



Rôle dual de PPAR γ dans les tumeurs de la vessie

Laure Coutos-Thévenot

► To cite this version:

Laure Coutos-Thévenot. Rôle dual de PPAR γ dans les tumeurs de la vessie. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS141 . tel-03188391

HAL Id: tel-03188391

<https://theses.hal.science/tel-03188391>

Submitted on 2 Apr 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Rôle dual de PPAR γ dans les tumeurs de la vessie

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n° 582 CBMS
Cancérologie : biologie - médecine – santé
Spécialité de doctorat: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 17 juin 2019, par
Laure Coutos-Thévenot

COMPOSITION DU JURY

Président :	Christian Auclair
Rapporteur :	Muriel Le Romancer
Rapporteur :	Philippe Lefebvre
Examineur :	Isabelle Jariel
Directeur de thèse :	François Radvanyi
Co-Directeur de thèse :	Isabelle Bernard-Pierrot
Invité :	Natacha Rochel

Résumé

Les tumeurs de la vessie sont le quatrième cancer en termes de fréquence chez l'homme dans les pays industrialisés. Elles peuvent schématiquement être séparées en deux sous-groupes principaux : les tumeurs basales, peu différenciées, et les tumeurs luminales, différenciées. PPAR γ est un récepteur nucléaire fortement exprimé dans ce second groupe, qui agit en hétérodimère avec un co-récepteur partenaire, RXR α , et qui possède un rôle essentiel dans la différenciation des cellules de l'urothélium normal.

Récemment, un rôle protumorigénique de PPAR γ a été mis en évidence dans les tumeurs luminales de vessie, où son activité est augmentée par le biais d'amplifications de PPAR γ , ainsi que des mutations activatrices de son partenaire, RXR α . Le premier axe de mon projet a consisté à mieux caractériser ce rôle protumorigénique de PPAR γ . J'ai d'abord participé à la mise en évidence de mutations récurrentes activatrices de PPAR γ dans les tumeurs luminales de la vessie renforçant le rôle protumorigénique du récepteur dans ces tumeurs. J'ai ensuite cherché à identifier les gènes cibles de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α pouvant médier cet effet protumorigénique. Grâce à des analyses transcriptomiques après extinction de l'expression de PPAR γ ou de RXR α et des expériences de ChIP-sequencing de PPAR γ et RXR α , j'ai pu identifier 30 gènes candidats. L'étude de l'implication de ces gènes dans la progression tumorale des tumeurs luminales présentant des altérations de la voie PPAR γ /RXR α est actuellement en cours.

Parallèlement à ce rôle protumorigénique dans les tumeurs luminales, des résultats suggéraient que ce gène pourrait posséder un rôle suppresseur de tumeurs dans le sous-groupe basal. La deuxième partie de mon projet a consisté à explorer cette hypothèse. J'ai pu montrer que des délétions hétérozygotes de PPAR γ sont associées à ce sous-groupe de tumeurs basales, qui présente également une diminution globale de l'expression de PPAR γ . De plus, parmi les mutations non-récurrentes de PPAR γ identifiées dans ces tumeurs, certaines sont des mutations inactivatrices, capables d'inhiber l'activité transcriptomique de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α en favorisant la fixation de co-répresseurs de l'hétérodimère. J'ai également pu montrer un rôle anti-tumoral de PPAR γ dans les tumeurs basales puisque l'expression de PPAR γ dans des lignées cellulaires basales à la suite de leur transfection avec un plasmide codant pour PPAR γ est capable d'inhiber leur viabilité. Ce projet a ainsi permis de mettre en évidence un rôle dual de PPAR γ dans les tumeurs de vessie, avec un rôle protumorigénique dans les tumeurs luminales, où il est suractivé par des amplifications et des mutations activatrices, et un rôle suppresseur de tumeurs dans les tumeurs basales, où il est réprimé par des délétions et des mutations inactivatrices.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mes directeurs de thèse, François Radvanyi et Isabelle Bernard-Pierrot, de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire, me permettant ainsi de réaliser ce projet de thèse qui me tient à cœur. Je les remercie également pour leur passion, leur aide et leurs conseils avisés qui m'ont permis de développer les nombreuses compétences que j'ai pu acquérir durant cette thèse.

Je tiens également à adresser mes sincères remerciements à Muriel Le Romancer et Philippe Lefebvre pour avoir accepté de juger mon travail de thèse en temps que rapporteurs, ainsi que Isabelle Jariel et Christian Auclair pour leur participation à ce jury en tant qu'examinatrice et président du jury.

J'adresse également mes remerciements à Natacha Rochel pour cette collaboration incomparable sans qui ces travaux n'auraient pas pu voir le jour, et pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'invitée.

Je remercie chaleureusement tout l'équipe d'Oncologie Moléculaire : Clémentine, qui a été un guide hors pair durant les premiers mois passés au sein de l'Institut Curie et une collègue incroyable pendant les années qui ont suivi, Florent et Hélène, pour le temps passé à me former et à m'assister, Aura et Jacqueline pour les fous rires et pour avoir fait du bureau surchargé un endroit si agréable, Elodie Chapeaublanc sans qui mes premiers pas dans le monde de la bioinformatique auraient été bien moins fructueux, Daniela et Mingjun pour l'entraide, année après année, face aux difficultés de la thèse, Jennifer pour ses conseils et sa joie de vivre, Virginia, Linda, Elodie Guyon et Jing pour les pauses repas joyeuses et bienvenues à la cantine. Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe, passés et présents, pour le bout de chemin à mes côtés, pour l'ambiance incroyable, les afterworks et les nombreuses discussions, qu'elles parlent de science ou du reste.

Je souhaite remercier les membres des équipes Glukhova, Chavrier et Johannes, pour les discussions en culture cellulaire ou entre deux portes ainsi que Michèle et Fatima pour leur écoute, leur bonne humeur et leur aide toujours aussi précieuse.

J'adresse également mes remerciements à toute l'équipe de Natacha Rochel et à celle de Roland Stote pour avoir participé activement à ce projet et aux travaux qui en découlent.

Je remercie enfin tous mes proches, famille et amis, pour leur soutien infailible, pour avoir cru en moi, pour m'avoir supportée durant tout ces années, et pour m'avoir permis d'être où je suis aujourd'hui.

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
Les récepteurs nucléaires	3
I. Structure et classification.....	3
II. Modalités d'action des récepteurs nucléaires	5
III. La famille des PPARs.....	9
IV. Récepteurs nucléaires et cancer	10
PPAR γ : Un récepteur nucléaire aux multiples facettes	13
I. Structure et mode d'action.....	13
II. Les principaux rôles physiologiques de PPAR γ	15
III. Pathologies associées à PPAR γ	17
IV. PPAR γ et cancer	19
Les cancers de la vessie	22
I. Cancers de la vessie : origine et développement	22
II. Classifications moléculaires des tumeurs de vessie	25
III. Le développement des thérapies ciblées.....	30
Rôle de PPAR γ dans les cancers de la vessie	33
I. Les prémisses : PPAR γ comme potentiel suppresseur de tumeurs.....	33
II. Rôle protumorigénique de PPAR γ dans les tumeurs luminales de vessie.....	34
Objectifs.....	37
Bibliographie.....	39
CHAPITRE I	57
Mutations récurrentes activatrices de PPAR γ associées aux tumeurs luminales.....	59
I. Résumé	59
II. Recurrent activating mutations of PPAR γ associated with luminal bladder tumors .	61
Identification de gènes cibles candidats de PPAR γ impliqués dans son rôle protumorigénique.....	97
I. Identification des gènes régulés par PPAR γ dans les tumeurs luminales de vessie ..	98
II. Caractérisation des sites de fixation de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α	103
III. Sélection des gènes candidats.....	105
IV. Matériels et Méthodes	107
Discussion	109

CHAPITRE II.....	113
Délétions et Mutations perte de fonctions de PPAR γ associées a un rôle suppresseur de tumeurs dans les tumeurs basales de vessie	115
I. Résumé	115
II. Deletions and loss-of-function mutations highlight a tumor suppressive role of PPAR γ in basal bladder tumors.	117
Discussion	141
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	143

Table des tableaux et figures

Tableau 1 : Les sous-familles de récepteurs nucléaires	4
Figure 1 : Structure des récepteurs nucléaires.....	3
Figure 2 : Modes d'action des récepteurs nucléaires	8
Figure 3 : Les différents transcrits et isoformes de <i>PPARG</i>	14
Figure 4 : Les deux voies de progressions de la tumorigenèse urothéliale	24
Figure 5 : Les différents types de cellules urothéliales et leurs marqueurs.....	26
Figure 6 : Illustration de classifications moléculaires des tumeurs de vessie	27
Figure 7 : Classification du TCGA 2017	28
Figure 8 : Classification Consensus	29
Figure 9 : Gènes différenciellement exprimés après extinction de l'expression de PPAR γ et RXR α	99
Figure 10 : Gènes régulés par PPAR γ dans les tumeurs de vessie.....	101
Figure 11 : Enzymes de la β -oxydation des acides gras régulés par PPAR γ dans les tumeurs de la vessie.	102
Figure 12 : Caractérisation des sites de fixation de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α	104
Figure 13 : Sélection des gènes cibles candidats.....	106
Figure 14 : Rôle dual de PPAR γ dans les tumeurs de la vessie.	147

Liste des abréviations

15d-PGJ2 :	15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J2
ACSL :	Long-chain-fatty-acid-CoA Ligase
AUM :	Asymmetric Unit Membrane
AF :	Activation Fonction
AR :	Androgen Receptor
Ba/Sq :	Basal/Squamous
C/EBP :	CCAAT/enhancer-binding proteins
CDK :	Cyclin-Dependent Kinase
CIS :	Carcinome In Situ
ChIP :	Chromatin-Immunoprecipitation
DBD :	DNA Binding Domain
DR :	Direct Repeat
DHA :	Acide Docosahéxaénoïque
ER :	Estrogen Receptor
FXR :	Farnesoid X Receptor
GR :	Glucocorticoid Receptor
HAT :	Histone Acétyltransferase
HDAC :	Histone Déacétylase
IR :	Inverted Repeat
LBD :	Ligand Binding Domain
LumP :	Luminal Papillary
LumNS :	Luminal Non-Specified
LumU :	Luminal Unstable
LXR :	Liver X Receptor
MIBC :	Muscle-Invasive Bladder Cancer
MR :	Mineralocorticoid Receptor
NE-like :	Neuroendocrine-like
NGFI-B :	Nerve Growth Factor IB-like
NHU :	Normal Human Urothelium
NMIBC :	Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer
PGC-1 :	PPAR γ Coactivator-1
PLIN :	Pérlipines
PPAR :	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPRE :	Peroxisome Proliferator Response Element
PR :	Progesterone Receptor
PXR :	Pregnane X Receptor
RAR :	Retinoic Acid Receptor

RIME :	Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins
ROR :	RAR-related Orphan Receptor
ROS :	Reactive Oxygen Species
RXR :	Retinoid X Receptor
SF-1 :	Steroidogenic Factor 1
TCGA :	The Cancer Genome Atlas
VDR :	Vitamin D Receptor

Introduction

LES RECEPTEURS NUCLEAIRES

I. Structure et classification

Le *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors gamma* (PPAR γ) est une protéine faisant partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ce sont des facteurs de transcription qui régulent des programmes transcriptionnels variés. Cependant, à la différence des facteurs de transcription classiques, les récepteurs nucléaires sont sous le contrôle direct de ligands capables de se fixer sur ces protéines, afin d'activer ou d'inhiber la transcription de leurs gènes cibles.

Les récepteurs nucléaires, très conservés chez les métazoaires (Escriva et al., 1997), possèdent tous une structure similaire, composée de plusieurs segments aux fonctions bien définies. En N-terminal se trouve un domaine A/B, contenant généralement un domaine d'activation de la transcription (*Activation Fonction 1*, AF-1). Le second domaine est le *DNA Binding Domain* (DBD), qui est capable de reconnaître des séquences ADN particulières, appelées *Response Element*, dans le promoteur de leurs gènes cibles et de s'y fixer. Le troisième domaine, le *Ligand Binding Domain* (LBD), fixe les ligands du récepteur nucléaire, et contient une deuxième fonction d'activation de la transcription, AF-2 (FIGURE 1, PAGE 3). La fixation du ligand entraîne la régulation de l'activité de la protéine, et donc la transcription de ses gènes cibles, par le recrutement de co-activateurs ou de co-répresseurs (Khorasanizadeh & Rastinejad, 2016).



Figure 1 : Structure des récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires sont composés d'un domaine A/B possédant une fonction d'activation AF-1, d'un domaine de liaison à l'ADN, et d'un domaine de liaison au ligand présentant également une fonction d'activation, AF-2.

Il existe plusieurs sous familles de récepteurs nucléaires, classés selon les similitudes entre leurs LBD et DBD (TABLEAU 1, PAGE 4). Les *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* (PPARs) font partie du premier groupe (NR1) qui réunit également les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR), les *RAR-related orphan receptors* (ROR), les *Liver X Receptors* (LXR), le *Pregnane X receptor* (PXR), le *Farnesoid X receptor* (FXR) ainsi que le récepteur à la vitamine D (VDR). Dans le second groupe, on

INTRODUCTION

retrouve principalement les *Retinoid X Receptors* (RXR), qui possèdent un rôle central puisque ce sont les partenaires d'hétérodimérisation de nombreux récepteurs nucléaires. Ils ont été regroupés avec les récepteurs HNF4, TLL, COUP et USP. Le troisième groupe est composé des récepteurs aux hormones stéroïdes : les récepteurs aux estrogènes (ER), aux androgènes (AR), aux minéralocorticoïdes (MR), aux glucocorticoïdes (GR), et à la progestérone (PR). Les groupes quatre à six sont de très petits groupes, comprenant notamment les récepteurs « *Nerve Growth Factor IB-like* » (NGFI-B), le « *steroidogenic factor 1* » (SF-1) ou le récepteur GCNF1 (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999).

Cette classification phylogénique n'est cependant pas la seule classification possible des récepteurs nucléaires, qui peuvent également être séparés selon leur mode de liaison à l'ADN.

Tableau 1 : Les sous-familles de récepteurs nucléaires
(Aranda and Pascual 2017)

	Receptor	Subtype	Denomination	Ligand	Response Element	Monomer, Homodimer, or Heterodimer
Class I	TR	α, β	Thyroid hormone receptor	Thyroid hormone (T_3)	Pal, DR-4, IP	H
	RAR	α, β, γ	Retinoic acid receptor	Retinoic acid	DR-2, DR-5	H
	VDR		Vitamin D receptor	1-25(OH) $_2$ vitamin D_3	Pal, IP	H
	PPAR	α, β, γ	Peroxisome proliferator activated receptor	Benzotriene B4; Wy 14.643 Eicosanoids; thiazolidinediones (TZDs); 15-deoxy-12,41-prostaglandin J_2 ; polyunsaturated fatty acids	DR-3, IP-9 DR-1	H H
	PXR		Pregnane X receptor	Pregnanes; C21 steroids	DR-3	H
	CAR/MB67	α, β	Constitutive androstane receptor	Androstanes; 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene	DR-5	H
	LXR	α, β	Liver X receptor	Oxysterols	DR-4	H
	FXR		Farnesoid X receptor	Bile acids	DR-4, IR-1	H
	RevErb	α, β	Reverse ErbA	Unknown	DR-2, Hemisite	M, D
	RZR/ROR	α, β, γ	Retinoid Z receptor/retinoic acid-related orphan receptor	Unknown	Hemisite	M
Class II	UR		Ubiquitous receptor	Unknown	DR-4	H
	RXR	α, β, γ	Retinoid X receptor	9- <i>Cis</i> -retinoic acid	Pal, DR-1	D
	COUP-TF	α, β, γ	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor	Unknown	Pal, DR-5	D, H
	HNF-4	α, β, γ	Hepatocyte nuclear factor 4	Fatty acyl-CoA thioesters	DR-1, DR-2	D
	TLX		Tailless-related receptor	Unknown	DR-1, Hemisite	M, D
Class III	PNR		Photoreceptor-specific nuclear receptor	Unknown	DR-1, Hemisite	M, D
	TR2	α, β	Testis receptor	Unknown	DR-1 to DR5	D, H
	GR		Glucocorticoid receptor	Glucocorticoids	Pal	D
	AR		Androgen receptor	Androgens	Pal	D
	PR		Progesterone receptor	Progestins	Pal	D
	ER	α, β	Estrogen receptor	Estradiol	Pal	D
	ERR	α, β, γ	Estrogen-related receptor	Unknown	Pal, Hemisite	M, D
Class IV	NGFI-B	α, β, γ	NGF-induced clone B	Unknown	Pal, DR-5	M, D, H
Class V	SF-1/TZF-1	α, β	Steroidogenic factor 1 Fushi Tarazu factor 1	Oxysterols	Hemisite	M
Class VI	GCNF		Germ cell nuclear factor	Unknown	DR-0	D
Class 0	SHP		Small heterodimeric partner	Unknown		H
	DAX-1		Dosage-sensitive sex reversal	Unknown		

M, monomer; D, homodimer; H, heterodimer; NGF, nerve growth factor; DR, direct repeat; Pal, palindrome; IP, inverted palindrome.

II. Modalités d'action des récepteurs nucléaires

Homodimères, hétérodimères, monomères

Afin d'exercer leurs fonctions de régulation de la transcription, les récepteurs nucléaires se fixent sur leurs *Response Element* selon des modes variables. Ceci permet de séparer cette superfamille en trois groupes, possédant des modalités d'action distinctes (FIGURE 2.A, PAGE 8).

Les récepteurs aux hormones stéroïdiennes se lient à l'ADN en formant un homodimère, composé de deux unités du même récepteur nucléaire. Ils se fixent sur des séquences *Inverted Repeat* (IR), formés de deux hexamères de nucléotides répétés en tête-à-tête, et séparés par 3 nucléotides (IR3). Dans la majorité des cas, cet hexamère correspond à un motif 5'-AGAACA-3', à l'exception d'ER, qui reconnaît l'hexamère 5'-AGGTCA-3'. Cet homodimère est transloqué au noyau par la fixation de son ligand, ce qui entraîne la régulation de la transcription de ses gènes cibles (Helsen et al., 2012; Hudson et al., 2014; Roemer et al., 2006; Schwabe et al., 1993).

