR.....	29
III.1. Activité ligand-dépendante.....	29
III. 2. Activité ligand indépendante.....	31
IV. Régulation de l'activité des PPAR.....	32
IV. 1. La trans-activation par les PPAR.....	32
IV. 2. La trans-répression par les PPAR.....	33
V. Distribution tissulaire de PPAR β/δ	35
VI. Les ligands et rôle des PPAR β/δ	35
VII. PPAR β/δ et cancer.....	37

VII. 1. Rôle de PPAR β/δ dans le processus tumoral.....	37
VII. 2. Effet pro-carcinogène.....	38
E3 ubiquitin-protein ligase Seven in absentia homolog, Siah	
I. Introduction.....	42
II. Les gènes <i>Siah</i> chez les mammifères.....	42
II. 1. Les gènes <i>Siah</i> chez la souris.....	42
II. 2. Les genes <i>Siah</i> chez l'humain.....	43
II. 3. Les gènes <i>Sina</i> et <i>Siah</i> chez d'autres espèces.....	44
III. Structure et fonction des protéines <i>Siah</i>	45
III. 1. Structure générale.....	45
III. 1. 1. Domaine Ring.....	46
III. 1. 2. Domaine de liaison au substrat.....	46
III. 1. 3. Domaine d'oligomérisation.....	47
III. 1. 4. Domaine de localisation nucléaire.....	47
IV- Implications biologiques des protéines <i>Siah</i>	47
IV. 1. Rôle des protéines <i>Siah</i> dans la voie de l'ubiquitination.....	47
IV. 2. Rôle des protéines <i>Siah</i> dans le développement de l'organisme.....	50
IV. 3. Rôle des protéines <i>Siah</i> au niveau de la cellule.....	50
V. <i>Siah</i> et cancers.....	52
Présentation de l'étude	57
Matériel et Méthodes	
I Matériel.....	60
I.1. Lignées cellulaires et réactifs de culture cellulaire.....	60
I.2. Réactifs de biologie moléculaire.....	60
I. 3. Réactifs biochimiques.....	60
II. Méthodes expérimentales.....	61
II.1. Traitement des glioblastomes.....	61
II. 2. Purification plasmidique.....	61
II. 3. Transfection des cellules T98G par le promoteur <i>Siah-1L</i>	62
II. 4. Essai luciférase.....	62
II. 5. Extraction des ARN totaux.....	63
II. 6. Transcription inverse (RT).....	63
II. 7. Réaction de polymérisation en chaine (PCR) en temps réel.....	64

II. 8. Clonage du promoteur du gène <i>Siah-1L</i> humain.....	64
II. 9. Délétions successives des séquences 5' du promoteur <i>Siah-1L</i>	65
II. 10. Construction des plasmides exprimant PPAR β/δ et <i>Siah-1L</i>	65
II. 11. Mutagenèse dirigée de la séquence promotrice <i>Siah-1L</i>	65
II. 12. Transfection transitoire des cellules T98G par le plasmide codant <i>Siah-1L</i>	66
II. 13. Test de prolifération cellulaire.....	67
II. 14. Test de cicatrisation et migration cellulaire ou “wound healing“.....	67
II. 15. Analyse de l'apoptose.....	68
II. 16. Analyse de l'expression de la protéine recombinante par immunoblot.....	69
II. 17. Microscopie par Immunofluorescence.....	69
II.18. Immunoprécipitation de la chromatine.....	70
II.18.1 Préparation de la chromatine.....	70
II.18.2 immunoprécipitation.....	70
Résultats	
I. Etude de l'effet de l'activation de PPAR β/δ sur la prolifération et la migration des cellules de glioblastome T98G.....	73
I. 1. Effet de l'agoniste de PPAR β/δ , GW501516 sur la prolifération des cellules T98G.....	73
I. 2. Effet de l'agoniste de PPAR β/δ , GW501516 sur la migration des cellules de glioblastome T98G.....	75
II. Effet de l'activation de PPAR β/δ sur l'expression de <i>Siah-1L</i>	76
III. Etude de l'effet de l'expression de <i>Siah-1L</i> sur la prolifération et la migration des cellules de glioblastome T98G.....	78
III. 1. Etude de l'effet de l'expression de <i>Siah-1L</i> sur la prolifération des cellules de glioblastome T98G.....	78
III. 2. Etude de l'effet de l'expression de <i>Siah-1L</i> sur la migration des cellules de glioblastome T98G.....	81
IV. Analyse de l'effet de l'activation de PPAR β/δ et de la surexpression de <i>Siah-1L</i> sur l'apoptose des cellules T98G.....	82
V. Clonage et caractérisation fonctionnelle du promoteur humain du gène <i>Siah-1L</i>	85
V. 1. Clonage de la séquence promotrice.....	85
V. 2. Détermination de la séquence promotrice minimale active.....	87
VI. Etude de la régulation du promoteur de <i>Siah-1L</i>	89
VI. 1. Analyse de l'effet de l'activation du récepteur PPAR β/d	

sur l'activité du promoteur.....	89
VI. 2. Rôle fonctionnel du site potentiel de fixation des PPAR au niveau du promoteur de Siah-1L.....	91
VI. 3. Effet de la transactivation par PPAR β/δ sur l'activité du promoteur de Siah-1L.....	93
VI. 4. PPAR β/δ endogène se lie au site PPAR-733 du promoteur Siah-1L.....	95
Discussion.....	98
Références bibliographiques.....	103
Annexes.....	116

ABREVIATIONS

- ADN	Acide Désoxyribonucléique
- ADRP	Adipose differentiation-related protein
- AF1	Activating Function 1
- APC	Anaphase Promoting Complex
- ARN	Acide Ribonucléique
- ARNm	Acide Ribonucléique messenger
- Bag-1	BCL2-associated athanogene
- Bax	Bcl-2-associated X protein
- Bcl2	B-cell lymphoma 2
- BMBA	Dimethylbenz(a)anthracene
- BRCA1	Breast cancer 1
- CBP/P300	cAMP Response Element Binding Protein
- CDK	Cycline Dependent kinase
- CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
- CDKN2B	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B
- ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
- CtIP	Ctb-interacting protein
- DAG	Diacylglycérol
- DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
- DBD	DNA Binding Domain
- DCC	Deleted in colorectal cancer
- DMSO	Diméthylsulfoxyde
- DR1	Direct Repeat 1
- EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
- EdU	5-éthynyl-2-désoxyuridine
- eEF1b	Elongation factor 1-beta
- EGFR	Epidermal Growth Factor receptor
- ERBB2	V-Erb-B2 Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2
- EPA	Epiandrostone
- FIR	Fuse-binding protein-interacting repressor
- GFAP	Protéine gliale acide fibrillaire

- HAT	Histone acétyltransferase
- HDAC	Histone désacétylases
- HIF	Hypoxia-inducible factors
- HIPK2	Homeodomain-interacting protein kinase 2
- IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1
- ILK	Integrin-linked kinase
- <i>i</i> NOS	Inducible nitric oxide synthase
- IRM	Imagerie par résonance magnétique
- Kid	kinesin-like DNA binding protein
- LB	Luria-Bertani
- LBD	Ligand Binding Domaine
- MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
- MCF7	Human breast adenocarcinoma cell line
- MDM2	Mouse double minute 2 homolog
- mGLutR1	Metabotropic glutamate receptor 1
- MGMT	Méthyltransférase 6O-méthylguanine
- N-CoR1	Nuclear receptor co-repressor 1
- N-CoR	Nuclear receptor co-repressor
- NF1	Neurofibromatose 1
- NLS	Nuclear Localization Signal
- OBF.1	B cell Oct-binding protein 1
- OMS	Organisation mondiale de la santé
- PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
- PBS	Solution tampon phosphate
- PCR	Polymerase Chain Reaction
- PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
- PDPK	13-phosphoinositide-dependent-protein kinase 1
- PEI	Polymère d'éthylène-imine
- PHD	Prolyl hydroxylases
- PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinases
- PKC	Protéine kinase C
- PMSF	Fluorure de phénylméthanesulfonyl
- PPAR	Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes
- PPRE	Peroxisome proliferator response elements

- PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
- RAR	Retinoic Acid Receptor
- RB1	Rétinoblastome
- RNase	Ribonucléase
- RT	Reverse transcriptase
- RTEL1	Regulator of telomere elongation helicase 1
- RTK	Récepteurs à activité tyrosine kinase
- RXR	Récepteur X des rétinoïdes
- SDS	Dodécylsulfate de sodium
- SIAH	Seven IN Absentia Homolog
- SINA	Seven IN Absentia
- SIP	Siah-interacting protein
- SMRT	Silencing Mediator co-repressor for Retinoid and Thyroid-hormone receptors
- SNC	Système nerveux central
- SRC1	Steroid Receptor Co-activator 1
- SVF	Sérum de veau fœtal
- SW1353	Human chondrosarcoma cell line
- tbp	Transcription facteur IIB
- TBST	Tris Buffer Saline Tween
- TIEG1	TGF- β -inducible early gene 1
- TNF	Tumor necrosis factor
- TP53	Tumor protein p53
- TRAF	TNF receptor associated factor proteins
- Var	Guanine nucleotide exchange factor
- VEGF	Vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

LES GLIOBLASTOMES

I. Les gliomes : Classification et gradation

Le cerveau est une structure extrêmement complexe qui peut renfermer jusqu'à plusieurs milliards de neurones connectés les uns aux autres. Ces neurones sont nourris par les cellules gliales qui sont dix fois plus nombreuses que les neurones. Elles représentent 90% des cellules du cerveau. Il en existe différents types : les astrocytes, les oligodendrocytes, les épendymocytes et les cellules microgliales. Un peu plus de la moitié des tumeurs du cerveau se développe à partir de ces cellules. Ce type de tumeur est appelé gliomes.

Les gliomes sont définis comme des tumeurs faisant preuve d'une différenciation gliale dans leurs caractéristiques histologiques, immuno-histochimiques et ultrastructurales. La classification actuellement la plus utilisée est celle de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) 2007 (Louis et al., 2007), selon laquelle les gliomes sont classés selon leur cellule originelle probable. Trois types de gliomes sont distingués : les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les oligo-astrocytomes. En se basant sur différents critères histologiques et immunohistochimiques, ces tumeurs sont classées de grade I à IV. Les astrocytomes constituent 90% des gliomes et 50% des tumeurs intracrâniennes (Behin et al., 2003). Même s'ils ne représentent que 2% de tous les cancers chez l'homme, les astrocytomes sont particulièrement agressifs et dévastateurs. Ces tumeurs, développées à partir du tissu de soutien cérébral composé d'astrocytes, sont infiltrantes et ne présentent généralement pas de limites nettes avec le tissu cérébral avoisinant. Les astrocytomes sont divisés en 4 grades : astrocytomes pilocytiques (grade I), astrocytomes diffus (grade II), astrocytomes anaplasiques (grade III) et glioblastomes multiformes (grade IV). Les oligodendrogliomes sont classés en grade II et grade III (ou anaplasiques), de même que les gliomes mixtes ou oligo-astrocytomes. Contrairement aux tumeurs solides d'autres organes, les gliomes ne font que rarement des métastases en dehors du système nerveux central (SNC). La gradation de ces tumeurs joue un rôle décisif dans leur pronostic. Les tumeurs de grade I sont biologiquement

considérées comme bénignes et peuvent, en fonction de leur localisation être guéries chirurgicalement. Bien que les tumeurs de grade II soient considérées comme faiblement malignes, elles ne peuvent pas être opérées par la chirurgie, du fait de leur expansion invasive. En outre, la moitié de ces tumeurs peuvent dégénérer en tumeurs de degré III ou IV, souvent après plusieurs années (Maher et al., 2001). Les gliomes de grade III et IV sont considérés comme très malins, le degré IV ayant le plus mauvais pronostic.

II. Les glioblastomes

Les glioblastomes sont des gliomes de grade IV, il s'agit des gliomes les plus fréquents et les plus graves. Ce sont des tumeurs hautement angiogéniques et invasives qui représentent 38% de l'ensemble des tumeurs primitives du SNC. Les glioblastomes de grade IV sont les plus fréquentes et représentent 65% des gliomes selon l'OMS. Bien que rare, il s'agit de la tumeur primitive cérébrale la plus fréquente, Il survient à tout âge mais dans 70% des cas entre 45 et 70 ans avec un pic à 58 ans (Ohgaki & Kleihues, 2005). Ces tumeurs siègent le plus souvent au niveau des hémisphères cérébraux, dans la matière blanche. Ce sont souvent des lésions volumineuses, profondes, inopérables (Figure 1).

II. 1. Incidence des glioblastomes

Le glioblastome représente approximativement 50% des astrocytomes. Tumeur astrocytaire la plus maligne, elle est composée d'astrocytes néoplasiques très peu différenciés. Les glioblastomes touchent principalement les adultes. Les glioblastomes peuvent se développer à partir d'astrocytomes de grade II ou d'astrocytomes anaplasiques "glioblastomes secondaires", mais ils sont diagnostiqués le plus fréquemment sans évidence de lésion antérieure "glioblastomes primaires". Les glioblastomes primaires et secondaires sont deux lésions distinctes qui se développent selon des patrons génétiques différents, touchent des

patients d'âges différents et se distinguent également dans leur réponse aux traitements.

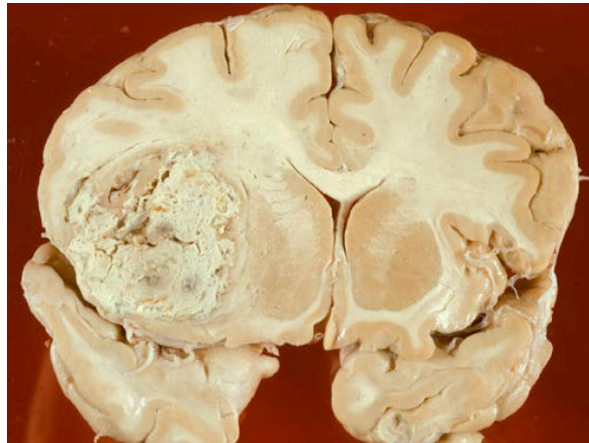


Figure 1 : Coupe macroscopique d'un glioblastome. Aspect cérébriforme intraparenchymateux avec une consistance friable et parfois kystique (Can. J. Neurol. Sci. 1998).

L'incidence des glioblastomes a augmenté au cours des 30 dernières années. Ceci est dû en grande partie aux conditions du diagnostic avec l'apparition des scanners puis de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et aux modifications des classifications histologiques. Elle s'explique également par le vieillissement de la population avec un accroissement du nombre de cas, plus particulièrement, au-delà de 70 ans et l'amélioration de l'accès à l'imagerie (Helseth, 1995 ; McKinley et al., 2000). On ne peut cependant pas exclure que l'apparition ou la progression de facteurs de risque aujourd'hui mal connus et auxquels l'âge rendrait plus vulnérable soient responsables pour tout ou partie de cette progression.

II. 2. Histologie

Les caractéristiques histologiques des glioblastomes incluent le polymorphisme cellulaire, des atypies nucléaires, une forte activité mitotique, des thromboses vasculaires, une

prolifération microvasculaire et de la nécrose (Omuro & DeAngelis, 2013). Le diagnostic des glioblastomes repose essentiellement sur l'observation générale du tissu, les larges zones nécrotiques occupent généralement le centre de la lésion, alors que les cellules tumorales tendent à s'accumuler en périphérie, la prolifération vasculaire se retrouve généralement autour des foyers de nécrose et en périphérie de la zone d'infiltration. Les noyaux des cellules sont volumineux et polylobés avec des petits nucléoles et le cytoplasme est d'aspect granuleux.

II. 3. Immunohistochimie

Les examens immunohistochimiques utilisent en général les anticorps contre les antigènes prolifératifs (par exemple contre l'antigène Ki67) (Figure 2A). Un index de prolifération élevé est souvent synonyme de mauvais pronostic. Le marquage des cellules endothéliales par un anticorps dirigé contre la protéine CD34 (Figure 2B) permet de visualiser la prolifération microvasculaire de manière plus précise. Les thromboses vasculaires sont fréquentes et jouent un rôle dans la formation des zones de nécrose. La nature astrocytaire de la lésion peut-être étudiée par marquage de la protéine GFAP (protéine gliale acide fibrillaire), protéine constituant les filaments intermédiaires spécifiques des astrocytes (Figure 2C) (Simonaviciu et al., 2008 ; Jung et al., 2013).

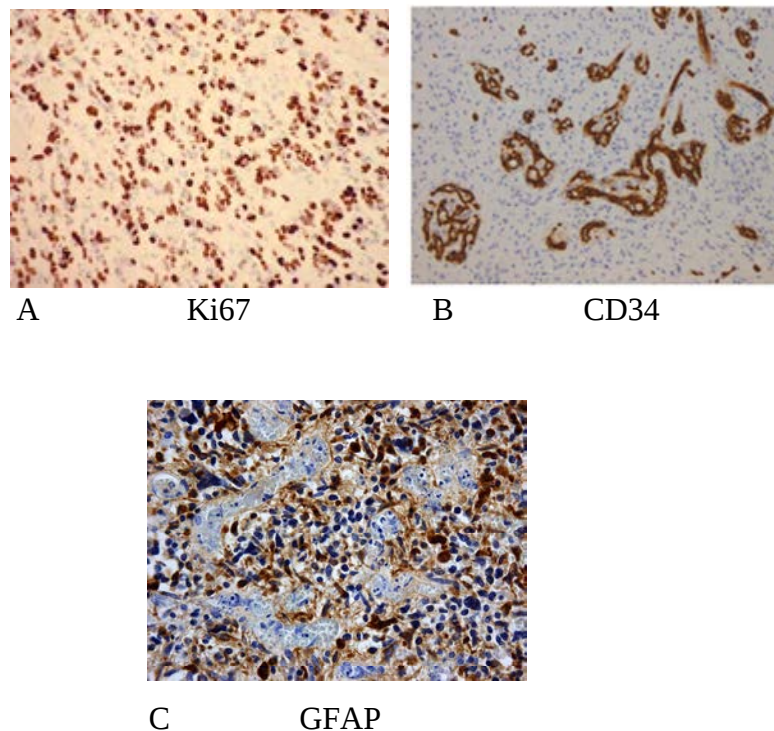


Figure 2 : Immunohistochimie sur coupes de glioblastomes. (A) Marquage de l'activité proliférative par l'anticorps MIB-1 dirigé contre la protéine Ki67. (B) Mise en évidence de la prolifération vasculaire par marquage de la protéine CD34. (C) Identification des cellules astrocytaires par marquage de la protéine GFAP (Pathpedia.com, Wikipedia.org, Simonaviciu et al., 2008).

II. 4. Les facteurs de risques

II. 4. 1. Allergies et maladies auto-immunes

La réduction du risque de survenue d'un glioblastome chez les sujets ayant un terrain atopique (asthme, rhume des foins, eczéma et allergies alimentaires) a été suspectée dès les années 1990. La presque totalité des études trouve des résultats identiques avec une réduction du risque d'environ 30 à 40% (Linos et al., 2007). Une réduction significative des taux sériques d'IgE et de différentes cytokines ont été observées (Linos et al., 2007). Une

réduction, d'ampleur similaire, du risque de survenue a été observée chez les patients atteints d'une maladie auto-immune (polyarthrite rhumatoïde, sclérose en plaque, etc.) (Tableau 1) (Schwartzbaum et al., 2003).

II.4.2. Polymorphisme génétique

L'identification de polymorphisme génétique corrélée au risque de survenue de glioblastomes a permis de montrer que des polymorphismes au niveau des gènes codant pour la CDKN2B et RTEL1 augmenteraient le risque de survenue (Shete et al., 2009 ; Wrensch et al., 2009). Une étude par Bethke et al., 2008 a identifié 16 polymorphismes, statistiquement significatifs, constituant autant de facteurs de risque de la survenue d'un gliome (Bethke et al., 2008).

Augmentation du risque	Pas d'influence démontrée	Diminution probable du risque
Age	Composés nitrosés	Allergies
Ethnie (3,99 chez les blancs et 1,91/100 000 chez les noirs)	Tabac	Maladies auto-immunes
Sexe (Prédominant chez l'homme dans un rapport de 1,5)	Alcool	Consommation d'antioxydants
Syndromes de prédisposition	Aspartame	Infections virales (HSV, varicelle-zona)
Polymorphismes génétiques (CDKN2B et RTEL1)	Acrylamide	Anti-inflammatoire
Radiothérapie encéphalique	Plomb	Traitement hormonal substitutif
	Champs électromagnétiques	
	Pesticides	

Tableau 1 : Facteurs susceptibles d'augmenter ou de réduire le risque de la survenue d'un glioblastome (Baldi et al., 2010).

II. 4. 3. Altérations génétiques

Les glioblastomes sont caractérisés par des anomalies moléculaires récurrentes affectant principalement les voies de signalisation liées aux récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) et la régulation du cycle cellulaire (Furnari et al., 2007). Parmi celles-ci, l'activation par amplification ou mutation du gène EGFR, la surexpression des gènes PDGF-A, PDGFR- α et MDM2 ainsi que l'inactivation par mutation ou perte des gènes suppresseurs de tumeurs tels que TP53 (Tumor protein p53), PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) et p16. L'étude des glioblastomes à l'échelle génomique a permis de révéler de nouvelles mutations et délétions fréquentes ciblant les gènes ERBB2, IDH1 (isocitrate dehydrogenase 1) et NF1 (la neurofibromine) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Yan et al., 2009).

II. 4. 3. 1. La voie RTK/Ras/ NF1/PTEN/PI3K

La caractérisation moléculaire de 206 glioblastomes par le réseau *The Cancer Genome Atlas Research Network* a révélé la présence de mutations ou d'amplifications conduisant à un gain de fonction au niveau des récepteurs EGFR (dans 45% des glioblastomes), ERBB2 (8%), PDGFRA (13%), MET (4%) et RAS (2%). Des mutations "perte de fonction" ont été identifiées au niveau du suppresseur de l'activité RAS, NF1 (dans 18% des glioblastomes) (Figure 3). D'autres mutations ont été identifiées au niveau des gènes PTEN, PI3K et AKT. En effet, 36% des glioblastomes étudiés présentent des mutations et des délétions inactivant la fonction de PTEN, 18% des glioblastomes présentent des mutations "gain de fonction" induisant une activation de PI3K et 2% celle de AKT. Ces altérations génétiques déclenche une cascade d'événements conduisant à la prolifération cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose. Cette étude portant principalement sur des glioblastomes primaires a montré une altération de la voie RTK/Ras/ NF1/PTEN/PI3K dans 88% des glioblastomes étudiés (Figure 3).

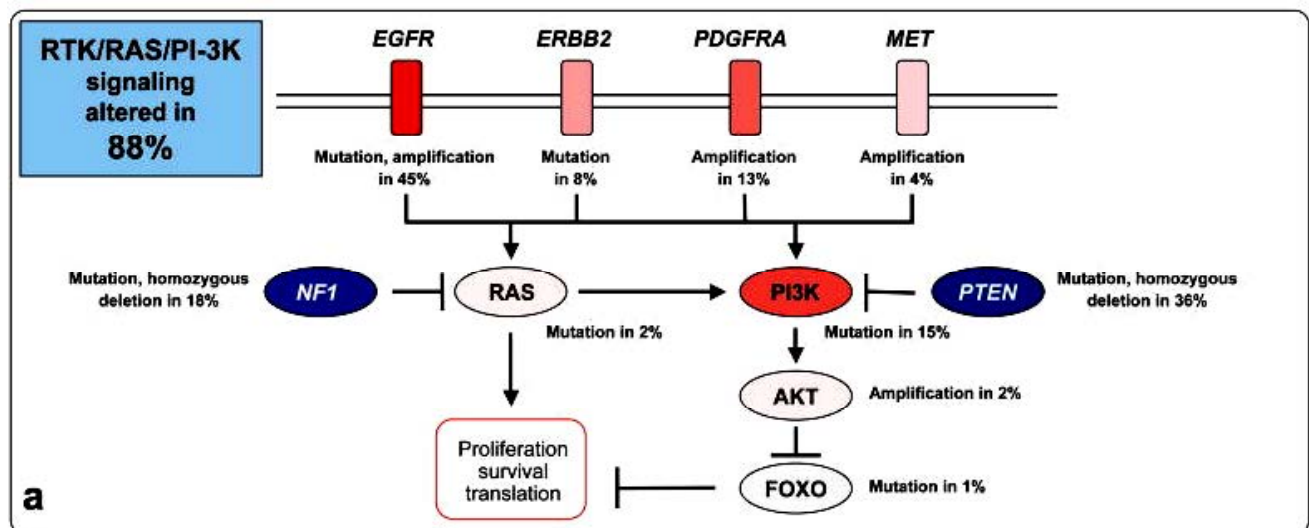


Figure 3 : Altération de la voie de signalisation RTK/PI3K/AKT. Les récepteurs des facteurs de croissance à activité tyrosine-kinase (EGFR, PDGFR) sont activés suite à la fixation de leurs ligands (EGF, TGF- α , PDGF) permettant le recrutement de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) à la membrane cellulaire ou encore l'activation de RAS. PI3K peut également être activée par RAS. PI3K permet l'activation de AKT qui inhibe FOXO. Cette cascade d'événements conduit à la prolifération cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose. (de Tayrac & Mosser, Neurochirurgie, 2010).

II. 4. 3. 2. La voie TP53/MDM2/MDM4/p14

D'autres voies de signalisation sont également touchées par les mutations dans les glioblastomes, en particulier la voie TP53/MDM2/MDM4/p14. Cette voie est altérée dans 87% des glioblastomes (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). En effet, des mutations/délétions conduisant à l'inactivation des gènes TP53 (35%) et CDKN2A/p14ARF (49%) ainsi que l'activation par amplification de MDM2 (14%) et MDM4 (7%) ont été identifiées (Figure 4).

Les mutations de *TP53* sont plus fréquentes dans les glioblastomes secondaires (65%) par rapport aux glioblastomes primaires (20%-30%). Alors que la surexpression de la protéine MDM2 est observée dans 50% des glioblastomes primaires. Par ailleurs une méthylation du

promoteur de CDKN2A est fréquente induisant une perte d'expression de p14ARF dans 75% des glioblastomes (Nakamura et al., 2001a).

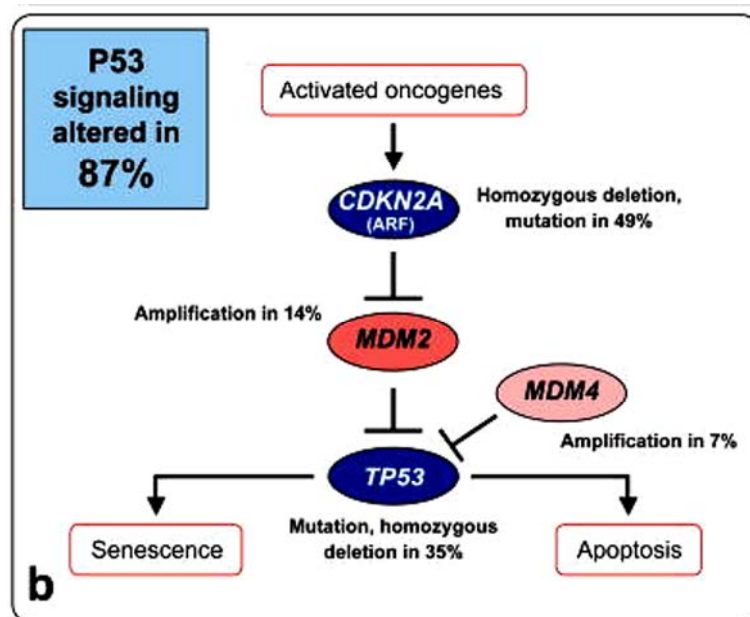


Figure 4 : Altération de la voie de signalisation p53. Le gène TP53 code pour une protéine qui joue un rôle clé dans le contrôle du cycle cellulaire en induisant la transcription du gène P21 susceptible de bloquer le passage de la phase G1 à la phase S. P53 peut également induire l'apoptose si les systèmes de réparation de l'ADN sont dépassés. L'expression de P53 est contrôlée par MDM2 et MDM4 qui peut stimuler sa dégradation. Inversement P53 peut induire la transcription de MDM2. (de Tayrac & Mosser, Neurochirurgie, 2010).

II. 4. 3. 3. La voie p16INK4a/CDK4/RB1

Dans le cas de la voie p16INK4a/CDK4/RB1, des altérations ont été rapportées dans 78% des glioblastomes analysés (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). En effet, des délétions conduisant à l'altération de la voie p16INK4a/CDK4/RB1 ont été identifiées au niveau des gènes CDKN2A/p16INK4a (52%), CDKN2B/p15INK2b (47%) et CDKN2C/p18INK4C (2%) (Figure 5). Des altérations dues également à l'amplification des gènes CDK4 (18%), cycline D2 (CCND2) (2%) et CDK6 (1%) ont été identifiées. En outre,

les délétions homozygotes ou les mutations de RB1 sont également présentes (11%) (Figure 5). D'autre part, RB1 (rétinoblastome) peut également être inactivé suite à une méthylation de son promoteur, rapportée dans 11% des glioblastomes primaires et 43% des glioblastomes secondaires (Nakamura et al., 2001). Une méthylation du promoteur de CDKN2A/p16INK4a est également fréquente (Kleihues et al., 2007).

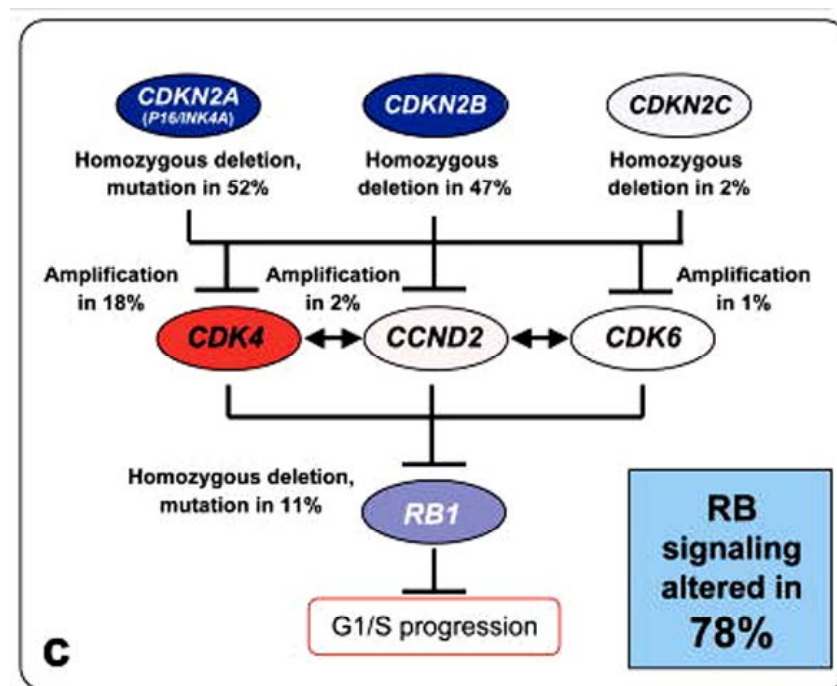


Figure 5 : Altération de la voie RB1. Cette voie joue un rôle clé dans le contrôle du cycle cellulaire et tout spécialement la progression G1/S. Le complexe CDK4-6/cycline D phosphoryle RB1, libérant le facteur de transcription E2F susceptible d'induire la transcription de gènes impliqués dans la transition G1/S. Par ailleurs p16INK4a et p15INK4B peuvent inhiber le complexe CDK4-6/cycline D, l'empêchant ainsi de phosphoryler RB1. (de Tayrac & Mosser, Neurochirurgie, 2010).

II. 5. Glioblastomes primaires et secondaires

Les glioblastomes primaires représentent plus de 90% des glioblastomes et se développent *de novo* chez des patients âgés (moyenne d'âge de 62 ans). Les principales altérations génétiques

qui caractérisent ce type de glioblastome sont l'amplification du gène EGFR (40%), la surexpression de la protéine MDM2, la perte d'expression de la protéine p16, ou des mutations/délétions du gène PTEN (25%) (Tableau 2). À l'opposé, les glioblastomes secondaires sont rares (<10% des glioblastomes) et touchent des patients plus jeunes (moyenne d'âge de 45 ans). Ils se développent plus lentement par la progression d'astrocytomes de bas grade, d'astrocytomes anaplasiques ou d'oligodendrogliomes. Ces glioblastomes ont un meilleur pronostic que les glioblastomes primaires (Kleihues et al., 2007). Ils se caractérisent essentiellement par des mutations du gène de la protéine p53 (65%). En revanche, la mutation de PTEN (4%) et l'amplification de EGFR (8%) sont plus rares (Tableau 2). Les glioblastomes secondaires se distinguent également des primaires par la présence de mutations au niveau du gène de l'isocitrate déshydrogénase 1 (IDH1) qui catalyse la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α -cétoglutarate au cours du cycle Krebs, conduisant à la génération de NADPH. En effet, ces mutations sont très rarement présentes dans les glioblastomes primaires. Une étude par Parsons et al., (2008) a montré que 5/6^{ème} des glioblastomes secondaires et 7/99^{ème} des glioblastomes primaires présentent des mutation au niveau de IDH1. La mutation de cette enzyme augmenterait la sensibilité aux radio/chimiothérapies. Enfin, Les glioblastomes primaires et secondaires présentent dans leur majorité (70%) des anomalies au niveau du chromosome 10, en particulier la perte d'un bras q ou p et la perte d'au moins trois domaines 10q23-q24, 10q25-pter et 10p14-p15.

Glioblastome primaire	Glioblastome secondaire
• Amplification EGFR : 40% • Mutation de PTEN : 25% • Mutation de p53 : 28% • Mutation IDH 1 : 7%	• Amplification EGFR : 8% • Mutation de PTEN : 4% • Mutation de p53 : 65% • Mutation IDH 1 : 83%

Tableau 2 : Critères de différenciation entre les glioblastomes primaires et secondaires

II.6. Prise en charge des glioblastomes et stratégies thérapeutique

II.6. 1. Chimiothérapie et radiothérapies

La prise en charge des glioblastomes est chirurgicale dans un premier temps. Elle consiste soit en une exérèse la plus complète possible, soit en une exérèse partielle car souvent la tumeur est infiltrante et difficile à extraire en totalité.

La stratégie thérapeutique appliquée après la chirurgie repose sur l'association de radiothérapie et de Témzolomide qui est un agent alkylant. L'association de ces deux traitements permet une réduction du risque de décès de 37% (Stupp et al., 2007). Le statut de méthylation du promoteur du gène de la méthyltransférase 6O-méthylguanine (MGMT) est considéré comme marqueur de pronostic pour le traitement par le témozolomide. En effet, l'inhibition épigénétique du gène MGMT, qui code pour une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN, sensibilise les cellules cancéreuses aux agents alkylants (Stupp et al., 2009)

II.6. 2. Les thérapies ciblées

II.6. 2. 1. Inhibiteur de RTK et des kinases

Le traitement des glioblastomes se heurte au caractère hautement résistant de ces tumeurs aux chimiothérapies conventionnelles et à la radiothérapie. Actuellement, des molécules ciblant les RTK et les composantes des voies de signalisation oncogéniques des glioblastomes sont à l'étude. Ainsi des inhibiteurs spécifiques des RTK et des tyrosine-kinases ou des anticorps monoclonaux dirigés contre les RTK ou leur ligands sont développés et sont à différents phases d'essai. Les molécules et leurs cibles sont résumées dans le tableau 3.

Molécule	Cible	Essai clinique
Lapatinib	EGFR, ErbB2	Phase II
Erlotinib	EGFR	Phase II
Imatinib	PDGFR, c-Kit, BCR-ABL	Phases I et II
Sunitinib	PDGFR, VEGFR, c-Kit	Phase II
Everolimus	mTor	Phase II
Sirolimus	mTor	Phase II
Bortezomib	mTor	Phase II

Tableau 3 : Thérapies ciblées pour le traitement des glioblastomes, molécules en essais cliniques (Bai et al., 2011 Trends in Molecular Med).