Mais la majorité des récepteurs nucléaires utilisent un autre mode d'action : ces protéines s'associent également en dimères, mais avec des membres très particuliers de cette superfamille, les RXRs. Chez l'Homme, la famille des RXRs regroupe trois membres, RXR α , RXR β et RXR γ , localisés respectivement sur les chromosomes 9q, 6p et 1q (Almasan et al., 1994; Mangelsdorf et al., 1990; Yu et al., 1991). RXR α et RXR β présentent une expression ubiquitaire, tandis que RXR γ est principalement exprimé dans la glande pinéale (Wu et al., 2009).

L'hétérodimère formé avec un de ces trois récepteurs nucléaires se fixe sur des séquences *Direct Repeat* (DR), soit deux hexamères 5'-AGGTCA-3' répétés en tandem, séparés de 0 à 5 nucléotides (DR0 à DR5). Chacun de ces hétérodimères lie préférentiellement un DR particulier. Ainsi, les hétérodimères VDR/RXR se fixent sur des séquences DR3, alors que LXR va préférer des motifs DR4. La variabilité des motifs DR, ainsi que leurs séquences adjacentes, permettent ainsi de créer un degré de spécificité entre les différents récepteurs nucléaires, en permettant la liaison des hétérodimères aux promoteurs des gènes cibles possédant leur motif préférentiel (Kliwer et al., 1992a, 1992b; Mangelsdorf & Evans, 1995).

Pratiquement tous les récepteurs nucléaires agissent en formant des dimères, mais certains, tels que SF-1 et NGFI-B, échappent pourtant à cette règle. Ils se fixent sous forme de monomères sur des demi-sites, formé d'un unique hexamère (Wilson et al., 1993).

Régulation de l'activité transcriptionnelle par les ligands

La fixation du dimère sur l'ADN ne permet pas directement l'activation de la transcription de son gène cible. En effet, la caractéristique de cette superfamille est la capacité de ses membres à lier des ligands capables de réguler leur activité. Les modalités de cette régulation peuvent être très variables selon le type de ligands, qui peuvent être classées selon leurs effets sur le récepteur nucléaire.

- ▶ Les agonistes purs représentent le groupe le plus classique. Ces molécules se fixent au niveau du LBD, entraînent un changement conformationnel de l'hélice H12, ce qui conduit au recrutement de co-activateurs et à l'activation de la transcription des gènes cibles (Batista & Martínez, 2013; Renaud et al., 1995; Togashi et al., 2005).
- ▶ A l'inverse, les antagonistes préviennent ce changement conformationnel et le recrutement des co-activateurs qui en résulte.
- ▶ Les agonistes inverses sont des compétiteurs des agonistes purs, et conduisent également à un changement de conformation de la protéine. Mais au contraire des agonistes purs, cette conformation entraîne le recrutement de co-répresseurs, et ce qui conduit à l'inhibition de la transcription des gènes cibles du récepteur nucléaire.
- ▶ Les agonistes partiels sont également des compétiteurs des agonistes purs qui activent la protéine, mais de manière moindre, ce qui conduit à une modulation plus fine de l'activité transcriptionnelle.
- ▶ Le dernier groupe de ligand présente le mode d'action le plus complexe : ce sont les modulateurs sélectifs. Ces molécules sont capables de moduler l'activité des récepteurs nucléaires différemment selon le tissu ou le gène cible concerné, pouvant ainsi agir en tant qu'agoniste ou antagoniste selon le contexte, et présentent des modes d'action variés selon la molécule et le récepteur concerné (Hughes et al., 2013).

Dans le cas d'un hétérodimère avec un RXR, deux cas de figure peuvent se présenter (FIGURE 2.B, PAGE 8). Dans le premier cas, l'hétérodimère peut être activé uniquement par les ligands du partenaire. Ces hétérodimères sont dit non-permissifs. Dans le deuxième cas, les hétérodimères peuvent être activés aussi bien par les ligands de RXR que par les ligands de son partenaire, et sont dits permissifs (Shulman et al., 2004).

Le premier ligand naturel des RXR à avoir été décrit est le 9-cis-RA, un acide rétinoïque dérivé de la vitamine A (Egea et al., 2002). Les ligands naturels des RXR incluent également l'acide docosahéaénoïque (DHA) ainsi que d'autres acides gras polyinsaturés, tels que l'acide arachidonique (Lengqvist et al., 2004; Mata et al., 2016). Des ligands synthétiques ont également été développés, tels que le bexarotène (ou LGD1069) (Boehm et al., 1994). Enfin, il existe un large panel de molécules capables d'inhiber l'activité des RXR, notamment LG100754 et UVI3003 (Watanabe & Kakuta, 2018).

Régulation des hétérodimères par les co-régulateurs

Etant donné les programmes transcriptionnels complexes qu'ils contrôlent, l'activité transcriptomique des récepteurs nucléaires doit être modulée de manière fine et précise. La spécificité des ligands ainsi que des sites de fixation sur l'ADN, tels que décrits précédemment, permettent un premier niveau de contrôle. Les protéines co-régulatrices en forment un deuxième.

En absence de ligand, la plupart des récepteurs nucléaires sont liés à des co-répresseurs, incluant SMRT, NCoR1 ou SUN-CoR (Chen & Evans, 1995; Hörlein et al., 1995; Zamir et al., 1997). Cette interaction se fait par le biais d'un motif LXX I/H I XXX I/L nommé CoRNR box, qui se fixe au niveau de l'hélice H12 du récepteur nucléaire (Hu & Lazar, 1999; Perissi et al., 1999). Ceci entraîne notamment le recrutement d'Histones Déacétylases (HDACs), ce qui entraîne la répression des gènes cibles de l'hétérodimère (Li et al., 2000; Yoon et al., 2003). La fixation du ligand dans la poche de liaison au ligand entraîne un changement de conformation de la protéine. Le complexe avec le co-répresseur est alors dissocié, les co-activateurs sont recrutés pour former de larges complexes protéiques, ce qui aboutit à l'activation de la transcription des gènes cibles (FIGURE 2.C, PAGE 8). L'interaction entre les récepteurs nucléaires et les co-activateurs se fait en général entre l'hélice H12 et un motif LXXLL présent sur le co-activateur (Heery et al., 1997).

Il existe plusieurs types de co-activateurs, possédant des rôles et des activités enzymatiques diverses, à commencer par les histones acétyltransferases (HATs) (Aranda & Pascual, 2017). A l'inverse des HDACs recrutées par les co-répresseurs, les HATs acétylent les histones et remodelent la chromatine de manière à faciliter l'activation de la transcription des gènes cibles. Les membres de la famille p160 (SRC-1, NCoA2, NCoA3) sont les premiers à avoir été identifiés, et sont essentiels à l'activation ligand-dépendante des récepteurs nucléaires (Cavailles et al., 2006; Halachmi et al., 2006). CBP/p300 et PCAF possèdent une activité HAT et font également partie des co-activateurs. En plus de leur activité HAT, ils servent à la formation d'un complexe avec des membres de la famille p160, avec lesquels ils peuvent interagir (Blanco et al., 1998; Chakravarti et al., 1996; Kamei et al., 1996).

D'autres co-activateurs sont impliqués dans le remodelage de la chromatine, tels que les membres du complexes SWI/SNF. Ils permettent l'ouverture de la chromatine par un remodelage ATP-dépendant des nucléosomes (Yoshinaga et al., 1992).

A l'inverse, certains co-activateurs ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque, mais jouent le rôle de pont entre les récepteurs nucléaires et les différents co-facteurs impliqués. Le complexe Mediator est un large complexe, qui permet de faire le lien entre l'activation par le ligand et la mise en place de la machinerie de transcription. Les récepteurs nucléaires interagissent avec ce complexe par le biais de MED1, qui contient deux motifs LXXLL (Yuan et al., 1998; Zhu et al., 1997), mais des résultats ont montré que d'autres composants du

complexe peuvent également interagir avec certains récepteurs nucléaires (Malik & Roeder, 2010).

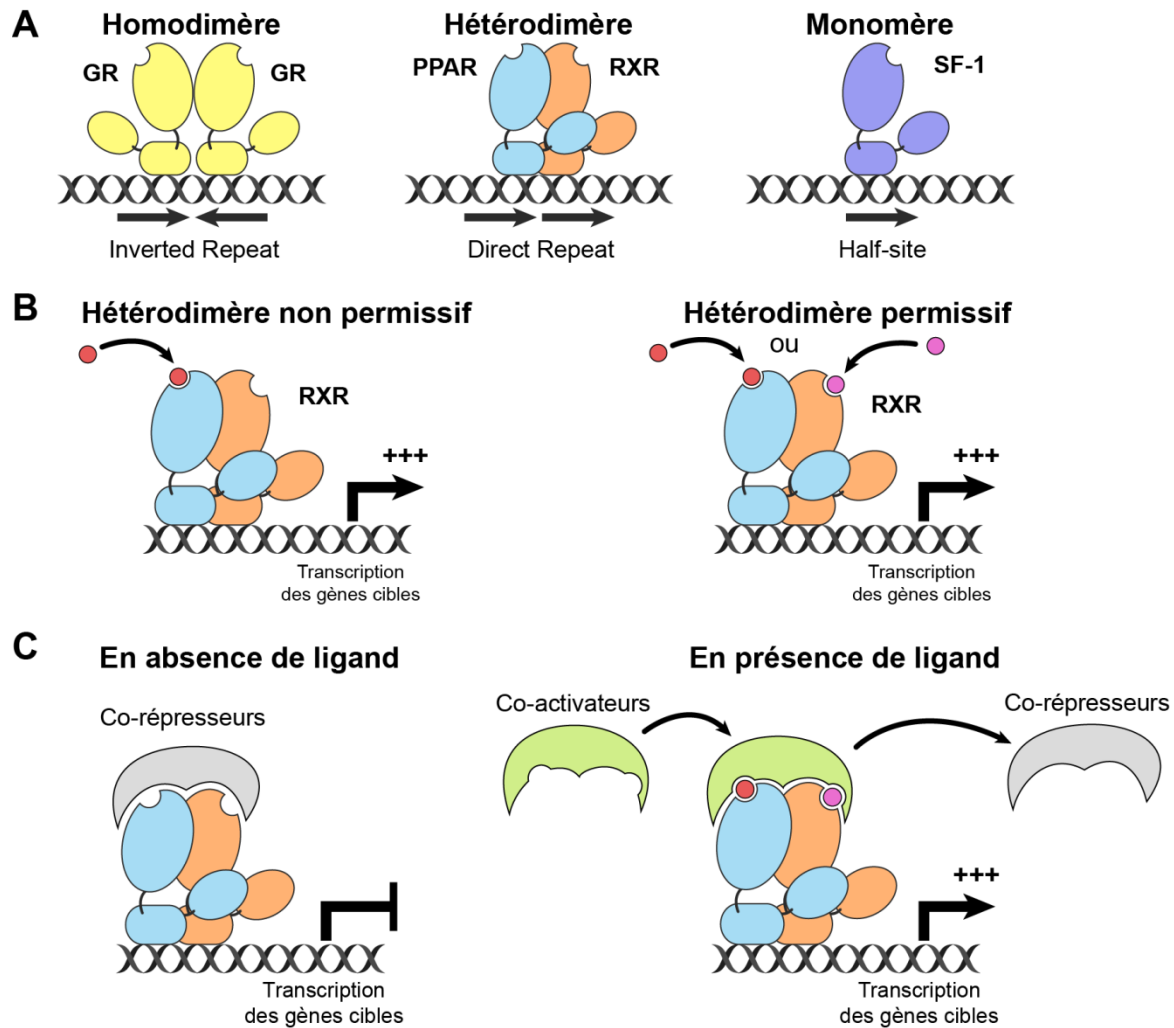


Figure 2 : Modes d'action des récepteurs nucléaires

A) Les différents modes de fixations des récepteurs nucléaires sur leur fréquences cibles. **B)** Modes d'activation différents des hétérodimères selon leur permissivité. **C)** Recrutement des co-régulateurs en fonction de la fixation des ligands.

Si la plupart des co-régulateurs sont relativement génériques, sans restriction tissulaire ou interaction préférentielle avec certains récepteurs, certains sont en revanche plus spécifiques, tels que le membre de la famille des « *PPAR γ coactivator-1* » (PGC-1 α et PGC1- β), qui présentent une expression beaucoup plus marquée dans les tissus nécessitant une forte consommation d'énergie. Ils sont davantage exprimés dans le tissu adipeux brun, le cœur, le muscle squelettique, le cerveau et le rein, et orchestrent le métabolisme cellulaire en servant de plateforme de recrutement pour les différents membres du complexe d'activation de la transcription (Finck & Kelly, 2006). Si les PGC-1 sont maintenant connus pour leur interaction avec un large panel de récepteurs nucléaires, leur première cible identifiée était PPAR γ , dont ils tirent leur nom (Puigserver et al., 1998).

III. La famille des PPARs

PPAR γ fait partie de la famille des PPARs, qui doit son nom au premier rôle qui lui a été attribué : la capacité à provoquer la prolifération des peroxysomes (Auwerx, 1992). Cette famille de récepteurs nucléaires regroupe trois isotypes : PPAR α , PPAR δ (également connu sous le nom de PPAR β) et PPAR γ , qui, même s'ils possèdent beaucoup de points communs, possèdent chacun des localisations et des rôles qui leur sont propres.

PPAR α est le premier membre à avoir été identifié (Issemann & Green, 1990). Son expression est particulièrement importante dans le foie, le cœur, le rein, le tissu adipeux brun, le muscle et les intestins, où il joue un rôle prépondérant dans le contrôle du catabolisme lipidique et de la β -oxydation, en particulier dans le foie (Pyper et al., 2010). PPAR β/δ est quant à lui exprimé dans une grande variété de tissus (Skogsberg et al., 2000). Il joue également un rôle dans le catabolisme des acides gras, en particulier dans le muscle squelettique et le tissu adipeux, et participe à la différenciation des kératinocytes (Burdick et al., 2006). PPAR γ est exprimé dans les tissus adipeux, le côlon, les cellules immunitaires et l'épithélium vésical. Il joue un rôle prépondérant dans la différenciation adipocytaire et urothéliale, et dans le stockage des acides gras (Chawla & Lazar, 2006; Varley et al., 2004).

Les trois membres de la famille des PPARs font partie des récepteurs nucléaires qui agissent en formant un hétérodimère permissif avec les membres de la famille des RXR (Kliwer et al., 1992b). Cet hétérodimère est capable de se fixer sur des séquences appelées PPRE (*Peroxisome Proliferator Response Element*), qui correspond à un motif DR1 (composé de deux séquences AGGTCA répétées, séparées par un nucléotide central). Si le motif DR1 est essentiel, la séquence située en 5' est également importante pour la fixation de l'hétérodimère et l'activation de la transcription. Le PPRE optimal correspond à une séquence consensus 5'-AACTAGGTCAAAGGTCA-3' (IJpenberg et al., 1997; Palmer et al., 1995). L'activation de cet hétérodimère par un ligand ciblant l'un ou l'autre des partenaires entraîne le recrutement des co-activateurs, et la régulation de programmes transcriptionnels variés, selon le membre concerné ou le contexte cellulaire dans lequel il est placé.

IV. Récepteurs nucléaires et cancer

Les récepteurs nucléaires contrôlent des programmes transcriptionnels impliqués dans des fonctions biologiques variées. Dans un certain nombre de cas, ces programmes sont essentiels au maintien de l'intégrité de la cellule, et leurs altérations peuvent jouer un rôle clé dans le développement des cancers.

La dépendance de certains cancers aux hormones stéroïdes, tels que le cancer du sein ou de la prostate, est connue et utilisée depuis longtemps comme arme contre le cancer (Beatson, 1896; Lacassagne, 1936). Les récepteurs aux hormones stéroïdes, ciblés par ces traitements, ont un rôle essentiel dans le développement de ces cancers, qui n'est encore aujourd'hui que partiellement compris. Le récepteur aux estrogènes, en particulier ER α , est impliqué dans le développement et la croissance du cancer du sein, et son inhibition par le Tamoxifène a permis de grands progrès dans le traitement de ces tumeurs. Du côté du cancer de la prostate, c'est le récepteur aux androgènes qui tient un rôle prépondérant. Son inhibition entraîne un arrêt du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose, ainsi qu'une diminution des capacités invasives des cellules cancéreuses (Hara et al., 2008; Heisler et al., 1997). Les glucocorticoïdes sont à l'inverse connus pour leurs effets immunosuppresseurs, anti-inflammatoires et cytotoxiques dans les leucémies (Greenstein et al., 2002).

Le rôle de ces récepteurs dans les tumeurs est cependant très complexe. De nombreuses études ont montré que chaque récepteur nucléaire peut être impliqué dans de nombreux cancers différents, et qu'il existe des « crosstalks » entre les voies de signalisation des récepteurs nucléaires, chaque récepteur étant capable d'agir sur le programme transcriptionnel dirigé par l'autre et donc d'impacter son rôle dans la cellule cancéreuse (Truong & Lange, 2018). La vitamine D et les acides rétinoïques sont par exemple capable d'induire la différenciation, l'arrêt du cycle et l'apoptose dans de nombreux cancers (Gottardis et al., 1996; Werman et al., 1997).

Dans certains cas, les récepteurs nucléaires pourraient même avoir des effets inverses selon le cancer en question. Par exemple, si ER α est protumorigénique dans les cancers gynécologiques, il présente un effet opposé dans les cancers digestifs et du poumon (Hsu et al., 2006; Pietras et al., 2005). PXR présente également ce type d'effet dual, ainsi que Nurr77 ou encore ERR α (Baek & Kim, 2013; Pondugula et al., 2016).

La famille des PPARs présente également un intérêt majeur dans la compréhension du cancer. PPAR α est principalement connu pour son rôle protumorigénique dans les cancers du foie, mais il a également été montré que certains de ses ligands sont capables d'inhiber la croissance de certaines tumeurs, incluant les cancers du côlon, du sein, du poumon ou les

gliomes, même si la spécificité des effets de ces ligands porte parfois à controverse (Gao et al., 2015; Misra & Reddy, 2014). Le rôle de PPAR β/δ est lui aussi sujet à controverse, principalement à cause de résultats discordants entre les différentes études et modèles cellulaires. PPAR β/δ a ainsi été associé au cancer du sein, du poumon, de la peau et du côlon, mais le rôle joué dans ces cancers est encore flou à cause de ces résultats discordants et des désaccords existants au sein de la communauté scientifique, en particulier dans le cas du cancer du côlon (Müller, 2017; Peters et al., 2015).

PPAR γ : UN RECEPTEUR NUCLEAIRE AUX MULTIPLES FACETTES

I. Structure et mode d'action

Organisation structurale et fonctionnelle des isoformes de PPAR γ

Chez l'Homme, le gène *PPARG* est situé sur le chromosome 3, en position 3p25 (Greene et al., 1995). Quatre ARN messagers différents ont été identifiés, donnant lieu après traduction à deux isoformes différents : PPAR γ 1, codé par les ARN messagers *PPARG1*, *PPARG3* et *PPARG4*, et PPAR γ 2, codé par l'ARN messenger *PPARG2* (FIGURE 3.A ET 3.B, PAGE 14). Ces deux protéines diffèrent par leur partie N-terminale, PPAR γ 2 possédant 28 acides aminés supplémentaires au début de sa séquence (Fajas et al., 1997, 1998; Sundvold & Lien, 2001). En conséquence, les acides aminés seront ici numérotés selon leur position dans l'isoforme PPAR γ 2.

Cette séquence N-terminale additionnelle augmente l'efficacité de la fonction AF-1, présente dans le domaine A/B des deux isoformes, qui est responsable de l'activation de la protéine indépendamment de la fixation du ligand (Werman et al., 1997). PPAR γ est ensuite constitué d'un domaine de liaison à l'ADN (DBD), permettant la spécificité de la liaison au promoteur du gène cible. Cette liaison se fait par l'intermédiaire de deux « *zinc-fingers* », très conservés chez les différents récepteurs nucléaires. Le troisième domaine, situé sur la partie C-terminale, est le domaine de liaison au ligand (LBD). Il contient des domaines essentiels au fonctionnement de la protéine : la poche permettant la fixation des ligands, ainsi que le domaine AF-2, permettant l'activation de la protéine lors de la fixation des ligands et le recrutement des co-régulateurs de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α (FIGURE 3.C, PAGE 14) (Zieleniak et al., 2008).

Régulation de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α

PPAR γ s'hétérodimérise avec RXR α , et comme tout hétérodimère permissif, il peut être activé aussi bien par les ligands de RXR α que de PPAR γ . Son premier ligand naturel identifié est le 15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), un dérivé de la prostaglandine. D'autres ligands naturels ont ensuite été identifiés, notamment parmi les acides gras insaturés. Si la connaissance des ligands naturels est essentielle à la compréhension du rôle de PPAR γ , les ligands synthétiques présentent également un intérêt majeur, en particulier dans le cadre du traitement des maladies liées à ce récepteur nucléaire. Les thiazolidinédiones, tels que la pioglitazone ou la rosiglitazone, sont des ligands synthétiques de PPAR γ bien connus et

utilisés dans le traitement du diabète de type 2 pour leur action de sensibilisation à l'insuline (Forman et al., 1995; Krey et al., 1997). Le GW1929 est l'un des composés ne faisant pas partie des thiazolidinédiones entraînant la plus forte activation de PPAR γ et présente donc également un intérêt primordial (Brown et al., 1999).

Tous les ligands précédemment décrits sont des ligands agonistes, capables d'entraîner une activation de l'hétérodimère par une stabilisation de l'hélice H12 en conformation active. Ceci conduit à la déstabilisation de l'interaction avec les co-répresseurs et le recrutement de co-activateurs au niveau des hélices H3, H4 et H12, activant ainsi l'activation de la transcription des gènes cibles de PPAR γ (Chrisman et al., 2018).

A l'inverse, de très nombreux composés capables d'inhiber l'activité de PPAR γ ont été identifiés, aussi bien agonistes inverses qu'antagonistes. Le T0070907 et le GW9662 sont respectivement des agonistes inverses et antagonistes largement utilisés qui entraînent diminution conséquente de l'activité de PPAR γ (Lee et al., 2002; Leesnitzer et al., 2002).

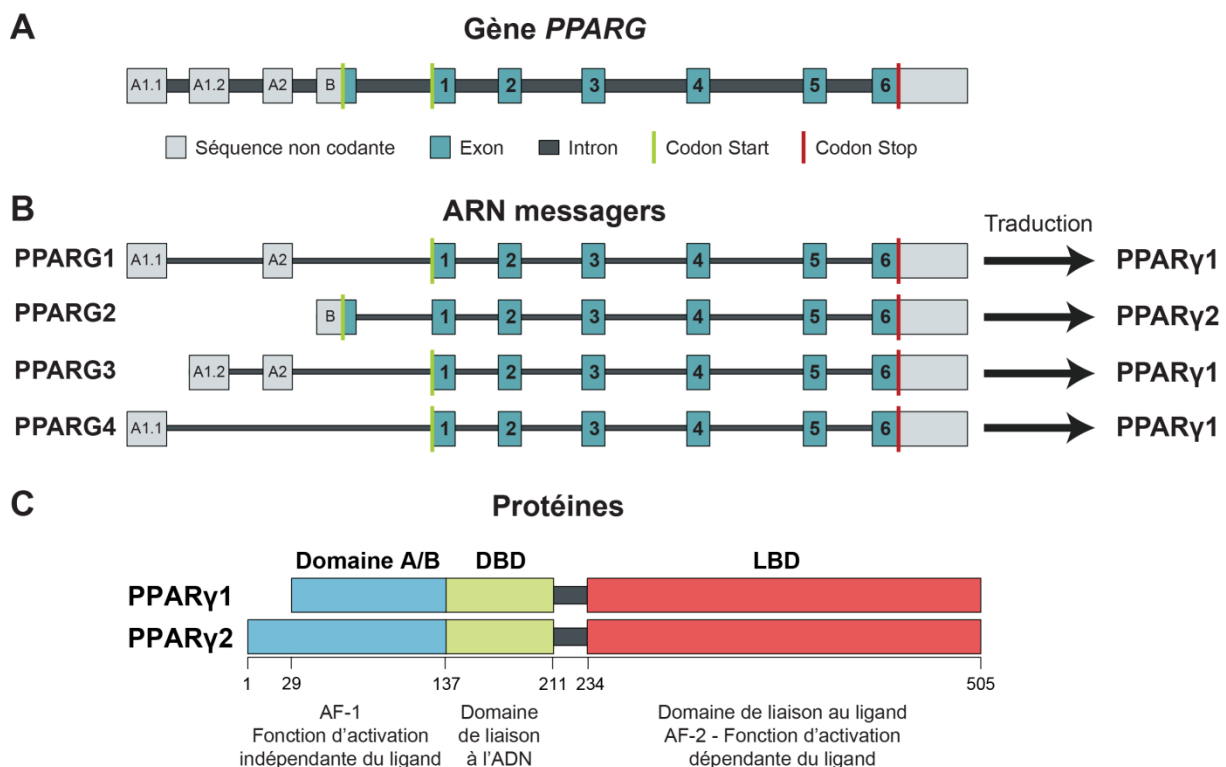


Figure 3 : Les différents transcrits et isoformes de *PPARG*

A) Structure du gène *PPARG*. **B)** Structure des quatre ARN messagers et les protéines issues de leur traduction. **C)** Structure de PPAR γ 1 et PPAR γ 2 et fonctions des différents domaines qui les composent. (Aprile et al., 2014).

Les modifications post-traductionnelles sont des systèmes de régulation qui touchent une grande partie des protéines, et les récepteurs nucléaires ne sont pas épargnés. La modification post-traductionnelle la plus décrite de PPAR γ est la phosphorylation de la sérine 112 par la voie ERK-MAPK ou CDK7 (Adams et al., 1997; Helenius et al., 2009; Hu et al., 1996). Cette

phosphorylation entraîne une inhibition de l'activité de la protéine en altérant l'interaction avec le ligand et les co-régulateurs, et donc une inhibition de la transcription de ses gènes cibles (Shao et al., 1998). Les phosphatases PP5, PPM1B et WIP1 sont à l'inverse capables de déphosphoryler la sérine 112, et d'augmenter l'activité de la protéine (Hinds et al., 2011; Li et al., 2017; Tasdelen et al., 2013). Plus récemment, d'autres sites de phosphorylations ont été identifiés aux positions S273, S133 et T296, mais ont été encore peu étudiés (Banks et al., 2015).

PPAR γ est également la cible de SUMOylations, qui conduisent également à une inhibition de la transcription de ses gènes cibles (Diezko & Suske, 2013; Yamashita et al., 2004). Enfin, la stabilité de PPAR γ et sa dégradation par le protéasome est modulée par des ubiquitination, pouvant soit induire sa dégradation (Kilroy et al., 2012; Kim et al., 2014), soit le protéger de celle-ci (Li et al., 2016; Watanabe et al., 2015).

II. Les principaux rôles physiologiques de PPAR γ

PPAR γ comme « master » régulateur de l'adipogenèse

En tant que membre de la famille des PPARs, PPAR γ possède un rôle primordial dans le métabolisme. Contrairement aux deux autres membres de sa famille, qui sont plutôt associés au catabolisme des lipides, PPAR γ est impliqué principalement dans l'adipogenèse et le maintien de l'homéostasie lipidique.

L'adipogenèse est un phénomène essentiel à la régulation du métabolisme lipidique, permettant à l'organisme de créer des réserves qui pourront être utilisées en cas de nécessité. Ceci implique la différenciation des adipocytes, cellules spécialisées dans le stockage des acides gras, en quantité et au moment opportun. Cette différenciation est strictement régulée par un programme précis, qui aboutit à la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures par le biais de nombreuses modifications morphologiques et transcriptionnelles. Les pré-adipocytes, qui possèdent une morphologie fibroblastique, s'arrondissent pour accueillir les gouttelettes lipidiques, arrêtent leur croissance, et déclenchent des programmes transcriptionnels complexes pour exprimer les protéines nécessaires à leur fonction (Gregoire et al., 1998).

PPAR γ est exprimé très tôt durant le processus de différenciation des adipocytes, et son expression ainsi que son activation sont essentielles à leur maturation et à leur survie (Chawla & Lazar, 2006; Kletzien et al., 1991). De nombreux facteurs de transcription sont de potentiels régulateurs de PPAR γ , à commencer par PPAR γ lui-même, qui est capable de se fixer sur son propre promoteur afin d'activer sa transcription (Lee et al., 2013). Les

« *CCAAT/enhancer-binding proteins* » (C/EBP) tiennent également une place centrale dans la régulation de l'expression de PPAR γ et de l'adipogenèse. Il coopère en particulier avec C/EBP α pour réguler le programme transcriptionnel de l'adipogenèse, activant ainsi la transcription des gènes cibles impliqués dans ce processus (Lefterova et al., 2008; Madsen et al., 2014).

Le panel de gènes régulés par PPAR γ est très large, et sont impliqués dans les différentes étapes essentielles au stockage des acides gras. PPAR γ régule leur importation au sein de la cellule et leur prise en charge par des protéines de transport, telles que CD36, FATP1 ou FABP4, et leur stockage dans les gouttelettes lipidiques sous forme de triglycérides grâce aux Périlipines (PLIN). PPAR γ régule également les gènes impliqués dans la synthèse de ces triglycérides, aussi bien dans la transformation des acides gras, notamment par le biais des « *Long-chain-fatty-acid-CoA ligase* » (ACSL), ainsi que la production de G3P en augmentant l'expression de PEPCCK et PDK4 (Nakamura et al., 2014).

PPAR γ et la différenciation de l'urothélium normal

Afin de stocker les urines efficacement, la vessie est tapissée d'un tissu hautement spécialisé, l'urothélium, permettant notamment de jouer le rôle de barrière entre l'urine et le reste des organes, mais également de s'adapter aux distensions et altérations de ses tissus (Kreft et al., 2010). Cet épithélium présente ainsi un renouvellement très lent, mais des capacités de régénération importantes, permettant une réponse rapide aux altérations. Il est composé de trois couches de cellules distinctes, les cellules basales, peu différenciées, les cellules intermédiaires, et les cellules luminales, très spécialisées.

Ces dernières possèdent un rôle essentiel dans l'architecture de l'urothélium, car leur membrane apicale est protégée par des structures nommées « *asymmetric unit membrane* » (AUM) (Hicks, 1965), qui sont un des éléments clés de la barrière formée par cet épithélium. Les AUM sont composées de protéines transmembranaires, les uroplakines, qui sont désormais considérés comme des marqueurs de la différenciation urothéliale (Wu et al., 1990; Yu et al., 1990).

PPAR γ possède un rôle essentiel dans la différenciation des cellules urothéliales : son activation par un ligand agoniste est capable de déclencher la différenciation de cellules normales d'urothélium humain prolifératives non différenciées (NHU). Cette différenciation induite par l'activation de PPAR γ nécessite cependant l'inhibition de la voie de l'EGFR, car celle-ci oriente les cellules urothéliales vers un phénotype de prolifération et de migration (Varley et al., 2005, 2004). Cette différenciation, qui aboutit notamment à l'expression des marqueurs de la différenciation urothéliale, à l'arrêt de la prolifération et à la formation de « *tight junctions* » entre les cellules luminales (Varley et al., 2007), passe par un programme

transcriptionnel dans lequel PPAR γ agit en tant que « *master* » régulateur, par l'intermédiaire de facteurs de transcriptions clés, tels que GATA3, FOXA1, IRF1 ou ELF3 (Fishwick et al., 2017).

PPAR γ et inflammation

En plus de son rôle dans la promotion de la différenciation de différents types cellulaires, l'activation de PPAR γ a également des propriétés anti-inflammatoires. Elle entraîne la régulation d'un panel de gènes cibles de PPAR γ en partie différent de celui exprimé dans les programmes de différenciation (Lefterova et al., 2010), et cette facette du programme transcriptionnel de PPAR γ a des répercussions sur plusieurs mécanismes liés à l'inflammation (Martin, 2010). Il est tout d'abord capable de diminuer la réaction inflammatoire par une inhibition de la voie NF- κ B et de la production des ROS, aboutissant à une inhibition globale de l'inflammation (Korbecki et al., 2019), mais également d'agir sur différents types de cellules immunitaires.

Les macrophages peuvent arborer deux phénotypes distincts : un phénotype M1 pro-inflammatoire induit par des cytokines telles que INF ou IL1 β , et un phénotype M2, induit par les cytokines IL-4 et IL-13 qui diminue au contraire l'inflammation (Gordon, 2003). IL-4 entraîne notamment une augmentation de l'expression et de l'activité de PPAR γ (Huang et al., 1999), qui est essentiel à la polarisation vers un phénotype M2 (Bouhrel et al., 2007; Odegaard et al., 2007). En plus de son activité au sein des macrophages, PPAR γ est également capable d'inhiber la maturation des cellules dendritiques (Klotz et al., 2007), et l'activation, la survie et la différenciation des cellules T, ce qui aboutit à une réduction de la réponse immunitaire (Clark et al., 2000).

III. Pathologies associées à PPAR γ

Les thiazolidinédiones, ligands agonistes de PPAR γ , sont particulièrement connus pour leur rôle de sensibilisation à l'insuline, et ont été largement utilisés comme traitement contre le diabète de type II. L'activation de PPAR γ par les thiazolidinédiones entraîne une sensibilisation globale à l'insuline, à travers une augmentation du stockage des acides gras au niveau des adipocytes, une meilleure absorption du glucose par le muscle squelettique et des macrophages, une réduction de la gluconéogenèse dans le foie, et une augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques (Soccio et al., 2014).

Cependant, ces composés entraînent de nombreux effets secondaires, ayant conduits à une rapide réduction de leur utilisation. PPAR γ étant un acteur de l'adipogenèse, les thiazolidinédiones entraînent une prise de poids modéré, par une augmentation du stockage des acides gras, mais aussi une rétention d'eau (Guan et al., 2005). Les effets secondaires

incluent également une augmentation des fractures osseuses causées par une augmentation des adipocytes situés dans la moelle osseuse (Colhoun et al., 2012), ainsi qu'une probable augmentation des risques de cancer de la vessie (Chiu et al., 2017).

La lipodystrophie est également associée à des altérations des fonctions adipogéniques de PPAR γ , notamment à travers des mutations inactivatrices. De nombreuses mutations hétérozygotes ont été identifiées dans des cas de lipodystrophies, avec des conséquences variées sur l'activité de la protéine. Des mutations du DBD sont capables d'inhiber la fixation de la protéine sur ses séquences cibles. Des mutations du LBD altèrent quant à elles l'hétérodimérisation ou la capacité à lier le ligand et à recruter les co-facteurs (Jeninga et al., 2009).

Si certaines mutations semblent causer la maladie à cause d'une haplo-insuffisance, d'autres présentent un effet dominant négatif qui aboutit à une inhibition de la forme sauvage de la protéine, par exemple la mutation P495L qui conserve la liaison aux co-répresseurs en présence du ligand et entre en compétition avec la forme sauvage par un recyclage moins important, et donc remplace progressivement la forme sauvage sur les promoteurs de ses gènes cibles (Li & Leff, 2007). Les mutants du DBD C142R, C159Y et C190W sont incapables de fixer les séquences cibles, mais conservent leur interaction avec les co-activateurs malgré leur quantité limitée, ce qui freine l'activation de la forme sauvage (Agostini et al., 2006).

A l'inverse des mutations inactivatrices décrites dans les cas de lipodystrophie, une mutation récurrente activatrice P113G a été identifiée dans des cas d'obésité. Cette mutation, située sur l'acide aminé voisin du site de phosphorylation de la sérine 112, conduit à une inhibition de la phosphorylation de la protéine, et donc une activité plus importante de celle-ci. Cette sur-activation entraîne une augmentation de l'adipogenèse, expliquant ainsi son rôle dans l'obésité des patients concernés (Ristow et al., 1998).

Enfin, PPAR γ est une cible potentielle pour le traitement de l'athérosclérose, de l'asthme et de l'hypertension (Ivanova et al., 2015; Spears et al., 2006), et également a été relié au développement de nombreux cancers, pouvant présenter aussi bien un rôle suppresseur de tumeurs que pro-tumorigénique, selon le type cellulaire concerné.