III.6. 2. 2. Agonistes de PPAR γ

Il a été montré que le traitement des glioblastomes par l'agoniste du récepteur PPAR γ , la rosiglitazone en association avec l'agoniste du récepteur RXR, le 6-OH-11-O-hydroxyphenantrene réduit l'invasion tumorale et l'expression des métalloprotéinases matricielles 2 et 9 dans trois lignées de glioblastomes (Papi et al., 2009a). Le traitement combiné réduit également la prolifération cellulaire et induit l'apoptose. Ceci est associé à une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl2 et p53, et une stimulation des protéines pro-apoptotique caspase 3 clivée, Bax et Bad. Ces résultats ont été confirmés dans un modèle de gliome murin *in vivo*, où l'administration orale de pioglitazone et IIF a permis de réduire sensiblement la prolifération tumorale (Papi et al., 2009b).

Une étude similaire réalisée par Pestereva et al., (2012) a permis de montrer que le traitement des cellules de glioblastome T98G par l'agoniste de PPAR γ , la ciglitazone ou la 15d-PGJ2 à une dose de 5 μ M réduit la survie cellulaire. L'étude montre également que l'agoniste de PPAR γ produit une altération dans l'expression de plusieurs gènes (Pestereva et al., 2012).

LES RECEPTEURS ACTIVES
PAR LES PROLIFERATEURS
DE PEROXYSOMES
(PPAR)

I. Généralités

Les PPAR (peroxisome proliferators-activated receptors) appartiennent à la super famille des récepteurs nucléaires hormonaux qui se définissent comme des facteurs de transcription ligand-dépendants. Les PPAR ont été décrits pour la première fois chez le rat traité par le clofibrate (de Duve, 1969) et le premier récepteur a été cloné en 1990 chez la souris (Isseman et Green, 1990). Les PPAR sont impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires et processus physiopathologiques tels que le contrôle du métabolisme lipidique, glucidique, la différenciation et la prolifération. Ils sont également impliqués dans plusieurs pathologies en particulier le diabète, l'athérosclérose et le cancer.

II. Isotypes

Trois isotypes de PPAR ont été identifiés chez plusieurs espèces dont le xénope, la souris, le rat et l'homme. Ils sont codés par des gènes différents qui dérivent d'un gène ancestral et ont été nommés PPAR α (NR1C1), PPAR β (NR1C2, également appelé delta ou NUC-1 ou FAAR) et PPAR γ (NR1C3) (Desvergne & Wahli., 1999). Chez l'homme, les gènes PPAR sont localisés au niveau des chromosomes 22 (22q123-q13,1), 6 (6p21,1-p21,2) et 3 (3p25) dans le cas de PPAR α (Sher et al., 1993), PPAR β (Yoshikawa et al., 1996) et PPAR γ (Green et al., 1995), respectivement. Alors que chez la souris, PPAR α , PPAR β et PPAR γ sont situés sur les chromosomes 15, 6 et 7, respectivement (Zhu et al., 1995). Les gènes codant pour les trois isotypes sont constitués de 6 exons. Un exon code pour le domaine A/B N-terminal peu conservé entre les isotypes. Il permet la transactivation indépendante du ligand grâce à une région activatrice AF1 (Activating Function 1) comportant des sites de phosphorylation (Diradourian et al., 2005). Un exon code pour le domaine D, qui constitue une zone charnière souple nécessaire à l'interaction du récepteur avec ses cofacteurs (coactivateurs et corépresseurs) et contenant une séquence peptide signal d'adressage vers le

noyau (NLS, Nuclear Localization Signal). Deux exons codent le domaine de liaison à l'ADN ou DBD (DNA Binding Domain) très conservés. C'est le cas également pour le domaine de liaison au ligand LBD (ligand Binding Domaine) mais ce dernier ne présente qu'un faible degré d'homologie entre les isotypes (Desvergne et Wahli, 1999) (Figure 6). Les acides aminés formant la poche hydrophobe de fixation des ligands sont variables d'un isotype à l'autre, ce qui pourrait expliquer que chaque isotype soit pharmacologiquement différent. D'autre part, la grande taille et la faible spécificité des interactions des ligands avec les acides aminés formant la poche sont à l'origine de la spécificité de substrat très large des PPAR (Hamilton, 2004). En effet, les PPAR peuvent fixer de nombreux ligands naturels avec des affinités relativement faibles.

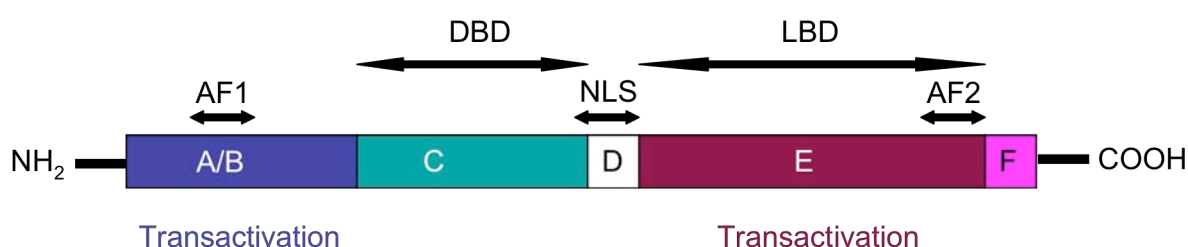


Figure 6 : Organisation structurale des PPAR. Le domaine A/B N-terminal permet la transactivation indépendante du ligand grâce à la région activatrice AF1. Le domaine de liaison à l'ADN ou DBD. Le domaine D, qui constitue une zone charnière et contenant une séquence peptide signal NLS d'adressage vers le noyau. Le domaine de liaison au ligand LBD ou domaine E/F permettant l'activation dépendante du ligand AF2 et la dimérisation avec RXR.

III. Mécanisme d'action des PPAR

III.1. Activité ligand-dépendante

Les PPAR forment des hétérodimères avec un autre récepteur nucléaire, le récepteur de l'acide 9-cis-rétinoïque (RXR). Les trois types de RXR (α , β et γ) peuvent dimériser avec

les PPAR mais des associations spécifiques avec chaque isotype semblent influencer la reconnaissance des promoteurs de gènes cibles (Juge-Aubry et al., 1997). La formation de l'hétérodimère PPAR/RXR ne nécessite pas la fixation du ligand ni la liaison à l'ADN (Feige et al., 2005). Les hétérodimères reconnaissent des séquences spécifiques, les PPRE (peroxisome proliferator response elements) situées dans les régions promotrices des gènes cibles. Le site PPRE est une séquence spécifique constituée de deux demi-sites 5'AGGTCAnAGGTCA appelé également DR1 (Direct Repeat 1) (Palmer et al., 1995). PPAR interagissant avec le premier motif hexamérique situé en amont en 5' et RXR occupant le deuxième motif hexamérique en 3' (Figure 7) (Ijpenberg et al., 1997). Cependant plusieurs autres exemples de sites PPAR hétérogènes ont été identifiés et rapportés par plusieurs auteurs (Tableau 4).

Gène	Séquences	Commentaires
FAT/CD36	GTTCTCTGGCCTCTGACTTACTTGGAT TAGCAGTGAAGTGTGACTTTTTTCT	Se lie à PPAR β et PPAR γ
Acyl-CoA oxidase	CCCGAACGTGACCTTTGTCCTGGTCC	Se lie à PPAR β
Liver fatty acid-binding protein (FABP)	TGACCTATGGCCT	
Acyl-CoA synthetase	TGACTGATGCCCT	
Lipoprotein lipase	TGCCCTTTCCCCC	Se lie à PPAR α et PPAR γ
Fatty acid transport protein	GATCTAGAGGAGGAAGTGGGGCAAAGG GCACAGGA	Activation par PPAR α et PPAR γ , mais pas PPAR β
Calcineurin A β	TTGGCCCCTGAACCATTCAACACTGC	Activation dans les cardiomyocytes par PPAR β
PGC-1 α	AAAATTCAGGACAAAGGTCA CGAGGAAAAAGGCCA	Activation dans le muscle squelettique par PPAR β
Pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) 2, 3, 4	TGAGGTCAAGGGTCA GGAAGTCATAGGTCA	Activation dans les cellules HEK et les fibroblastes de souris par PPAR β

Tableau 4 : Exemples de sites de fixation des PPARs hétérogènes

Les PPAR, en absence de ligand, forment des complexes avec des co-répresseurs comme SMRT (Silencing Mediator co-repressor for Retinoid and Thyroid-hormone

receptors) (Chen et Evans, 1995) et N-CoR (nuclear receptor co-repressor) dans le noyau (Horlein et al., 1995; Feige et al., 2005). Leur effet répressif est essentiellement dû au recrutement des histones désacétylases (HDAC) qui induisent une compaction de la chromatine (Robyr et al., 2000). La fixation du ligand sur le récepteur induit la dissociation des PPAR de leurs co-répresseurs et le recrutement des co-activateurs transcriptionnels comme CBP/P300 (cAMP Response Element Binding Protein) et SRC1 (steroid Receptor Co-activator 1). Ces derniers sont capables de produire des changements de configuration de la chromatine grâce à leur activité acétyltransférase spécifique des histones permettant ainsi l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN et à la région promotrice des gènes (Roeder, 2005).

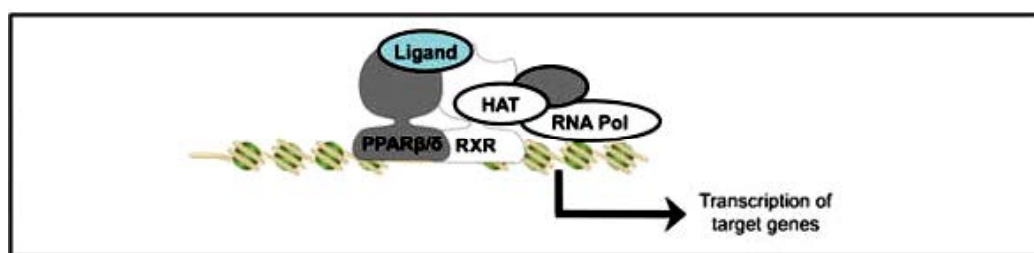


Figure 7 : Activation de la transcription des gènes cibles par PPAR β/δ . Après liaison du ligand et activation du récepteur, PPAR β/δ se fixe à l'ADN et recrute des co-activateurs (plus de 100 co-activateur actuellement connus) qui grâce à leur activité histone acétyltransférase (HAT) permettent le remodelage de la chromatine et l'accessibilité du promoteur du gène à la machinerie transcriptionnelle (Peters et al., 2011).

III. 2. Activité ligand indépendante

En l'absence de ligand, il existe une activité basale du récepteur PPAR qui est liée à la région AF1 de son domaine A/B. En effet, l'hétérodimère PPAR-RXR peut se former en

absence de ligand et se fixer au niveau du promoteur des gènes cibles de PPAR (Sérée et al., 2004, Chui et al., 2005). Il a été montré que le domaine A/B de PPAR γ est capable d'interagir avec le coactivateur p300 de façon ligand-indépendante (Gelman et al., 1999). D'autre part, des co-activateurs peuvent être recrutés au niveau des promoteurs cibles au niveau du PPRE en l'absence de ligand comme dans le cas du gène *aP2* (Guan et al., 2005). La majorité de ces observations porte sur PPAR α et PPAR γ . Dans le cas de PPAR β/δ , il semble que sa fixation sur le promoteur ne nécessite pas la présence de ligand (Wagner et al., 2009).

IV. Régulation de l'activité des PPAR

IV. 1. La trans-activation par les PPAR

L'activité de transactivation des PPAR peut être modulée par différents mécanismes. Parmi eux la phosphorylation de résidus spécifiques par des protéines kinases p38MAPK, JNK, PKA et PKC (Figure 8). Ceci entraîne des changements structuraux et par conséquent des modifications des propriétés de liaison au ligand à l'ADN, la dimérisation du récepteur, le recrutement de cofacteurs, la dégradation après ubiquitinylation (Diradourian et al., 2005). La phosphorylation des PPAR α et γ par les kinases influence différemment leur activité transcriptionnelle activant PPAR α et inhibant PPAR γ . En ce qui concerne PPAR β/δ , il semble que sa phosphorylation par PKA augmente son activité transcriptionnelle (Blanquart et al., 2003).

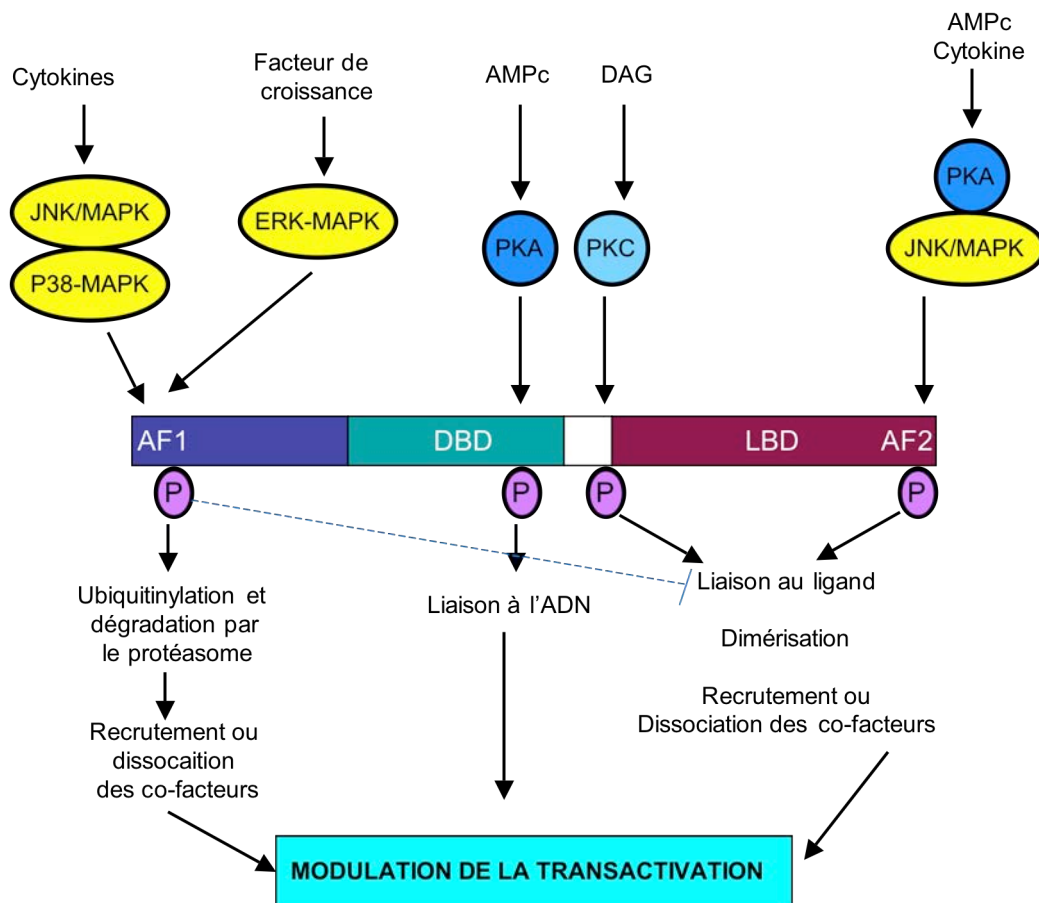


Figure 8 : Mécanismes de modulation de l'activité des PPAR par phosphorylation. La phosphorylation de certains résidus des PPAR par les protéines kinases (p38, JNK, PKA et PKC) entraîne des modifications structurales et des changements de propriétés de liaison au ligand et à l'ADN, la dimérisation du récepteur, la dégradation par le protéasome après ubiquitinylation (Diradourian et al., 2005). DAG (Diacylglycérol).

IV. 2. La trans-répression par les PPAR

Les PPAR sont également capables de réguler de manière négative la transcription des gènes cibles. En effet, les PPAR peuvent interférer avec d'autres voies de signalisation telles

que la voie NF- κ B, STAT et AP-1 (Figure 9). Les mécanismes impliqués regroupent la séquestration du facteur de transcription empêchant sa fixation et sa transactivation au niveau de son gène cible, comme dans le cas du facteur NFAT séquestré par PPAR γ est dissocié du promoteur de l'IL2 (Yang et al., 2000). Un deuxième mode d'action consiste en la séquestration de co-facteurs nécessaires à l'activité de certains facteurs de transcription, mécanisme observé pour la répression du gène *iNOS* (inducible nitric oxide synthase) où le facteur CBP est séquestré par PPAR γ empêchant ainsi la transactivation de *iNOS* par NF κ B et STAT-1 (Li et al., 2000b, Ricote et al., 1998).

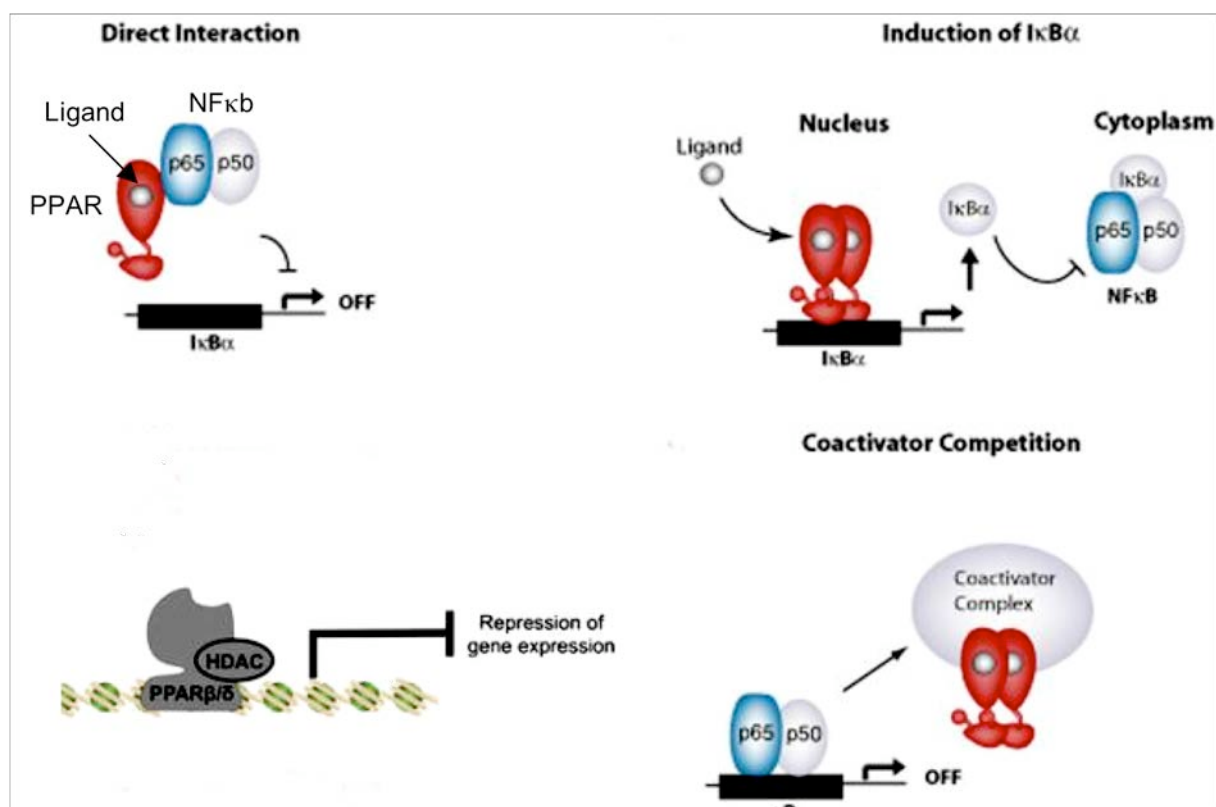


Figure 9 : Mécanismes de la trans-répression des gènes cibles par les PPAR. Les PPAR sont capables de réprimer l'expression des gènes par interaction directe avec les facteurs de transcription impliqués dans leur expression, par l'induction de l'expression des co-répresseurs, recrutement de corépresseur ou réduction de la disponibilité des co-activateurs p65 et p50 de NF κ B (Ricote and Glass, 2007; Peters et al., 2011).

V. Distribution tissulaire de PPAR β/δ

PPAR β/δ semble être exprimé de façon ubiquitaire chez l'homme. Cependant, il est fortement exprimé au niveau du SNC en particulier au niveau du thalamus où il serait impliqué dans la réponse à la douleur (Moreno et al., 2004). Des agonistes de PPAR β/δ sont également capables d'augmenter la différenciation des oligodendrocytes suggérant un rôle de ce récepteur dans la myélinisation des axones (Saluja et al., 2001)

VI. Les ligands et rôle des PPAR β/δ

PPAR β/δ interagit avec les acides gras saturés et insaturés tels que l'acide dihomog- γ -linolénique, l'EPA (épiandrostone) et l'acide arachidonique qui présentent des affinités de l'ordre du micromolaire pour ce récepteur. Les éicosanoïdes, comme les prostaglandines PGA2 et PGD2, sont également capables d'activer PPAR β/δ . Dans le but de définir le rôle physiologique de PPAR β/δ , des efforts ont été déployés pour développer des composés capables d'activer de manière sélective ce récepteur tels que le L-165041 et le GW501516 (Peters et al., 2008), ce dernier a été utilisé dans notre étude (Figure 10)

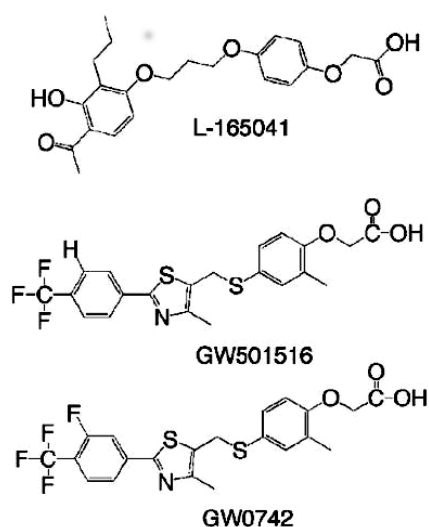


Figure 10 : Ligands synthétiques de PPAR β/δ

En effet, l'utilisation de l'agoniste de PPAR β/δ , le GW501516 a permis de montrer que ce ligand sélectif de PPAR β/δ augmente les taux de cholestérol-HDL tout en diminuant les niveaux de triglycérides circulants et d'insuline chez le singe rhésus obèse (Olivier et al., 2001). Le GW501516 est également capable d'améliorer la sensibilité à l'insuline chez les souris soumises à un régime riche en graisses. Cette amélioration n'est pas observée chez les souris invalidées pour le gène PPAR β/δ (Ppar β/δ -null mice). En test clinique, il a été montré que GW501516 augmente le niveau des HDL circulant chez des sujets sains (Sprecher et al., 2007) alors qu'il réduit le taux circulant des triglycérides, de l'apoB, des LDL-c et le niveau de l'insuline chez des sujets en surpoids (Risérus et al., 2008). Ceci suggère que les ligands de PPAR β/δ pourraient présenter un intérêt thérapeutique potentiel pour le traitement de pathologies associées à des altérations de l'homéostasie des lipides et du glucose y compris le diabète.

PPAR β/δ est également impliqué dans le développement du placenta (Barak et al., 2002) et dans le contrôle de la prolifération et la différenciation des kératinocytes (Peters et al., 2009). Il a été montré que GW501516 est capable d'induire la prolifération et la migration des cellules endothéliales en culture, processus associée à une forte expression et sécrétion du VEGF (vascular endothelial growth factor) et de l'ADRP (adipose differentiation-related protein). Ces effets du GW501516 sont abrogés par la transfection des cellules endothéliales par le dominant négatif de PPAR β/δ (Piqueras et al., 2007).

D'autre part, il a été récemment montré que les ligands de PPAR β/δ sont capables de réduire la production des cytokines et d'améliorer les symptômes liés aux pathologies inflammatoires de la peau (Hatano et al, 2010). D'autres auteurs ont montré que l'activation de PPAR β/δ par le GW501516 prévient l'induction par le TNF α de l'expression de plusieurs gènes cibles du facteur NF- κ B en interférant avec la sous unité p65 de NF- κ B (Figure 11). Un

autre mécanisme implique une réduction de l'acétylation induite par le $\text{TNF}\alpha$ de la sous-unité p65 du facteur NF- κB (Barroso et al., 2011).

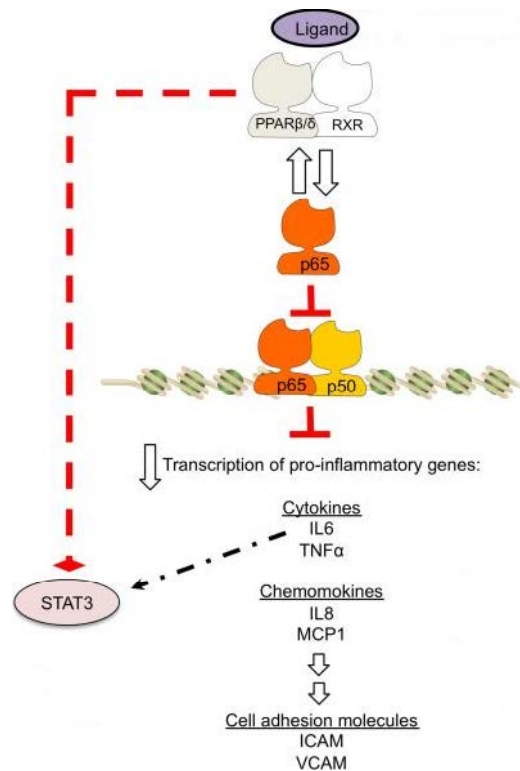


Figure 11 : Régulation de l'inflammation par PPARβ/δ. En présence de signaux pro-inflammatoires, l'activation de PPARβ/δ peut interférer avec la sous unité p65 de NF-κB conduisant à une réduction de l'expression des cytokines et des chimiokines. L'activation de PPARβ/δ peut également interférer avec celle de STAT3 réduisant ainsi l'expression des gènes cibles.

VII. PPARβ/δ et cancer

VII. 1. Rôle de PPARβ/δ dans le processus tumoral

Le rôle de PPARβ/δ dans l'oncogenèse est controversé en particulier dans le cas du cancer du colon. Initialement, il a été rapporté que l'expression de PPARβ/δ est élevée dans le cancer du colon suite à un mécanisme impliquant la voie de l'ACP/β-caténine/TCF4

(adenomatous polyposis coli) qui est un suppresseur de tumeurs (He et al., 1999, Foreman et al., 2009)). En effet, des mutations au niveau du gène de l'APC ont été observées de façon fréquente dans les adénomes et carcinomes colorectaux (Gupta et al., 2000). La surexpression de PPAR β/δ serait due à la perte de fonction de la voie APC- β -caténine. En accord avec ce modèle, les souris *APC*^{min/+} montrent une augmentation de la taille des polypes au niveau de l'intestin mais pas au niveau du colon en réponse à l'activation pharmacologique de PPAR β/δ (Gupta et al., 2004). D'autre part, l'inactivation de PPAR β/δ réduit la tumorigénicité des cellules malignes du colon dans les modèles de xénogreffes chez la souris nude (Park et al., 2001).

VII. 2. Effet pro-carcinogène

Quelques mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet pro-carcinogène de PPAR β/δ . Parmi ceux-ci la stimulation de l'expression de la 3-phosphoinositide-dependent-protein kinase 1 (PDPK1) et de l'integrin-linked kinase (ILK) ainsi que l'inhibition de l'expression de la Phosphatase and tensin homolog on chromosome ten (PTEN) conduisant à l'augmentation de la phosphorylation de AKT et par conséquent à l'augmentation de la survie cellulaire (Di-Poi et al., 2002). Un deuxième mécanisme consiste en l'augmentation de l'expression du VEGF par une voie PPAR β/δ -dépendante suite à l'activation pharmacologique du récepteur conduisant à l'augmentation de la phosphorylation de AKT et de la survie cellulaire (Wang et al., 2006). Cependant, d'autres auteurs ont montré que l'activation de PPAR β/δ n'a pas d'effet sur l'expression du VEGF ou la phosphorylation de AKT dans les lignées cellulaires humaines du cancer du colon HCT116, LS174T et HT29 (Hollingshead et al., 2007). En outre, il a été montré en utilisant les souris *APC*^{min/+} invalidées pour le gène de PPAR β/δ que ce gène n'est pas indispensable pour la formation de polypes dans le colon (Barak et al., 2002).

Récemment, l'analyse de l'expression de PPAR β/δ dans les tumeurs de colon d'origine humaine montre que l'expression de la protéine est plus faible dans ces tissus comparés aux tissus non cancéreux (Foreman et al., 2011). D'autre part, une étude menée sur une cohorte de 141 patients a permis de montrer que les patients présentant un taux d'expression de PPAR β/δ élevé au niveau des tumeurs colorectales primaires survivent plus longtemps que ceux présentant un taux d'expression moins élevé (Yang et al., 2011).

Comme dans le cas du cancer du colon, l'effet de l'activation de PPAR β/δ a été étudié dans le cancer du sein. L'étude menée a montré que l'activation de PPAR β/δ par le ligand GW501516 stimule la prolifération des cellules cancéreuses mammaires humaines MCF7 et T47D (Stephen et al., 2004). D'autre part, l'activation de PPAR β/δ par l'administration du ligand GW501516 produit une augmentation des carcinomes mammaires induits par le dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) chez la souris (Yin et al., 2005). D'autre part, il a été montré que le GW501516 inhibe la prolifération des cellules cancéreuses MCF7. Cependant, dans cette étude, le ligand GW501516 a été utilisé à une concentration très élevée (10 μ M) (Girroir et al., 2008).

Dans le cas du cancer du poumon, l'activation de PPAR β/δ par le ligand spécifique GW501516 induit la prolifération des cellules cancéreuses A549, H23, H157, H1838 et H2106. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cet effet dont l'inhibition de PTEN par un mécanisme PPAR β/δ -dépendant et l'augmentation de la phosphorylation de AKT (Han et al., 2005; Han et al., 2008; Pedchenko et al., 2008). Cependant, cette analyse n'est pas partagée par d'autres auteurs qui n'ont pas observé d'augmentation de la prolifération des cellules A549 et H1838 ou de phosphorylation de AKT après activation de PPAR β/δ par le GW501516 (He et al., 2008).

L'investigation de l'effet de l'activation PPAR β/δ par l'agoniste GW501516 dans le cancer du foie a été réalisée sur la lignée d'hépatocarcinome humain HepG2. Ces études ont

permis de montrer que l'activation de PPAR β/δ stimule la prolifération cellulaire (Glinghammar et al., 2003). Une étude similaire sur les lignées d'hépatocarcinomes Hep3B, et Huh7 indique une stimulation de la prolifération cellulaire par l'agoniste de PPAR β/δ , le GW501516 (Xu et al., 2006).

Un nombre limité d'études ont été menées dans d'autres types de cancers. Dans le cas des gliomes, l'activation de PPAR β/δ par l'agoniste GW501516 produit une modeste augmentation de la croissance cellulaire de lignée de gliome de rat BT4Cn (Berge et al., 2001). De même, l'augmentation de la prolifération cellulaire après activation de PPAR β/δ a été observée dans les lignées cellulaires de cancer de la prostate, PNT1A et LnCaP (Stephen et al., 2004).

A l'opposé, l'activation de PPAR β/δ inhibe la prolifération cellulaire de la lignée de mélanome humain UACC903 (Girroir et al., 2008). De même, la culture de la lignée cellulaire de neuroblastome humain SH-SY5Y en présence d'une concentration élevée en ligand GW0742 inhibe la prolifération cellulaire associée à l'inhibition de l'expression de la cycline D1, PCNA, BCL2 et à la stimulation de l'expression de p16 (Takayama et al., 2006).

*E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE
SEVEN IN ABSENTIA HOMOLOG
SIAH*

I. Introduction

Les gènes *Siah* constituent une famille fortement conservée. Son membre fondateur est le gène *sina* qui a été mis en évidence, pour la première fois, au cours des études de développement de l'œil de drosophile. Ces études de développement chez la drosophile ont montré une succession d'événements, aboutissant à la formation d'unités répétées formées de photorécepteurs et de cellules non-neuronales. En effet, la différenciation du R7, un des photorécepteurs, est sous contrôle du gène Seven IN Absentia (*SINA*) ; sa mutation empêchait les cellules de se différencier en R7 (Carthew and Rubin, 1990). Sur le plan fonctionnel, le rôle de *Sina* est de transmettre le signal venant des récepteurs de type tyrosine kinase Sevenless et Ras. La conservation des gènes *sina* durant l'évolution a mis en évidence leur importance pour la cellule.

II. Les gènes *Siah* chez les mammifères

Les gènes *siah* sont des gènes homologues de *sina* de drosophile. Cette famille de gènes est composée de 3 membres : *Siah-1a*, *Siah-1b* (*Siah-1L*) et *Siah-2*. Les deux gènes *Siah-1a*, *Siah-1b* sont fortement identiques, cependant, le gène *Siah-2* possède une séquence quelque peu différente des deux autres gènes.

II. 1. Les gènes *Siah* chez la souris

Le génome murin renferme les deux gènes *Siah-1a*, *Siah-1b* (*siah-1L*) qui s'expriment, en plus, de deux pseudogènes qui ne s'expriment pas car ils renferment plusieurs codons stop dans leur phase ouverte de lecture (Della et al., 1993). Le gène *Siah-1a* est localisé sur le chromosome 8, alors que *Siah-1b* (*Siah-1L*) est localisé sur le chromosome X (Abbott and Chambers, 1994 ; Holloway et al., 1997). Ils produisent des ARNm très proches, ne différant que de 25 nucléotides (sur 846) dans leurs séquences codantes, cette dernière codant pour des

protéines de 31kDa possédant seulement 6 acides aminés de différence. Les séquences d'ADNc comparées aux séquences génomiques montrent que *Siah-1a*, *Siah-1b* (*Siah-1L*) ont deux exons et un intron, une structure identique au gène *sina*. Le gène murin *Siah-2*, localisé sur le chromosome 3, renferme un intron de 18kb.

II. 2. Les gènes *Siah* chez l'humain

Le génome humain renferme un gène *Siah-1*, qui est très proche du gène *Siah-1a* murin (Holloway et al., 1997 ; Hu et al., 1997). Ils codent la même séquence d'acides aminés. De même, pour les différences en 3'UTR. Un deuxième gène, qui se trouve sur le chromosome X, a été identifié et qualifié de pseudogène car il ne s'exprime pas (Yano et al., 2005).

L'unique gène *Siah* humain qui s'exprime est localisé au niveau du chromosome 16q12-13 (Bani et al., 1996 ; Nemani et al., 1996). Il renferme deux exons et un intron de 14,5kb. L'exon deux est l'unique codant pour la protéine (Hu et al., 1997). Le test de protection à la RNase a révélé la présence de deux transcrits (Matsuzawa et al., 1998). Ces deux transcrits proviennent de l'existence de deux sites d'initiation dans la séquence du gène *Siah-1* humain. Le transcrit le plus court qui code pour la protéine la plus longue a été appelé *Siah-1L*. La partie codante possède 93 nucléotides de plus qui codent pour 31 acides aminés, au niveau de sa partie 5', par rapport à *Siah-1* (Figure 12). Il a été montré que *Siah-1L* possède un promoteur différent de celui de *Siah-1* et qu'il est régulé par p53 (Iwai et al., 2004, Fiucci et al., 2004).