IV. PPAR γ et cancer

PPAR γ comme gène suppresseur de tumeurs

Dans les années qui ont suivi l'identification de PPAR γ et de son rôle dans la différenciation adipocytaire, des études ont mis en évidence la capacité de la troglitazone, une thiazolidinédione, à promouvoir la différenciation et à inhiber la croissance de lignées cellulaires issues de différents types de cancers, incluant les liposarcomes, et les cancers du sein, du côlon et de la prostate (Kubota et al., 1998; Mueller et al., 1998; Sarraf et al., 1998; Tontonoz et al., 1997).

Par la suite, des résultats similaires ont été mis en évidence pour d'autres ligands de PPAR γ , et ont permis de préciser les mécanismes impliqués. En plus de favoriser l'expression de marqueurs de différenciations, les agonistes de PPAR γ entraînent une régulation du cycle cellulaire par une induction d'inhibiteurs des *cyclin-dependent kinase* (CDK) P18, P21 ou P27, ou en inhibant l'expression des CDK elles-mêmes dans des modèles de cancer du pancréas, du foie, du sein et du poumon. Ces ligands entraînent également une induction de l'apoptose et une inhibition de l'angiogenèse, ce qui a conduit à décrire PPAR γ comme un gène suppresseur de tumeurs dans de nombreux cancers (Wang et al., 2006).

Ce rôle tumeur suppresseur a particulièrement été étudié dans le cancer du poumon, où une expression plus faible de PPAR γ a été associée à un mauvais pronostic (Terashita et al., 2002). En plus des effets des ligands de PPAR γ décrits précédemment (Li et al., 2012), des sur-expressions de PPAR γ dans des souris transgéniques ou l'utilisation de thiazolidinédiones chez l'humain ont montré un effet protecteur contre le développement des tumeurs du poumon (Bren-Mattison et al., 2007; Govindarajan et al., 2007). Cet effet est médié par une activation de PTEN, qui conduit à une diminution de la phosphorylation de Akt et à une inhibition de l'activité de NF- κ B et de l'expression de COX-2 (Li et al., 2012).

De nombreux modèles *in vivo* de cancers du côlon ont également soutenu le rôle tumeur suppresseur de PPAR γ dans ces cancers, montrant que non seulement les ligands de PPAR γ sont capables d'inhiber la croissance et le développement de la tumeur, mais que des délétions bialléliques et hémizygotiques de PPAR γ au niveau des cellules du côlon entraînent respectivement une augmentation de la croissance et de l'incidence des tumeurs (Sabatino et al., 2012).

Un rôle controversé

Cependant, des études ont par la suite nuancé le rôle tumeur suppresseur de PPAR γ , en mettant en avant des effets de ses ligands, en particulier des thiazolidinédiones, indépendants de l'activité de PPAR γ lui-même (Chaffer et al., 2006). Des essais cliniques ont également été

menés afin d'évaluer les possibilités d'utilisation des thiazolidinédiones dans le traitement des cancers, mais ont mené à des résultats modestes, voire parfois inexistants (Hatton & Yee, 2008).

De plus, les tentatives d'extrapolation des résultats à des modèles *in vivo* ont amené des résultats pouvant parfois contredire cet effet tumeur supprimeur, en particulier dans le cas du cancer du côlon (Lefebvre et al., 1998; Saez et al., 1998), mettant en avant un possible effet contexte-spécifique dans le rôle de PPAR γ , capable d'inhiber la croissance des tumeurs peu et moyennement différenciées, mais non celle des tumeurs très différenciées (Sato et al., 2000). Des mutations perte de fonction de PPAR γ ont également été décrites dans les tumeurs du côlon (Sarraf et al., 1999), cependant, des études ultérieures n'ont pas confirmé les résultats obtenus par cette première étude, renforçant la controverse autour du rôle de PPAR γ dans les tumeurs du côlon (Ikezoe et al., 2001).

Des fusions de *PPARG* avec *PAX8* ont été identifiées dans plus de 30% des carcinomes thyroïdiens folliculaires (Kroll et al., 2000). La protéine de fusion, composée des DBD appartenant à chacune des protéines, entraîne une régulation des gènes cibles et un profil de fixation sur l'ADN spécifique, comprenant aussi bien des gènes cibles de PPAR γ que de PAX8 (Zhang et al., 2016). Cette protéine de fusion agit comme un oncogène, mais les mécanismes impliqués sont encore flous, pouvant soit provenir d'un effet dominant négatif de la protéine de fusion sur la voie régulée par la forme sauvage de PPAR γ , soit de l'activation uniquement d'un sous-ensemble particulier de gènes cibles de PPAR γ et PAX8 qui favorise la tumeur.

PPAR γ comme gène protumorigénique

Malgré le rôle supprimeur de tumeurs couramment admis, un rôle opposé, protumorigénique, a également été mis en évidence dans certains cancers, alimentant ainsi la controverse.

Des modèles *in vivo* de souris APCMin/+ ont montré dans deux études un effet protumorigénique des ligands de PPAR γ (Lefebvre et al., 1998; Saez et al., 1998), même si des résultats inverses ont également été obtenus pour le même modèle (Niho et al., 2003).

Le cancer du foie a également vu l'émergence de résultats opposés. Si les agonistes de PPAR γ sont bien capable d'inhiber la prolifération et l'invasion des cellules des hépatocarcinomes en régulant le cycle cellulaire, les antagonistes entraînent, eux, une augmentation de la mort cellulaire, qui semble contradictoire avec les effets précédemment décrits (Kim et al., 2007; Schaefer et al., 2005).

Dans le cas du cancer du sein, une étude a montré que les tumeurs sur-exprimant HER2 sont associées à une sur-expression de PPAR γ , et que cette sur-expression permet d'éviter une accumulation toxique des métabolites au travers de la lipogenèse (Menendez, 2010).

Cette possible implication de ce rôle pro-tumorigénique dans la régulation du métabolisme des cellules cancéreuses a été également suggérée par un modèle de fibroblastes

embryonnaires de poulet transformés par l'oncogène Ski. Ces cellules présentent une expression plus forte de PPAR γ , et cette sur-expression est associée à un métabolisme inhabituel chez les cellules tumorales, orientée non vers le métabolisme du glucose mais vers la β -oxydation des acides gras. Ceci suggère un rôle de PPAR γ dans le métabolisme de ces cellules tumorales, et donc dans le maintien de leur survie et de leurs capacités prolifératives à travers un métabolisme lipidique (Ye et al., 2011).

Le rôle de PPAR γ dans le développement et la progression tumorale est donc un sujet complexe, qui reste encore à préciser afin de mieux comprendre ces effets qui semblent contradictoires, et ceci est également valable pour les tumeurs de la vessie.

LES CANCERS DE LA VESSIE

I. Cancers de la vessie : origine et développement

Le cancer de la vessie est le dixième cancer le plus fréquent dans le monde, avec 549 000 nouveaux cas et 200 000 décès estimés en 2018. Son incidence est plus importante dans les pays industrialisés, et en particulier l'Europe du Sud et de l'Ouest, ainsi que l'Amérique du Nord (Bray et al., 2018). En France, le cancer de la vessie est le cinquième cancer le plus fréquent, avec plus de 10 000 nouveaux cas et 5 000 décès par an (Binder-Foucard et al., 2013). Ces cancers sont quatre fois plus fréquents chez les hommes que chez les femmes, occupant la sixième place en terme de fréquence chez l'homme dans le monde, avec un âge médian entre 65 et 70 ans au diagnostic (Bray et al., 2018).

Parmi les tumeurs de vessie, 90% sont des carcinomes touchant l'épithélium vésical, l'urothélium. Ces tumeurs peuvent être séparées en deux grandes catégories : les tumeurs n'envahissant pas le muscle (NMIBC) et les tumeurs qui, au contraire, envahissent le muscle sous-jacent (MIBC). Les NMIBC représentent environ 70% des tumeurs de vessie au diagnostic initial. Elles sont limitées à l'urothélium lui-même dans le cas des carcinomes in situ (CIS) et des tumeurs papillaires (Ta), ou à une invasion du chorion (T1). Les MIBC, qui envahissent le muscle (T2), le tissu péri-vésical (T3) ou les organes avoisinants (T4) sont moins fréquentes, mais sont plus agressives et présentent un mauvais pronostic, avec un taux de survie à 5 ans de 25% pour les T4 (Sengupta et al., 2004; Sobin et al., 2009).

Les facteurs de risques associées aux tumeurs de vessie

Le premier facteur de risque au développement des tumeurs de vessie est le tabagisme, qui serait responsable de 50% des tumeurs de vessie. La différence d'incidence des cancers de vessie entre les hommes et les femmes est couramment imputée à la différence de consommation de cigarettes qui a pu exister entre les hommes et les femmes, elle n'explique cependant pas à elle seule ce phénomène, puisque cette différence d'incidence est également retrouvée chez les patients non-fumeurs (Freedman et al., 2011).

Le deuxième facteur de risque est l'exposition professionnelle à certains carcinogènes, tels que les amines aromatiques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou les nitrosamines, impliqués dans environ 20% des tumeurs de vessie. L'alimentation influence les tumeurs de vessies : une plus grande consommation d'eau entraîne une diminution du risque de ces cancers, cependant, la pollution de l'eau, notamment par l'arsenic ou le chlore, augmente ce risque. Certains facteurs de risque sont également liés à l'état de santé du patient : les infections urinaires récurrentes ou chroniques font également partie des facteurs augmentant

le risque de cancers de vessie, ainsi que la schistosomiase. De même, certains traitements sont associés à une plus forte incidence des cancers de vessie, tels que la radiothérapie, l'utilisation de cyclophosphamide pour le traitement des lymphomes et leucémies, ainsi que la pioglitazone, même si ce dernier point reste sujet à controverse en raison de résultats contradictoires (Burger et al., 2013).

En plus des facteurs environnementaux, des facteurs génétiques entraînent une prédisposition aux tumeurs de vessie, en particulier des altérations du métabolisme des xénobiotiques (Harries et al., 1997; Kadlubar et al., 1995).

Les deux voies de l'oncogenèse urothéliale

Les tumeurs de vessie forment un groupe particulièrement hétérogène, avec des pronostics et des caractéristiques morphologiques et biologiques différents. Le modèle d'oncogenèse urothéliale couramment admis sépare celle-ci en deux voies distinctes (FIGURE 4, PAGE 24), et proposant ainsi une séparation des NMIBC en deux grands groupes possédant chacun ses caractéristiques, pronostics et altérations propres (Wu, 2005).

La première voie est la plus fréquente : elle concerne 80% des tumeurs. Ces tumeurs sont généralement de bas grade, et caractérisées par une morphologie papillaire. Le pronostic est plutôt encourageant, car ces tumeurs sont peu agressives et évoluent dans seulement 15% des cas vers des tumeurs infiltrant le muscle. Cependant, leur fort taux de récurrence (environ 70%) nécessite une surveillance rapprochée des patients.

Cette voie de l'oncogenèse urothéliale présente des altérations génomiques qui lui sont propres, à commencer par les altérations de *HRAS*. Cet oncogène est le premier à avoir été identifié dans les tumeurs de vessie (Reddy et al., 1982) et peut être sur-activé par le biais de mutations ou de sur-expression de la protéine. Des mutations activatrices de *NRAS* et *KRAS* ont également été détectées dans les tumeurs de vessie, aboutissant à une sur-activation globale de la voie RTK–RAS.

Les tumeurs papillaires présentent également des altérations de la voie RTK-RAS plus en amont : 70% des tumeurs papillaires présentent des mutations de *FGFR3* qui entraînent une activation constitutive de la protéine, et donc de la voie RTK-RAS en aval (Billerey et al., 2001; Cappellen et al., 1999; van Rhijn et al., 2002). Ces mutations de *FGFR3* avaient été précédemment décrites au niveau germlinal chez des patients atteints de malformations squelettiques, où elles causent une diminution de la croissance cellulaire. Elles présentent en revanche un rôle opposé dans les tumeurs de la vessie puisque cette sur-activation est essentielle pour la tumeur, et son inhibition entraîne une forte altération de la croissance tumorale (Lamont et al., 2011). Plus récemment des fusions de *FGFR3* ont également été identifiées, conduisant également à une activation constitutive de la protéine (TCGA, 2014; Williams et al., 2013).

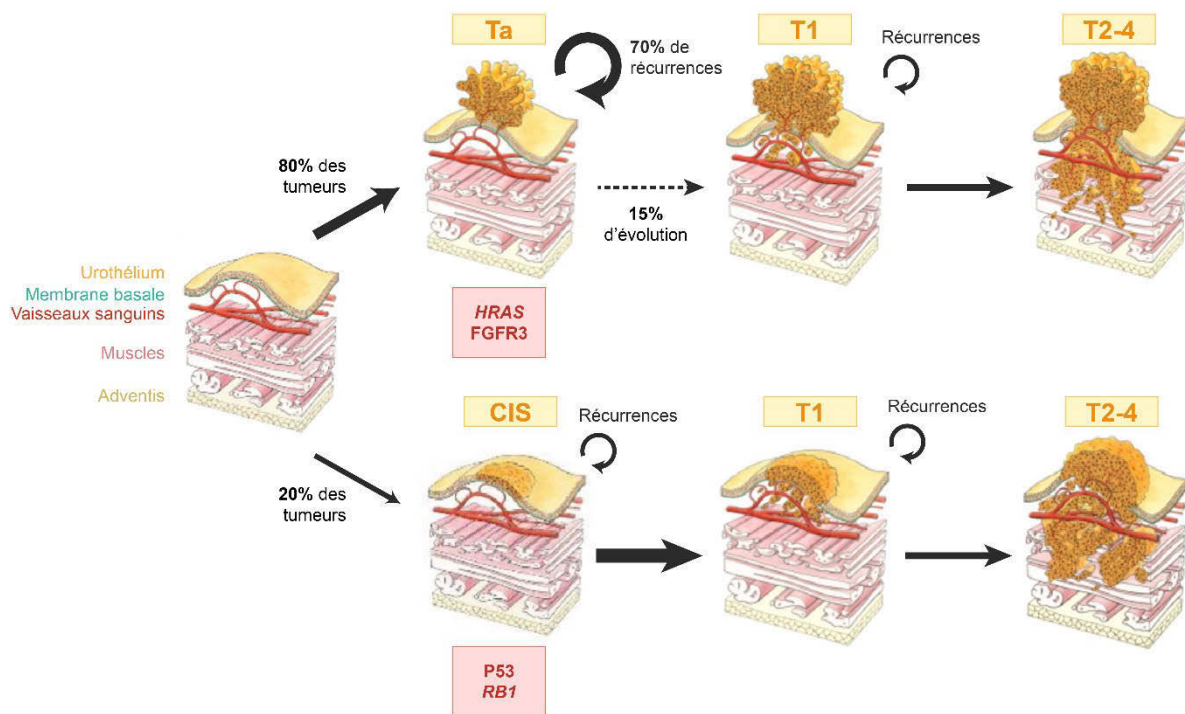


Figure 4 : Les deux voies de progressions de la tumorigenèse urothéliale

Description des caractéristiques des deux voies de la progression tumorale urothéliale décrites par Wu (Wu 2005) : la voie des tumeurs papillaires (haut) et la voie des carcinomes *in situ* (bas), et des altérations génétiques associées à chacune d'elle.

Les 20% de tumeurs de vessie restantes sont généralement diagnostiquées au stade invasif, sans aucun historique de cancer de vessie chez le patient. Ces tumeurs sont particulièrement agressives : 50% des patients atteints de tumeurs infiltrant le muscle décèdent dans les 5 ans suivant le diagnostic. Elles dérivent d'un carcinome *in situ* (CIS), une lésion cancéreuse plane de haut grade. Contrairement aux tumeurs papillaires, les CIS sont des tumeurs à haut risque d'évolution, associé à un mauvais pronostic.

Tout comme les tumeurs papillaires, la voie des CIS présente des enrichissements pour certaines altérations. La voie p53 est souvent touchée dans les tumeurs de vessie, et en particulier dans les CIS et tumeurs infiltrant le muscle de haut grade. Les mutations et pertes d'hétérozygoties entraînent une inactivation totale de la voie p53, aboutissant à une perte de sa régulation essentielle du cycle cellulaire et de l'apoptose (He et al., 2009).

Les tumeurs invasives sont également enrichies en altération de *RB1*. Les mutations germinales de cette protéine, initialement décrites comme facteur de risque dans le rétinoblastome chez l'enfant, entraînent chez l'adulte une augmentation du risque de tumeurs de vessie (Fletcher et al., 2004). Les altérations somatiques et pertes d'hétérozygoties de *RB1* empêche la protéine de séquestrer E2F dans le cytoplasme, permettant ainsi à cette famille de protéine d'exercer leur rôle de promotion de la prolifération cellulaire.

II. Classifications moléculaires des tumeurs de vessie

Les tumeurs de vessie, et en particulier les tumeurs infiltrant le muscle, font partie des tumeurs présentant la plus grande hétérogénéité mutationnelle et le plus haut taux de mutations somatiques (Glaser et al., 2017), ce qui a longtemps été un frein à l'établissement d'une classification basée sur les altérations génétiques. Ces dernières années, de nombreuses équipes ont tenté de définir une classification moléculaire des tumeurs de vessie, en se basant sur le transcriptome de larges panels de tumeurs.

La première génération de classification des tumeurs de vessie

Le groupe de Lund ont été les premiers à proposer une classification moléculaire, séparant les tumeurs de vessie en 5 sous-types distincts (Sjödahl et al., 2012, 2013, 2017) : le sous-groupe Urobasal A qui présente une charge mutationnelle réduite, une forte expression de la voie FGFR3 et des marqueurs de la différenciation urothéliale luminale (FIGURE 5, PAGE 26), le sous-groupe Genomically Unstable, présentant une charge mutationnelle importante, le sous-groupe Infiltrated caractérisé par une forte infiltration de la tumeur par des cellules non tumorales, le groupe SCC-like, renommé Basal par la suite en raison de ses points communs avec le sous-groupe basal du cancer du sein, qui exprime des kératines des cellules basales de l'urothélium telles que la kératine 5 ainsi qu'une forte expression des gènes de la voie de l'EGFR, et un sous-groupe Urobasal B, partageant des caractéristiques avec les sous-groupes Urobasal A et Basal (FIGURE 6.A, PAGE 27).

En 2014, quatre groupes différents dont notre équipe ont publié des classifications des tumeurs de vessie (Choi et al., 2014; Damrauer et al., 2014; Rebouissou et al., 2014; TCGA, 2014). Le TCGA (TCGA, 2014) propose une classification en quatre sous-groupes (FIGURE 6.B, PAGE 27) : les deux premiers clusters expriment les marqueurs des cellules luminales de l'urothélium, mais se distinguent l'un de l'autre par un enrichissement du Cluster I en tumeurs papillaires et mutations de FGFR3. Le cluster III exprime les marqueurs des cellules basales de l'urothélium ainsi que l'EGFR et présente un mauvais pronostic. Il correspond au sous-type Basal de la classification de Lund.

Le M.D. Anderson Cancer Center (Choi et al., 2014) a proposé une séparation en trois groupes (FIGURE 6.C, PAGE 27) : un groupe luminal et un groupe basal, reprenant respectivement les caractéristiques des Cluster I et II et du Cluster III du TCGA, et un troisième groupe appelé p53-like, caractérisé par l'expression d'une signature p53 sauvage. Cette classification fait également écho à celle publiée par Damrauer (Damrauer et al., 2014) qui sépare les tumeurs en deux groupes, un groupe basal et un groupe luminal (FIGURE 6.D, PAGE 27).

Enfin, la même année, notre équipe a également mis en évidence le sous-groupe basal présentant les mêmes caractéristiques que les sous-groupes basaux des classifications précédemment décrites. Notre équipe a également montré, dans des modèles précliniques, que ce sous-groupe basal est dirigé par la sur-activation de la voie de l'EGFR, notamment par des amplifications de ce gène, et que cette voie est essentielle pour la croissance de la tumeur (Rebouissou et al., 2014).

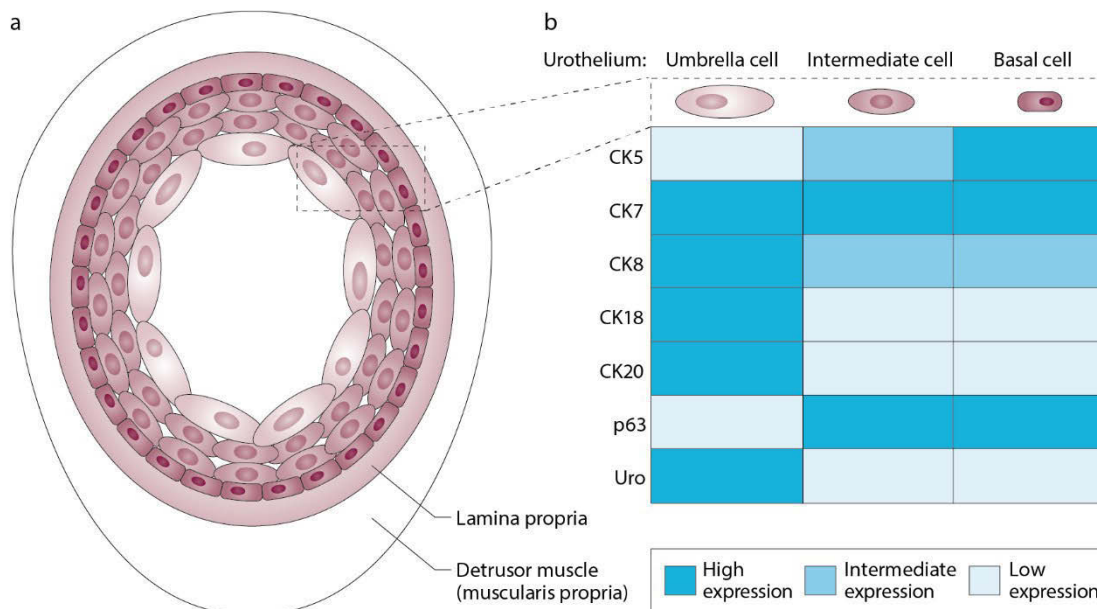


Figure 5 : Les différents types de cellules urothéliales et leurs marqueurs

A. Anatomie de la vessie et des différents types cellulaires urothéliaux. **B.** Récapitulatif de l'expression des cytokératines, uroplakines et P63 dans les différents types cellulaires de l'urothélium (Kobayashi et al., 2015).

Si ces classifications présentent des différences, en particulier l'existence de certains sous-groupes non mis en évidence par les autres groupes, elles coïncident toutes sur deux groupes : le groupe luminal et le groupe basal. Le premier exprime les uroplakines et la kératine 20, marqueurs de la différenciation urothéliale, qui sont des cibles de PPAR γ , et Choi et al. ont notamment montré que la voie PPAR γ est sur-activée dans ces tumeurs. Ce sous-groupe comprend également les tumeurs présentant des altérations de la voie FGFR3, et donc probablement une grande majorité des tumeurs issues de la voie d'oncogénèse passant par la formation de tumeurs papillaires de bas grade. Le second groupe comprend les tumeurs exprimant des marqueurs des cellules basales de l'urothélium, mais pas les marqueurs de la différenciation luminale ce qui est lié avec une globale inactivation de la voie PPAR γ . Ce sont des tumeurs très agressives et de mauvais pronostic, caractérisés notamment par des altérations de la voie de l'EGFR.

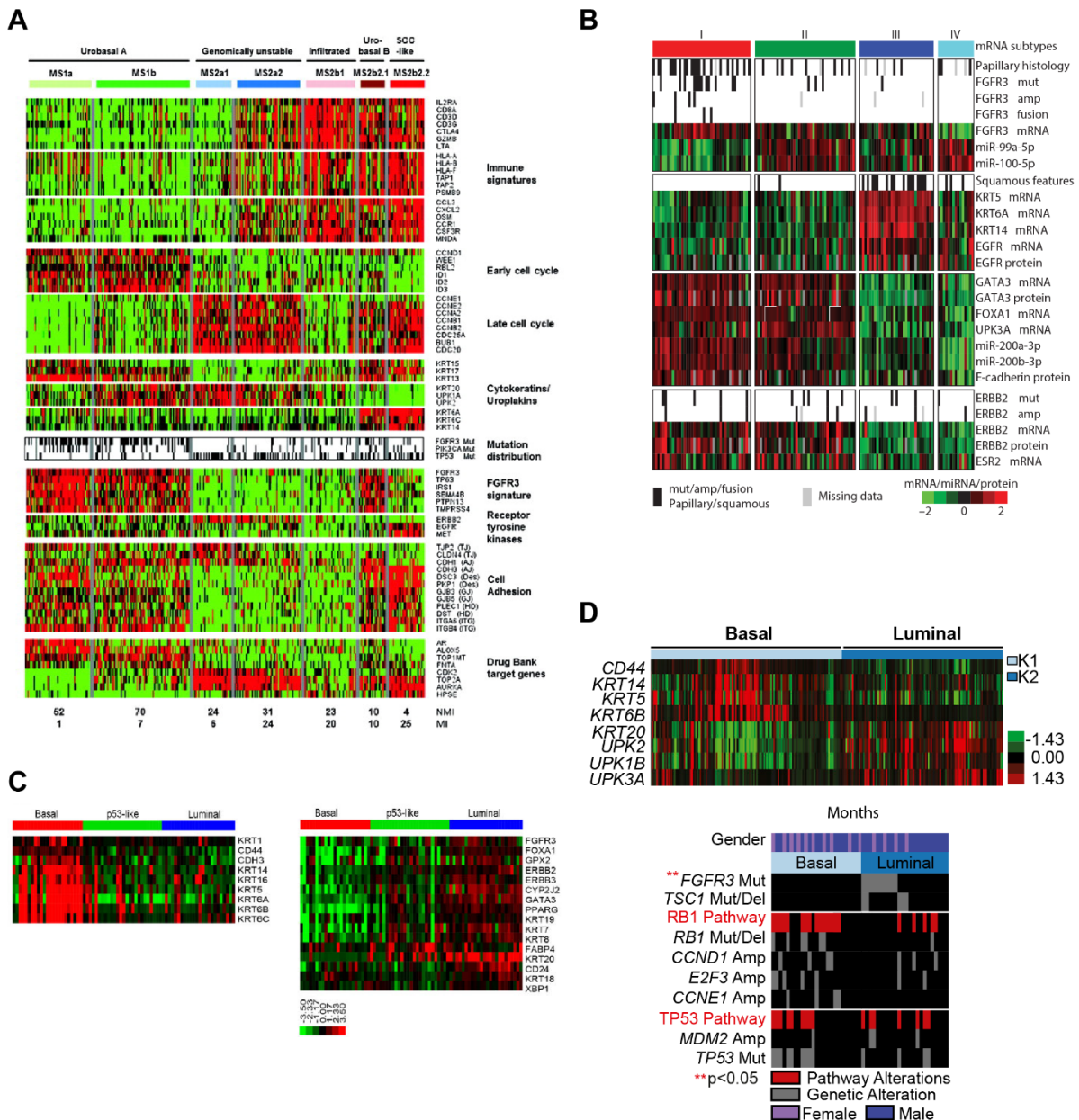


Figure 6 : Illustration de classifications moléculaires des tumeurs de vessie
A. Classification de Lund (Sjödahl et al., 2012). **B.** Classification du TCGA 2014 (TCGA, 2014).
C. Classification du M.D. Anderson Cancer Center (Choi et al., 2014). **D.** Classification de Damrauer (Damrauer et al., 2014).

Vers une classification consensus

Suite à ces premiers efforts de classification, le TCGA a publié en 2017 une nouvelle classification basée sur une cohorte plus importante, constituée de plus de 400 tumeurs (TCGA, 2017), séparant ces tumeurs en cinq sous-groupes (FIGURE 7, PAGE 28).

Les tumeurs lumineuses sont ici séparées en trois sous-groupes. Le premier sous-groupe, appelé Luminal-Papillary, comprend principalement les tumeurs papillaires et est enrichi en tumeurs altérées pour FGFR3. Ce groupe correspond globalement au Cluster I de la classification du TCGA 2014. Une grande partie des tumeurs du Cluster II sont classées dans le second groupe,

désigné comme Luminal-Infiltrated. Ces tumeurs reprennent les caractéristiques du groupe Infiltrated de la classification Lund de 2013, et présentent donc une forte infiltration par des tumeurs non cancéreuses, en particulier du muscle lisse. Le troisième groupe, appelé simplement Luminal, regroupe les tumeurs présentant une forte expression des marqueurs de la différenciation urothéliale, mais n'appartenant pas aux tumeurs papillaires ou infiltrées.



Le sous-groupe Basal-Squamous comprend les tumeurs du Cluster III, ainsi que quelques tumeurs des Cluster II et IV. Il reprend les principes des groupes basaux présentés précédemment, avec une forte agressivité et un mauvais pronostic, ainsi qu'une forte infiltration immunitaire. En plus de ces sous-groupes, qui correspondent au dogme des sous-groupes luminaux et basaux, se dessine un cinquième groupe qui comprend des tumeurs ne

présentant pas de caractéristique morphologique particulière, mais qui expriment certains marqueurs retrouvés dans la différenciation neuronale, ce qui a donné son nom à ce dernier groupe.

La naissance de ces classifications a permis à beaucoup d'équipes de prendre en compte le profil moléculaire des tumeurs dans leurs stratégies expérimentales. Cependant, l'existence de nombreuses classifications rend le recouplement de ces résultats plus difficiles. Il est donc apparu comme essentiel de convenir d'une classification consensus en rassemblant les différentes équipes travaillant sur les classifications de tumeurs de vessie au sein d'un consortium (Kamoun et al., 2018). La classification consensus issue de ce consortium sépare les tumeurs en 6 sous-groupes (FIGURE 8, PAGE 29).

	Luminal Papillary	Luminal Non-Specified	Luminal Unstable	Stroma -rich	Basal/Squamous	Neuroendocrine like
						
Differentiation	Urothelial / Luminal				Basal	Neuroendocrine
Oncogenic mechanisms	FGFR3 ++ CDKN2A -	PPAR -γ ++	PPAR -γ ++ E2F3 +, ERBB2 + Genomic instability		EGFR +	TP53 --, RB1 --, Cell cycle +
Mutations	FGFR3 (40%), KDM6A (38%), STAG2 (22%)	ELF3 (35%)	TP53 (76%), ERCC2 (22%) TMB +, APOBEC +		TP53 (61%), RB1 (25%)	TP53 (94%) RB1 (39%)
Stromal infiltrate		Fibroblasts		Smooth muscle Fibroblasts Myofibroblasts	Fibroblasts Myofibroblasts	
Immune infiltrate				B cells	CD8 T cells NK cells	
Histology	Papillary morphology	Micropapillary variants			Squamous differentiation	Neuroendocrine differentiation
Clinical	T2 stage +	Older patients + (80+)			Women + T3/T4 stage +	
Median overall survival (years)	4	1.8	2.9	3.8	1.2	1

Figure 8 : Classification Consensus

Tableau récapitulatif des caractéristiques des 6 sous-groupes de la classification consensus

Le groupe Luminal-Papillary (LumP) est encore une fois représenté ici, présentant les mêmes caractéristiques que pour les classifications précédentes. Le groupe Luminal Unstable (LumU) fait référence au sous-groupe Genomic Unstable de la classification de Lund. Il est enrichi en tumeurs altérées pour TP53, ERCC2 ou ERBB2, et présentent une charge mutationnelle plus importante. Le troisième groupe de tumeurs lumbales a été nommé Luminal Non-specified (LumNS), contient un nombre réduit de tumeurs. Ces tumeurs sont les seules tumeurs

luminales à exprimer des signatures stromales et immunitaires et ont un plus mauvais pronostic que les autres classes de tumeurs lumineuses.

Le sous-groupe Stroma-rich comprend des tumeurs présentant une forte infiltration par les cellules non tumorales, sans distinction d'expression d'une signature de différenciation luminale. Le quatrième sous-groupe est le sous-groupe Basal/Squamous (Ba/Sq), qui reprend une fois encore les caractéristiques des groupes basaux décrits précédemment. Enfin, le dernier groupe, qui concentre les tumeurs présentant une différenciation neuro-endocrine, est le groupe Neuroendocrine-Like (NE-like).

Ces classifications ont permis non seulement de clarifier les différents types de tumeurs de vessies, mais également de mettre en évidence des gènes et voies de signalisation altérées dans certains sous-groupes. Ceci a donné lieu à de nombreux espoirs concernant la prise en charge des patients, et donc le développement de thérapies davantage ciblées selon le type de tumeur concernée.

III. Le développement des thérapies ciblées

Prise en charge actuelle des tumeurs de vessie

La prise en charge des patients atteints de tumeurs de vessie dépend principalement du stade de la tumeur. En cas de NMIBC, le traitement de base consiste en une résection locale de la tumeur. Dans le cas d'une tumeur présentant un faible risque de récurrence et de progression, une chimiothérapie post-opératoire intra-vésicale à base de mitomycine C est réalisée dans les 24h suivant l'opération (Rouprêt et al., 2016).

Dans le cas d'une tumeur de type NMIBC présentant un risque plus important, l'opération peut être suivie d'une BCG-thérapie. Cette thérapie consiste en une injection intravésicale d'une mycobactérie, qui diminue le risque de récurrence et de progression par deux mécanismes : elle permet non seulement de stimuler la réponse immunitaire en entraînant notamment la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes T helper, mais est également endocytée par les cellules cancéreuses, où elle a un effet cytotoxique en entraînant la production de monoxyde d'azote (Alexandroff et al., 2010). Si la tumeur présente un risque trop important, elle peut être traitée par une ablation de la vessie.

La cystectomie est également préconisée dans le cas d'une MIBC localisée. Une chimiothérapie néo-adjuvante est recommandée, afin de limiter le risque de dissémination des cellules tumorales. Si des métastases sont présentes, la seule arme disponible est la chimiothérapie (Rouprêt et al., 2016).

Malgré les précautions prises par l'utilisation de la chimiothérapie et de la BCG-thérapie intravésicale contre les NMIBC, les récurrences n'en restent pas moins fréquentes. Ceci impose donc une surveillance méticuleuse des patients sur le long terme, ce qui entraîne des coûts élevés. Le coût de prise en charge des patients atteints de cancers de vessie est estimé à environ 4,9 milliards d'euros, faisant de ce cancer l'un des plus coûteux à traiter (Leal et al., 2016).

Si ces traitements ont montré leur efficacité dans le cas des tumeurs localisées, le traitement des tumeurs métastatiques est non seulement lourd, mais également peu efficace. Or, ces traitements ne prennent pas en compte les dernières avancées dans la recherche sur les tumeurs de vessie, telles que les classifications moléculaires ou les gènes et voies de signalisations fréquemment altérés. Cependant, ces dernières années, des cibles thérapeutiques ont émergé, conduisant au développement de nouvelles options thérapeutiques, incluant notamment le développement de l'immunothérapie, ainsi que différentes thérapies ciblées.

Vers une médecine personnalisée

L'immunothérapie est utilisée depuis longtemps dans le traitement des tumeurs de vessie par la BCG-thérapie, qui a fait ses preuves. Cependant, certaines tumeurs présentent une résistance à cette thérapie. Ces tumeurs sont notamment caractérisées par une forte expression des gènes du checkpoint immunitaire, ce qui entraîne une inhibition l'activation des lymphocytes par les antigènes tumoraux, et donc de la réponse immunitaire. Le développement d'une approche différente pourrait bénéficier à ces patients, ainsi qu'aux patients atteints de MIBC.

Des essais cliniques ont été menés en utilisant des inhibiteurs du checkpoint immunitaire, des anticorps anti-PD-L1, sur les MIBC, en particulier dans le cas de patients non éligibles à la chimiothérapie à base de cisplatine ou dans le cas de résistance à la chimiothérapie. Ces études ont montré un réel intérêt dans le traitement de ces patients, permettant ainsi d'élargir le panel pour le moment réduit de traitements envisageable pour les patients atteints de tumeurs de la vessie infiltrant le muscle (Balar et al., 2017; Powles et al., 2018b, 2018a). Cependant, tous les patients ne répondent pas de manière égale au traitement. Les patients présentant des tumeurs luminales appartenant au Cluster I du TCGA (TCGA 2014) présentent le plus faible taux de réponse complète, ceci pouvant s'expliquer par le faible taux d'infiltration immunitaire au sein de la tumeur (en particulier les cellules T CD8+), et la faible expression de PD-L1 (Powles et al., 2018b).