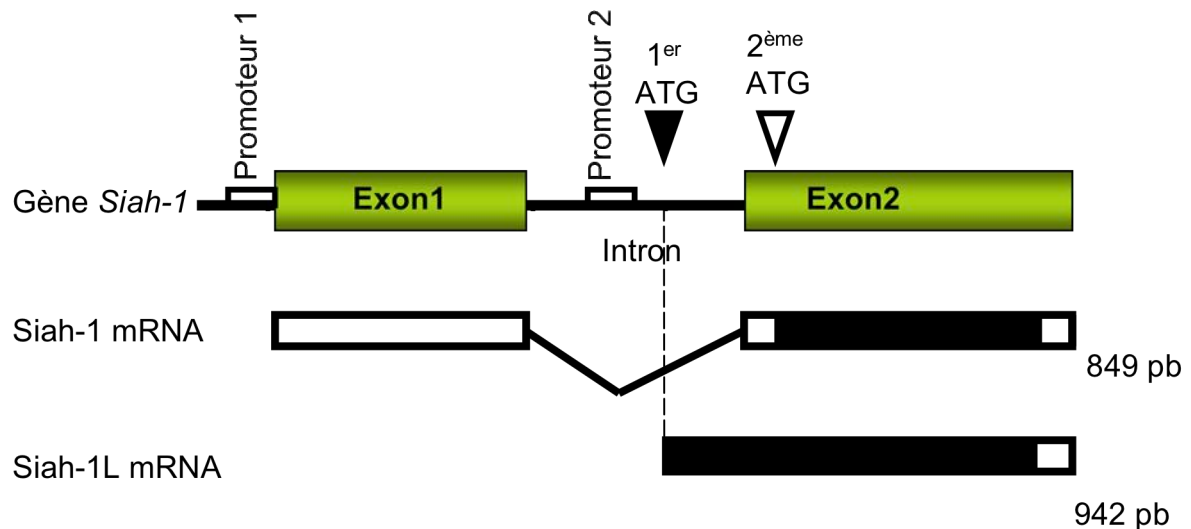


Figure 12 : Représentation schématique de *Siah-1L* et *Siah-1*. Le gène *Siah-1* contient deux exons et un intron. Le transcrit de *Siah-1* est généré par les deux exons après épissage de l'intron et produit une protéine de 282 acides aminés. La transcription de *Siah-1* est sous le contrôle du promoteur 1. Le transcrit de *Siah-1L* est issu d'une partie de l'intron et de l'exon 2. Sa transcription est sous le contrôle du promoteur 2 et génère une protéine de 313 acides aminés. (Iwai et al., 2004).

Le gène humain *Siah-2* se trouve sur le chromosome 3q25 (Holloway et al., 1997 ; Hu et al., 1997) et possède deux exons codants séparés par un intron de 9,8kb. Il a été montré, par Southern blot, l'existence de deux gènes apparentés à *Siah-2* dans le génome humain. Ils se sont révélés des pseudogènes dépourvus d'expression (Holloway et al., 1997).

II. 3. Les gènes *Sina* et *Siah* chez d'autres espèces

Des homologues de *sina* ont été trouvés chez *Schistosoma mansoni* (Fantappie et al., 2003). De même, chez *Arabidopsis thaliana* (Xie et al., 2002). Des gènes également codant pour les protéines *siah* ont été identifiés chez le taureau (Goldammer et al., 2002), chez le poulet (Neiman et al., 2001), chez le xénope (Bogdan et al., 2001), chez la chèvre (Mandon-Pépin et

al., 2003), chez le poisson zèbre (Ro et al., 2003), dans le riz , le chou (brassica) (Brugiere et al., 2000, Cui et al., 2000).

III. Structure et fonction des protéines siah

III. 1. Structure générale

Sur le plan structural, les protéines possèdent une masse moléculaire de 31kDa. Elles présentent une divergence au niveau du domaine N-terminal. Alors que, le domaine ring, C-terminal et le domaine de liaison au substrat (Della et al., 1993) sont fortement conservés (Figure 13). La structure cristallographique du domaine de liaison au substrat présente une forte homologie structurale avec le facteur TNF (tumor necrosis facteur), TRAF (TNF receptor associated factor proteins) (Polekhina et al., 2002). Par conséquent, des études ultérieures ont montré que Siah-2, par son action de dégrader TRAF2, est considérée comme régulateur de la voie de signalisation de TRAF2 (Habelhah, 2002).

La famille des protéines Siah peut interagir avec une multitude de protéines cellulaires, telles que les protéines d'échafaudage (phyllopod), les répresseurs de la transcription, corépresseur de récepteur nucléaire ("NCor"), protéine kid, les oncogènes β -caténine et enfin les suppresseurs de tumeurs des gènes précoces induits par TGF- β .

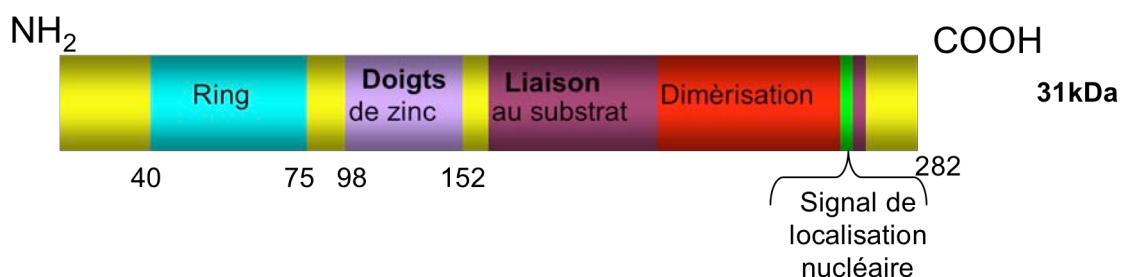


Figure 13 : Structure des protéines Siah. Le domaine ring permet l'ubiquitination des protéines cibles. La séquence signal C-terminale permet l'adressage vers le noyau.

III. 1. 1. Domaine Ring :

Le domaine RING au niveau N-terminal renferme 8 acides aminés cystéines et histidines qui fixent deux ions zinc. Ce domaine est présent dans de nombreuses protéines qui possèdent différentes fonctions allant de la transduction du signal à la pathogénicité virale et la biogénèse des peroxisomes (Borden and Freemont, 1996 ; Saurin et al., 1996). Le rôle de ce domaine est l'ubiquitination des protéines cibles par le biais de son interaction avec l'enzyme de conjugaison avec l'ubiquitine (Hu and Fearon, 1999 ; Lorick et al., 1999).

III. 1. 2. Domaine de liaison au substrat

Le domaine de liaison au substrat (Substrate Binding Domain) au niveau C-terminal a est composé d'un feuillet β à 8 brins (Polekhina et al., 2002). La séquence consensus PxAxVxP permet l'interaction aux protéines Siah. Cette séquence consensus a été trouvée aussi au niveau des protéines SIP (Siah-interacting protein), OBF.1 (B cell Oct-binding protein 1), DCC (Deleted in colorectal cancer , receptor), Synphilin-1 et TIEG1 ((TGF)- β -inducible early gene 1). De même, une séquence similaire a été trouvée sur Numb (un inhibiteur de la voie de signalisation Notch), eEF1 β (Elongation factor 1-beta), Var (Guanine nucleotide exchange factor), Kid (kinesin-like DNA binding protein), N-cor (Nuclear receptor co-repressor 1) et FIR (Fuse-binding protein-interacting repressor). Cependant, les protéines pAPC (anaphase-promoting complex), synaptophysine, mGLutR1 (metabotropic glutamate receptor 1) et l' α -tubuline dépourvues de séquences homologues, se lient aux *siah*. La recherche par homologie de séquence a permis d'identifier la plectine-1 comme partenaire des Siah (House et al., 2003).

III. 1. 3. Domaine d'oligomérisation

Le domaine d'oligomérisation localisé au niveau C-terminal, favorise la dimérisation des protéines Siah et sina (Hu et al., 1997 ; Maturawa et al., 1998 ; Hu and Fearon, 1999). Le dimère formé, *via* le contact de feuillet β antiparallèle de chaque monomère, possède une constante d'association de 10^{-8} mol^{-1} (Polekhina et al., 2002). Une large surface concave située à l'interface du dimère, est capable de se lier à la protéine SIP.

III. 1. 4. Domaine de localisation nucléaire

Carthew et collaborateur ont décrit initialement une localisation nucléaire pour les protéines *sina* (Carthew and Rubin, 1990). De plus, l'étude de Roperch a montré également une accumulation nucléaire des protéines Siah-1 (Roperch et al. 1999). Enfin, des études ultérieures ont montré, que la plupart des protéines Siah renferment un signal de localisation nucléaire au niveau C-terminal (Matsuzawa et al., 1998 ; Fantappie et al., 2003).

IV- Implications biologiques des protéines Siah

IV. 1. Rôle des protéines Siah dans la voie de l'ubiquitination

Les protéines de la famille Siah sont des E3 ligases, d'où leur implication dans la voie de l'ubiquitination. Cette voie est impliquée dans l'élimination des protéines par la voie du protéasome. La protéine ubiquitine est conservée au cours de l'évolution et présente dans tous les compartiments subcellulaires de toutes les cellules, elle est dite ubiquitaire. Elle est composée de 76 acides aminés servant de signal de protéines à éliminer. Une cascade de réactions enzymatiques (E1, E2, E3) permet, de lier de manière covalente et ATP dépendante une chaîne de molécules d'ubiquitine, sur des résidus lysines des protéines cibles (Figure 14). Cette modification post-traductionnelle a pour but la reconnaissance puis la dégradation de la

protéine ainsi marquée, par le protéasome (Varshavsky, 1997 ; Ciechanover, 1998, Ciechanover and Schwartz, 1998).

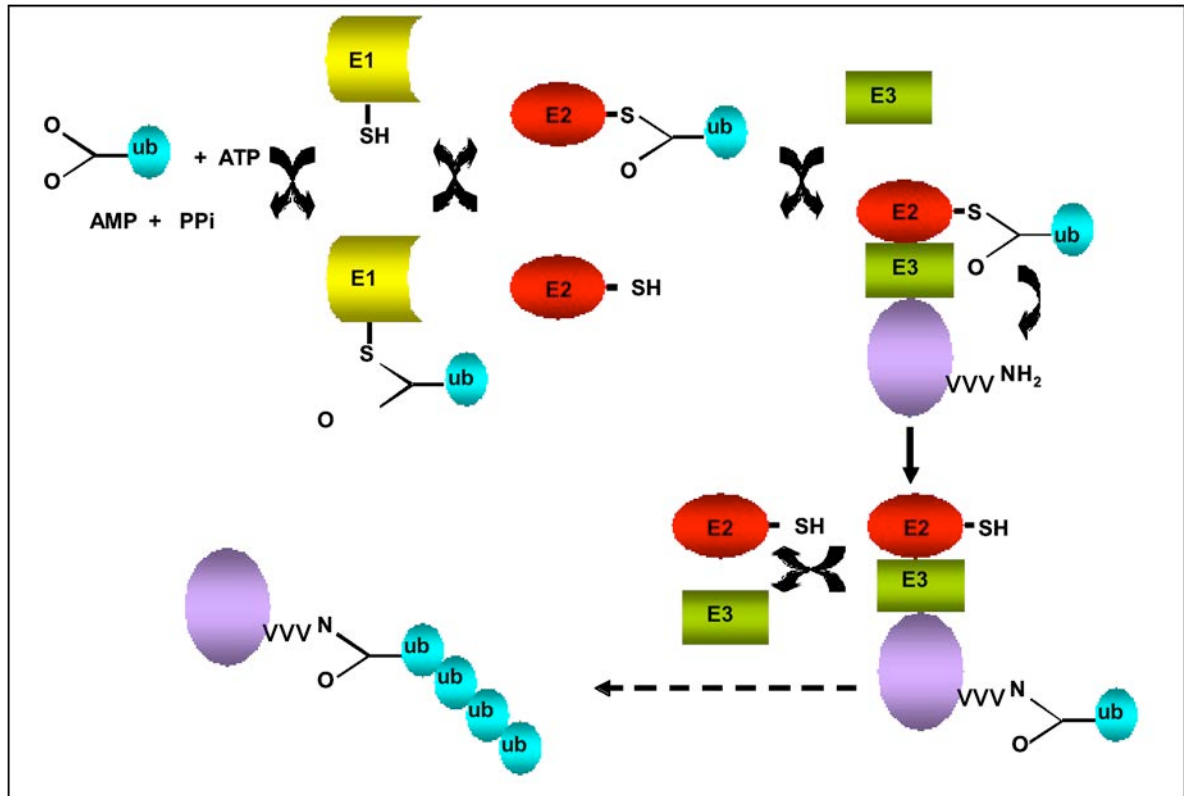


Figure 14 : Représentation schématique des étapes de la réaction d'ubiquitination. La cascade de réactions enzymatiques fait intervenir trois enzymes (E1, E2 et E3) d'une manière séquentielle conduisant à l'ubiquitination des protéines cibles. Activation de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine par l'enzyme E1, transfert de l'ubiquitine de E1 à l'enzyme E2 et transfert de l'ubiquitine de E2 sur une lysine de la protéine cible par l'enzyme E3. Siah peut faire partie d'un complexe E3 ligase, mais elle peut également agir seule en tant que E3 ligase.

L'étape 1 est catalysée par l'enzyme E1 (ubiquitin-activating enzyme), qui est ATP-dépendante. Elle forme un pont thio-ester entre une cystéine de l'enzyme E1 et l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine. La deuxième étape est un transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E1

vers une cystéine de l'enzyme E2. Ensuite, l'ubiquitine ligase E3 transfère l'ubiquitine lié à l'enzyme E2 vers une lysine de la protéine cible ou vers une autre ubiquitine déjà fixée à la protéine cible. C'est l'enzyme E3 qui est spécifique de certaines protéines (Figure 14). Il existe une seule E1 chez l'homme et plus de 20 enzymes E2. L'enzyme E3 ligase confère la spécificité de substrat pour l'ubiquitination, elle est l'élément clé de ce processus de dégradation (Shumueli and Oren, 2005).

Les protéines peuvent subir une mono ou une poly-ubiquitination. Il faut quatre ubiquitines pour qu'une protéine soit dégradée par le protéasome. La mono-ubiquitination peut conduire les protéines membranaires vers la voie de l'endocytose et la dégradation par les lysosomes. Une voie de dégradation des protéines indépendante de la voie ubiquitine-protéasome. La mono-ubiquitination serait aussi engagée dans la réparation de l'ADN et l'export nucléaire de P53 (Hicke, 2001). En revanche, la poly-ubiquitination conduit les protéines vers la voie de dégradation par le protéasome, elle est également impliquée dans la réparation de l'ADN et l'activation des kinases (Sun and Chen, 2004). Les protéines Siah possèdent cette double action de mono ou poly-ubiquitination de ces protéines cibles. D'ailleurs, Siah-2 induit *in vitro* à la fois la mono et la poly-ubiquitination de la synphilin-1 (Liani et al 2004). L'activité E3-ligase de *sina* a été montrée par deux équipes indépendantes (Carthew et Rubin, 1990 ; Lorick et al., 1999). Plusieurs équipes ont souligné l'implication du domaine Ring dans la dégradation des protéines cibles de Siah par le protéasome (Hu and Fearon, 1999). En résumé, Siah interviennent dans la dégradation de plusieurs protéines : β -caténine, c-myb, BOB1/OBF1, N-COR, DCC, TIEG1, TRAF2, Numb, Bag-1 (BCL2-associated athanogene), Kid et la synaptophysine.

IV. 2. Rôle des protéines Siah dans le développement de l'organisme

Au niveau de l'organisme, les protéines Siah interviennent dans l'embryogénèse. Elles contrôlent la croissance et le développement neuronal. Elles participent à la formation des os et à l'hématopoïèse. Elles possèdent une activité au niveau des organes sexuels. La génération de souris KO pour chacun des gènes *siah* a permis de déterminer l'activité et la fonction propres à chacune des protéines *siah*. Les souris KO ont des phénotypes différents. Le travail de Frew sur les souris KO pour *Siah-1b* (*Siah-1L*), a montré le rôle majeur de *siah-1b* dans le développement embryonnaire (Frew et al., 2002). Un autre travail a montré que la protéine Siah-1 humaine favorise la dégradation de la protéine Numb, qui bloque la voie de Notch chez la drosophile. Cette voie Notch est impliquée dans l'activation de plusieurs gènes nécessaires à l'embryogenèse (Susini et al., 2002).

Sur le plan de la formation des os, les souris *Siah-1a* mutantes possèdent un nombre important d'ostéoclastes et un taux faible d'ostéoblastes, ceci déclenche une ostéopénie sévère (Frew et al., 2004).

An niveau des organes sexuels, les souris KO pour *Siah-2* sont fertiles, alors que les *siah-1a* KO sont stériles (Frew et al., 2003).

IV. 3. Rôle des protéines Siah au niveau de la cellule

La régulation des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, la mitose, la méiose ou l'apoptose confèrent à Siah le contrôle des différentes étapes du cycle cellulaire. En effet, l'implication des protéines Siah dans le cycle cellulaire a été démontrée par plusieurs équipes indépendantes. Les travaux de Frew et al., (2002) ont démontré que le taux d'expression des Siah-1 change au niveau du cycle cellulaire (Frew et al., 2002). Cette expression est contrôlée positivement par les protéines P53 et P21/Waf1/Cip1, qui sont déterminantes dans la progression du cycle cellulaire (Liu et al., 2001). Il a été montré que Siah induit l'arrêt de

croissance en inhibant la transition G2/M chez le poisson (Ro et al., 2004). Siah-1 et Siah-2 induisent la dégradation de CtIP (CTB-interacting protein) par le protéasome (Germani et al., 2005) libérant ainsi BRCA1, gène suppresseur de tumeur impliqué dans la réparation de l'ADN, la croissance cellulaire, la régulation transcriptionnelle (Li et al., 2000). Il en résulte une transactivation des gènes majeurs du cycle cellulaire p21/waf1/cip1, gadd45 et tbp (transcription facteur IIB). Siah régule aussi la protéine Numb dont la surexpression inhibe la prolifération cellulaire (Susini et al., 2001). De plus, Siah-1 induit l'ubiquitination suivie de la dégradation de kid (Germani et al., 2000). La protéine kid est impliquée dans l'alignement des chromosomes le long de la plaque métaphasique (Afshar et al 1995). Pour cette raison, l'anaphase ne peut démarrer qu'après la dégradation de kid par APC (anaphase Promoting Complex) et le protéasome. Il a été également montré que la protéine Siah-1a interagit avec la protéine Bag-1 (bcl-2-associated athanogene), cette dernière se lie avec Bcl-2 et favorise ainsi la survie cellulaire (Luders et al., 2000).

Siah-1 et Siah-2 sont des médiateurs de la dégradation de la β -caténine (Matsuzuwa and Reed, 2001 ; Topol et al., 2003). L'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine est cruciale pour le mécanisme d'apoptose. Iwai et al., (2004) ont montré, *in vivo* en réponse à p53, que c'est la forme longue de Siah-1, Siah-1L qui serait responsable de la dégradation de la β -caténine (Iwai et al., 2004). L'apparition de mutations ponctuelles sur Siah-1 prévient son effet de dégradation de la β -caténine et par conséquent l'induction de l'apoptose (Kim et al., 2004).

Siah-2 induit l'ubiquitination et la dégradation de TRAF-2 en réponse à des signaux apoptotiques (Habelhah et al., 2002). Siah-1 peut lier la GAPDH-S-nitrosylée. Le complexe Siah-GAPDH-S-nitrosylée devient stable, puis transloqué dans le noyau où il active l'apoptose, *via* la dégradation des protéines nucléaires (Yego and Mohr, 2010).

Les protéines Siah-1 et Siah-2 contrôlent la protéine HIF-1 α en réponse à l'hypoxie. Cette régulation du facteur HIF-1 α se joue au niveau des protéines prolyl-hydroxylases PHD1 et

PHD 3 (Habelhah et al., 2004), qui sont à leur tour impliquées dans la dégradation de HIF-1 α (Nakayama and Ronai, 2004). Les protéines PHD sont préservées, en l'absence de Siah, et favorisent la dégradation des protéines HIF-1 α . L'hypoxie favorise une transcription accrue de Siah-2 (Nakayama et al., 2004) ce qui induit l'activation de HIF-1 α en réponse au stress.

V. Siah et cancers

Les protéines Siah jouent un rôle important dans plusieurs voies de signalisation qui sont impliquées dans la progression et la propagation du cancer. En effet, plusieurs fonctions physiologiques sont sous contrôle des Siah telles que la progression du cycle cellulaire, la prolifération, la sénescence, la différenciation et l'apoptose. Ces différentes fonctions sont contrôlées par un mécanisme dépendant de l'ubiquitination puis la dégradation par le protéasome. En effet, une perturbation du taux de dégradation par le protéasome peut engendrer le développement et la progression de tumeurs. Par conséquent, l'utilisation de molécules capables, d'une part, de bloquer la dégradation protéasomale des suppresseurs de tumeurs ou d'autre part, d'accélérer l'élimination des protéines oncogènes *via* la dégradation protéasomale, sont les meilleurs candidats actuels pour le développement d'agents anticancéreux.

Les Siah ont été décrites à la fois comme oncogéniques et suppresseurs de tumeur. Leur rôle dans la progression des tumeurs reste controversé. Néanmoins, elles sont considérées comme de nouvelles cibles thérapeutiques prometteuses pour le développement de nouveaux médicaments anticancéreux.

Il a été montré que les protéines Siah sont impliquées dans la progression de plusieurs types de cancers incluant le cancer du poumon, du pancréas, du sein, de la prostate et le mélanome (Ahmed et al., 2008 ; Schmidt et al., 2007 ; Moller et al., 2009 ; Qi et al., 2010).

Dans les cellules cancéreuses de sein positives pour le récepteur des estrogènes, l'estrogène induit le taux des protéines Siah, favorisant ainsi une dégradation nucléaire du corépresseur I (N-CoR). Cela conduit à une réduction de l'effet répressif du N-CoR sur l'expression des gènes responsables de la croissance tumorale (Frasor et al., 2005).

Siah-2 est souvent surexprimé dans des carcinomes mammaires (Roh et al., 2004). Siah-1 est plutôt moins exprimé chez les patients atteints de cancer de colon ou de sein (Nambiar et al., 2002). Il a été également montré que, l'expression de Siah-1 est dérégulée dans les lymphomes (Martinez-Climent et al., 2003). Dans le cancer agressif du sein humain, l'expression de Siah-2 a été corrélée avec l'expression de la p53, et également avec l'augmentation du nombre de copie du gène *Siah-2* (Chan et al., 2011).

L'expression de Siah est augmentée dans la majorité des différents types de cancers du poumon comparé aux tissus normaux (Ahmed et al, 2008). D'ailleurs, l'utilisation du dominant négatif des protéines Siah réduit la croissance des cellules cancéreuses du poumon. L'inhibition ou le knockdown de Siah-2 réduit l'expression de ERK et la prolifération cellulaire ainsi que la tumorigenèse des cellules cancéreuses humaines du poumon A549 dans la souris nude (Ahmed et al, 2008).

D'autre part, des études antérieures ont montré, en particuliers que les Siah-1 sont capables de réprimer les protéines tumorales, en raison de leur surexpression dans les cellules transformées. L'introduction des Siah dans les cellules U937 supprime leur tumorigenèse dans les souris Scid/Scid (Telerman et al., 2009). En plus, des études ultérieures ont montré l'implication des Siah dans la dégradation de l'oncogène β -caténine *via* leurs interactions avec les protéines APC et SIP (siah-interacting protein) (Liu et al., 2001).

Du fait que les protéines Siah sont des co-suppresseurs de tumeurs, on s'attend à trouver des mutations de Siah au niveau des cancers humains. Cependant, jusqu'à présent seulement deux mutations ont été identifiées dans le gène *Siah-1* de patients atteints de cancer gastrique.

Ces mutations favorisent une stabilisation de la β -caténine et une apoptose défailante (Kim et al., 2004).

Le dommage aux ADN (DNA dommage) déclenche une phosphorylation inhibitrice des Siah-1 au niveau du résidu de la sérine 19, catalysée par les kinases ATM/ATR (Winter et al, 2008 ; Kim et al., 2009). La kinase HIPK2, suppressif de tumeur, phosphoryle Siah-2 au niveau du N-terminal les sérines 26, 28, et 68. Cette phosphorylation inactivante stabilise la protéine Siah-2 et empêche ainsi son interaction avec HIPK2, qui est elle-même une cible des Siah (Calzado et al., 2009) (Figure 15).

Un des rôles important des Siah a été démontré par leur implication dans la voie de signalisation d'hypoxie, via la régulation du facteur clé proangiogénique HIF-1 α . En effet, les protéines Siah ciblent la dégradation des PHD qui sont responsables des modifications post-transcriptionnelles du facteur HIF-1 α , permettant la stabilisation de ce dernier dans des conditions d'hypoxie (Habelhah et al, 2002). L'ensemble de ces données suggère le potentiel inhibiteur de la voie hypoxie protumorigénique par l'inactivation des Siah (Figure 15).

Les protéines Siah ont été identifiées comme cible de la voie de signalisation Ras chez la drosophile (Carthew et al, 1994). Les tumeurs pancréatiques sont caractérisées par une forte fréquence de mutations k-Ras. Ce qui fait d'elles un excellent modèle pour tester le rôle des Siah dans les cancers impliquant Ras. L'étude de Schmidt (Schmidt et al, 2007) a montré qu'un dominant négatif des Siah ou leur inhibition par shRNA potentialisent la croissance de xénogreffe des cellules pancréatiques tumorales chez la souris. La phosphorylation d'ERK est réduite dans ces cellules suggérant que Siah agit sur la voie RAS/MEK/ERK. D'autres études ont montré que Siah-2 favorise la dégradation des Sprouty 2 (Nadeau et al, 2007). Ce dernier est un régulateur négatif de Ras montrant le mécanisme potentiel par lequel la perte de Siah peut conduire à l'altération des fonctions de Ras (Figure 15).

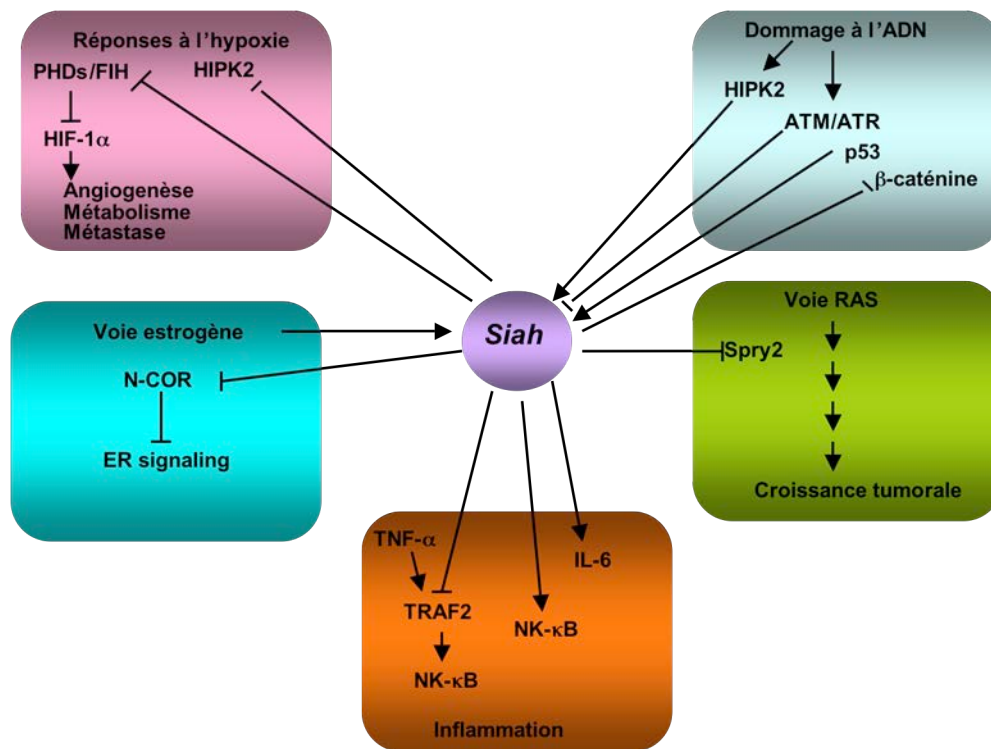


Figure 15 : Implication des protéines Siah dans le cancer : Les protéines Siah sont liées à différentes voies de signalisation dans le cancer. **Hypoxie :** les protéines Siah polyubiquitine les régulateurs négatifs de la voie de signalisation d'hypoxie, PHD et FIH, aboutissant à la stabilisation du facteur HIF-1 α dans les conditions d'hypoxie. Les conditions d'hypoxie favorisent l'interaction des Siah avec HIPK2 pour faciliter sa dégradation et réprimer l'expression des gènes hypoxie inducibles. **Voie estrogène :** Siah favorise la dégradation nucléaire du corépresseur I (N-CoR) conduisant à une réduction de l'effet répressif du N-CoR sur l'expression des gènes responsables de la croissance tumorale. **Inflammation :** Siah sont capables de réguler la stabilité de TRAF et de ce fait réguler l'inflammation. **Dommage aux ADN :** p53 induit l'expression des protéines Siah. Les protéines Siah régulent *via* un complexe multiprotéique, la dégradation de la β -caténine. Les cassures de l'ADN préviennent l'interaction des protéines Siah avec la p53 kinase HIPK2 par le biais des ATM/ATR. **Voie Ras :** Siah favorisent la dégradation de Sprouty 2 qui est un régulateur négatif de Ras.

PRESENTATION

DE

L'ETUDE

Les glioblastomes sont des tumeurs cérébrales malignes primitives dont le pronostic est sévère en raison de leur agressivité et de l'absence de traitement efficace. Malgré les progrès récents en chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et d'autres thérapies moléculaires, la médiane de survie s'établit en effet à un an et moins de 10% de patients sont encore en vie après cinq ans. Il y a donc un besoin évident de développer de nouvelles thérapies ciblées à fort impact sur les glioblastomes. Pour cela, une meilleure compréhension des mécanismes de tumorigenèse et de la prolifération tumorale ainsi que la caractérisation des voies de signalisation impliquées sont importantes pour l'identification de cibles et le développement de thérapies ciblées.

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxisomes et en particulier PPAR β / δ est fortement exprimé dans le cerveau où il jouerait un rôle important dans le contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire. De façon intéressante, PPAR β / δ est surexprimé dans différents cancers humains et de ce fait pourrait jouer un rôle important dans l'initiation et la progression tumorale. En effet, l'activation du récepteur PPAR β / δ par des ligands spécifiques favorise la prolifération des lignées cellulaires du cancer de la prostate, du sein et du poumon.

Des études de transcriptomique réalisées au laboratoire sur la lignée de glioblastome humain T98G ont révélé que l'activation du récepteur PPAR β / δ par le ligand spécifique GW501516 induit fortement l'expression de Siah-1L (Hossam Murad). Siah-1L est l'homologue humain du gène de la drosophile seven in absentia (*Sina*) qui appartient à la famille des E3 ubiquitine ligases. Les protéines Siah jouent un rôle clé dans la régulation de la stabilité des protéines par la voie ubiquitine-protéasome qui est maintenant reconnu comme un mécanisme majeur de la régulation d'un large éventail de processus cellulaires. Siah sont également impliquées dans le processus cancéreux en augmentant le potentiel tumorigénique

en particulier des hépatocarcinomes humains par la stimulation de la prolifération et la migration cellulaires.

Notre travail s'inscrit dans l'étude du rôle de PPAR β/δ et du gène *Siah-1L* dans le processus tumoral des glioblastomes. Il vise à étudier le rôle du récepteur PPAR β/δ dans le processus tumoral des glioblastomes. En particulier déterminer l'effet de l'activation du récepteur PPAR β/δ par le ligand spécifique GW501516 sur la prolifération, la migration et l'apoptose de la lignée cellulaire du glioblastome humain T98G. Il a également pour objectif d'étudier le rôle de *Siah-1L* dans le processus tumoral des glioblastomes T98G. Ce gène est induit par le ligand de PPAR β/δ , le GW501516 dans les cellules cancéreuses T98G selon une étude transcriptomique menée au laboratoire.

Le dernier objectif du travail consiste en le clonage du promoteur du gène *Siah-1L* humain et d'étudier sa régulation par PPAR β/δ et l'identification des mécanismes moléculaires et des facteurs impliqués.

MATERIEL ET METHODES

I Matériel

I.1. Lignées cellulaires et réactifs de culture cellulaire

La lignée de glioblastome multiforme T98G, le chondrosarcome humain SW1353, la lignée d'adénocarcinome humain de sein MCF7 et la lignée d'hépatocarcinome humain HepG2 sont obtenues auprès de la banque de cellules "American Type Culture Collection" (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France). Le milieu de culture DMEM, le sérum de veau fœtal (SVF) et les antibiotiques sont obtenus auprès de life Technologies (France).

Les inserts de culture utilisés pour les tests de cicatrisation et d'invasion cellulaires proviennent d'Ibidi (Biovalley, Marne-la-Vallée, France).

I.2. Réactifs de biologie moléculaire

L'ADN génomique cellulaire a été extrait à l'aide du kit "GenomicPrep DNA isolation" (GE Healthcare, Amersham, Grande-Bretagne). Le kit d'extraction des ARN totaux "RNeasy Kit" est fourni par Qiagen (Allemagne); le vecteur de clonage TopoTA cloning, les cellules compétentes Top10 sont fournis par Life Technologies (France). La réaction de transcription inverse (reverse transcriptase, RT) est réalisée avec le kit super Script Reverse Transcriptase (Clontech). L'amplification par polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction, PCR) est réalisée au moyen du kit SYBR Green Master Mix (Qiagen). L'agoniste de PPAR β/δ , le GW501516 est fourni par Alexis Biochemicals (France). ExGen 500 est obtenu auprès d'Euromedex (France) et Dual-Luciferase® Reporter Assay System est fourni par Promega (France). Les clones I.M.A.G.E des ADNc codant PPAR β/δ et Siah-1L humains ont été obtenus auprès de ImaGenes (Allemagne).

I. 3. Réactifs biochimiques

Le réactif utilisé pour le développement des immunoblots en chimioluminescence "Western Blot Reagent, Luminol" ainsi que les anticorps primaires anti-Siah1 sont fournis par

Santa Cruz Biotechnology (Allemagne). Les anticorps anti-PPAR ont été développés au laboratoire. Les films Hyperfilm MP utilisés pour la chimioluminescence sont fournis par Amersham Biosciences (GE Healthcare).

II. Méthodes expérimentales

II.1. Traitement des glioblastomes

Les cellules T98G sont cultivées dans le milieu DMEM contenant 10% de SVF jusqu'à 80% de confluence dans des plaques de six puits. A ce stade, le milieu est remplacé par du DMEM sans sérum et les cellules sont cultivées pendant toute la nuit. Les cellules sont ensuite traitées par le GW501516 à une concentration de 100 nM ou par le DMSO (contrôle) pendant 24h avant d'être récoltées pour l'analyse de l'expression de Siah-1L par RT-PCR en temps réel.

II. 2. Purification plasmidique

Les bactéries portant le plasmide d'intérêt sont cultivées dans le milieu LB et récoltées par centrifugation à 5000 rpm pendant 20min à 4°C, le culot bactérien est suspendu dans une solution P1 (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8) puis lysé pendant 5min dans une solution P2 (200 mM NaOH, 1% SDS (p/v)). L'ADN génomique est précipité après dénaturation par P2 par addition de P3 (3 M acétate de potassium, pH 5.5) et centrifugé à 16000 rpm pendant 20min à 4°C. Le surnageant est déposé sur une colonne Qiagen TIP100 équilibrée au préalable par une solution de QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% isopropanol (v/v), 0.15% Triton[®] X-100 (v/v)). Après lavage par une solution de QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% isopropanol (v/v), pH 7), le plasmide est élué par une solution de QF (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15% isopropanol (v/v), pH 8.5). Le plasmide ainsi obtenu est précipité par 0,7 volumes d'isopropanol après centrifugation à 15000 rpm durant

20min à 4°C. Après lavage du culot à l'éthanol 70% et séchage, le plasmide est repris dans de l'eau ultrapure. La qualité et la quantité d'ADN ont été évaluées par spectrophotométrie sur un appareil Nanodrop.