INTRODUCTION

Le taux d'altérations de FGFR3 est particulièrement haut dans les tumeurs luminaires papillaires de la vessie et les résultats obtenus *in vitro* suggèrent un réel intérêt dans l'utilisation des inhibiteurs des FGFR pour traiter ces tumeurs (Lamont et al., 2011). Si les premiers essais cliniques ont été peu concluants, l'utilisation d'inhibiteurs plus puissants tels que le BGJ398 a montré un effet bien plus prometteur (Hahn et al., 2017; Pal et al., 2018).

Les sur-activations de la voie de l'EGFR dans les tumeurs basales de la vessie forment une autre catégorie de cibles thérapeutiques (Rebouissou et al., 2014). Les essais précliniques utilisant des inhibiteurs d'EGFR ont montré des résultats encourageants, mais les bénéfices concernent principalement les tumeurs basales ayant une sur-activation de cette voie, ce qui souligne la nécessité d'une sélection préalable des patients pouvant bénéficier de ce traitement (Petrylak et al., 2010; Pruthi et al., 2010; Stephenson et al., 2009; Wong et al., 2012). Les mutations de ERBB2 et ERBB3 sont une troisième catégorie de cibles prometteuses, les inhibiteurs pan-ERBB ayant également montré leur potentiel dans un essai clinique (Choudhury et al., 2016).

ROLE DE PPAR γ DANS LES CANCERS DE LA VESSIE

I. Les prémices : PPAR γ comme potentiel suppresseur de tumeurs

Les premières explorations du rôle de PPAR γ dans la tumorigenèse vésicale ont été réalisées sur la lignée cellulaire T24, qui est une lignée de carcinome de vessie non-luminale avec une faible expression de PPAR γ (Earl et al., 2015). Ces études ont montré que le traitement de ces lignées avec des ligands de PPAR γ entraîne une diminution de la viabilité cellulaire, et que l'activation de l'hétérodimère par les ligands de PPAR γ et RXR α a un effet synergique sur cette diminution de la viabilité (Guan et al., 1999; Yoshimura et al., 2003). L'activation de PPAR γ présente également un intérêt dans un potentiel traitement anti-EGFR, dont il potentialise les effets sur la viabilité cellulaire (Mansure et al., 2013).

PPAR γ a également été impliqué dans la réponse à la BCG-thérapie : dans des modèles précliniques, il est sur-exprimé suite au traitement, et son activation par un ligand entraîne une efficacité plus importante du traitement sur les cellules cancéreuses, effet qui est contré par l'inhibition de PPAR γ par un antagoniste (Lodillinsky et al., 2006).

Très récemment, une étude a montré qu'à l'inverse des antagonistes de PPAR γ , ses agonistes sont capable d'inhiber la croissance tumorale par un arrêt du cycle cellulaire et une augmentation de l'apoptose par une inhibition de la voie PI3K-Akt (Lv et al., 2019).

Cependant, la mise en évidence des effets PPAR γ -indépendant des thiazolidinédiones a mis à mal l'hypothèse de ce potentiel rôle suppresseur de tumeur de PPAR γ , de même que les résultats décevants des essais cliniques menés pour évaluer l'intérêt de ses ligands dans le traitement ou la prévention des cancers. En revanche, au cours des dernières années, de plus en plus d'évidences ont soutenu un rôle opposé, protumorigénique, de PPAR γ dans les tumeurs de vessie.

II. Rôle protumorigénique de PPAR γ dans les tumeurs luminales de vessie

L'un des premiers indices du rôle protumorigénique de PPAR γ a été la suspicion d'une augmentation des risques de cancer de vessie chez les patients diabétiques traités par la pioglitazone (Lewis et al., 2011). Ce point reste largement controversé : de nombreuses études ont été menées sur ce sujet, aboutissant à de résultats variés. Cependant, des méta-analyses ont montré qu'il y a bien une augmentation du risque de cancer de vessie chez les patients ayant été exposés à long terme au traitement (Chiu et al., 2017). De plus, Lubet et al. ont montré que la rosiglitazone est capable de promouvoir la carcinogénèse induite par OH-BBN chez le rat, appuyant ainsi cette hypothèse malgré un potentiel effet indépendant de PPAR γ (Lubet et al., 2008).

Amplifications de PPAR γ mise en évidence de son rôle protumorigénique

Par la suite, des études menées afin de mieux comprendre le rôle de PPAR γ dans ces tumeurs ont mis en évidence des amplifications de ce gène dans 20% des tumeurs de vessie (Conconi et al., 2012; TCGA, 2014; Yang et al., 2013). Yang et al. ont notamment montré le rôle des amplifications et des sur-expression de ce gène de dans la progression des tumeurs, en soulignant l'enrichissement de ces amplifications dans les tumeurs invasives et de haut grade ainsi que l'importance de l'activation de la voie PPAR γ dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de vessie.

La caractérisation moléculaire des MIBC et les efforts fournis pour déterminer une classification moléculaire de ces tumeurs a été essentielle à la compréhension du rôle de PPAR γ dans les tumeurs de vessie ainsi qu'à expliquer quinze ans de résultats contradictoires. En 2014, l'équipe du TCGA ainsi que notre équipe ont relié les gains et amplifications de PPAR γ au groupe luminal (Biton et al., 2014; TCGA, 2014), qui est caractérisé par l'expression de marqueurs de la différenciation urothéliale, contrôlée par PPAR γ (Choi et al., 2014).

Notre équipe a notamment montré que cette activation de PPAR γ est corrélée avec une forte expression des marqueurs de la différenciation urothéliale, mais que cette différenciation moléculaire n'implique pas forcément une différenciation morphologique, les tumeurs présentant la plus forte expression de PPAR γ et de ses gènes cibles étant des tumeurs de haut grade.

De plus, cette étude a mis en évidence le rôle de PPAR γ dans la croissance tumorale : l'inhibition de son expression par ARN interférence entraîne une forte diminution de la viabilité des lignées cellulaires de tumeur luminale de vessie, qui est corrélée au niveau

d'expression de PPAR γ dans la cellule, montrant ainsi un rôle protumorigénique de PPAR γ dans les tumeurs appartenant au sous-groupe luminal (Biton et al., 2014). Une étude plus récente a montré qu'une exposition prolongée des lignées cellulaires de tumeurs lumbinales aux agonistes inverses de PPAR γ entraîne également une diminution de la viabilité cellulaire, soutenant le rôle protumorigénique de PPAR γ au sein de ces tumeurs (Goldstein et al., 2017).

Mutations activatrices récurrentes de RXR α

La mise en évidence de ce rôle protumorigénique de PPAR γ et des amplifications associées a rapidement soulevé la question de l'importance de son partenaire d'hétérodimérisation, RXR α . En 2017, trois études publiées consécutivement ont partiellement levé le voile sur cette interrogation, en caractérisant les mutations récurrentes activatrices de RXR α (Goldstein et al., 2017; Halstead et al., 2017; Korpál et al., 2017) précédemment identifiées dans 5 à 8% des tumeurs de vessie (TCGA, 2014). Ces mutations S427F/Y touchent un hotspot particulier, qui se trouve à l'interface de dimérisation entre PPAR γ et RXR α , et entraînent une stabilisation de l'interaction des deux protéines ainsi qu'une stabilisation de la conformation agoniste, ce qui aboutit à une augmentation de la transcription des gènes cibles de l'hétérodimère.

Remodelage du micro-environnement tumoral

Dans une de ces études, Korpál et al. ont montré un intérêt essentiel de la sur-activation de la voie PPAR γ par l'intermédiaire des mutations de RXR α et des amplifications de PPAR γ dans le remodelage du micro-environnement tumoral. L'hétérodimère régule des gènes liés à l'inflammation, et son activation entraîne une réduction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de l'expression des cytokines anti-inflammatoires.

Ceci est en accord avec des résultats montrant que les tumeurs avec une expression forte de PPAR γ ou des mutations de RXR α présentent une infiltration immunitaire (en particulier les lymphocytes T CD8+) et une signature d'inflammation réduites, ce qui permet notamment à la tumeur une évvasion de l'immunosurveillance, et une résistance à l'immunothérapie. En effet, les tumeurs du cluster I du TCGA, qui présentent une forte signature d'activation de PPAR γ (TCGA, 2014) présentent des résistances aux traitements anti-PD-L1 (Rosenberg et al., 2016), dont les altérations de la voie PPAR γ seraient en partie responsables (Korpál et al., 2017).

Korpál et al. n'ont cependant pas trouvé d'effet significatif de l'inhibition de l'expression de PPAR γ sur la viabilité cellulaire, mais cette absence d'effet est certainement due à une inhibition incomplète de l'expression par les shRNA, ainsi qu'à un choix inadapté de lignée cellulaire. En effet, si les lignées 5637 et HT1197 portent respectivement une amplification et une mutation de RXR α , elles sont en général classées parmi les tumeurs basales, avec une

INTRODUCTION

faible expression des marqueurs de la différenciation urothéliale (Earl et al., 2015; Rebouissou et al., 2014). En revanche, ils ont montré une légère inhibition de la viabilité cellulaire après sur-expression de PPAR γ dans la lignée ScaBer ou de la forme mutée de RXR α dans la lignée T24, qui sont également des lignées cellulaires issues de tumeurs basales.

Cet exemple parmi tant d'autres montre qu'il est essentiel, afin de comprendre le rôle de PPAR γ dans les tumeurs de la vessie, de prendre en compte le type de tumeur concernée, et de différencier son rôle dans le sous-groupe luminal et dans le sous-groupe basal où il présente un comportement radicalement différent.

OBJECTIFS

Le rôle protumorigénique de PPAR γ dans les tumeurs luminales de la vessie est bien établi. Cependant, une grande part des mécanismes impliqués reste encore mal comprise. Des amplifications de *PPARG* et des mutations activatrices de RXR α ont été identifiées dans le sous-groupe luminal, mais ces altérations peuvent expliquer la sur-activation de la voie PPAR γ dans seulement une partie des tumeurs luminales. De plus, si les gènes cibles de PPAR γ dans les adipocytes ont été largement étudiés, les gènes qu'il régule dans l'urothélium vésical normal et tumoral sont très mal connus. Il semble donc essentiel de mieux comprendre le fonctionnement de cette voie dans les tumeurs luminales et donc le rôle de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α et les mécanismes qui sont impliqués dans ce rôle protumorigénique d'une part afin de mieux caractériser son rôle au sein de des tumeurs de vessie, et d'autre part afin de l'utiliser comme potentielle cible thérapeutique pour le traitement de ces tumeurs.

La première partie de mon projet a donc consisté à explorer les altérations de la voie PPAR γ dans le sous-groupe luminal. Notre équipe a identifié des mutations de *PPARG* dans les tumeurs de vessie, dont huit mutations récurrentes. Cette récurrence suggérerait un rôle activateur sur l'activité de la protéine, et donc une potentielle sur-activation de la voie sous-jacente. J'ai participé à la caractérisation de ces mutations récurrentes en collaboration avec les groupes de Natacha Rochel et de Roland Stote de l'IGBMC de Strasbourg, afin d'élucider leur impact sur l'activité de la protéine, et leur rôle potentiel dans le sous-groupe luminal. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Nature Communications*, où je suis co-deuxième auteur.

Cette sur-activation de la voie PPAR γ , par le biais d'amplifications et de mutations de *PPARG* ou de mutations de *RXRA* conduit à une activité plus importante de l'hétérodimère, et donc une expression plus importante de ses gènes cibles directs, mais ceux-ci sont encore très mal connus dans ce contexte particulier. Afin de comprendre les conséquences de cette sur-activation dans la tumeur, j'ai cherché à identifier ces gènes cibles directs pouvant être impliqués dans le rôle protumorigénique de PPAR γ grâce à des analyses transcriptomiques de lignées tumorales et de tumeurs de vessie associées à des expériences de ChIP-sequencing. Cet axe de mon projet de recherche, qui est encore en cours de réalisation, est présenté dans le **CHAPITRE I**.

A l'inverse du sous-groupe luminal, le sous-groupe basal présente un profil très peu différencié, et donc une expression faible de PPAR γ et des marqueurs de la différenciation qu'il régule. Le rôle de PPAR γ dans ce sous-groupe n'est pas établi, mais l'effet des ligands

de PPAR γ sur certaines lignées de tumeurs de vessie, de même que son rôle dans la différenciation de l'urothélium laissaient cependant suggérer un rôle anti-tumoral opposé au rôle pro-tumorigénique décrit dans les tumeurs lumineuses.

En plus des mutations récurrentes identifiées dans le sous-groupe luminal, des mutations non récurrentes ont été identifiées dans le sous-groupe basal. De plus, des délétions hétérozygotes de *PPARG* sont présentes dans certaines tumeurs de vessie. J'ai cherché à caractériser le rôle de ces altérations dans l'activité de la voie PPAR γ et dans le sous-groupe basal, en mettant en évidence un éventuel rôle anti-tumorigénique de PPAR γ dans ce sous-groupe. Cet axe de mon projet est exposé dans le **CHAPITRE II**.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK. 1997. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor γ is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem.* doi:10.1074/jbc.272.8.5128
- Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, Szatmari I, Savage D, Smith A, Rajanayagam O, Semple R, Luan J, Bath L, Zalin A, Labib M, Kumar S, Simpson H, Blom D, Marais D, Schwabe J, Barroso I, Trembath R, Wareham N, Nagy L, Gurnell M, O'Rahilly S, Chatterjee K. 2006. Non-DNA binding, dominant-negative, human PPAR γ mutations cause lipodystrophic insulin resistance. *Cell Metab.* doi:10.1016/j.cmet.2006.09.003
- Alexandroff AB, Nicholson S, Patel PM, Jackson AM. 2010. Recent advances in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in bladder cancer. *Immunotherapy.* doi:10.2217/imt.10.32
- Almasan A, Mangelsdorf DJ, Ong ES, Wahl GM, Evans RM. 1994. Chromosomal localization of the human retinoid x receptors. *Genomics* **20**:397–403. doi:10.1006/geno.1994.1193
- Aprile M, Ambrosio MR, D'Esposito V, Beguinot F, Formisano P, Costa V, Ciccodicola A. 2014. PPAR γ in human adipogenesis: Differential contribution of canonical transcripts and dominant negative isoforms. *PPAR Res* **2014**:18–20. doi:10.1155/2014/537865
- Aranda A, Pascual A. 2017. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol Rev* **81**:1269–1304. doi:10.1152/physrev.2001.81.3.1269
- Auwerx J. 1992. Regulation of gene expression by fatty acids and fibric acid derivatives: An integrative role for peroxisome proliferator activated receptors: The belgian endocrine society lecture 1992. *Horm Res Paediatr.* doi:10.1159/000182557
- Baek SH, Kim K Il. 2013. Emerging Roles of Orphan Nuclear Receptors in Cancer. *Annu Rev Physiol* **76**:177–195. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183758
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS. 2009. MEME Suite: Tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkp335
- Balar A V, Galsky MD, Rosenberg JE, Powles T, Petrylak DP, Bellmunt J, Loriot Y, Necchi A, Hoffman-Censits J, Perez-Gracia JL, Dawson NA, van der Heijden MS, Dreicer R, Srinivas S, Retz MM, Joseph RW, Drakaki A, Vaishampayan UN, Sridhar SS, Quinn DI, Durán I, Shaffer DR, Eigl BJ, Grivas PD, Yu EY, Li S, Kadel EE, Boyd Z, Bourgon R, Hegde PS, Mariathasan S, Thåström A, Abidoye OO, Fine GD, Bajorin DF. 2017. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* **389**:67–76. doi:10.1016/S0140-6736(16)32455-2
- Banks AS, McAllister FE, Camporez JPG, Zushin P-JH, Jurczak MJ, Laznik-Bogoslavski D, Shulman GI, Gygi SP, Spiegelman BM. 2015. An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPAR γ . *Nature* **517**:391–395. doi:10.1038/nature13887
- Batista MRB, Martínez L. 2013. Dynamics of nuclear receptor Helix-12 switch of transcription activation by modeling time-resolved fluorescence anisotropy decays.