II. 3. Transfection des cellules T98G par le promoteur Siah-1L

Les cellules T98G sont cultivées dans le milieu DMEM contenant 10% (v/v) de SVF en plaques à 24 puits jusqu'à 80% de confluence. Les cellules sont transfectées avec 2 µg d'ADN correspondant à la construction du promoteur étudié et 100 ng du vecteur pRL-TK (Promega) exprimant la luciférase Rénilla (contrôle interne). Dans le cas de l'étude de l'effet de PPAR β/δ sur l'activité transcriptionnelle du promoteur, 100 ng du plasmide exprimant ce récepteur ou le vecteur vide correspondant sont co-transfectés avec le promoteur. La transfection des cellules est réalisée au moyen d'un polymère d'éthylène-imine (PEI) linéaire, l'ExGen 500 (Euromedex). Le PEI et les plasmides sont mis en contact dans une solution de NaCl 9‰ (p/v) stérile et incubés 10min à température ambiante avant dépôt sur les cellules en présence de milieu de culture sans SVF. Après 2h d'incubation, le milieu est remplacé par du DMEM contenant 10% de SVF. L'activité luciférase est mesurée 24h après la transfection. Dans le cas des traitements au GW501516, les cellules sont mises en culture dans le milieu DMEM sans SVF toute la nuit puis traitées par l'agoniste de PPAR β/δ à une concentration de 100 nM pendant 24h.

II. 4. Essai luciférase

L'essai luciférase est réalisé avec le kit Dual Luciferase Assay (Promega) qui permet d'estimer à la fois l'activité luciférase Firefly du promoteur étudié et l'activité Renilla du contrôle interne. Les cellules sont lysées par addition de "Passive Lysis Buffer" et incubation 15min à température ambiante sous agitation. Le lysat est centrifugé pendant 30s à 12000 rpm

à 4°C, ensuite mis en contact avec un réactif contenant le substrat de la luciférase Firefly, la “Beetle luciferin“. La luminescence produite est estimée grâce à un luminomètre (Berthold). Le substrat de la Renilla luciférase, la coelenterazine, est alors ajouté et l’activité du contrôle interne est estimée comme précédemment. L’activité du promoteur étudié est normalisée par rapport à celle du contrôle interne.

II. 5. Extraction des ARN totaux

L’extraction des ARN totaux des différents lignées des cellules cancéreuses a été effectuée à l’aide du kit RNeasy plus mini Kit (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. Les cellules sont lysées dans les puits des plaques 6 puits par addition de 600 µl du tampon RLT contenant du thiocyanate de guanidinium et du β-mercaptoéthanol. Un volume d’éthanol 70% est ensuite ajouté et le mélange est déposé sur une mini-colonne de silice. La colonne est centrifugée 15s à 12000 rpm puis lavée par 700 µl du tampon RW1 et centrifugée pendant 15s à 12000 rpm. La colonne est lavée deux fois par 500 µl du tampon RPE et centrifugée à 16000 rpm pendant 2min. Enfin, les ARNm totaux sont élués de la colonne par 30 µl d’eau “RNase-free“. La qualité et la quantité d’ARN sont évaluées par spectrophotométrie sur un appareil Nanodrop (Labtech, France).

II. 6. Transcription inverse (RT)

La RT a été réalisée à partir de 500 ng d’ARN totaux dans un volume de 20 µl contenant un mélange d’héxamère et d’oligoDT, 500 µM de dNTP, 4 µl du tampon de RT (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂) et 50 unités de transcriptase inverse (PrimeScript™ Reverse Transcriptase). Le mélange réactionnel est incubé à 42°C pendant 1h. La réaction enzymatique est arrêtée par chauffage à 70°C pendant 15min.

II. 7. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel

La PCR en temps réel est effectuée avec le système LightCycler® 2.0 (Roche) à l'aide du SYBR® Green Master Mix (Qiagen). Le mélange réactionnel contient le SYBR Green RT-PCR Master Mix, 0,5 µM d'amorces *Siah-1L* (sens 5'ACCAGCGGCCAGGACAAGGA3' et anti-sens 5'TCAGGGCAGGCACCCTCTGG3') et 2 µl de produit de RT dilué au 1/10^{ème}. Le gène cible et le gène de référence étant respectivement ceux de *Siah-1L* et de RP29 (protéine ribosomale S29). La PCR est réalisée en 3 étapes : une première étape de dénaturation et d'activation à 95°C pendant 10min, ensuite 40 cycles : dénaturation à 95°C pendant 15s; hybridation à 55°C pendant 25s; élongation à 72°C pendant 20s. L'analyse des résultats est réalisée grâce au logiciel "RelQuant" (Roche Diagnostic, France). Elle est suivie de la vérification de la taille de l'amplicon sur un gel d'agarose. Les résultats sont analysés en utilisant le logiciel RNA validation data analysis (SABiosciences corporation, Frederick, MD, USA). L'analyse est réalisée par la méthode de comparaison des C_T . Le taux d'induction est calculé à partir de la valeur du $\Delta\Delta C_T$ en utilisant la formule $2^{-\Delta\Delta C_T}$ et exprimé de façon relative au contrôle.

II. 8. Clonage du promoteur du gène *Siah-1L* humain

La séquence du promoteur du gène *Siah-1L* humain correspondant à la région -1572 à +146 a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique en utilisant les oligonucléotides sens 5'GGGTCTGAATCCAAGTGTAGATGACTC3' et anti-sens 5'GTCTCCCAAGTTTGTTTCTCCAGA3' et la polymerase advantage GC 2 Polymerase (Clontech). Deux sites de restriction, KpnI et HindIII, sont introduits aux extrémités 5'- et 3', respectivement par PCR. La séquence du promoteur de *Siah-1L* a été sous-clonée entre les sites KpnI et HindIII du vecteur pGL3basic (Promega, Madison, WI, USA).

II. 9. Délétions successives des séquences 5' du promoteur Siah-1L

A partir de la séquence promotrice -1572/+146, différentes troncations successives de la partie amont du promoteur ont été réalisées par la technique de PCR en utilisant des oligonucléotides 5' correspondant à la troncation et contenant un site de restriction *KpnI* et un oligonucléotide 3' correspondant à l'extrémité avale du promoteur et contenant un site de restriction *HindIII*. Les produits de PCR ont été digérés par les enzymes de restriction et sous-clonés dans le vecteur pGL3 basic préalablement digéré par les mêmes enzymes en amont du gène codant pour la luciférase. Ainsi les plasmides pGL3-basic contenant les séquences du promoteur -1572/+146, -1350/+146, -1050/+146, -710/+146, -470/+146 et -140/+146 ont été construits.

II. 10. Construction des plasmides exprimant PPAR β/δ et Siah-1L

Les séquences codant PPAR β/δ et Siah-1L ont été amplifiées par PCR à partir des clones I.M.A.G.E en utilisant des oligonucléotides contenant en 5' et 3' les sites de restriction *BamHI* et *HindIII* dans le cas de PPAR β/δ et les sites de restriction *EcoRI* et *XhoI* dans le cas de Siah-1L. Les fragments d'ADN ainsi amplifiés ont été sous-clonés dans les vecteurs d'expression pSG5 et pCMV, respectivement pour générer les plasmides pSG-PPAR β/δ et pCMV-Siah-1L capables d'exprimer les deux protéines recombinantes.

II. 11. Mutagenèse dirigée de la séquence promotrice Siah-1L

La mutation du site PPAR-733 au niveau de la séquence du promoteur Siah-1L a été réalisée par la technique de mutagenèse dirigée par PCR à l'aide du kit Quickchange™ (Stratagène, La Jolla, CA) au moyen des amorces sens 5'GATGCAATGCAAATCATTGGCGCAGGACTTTA^{3'} et antisens 5'TAAAGTCCTGCGCCAATGATTTGCATTGCATC^{3'} et du vecteur pGL3-basic contenant

la séquence -1583/+146 du promoteur Siah-1L (matrice). Le mélange réactionnel consiste en 125 ng d'oligonucléotides sens et antisens portant la mutation, 200 μ M de dNTP, 5 μ l de tampon concentré 10x, 100 ng de plasmide (matrice), 2,5 U de *PfuTurbo*[®] DNA polymérase dans un volume final de 50 μ l. L'amplification a été effectuée dans les conditions suivantes : un cycle à 95°C pendant 30s puis 16 cycles à 95°C pendant 30s, 55°C pendant 1min et 68°C pendant 8min. Les produits de PCR sont ensuite digérés par l'enzyme de restriction *DpnI* afin d'éliminer les brins parentaux non mutés. Ensuite, 3 μ l de produit de digestion ont été utilisés pour transformer 25 μ l de bactéries compétentes TOP 10[®] (Invitrogen, France). Après incubation de 25min dans la glace. La transformation a été effectuée par un choc thermique de 45s à 42°C puis incubation 2min dans la glace. Les bactéries ont été ensuite cultivées dans 200 μ l de milieu SOC pendant 45min à 37°C puis ont été étalées sur des boîtes Luria-Bertani (LB)-agar (Difco, France) contenant 100 μ g/ml d'ampicilline. Cinq colonies ont été cultivées séparément dans 2 ml de milieu LB contenant 100 μ g/ml d'ampicilline. La présence de l'insert et de la mutation a été vérifiée par purification de l'ADN plasmidique et digestion enzymatique puis par séquençage (Cogenics, France). Les bactéries recombinantes ont été amplifiées dans 50 ml de milieu LB contenant 100 μ g/ml d'ampicilline. Le plasmide a enfin été purifié à l'aide du kit Plasmid Midi Kit (Qiagen, France).

II. 12. Transfection transitoire des cellules T98G par le plasmide codant Siah-1L

Les cellules T98G sont cultivées en plaques de six puits en milieu DMEM contenant de la glutamine (1%, v/v), de la pénicilline-streptomycine (1%, v/v) et du SVF (10%, v/v) jusqu'à une confluence de 80%. La transfection de l'ADN plasmidique est réalisée en utilisant un agent de transfection lipidique, l'ExGen 500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Le mélange de transfection contenant 2.5 μ g ADN plasmidique et 10 μ l d'exgen 500 (par puits) complété à un volume final de 100 μ l par une solution de NaCl 9‰ (p/v) est étalé sur les

cellules en culture dans 900 µl de milieu DMEM sans SVF et laissé incuber pendant 2h. Ensuite le milieu est remplacé par du DMEM contenant 10% de SVF. Les cellules sont collectées 24 h après transfection dans une solution de PBS puis centrifugées à 4°C durant 10 min à 5000 rpm . Les culots sont repris dans du tampon 0.25 M saccharose, 5 mM HEPES (pH 7.4) et l'homogénat cellulaire est soniqué préalablement au dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976). L'expression de Siah-1L recombinante est analysée par immunoblot.

II. 13. Test de prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est mesurée à l'aide du kit Click-iT[®] EdU (Molecular Probes, Invitrogen) qui utilise l'EdU (5-éthynyl-2-désoxyuridine), qui est un analogue nucléosidique de la thymidine incorporé dans l'ADN lors de la synthèse active d'ADN. Les cellules sontensemencées en plaques à 96 puits à la densité de 10⁴ cellules/puit. Après 16h de culture, les cellules sont traitées par le GW501516 ou le DMSO pendant 24h puis exposées à 10µM de 5-éthynyl-2'-désoxyuridine (EdU) pendant 4h supplémentaires à 37°C. Les cellules sont alors fixées puis incubées avec l'anticorps anti-Oregon Green[®] conjugué à la peroxidase et avec le réactif Amplex[®] UltraRed suivant les recommandations du fournisseur. Les plaques sont analysées par un lecteur de plaques utilisant les filtres appropriés pour l'Amplex[®] UltraRed (excitation/émission 568/585 nm)

II. 14. Test de cicatrisation et migration cellulaire ou “wound healing”

Ce test consiste à créer une cicatrice ou brèche au niveau d'un tapis cellulaire et à évaluer le temps nécessaire aux cellules disposées de part et d'autre de la cicatrice pour migrer et combler la brèche. Pour cela, nous disposons d'inserts de culture en silicone autocollants qui sont placés au fond d'un puits d'une plaque de culture. Ces inserts ont la

particularité d'être composés de deux chambres distinctes séparées par une membrane de 500 μm d'épaisseur qui est imperméable à la fois au milieu de culture et aux cellules. Les cellules à tester sont ainsiensemencées séparément dans chacune des deux chambres de l'insert au nombre de 30000 cellules par chambre et incubées durant toute la nuit à l'étuve à 37°C afin d'obtenir une adhésion complète. Le lendemain, l'insert est retiré avec une pince, le puit rincé et rempli avec du milieu de culture contenant l'agoniste de PPAR β/δ , le GW501516 ou le DMSO. Des photos de cette brèche sont prises à différents temps afin de suivre les processus de prolifération et de migration cellulaires participant au comblement de la cicatrice. L'analyse des images est réalisée aux différents temps avec l'aide du logiciel de traitement et d'analyse d'images Image J.

II. 15. Analyse de l'apoptose

L'apoptose cellulaire est mesurée à l'aide du kit Alexa Fluor 488 Annexin V/Dead Cell apoptosis kit (Molecular probes, Invitrogen). Les cellules T98G cultivées dans les plaques de culture à six puits sont traitées par le GW501516 (100 nM) ou le DMSO pendant 24 h, ensuite elles sont récoltées et suspendues dans 100 μl de tampon annexin-binding buffer. De même, les cellules T98G transfectées par le vecteur pCMV-Siah-1L exprimant Siah-1L ou le vecteur pCMV-contrôle sont récoltées dans 100 μl du même tampon 24 h après la transfection. Les cellules sont ensuite marquées par addition de 5 μl d'Alexa Fluor 488 Annexin V, qui va se fixer sur les phosphatidylsérines exposées à la surface des cellules en apoptose, et avec 1 μl (100 $\mu\text{g/ml}$) d'iodure de propidium pendant 15 min. Ce dernier permet de différencier les cellules vivantes et les cellules en apoptose des cellules mortes. Ensuite 400 μl d'annexin-binding buffer sont ajoutés avant l'analyse par cytométrie de flux à des longueurs d'onde d'excitation de 488 nM et d'émission de 530 nM et 575 nM.

II. 16. Analyse de l'expression de la protéine recombinante par immunoblot

L'analyse du taux d'expression de la protéine recombinante Siah-1L est réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) dans des conditions dénaturantes afin de permettre une séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire.

Les échantillons protéiques contenant 15 à 20 µg de protéines totales sont dilués dans le tampon de Laemmli (v/v) et portés à ébullition pendant 2 à 3min avant dépôt. La migration des échantillons à travers le gel de SDS-PAGE se fait dans du tampon d'électrophorèse à ampérage constant (15 mA) durant 1h30 environ.

Après transfert, la membrane est placée sous agitation durant 1h dans une solution à 5% (p/v) de lait en poudre écrémé. L'hybridation de la membrane fait intervenir successivement deux anticorps. Le premier est un anticorps polyclonal dirigé contre la partie N-terminale de Siah1 (sc-5505, Santa Cruz) et le deuxième est un anticorps anti-IgG de chèvre couplé à la peroxidase (Sigma-Aldrich). Après plusieurs étapes de lavage au TBST (Tris Buffer Saline Tween : 150 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM NaCl, 0,5% (v/v) Tween 20, 0,02% (p/v) azide de sodium), la membrane est révélée par ajout du réactif luminol durant 1 à 2min et exposition sur film photosensible.

II. 17. Microscopie par Immunofluorescence

Les cellules sont cultivées en boîte de six puits sur une lamelle de verre et incubées pendant 24h pour atteindre une confluence de 80%. Les cellules sont ensuite fixées au paraformaldéhyde 4%, perméabilisées avec 0,2% de Triton X-100. Les épitopes non spécifiques sont bloquées avec une solution de BSA. La détection de la protéine Siah-1L est réalisée à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre Siah-1 et un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome Alexa 594 (1/1000) (Invitrogen).

II.18. Immunoprécipitation de la chromatine

II.18.1 Préparation de la chromatine

L'isolement et la précipitation de la chromatine ont été réalisés en utilisant le kit ChiP-it (Active motif) suivant les recommandations du kit. Brièvement, les cellules T98G sont cultivées jusqu'à 80% de confluence, ensuite traitées par le GW501516 ou le DMSO pendant 4h avant d'être fixées avec une solution de formaldéhyde à 37% dans du milieu de culture DMEM sans sérum pendant 10min à température ambiante. Les cellules sont lavées par une solution de PBS contenant 125 mM de Glycine, durant 5 min à température ambiante et récupérées par grattage dans la même solution contenant 2 μ M de PMSF et centrifugation à 720 x g pendant 10min à 4°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans un tampon de lyse contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC) et 2 μ M de PMSF. Les cellules en suspension sont lysées par plusieurs passages dans un dounce, et le lysat obtenu est centrifugé à 2400 x g pendant 10 min à 4°C. Les noyaux sont ensuite resuspendus dans un tampon de digestion contenant 2% de PIC et 2 μ M de PMSF. Après une pré-incubation du mélange à 37°C, pendant 5min, le cocktail enzymatique de digestion de la chromatine, est ajouté à raison de 100 U/ml et laissé en contact avec les noyaux pendant 10min à 37°C pour obtenir des fragments de chromatine de 200 à 1000 pb. La réaction est arrêtée par l'addition de 0,5 M d'EDTA. Une centrifugation de 10min à 12000 x g et à 4°C permet de récupérer la chromatine fragmentée dans le surnageant, qui est immédiatement congelée à -80°C jusqu'à utilisation.

II.18.2 immunoprécipitation

L'immunoprécipitation est réalisée avec 10 μ g d'ADN et 3 μ g d'anticorps anti-PPAR (produit au laboratoire) ou d'immunoglobulines contrôles non spécifiques. Brièvement, le mélange pour chaque réaction est réalisé dans un volume final de 100 μ l, contenant 25 μ l de

billes magnétiques portant la protéine G, un volume correspondant à 10 µg de chromatine fragmentée, 10 µl de tampon d'incubation (ChIP Buffer 1), 1 µl de PIC, 3 µg d'anticorps spécifiques dirigés contre le récepteur PPAR, ou encore des immunoglobulines contrôles non spécifiques servant de témoin négatif. L'ensemble est ensuite placé à 4°C pendant la nuit sous rotation. Après 3 lavages à l'aide des tampons de ChIP 1 et 2, l'ensemble correspondant aux anticorps ayant reconnue leur protéine spécifique sur la chromatine, et retenu sur les billes magnétiques de protéine G, est élué par 50 µl de tampon d'élution fourni dans le kit commercial, durant 15min à température ambiante. Avant l'analyse par PCR, la chromatine immunoprécipitée est digérée avec 1 µg de protéinase K pendant 1h à 37°C. L'ADN ainsi obtenu est utilisé pour l'analyse par PCR en combinaison avec les oligonucléotides sens 5'CTTGCATTGGGTTCCTCACTGCCAA-3' et antisens 5'ACTACCCTTGCCCCAATAAAGTCCTGCG-3' permettant l'amplification de la séquence -774 à -447 bp de la région promotrice du gène Siah-1L. Les produits de PCR sont ensuite analysés sur gel d'agarose 2% (p/v).

RESULTATS

I. Etude de l'effet de l'activation de PPAR β / δ sur la prolifération et la migration des cellules de glioblastome T98G

I. 1. Effet de l'agoniste de PPAR β / δ , GW501516 sur la prolifération des cellules T98G.

Des études récentes ont montré que PPAR β / δ stimule la prolifération et la migration des cellules cancéreuses humaines en particulier des lignées cellulaires malignes du sein, de la prostate et des tissus adipeux (liposarcomes) (Stephen et al., 2004; Wagner et al., 2011). Alors que l'expression du récepteur PPAR β / δ est abondante au niveau du cerveau où il jouerait un rôle dans la croissance et la différenciation cellulaires, son implication potentielle dans le développement tumoral au niveau du tissu cérébral n'a pas encore été étudiée. Dans ce travail, nous avons utilisé la lignée cellulaire T98G provenant d'un glioblastome humain qui est largement utilisée pour l'étude du processus tumoral des glioblastomes.

Afin de déterminer si le récepteur PPAR β / δ est impliqué dans le caractère tumoral des glioblastomes, nous avons analysé l'effet de son activation par l'agoniste GW501516 sur la prolifération des cellules T98G. Les cellules sont traitées par l'agoniste de PPAR β / δ ou par le DMSO (solvant) pendant 24h en présence de l'EdU (5-éthynyl-2-désoxyuridine), un analogue de l'uridine qui s'incorpore dans l'ADN néosynthétisé et qui est reconnu par un anticorps spécifique. Les résultats obtenus montrent que l'activation de PPAR β / δ par le ligand GW501516 augmente d'environ 25% l'incorporation de l'EdU dans l'ADN néosynthétisé indiquant une stimulation de la prolifération des cellules T98G par cet agoniste de PPAR β / δ (Figure 16). Ces résultats indiquent que l'activation de PPAR β / δ est pro-proliférative dans les cellules T98G et suggèrent un rôle de ce récepteur dans la prolifération des glioblastomes.

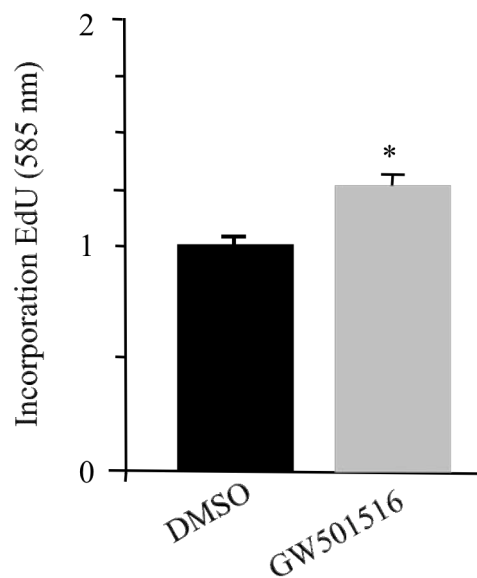


Figure 16 : Effet du GW501516 sur la prolifération des cellules de glioblastome humain T98G. Les cellules ont été traitées par le GW501516 (100 nM) pendant 24h. L'incorporation de EdU dans l'ADN néosynthétisé est évaluée par fluorescence à 519 nm. L'histogramme représente la moyenne des rapports d'induction obtenus lors de trois expériences indépendantes (n=3). Variation statistiquement significative entre contrôle non traité et échantillon traité par le test *a posteriori* de Fisher (* $P < 0.05$).

I. 2. Effet de l'agoniste de PPAR β/δ , GW501516 sur la migration des cellules de glioblastome T98G

La migration cellulaire est un aspect central de la physiopathologie et du caractère tumoral des glioblastomes. Nous avons analysé l'effet du ligand de PPAR β/δ , le GW501516 sur la migration des cellules T98G en utilisant le test de cicatrization. Les cellules T98G sont cultivées dans un puits d'une plaque 30 μ -Dish (Ibidi) séparé en deux parties par un insert. Après 24h, l'insert est retiré et le milieu de culture est remplacé par un milieu contenant l'agoniste de PPAR β/δ , le GW501516 ou le DMSO (contrôle). Après 24h de culture, la migration des cellules est reflétée par l'étendu de la fermeture de la cicatrice laissée par l'insert. Les résultats obtenus révèlent que l'activation du récepteur PPAR β/δ stimule la migration des cellules T98G. En effet, comparées aux cellules traitées par le DMSO, les cellules traitées par le GW501516 migrent plus rapidement d'où une fermeture plus importante de la cicatrization au bout de 24h (Figure 17). Ceci indique que PPAR β/δ joue un rôle significatif dans la migration des cellules de glioblastomes.

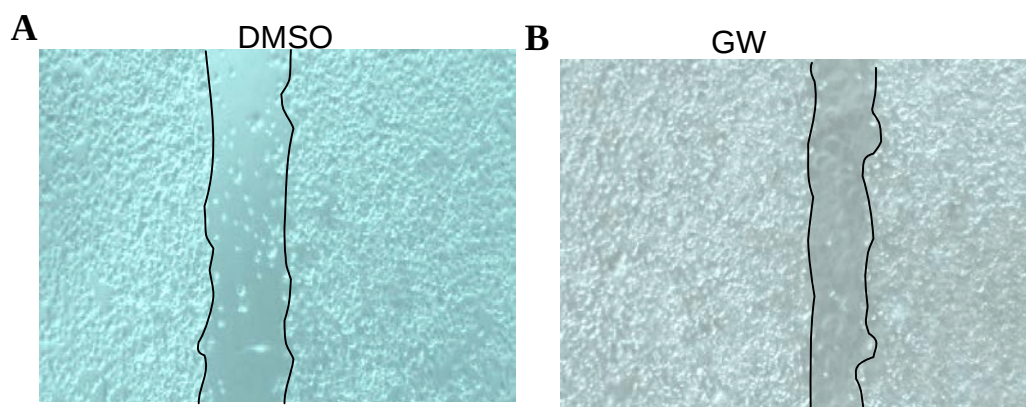


Figure 17: Effet du GW501516 sur la migration des cellules de glioblastome humain T98G. Les cellules sontensemencées au nombre de 30000 cellules par chambre séparée par un insert. Après 24h l'insert est retiré et le GW501516 (100 nM) est ajouté au milieu de culture. La migration des cellules est évaluée par le temps mis à réduire la "brèche". Grossissement 4X.

II. Effet de l'activation de PPAR β/δ sur l'expression de Siah-1L

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la stimulation de la croissance et la propagation des cellules tumorales de glioblastomes par l'activation du récepteur PPAR β/δ , nous avons effectué une analyse transcriptomique des cellules T98G traitées par l'agoniste GW501516 ou par le DMSO et comparé leurs profils. Parmi les gènes exprimés de manière différentielle, Siah-1L présente une augmentation d'environ trois fois (manuscrit en préparation).

Des études ultérieures ont montré que les protéines Siah participent à la régulation de processus physiologiques importants tels que la prolifération cellulaire, la migration et l'apoptose. Afin de confirmer l'induction de Siah-1L par l'agoniste de PPAR β/δ , nous avons analysé l'effet du GW501516 sur l'expression du gène *Siah-1L* par RT-PCR en temps réel dans les cellules T98G. Comme attendu, les résultats montrent que le traitement du glioblastome T98G par le GW501516 pendant 24h augmente d'environ 2,8 fois le niveau d'expression de l'ARNm de Siah-1L (Figure 18).

Afin de déterminer si l'expression de Siah-1L est régulée par PPAR β/δ dans d'autres lignées de cellules cancéreuses, nous avons analysé l'effet du ligand GW501516 sur les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, les chondrosarcomes SW1353 et les hépatocarcinomes HepG2. Les résultats montrent que l'activation du récepteur PPAR β/δ dans les différentes lignées de cellules cancéreuses induit l'expression de Siah-1L (Figure 18). Cette induction est de l'ordre de 1,5 fois dans les cellules MCF-7, 2,5 fois dans les cellules SW1353 et 1,5 fois dans les cellules HepG2 (Figure 18). Ces résultats suggèrent que l'expression de Siah-1L est régulée par le récepteur PPAR β/δ dans les cellules cancéreuses de différentes origines.

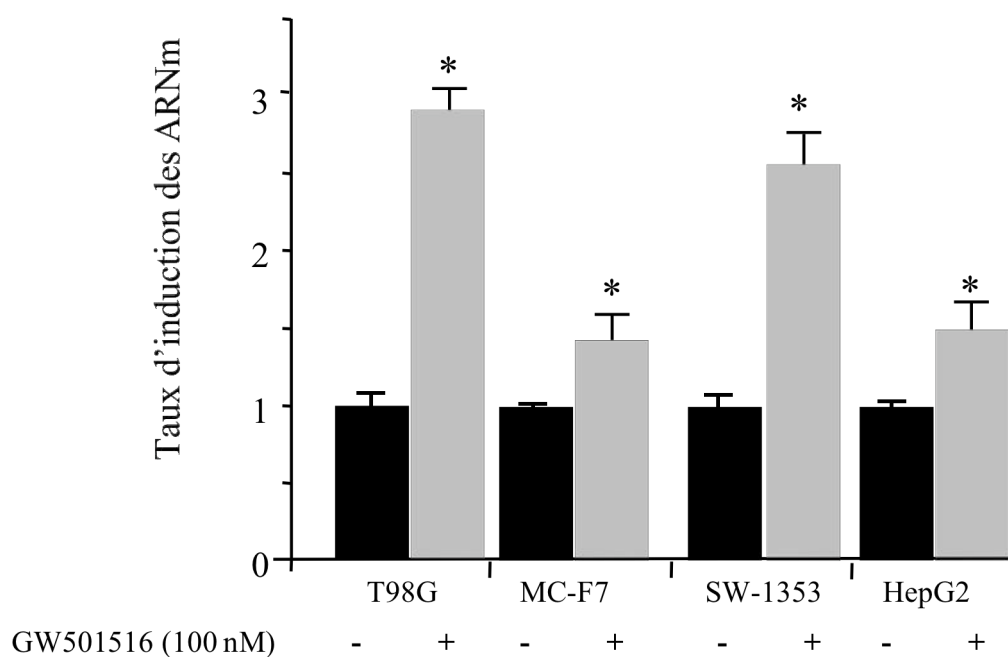


Figure 18 : Effet de l'activation de PPAR β/δ sur l'expression des ARNm de Siah1L dans les cellules de glioblastome humain T98G, cellules cancéreuses mammaires MCF-7, les chondrosarcomes SW1353 et les hépatocarcinomes HepG2 en culture. Les cellules ont été traitées par l'agoniste GW501516 pendant 24h. Les ARNm de Siah-1L ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel. L'histogramme représente la moyenne des rapports d'induction obtenus lors de trois expériences indépendantes (n=3). Variation statistiquement significative entre contrôle non traité et échantillon traité par le test *a posteriori* de Fisher (* P<0.05).

III. Etude de l'effet de l'expression de Siah-1L sur la prolifération et la migration des cellules de glioblastome T98G

III. 1. Etude de l'effet de l'expression de Siah-1L sur la prolifération des cellules de glioblastome T98G.

Les résultats précédents ont révélé que l'activation du récepteur PPAR β/δ par l'agoniste GW501516 induit l'expression de Siah-1L. Ce gène peut jouer un rôle dans différents processus cellulaires majeurs tels que la prolifération, la migration et l'apoptose. Nous avons analysé l'effet de la surexpression de Siah-1L sur la prolifération des cellules T98G. Dans un premier temps, nous avons transfecté les cellules T98G par le vecteur d'expression pCMV-Siah-1L et analysé l'expression et la localisation subcellulaire de Siah-1L recombinant dans les cellules par immunoblot et par immunofluorescence en utilisant des anticorps spécifiques. Les cellules transfectées avec le vecteur pCMV natif ont été utilisées comme contrôle. L'analyse par immunoblot de l'expression de Siah-1L indique une expression importante de Siah-1L 24h après la transfection des cellules par le vecteur d'expression pCMV-Siah-1L (Figure 19).

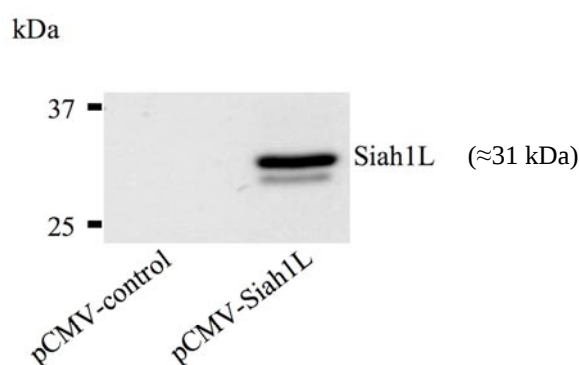


Figure 19 : Surexpression de Siah-1L recombinante dans les cellules T98G. Les cellules T98G en culture ont été transfectés par le pCMV-Siah-1L ou par le vecteur contrôle pCMV

natif. Les protéines ont été analysées par SDS-PAGE et la détection de Siah-1L a été réalisée par immunoblot au moyen d'anticorps polyclonaux anti-Siah1 (santa cruz).

Afin de déterminer la localisation intracellulaire de la protéine Siah-1L, des analyses par immunofluorescence ont été réalisées en utilisant des anticorps anti-Siah1. Les résultats montrent que Siah-1L est principalement localisée dans le cytoplasme à la périphérie de l'enveloppe nucléaire et présente un profil ponctué. Un immunomarquage de faible ampleur est également présent au niveau du noyau. Aucun marquage n'est observé dans les cellules transfectées par le vecteur pCMV-natif (Figure 20).

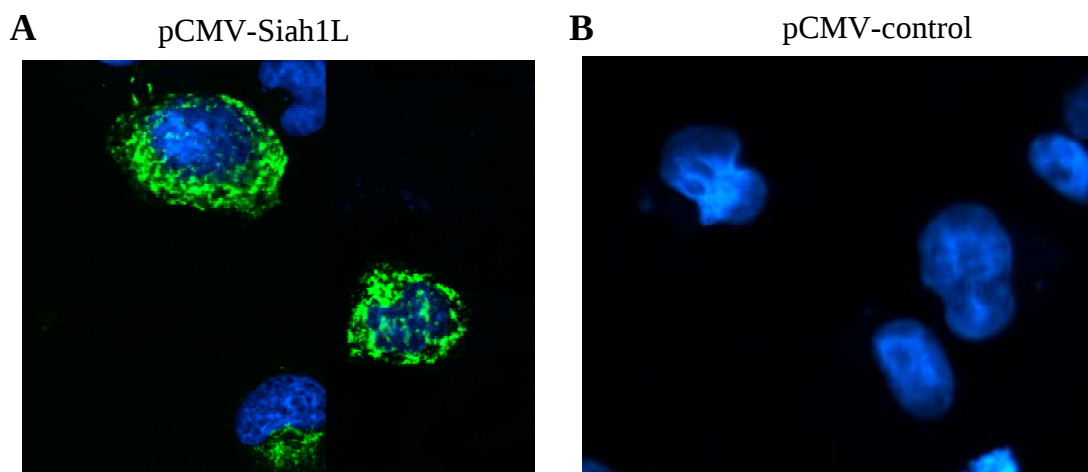


Figure 20 : Immunolocalisation de Siah-1L dans les cellules T98G. Les cellules T98G en culture ont été transfectées par le vecteur pCMV-Siah-1L ou par le vecteur contrôle pCMV natif. La localisation de la protéine a été réalisée à l'aide de l'anticorps anti-Siah-1L et d'un deuxième anticorps conjugué au fluorochrome Alexa 594. Les noyaux des cellules ont été colorés avec le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole). Grossissement 100X.

Comme précédemment, l'analyse de l'effet de la surexpression de Siah-1L sur la prolifération des cellules T98G a été réalisée par la technique de l'incorporation de l'EdU. Cette analyse a été effectuée sur des cellules T98G exprimant la protéine Siah-1L recombinante après transfection transitoire par le vecteur d'expression pCMV-Siah-1L et sur les cellules transfectées par le vecteur pCMV natif (contrôle). Les résultats obtenus montrent que l'expression de Siah-1L augmente d'environ 28% l'incorporation de l'EdU dans l'ADN néosynthétisé indiquant une stimulation de la prolifération cellulaire (Figure 21).

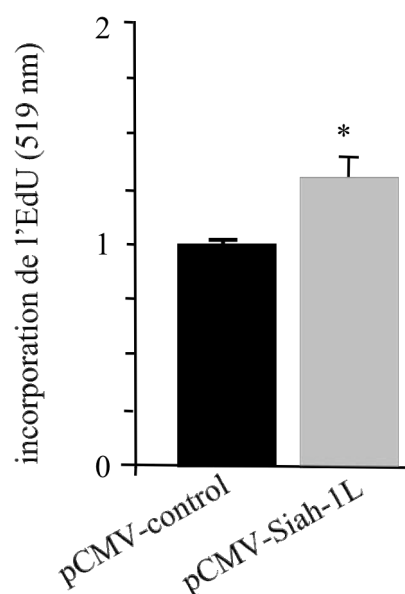


Figure 21 : Effet de la surexpression de Siah-1L sur la prolifération des cellules de glioblastome humain T98G. Les cellules ont été transfectées par le vecteur pCMV-Siah-1L exprimant Siah-1L ou le vecteur contrôle pCMV natif (contrôle). Après 24h, l'incorporation de EdU dans l'ADN néosynthétisé est évaluée par fluorescence à 519 nM. L'histogramme représente la moyenne des rapports d'induction obtenus lors de trois expériences indépendantes (n=3). Variation statistiquement significative entre contrôle non traité et échantillon traité par le test *a posteriori* de Fisher (* $P < 0.05$).

III. 2. Etude de l'effet de l'expression de Siah-1L sur la migration des cellules de glioblastome T98G.

Les protéines Siah sont capables d'interagir et de réguler la stabilité des protéines impliquées dans la modulation de la migration cellulaire. Nous avons donc analysé l'influence de la surexpression de Siah-1L sur la migration des cellules T98G. L'analyse de la migration des cellules T98G transfectées de façon transitoire par le vecteur pCMV-Siah-1L ou pCMV-natif a été réalisée par la technique de cicatrisation 24h après la transfection. Les résultats montrent que la surexpression de Siah-1L augmente la capacité des cellules T98G à réduire l'étendu de la cicatrice plus rapidement par comparaison aux cellules contrôle (Figure 21). Ces résultats indiquent que la surexpression de Siah-1L stimule la migration des cellules de glioblastome.

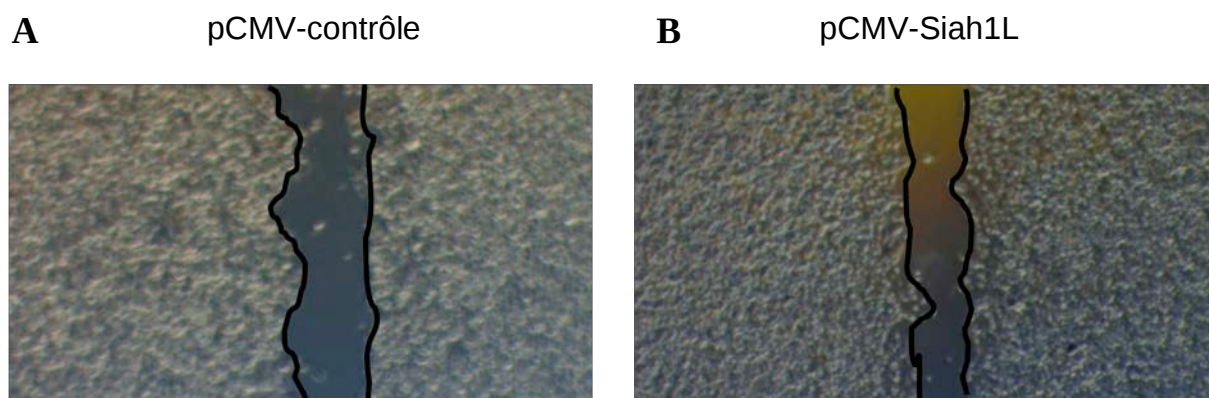


Figure 21 : Effet de la surexpression de Siah-1L sur la migration des cellules de glioblastome humain T98G. Les cellules sont transfectées par le vecteur pCMV-Siah-1L exprimant Siah-1L ou par le vecteur contrôle pCMV natif. Les cellules transfectées sont ensemencées au nombre de 30000 cellules par chambre séparée par un insert. Après 24 h l'insert est retiré et la migration des cellules est évaluée par le temps mis à réduire la "brèche". Grossissement 4X.

IV. Analyse de l'effet de l'activation de PPAR β/δ et de la surexpression de Siah-1L sur l'apoptose des cellules T98G

Nous avons étudié l'effet de l'activation du récepteur PPAR β/δ par l'agoniste spécifique, le GW501516 sur l'apoptose des cellules T98G par la technique du double marquage à l'annexine-V-Alexa Fluor 488 et à l'iodure de propidium. Les cellules ont été analysées par cytométrie de flux (Figure 22). Les résultats montrent que le taux d'apoptose est similaire dans les cellules traitées par l'agoniste GW501516 et les cellules traitées par le DMSO (Figure 23).

Nous avons ensuite analysé l'effet de la surexpression de Siah-1L sur l'apoptose des cellules T98G. Le taux d'apoptose est déterminé, comme ci-dessus (Figure 22), dans les cellules surexprimant Siah-1L après transfection transitoire par le vecteur pCMV-Siah-1L et dans les cellules contrôle transfectées par le vecteur pCMV natif. Les résultats obtenus montrent que le taux d'apoptose ne diffère pas significativement entre les cellules surexprimant Siah-1L et les cellules contrôles (Figure 23) indiquant que Siah-1L n'a pas d'effet significatif sur la survie des cellules de glioblastome T98G.

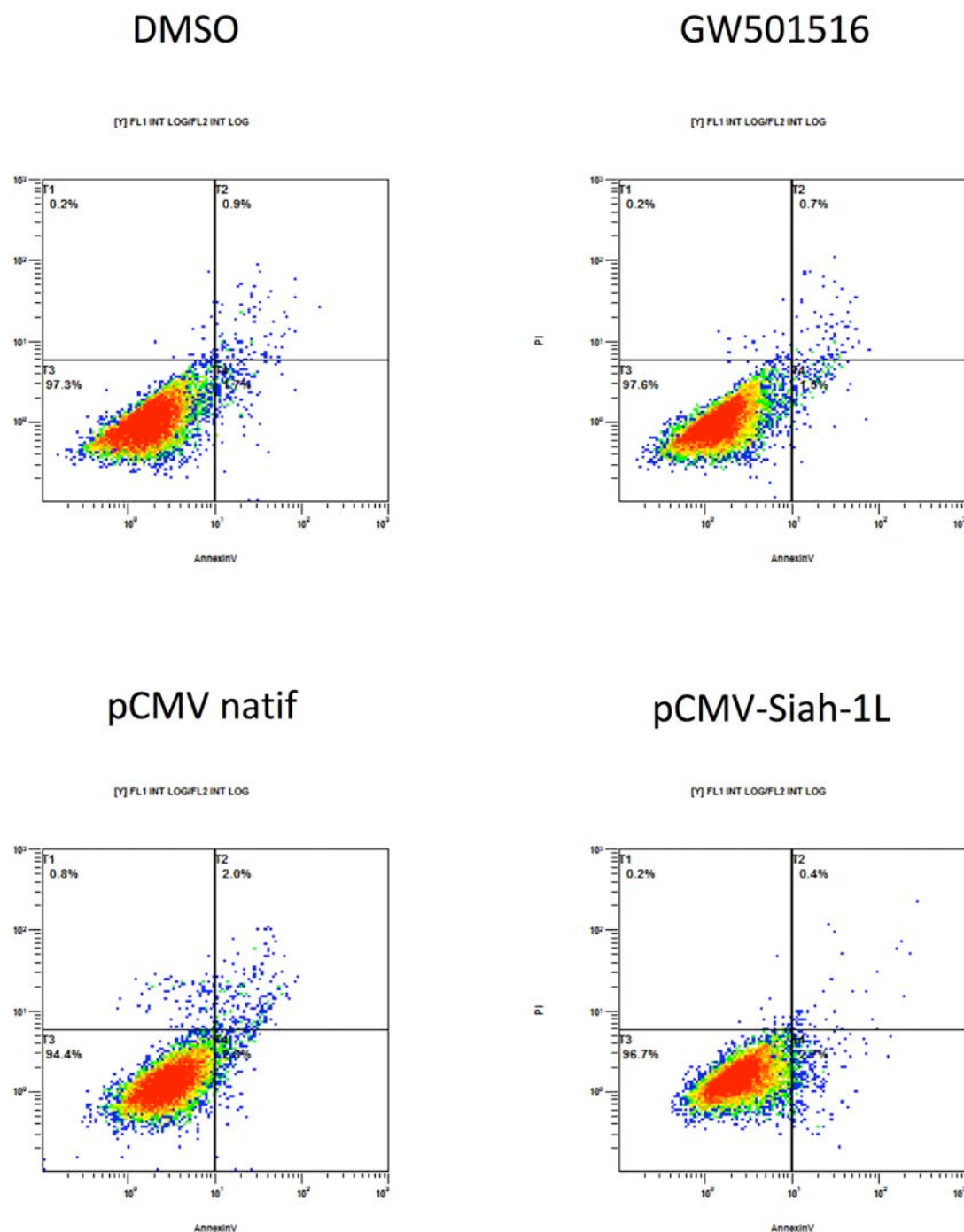


Figure 22 : Effet de la surexpression de Siah-1L et du traitement par l'agoniste de $\text{PPAR}\beta/\delta$ sur l'apoptose des cellules de glioblastome T98G. Les cellules ont été transfectées par le vecteur pCMV-Siah-1L ou pCMV-contrôle ou alors traitées avec le GW501516 ou le DMSO et l'apoptose a été mesurée par double marquage à l'annexine-V-Alexa Fluor 488 et à l'iodure de propidium; les cellules ont été ensuite analysées par cytométrie de flux.

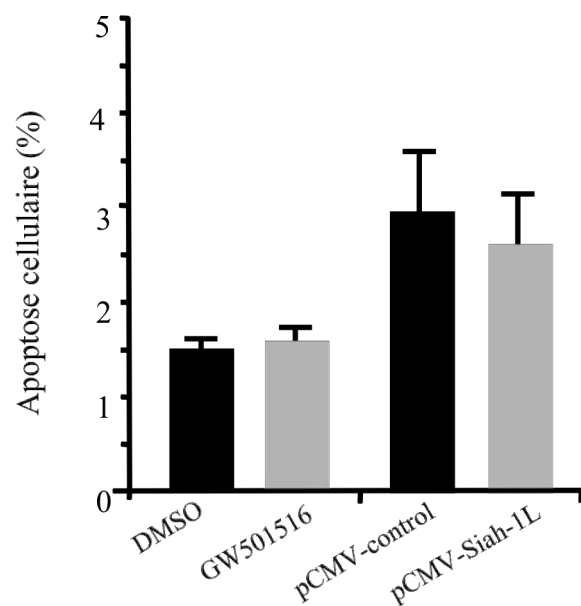


Figure 23 : Effet de la surexpression de Siah-1L et du traitement par l'agoniste de PPAR β/δ sur l'apoptose des cellules de glioblastome T98G. Histogramme représentant le pourcentage des cellules en apoptose après traitement avec le GW501516 ou le DMSO et après transfection des cellules avec le vecteur pCMV-Siah-1L ou pCMV-contrôle. L'histogramme représente la moyenne des rapports d'induction obtenus lors de trois expériences indépendantes (n=3).

V. Clonage et caractérisation fonctionnelle du promoteur humain du gène *Siah-1L*

V. 1. Clonage de la séquence promotrice

Afin de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans l'induction de l'expression de *Siah-1L* par l'agoniste du récepteur PPAR β/δ , nous avons cloné la séquence du promoteur du gène humain et étudié sa régulation dans les cellules T98G. Une séquence de -1572/+146 pb (par rapport au site d'initiation de la transcription) du promoteur a été clonée à partir d'ADN génomique humain par PCR et sous clonée dans le vecteur pGL3 basic en amont du gène de la luciférase. L'analyse de cette séquence par le logiciel TRANSFAC 3.5 a permis l'identification des sites potentiels de fixation pour les facteurs de transcription Sp1, AP1 et PPAR qui pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression de *Siah-1L*. Cependant, aucune boîte TATA n'a pu être identifiée (Figure 24).

V. 2. Détermination de la séquence promotrice minimale active

La séquence minimale active du promoteur de Siah-1L a été déterminée par délétions successives de la partie 5' de la séquence promotrice. Ainsi, les plasmides pGL3 contenant les séquences correspondant aux fragments -1572/+146, -1350/+146, -1050/+146, -710/+146, -470/+146 et -140/+146 pb ont été générés. L'activité transcriptionnelle des différentes constructions a été évaluée après transfection des cellules T98G en culture. Les résultats obtenus montrent que la séquence -140/+146 présente une activité promotrice très faible. Par contre, lorsque la séquence du promoteur est allongée jusqu'à -470 pb, une forte activité du promoteur est observée indiquant que la séquence -470/+146 constitue la séquence active minimale contenant des éléments essentiels pour l'activité basale du promoteur. Une activité promotrice similaire est observée pour les séquences plus en amont (Figure 25).

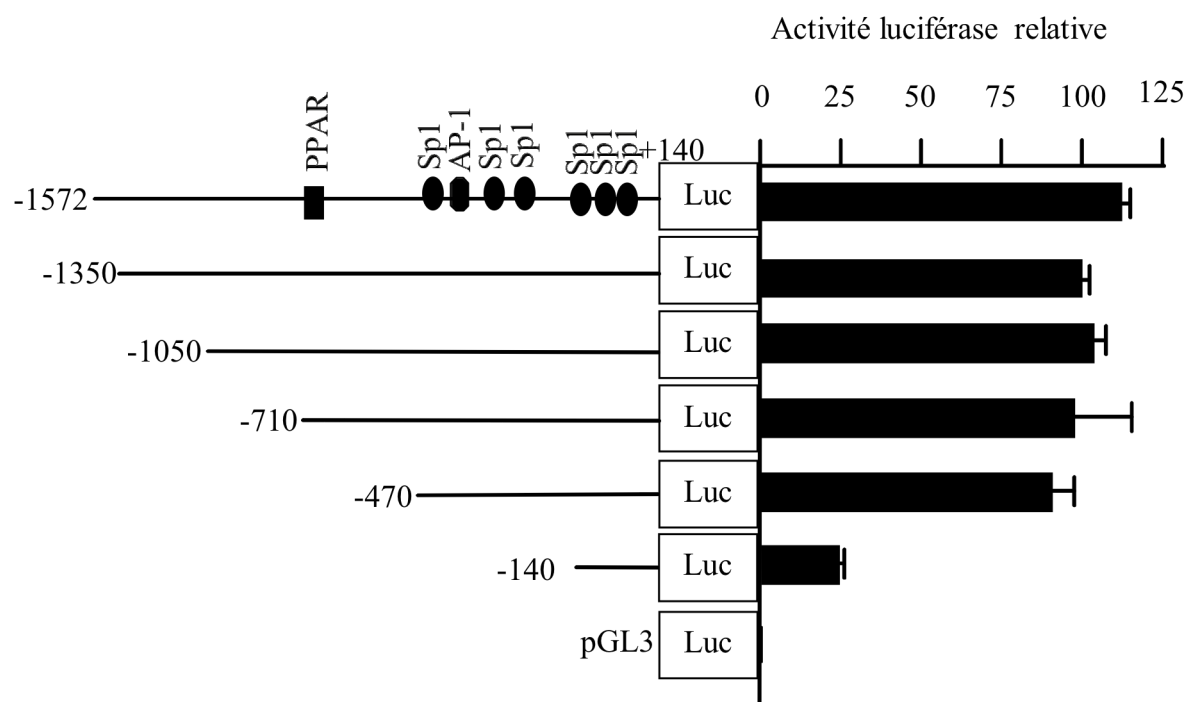


Figure 25 : Effet des délétions successives en 5' sur l'activité promotrice. Les plasmides pGL3-basic contenant les séquences correspondant aux fragments -1572/+146, -1350/+146, -1050/+146, -710/+146, -470/+146 et -140/+146 pb du promoteur ont été transfectés dans les cellules T98G en culture. L'activité de chaque construction a été mesurée par luminescence. L'histogramme représente le rapport de l'activité luciférase Firefly par rapport à celle de Renilla et les écarts-types correspondants à trois expériences indépendantes.

VI. Etude de la régulation du promoteur de Siah-1L

VI. 1. Analyse de l'effet de l'activation du récepteur PPAR β/δ sur l'activité du promoteur

Les cellules T98G en culture ont été transfectées par le vecteur pGL3 basic portant la séquence du promoteur -1572/+146 puis traitées par le GW501516 pendant 24h. Les résultats obtenus montrent que l'activité du promoteur est stimulée environ deux fois après traitement par l'agoniste spécifique du récepteur PPAR β/δ (Figure 26). Ceci indique : (1) que le promoteur du gène Siah-1L est une cible de PPAR β/δ , (2) que la séquence clonée comprend les éléments impliqués dans l'induction de l'expression du gène Siah-1L par le ligand de PPAR β/δ .

Afin d'identifier les éléments responsables de la régulation de Siah-1L par PPAR β/δ , l'activité transcriptionnelle des différentes constructions citées ci-dessus a été évaluée en présence de l'agoniste GW501516. L'analyse de l'activité luciférase montre que le GW501516 est capable de stimuler l'activité aussi bien de la séquence promotrice -1350/+146 que celle de la séquence -1050/+146. Par contre, aucun effet du GW501516 n'est observé sur la séquence promotrice -710/+146 ni sur les séquences -470/+146 et -140/+146 (Figure 26). L'ensemble de ces résultats suggère que l'induction du promoteur de Siah-1L par l'activation de PPAR β/δ nécessite des élément(s) présent(s) entre les séquences -710 et -1050 du promoteur. En effet, l'analyse de la séquence du promoteur de *Siah-1L* montre la présence d'un site potentiel de fixation pour les récepteurs PPAR entre les positions -733 et -715 que nous avons nommé PPAR-733 (Figure 24).

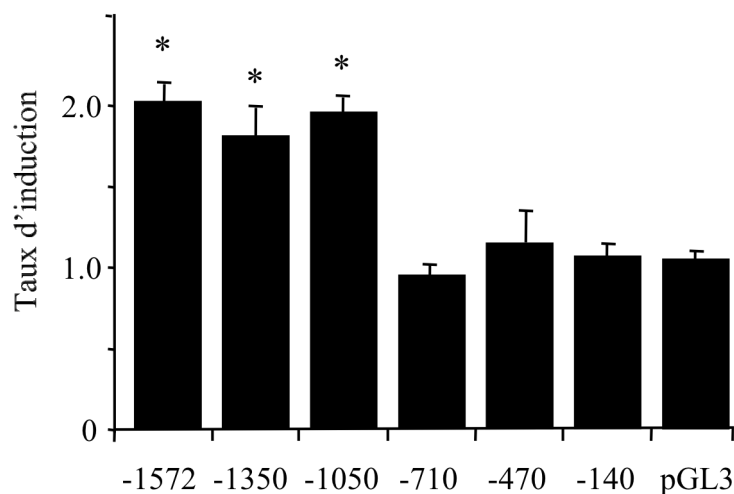


Figure 26 : Analyse de l'effet du GW501516 sur l'activité des différentes formes tronquées du promoteur. L'activité transcriptionnelle des différentes formes tronquées a été évaluée par luminescence dans les cellules T98G en culture transfectés par les différentes constructions et traitées ou non par 100 nM de GW501516. L'histogramme représente la moyenne des rapports d'induction de l'activité transcriptionnelle en présence du GW501516 et les écarts-types correspondant à trois expériences indépendantes. L'histogramme représente la moyenne des rapports d'induction obtenus lors de trois expériences indépendantes (n=3). Variation statistiquement significative analysée par le test *a posteriori* de Fisher (* $P < 0.05$).

VI. 2. Rôle fonctionnel du site potentiel de fixation des PPAR au niveau du promoteur de Siah-1L

Afin de déterminer le rôle fonctionnel éventuel du site PPAR-733 du promoteur de Siah-1L, son inactivation a été réalisée par mutagenèse dirigée au niveau de la séquence promotrice -1572/+146 . L'effet de la mutation a été évalué après transfection des cellules T98G par le promoteur muté au niveau du site PPAR-733 nommé mPPAR-733. L'activité du promoteur a été évaluée 24h après transfection par mesure de l'activité luciférase. Les résultats obtenus montrent que la mutation du site PPAR-733 n'a pas d'effet sur l'activité basale du promoteur (Figure 27).

Le rôle du site PPAR-733 dans l'induction de l'activité du promoteur par l'agoniste GW501516 a été ensuite évalué. Les cellules T98G en culture ont été transfectées par le promoteur sauvage ou muté au niveau de PPAR-733 et traitées par le ligand spécifique de PPAR β/δ , le GW501516. Les résultats obtenus montrent que la mutation du site PPAR-733 abolit l'induction du promoteur par le GW501516. (Figure 27). L'ensemble de ces résultats montre que l'induction du promoteur Siah-1L par l'activation du récepteur PPAR β/δ est médiée par le site PPAR-733 (Figure 27).

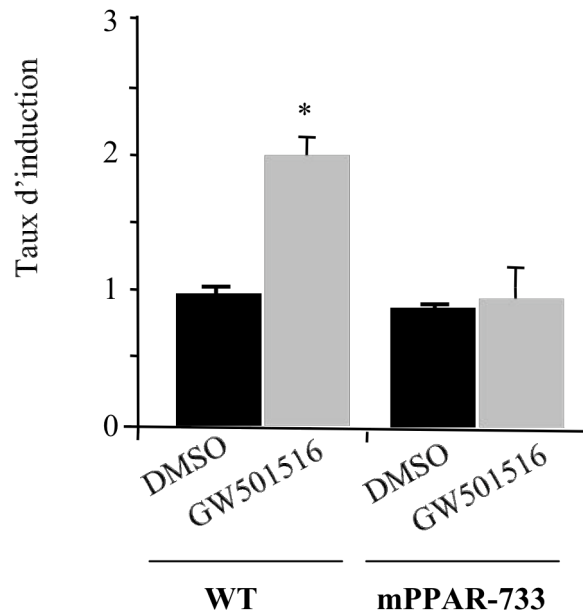


Figure 27 : Influence de la mutation du site de fixation PPAR-733 sur l'activité basale et inducible du promoteur de Siah-1L. Les glioblastomes T98G en culture ont été transfectés par le vecteur pGL3-basic contenant la séquence promotrice -1572/+146 sauvage ou mutée au niveau du site de fixation de PPAR (mPPAR-733) et traités pendant 24h par le GW501516. L'activité luciférase a été mesurée par luminescence. L'histogramme représente les moyennes des rapports d'induction et les écarts-types obtenus pour trois expériences indépendantes effectuées (n=3). Variation statistiquement significative analysée par le test *a posteriori* de Fisher (* $P < 0.05$).

VI. 3. Effet de la transactivation par PPAR β/δ sur l'activité du promoteur de Siah-1L

Afin de mettre en évidence le rôle du récepteur PPAR β/δ dans l'induction de l'activité du promoteur de Siah-1L, nous avons cotransfecté le promoteur de Siah-1L avec le vecteur d'expression de PPAR β/δ , le pSG-PPAR β/δ et analysé l'effet sur l'activité promotrice. Le vecteur pSG5 natif a été utilisé comme contrôle. Les résultats obtenus montrent clairement que la surexpression de PPAR β/δ dans les cellules T98G augmente de quatre fois l'activité du promoteur (Figure 28) indiquant que le facteur de transcription PPAR β/δ est capable de réguler l'activité du promoteur de Siah-1L.

L'importance du site PPAR-733 dans la transactivation du promoteur Siah-1L par le facteur de transcription PPAR β/δ a été analysée en utilisant d'une part, la construction -710/+146 qui ne renferme pas le site PPAR-733 et d'autre part, le promoteur muté au niveau du site PPAR-733, mPPAR-733. Les résultats obtenus montrent que l'activité du promoteur -710/+146 n'est pas modifiée par la surexpression de PPAR β/δ (Figure 28). En effet, cette activité est similaire après transfection des cellules T98G par le vecteur d'expression pSG-PPAR β/δ ou par le vecteur pSG5 natif (contrôle). Ainsi, comme dans le cas de l'activation par le ligand de PPAR β/δ , l'activité promotrice de la séquence -710/+146 (dépourvue du site PPAR-733) n'est pas stimulée par la transactivation par PPAR β/δ (Figure 28).

Afin de déterminer l'importance du site PPAR-733 dans l'induction de l'activité promotrice induite par transactivation par PPAR β/δ , nous avons analysé l'effet de l'expression de PPAR β/δ sur l'activité du promoteur -1572/+146 contenant la mutation au niveau du site PPAR-733 (mPPAR-733). Les résultats obtenus montrent que la mutation du site PPAR-733 abolit complètement la transactivation du promoteur de Siah-1L par PPAR β/δ (Figure 28). L'ensemble de ces résultats démontre que PPAR β/δ est un transactivateur du promoteur de Siah-1L et que son effet de transactivation est médié par le site PPAR-733.

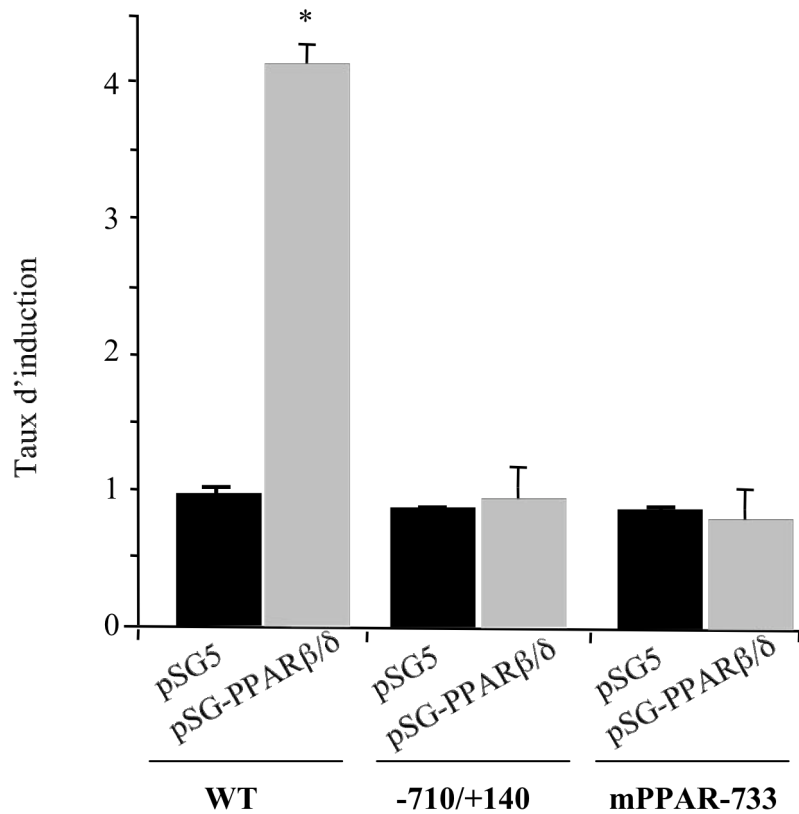


Figure 28 : Effet de la surexpression du facteur de transcription PPAR β/δ sur l'activité transcriptionnelle du promoteur muté et non muté de Siah-1L. Les cellules T98G en culture ont été cotransfectées avec le vecteur pGL3 basic contenant la sequence promotrice -1572/+146 sauvage ou muté au niveau du site PPAR-733 (mPPAR-733) ou la troncation -710/+140 et par le vecteur pSG5-PPAR β/δ . L'activité luciférase a été mesurée par luminescence. L'histogramme représente la moyenne des rapports d'induction et les écarts-types correspondant à trois expériences indépendantes (n=3). Variation statistiquement significative analysée par le test *a posteriori* de Fisher (* $P < 0.05$).

VI. 4. PPAR β / δ endogène se lie au site PPAR-733 du promoteur Siah-1L

Nous avons précédemment montré que PPAR β / δ est capable de transactiver le promoteur de Siah-1L probablement *via* sa fixation sur le site PPAR-733. Afin de déterminer si PPAR β / δ endogène est capable d'interagir avec le promoteur de Siah-1L et d'apporter des éléments de réponse quant au mécanisme d'induction du promoteur par l'agoniste de PPAR β / δ , le GW501516, nous avons analysé la fixation de PPAR β / δ sur la région promotrice de Siah-1L qui renferme le site PPAR-733 et déterminé l'effet du GW501516 sur cette activité de liaison à l'ADN par la technique de la précipitation de la chromatine (ChiP). Les cellules T98G sont traitées par le GW501516 ou le DMSO pendant 4h et la chromatine a été préparée et immunoprécipité par les anticorps anti-PPAR ou par les IgG contrôle. La détection du segment d'ADN correspondant à la partie renfermant le site PPAR-733 du promoteur Siah-1L a été réalisée par PCR en utilisant des oligonucléotides spécifiques. Les résultats obtenus montrent l'amplification par PCR d'un fragment de 150 pb correspondant à la région -842 à -692 du promoteur de Siah-1L à partir de la chromatine immunoprécipitée à l'aide d'anticorps anti-PPAR (Figure 29). Ce fragment n'est pas détecté par PCR à partir de la chromatine immunoprécipitée par les IgG contrôle (Figure 29). Ces résultats indiquent que PPAR β / δ endogène se fixe sur la région promotrice de Siah-1L renfermant le site PPAR-733.

Nous avons ensuite analysé l'effet du GW501516 sur la liaison du récepteur PPAR β / δ sur la région promotrice de Siah-1L. Pour cela, les cellules T98G ont été traitées par le ligand avant l'extraction et la précipitation de la chromatine avec les anticorps anti-PPAR. Les résultats montrent que la fixation du récepteur sur la région promotrice de Siah-1L contenant le site PPAR-733 augmente de manière significative dans les cellules traitées par le GW501516 comparées aux cellules traitées par le DMSO (contrôle) (Figure 29). L'ensemble de ces résultats démontre d'une part, que PPAR β / δ est capable de se fixer sur le promoteur de Siah-1L et d'autre part, que son activation par le ligand spécifique GW501516 induit une

augmentation significative de son activité d'interaction avec le promoteur. Ces résultats suggèrent également que l'induction de l'activité promotrice Siah-1L par le GW501516 serait due à une l'augmentation de la fixation du récepteur PPAR β/δ sur le promoteur.

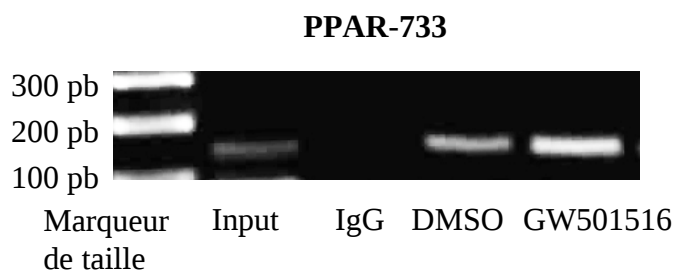


Figure 29 : Effet du GW501516 sur la fixation de PPAR β/δ endogène sur la région promotrice de Siah-1L comprenant le site PPAR-733. Les cellules T98G ont été traitées par l'agoniste GW501516 ou le DMSO pendant 4h, ensuite l'ADN a été immunoprécipité en utilisant des anticorps anti-PPAR ou les IgG de lapin (contrôle). La PCR a été réalisée avec des amorces spécifiques de la region -842 à -692 du promoteur de Siah-1L renfermant le site PPAR-733. La même quantité d'ADN représentée par le "Input" a été utilisée pour l'immunoprécipitation. Les produits de PCR ont été analysés sur gel d'agarose 2% (p/v) coloré avec du GelRed.

DISCUSSION

Ce travail a permis de montrer pour la première fois l'implication du récepteur PPAR β/δ dans la régulation de la prolifération et la migration des cellules T98G de glioblastome humain. Nous avons montré que l'activation de PPAR β/δ par l'agoniste spécifique GW501516 stimule la prolifération et la migration des cellules T98G. Il est important de noter que PPAR β/δ est associé au processus tumoral chez l'homme (Youssef & Badr, 2011 ; Peters et al., 2012). En effet, PPAR β/δ est surexprimé dans de nombreux cancers humains y compris les cancers du côlon, de l'endomètre et du poumon (Gupta et al., 2000; Tong et al., 2000; Genini et al., 2012). Il a également été montré que PPAR β/δ stimule la prolifération et la survie de différents types de cellules cancéreuses et de modèles tumoraux (Michalik et al., 2004). En effet, les agonistes de PPAR β/δ sont capables de stimuler la prolifération des cellules cancéreuses de poumon et de sein (Genini et al., 2012) ainsi que des lignées de cellules cancéreuses de la prostate (Stephen et al., 2004) et des liposarcomes (Wagner et al., 2011). Dans ces derniers, comme dans le cas de cette étude, PPAR β/δ augmente la migration cellulaire suggérant un rôle pro-tumoral de ce récepteur. En revanche, il a été montré que l'activation de PPAR γ par la rosiglitazone en combinaison avec un agoniste du RXR réduit la prolifération et l'invasion des glioblastomes (Papi et al., 2009) suggérant des mécanismes et des cibles différentes pour les deux récepteurs.

Etant donné que PPAR β/δ est un facteur de transcription, il est fort probable que la stimulation de la prolifération et de la migration cellulaires produites par ce récepteur est liée à l'expression des gènes cibles. En effet, l'analyse transcriptomique de l'expression des gènes des cellules T98G traitées ou non par l'agoniste GW501516 révèle que l'agoniste de PPAR β/δ induit l'expression de plusieurs gènes dont le gène *Siah-1L*. L'induction de l'expression de ce gène après traitement des cellules T98G par le GW501516 a été confirmée par qRT-PCR en temps réel indiquant que *Siah-1L* est régulé PPAR β/δ .

Siah-1L est une E3 ubiquitine ligase capable de prendre en charge des substrats divers tels que les protéines nucléaires, les protéines cytoplasmiques et des récepteurs membranaires permettant leur dégradation par le protéasome. Siah-1L est impliquée dans divers processus biologiques, en particulier l'apoptose, la survie et la migration cellulaire (Hara et al., 2005; Nagano et al., 2011; Reed et al., 2002). En effet, il a été montré que Siah-1L augmente la sensibilité des cellules cancéreuses du sein SKBR3 aux effets cytotoxiques de l'irradiation et accroît leur apoptose (He et al., 2010). D'autres études ont montré que Siah-1L stimule la prolifération et la migration des cellules d'hépatocarcinomes humain (HCC) (Brauckhoff et al., 2011). De même, notre étude révèle que Siah-1L est capable d'induire des processus tumoraux similaires dans les cellules de glioblastome T98G.

Malgré l'implication de Siah-1L dans l'apoptose, nous n'avons pas observé d'effet de Siah-1L sur l'apoptose des cellules T98G ni après surexpression par le vecteur pCMV-Siah-1L ni après traitement des cellules par l'agoniste de PPAR β/δ qui induit l'expression de Siah-1L.

Dans ce travail, nous avons également montré que la protéine Siah-1L est principalement localisée dans le cytoplasme à la périphérie de l'enveloppe nucléaire. La présence de Siah-1L dans le noyau est fort probable car nous avons observé un immuno-marquage au niveau de cette organelle mais qui est très faible. La présence d'un peptide signal d'adressage nucléaire (NLS) dans Siah-1L ainsi que la localisation cytosolique et nucléaire des substrats pris en charge par cette E3 ubiquitine ligase font qu'elle pourrait faire la navette entre les deux compartiments cellulaires (Hara et al., 2005). Il a été montré que Siah1 est localisée au niveau du cytoplasme dans les cellules Hep3B et au niveau du cytoplasme et du noyau dans le cas des cellules N2a transfectées par le vecteur exprimant Siah1 (Zhao et al., 2011; Bae et al., 2006). D'autre part, la localisation nucléaire de Siah1 a été observée dans les lignées d'hépatocarcinomes HepG2 et Huh-7 et dans les hépatocarcinomes humains où cette accumulation nucléaire est corrélée avec le caractère malin des HCC (Brauckhoff et al.,

2011). Cependant, dans cette étude la localisation de Siah1 a été analysée par des anticorps reconnaissant les deux formes de Siah1, Siah1a et Siah1L.