- Biophys J* **105**:1670–1680. doi:10.1016/j.bpj.2013.07.032
- Beatson G. 1896. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma. *Lancet* 104–107.
- Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton M-H, Ricol D, Gil Diez de Medina S, Van Rhijn B, Bralet M-P, Lefrere-Belda M-A, Lahaye J-B, Abbou CC, Bonaventure J, Zafrani ES, van der Kwast T, Thiery JP, Radvanyi F. 2001. Frequent FGFR3 Mutations in Papillary Non-Invasive Bladder (pTa) Tumors. *Am J Pathol* **158**:1955–1959. doi:10.1016/S0002-9440(10)64665-2
- Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P. 2013. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1- Tumeurs solides, Institut de Veille Sanitaire. doi:978-2-11-138316-6
- Biton A, Bernard-Pierrot I, Lou Y, Krucker C, Chapeaublanc E, Rubio-Pérez C, López-Bigas N, Kamoun A, Neuzillet Y, Gestraud P, Grieco L, Rebouissou S, de Reyniès A, Benhamou S, Lebre T, Southgate J, Barillot E, Allory Y, Zinovyev A, Radvanyi F. 2014. Independent Component Analysis Uncovers the Landscape of the Bladder Tumor Transcriptome and Reveals Insights into Luminal and Basal Subtypes. *Cell Rep* **9**:1235–1245. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.035
- Blanco JCG, Minucci S, Lu J, Yang X, Walker KK, Chen H, Evans RM, Nakatani Y, Ozato K. 1998. The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator 1638–1651.
- Boehm MF, Zhang L, Badea BA, White SK, Mais DE, Berger E, Suto CM, Goldman ME, Heyman RA. 1994. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Novel Retinoid X Receptor-Selective Retinoids. *J Med Chem* **37**:2930–2941. doi:10.1021/jm00044a014
- Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. 2007. PPAR γ Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory Properties. *Cell Metab* **6**:137–143. doi:10.1016/j.cmet.2007.06.010
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**:394–424. doi:10.3322/caac.21492
- Bren-Mattison Y, Meyer AM, Van Putten V, Li H, Kuhn K, Stearman R, Weiser-Evans M, Winn RA, Heasley LE, Nemenoff RA. 2007. Antitumorigenic Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells Are Mediated by Suppression of Cyclooxygenase-2 via Inhibition of Nuclear Factor- B. *Mol Pharmacol*. doi:10.1124/mol.107.042002
- Brown KK, Henke BR, Blanchard SG, Cobb JE, Mook R, Kaldor I, Kliwer SA, Lehmann JM, Lenhard JM, Harrington WW, Novak PJ, Faison W, Binz JG, Hashim MA, Oliver WO, Brown HR, Parks DJ, Plunket KD, Tong WQ, Menius JA, Adkison K, Noble SA, Willson TM. 1999. A novel N-aryl tyrosine activator of peroxisome proliferator-activated receptor- γ reverses the diabetic phenotype of the Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* **48**:1415–1424. doi:10.2337/diabetes.48.7.1415
- Burdick AD, Kim DJ, Peraza MA, Gonzalez FJ, Peters JM. 2006. The role of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ in epithelial cell growth and differentiation. *Cell Signal* **18**:9–20. doi:10.1016/j.cellsig.2005.07.009
- Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, Kassouf W, Kiemeny LA, La Vecchia C, Shariat S, Lotan Y. 2013. Epidemiology and Risk Factors

- of Urothelial Bladder Cancer. *Eur Urol* **63**:234–241. doi:10.1016/j.eururo.2012.07.033
- Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. 1999. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* **23**:18–20. doi:10.1038/12615
- Cavaillès V, Dauvois S, Danielian PS, Parker MG. 2006. Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors. *Proc Natl Acad Sci*. doi:10.1073/pnas.91.21.10009
- Chaffer CL, Thomas DM, Thompson EW, Williams ED. 2006. PPAR γ -independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma. *BMC Cancer*. doi:10.1186/1471-2407-6-53
- Chakravarti D, LaMorte VJ, Nelson MC, Nakajima T, Schulman IG, Juguilon H, Montminy M, Evans RM. 1996. Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature*. doi:10.1038/383099a0
- Chawla A, Lazar MA. 2006. Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. *Proc Natl Acad Sci*. doi:10.1073/pnas.91.5.1786
- Chen JD, Evans RM. 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*. doi:10.1038/377454a0
- Chiu M, McBeth L, Sindhwani P, Hinds TD. 2017. Deciphering the Roles of Thiazolidinediones and PPAR γ in Bladder Cancer. *PPAR Res*. doi:10.1155/2017/4810672
- Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack E, Hoffman-Censits J, Roth B, Cheng T, Tran M, Lee IL, Melquist J, Bondaruk J, Majewski T, Zhang S, Pretzsch S, Baggerly K, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney CN, McConkey D. 2014. Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell* **25**:152–165. doi:10.1016/j.ccr.2014.01.009
- Choudhury NJ, Campanile A, Antic T, Yap KL, Fitzpatrick CA, Wade JL, Karrison T, Stadler WM, Nakamura Y, O'Donnell PH. 2016. Afatinib activity in platinum-refractory metastatic urothelial carcinoma in patients with ERBB alterations. *J Clin Oncol*. doi:10.1200/JCO.2015.66.3047
- Chrisman IM, Nemetchek MD, De Vera IMS, Shang J, Heidari Z, Long Y, Reyes-Caballero H, Galindo-Murillo R, Cheatham TE, Blayo AL, Shin Y, Fuhrmann J, Griffin PR, Kamenecka TM, Kojetin DJ, Hughes TS. 2018. Defining a conformational ensemble that directs activation of PPAR γ . *Nat Commun* **9**:1–16. doi:10.1038/s41467-018-04176-x
- Clark RB, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula SJ. 2000. The Nuclear Receptor PPAR and Immunoregulation: PPAR Mediates Inhibition of Helper T Cell Responses. *J Immunol* **164**:1364–1371. doi:10.4049/jimmunol.164.3.1364
- Colhoun HM, Livingstone SJ, Looker HC, Morris AD, Wild SH, Lindsay RS, Reed C, Donnan PT, Guthrie B, Leese GP, McKnight J, Pearson DWM, Pearson E, Petrie JR, Philip S, Sattar N, Sullivan FM, McKeigue P. 2012. Hospitalised hip fracture risk with rosiglitazone and pioglitazone use compared with other glucose-lowering drugs. *Diabetologia* **55**:2929–2937. doi:10.1007/s00125-012-2668-0
- Conconi D, Panzeri E, Redaelli S, Bovo G, Volante M, Viganò P, Strada G, Dalprà L, Bentivegna A. 2012. DNA copy number alterations and PPARG amplification in a

- patient with multifocal bladder urothelial carcinoma. *BMC Res Notes* **5**:607. doi:10.1186/1756-0500-5-607
- Dai M, Wang P, Boyd AD, Kostov G, Athey B, Jones EG, Bunney WE, Myers RM, Speed TP, Akil H, Watson SJ, Meng F. 2005. Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. *Nucleic Acids Res* **33**:e175. doi:10.1093/nar/gni179
- Damrauer JS, Hoadley K a, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, Yeh JJ, Milowsky MI, Iyer G, Parker JS, Kim WY. 2014. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:3110–5. doi:10.1073/pnas.1318376111
- Diezko R, Suske G. 2013. Ligand Binding Reduces SUMOylation of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Activation Function 1 (AF1) Domain. *PLoS One* **8**:e66947. doi:10.1371/journal.pone.0066947
- Earl J, Rico D, Carrillo-de-Santa-Pau E, Rodríguez-Santiago B, Méndez-Pertuz M, Auer H, Gómez G, Grossman HB, Pisano DG, Schulz WA, Pérez-Jurado LA, Carrato A, Theodorescu D, Chanock S, Valencia A, Real FX. 2015. The UBC-40 Urothelial Bladder Cancer cell line index: a genomic resource for functional studies. *BMC Genomics* **16**:403. doi:10.1186/s12864-015-1450-3
- Egea PF, Mitschler A, Rochel N, Marc R, Pierre C, Moras D. 2002. Crystal structure of the human RXR α ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis retinoic acid. *EMBO J* **19**:2592–2601. doi:10.1093/emboj/19.11.2592
- Escriva H, Safi R, Hänni C, Langlois MC, Saumitou-Laprade P, Stehelin D, Capron A, Pierce R, Laudet V. 1997. Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci* **94**:6803–6808. doi:10.1073/pnas.94.13.6803
- Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre A-M, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart J-C, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. 1997. The Organization, Promoter Analysis, and Expression of the Human PPAR γ Gene. *J Biol Chem* **272**:18779–18789. doi:10.1074/jbc.272.30.18779
- Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. 1998. PPAR γ 3 mRNA: A distinct PPAR γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* **438**:55–60. doi:10.1016/S0014-5793(98)01273-3
- Finck BN, Kelly DP. 2006. PGC-1 coactivators: Inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest*. doi:10.1172/JCI27794
- Fishwick C, Higgins J, Percival-alwyn L, Hustler A, Pearson J, Bastkowski S, Moxon S, Swarbreck D, Greenman CD, Southgate J. 2017. Heterarchy of transcription factors driving basal and luminal cell phenotypes in human urothelium **24**:809–818. doi:10.1038/cdd.2017.10
- Fletcher O, Easton D, Anderson K, Gilham C, Jay M, Peto J. 2004. Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *J Natl Cancer Inst* **96**:357–63.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 1995. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* **83**:803–812. doi:10.1016/0092-8674(95)90193-0
- Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. 2011. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA - J Am Med Assoc*. doi:10.1001/jama.2011.1142

- Gao J, Yuan S, Jin J, Shi J, Hou Y. 2015. PPAR α regulates tumor progression, foe or friend? *Eur J Pharmacol* **765**:560–564. doi:10.1016/j.ejphar.2015.09.027
- Glaser AP, Fantini D, Shilatifard A, Schaeffer EM, Meeks JJ. 2017. The evolving genomic landscape of urothelial carcinoma. *Nat Rev Urol*. doi:10.1038/nrurol.2017.11
- Goldstein JT, Berger AC, Shih J, Duke FF, Furst L, Kwiatkowski DJ, Cherniack AD, Meyerson M, Strathdee CA. 2017. Genomic Activation of PPARG Reveals a Candidate Therapeutic Axis in Bladder Cancer. *Cancer Res* **77**:6987–6998. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1701
- Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. doi:10.1038/nri978
- Gottardis MM, Lamph WW, Shalinsky DR, Wellstein A, Heyman RA. 1996. The efficacy of 9-cis retinoic acid in experimental models of cancer. *Breast Cancer Res Treat* **38**:85–96. doi:10.1007/BF01803787
- Govindarajan R, Ratnasinghe L, Simmons DL, Siegel ER, Midathada M V., Kim L, Kim PJ, Owens RJ, Lang NP. 2007. Thiazolidinediones and the risk of lung, prostate, and colon cancer in patients with diabetes. *J Clin Oncol*. doi:10.1200/JCO.2006.07.2777
- Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G, Nimer SD. 1995. isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: Expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr* **4**:281–299.
- Greenstein S, Ghias K, Krett NL, Rosen ST. 2002. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res* **8**:1681–1694.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* **78**:783–809. doi:10.1152/physrev.1998.78.3.783
- Guan Y, Hao C, Cha DR, Rao R, Lu W, Kohan DE, Magnuson MA, Redha R, Zhang Y, Breyer MD. 2005. Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPAR γ stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat Med* **11**:861–866. doi:10.1038/nm1278
- Guan YF, Zhang YH, Breyer RM, Davis L, Breyer MD. 1999. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human transitional bladder cancer and its role in inducing cell death. *Neoplasia* **1**:330–9.
- Hahn NM, Bivalacqua TJ, Ross AE, Netto GJ, Baras A, Park JC, Chapman C, Masterson TA, Koch MO, Bihrl R, Foster RS, Gardner TA, Cheng L, Jones DR, McElyea K, Sandusky GE, Breen T, Liu Z, Albany C, Moore ML, Loman RL, Reed A, Turner SA, De Abreu FB, Gallagher T, Tsongalis GJ, Plimack ER, Greenberg RE, Geynisman DM. 2017. A phase II trial of dovitinib in BCG-unresponsive urothelial carcinoma with FGFR3 mutations or overexpression: Hoosier Cancer Research Network trial HCRN 12-157. *Clin Cancer Res*. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2267
- Halachmi S, Brown M, Martin G, Marden E, MacKay H, Abbondanza C. 2006. Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science (80-)* **264**:1455–1458. doi:10.1126/science.8197458
- Halstead AM, Kapadia CD, Bolzenius J, Chu CE, Schrieffer A, Wartman LD, Bowman GR, Arora VK. 2017. Bladder-cancer-associated mutations in RXRA activate peroxisome proliferator-activated receptors to drive urothelial proliferation. *Elife* **6**:1–27. doi:10.7554/eLife.30862

- Hara T, Miyazaki H, Lee A, Tran CP, Reiter RE. 2008. Androgen Receptor and Invasion in Prostate Cancer. *Cancer Res* **68**:1128–1135. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1929
- Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GCW, Wolf CR. 1997. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*. doi:10.1093/carcin/18.4.641
- Hatton JL, Yee LD. 2008. Clinical use of PPAR γ ligands in cancer. *PPAR Res*. doi:10.1155/2008/159415
- He F, Mo L, Zheng X-Y, Hu C, Lepor H, Lee EYHP, Sun T-T, Wu X-R. 2009. Deficiency of pRb Family Proteins and p53 in Invasive Urothelial Tumorigenesis. *Cancer Res* **69**:9413–9421. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2158
- Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**:733–736. doi:10.1038/42750
- Heisler LE, Evangelou A, Lew AM, Trachtenberg J, Elsholtz HP, Brown TJ. 1997. Androgen-dependent cell cycle arrest and apoptotic death in PC-3 prostatic cell cultures expressing a full-length human androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* **126**:59–73. doi:10.1016/S0303-7207(96)03970-6
- Helenius K, Yang Y, Alasaari J, Makela TP. 2009. Mat1 Inhibits Peroxisome Proliferator-Activated Receptor -Mediated Adipocyte Differentiation. *Mol Cell Biol* **29**:315–323. doi:10.1128/MCB.00347-08
- Helsen C, Dubois V, Verfaillie A, Young J, Trekels M, Vancraenenbroeck R, De Maeyer M, Claessens F. 2012. Evidence for DNA-Binding Domain-Ligand-Binding Domain Communications in the Androgen Receptor. *Mol Cell Biol* **32**:3033–3043. doi:10.1128/MCB.00151-12
- Hicks RM. 1965. The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter. *J Cell Biol* **26**:25–48. doi:10.1083/jcb.26.1.25
- Hinds TD, Stechschulte LA, Cash HA, Whisler D, Banerjee A, Yong W, Khuder SS, Kaw MK, Shou W, Najjar SM, Sanchez ER. 2011. Protein Phosphatase 5 Mediates Lipid Metabolism through Reciprocal Control of Glucocorticoid Receptor and Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ (PPAR γ). *J Biol Chem* **286**:42911–42922. doi:10.1074/jbc.M111.311662
- Hörlein AJ, Näär AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Söderström M, Glass CK, Rosenfeld MG. 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. doi:10.1038/377397a0
- Hsu HH, Cheng SF, Chen LM, Liu JY, Chu CH, Weng YJ, Li ZY, Lin CS, Lee S Da, Kuo WW, Huang CY. 2006. Over-expressed estrogen receptor- α up-regulates hTNF- α gene expression and down-regulates β -catenin signaling activity to induce the apoptosis and inhibit proliferation of LoVo colon cancer cells. *Mol Cell Biochem*. doi:10.1007/s11010-006-9153-3
- Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. 1996. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ . *Science* (80-). doi:10.1126/science.274.5295.2100
- Hu X, Lazar MA. 1999. The CoRNR motif controls the recruitment of co-repressors by

- nuclear hormone receptors. *Nature* **402**:93–96. doi:10.1038/47069
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. 2009a. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkn923
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* doi:10.1038/nprot.2008.211
- Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK. 1999. Interleukin-4-dependent production of PPAR- γ ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* **400**:378–382. doi:10.1038/22572
- Hudson WH, Youn C, Ortlund EA. 2014. Crystal Structure of the Mineralocorticoid Receptor DNA Binding Domain in Complex with DNA. *PLoS One* **9**:e107000. doi:10.1371/journal.pone.0107000
- Hughes T, Burris TP, Lundasen T, Kojetin DJ, Crumbley C, Banerjee S, Griffett K, Wang Y, Solt LA. 2013. Nuclear Receptors and Their Selective Pharmacologic Modulators. *Pharmacol Rev* **65**:710–778. doi:10.1124/pr.112.006833
- 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. *J Biol Chem* **272**:20108–20117. doi:10.1074/jbc.272.32.20108
- Ikezoe T, Miller CW, Kawano S, Williamson EA, Hisatake J, Green E, Hofmann W, Koeffler HP, Heaney A, Taguchi H. 2001. Mutational analysis of the peroxisome proliferator-activated receptor γ in human malignancies. *Cancer Res.*
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. 2012. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Selected Works of Terry Speed*. doi:10.1007/978-1-4614-1347-9_15
- Issemann I, Green S. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. doi:10.1038/347645a0
- Ivanova EA, Parolari A, Myasoedova V, Melnichenko AA, Bobryshev Y V., Orekhov AN. 2015. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma in cardiovascular disorders and cardiovascular surgery. *J Cardiol* **66**:271–278. doi:10.1016/j.jjcc.2015.05.004
- Jeninga EH, Gurnell M, Kalkhoven E. 2009. Functional implications of genetic variation in human PPAR γ . *Trends Endocrinol Metab* **20**:380–387. doi:10.1016/j.tem.2009.04.005
- Kadlubar FF, Hirvonen A, Bell DA, Lang NP, Badawi AF. 1995. Role of Aromatic Amine Acetyltransferases, NAT1 and NAT2, in Carcinogen-DNA Adduct Formation in the Human Urinary Bladder. *Cancer Res.*
- Kamei Y, Xu L, Heinzel T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin S-C, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG. 1996. A CBP Integrator Complex Mediates Transcriptional Activation and AP-1 Inhibition by Nuclear Receptors. *Cell* **85**:403–414. doi:10.1016/S0092-8674(00)81118-6
- Kamoun A, Reynies A de, Allory Y, Sjodahl G, Robertson AG, Seiler R, Hoadley K, Al-Ahmadie H, Choi W, Groeneveld CS, Castro MAA, Fontugne J, Eriksson P, Mo Q, Kardos J, Zlotta A, Hartmann A, Dinney CP, Bellmunt J, Powles T, Malats N, Chan KS,

- Kim WY, McConkey DJ, Black PC, Dyrskjot L, Hoglund M, Lerner SP, Real FX, Radvanyi F, Group TBCMT. 2018. The consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer. *bioRxiv*. doi:10.1101/488460
- Khan A, Fornes O, Stigliani A, Gheorghe M, Castro-Mondragon JA, Van Der Lee R, Bessy A, Chèneby J, Kulkarni SR, Tan G, Baranasic D, Arenillas DJ, Sandelin A, Vandepoele K, Lenhard B, Ballester B, Wasserman WW, Parcy F, Mathelier A. 2018. JASPAR 2018: Update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Res*. doi:10.1093/nar/gkx1126
- Khorasanizadeh S, Rastinejad F. 2016. Visualizing the Architectures and Interactions of Nuclear Receptors **157**:4212–4221. doi:10.1210/en.2016-1559
- Kilroy G, Kirk-Ballard H, Carter LE, Floyd ZE. 2012. The Ubiquitin Ligase Siah2 Regulates PPAR γ Activity in Adipocytes. *Endocrinology* **153**:1206–1218. doi:10.1210/en.2011-1725
- Kim J-H, Park KW, Lee E-W, Jang W-S, Seo J, Shin S, Hwang K-A, Song J. 2014. Suppression of PPAR γ through MKRN1-mediated ubiquitination and degradation prevents adipocyte differentiation. *Cell Death Differ* **21**:594–603. doi:10.1038/cdd.2013.181
- Kim KR, Choi HN, Lee HJ, Baek HA, Park HS, Jang KY, Chung MJ, Moon WS. 2007. A peroxisome proliferator-activated receptor γ antagonist induces vimentin cleavage and inhibits invasion in high-grade hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*.
- Kletzien RF, Clarke SD, Ulrich RG. 1991. Enhancement of Adipocyte Differentiation by an Insulin Sensitizing Agent. *Mol Pharmacol*.
- Kliwer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM. 1992a. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* **355**:446–449. doi:10.1038/355446a0
- Kliwer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. 1992b. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358**:771–774. doi:10.1038/358771a0
- Klotz L, Dani I, Edenhofer F, Nolden L, Evert B, Paul B, Kolanus W, Klockgether T, Knolle P, Diehl L. 2007. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Control of Dendritic Cell Function Contributes to Development of CD4⁺ T Cell Anergy. *J Immunol* **178**:2122–2131. doi:10.4049/jimmunol.178.4.2122
- Kobayashi T, Owczarek TB, McKiernan JM, Abate-Shen C. 2015. Modelling bladder cancer in mice: Opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. doi:10.1038/nrc3858
- Korbecki J, Bobiński R, Dutka M. 2019. Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. *Inflamm Res*. doi:10.1007/s00011-019-01231-1
- Korpál M, Puyang X, Jeremy Wu Z, Seiler R, Furman C, Oo HZ, Seiler M, Irwin S, Subramanian V, Julie Joshi J, Wang CK, Rinkunas V, Tortora D, Yang H, Kumar N, Kuznetsov G, Matijevic M, Chow J, Kumar P, Zou J, Feala J, Corson L, Henry R, Selvaraj A, Davis A, Bloudoff K, Douglas J, Kiss B, Roberts M, Fazli L, Black PC, Fekkes P, Smith PG, Warmuth M, Yu L, Hao M, Larsen N, Dugaard M, Zhu P. 2017. Evasion of immunosurveillance by genomic alterations of PPAR γ /RXR α in bladder cancer. *Nat Commun* **8**:103. doi:10.1038/s41467-017-00147-w
- Kreft ME, Hudoklin S, Jezernik K, Romih R. 2010. Formation and maintenance of blood-