Très peu de travaux ont été consacrés à l'étude de la régulation de l'expression de Siah1 en général et de Siah-1L en particulier. Une seule étude a été réalisée sur le promoteur de Siah-1L. Cette étude a montré que le promoteur du gène humain renferme un site fonctionnel de fixation de la protéine p53 et de ce fait Siah-1L jouerait un rôle dans l'ubiquitination et la dégradation des protéines régulées par p53 (Fiucci et al., 2004; Zhao et al., 2011).

Notre étude sur le gène Siah-1L humain a permis de montrer que l'expression de ce gène est régulée par PPAR β/δ . En effet, l'activation de PPAR β/δ par l'agoniste GW501516 induit l'expression du gène et stimule l'activité transcriptionnelle du promoteur. Plusieurs éléments suggèrent que l'expression de Siah-1L est régulée par PPAR β/δ :

- 1) L'expression de Siah-1L est induite par l'activation du récepteur PPAR β/δ .
- 2) L'activité du promoteur de Siah-1L est fortement stimulée par PPAR β/δ .
- 3) La région promotrice de *Siah-1L* interagit et fixe le récepteur PPAR β/δ *ex vivo*.
- 4) La mutation du site de fixation de PPAR β/δ , PPAR-733 abolit complètement l'activation du promoteur du gène de Siah-1L par l'agoniste de PPAR β/δ ainsi que la transactivation par le facteur de transcription PPAR β/δ .

L'analyse de la séquence en amont du site d'initiation de la transcription montre que le promoteur de Siah-1 L est riche en GC et ne contient pas de séquence TATA. Par contre, plusieurs sites de fixation du facteur Sp1 sont présents dans la partie proximale du promoteur. Le promoteur contient également des sites de fixation potentiels pour les facteurs AP-1 et NF κ B suggérant que *Siah-1L* peut être régulé par ces facteurs de transcription en plus de PPAR β/δ .

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence le rôle du récepteur PPAR β/δ dans certaines propriétés des cellules de glioblastomes de la lignée T98G. En effet, nous avons

montré que l'activation du récepteur PPAR β/δ stimule la prolifération et la migration des cellules de glioblastome T98G. Nous avons également montré que l'activation de PPAR β/δ induit l'expression de Siah-1L dans les cellules T98G et dans d'autres cellules cancéreuses et que la surexpression de Siah-1L dans les cellules T98G induit la prolifération et la migration cellulaire. Etant donné que l'activation de PPAR β/δ induit Siah-1L dans différentes lignées cellulaires cancéreuses, il est probable qu'elle pourrait stimuler leur prolifération et leur migration comme dans le cas des glioblastomes. En effet, il a été montré que l'activation de PPAR β/δ stimule la prolifération des cellules cancéreuses du sein MCF-7 et T47D (Stephen et al., 2004), du foie HepG2, Huh7 et Hep3B (Xu et al., 2006) et de la prostate PNT1A et LnCaP (Stephen et al., 2004). Par conséquent, l'utilisation d'antagonistes de PPAR β/δ ou l'inhibition de l'expression de Siah-1L pourraient constituer une approche thérapeutique potentielle pour le glioblastome. En effet, l'expression d'un dominant négatif de Siah dans les cellules du cancer du pancréas humain réduit la prolifération tumorale dans un modèle de xénogreffe chez la souris nude (Schmidt et al., 2007).

En conclusion, notre étude révèle une nouvelle voie impliquée dans la prolifération et la migration des glioblastomes et suggère que les antagonistes du récepteur PPAR β/δ peuvent s'avérer efficace dans le traitement des glioblastomes.

Il serait également intéressant dans les perspectives de ce travail de déterminer le lien entre PPAR β/δ , le processus tumoral des glioblastomes et Siah-1L en particulier déterminer si l'effet de l'activation de PPAR β/δ sur la prolifération et la migration des glioblastomes T98G est aboli ou non après inhibition de Siah-1L par les siRNA. D'autre part, afin de comprendre le mécanisme d'action de Siah-1L sur la prolifération et la migration des glioblastomes, il serait intéressant d'étudier la stabilité des facteurs impliqués dans ces processus cellulaires afin d'identifier ceux qui seraient les cibles de Siah-1L.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott C, Chambers D (1994) Analysis of CAG trinucleotide repeats from mouse cDNA sequences. *Ann Hum Genet.* 58 :87-94.
- Afshar K, Scholey J, Hawley RS (1995) Identification of the chromosome localization domain of the *Drosophila* nod kinesin-like protein. *J Cell Biol.* 131: 833-43.
- Ahmed AU, Schmidt, RL, Park C H, Reed NR, Hesse SE, Thomas CF, Tang AH (2008) Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth. *J. Natl. Cancer Inst.* 100: 1606-29.
- Bae BI, Hara MR, Cascio MB, Wellington CL, Hayden MR, Ross CA, Ha HC, Li XJ, Snyder SH, Sawa A.(2006) Mutant huntingtin: nuclear translocation and cytotoxicity mediated by GAPDH. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 3405-9.
- Bai RY, Staedtke V, Riggins GJ (2011) Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends Mol Med.* 17, 301-12.
- Baldi I, Huchet A, Bauchet L, Loiseau H (2010) Epidemiology of glioblastoma. [Neurochirurgie 56, 433–440](#)
- Bani MR, Rak J, Adachi D, Wiltshire R, Trent JM, Kerbel RS, Ben-David Y (1996) Multiple features of advanced melanoma recapitulated in tumorigenic variants of early stage (radial growth phase) human melanoma cell lines: evidence for a dominant phenotype. *Cancer Res.* 56: 3075-86.
- Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Evans RM (2002). Effects of peroxisome proliferator-activated receptor δ on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 9: 303-08.
- Barroso EE, Eyre X, Palomer, Vázquez-Carrera M (2011) The peroxisome proliferator-activated receptor β/δ ({PPAR β/δ }) agonist {GW501516} prevents {TNF- α -induced} {NF- κ B} activation in human {HaCaT} cells by reducing p65 acetylation through {AMPK} and {SIRT1}. *Biochem Pharmacol.* 81, 534-543.
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F., and Delattre, J.Y. (2003). Primary brain tumours in adults. *Lancet.* 361, 323-331.
- Berge K, Tronstad KJ, Flindt EN, Rasmussen TH, Madsen L, Kristiansen K, Berge R (2001) Tetradecylthioacetic acid inhibits growth of rat glioma cells ex vivo and in vivo via PPAR-dependent and PPAR-independent pathways. *Carcinogenesis.* 22, 1747–55.
- Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 85: 267-73.
- Bogdan S, Senkel S, Esser F, Ryffel GU, Pogge v Strandmann E (2001) Misexpression of Xsiah-2 induces a small eye phenotype in *Xenopus*. *Mech Dev.* 103: 61-9.
- Borden KL, Freemont PS (1996) The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol.* 6: 395-401.

- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
- Brauckhoff A, Malz M, Tschaharganeh D, Malek N, Weber A, Riener MO, Soll C, Samarin J, Bissinger M, Schmidt J, Longerich T, Ehemann V, Schirmacher P, Breuhahn K. (2011) Nuclear expression of the ubiquitin ligase seven in absentia homolog (SIAH)-1 induces proliferation and migration of liver cancer cells. *J Hepatol.* 55: 1049-57.
- Brugière N, Rothstein SJ, Cui Y (2000) Molecular mechanisms of self-recognition in Brassica self-incompatibility. *Trends Plant Sci.* 5: 432-8.
- Bruzzoni-Giovanelli H, Faille A, Linares-Cruz G, Nemani M, Le Deist F, Germani A, Chassoux D, Millot G, Roperch JP, Amson R, Telerman A, Calvo F. (1999) SIAH-1 inhibits cell growth by altering the mitotic process. *Oncogene.* 18: 7101-9.
- Calzado MA, de la Vega L, Munoz E, Schmitz M L (2009) Autoregulatory control of the p53 response by Siah-1L-mediated HIPK2 degradation. *Biol Chem.* 390: 1079-83.
- Cancer Genome Atlas Research Network, 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 455 (7216), 1061–1068.
- Carthew P, Smith AG (1994) Pathological mechanisms of hepatic tumour formation in rats exposed chronically to dietary hexachlorobenzene. *J Appl Toxicol.* 14: 447-52.
- Carthew RW, Rubin GM (1990) seven in absentia, a gene required for specification of R7 cell fate in the Drosophila eye. *Cell.* 63: 561-577.
- Chan P, Moller A, Liu MC, Sceneay JE, Wong CS, Waddell N, Huang KT, Dobrovic A, Millar EK, O'Toole SA, McNeil CM, Sutherland RL, Bowtell DD and Fox SB. (2011) The expression of the ubiquitin ligase SIAH2 (seven in absentia homolog 2) is mediated through gene copy number in breast cancer and is associated with a basal-like phenotype and p53 expression. *Breast Cancer Res.* **13**: R19.
- Chui PC, Guan HP, Lehrke M, Lazar MA (2005) PPARgamma regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *J Clin Invest.* 115: 2244-56.
- Ciechanover A (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17: 7151-60.
- Ciechanover A, Schwartz AL (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 2727-30.
- Cui Y, Bi YM, Brugière N, Arnoldo M, Rothstein SJ (2000) The S locus glycoprotein and the S receptor kinase are sufficient for self-pollen rejection in Brassica. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 3713-7.
- de Duve C. (1969b) The peroxisome: a new cytoplasmic organelle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 173: 71-83.
- de Tayrac M and Mosser J. (2010) Classification of glioblastoma and genome profiling. *Neurochirurgie.* 56, 464-6.

- Della NG, Senior PV, Bowtell DD (1993) Isolation and characterisation of murine homologues of the *Drosophila* seven in absentia gene (*sina*). *Development*. 117:1333–43.
- Di-Poi N, Tan NS, Michalik L, Wahli W, Desvergne B (2002) Antiapoptotic role of {PPARbeta} in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Mol Cell*. 10, 721-733.
- Fantappie MR, Osman A, Ericsson C, Niles EG, LoVerde PT (2003) Cloning of *Schistosoma mansoni* Seven in Absentia (SmSINA)(+) homologue cDNA, a gene involved in ubiquitination of SmRXR1 and SmRXR2.
- Feige JN, Gelman L, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B (2005) Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J Biol Chem*. 280: 17880-90.
- Fiucci G, Beaucourt S, Duflaut D, Lespagnol A, Stumptner-Cuvelette P, Géant A, Buchwalter G, Tuynder M, Susini L, Lassalle JM, Wasylyk C, Wasylyk B, Oren M, Amson R, Telerman A (2004) Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: identification of the functional p53 responsive element in the siah-1b promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 3510-3515.
- Foreman JE, Chang WL, Palkar PS, Zhu B, Borland MG, Williams JL, Kramer LR, Clapper ML, Gonzalez FJ, Peters JM (2011) Functional characterization of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ expression in colon cancer. *Mol Carcinogen*. 50, 884-900.
- Foreman JE, Sorg JM, McGinnis KS, Rigas B, Williams JL, Clapper ML, Gonzalez FJ, Peters JM (2009) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta by the {APC/beta-CATENIN} pathway and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Mol. Carcinogen*. 48, 942-952.
- Frasor J, Danes JM, Funk CC, Katzenellenbogen BS (2005) Estrogen down-regulation of the corepressor N-CoR: mechanism and implications for estrogen derepression of N-CoR-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 13153-7.
- Frew IJ, Hammond VE, Dickins RA, Quinn JM, Walkley CR, et al (2003) Generation and analysis of Siah2 mutant mice. *Mol Cell Biol*. 2003 Dec;23(24):9150-61.
- Frew IJ, Dickins RA, Cuddihy AR, Del Rosario M, Reinhard C, O'Connell MJ, Bowtell DD (2002) Normal p53 function in primary cells deficient for Siah genes. *Mol Cell Biol*. 22: 8155-64.
- Frew IJ, Sims NA, Quinn JM, Walkley CR, Purton LE, Bowtell DD, Gillespie MT (2004) Osteopenia in Siah1a mutant mice. *J Biol Chem*. 279: 29583-8.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Cavenee WK. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Gene Dev.*, 21: 2683-2710.

- Gelman L, Fruchart JC, Auwerx J (1999) An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol Life Sci.*55: 932-43.
- Genini D, Garcia-Escudero R, Carbone GM, Catapano CV. (2012) Transcriptional and Non-Transcriptional Functions of PPAR β/δ in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One.* 7: e46009.
- Germani A, Bruzzoni-Giovanelli H, Fellous A, Gisselbrecht S, Varin-Blank N, Calvo F (2000) SIAH-1 interacts with alpha-tubulin and degrades the kinesin Kid by the proteasome pathway during mitosis. *Oncogene.* 19: 5997-6006.
- Germani A, Prabel A, Mourah S, Podgorniak MP, Di Carlo A, Ehrlich R, Gisselbrecht S, Varin-Blank N, Calvo F, Bruzzoni-Giovanelli H. (2003) SIAH-1 interacts with CtIP and promotes its degradation by the proteasome pathway. *Oncogene.* 22: 8845-51.
- Girroir EE, Hollingshead HE, Billin AN, Willson TM, Robertson GP, Sharma AK, Amin S, Gonzalez FJ, Peters JM (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) ligands inhibit growth of UACC903 and MCF7 human cancer cell lines. *Toxicology.* 243: 236-43.
- Glinghammar B, Skogsberg J, Hamsten A, Ehrenborg E (2003) {PPARdelta} activation induces {COX-2} gene expression and cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells. *BBRC.* 308, 361-368.
- Goldammer T, Dorroch U, Brunner RM, Kata SR, Womack JE, Schwerin M (2002) Identification and chromosome assignment of 23 genes expressed in meat and dairy cattle. *Chromosome Res.* 10: 411-8.
- Guan HP, Ishizuka T, Chui PC, Lehrke M, Lazar MA (2005) Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev.* 19: 453-61.
- Gupta RA, Tan J, Krause WF, Geraci MW, Willson TM, Dey SK, DuBois RN (2000) Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 13275-13280.
- Gupta RA, Wang D, Katkuri S, Wang H, Dey SK, DuBois RN (2004) Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-delta accelerates intestinal adenoma growth. *Nat Med.* 10, 245-247.
- Habelhah H, Frew IJ, Laine A, Janes PW, Relaix F, Sassoon D, Bowtell DD, Ronai Z (2002) Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2. *EMBO J.* 21: 5756-5765.
- Habelhah H, Laine A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Gershwin ME, Bowtell DD, Ronai Z. (2004) Regulation of 2-oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase stability by the RING finger ubiquitin ligase Siah. *J Biol Chem.* 279: 53782-8.
- Han J, Lee H, Yang H, Hur J, Jun S, Kim J, Cho C, Koh G, Peters JM, Park K, Cho H, Lee H, Kang H, Oh B, Park Y, Kim H (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor-delta agonist enhances vasculogenesis by regulating endothelial progenitor cells through genomic

and nongenomic activations of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Circulation*. 118, 1021-1033.

- Han S, Ritzenthaler JD, Wingerd B, Roman J (2005) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) increases the expression of prostaglandin E2 receptor subtype EP4. The roles of phosphatidylinositol 3-kinase and CCAAT/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem*. 280, 33240-33249.

- Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, Takahashi M, Cheah JH, Tankou SK, Hester LD, Ferris CD, Hayward SD, Snyder SH, Sawa A (2005) S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol*. 7: 665-674.

- Hatano Y, Man M, Uchida Y, Crumrine D, Mauro TM, Feingold KR, Elias PM, Holleran WM (2010) Murine atopic dermatitis responds to peroxisome proliferator-activated receptors alpha and beta/delta (but not gamma) and liver X receptor activators. *J Allerg Clin Immunol*. 125, 160-169.

- He HT, Fokas E, You A, Engenhart-Cabillie R, An HX (2010) Siah1 proteins enhance radiosensitivity of human breast cancer cells. *BMC Cancer*. 10: 403.

- He P, Borland MG, Zhu B, Sharma AK, Amin S, El-Bayoumy K, Gonzalez FJ, Peters JM (2008) Effect of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) in human lung cancer cell lines. *Toxicology*. 254, 112-117.

- He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW (1999) PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*. 99: 335-45.

- Helseth, A. (1995). The incidence of primary CNS neoplasms before and after computerized tomography availability. *J. Neurosurg*. 83: 999-1003.

- Hicke L (2001) A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell*. 106: 527-30.

- Hofmann TG, Moller A, Sirma H, Zentgraf H, Taya Y, Droge W, Will H, Schmitz ML (2002) Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol*. 4, 1-10.

- Hofmann TG, Schmitz ML (2002) The promoter context determines mutual repression or synergism between NF-kappaB and the glucocorticoid receptor. *Biol Chem*. 383: 1947-51.

- Hollingshead HE, Killins RL, Borland MG, Girroir EE, Billin AN, Willson TM, Sharma AK, Amin S, Gonzalez FJ, Peters JM (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) ligands do not potentiate growth of human cancer cell lines. *Carcinogenesis*. 28: 2641-9.

- Holloway AJ, Della NG, Fletcher CF, et al (1997) Chromosomal mapping of five highly conserved murine homologues of the Drosophila RING finger gene seven-in-absentia. *Genomics*. 41:160-80.

- Hörlein AJ, Näär AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Söderström M, Glass CK, et al. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. 377: 397-404.
- House CM, Frew IJ, Huang HL, Wiche G, Traficante N, Nice E, Catimel B, Bowtell DD (2003) A binding motif for Siah ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 3101-6.
- Hu G, Fearon ER (1999) Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins. *Mol Cell Biol*. 19: 724-32.
- Hu G, Zhang S, Vidal M, Baer JL, Xu T, Fearon ER (1997) Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*. 11: 2701-2714.
- Ijpenberg A, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B (1997) Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem*. 272: 20108-17.
- Issemann, I. and Green S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 347, 645-50.
- Iwai A, Marusawa H, Matsuzawa S, Fukushima T, Hijikata M, Reed JC, Shimotohno K, Chiba T (2004) Siah-1L, a novel transcript variant belonging to the human Siah family of proteins, regulates beta-catenin activity in a p53-dependent manner. *Oncogene*. 23: 7593-7600.
- Jung TY, Choi YD, Kim YH, Lee JJ, Kim HS, Kim JS, Kim SK, Jung S, Cho D. (2013) Immunological characterization of glioblastoma cells for immunotherapy. *Anticancer Res*. 33, 2525-33.
- Kim CJ, Cho YG, Park CH, Jeong SW, Nam SW, Kim SY, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS (2004) Inactivating mutations of the Siah-1 gene in gastric cancer. *Oncogene*. 23: 8591-6.
- Kim,SY, Choi DW, Kim EA, Choi CY (2009) Stabilization of HIPK2 by escape from proteasomal degradation mediated by the E3 ubiquitin ligase Siah1. *Cancer Lett*. 279: 177-84.
- Li M, Pascual G, Glass CK (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol*. 20: 4699-707.
- Li S, Ting NS, Zheng L, Chen PL, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EY, Lee WH (2000) Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature*. 406: 210-5.
- Liani E, Eyal A, Avraham E, Shemer R, Szargel R, Berg D, Bornemann A, Riess O, Ross CA, Rott R, Engelender S (2004) Ubiquitylation of synphilin-1 and alpha-synuclein by SIAH and its presence in cellular inclusions and Lewy bodies imply a role in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 5500-5.

- Linos E., Raine T, Alonso A, Michaud D. (2007). Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *J Nat Cancer I.* 99: 1544-50.
- Liu J, Stevens J, Rote CA, Yost HJ, Hu Y, Neufeld KL, White RL, Matsunami N. (2001) Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell.* 7: 927-36.
- Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM (1999) RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 11364-9.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114:97-109.
- Lüders J, Demand J, Höhfeld J (2000) The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J Biol Chem.* 275: 4613-7.
- Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, et al (2001) Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes and Dev.* 15: 1311–33.
- Mandon-Pépin B, Oustry-Vaiman A, Vigier B, Piumi F, Cribiu E, Cotinot C (2003) Expression profiles and chromosomal localization of genes controlling meiosis and follicular development in the sheep ovary. *Biol Reprod.* 68: 985-95.
- Martinez-Climent JA, Alizadeh AA, Segraves R, Blesa D, Rubio-Moscardo F, Albertson DG, Garcia-Conde J, Dyer MJ, Levy R, Pinkel D, Lossos IS (2003) Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood.* 101: 3109-17.
- Matsuzawa S, Takayama S, Froesch BA, Zapata JM, Reed JC (1998) p53-inducible human homologue of *Drosophila* seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1. *EMBO J.* 17: 2736–47.
- Matsuzawa SI, Reed JC (2001) Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell.* 7: 915-26.
- McKinley BP, Michalek AM, Fenstermaker RA, Plunkett RJ. (2000). The impact of age and gender on the incidence of glial tumors in New York state from 1976-1995. *J Neurosurg.* 93: 932-39.
- Michalik L, Desvergne B, Wahli W (2004) Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer.* 4: 61-70.
- Möller A, House CM, Wong CS, Scanlon DB, Liu MC, Ronai Z, Bowtell DD (2009) Inhibition of Siah ubiquitin ligase function. *Oncogene.* 28: 289-96.
- Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Ceru MP (2004) Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience.* 123: 131-45.

- Nadeau RJ, Toher JL, Yang X, Kovalenko D, Friesel R (2007) Regulation of Sprouty2 stability by mammalian Seven-in-Absentia homolog 2. *J Cell Biochem.* 100: 151-60.
- Nagano Y, Fukushima T, Okemoto K, Tanaka K, Bowtell DD, Ronai Z, Reed JC, Matsuzawa S (2011) Siah1/SIP regulates p27(kip1) stability and cell migration under metabolic stress. *Cell Cycle.* 10: 2592-2602.
- Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. (2001a). Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest.* 81: 77-82.
- Nakamura T, Funahashi T, Yamashita S, Nishida M, Nishida Y, et al., (2001b) Thiazolidinedione derivative improves fat distribution and multiple risk factors in subjects with visceral fat accumulation--double-blind placebo-controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 54: 181-90.
- Nakamura, T, Tsubono Y, Kameda-Takemura K, Funahashi T, Yamashita S, Hisamichi S, Kita T, Yamamura, Matsuzawa Y. (2001c) Magnitude of sustained multiple risk factors for ischemic heart disease in Japanese employees: a case-control study. *Jpn Circ J.* 65: 11-7.
- Nakayama K, Frew IJ, Hagensen M, Skals M, Habelhah H, Bhoomik A, Kadoya T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Frappell PB, Bowtell DD, Ronai Z (2004) Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1 α abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell.* 117: 941-52.
- Nakayama K, Ronai Z (2004) Siah: new players in the cellular response to hypoxia. *Cell Cycle.* 3: 1345-7.
- Nambiar PR, Giardina C, Guda K, Aizu W, Raja R, Rosenberg DW. (2002) Role of the alternating reading frame (P19)-p53 pathway in an in vivo murine colon tumor model. *Cancer Res.* 62: 3667-74.
- Neiman PE, Ruddell A, Jasoni C, Loring G, Thomas SJ, Brandvold KA, Lee RM, Burnside J, Delrow J (2001) Analysis of gene expression during myc oncogene-induced lymphomagenesis in the bursa of Fabricius. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 6378-83.
- Nemani M, Linares-Cruz G, Bruzzoni-Giovanelli H, Roperch JP, Tuynder M, et al. (1996) Activation of the human homologue of the *Drosophila* sina gene in apoptosis and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 9039-42.
- Ohgaki, H., Kleihues, P., 2005. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 64, 479-489.
- Oliver WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin L, Willson TM (2001) A selective peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci.* 98: 5306-11.
- Omuro A, DeAngelis LM (2013) Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA.* 310, 1842-50

- Palmer CN, Hsu MH, Griffin KJ, Johnson EF (1995) Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *J Biol Chem.* 27: 16114-21.
- Papi A, Rocchi P, Ferreri AM, Guerra F, Orlandi M. (2009a) Enhanced effects of PPARgamma ligands and RXR selective retinoids in combination to inhibit migration and invasiveness in cancer cells. *Oncol Rep.* 21: 1083-9.
- Papi A, Tatenhorst L, Terwel D, Hermes M, Kummer MP, Orlandi M, Heneka MT (2009b) PPARgamma and RXRgamma ligands act synergistically as potent antineoplastic agents in vitro and in vivo glioma models. *J Neurochem.* 109:1779-1790.
- Park BH, Vogelstein B, Kinzler KW (2001) Genetic disruption of PPARdelta decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 2598-2603.
- Parsons, D., Jones, S., Zhang, X., Cheng-Ho Lin, J. et al. (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 321,1807.
- Pedchenko TV, Gonzalez AL, Wang D, DuBois RN, Massion PP (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta expression and activation in lung cancer. *Am J Resp Cell Mol.* 39, 689--696.
- Pestereva E, Kanakasabai S, Bright JJ. (2012) PPARgamma agonists regulate the expression of stemness and differentiation genes in brain tumour stem cells. *Br J Cancer.* 106: 1702-12.
- Peters J, Hollingshead H, Gonzalez F (2008) Role of peroxisome-proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) in gastrointestinal tract function and disease. *Clin Sci.* 115: 107-127.
- Peters JM and Gonzalez FJ (2009) Sorting out the functional role(s) of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta ({PPARbeta/delta}) in cell proliferation and cancer. *BBA.* 1796, 230--241.
- Peters JM, Foreman JE, Gonzalez FJ (2011) Dissecting the role of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ (PPAR β/δ) in colon, breast, and lung carcinogenesis. *Cancer Metast Rev.* 30: 619-40.
- Peters JM, Shah YM, Gonzalez FJ (2012) The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer.* 12, 181-95.
- Piqueras L, Reynolds AR, Hodivala-Dilke KM, Alfranca A, Redondo JM, Hatae T, Tanabe T, Warner TD, Bishop-Bailey D (2007) Activation of PPARbeta/delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27: 63-9.
- Polekhina G, House CM, Traficante N, Mackay JP, Relaix F, Sassoon DA, Parker MW, Bowtell DD (2002) Siah ubiquitin ligase is structurally related to TRAF and modulates TNF-alpha signaling. *Nat Struct Biol.* 9: 68-75.
- Qi J, Pellecchia M, & Ze'ev, A R. (2010). The Siah2-HIF-FoxA2 axis in prostate cancer—new markers and therapeutic opportunities. *Oncotarget,* 1: 379.

- Reed JC, Ely KR (2002) Degrading liaisons: Siah structure revealed. *Nat Struct Biol.* 9: 8-10.
- Ricote M, Glass CK (2007) PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *BBA-Mol Cell Biol.* 8: 926-35.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 391: 79-82.
- Risérus U, Sprecher D, Johnson T, Olson E, Hirschberg S, Liu A, Karpe F (2008) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. *Diabetes.* 57: 332-39.
- Ro H, Jang Y, Rhee M (2004) The RING domain of Siaz, the zebrafish homologue of *Drosophila* seven in absentia, is essential for cellular growth arrest. *Mol Cells.* 17: 160-5.
- Ro H, Kim KE, Huh TL, Lee SK, Rhee M (2003) Expression pattern of Siaz gene during the zebrafish embryonic development. *Gene Expr Patterns.* 3: 483-8.
- Robyr D, Wolffe AP, Wahli W (2000) Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol. Endocrinol.* 14: 329-47.
- Roeder RG (2005) Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett.* 579: 909-15.
- Roh MS, Hong SH, Jeong JS, Kwon HC, Kim MC, Cho SH, Yoon JH, Hwang TH (2004) Gene expression profiling of breast cancers with emphasis of beta-catenin regulation. *J Korean Med Sci.* 19: 275-82.
- Roperch JP, Lethrone F, Prieur S, Piouffre L, Israeli D, Tuynder M, Nemani M, Pasturaud P, Gendron MC, Dausset J, Oren M, Amson RB, Telerman A (1999) SIAH-1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: identification of common effectors with p53 and p21(Waf1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 8070-3.
- Saluja I, Granneman JG, Skoff RP (2001) PPAR δ agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture. *Glia.* 33: 191-204.
- Saurin AJ, Borden KL, Boddy MN, Freemont PS (1996) Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci.* 21: 208-14.
- Schmidt RL, Park CH, Ahmed AU, Gundelach JH, Reed NR, Cheng S, Knudsen BE, Tang AH (2007) Inhibition of RAS-mediated transformation and tumorigenesis by targeting the downstream E3 ubiquitin ligase seven in absentia homologue. *Cancer Res.* 67: 11798-11810.
- Schwartzbaum J, Jonsson F, Ahlbom A, Preston-Martin S, Lonn S, Soderberg KC, Feychting M. (2003) Cohort studies of association between self-reported allergic conditions, immune-related diagnoses and glioma and meningioma risk. *Int J Cancer.* 106: 423-8.

- Seree E, Villard PH, Pascussi JM, Pineau T, Maurel P, Nguyen QB, Barra Y (2004) Evidence for a new human CYP1A1 regulation pathway involving PPAR- α and 2 PPRE sites. *Gastroenterology*, 127: 1436-45.
- Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, Dobbins SE, Sanson M, Malmer B, Houlston RS. (2009). Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Na. Genet.* 41: 899-904.
- Shmueli A, Oren M (2005) Life, death, and ubiquitin: taming the mule. *Cell.* 121: 963-5.
- Simonavicius N, Robertson D, Bax DA, Jones C, Huijbers IJ, Isacke CM (2008) Endosialin (CD248) is a marker of tumor-associated pericytes in high-grade glioma. *Mod Pathol.* 21, 308-15.
- Sprecher DL, Massien C, Pearce G, Billin AN, Perlstein I, Willson TM, Johnson TG (2007) Triglyceride: high-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor δ agonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27: 359-65.
- Stephen RL, Gustafsson MC, Jarvis M, Tatoud R, Marshall BR, Knight D, Ehrenborg E, Harris AL, Wolf CR, Palmer CN (2004) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines. *Cancer Res.* 64: 3162-70.
- Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A. (2007). Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol.* 25: 4127-36.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Mirimanoff RO. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10: 459-66.
- Sun L, Chen ZJ (2004) The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 16: 119-26.
- Susini L, Passer BJ, Amzallag-Elbaz N, Juven-Gershon T, Prieur S, Privat N, Tuynder M, Gendron MC, Israël A, Amson R, Oren M, Telerman A. (2001) Siah-1 binds and regulates the function of Numb. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 15067-72.
- Takayama O, Yamamoto H, Damdinsuren B, Sugita Y, Ngan CY, Xu X, Tsujino T, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M (2006) Expression of {PPARdelta} in multistage carcinogenesis of the colorectum: implications of malignant cancer morphology. *Brit J Cancer.* 95, 889--895.
- Telerman A, Amson R (2009) The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. *Nat Rev Cancer.* 9: 206-16.

- Tong BJ, Tan J, Tajeda L, Das SK, Chapman JA, DuBois RN, Dey SK (2000) Heightened expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-delta in human endometrial adenocarcinoma. *Neoplasia*. 2: 483-490.
- Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y (2003) Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol*. 162: 899-908.
- Tuynder M, Susini L, Prieur S, Besse S, Fiucci G, Amson R, Telerman A. (2002) Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 14976-81.
- Varshavsky A (1997) The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci*. 22: 383-7.
- Wagner KD, Benchetrit M, Bianchini L, Michiels JF, Wagner N (2011) Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ) is highly expressed in liposarcoma and promotes migration and proliferation. *J Pathol*. 224: 575-588.
- Wagner N, Jehl-Pi  tri C, Lopez P, Murdaca J, Giordano C, Schwartz C, Gounon P, Hatem SN, Grimaldi P, Wagner KD (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor β stimulation induces rapid cardiac growth and angiogenesis via direct activation of calcineurin. *Cardiovasc Res*. 83: 61-71.
- Wang T, Xu J, Yu X, Yang R, Han ZC (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases. *Crit Rev Oncol Hematol*. 58: 1-14.
- Winter M, Sombroek D, Dauth I, Moehlenbrink J, Scheuermann K, Crone J, Hofmann TG (2008) Control of HIPK2 stability by ubiquitin ligase Siah-1 and checkpoint kinases ATM and ATR. *Nat Cell Biol*. 10: 812-24.
- Wrensch M, Jenkins RB, Chang JS, Yeh RF, Xiao Y, Decker, PA, Wiencke JK (2009). Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nat Genet*. 41: 905-908.
- Xia M, Hou M, Zhu H, Ma J, Tang Z, Wang Q, Li Y, Chi D, Yu X, Zhao T, Han P, Xia X, Ling W (2005) Anthocyanins induce cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages: the role of the peroxisome proliferator-activated receptor γ -liver X receptor α -ABCA1 pathway. *J Biol Chem*. 280, 36792-36801.
- Xie Q, Guo HS, Dallman G, Fang S, Weissman AM, Chua NH (2002) SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature*. 419: 167-70.
- Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, Wat NM, Wong WK, Lam KS (2006) Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem*. 52: 405-13.
- Yan J, Young ME, Cui L, Lopaschuk GD, Liao R, Tian R. (2009) Increased glucose uptake and oxidation in mouse hearts prevent high fatty acid oxidation but cause cardiac dysfunction in diet-induced obesity. *Circulation*. 119: 2818-28.

- Yang X, Kume S, Tanaka Y, Isshiki K, Araki S, Chin-Kanasaki M, Sugimoto T, Koya D, Haneda M, Sugaya T, Li D, Han P, Nishio Y, Kashiwagi A, Maegawa H, Uzu T (2011) {GW501516}, a {PPAR δ } agonist, ameliorates tubulointerstitial inflammation in proteinuric kidney disease via inhibition of {TAK1-NF κ B} pathway in mice. *PloS One*. 6, e25271.
- Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, Farrar WL (2000) Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem*. 275: 4541-4.
- Yano M, Imagawa E, Tada M, Moriuchi T. (2005) In silico and systematic molecular evolutionary analysis of human SIAH1b inactivation. *Hokkaido Igaku Zasshi*. 80: 201-9.
- Yego EC, Mohr S. (2010) siah-1 Protein is necessary for high glucose-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase nuclear accumulation and cell death in Muller cells. *J Biol Chem*. 285: 3181-90.
- Yin Y, Russell RG, Dettin LE, Bai R, Wei ZL, Kozikowski AP, Kopelovich L, Glazer RI (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma agonists differentially alter tumor differentiation and progression during mammary carcinogenesis. *Cancer Res*. 65: 3950-7.
- Yoshikawa T, Brkanac Z, Dupont BR, Xing GQ, Leach RJ, Detera-Wadleigh SD (1996) Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics*. 35: 637-8.
- Youssef J, Badr M (2011) Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. *Br J Pharmacol*. 164: 68-82.
- Zhao J, Wang C, Wang J, Yang X, Diao N, Li Q, Wang W, Xian L, Fang Z, Yu L. (2011) E3 ubiquitin ligase Siah-1 facilitates poly-ubiquitylation and proteasomal degradation of the hepatitis B viral X protein. *FEBS Lett*. 585: 2943-50.

ANNEXES

Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ Stimulates the Expression of Siah-1L and Promotes Glioblastoma Cell Proliferation and Migration

Najat Khalil*, Hossam Murad, Philippe Becuwe and Lionel Domenjoud

Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), UMR 7039 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, Boulevard des Aiguillettes, BP70239, 54506 Vandoeuvre-Les-Nancy, France.

*Address correspondence to: Najat Khalil, UMR 7039 CNRS-Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, France. Phone: 33-3-83-68-42-22 ; Fax:33-3-83-68-42-19; E-mail: Knajat17@yahoo.fr

Short title: Siah-1L and PPAR β/δ function in glioblastoma

Nonstandard Abbreviations used: PPAR, Peroxisome proliferators-activated receptor; Siah, E3 ubiquitin ligase seven in absentia homolog; qPCR, quantitative real-time PCR.

Abstract

Glioblastoma represent the most frequent primary brain tumor in adults and the prognosis of patients with glioblastoma is poor and only marginally improved by chemotherapy. Peroxisome proliferators-activated receptor β (PPAR β/δ) is highly expressed in brain and has been associated with cancer. However, not much is known about the role of PPAR β/δ in glioblastoma tumorigenesis. Here, we have assessed the involvement of PPAR β/δ in glioblastoma cell proliferation, migration and apoptosis. We found that PPAR β/δ agonist GW501516 stimulated growth and migration of T98G glioblastoma cell line. Interestingly, gene expression analysis showed that PPAR β/δ agonist induced the expression of the E3 ubiquitin ligase seven in absentia homolog (SIAH-1L) gene. We therefore analyzed the functional relevance and studied the promoter regulation of SIAH-1L in human T98G glioblastoma cell line. Transfection of T98G cells with pCMV-Siah-1L vector revealed that overexpression of Siah-1L predominantly supported T98G cell proliferation and migration without significantly affecting apoptosis. SIAH-1L gene promoter analysis showed that the minimal promoter of human Siah-1L lies within 470 bp sequence upstream of the transcriptional start site, whereas the PPAR β/δ agonist GW501516 responsive element is present within sequence up to -710. Site directed mutagenesis revealed that PPAR β/δ induced Siah-1L promoter activity is achieved through PPAR response element located at -733. Transactivation and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays indicated that PPAR β/δ is a potent transactivator of SIAH-1L gene promoter and that PPAR β/δ agonist GW501516-induced activity is mediated through increased recruitment of PPAR β/δ to the promoter. This study reveals a novel pathway for glioblastoma growth and migration and suggests that PPAR β/δ antagonists may prove effective in the treatment of glioblastoma.

Key Words: Glioblastoma, PPAR β/δ , Siah-1L, promoter, proliferation

Introduction

Glioblastomas are the most frequent primary malignant brain tumors that present unique challenges to therapy and pose major health problems [1]. Clarifying the mechanisms of tumorigenesis, growth, and treatment resistance in glioblastoma is critical to the development and application of molecular targeted therapies.

Despite recent advances in surgery, radiation, chemotherapy and other molecular therapies, the prognosis of glioblastoma patients remains poor and a cure for brain tumors is elusive, see for review [2]. However, increased understanding of signalling pathways involved in initiation of malignant gliomas and improvements in target identification will stimulate the development of novel target therapies.

Peroxisome proliferators-activated receptors (PPARs), mainly PPAR β/δ is expressed in brain and thought to play a role in controlling brain cell growth and differentiation [3]. PPARs are members of the family of nuclear receptor transcription factors composed of three known subtypes PPAR α , PPAR β/δ and PPAR γ that are involved in metabolic and developmental processes [4]. These receptors are activated by a wide range of naturally occurring lipids or their metabolites [5] and activate the transcription of their target genes as heterodimers with retinoid X receptor (RXR) [6]. PPARs have been implicated in several important diseases and pathological conditions such as inflammation [7] diabetes [8] and cancer [9-12]. It has been reported that PPAR β/δ is over-expressed in human cancer and may be important in tumor initiation and progression [13, 14]. In support to this, PPAR β/δ -null HCT116 cells have reduced tumorigenicity in a xenograft model [15] and PPAR β/δ ligands promote cell proliferation in prostate and breast cancer cell lines [16] as well as in non small cell lung cancer [14].

Recently, it has been shown that Siah-1, the human homologue of the *Drosophila* seven in absentia (Sina) protein, induced cell proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma [17]. Siah-1 and Siah-2 are human homologues belonging to an evolutionarily highly conserved family of E3 ubiquitin ligases [18]. They play a key role in the regulation of protein stability through the ubiquitin-proteasome pathway which is now being recognized as a major mechanism of regulating a diverse array of cellular processes [19]. Siah1 and Siah2 contain a N-terminal RING (Really Interesting Novel Gene) finger domain that binds E2 ubiquitin conjugating enzymes and a C-terminal substrate-binding domain that interact with their target proteins, tagging them with Ubiquitin, thereby targeting their degradation by ubiquitin-proteasome pathway [20-22]. Siah1 and Siah2 have been shown to control the

stability of several proteins, including β -catenin, DCC [23], N-CoR [24], TIEG-1 [25], TRAF2 [26] c-Myb [27] the CDK activator RINGO and GAG-1 [28] and Pard3A that controls neuronal cell adhesion [29]. Siah1 and Siah2 proteins play a key role in cancer and suggested as anticancer targets, see for review [30].

The human SIAH-1 gene encodes Siah-1 and its splice variant Siah-1L (Siah-1a and Siah-1b) that are transcribed by two independent promoter sequences generating Siah-1 and Siah-1L. Siah-1L protein differs from Siah-1 by an extended N-terminal amino acid sequence of 31 residues. It has been shown that Siah-1L is induced by p53 and regulates β -catenin activity [31, 32].

In this study, we investigated the effect of highly selective PPAR β/δ agonist, GW501516 on glioblastoma tumorigenesis. Interestingly, our study showed that activation of PPAR β/δ induced glioblastoma cell proliferation and migration. Importantly, investigation of the molecular mechanism involved reveals for the first time that Siah-1L gene expression is up-regulated by PPAR β/δ in glioblastoma T98G cells leading to an increased cell proliferation and migration. Gene promoter and site directed mutagenesis studies showed that PPAR δ/β is a potent transactivator of SIAH-1L gene promoter and identified PPAR β/δ response element on the promoter sequence. Furthermore, ChIP assay demonstrated that GW501516-induced activity is mediated through increased recruitment of PPAR β/δ to the promoter. This study reveals a novel pathway for glioblastoma growth and migration and suggests that PPAR β/δ antagonists may prove effective in the treatment of glioblastoma.

Materials and Methods

Reagents

PPAR β/δ agonist GW501516 was from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Chemicals were obtained from Sigma (St Quentin-Fallavier, France). ExGen 500 reagent was from Euromedex (Souffelweyersheim, France), and Dual-Luciferase® Reporter Assay System was from Promega (Madison, WI).

Cell culture and treatments

Human glioblastoma T98G, chondrosarcoma SW1353, breast adenocarcinoma MCF7 and liver hepatocellular HepG2 cells were obtained from ATCC. Cells were maintained in

DMEM medium supplemented with 2 mM glutamine 100 µg/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin and 10% (v/v) fetal calf serum (Invitrogen-Gibco, Cergy-Pontoise, France) at 37°C in a humidified atmosphere supplemented with 5% CO₂. For PPARβ agonist treatments, cells were seeded onto six-well plates at 5x10⁵ cells/ml in DMEM and allowed to grow to 80% confluence. Cells were then serum starved overnight and treated either with PPARβ agonist GW 501516 (100 nM) or vehicle (DMSO) for 24 h prior to Siah-1L gene expression analysis.

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from cells treated or not with PPARβ/δ agonist using the RNAeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany). cDNA synthesis was performed in 20 µl reaction volume using 0.5 µg of total RNA using random primers and super Script Reverse Transcriptase (Clontech, Mountain View, CA, USA). Quantitative PCR was carried out using Siah-1L forward primer ACCAGCGGCCAGGACAAGGA and reverse primer TCAGGGCAGGCACCCTCTGG together with SYBR Green Master Mix (Qiagen) and LightCycler detection system (Roche, Meylan, France). Cycling parameters were 15 min at 95°C; 40 cycles of 15 s at 95°C, 25 s at 55°C, and 20 s at 72°C. The specificity of PCR amplifications was examined by agarose gel electrophoresis. Gene expression was determined in triplicate in three separate experiments and normalized using the housekeeping gene ribosomal protein S29. Analyses and fold differences were determined using the comparative C_T method. Fold change was calculated from the $\Delta\Delta C_T$ values with the formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, and data are relative to control values.

Expression vectors

PPARβ/δ and Siah-1L cDNA sequences in the cloning vector pOTB7 were obtained from ImaGenes (Germany). The coding region of PPARβ/δ cDNA was amplified by PCR using forward and reverse primers containing BamHI/HindIII restriction sites and that of Siah-1L was amplified using primers containing EcoRI/XhoI sites. PPARβ/δ and Siah-1L amplified sequences were then inserted into BamHI/HindIII and EcoRI/XhoI sites of pCMV expression vector (Clontech) downstream the pCMV promoter to generate pCMV-PPARβ/δ and pCMV-Siah-1L expression vectors.

Cell proliferation assay

The cell proliferation was measured by Click-iT[®] EdU (Molecular Probes, Invitrogen) assay, that uses the EdU (5-ethynyl-2-deoxyuridine) which is a nucleoside analogue of

thymidine that is incorporated into DNA during active DNA synthesis, according to the manufacturer's protocol. Cells were seeded in 96-well plates at 1×10^4 cell/per well and grown for 16 h, then treated with GW501516 or vehicle for 24 h and exposed to 10 μ M of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for additional 4 h at 37 °C. Cells were fixed and incubated with anti-Oregon Green[®] HRP conjugate and with Amplex[®] UltraRed reagent. Plates were analyzed on a plate reader with filter sets appropriate for Amplex[®] UltraRed (excitation/emission 568/585 nm).

Cell migration assay

The cell migration was measured using the 30 μ -Dish Culture-insert cell (Ibidi) following the manufacturer's instructions. In brief, on the first day, 3×10^4 cells non transfected or Siah-1L-transfected were seeded in each well. On day 2, the stopper was removed to allow cells to migrate into the detection zone. Cells were washed and treated with GW501516 or vehicle for 24 h. After 24 h treatment, the photo showing that cells migrated into the detection zone was taken using inverted microscope image system.

Analysis of Apoptosis

Apoptosis was measured by Alexa Fluor[®] 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis (Molecular Probes, Invitrogen) assay, according to the manufacturer's protocol. After treatment with appropriate inhibitors for 3 h, cells were harvested and resuspended in 100 μ L annexin-binding buffer, stained with 5 μ L annexin-V-FITC and 1 μ L propidium iodide (PI) for 15 min at room temperature in the dark. After incubation, 400 μ L annexin-binding buffer was added, cells were measured on EPICS ALTRAII flow cytometry (Beckman, USA) and analyzed with Multi-cycle software (Phoenix Flow Systems, USA). Results were expressed as percentage (PI negative and annexin-V positive) apoptotic cells. All experiments were performed in triplicate.

Western blot analysis

Total proteins from T98G cells were extracted and quantified using the Bradford method. Proteins (15 μ g/lane) were separated in 12 % SDS-PAGE gels, transferred to a PVDF membrane (Millipore, Germany), and subsequently blocked in Tris-buffer saline-Tween 20 containing 5 % nonfat milk. Membranes were incubated overnight with primary antibodies directed against Siah1 (sc-5505, Santa Cruz) followed by incubation with horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies. The blot was then developed using LumiGLO[™]

according to the instructions of the manufacturer (Cell Signaling, MA).

Immunofluorescence Microscopy

Immunofluorescence was performed as described by Louvard et al. [33]. Briefly, cells were grown on glass coverslips and fixed with 3% (w/v) paraformaldehyde in PBS for 20 min. Cells were permeabilized by treatment with 0.1% (w/v) Triton X-100/PBS solution for 4 min. After extensive washing in 0.2% (w/v) gelatin in PBS, cells were incubated with anti-Siah1 antibodies (sc-5505, Santa Cruz) for 1 h then washed with PBS and incubated with FITC-conjugated anti-goat antibodies for 30 min. Finally, cells were washed in PBS containing DAPI (nucleus staining) and mounted on microscope slides. Fluorescence microscopy was performed using a Zeiss microscope with a 40 x objective.

Cloning of Siah-1L promoter sequence and reporter gene constructs

The human Siah-1L promoter region -1572 to +146 was amplified from human genomic DNA by PCR using forward (5'GGGTCTGAATCCAAGTGTAGATGACTC^{3'}) and reverse (5'GTCTCCCAAGTTTGTCTTCTCCAGA^{3'}) primers and Advantage GC 2 Polymerase Mix (Clontech, Mountain view, CA, USA). Various 5' deletion fragments of the Siah-1L promoter were generated by PCR using sense and antisense primers containing an adaptor with KpnI and HindIII restriction sites at the 5'- and 3'- ends, respectively. Complete and truncated forms of Siah-1L promoter were subcloned into the KpnI-HindIII sites of the pGL3basic vector (Promega, Madison, WI, USA).

Site directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis of the PPAR binding site sequence in the pGL3 (-1572/+146) Siah-1L promoter reporter construct was generated by site-directed mutagenesis using the QuickChange mutagenesis kit (Stratagene, LaJolla, CA, USA) together with the forward primer (5'GATGCAATGCAAATCATTGGCGCAGGACTTTA^{3'}) and reverse primer (5'TAAAGTCCTGCGCCAATGATTTGCATTGCATC^{3'}). Final vector constructs were sequenced to verify that no errors had been introduced.

Transient transfection and promoter activity assays

T98G cells were plated onto twenty four-well plates and grown to 80% confluency. Cells were transfected with 500 ng of Siah-1L promoter constructs and 50 ng of pRL-TK vector (Promega) using ExGen 500 reagent according to the manufacturer's instructions. An

additional 100 ng of vector expressing PPAR β/δ was used when specified. The corresponding empty vectors were used as control. Twenty-four hours after transfection Firefly and Renilla luciferase activities in cells of each well were measured with the Dual-luciferase Assay System (Promega) using a Berthold (Bad Wildbad, Germany) luminometer. Luciferase activities were normalized to pRL-TK vector activity and were expressed relative to the basal activity of empty pGL3Basic vector. The data presented were mean values ($\pm$ S.D.) of triplicates repeated in three independent experiments.

To study the effect of PPAR β/δ agonist GW501516 on promoter activity, cells were transfected with promoter constructs then serum-starved overnight and stimulated with GW501516 (100 nM) for 24 h. After treatment, luciferase activities were measured as described above.

Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP)

Glioblastoma T98G cells were grown to 80% confluence in 15 cm plates and treated with GW501516 or vehicle for 4 h. Cells were cross-linked, lysed, and enzymatically sheared using the ChIP-IT Express kit according to the manufacturer's instructions (Active Motif, La Hulpe, Belgium). Chromatin immunoprecipitations were conducted with 10 μ g sheared DNA and 3 μ g of Rabbit polyclonal anti-PPAR antibodies. Normal Rabbit IgG antibodies were added in the control conditions. The DNA in immunoprecipitates was analyzed by PCR. The set of PCR primers used for the analysis of the PPAR-733 site were 5'CTTGCATTGGGTTCACCTCCTCACTGCCAA-3' for sense and 5'ACTACCCTTGCCCCAATAAAGTCCTGCG-3' for antisense that recognize the -774 to -447 bp region. PCR amplification products were analysed on GelRed-stained 2% (w/v)-agarose gels.

Results

PPAR β/δ agonist induced proliferation and migration of glioblastoma T98G cells

Recent data demonstrated that PPAR β/δ stimulates proliferation and migration of, for example, human Breast, prostate and adipose tissue cancer cells [34,35]. To determine whether PPAR β/δ is involved in proliferation of glioblastoma, T98G cells were treated with the specific PPAR β/δ agonist GW501516 or vehicle (DMSO) for 24 h and proliferation was

measured by incorporation of EdU (5-ethynyl-2-deoxyuridine). Interestingly, treatment of the cells with the PPAR β/δ -selective agonist stimulated proliferation as indicated by an increase of about 25% in EdU incorporation compared to vehicle-treated cells (Fig. 1A). This result indicated that activation of PPAR β/δ is pro-proliferative in T98G glioblastoma cell line.

Cell migration is a central aspect of the pathophysiology of glioblastoma. Therefore, we analyzed the effect of GW501516 treatment on migration of T98G cells using scratch wound healing assay. Activation of PPAR β/δ by GW501516 significantly increased the ability of T98G to close the scratch compared to vehicle-treated cells after 24 h (Fig. 1, compare B and C), indicating that PPAR β/δ activation support glioblastoma cell migration.

PPAR β agonist induced the expression of Siah-1L in glioblastoma cells T98G

In order to identify molecular mechanisms by which PPAR β/δ activation may support T98G growth and tumor cell dissemination, we performed gene expression analysis of glioblastoma cells T98G treated with PPAR β/δ agonist GW501516 and with vehicle and compared their profiles. Among the genes differentially expressed, Siah-1L presented an increase of about 3-fold (manuscript in preparation). Interestingly, SIAH-1 gene family have been shown to regulate cell proliferation, migration and apoptosis [17, 31, 36, 37].

To further confirm the up-regulation of Siah-1L following PPAR β/δ activation, we analyzed the effect of the agonist GW501516 on the expression of Siah-1L gene in T98G cells. As expected, the results revealed that treatment of glioblastoma with GW501516 for 24 h increased by 2.8-fold the mRNA expression level of Siah-1L (Fig. 2).

To determine whether the expression of Siah1L is regulated by PPAR β/δ in other cancer cell lines, we analyzed the effect of its activation by the agonist GW501516 in MCF7, SW1353 and HepG2 cells. Interestingly, treatment of MCF7, SW1353 and HepG2 cells with PPAR β/δ agonist induced the expression of Siah-1L by 1.4-, 2.5- and 1.5-fold, respectively (Fig. 2), indicating that Siah1L expression is up-regulated by PPAR β/δ activation in different cancer cells.

Siah-1L expression stimulated proliferation and migration of glioblastoma cells T98G

As PPAR β/δ agonist GW501516 induced expression of Siah-1L, we analyzed the effect of overexpression of Siah-1L on T98G proliferation. We first analyzed the expression of recombinant Siah-1L in pCMV-Siah-1L-transfected T98G cells by Western blot and by immunofluorescence assays. Cells transfected with empty pCMV vector were used as control.

Immunoblot analysis showed that transfection with pCMV-Siah-1L vector lead to efficient expression of recombinant Siah-1L in T98G cells at 24 h after transfection (Fig. 3A). To determine the intracellular localization of the Siah-1L protein, immunofluorescence analyses were carried out using anti-Siah1 antibodies. The result showed that Siah-1L was mainly detected in cytoplasm at the periphery of the nuclear envelope and exhibited a punctuated staining pattern (Fig. 3B). Of note, very less staining of Siah-1L was also seen in the nucleus (Fig. 3B). No staining was observed in cells transfected with pCMV-control vector (Fig. 3C).

Interestingly, analysis of the effect of Siah-1L overexpression on T98G cell proliferation indicated that Siah-1L stimulated proliferation. Indeed, as indicated in Fig 4A, EdU incorporation was increased by about 28% in cells transfected with pCMV-Siah-1L expressing vector compared to cells transfected with the pCMV-control vector.

Since Siah1 also interacts with proteins that are known to modulate cell migration, we tested whether overexpression in T98G affected cell motility. Interestingly, overexpression of Siah-1L enhances glioblastoma cell migration as indicated by increased ability of pCMV-Siah-1L-transfected cells to close the scratch compared to pCMV-transfected control cells (Fig. 4, compare B and C), indicating that overexpression of Siah-1L led to increased cell migration.

Activation of PPAR β/δ or overexpression of Siah-1L did not affect apoptosis

Whether activation of PPAR β/δ may have an effect on glioblastoma cell apoptosis have not yet been addressed. We therefore investigated the effects of PPAR β/δ agonist GW501516 on T98G cells apoptosis. We found that activation of PPAR β/δ did not have any significant effect on cell apoptosis compared with T98G cells treated with DMSO (vehicle) (Fig. 5). Siah-1L has been shown to be involved in programmed cell death therefore, changes in apoptosis were determined after Siah-1L overexpression (Fig. 5). The results obtained indicated no significant changes in apoptosis in cells overexpressing Siah-1L compared to control cells, indicating that Siah-1L did not present significant effects on glioblastoma cell survival.

Functional characterization of the human Siah-1L promoter

To define the mechanism of PPAR β/δ agonist action on Siah-1L gene expression, we investigated the regulation of the Siah-1L gene promoter in T98G cells. For this purpose, the sequence of the Siah-1L promoter region -1572 to +146 was cloned from human genomic

DNA by PCR as indicated in the Material and Methods. Sequencing of Siah-1L promoter sequence did not show any mutations compared to the sequence present in data bases.

In silico analysis of the promoter sequence using TFSEARCH software (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) revealed the presence of Sp1, AP-1, and PPAR transcription factor binding sites that might be potential regulators of constitutive and induced expression of Siah-1L in T98G cells. Other potential transcription factor binding sites were also found. However, neither initiator nor TATA boxes could be identified at consensus positions (Fig. 6).

To ascertain the transcriptional promoter activity, a series of 5'-deletion mutants of -1572/+146 promoter sequence were cloned upstream a firefly luciferase reporter gene in pGL3 basic vector and the constructs were transfected into T98G cells. The results of dual luciferase assays are shown in Fig. 7. The shorted construct -140/+146 showed a low promoter activity (Fig. 7A). However, when the length of the promoter sequence was extended to -470 bp, a high promoter activity was observed suggesting that the sequence between -470 and -140 bp contains elements that are essential for basal activity of the Siah-1L gene promoter (Fig. 7A).

PPAR β/δ agonist induced Siah-1L promoter activity in glioblastoma cells T98G

To study the mechanism of PPAR β/δ agonist effect on Siah-1L transcription, the -1572/+146 promoter construct was transiently transfected into T98G cells and exposed to GW501516 (100 nM). Interestingly, treatment with PPAR β/δ agonist for 24 h significantly increased (2 ± 0.2 -fold) the transcriptional activity of the promoter construct -1572/+146 (Fig. 7B) indicating that Siah-1L promoter activity is up-regulated by the PPAR β/δ agonist GW501516. The stimulatory effect of GW501516 was also observed for the promoter constructs -1350/+146 (1.8 ± 0.2 -fold) and -1050/+146 (2 ± 0.3 -fold), whereas it was absent for the -710/+146 promoter construct indicating that deletion of the 5'-end to -710 completely abolished GW501516-induced promoter activity (Fig. 7B). Thus, these results revealed that a sequence from -1050 to -710 bp in the promoter mediates GW501516-induced stimulation of human Siah-1L gene transcription.

PPAR β/δ -induced Siah-1L promoter activity is mediated through a PPAR site

Interestingly, the -1572/+146 Siah-1L promoter sequence contains a potential binding site for a PPAR transcription factor which was located at positions -733 to -715 (PPAR-733) (See

Fig. 6). The implication of this site in basal transcription and/or in the response of the promoter to PPAR β/δ activation was investigated by site directed mutagenesis. The results showed that mutation of PPAR-733 binding site did not have any significant effect on basal promoter activity (Fig. 8), suggesting that this site is not critical for basal activity of human Siah-1L gene promoter. To further understand the role of PPAR-733 binding site in the regulation of Siah-1L promoter activity if any, we investigated whether it is involved in stimulation of promoter activity by PPAR β/δ agonist GW501516. The results clearly showed that mutation of this site completely suppressed the stimulatory effect of PPAR β/δ agonist (Fig. 8). These results strongly suggest that PPAR β/δ -induced Siah-1L promoter activity is mediated through PPAR-733 response element.

PPAR β/δ transcription factor is a transactivator of Siah-1L promoter

To obtain further evidence to support the importance of the PPAR β/δ transcription factor in the activation of Siah-1L promoter activity, we co-transfected the -1572/+146 promoter construct with pCMV-PPAR β/δ and analyzed the effect on the activity of the promoter. pCMV empty plasmid was used as a control. Fig. 9 clearly showed that overexpression of PPAR β/δ in T98G cells enhanced by 4-fold the promoter activity. Interestingly, no stimulation of promoter activity was observed for the construct -710/+146 lacking the PPAR-733 binding site (Fig. 9). To determine whether this site mediates PPAR β/δ effect on the promoter activity, Siah-1L promoter construct -1572/+146 containing mutated PPAR-733 site (mPPAR-733) was used for analysis of the stimulatory effect of PPAR β/δ on the promoter activity. Interestingly, the data showed that mutation of PPAR-733 site abrogated the stimulatory effect of PPAR β/δ on the promoter activity (Fig. 9). Altogether, these results demonstrated that PPAR β/δ is a potent activator of the Siah-1L promoter that mediates its effect through PPAR-733 binding site.

Endogenous PPAR β directly binds to PPAR binding site in the human Siah-1L gene promoter *in vivo*

Based on the results above, we investigated whether PPAR β/δ directly binds to the promoter region of Siah-1L and whether treatment with GW501516 affects its DNA binding activity *in vivo*. Therefore, we examined physical binding of PPAR β/δ to the endogenous Siah-1L promoter with endogenous PPAR β/δ proteins by using ChIP assays. As shown in Fig. 10, the 150 bp (-842 to -692) of the Siah-1L promoter fragment harbouring PPAR-733

response element was detected from chromatin precipitated with endogenous PPAR antibody but not with control IgG. Interestingly, the binding of PPAR β/δ to the 150 bp Siah-1L promoter fragment containing the PPAR-733 response element was significantly increased in GW50151-treated cells compared to vehicle-treated cells (Fig. 10), thus indicating that the DNA binding activity of PPAR β/δ to the promoter is enhanced upon treatment with GW501516.

Discussion

In this study, we have provided the first evidence for a role of PPAR β/δ in the regulation of proliferation and migration of glioblastoma cells. We demonstrated that activation of PPAR β/δ by the highly selective agonist GW501516 increased proliferation and migration in T98G cells. Of note, PPAR β/δ has been associated with cancer [12] and is over-expressed in many human cancers including colon, endometrial, and lung cancers [38, 39, 14]. It has been shown that PPAR β/δ promotes proliferation and survival in various cancer cell type and tumor models [13]. Indeed, PPAR β/δ agonists have been shown to stimulate proliferation in non-small cell lung [14], breast and prostate cancer cell lines [16], and in liposarcoma [35]. In the latter, as demonstrated herein, PPAR β/δ promoted cell migration, suggesting that it might have a tumor promoting function.

The fact that PPAR β/δ is a transcription factor suggests that such growth- and migration-promoting effects are related to expression of target genes. Indeed, analysis of T98G gene expression following PPAR β/δ activation revealed the up-regulation of several genes among which Siah-1L was highly induced. Induction of Siah-1L gene expression in T98G cells by PPAR β/δ agonist was further confirmed by qRT-PCR indicating that Siah-1L gene is regulated by PPAR β/δ . Siah is an E3 ubiquitin ligase with diverse substrates including nuclear proteins, cytosolic proteins and membrane receptors targeting them for ubiquitin-proteasome degradation. Siah-1L is involved in diverse biological processes including apoptosis, cell survival and migration [36, 37, 40]. Indeed, Siah-1L was shown to sensitize SKBR3 breast cancer cells to the cytotoxic effects of irradiation and to increase apoptosis [41]. Siah1 also decreased cell motility through promoting degradation of cytoplasmic p27 protein in HEK293T cells [40]. On the other hand, Siah-1L was shown to induce proliferation and migration of liver cancer cells [17]. Accordingly, we brought evidence that Siah-1L was able to induce similar tumoregenic processes in glioblastoma cells when its expression was

induced following PPAR β/δ activation or overexpression. However, no effects of PPAR β/δ or expression of Siah-1L were observed on cell apoptosis. In contrast, it has been shown that PPAR γ agonist rosiglitazone, in combination with RXR agonist, was effective in reducing proliferation, and invasion of glioblastoma [42] however, this drug has a marginal effect in vivo [43].

Of note, Siah1 substrates are localized in cytosol and nucleus, and Siah1 protein which contains an NLS signal, has nuclear as well as cytosolic localization and as such shuttles between these two cell compartments [36]. Here we have shown that Siah-1L was mainly localized in cytoplasm at the periphery of the nuclear envelope and exhibited a punctuated staining, suggesting that the effects induced by Siah-1L in T98G cells may be mediated through its cytoplasmic substrates. Similar localization of Siah1 was observed in Hep3B cells [44], however, both cytoplasmic and nuclear localizations were reported in N2a cells when transfected with Siah1 expressing vector. On the other hand, nuclear localization was observed in liver cancer cells, HepG2 and HuH-7 [17]. These data suggested that the localization of Siah1 may differentially induce cellular effects.

Little is known about transcriptional regulation of Siah-1L gene. Only one study demonstrated that Siah-1L promoter contains a functional p53 responsive element and as such is a direct transcriptional target of p53, therefore supporting the importance of Siah-1L in the p53-mediated protein ubiquitylation and degradation [32, 44]. In the present study, we have demonstrated that Siah-1L gene is up-regulated by PPAR β/δ activation through a PPAR response element present in the promoter sequence.

To investigate the molecular mechanism involved in the regulation of Siah-1L gene expression by PPAR β/δ in glioblastoma, the -1572/+146 kb 5'-flanking DNA of the human Siah-1L gene was cloned and expressed as a functional promoter in T98G cells. Analysis of sequence directly upstream of the transcriptional initiation site revealed that the human Siah-1L promoter is a GC-rich TATA-less promoter containing proximal Sp1-binding sites. Such promoters are regulated by the involvement of Sp factors which recruit and interact with specific transcription factors to achieve promoter activity [45, 46]. Analysis of the promoter sequence revealed the presence of potential binding sites for AP-1 and NF κ B as well as PPAR suggesting that Siah-1L promoter may be regulated by these transcription factors.

Indeed, several lines of evidence suggest that PPAR β/δ directly regulates Siah-1L expression:

a) Siah-1L expression was up-regulated upon PPAR β/δ activation; b) PPAR β/δ activation significantly enhanced the activity of the Siah-1L promoter and co-transfection with PPAR β/δ

expression construct enhanced Siah-1L promoter activity; c) in chromatin immunoprecipitation experiments, we detected binding of PPAR β/δ transcription factor protein to a predicted PPAR β/δ responsive element in the Siah-1L promoter sequence; d) Mutation of PPAR β/δ binding site completely abrogated the activation of Siah-1L gene promoter by PPAR β/δ agonist and the transactivation by PPAR β/δ transcription factor.

Our results showed increased cell proliferation and migration in response to PPAR β/δ , which at least in part might be due to up-regulation of Siah-1L. Therefore, use of PPAR β/δ antagonists or inhibition of Siah-1L expression may represent a potential therapeutic approach to glioblastoma. Indeed, recent studies have demonstrated that reduced Siah1/substrate interaction led to reduced HIF-1 concentration under hypoxic conditions, a process associated with reduced HIF-1-driven tumor growth and neoangiogenesis in a syngeneic mouse model of breast cancer [47]. In addition, expression of a dominant negative of Siah in human pancreatic cancer cells led to reduced tumor growth in nude mice [48]. Altogether, our study reveals a novel pathway for glioblastoma growth and migration and suggests that PPAR β/δ antagonists may prove effective in the treatment of glioblastoma.

References

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114:97-109.
2. Tanaka S, Louis DN, Curry WT, Batchelor TT, Dietrich J (2013) Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: no longer a dead end? *Nat Rev Clin Oncol.* 10:14-26.
3. Heneka MT, Landreth GE (2007) PPARs in the brain. *Biochim Biophys Acta.* 1771: 1031-45.
4. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature.* 358: 771-774.
5. Berger J, Moller DE (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 53: 409-435.

6. Wolfrum C, Borrmann CM, Borchers T, Spener F (2001) Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 2323-2328.
7. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res*. 49: 497-505.
8. Lefebvre AM, Laville M, Vega N, Riou JP, van Gaal L, Auwerx J, Vidal H (1998) Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes*. 47: 98-103.
9. Panigrahy D, Kaipainen A, Kieran MW, Huang S (2008) PPARs: A Double-Edged Sword in Cancer Therapy? *PPAR Res*. 2008: 2350351.
10. Tatenhorst L, Hahnen E, Heneka MT (2008) Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) as Potential Inducers of Antineoplastic Effects in CNS Tumors. *PPAR Res*. 2008: 204514.
11. Chearwae W, Bright JJ (2008) PPARgamma agonists inhibit growth and expansion of CD133+ brain tumour stem cells. *Br J Cancer*. 99: 2044-2053.
12. Youssef J, Badr M (2011) Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. *Br J Pharmacol*. 164: 68-82.
13. Michalik L, Desvergne B, Wahli W (2004) Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*. 4: 61-70.
14. Genini D, Garcia-Escudero R, Carbone GM, Catapano CV (2012) Transcriptional and Non-Transcriptional Functions of PPAR β/δ in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One*. 7: e46009.
15. Park BH, Vogelstein B, Kinzler KW (2001) Genetic disruption of PPARdelta decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 2598-2603.
16. Stephen RL, Gustafsson MC, Jarvis M, Tatoud R, Marshall BR, Knight D, Ehrenborg E, Harris AL, Wolf CR, Palmer CN (2004) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines. *Cancer Res*. 64: 3162-3170.
17. Brauckhoff A, Malz M, Tschaharganeh D, Malek N, Weber A, Riener MO, Soll C, Samarin J, Bissinger M, Schmidt J, Longerich T, Ehemann V, Schirmacher P, Breuhahn

- K (2011) Nuclear expression of the ubiquitin ligase seven in absentia homolog (SIAH)-1 induces proliferation and migration of liver cancer cells. *J Hepatol.* 55: 1049-1057.
18. Carthew RW, Rubin GM (1990) seven in absentia, a gene required for specification of R7 cell fate in the *Drosophila* eye. *Cell.* 63: 561-577.
 19. Hoeller D, Hecker CM, Dikic I (2006) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 6: 776-788.
 20. Polekhina G, House CM, Traficante N, Mackay JP, Relaix F, Sassoon DA, Parker MW, Bowtell DD (2002) Siah ubiquitin ligase is structurally related to TRAF and modulates TNF-alpha signaling. *Nat Struct Biol.* 9: 68-75.
 21. Germani A, Bruzzoni-Giovanelli H, Fellous A, Gisselbrecht S, Varin-Blank N, Calvo F (2000) SIAH-1 interacts with alpha-tubulin and degrades the kinesin Kid by the proteasome pathway during mitosis. *Oncogene.* 19: 5997-6006.
 22. Santelli E, Leone M, Li C, Fukushima T, Preece NE, Olson AJ, Ely KR, Reed JC, Pellecchia M, Liddington RC, Matsuzawa S (2005) Structural analysis of Siah1-Siah-interacting protein interactions and insights into the assembly of an E3 ligase multiprotein complex. *J Biol Chem.* 280: 34278-34287.
 23. Hu G, Zhang S, Vidal M, Baer JL, Xu T, Fearon ER (1997) Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 11: 2701-2714.
 24. Zhang J, Guenther MG, Carthew RW, Lazar MA (1998) Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression. *Genes Dev.* 12: 1775-1780.
 25. Johnsen SA, Subramaniam M, Monroe DG, Janknecht R, Spelsberg TC (2002) Modulation of transforming growth factor beta (TGFbeta)/Smad transcriptional responses through targeted degradation of TGFbeta-inducible early gene-1 by human seven in absentia homologue. *J Biol Chem.* 277: 30754-30759.
 26. Habelhah H, Frew IJ, Laine A, Janes PW, Relaix F, Sassoon D, Bowtell DD, Ronai Z (2002) Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2. *EMBO J.* 21: 5756-5765.
 27. Tanikawa J, Ichikawa-Iwata E, Kanei-Ishii C, Nakai A, Matsuzawa S, Reed JC, Ishii S (2000) p53 suppresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. *J Biol Chem.* 275: 15578-15585.
 28. Gutierrez GJ, Vöggtlin A, Castro A, Ferby I, Salvagiotto G, Ronai Z, Lorca T, Nebreda AR (2006) Meiotic regulation of the CDK activator RINGO/Speedy by ubiquitin-proteasome-mediated processing and degradation. *Nat Cell Biol.* 8: 1084-1094.

29. Famulski JK, Trivedi N, Howell D, Yang Y, Tong Y, Gilbertson R, Solecki DJ (2010) Siah regulation of Pard3A controls neuronal cell adhesion during germinal zone exit. *Science*. 330: 1834-1838.
30. Wong CS, Möller A (2013) Siah: a promising anticancer target. *Cancer Res*. 73: 2400-2406.
31. Iwai A, Marusawa H, Matsuzawa S, Fukushima T, Hijikata M, Reed JC, Shimotohno K, Chiba T (2004) Siah-1L, a novel transcript variant belonging to the human Siah family of proteins, regulates beta-catenin activity in a p53-dependent manner. *Oncogene*. 23: 7593-7600.
32. Fiucci G, Beaucourt S, Duflaut D, Lespagnol A, Stumptner-Cuvelette P, Géant A, Buchwalter G, Tuynder M, Susini L, Lassalle JM, Wasylyk C, Wasylyk B, Oren M, Amson R, Telerman A (2004) Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: identification of the functional p53 responsive element in the siah-1b promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 3510-3515.
33. Louvard D, Reggio H, Warren G (1982) Antibodies to the Golgi complex and the rough endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 92: 92-107.
34. Stephen RL, Gustafsson MC, Jarvis M, Tatoud R, Marshall BR, Knight D, Ehrenborg E, Harris AL, Wolf CR, Palmer CN (2004) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines. *Cancer Res*. 64: 3162-3170.
35. Wagner KD, Benchetrit M, Bianchini L, Michiels JF, Wagner N (2011) Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ) is highly expressed in liposarcoma and promotes migration and proliferation. *J Pathol*. 224: 575-588.
36. Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, Takahashi M, Cheah JH, Tankou SK, Hester LD, Ferris CD, Hayward SD, Snyder SH, Sawa A (2005) S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol*. 7: 665-674.
37. Nagano Y, Fukushima T, Okemoto K, Tanaka K, Bowtell DD, Ronai Z, Reed JC, Matsuzawa S (2011) Siah1/SIP regulates p27(kip1) stability and cell migration under metabolic stress. *Cell Cycle*. 10: 2592-2602.
38. Gupta RA, Tan J, Krause WF, Geraci MW, Willson TM, Dey SK, DuBois RN (2000) Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 13275-13280.

39. Tong BJ, Tan J, Tajeda L, Das SK, Chapman JA, DuBois RN, Dey SK (2000) Heightened expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-delta in human endometrial adenocarcinoma. *Neoplasia*. 2: 483-490.
40. Reed JC, Ely KR (2002) Degrading liaisons: Siah structure revealed. *Nat Struct Biol*. 9: 8-10.
41. He HT, Fokas E, You A, Engenhardt-Cabillic R, An HX (2010) Siah1 proteins enhance radiosensitivity of human breast cancer cells. *BMC Cancer*. 10: 403.
42. Papi A, Tatenhorst L, Terwel D, Hermes M, Kummer MP, Orlandi M, Heneka MT (2009) PPARgamma and RXRgamma ligands act synergistically as potent antineoplastic agents in vitro and in vivo glioma models. *J Neurochem*. 109:1779-1790.
43. Krieger-Hinck N, Schumacher U, Müller A, Valentiner U (2010) The effect of the PPAR-gamma agonist rosiglitazone on neuroblastoma SK-N-SH cells in a metastatic xenograft mouse model. *Oncol Res*. 18: 387-393.
44. Zhao J, Wang C, Wang J, Yang X, Diao N, Li Q, Wang W, Xian L, Fang Z, Yu L (2011) E3 ubiquitin ligase Siah-1 facilitates poly-ubiquitylation and proteasomal degradation of the hepatitis B viral X protein. *FEBS Lett*. 585: 943-50.
45. Barré L, Venkatesan N, Magdalou J, Netter P, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M (2006) Evidence of calcium-dependent pathway in the regulation of human beta1,3-glucuronosyltransferase-1 (GlcAT-I) gene expression: a key enzyme in proteoglycan synthesis. *FASEB J*. 20: 1692-4.
46. Singh DP, Bhargavan B, Chhunchha B, Kubo E, Kumar A, Fatma N (2012) Transcriptional protein Sp1 regulates LEDGF transcription by directly interacting with its cis-elements in GC-rich region of TATA-less gene promoter. *PLoS One*. 2012;7(5):e37012.
47. Möller A, House CM, Wong CS, Scanlon DB, Liu MC, Ronai Z, Bowtell DD (2009) Inhibition of Siah ubiquitin ligase function. *Oncogene*. 28: 289-296.
48. Schmidt RL, Park CH, Ahmed AU, Gundelach JH, Reed NR, Cheng S, Knudsen BE, Tang AH (2007) Inhibition of RAS-mediated transformation and tumorigenesis by targeting the downstream E3 ubiquitin ligase seven in absentia homologue. *Cancer Res*. 67: 11798-11810.

Figure legends

Figure 1. PPAR β/δ agonist GW501516 induces T98G cell proliferation and migration.

(A) The cell proliferation was measured by Click-iT[®] EdU as described in Material and Methods. T98G cells were seeded in 96-well plates at 1×10^4 cells per well and grown for 16 h then treated with GW501516 or DMSO (Control) for 24 h. Cell proliferation was determined by incorporation of deoxyuridine (EdU) for 4 h. **(B)** and **(C)** The cell migration was measured using the 30 μ -Dish Culture insert cell (Ibidi). Cells were seeded at 3×10^4 cells per well. After 24 h culture the stopper was removed and cells were treated with **(B)** DMSO or **(C)** GW501516. Representative images are shown of the progression of migration into the detection zone at 24 h at which time the T98G cells treated with GW501516 can be seen to fill the detection area more rapidly than control. Analysis were performed by microscopy (4X original magnification)

Figure 2. PPAR β/δ agonist GW501516 regulates Siah-1L mRNA expression. Human glioblastoma T98G, chondrosarcoma SW-1353, breast adenocarcinoma MCF-7 and liver hepatocellular HepG2 cells were treated with 100 nM of GW501516 or DMSO (vehicle) for 24 h and Siah-1L mRNA levels were determined by real time PCR as described in Materials and Methods. Results were normalized using the housekeeping gene ribosomal protein S29 and are expressed as relative expression compared to that obtained with DMSO-treated cells. Data are expressed as mean $\pm$ SD of three separate experiments. Statistical significance was evaluated using Student's t test (*, $P < 0.05$).

Figure 3. Expression of recombinant Siah-1L in T98G cells. **(A)** Immunoblot analysis of the expression of Siah-1L in T98G cells grown in a six well plate and transfected with 1 μ g of pCMV-Siah-1L vector and 10 μ l of Exgen 500 per well. A production of expected Siah-1L recombinant protein of about 34 kDa is detected in cells transfected with pCMV-Siah-1L vector. **(B)** Immunofluorescence microscopic evaluation of localisation of Siah-1L protein 24 h after transient transfection of T98G cells with pCMV-Siah-1L vector or **(C)** empty pCMV vector. Cells were immunostained with anti-Siah1 antibodies (sc-5505, Santa Cruz) and FITC-conjugated anti-goat antibodies and analyzed by fluorescence microscopy (40X original magnification). Nucleus were stained using DAPI.

Figure 4. Siah-1L expression stimulates T98G cell proliferation and migration. (A) The cell proliferation was measured by Click-iT[®] EdU as described in Material and Methods. T98G cells were seeded in 96-well plates at 1×10^4 cells per well transfected with pCMV-Siah-1L or empty pCMV vector (Control). Cell proliferation was determined 24h after transfection by incorporation of deoxyuridine (EdU) for 4 h. (B) and (C) The cell migration was measured using the 30 μ -Dish Culture insert cell (Ibidi). Cells were transfected with (B) pCMV-Siah-1L or (C) pCMV control vector and seeded at 3×10^4 cells per well. After 24 h culture the stopper was removed. Representative images are shown of the progression of migration into the detection zone at 24 h at which time the Siah-1L-transfected cells can be seen to fill the detection area more rapidly than control. Analysis were performed by microscopy (4X original magnification)

Figure 5. Effect of PPAR β/δ agonist GW501516 and of overexpression of Siah-1L on T98G cell apoptosis. T98G cells were treated with DMSO and GW501516 or transfected with pCMV-control and pCMV-Siah-1L vector. Apoptosis was determined at 24h after treatment or transfection by Alexa Fluor[®] 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis assay as described in materials and methods. Results were expressed as percentage (PI negative and annexin-V positive) apoptotic cells. All experiments were performed in triplicate.

Figure 6. Nucleotide sequence of the 5'-flanking region of the human Siah-1L gene. The 5'-flanking region of Siah-1L gene was cloned from human genomic DNA as described in Materials and Methods, and sequenced. The putative start site of transcription (+1) is indicated by an arrow. Sp1, PPAR, AP-1 and NF κ B core sequences predicted by *In silico* analysis of the promoter sequence using TFSEARCH software (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) are underlined. The PPAR site sequence (in bold) was predicted at 60% homology with the PPAR consensus sequence.

Figure 7. Defining the human Siah-1L proximal promoter for constitutive and PPAR β/δ agonist-induced activity. (A) Left half, diagrams showing the 5'-deletion constructs of Siah-1L promoter linked to Firefly luciferase reporter gene used for transient transfections. *Right* half, relative luciferase activity of Siah-1L promoter deletion constructs and empty pGL3-Basic vector in human T98G cells. Relative luciferase activity is calculated as fold activation over that of pGL3-Basic after normalisation. (B) Human T98G cells transfected with 5'

deletion constructs and pRL-TK vector were treated with GW50516 (100 nM) or vehicle (DMSO) for 24 h and relative luciferase activity was determined as described above. Relative luciferase activity is calculated as fold activation over that of untreated cells. Data are expressed as mean $\pm$ SD of three separate experiments, (*P<0.05).

Figure 8. Identification of functional PPAR β/δ site within human Siah-1L promoter.

Glioblastoma T98G cells were transfected with wild-type promoter construct (WT) or with promoter harbouring mutated putative PPAR binding site at position -733 (mPPAR-733) then treated or not with 100 nM GW5011516. Twenty four hours later cell extracts were assayed for luciferase activity. Relative luciferase activity is calculated as fold activation over that of untreated cells. Data are expressed as mean $\pm$ SD of three separate experiments, (*P<0.05).

Figure 9. PPAR β/δ transactivates the Siah-1L promoter via a PPAR binding site at position -733. Cells were transfected with the wild-type (-1572/+146), mutated PPAR (mPPAR-733) or truncated (-710/+146) promoter constructs in combination with pSG5 (empty vector) or pSG5-PPAR β/δ expression plasmid. Relative luciferase activity is calculated as fold activation over that of pSG5 empty vector after normalisation for Renilla luciferase activity. Values are expressed as mean $\pm$ SD of three separate experiments, (*P<0.05).

Figure 10. PPAR β/δ binds to Siah-1L promoter region *in vivo*. ChIP was performed after activation of PPAR β/δ by the agonist GW501516 or treatment with DMSO (control) using antibodies to PPAR or rabbit preimmune serum (IgG). PCR was performed with primers specific to the region described in Material and Methods. The quantity of each input DNA was initially measured equalized by O.D. A representative gel of three independent experiments stained by GelRed is shown.

Figure 1

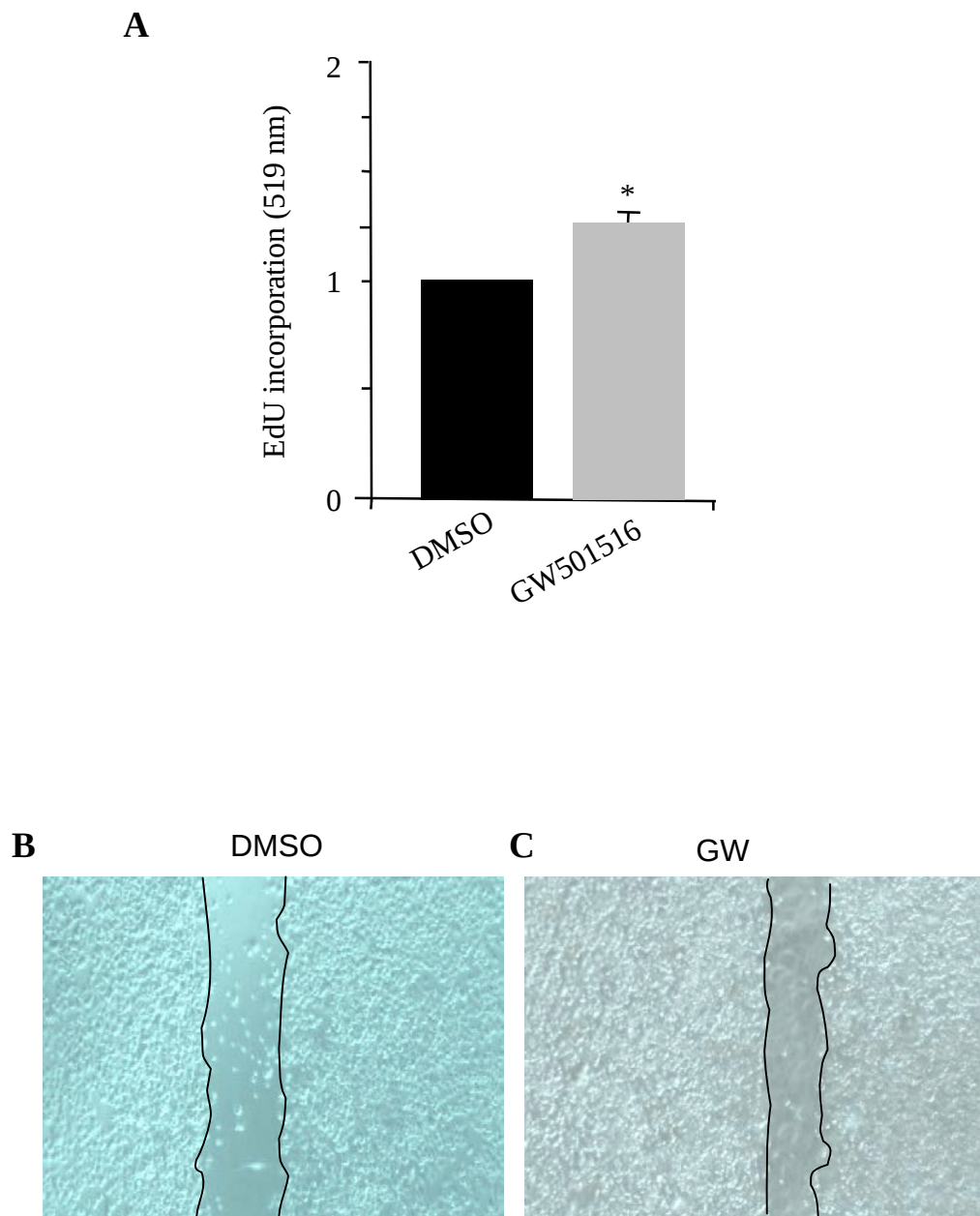


Figure 2

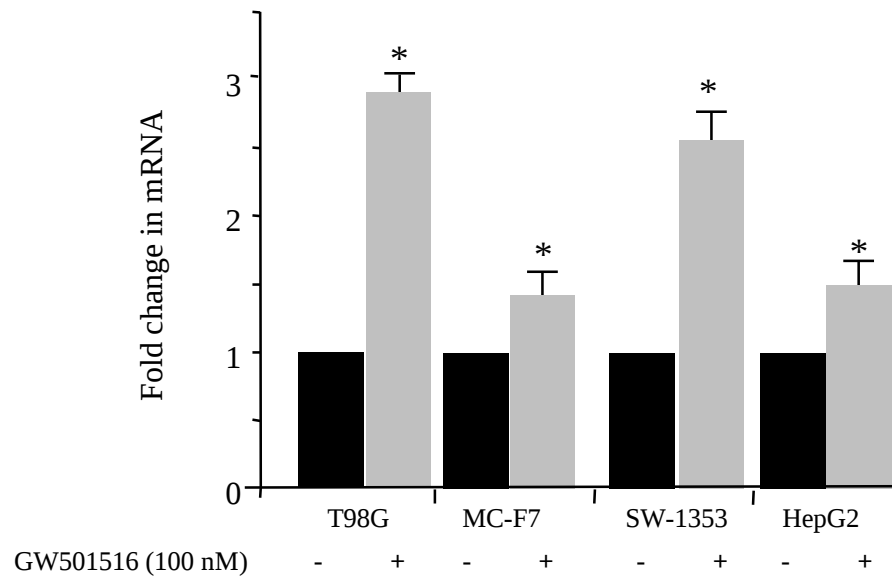


Figure 3

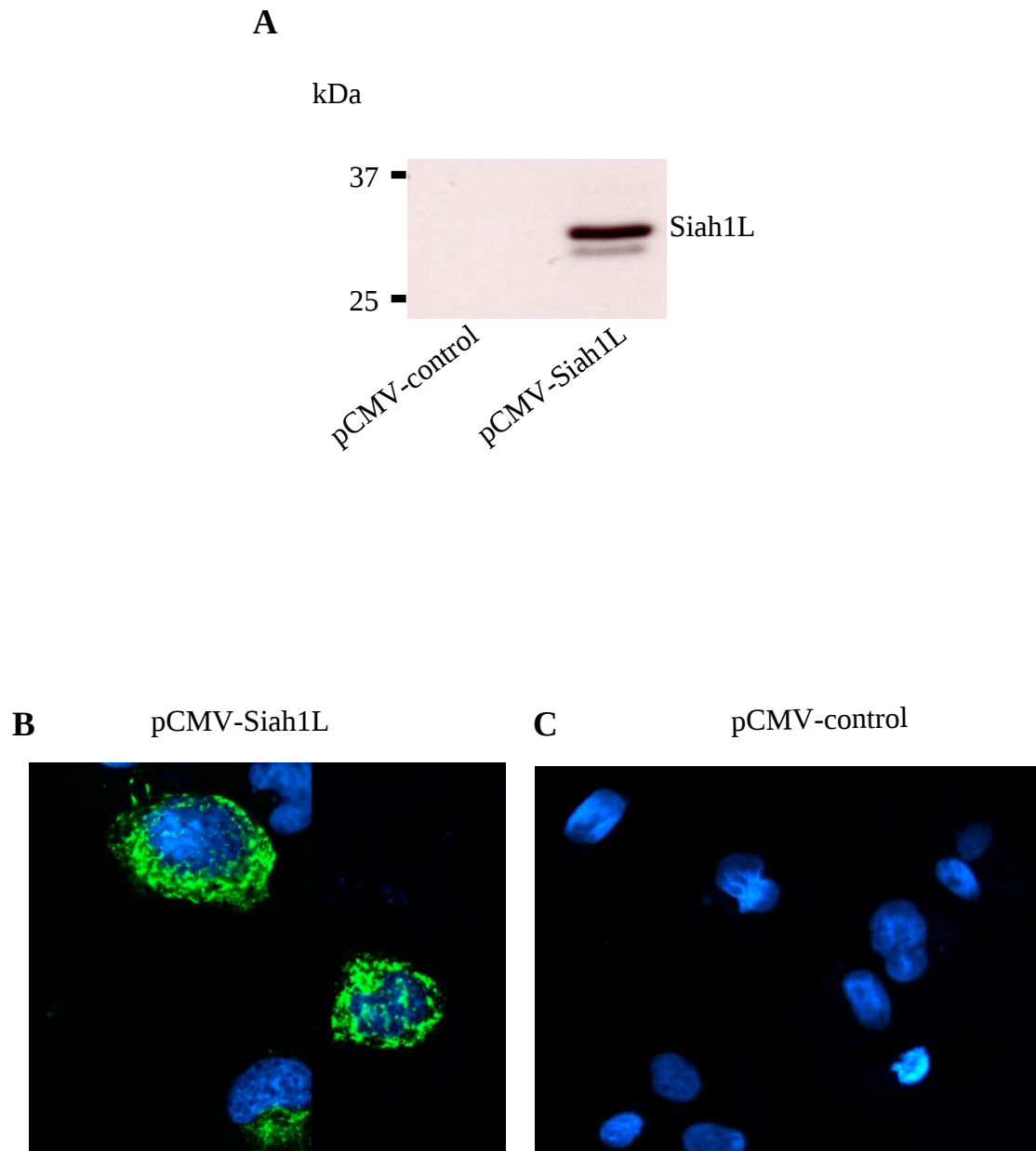


Figure 4

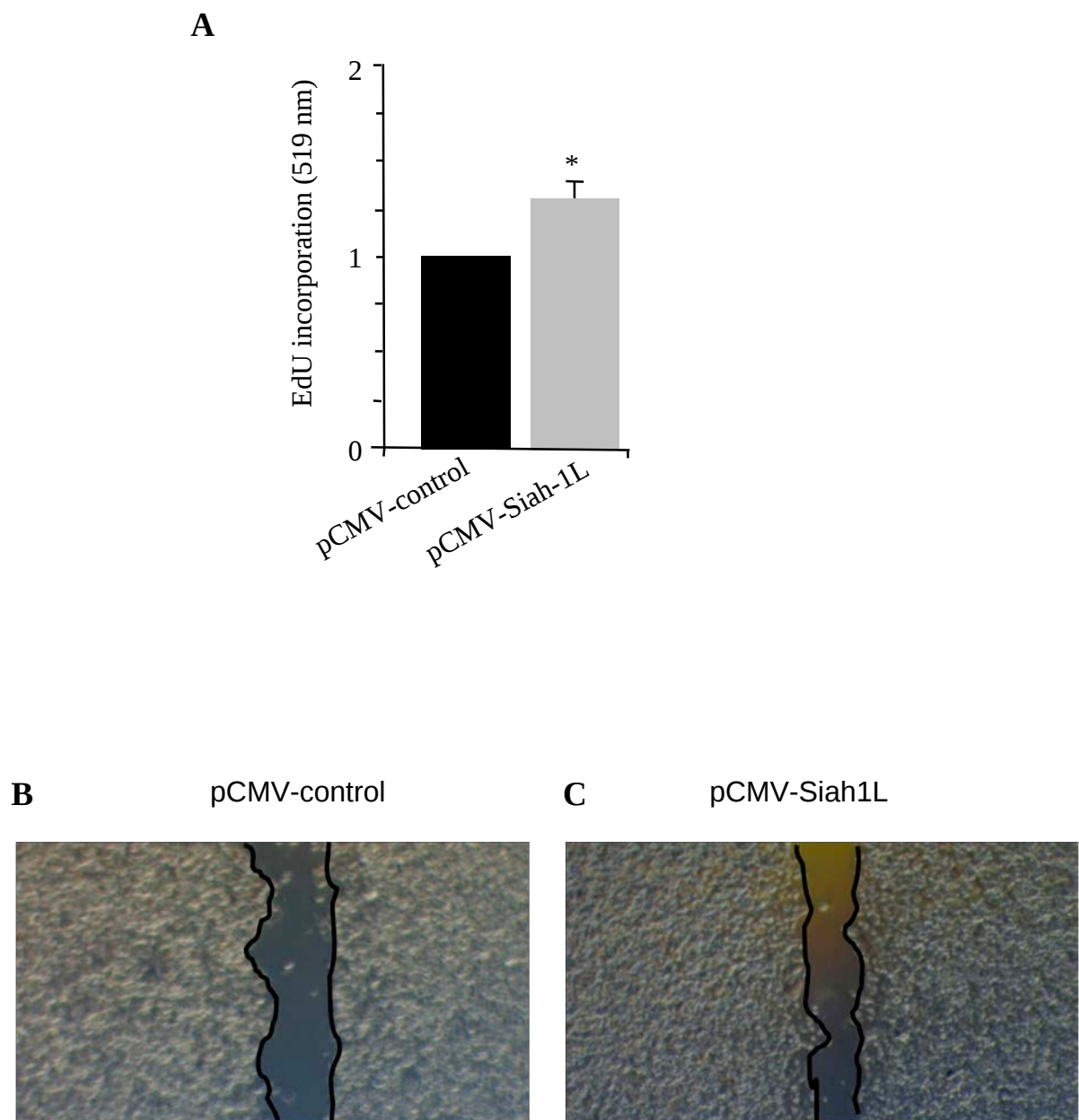


Figure 5

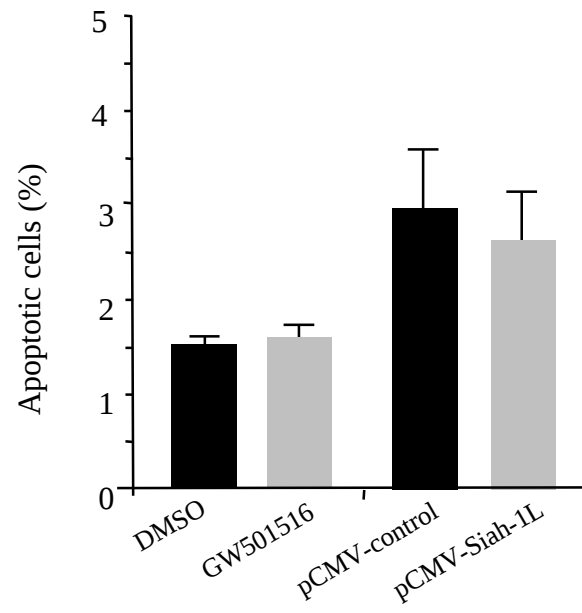
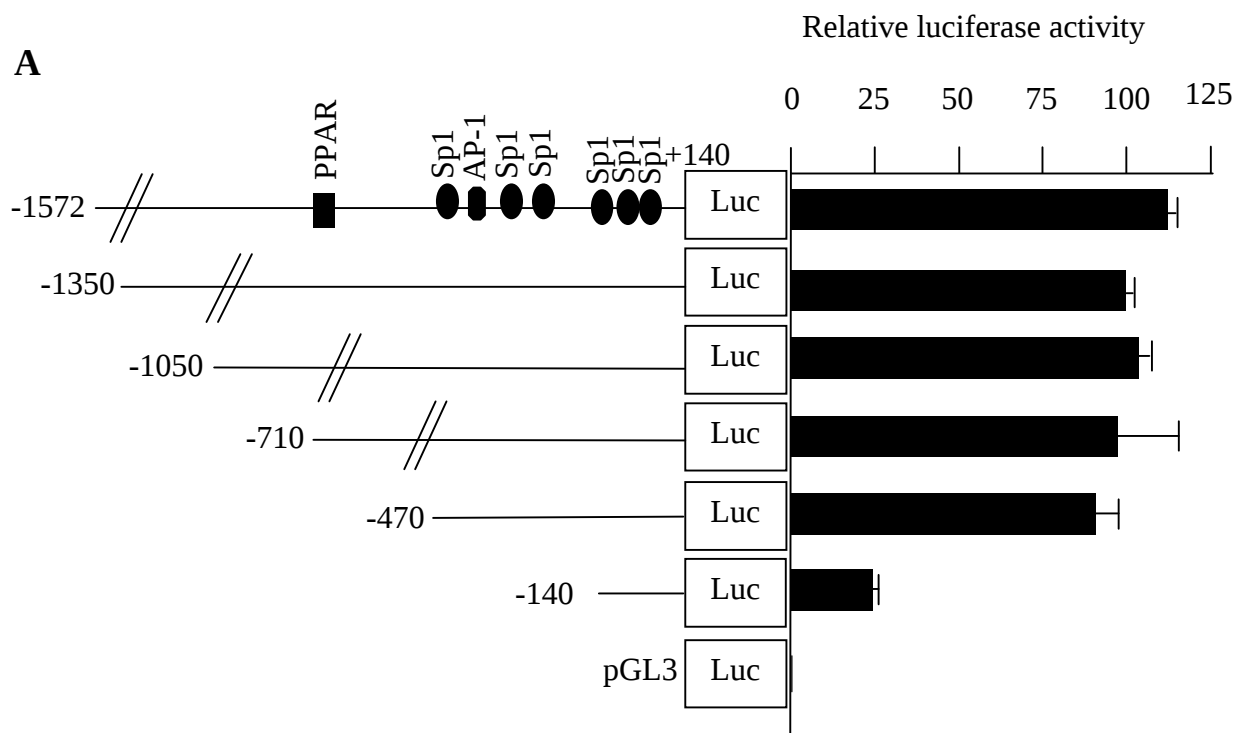


Figure 6

-1572 GGGTCTGAATCCAAGTGTAGATGACTCTAGAATGCTTCCACTTTTCTGACTTAATTAAGTAGAGGGGC
-1504 CTGTCCATAGATCAGTGGTTTTTCAGAGTGTGCTGTAAGGCTCTGTACAGATCTTTTGGAGTTTGGTAA
-1436 ACAGTGAAATATCTTTTGCTTGAGAAATAATCAGTCATCTTTTGTGTATACATTTTGGTTCTGT
-1368 GGAAGAGTTTCTCTATATGAAATTTTCTTCTCTAGGGAAATTTAAGACCTGTGCAATGAAAAAATATT
-1300 AGAAAATAAAAATATAGACTGGGCACAGTGGCTCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGCTGATGGCTT
-1232 TAGCCCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGGGCAACATGGGGACTCCCTATCTTTACAAAGAAAAATTAACGA
-1164 GAGTGGTGGTGCCAGCCTGTGGTCTTAGCTACTGGGGAGATTGAGGTGGGAGGATTGCTCGAGCCCGAG
-1096 AAGACCGAGGCTGCGGTGAGTGGAGATTGTGCCACTGCACTCAGACCTGGGCAACAGAGTGAGACCCCT
-1028 GTCTCAAAAAAAGGAAAAAAGTAGTTGTGGGGCTGACTGTGTCTATTTTCAATTATATTCTTTTC
-960 CTAATGCTGTTTTGTGTAGCCTGTATTGTAAACGAGGTTGAGGTGATTGAACACACTTAATAGAGTG
-892 AGGAAGTGGTTAGAGTTAAATTTTCTGCTGAAAGTGGGTAATCTGCAATTCCTTGCATTGGGTTTAC
-824 TCCTCACTGCCAACTCTTGCTGCATTTTGGGCTGCCCTAAGCATGATGTAATGACAGGTAAACCTC
-756 TGCACGCACTAGCTGATGCAATGCAAATCTGAGGCGCAGGACTTTTATTGGGGCAAGGGTAGTGCTTGT
-688 TTA AAAACAAAACAAGCTACTCTGCGTTTAAATGAGGCCATTTAAGATGGCTTTCCAGAGTGGAAGA
-620 GAGTATAATCTCTTAGGAGGTTTAAAGTAGGAGTTTAAATGTGGCAGAAGTGTGCTTACTACTTTTCTG
-552 CAAAGTCTTTTTCAGTGGGTAAGGAGAGTTTAAATATAGTGCTGATAGGAGTAGAAATGAAGTGAG
-484 CTAGAATTGAGGAAATATGGTAGTTGATGCCCGGTAAATAGCCGTTGAATGAATTAGGGAGAATGTTT
-416 TCACTCTAAAAATTTAGAGTTCGCACGATAAACCTGGAGCGTAGCGCCAGTGTGGCCACGCATTTCCC
-348 AGATACGCTGTAGCTCTTAGATCGAAACCATAAGAACTGCCGATATTCGACTGTTCTGACCTACCGA
-280 AAATAGCGTGGTTCCACCTAATTTTAACTGGTGGAATGCTGAGGAAGGTTTCGATGTCGCTGGGGTG
-212 GGATGGGGTCAACGGCGGGGTGGCGGGGGCTCCCCACGCCCCGGCCTTTGGCTGGGGGGCGGGGCT
-144 TGCGGGCACGGCCCCACCCTTGCGCGAGCAAGACGGGCATCGCCCTGTGCGCCGCGCGCCCTGA
-76 GGCCTGGCGCCCCGGGTTGGAGTAGGCGTTCCCAACGCAGGCCCGCCGAGGCTCCAAATGG
-8 CTCTCCCGGCAGGCAGGCTCCTGCAGTAACTCTTGAGCTGGCTCAGGGAGCGCACTTCCTTCTCAGCC
+61 AGCGCGTCGCCCCCTGCATCCGTGGCCTCCACTGGAGCTGGGCAGGACCCTACCCAGTGAATCTGGAG
+129 AAAACAACTTGGGAGAC

Figure 7



B

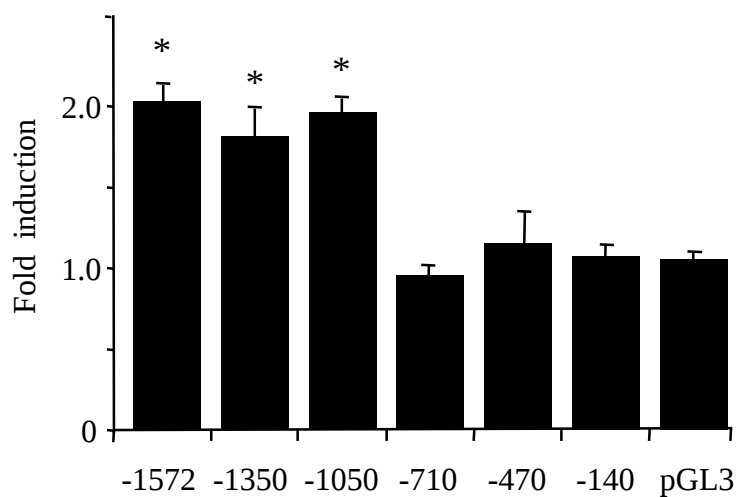


Figure 8

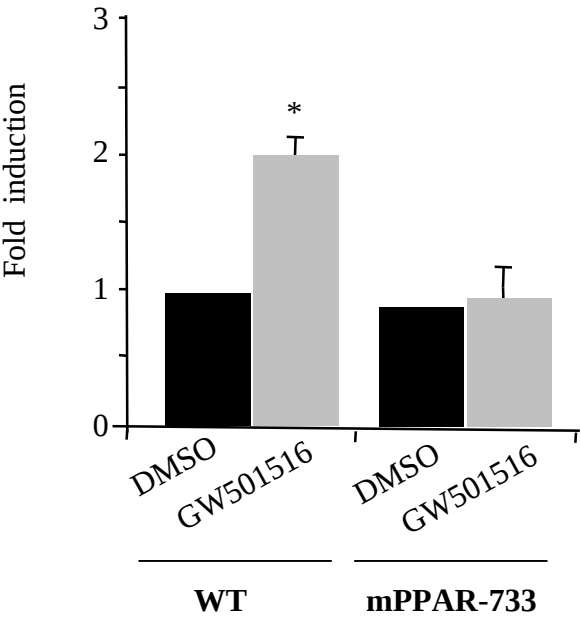


Figure 9

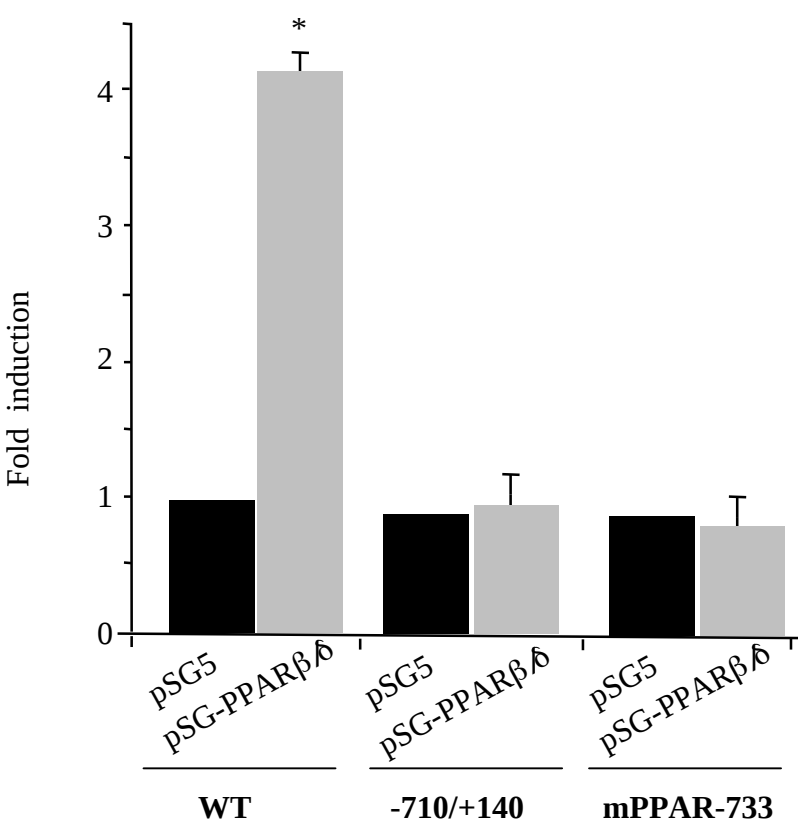


Figure 10