- urine barrier in urothelium. *Protoplasma* **246**:3–14. doi:10.1007/s00709-010-0112-1
- Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. 1997. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*. doi:10.1210/mend.11.6.0007
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA. 2000. PAX8-PPAR γ 1 fusion in oncogene human thyroid carcinoma. *Science* (80-). doi:10.1126/science.289.5483.1357
- Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA, Asou H, Said JW, Holden S, Miyoshi I, Koeffler HP. 1998. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (Troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res*.
- Lacassagne A. 1936. Hormonal pathogenesis of adenocarcinoma of the breast. *Am J Cancer*. doi:10.1158/ajc.1936.217
- Lamont FR, Tomlinson DC, Cooper PA, Shnyder SD, Chester JD, Knowles MA. 2011. Small molecule FGF receptor inhibitors block FGFR-dependent urothelial carcinoma growth in vitro and in vivo. *Br J Cancer*. doi:10.1038/sj.bjc.6606016
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25
- Leal J, Luengo-Fernandez R, Sullivan R, Witjes JA. 2016. Economic Burden of Bladder Cancer Across the European Union. *Eur Urol* **69**:438–447. doi:10.1016/j.eururo.2015.10.024
- Lee G, Elwood F, McNally J, Weiszmann J, Lindstrom M, Amaral K, Nakamura M, Miao S, Cao P, Marc Learned R, Chen JL, Li Y. 2002. T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ , functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J Biol Chem* **277**:19649–19657. doi:10.1074/jbc.M200743200
- Lee JE, Wang C, Xu S, Cho YW, Wang L, Feng X, Baldrige A, Sartorelli V, Zhuang L, Peng W, Ge K. 2013. H3K4 mono- And di-methyltransferase MLL4 is required for enhancer activation during cell differentiation. *Elife*. doi:10.7554/eLife.01503
- Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, Cobb JE, Collins JL, Consler TG, Davis RG, Hull-Ryde EA, Lenhard JM, Patel L, Plunket KD, Shenk JL, Stimmel JB, Therapontos C, Willson TM, Blanchard SG. 2002. Functional Consequences of Cysteine Modification in the Ligand Binding Sites of Peroxisome Proliferator Activated Receptors by GW9662. *Biochemistry* **41**:6640–6650. doi:10.1021/bi0159581
- Lefebvre A-M, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart J, Geboes K, Briggs M, Heyman R, Auwerx J. 1998. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med* **4**:1053–1057. doi:10.1038/2036
- Lefterova MI, Steger DJ, Zhuo D, Qatanani M, Mullican SE, Tuteja G, Manduchi E, Grant GR, Lazar MA. 2010. Cell-Specific Determinants of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Function in Adipocytes and Macrophages. *Mol Cell Biol* **30**:2078–2089. doi:10.1128/MCB.01651-09
- Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, Schupp M, Schug J, Cristancho A, Feng D, Zhuo D, Stoeckert CJ, Liu XS, Lazar MA. 2008. PPAR γ and C/EBP factors orchestrate adipocyte

- biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev* **22**:2941–2952. doi:10.1101/gad.1709008
- Lengqvist J, Perlmann T, Sjövall J, Griffiths WJ, Bergman A-C, Mata de Urquiza A, Willson TM. 2004. Polyunsaturated Fatty Acids Including Docosahexaenoic and Arachidonic Acid Bind to the Retinoid X Receptor α Ligand-binding Domain. *Mol Cell Proteomics* **3**:692–703. doi:10.1074/mcp.m400003-mcp200
- Lewis JD, Ferrara A, Peng T, Hedderson M, Bilker WB, Quesenberry CP, Vaughn DJ, Nessel L, Selby J, Strom BL. 2011. Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: Interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care*. doi:10.2337/dc10-1068
- Li D, Zhang L, Xu L, Liu L, He Y, Zhang Y, Huang X, Zhao TT, Wu L, Zhao Y, Wu K, Li H, Yu X, Zhao TT, Gong S, Fan M, Zhu L. 2017. WIP1 phosphatase is a critical regulator of adipogenesis through dephosphorylating PPAR γ serine 112. *Cell Mol Life Sci* **74**:2067–2079. doi:10.1007/s00018-016-2450-4
- Li G, Leff T. 2007. Altered Promoter Recycling Rates Contribute to Dominant-Negative Activity of Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Mutations Associated with Diabetes. *Mol Endocrinol*. doi:10.1210/me.2006-0401
- Li H, Weiser-Evans MCM, Nemenoff R. 2012. Anti- and protumorigenic effects of PPAR γ in lung cancer progression: A double-edged sword. *PPAR Res*. doi:10.1155/2012/362085
- Li J, Wang JJ, Wang JJ, Nawaz Z, Liu JM, Qin J, Wong J. 2000. Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *EMBO J* **19**:4342–4350. doi:10.1093/emboj/19.16.4342
- Li JJ, Wang R, Lama R, Wang X, Floyd ZE, Park EA, Liao F-F. 2016. Ubiquitin Ligase NEDD4 Regulates PPAR γ Stability and Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells. *Sci Rep* **6**:38550. doi:10.1038/srep38550
- Lodillinsky C, Umerez MS, Jasnias MA, Casabé A, Sandes E, Eiján AM. 2006. Bacillus Calmette-Guérin induces the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bladder cancer cells. *Int J Mol Med*.
- Lubet RA, Fischer SM, Steele VE, Juliana MM, Desmond R, Grubbs CJ. 2008. Rosiglitazone, a PPAR gamma agonist: Potent promoter of hydroxybutyl(butyl)nitrosamine-induced urinary bladder cancers. *Int J Cancer*. doi:10.1002/ijc.23765
- Lv S, Wang W, Wang H, Zhu Y, Lei C. 2019. PPAR γ activation serves as therapeutic strategy against bladder cancer via inhibiting PI3K-Akt signaling pathway. *BMC Cancer* **19**:204. doi:10.1186/s12885-019-5426-6
- Madsen MS, Siersbæk R, Boergesen M, Nielsen R, Mandrup S. 2014. PPAR γ and C/EBP α Synergistically Activate Key Metabolic Adipocyte Genes by Assisted Loading. *Mol Cell Biol*. doi:10.1128/MCB.01344-13
- Malik S, Roeder RG. 2010. The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat Rev Genet*. doi:10.1038/nrg2901
- Mangelsdorf DJ, Evans RM. 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*. doi:10.1016/0092-8674(95)90200-7
- Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. 1990. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* **345**:224–229. doi:10.1038/345224a0
- Mansure JJ, Nassim R, Chevalier S, Szymanski K, Rocha J, Aldousari S, Kassouf W. 2013. A

- Novel Mechanism of PPAR Gamma Induction via EGFR Signalling Constitutes Rational for Combination Therapy in Bladder Cancer. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0055997
- Martin H. 2010. Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* **690**:57–63. doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.09.009
- Mata A, Liu S, Sjöberg M, Zetterström RH, Griffiths W, Sjövall J, Perlmann T. 2016. Docosahexaenoic Acid, a Ligand for the Retinoid X Receptor in Mouse Brain Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/3081610> Linked references are available on JSTOR for this article: Doco **290**:2140–2144.
- Menendez JA. 2010. Fine-tuning the lipogenic/lipolytic balance to optimize the metabolic requirements of cancer cell growth: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1801**:381–391. doi:10.1016/j.bbalip.2009.09.005
- Misra P, Reddy JK. 2014. Peroxisome proliferator-activated receptor- α activation and excess energy burning in hepatocarcinogenesis. *Biochimie* **98**:63–74. doi:10.1016/j.biochi.2013.11.011
- Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, Fletcher C, Singer S, Spiegelman BM. 1998. Terminal Differentiation of Human Breast Cancer through PPAR γ . *Mol Cell*. doi:10.1016/S1097-2765(00)80047-7
- Müller R. 2017. PPAR β/δ in human cancer. *Biochimie* **136**:90–99. doi:10.1016/j.biochi.2016.10.019
- Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. 2014. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* **53**:124–144. doi:10.1016/j.plipres.2013.12.001
- Niho N, Takahashi M, Shoji Y, Takeuchi Y, Matsubara S, Sugimura T, Wakabayashi K. 2003. Dose-dependent suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Min mice by pioglitazone, a PPAR γ ligand. *Cancer Sci*. doi:10.1111/j.1349-7006.2003.tb01385.x
- Nuclear Receptors Nomenclature Committee. 1999. A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell* **97**:161–163.
- Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Eagle AR, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A. 2007. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*. doi:10.1038/nature05894
- Pal SK, Rosenberg JE, Hoffman-Censits JH, Berger R, Quinn DI, Galsky MD, Wolf J, Dittrich C, Keam B, Delord JP, Schellens JHM, Gravis G, Medioni J, Maroto P, Sriuranpong V, Charoentum C, Burris HA, Grünwald V, Petrylak D, Vaishampayan U, Gez E, De Giorgi U, Lee JL, Voortman J, Gupta S, Sharma S, Mortazavi A, Vaughn DJ, Isaacs R, Parker K, Chen X, Yu K, Porter D, Porta DG, Bajorin DF. 2018. Efficacy of BGJ398, a fibroblast growth factor receptor 1–3 inhibitor, in patients with previously treated advanced urothelial carcinoma with FGFR3 alterations. *Cancer Discov*. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0229
- Palmer CNA, Hsu MH, Griffin KJ, Johnson EF. 1995. Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *J Biol Chem* **270**:16114–16121.

doi:10.1074/jbc.270.27.16114

- Perissi V, Staszewski LM, McInerney EM, Kurokawa R, Kronen A, Rose DW, Lambert MH, Milburn M V., Glass CK, Rosenfeld MG. 1999. Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* **13**:3198–3208. doi:10.1101/gad.13.24.3198
- Peters JM, Yao P-L, Gonzalez FJ. 2015. Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- β/δ (PPAR β/δ) for Cancer Chemoprevention. *Curr Pharmacol Reports* **1**:121–128. doi:10.1007/s40495-015-0026-x
- Petrylak DP, Tangen CM, Van Veldhuizen PJ, Goodwin JW, Twardowski PW, Atkins JN, Kakhil SR, Lange MK, Mansukhani M, Crawford ED. 2010. Results: Of the Southwest Oncology Group phase II evaluation (study S0031) of ZD1839 for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. *BJU Int*. doi:10.1111/j.1464-410X.2009.08799.x
- Pietras RJ, Márquez DC, Chen HW, Tsai E, Weinberg O, Fishbein M. 2005. Estrogen and growth factor receptor interactions in human breast and non-small cell lung cancer cells. *Steroids* **70**:372–381. doi:10.1016/j.steroids.2005.02.017
- Pondugula SR, Pavak P, Mani S. 2016. Pregnane X Receptor and Cancer: Context-Specificity is Key. *Nucl Recept Res* **3**:1–20. doi:10.11131/2016/101198
- Powles T, Durán I, van der Heijden MS, Loriot Y, Vogelzang NJ, De Giorgi U, Oudard S, Retz MM, Castellano D, Bamias A, Fléchon A, Gravis G, Hussain S, Takano T, Leng N, Kadel EE, Banchereau R, Hegde PS, Mariathasan S, Cui N, Shen X, Derleth CL, Green MC, Ravaud A. 2018a. Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* **391**:748–757. doi:10.1016/S0140-6736(17)33297-X
- Powles T, Necchi A, Rosen G, Hariharan S, Apolo AB. 2018b. Anti-Programmed Cell Death 1/Ligand 1 (PD-1/PD-L1) Antibodies for the Treatment of Urothelial Carcinoma: State of the Art and Future Development. *Clin Genitourin Cancer* **16**:117–129. doi:10.1016/j.clgc.2017.11.002
- Pruthi RS, Nielsen M, Heathcote S, Wallen EM, Rathmell WK, Godley P, Whang Y, Fielding J, Schultz H, Grigson G, Smith A, Kim W. 2010. A phase II trial of neoadjuvant erlotinib in patients with muscle-invasive bladder cancer undergoing radical cystectomy: Clinical and pathological results. *BJU Int*. doi:10.1111/j.1464-410X.2009.09101.x
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**:829–839. doi:10.1016/S0092-8674(00)81410-5
- Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK. 2010. PPAR α : Energy Combustion, Hypolipidemia, Inflammation and Cancer. *Nucl Recept Signal* **8**:nrs.08002. doi:10.1621/nrs.08002
- Rebouissou S, Bernard-Pierrot I, de Reyniès A, Lepage M-L, Krucker C, Chapeaublanc E, Hérault A, Kamoun A, Caillaud A, Letouzé E, Elarouci N, Neuzillet Y, Denoux Y, Molinié V, Vordos D, Laplanche A, Maillé P, Soyeux P, Ofualuka K, Reyat F, Biton A, Sibony M, Paoletti X, Southgate J, Benhamou S, Lebrete T, Allory Y, Radvanyi F. 2014. EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype. *Sci Transl Med* **6**:244ra91. doi:10.1126/scitranslmed.3008970
- Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M. 1982. A point mutation is responsible for the

- acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature*. doi:10.1038/300149a0
- Renaud J-P, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. 1995. Crystal structure of the RAR- γ ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* **378**:681–689. doi:10.1038/378681a0
- Ricote M, Glass CK. 2007. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. doi:10.1016/j.bbalip.2007.02.013
- Ristow M, Müller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR. 1998. Obesity Associated with a Mutation in a Genetic Regulator of Adipocyte Differentiation. *N Engl J Med* **339**:953–959. doi:10.1056/NEJM199810013391403
- Rochel N, Krucker C, Coutos-Thévenot L, Osz J, Zhang R, Guyon E, Zita W, Vanthong S, Hernandez OA, Bourguet M, Badawy K Al, Dufour F, Peluso-Iltis C, Heckler-Beji S, Dejaegere A, Kamoun A, de Reyniès A, Neuzillet Y, Rebouissou S, Béraud C, Lang H, Massfelder T, Allory Y, Cianférani S, Stote RH, Radvanyi F, Bernard-Pierrot I. 2019. Recurrent activating mutations of PPAR γ associated with luminal bladder tumors. *Nat Commun* **10**:253. doi:10.1038/s41467-018-08157-y
- Roemer SC, Donham DC, Sherman L, Pon VH, Edwards DP, Churchill MEA. 2006. Structure of the Progesterone Receptor-Deoxyribonucleic Acid Complex: Novel Interactions Required for Binding to Half-Site Response Elements. *Mol Endocrinol* **20**:3042–3052. doi:10.1210/me.2005-0511
- Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, Van Der Heijden MS, Balar A V., Necchi A, Dawson N, O'Donnell PH, Balmanoukian A, Loriot Y, Srinivas S, Retz MM, Grivas P, Joseph RW, Galsky MD, Fleming MT, Petrylak DP, Perez-Gracia JL, Burris HA, Castellano D, Canil C, Bellmunt J, Bajorin D, Nickles D, Bourgon R, Frampton GM, Cui N, Mariathasan S, Abidoye O, Fine GD, Dreicer R. 2016. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: A single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(16)00561-4
- Rouprêt M, Neuzillet Y, Masson-Lecomte A, Colin P, Compérat E, Dubosq F, Houédé N, Larré S, Pignot G, Puech P, Roumiguié M, Xylinas E, Méjean A. 2016. Recommandations en onco-urologie 2016-2018 du CCAFU : Tumeurs de la vessie. *Progrès en Urol*. doi:10.1016/s1166-7087(16)30704-7
- Sabatino L, Fucci A, Pancione M, Colantuoni V. 2012. PPARG epigenetic deregulation and its role in colorectal tumorigenesis. *PPAR Res*. doi:10.1155/2012/687492
- Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, Alvarez JGA, Ming U T, Baird SM, Thomazy VA, Evans RM. 1998. Activators of the nuclear receptor PPAR γ enhance colon polyp formation. *Nat Med* **4**:1058–1061. doi:10.1038/2042
- Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, Spiegelman BM. 1998. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR γ . *Nat Med*. doi:10.1038/2030
- Sarraf P, Mueller E, Smith WM, Wright HM, Kum JB, Aaltonen L a, de la Chapelle A, Spiegelman BM, Eng C. 1999. Loss-of-Function Mutations in PPAR γ Associated with Human Colon Cancer. *Mol Cell* **3**:799–804. doi:10.1016/S1097-2765(01)80012-5
- Sato H, Ishihara S, Kawashima K, Moriyama N, Suetsugu H, Kazumori H, Okuyama T, Rumi MAK, Fukuda R, Nagasue N, Kinoshita Y. 2000. Expression of peroxisome proliferator-

- activated receptor (PPAR) γ in gastric cancer and inhibitory effects of PPAR γ agonists. *Br J Cancer* **83**:1394–1400. doi:10.1054/bjoc.2000.1457
- Schaefer KL, Wada K, Takahashi H, Matsushashi N, Ohnishi S, Wolfe MM, Turner JR, Nakajima A, Borkan SC, Saubermann LJ. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor γ inhibition prevents adhesion to the extracellular matrix and induces anoikis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3037
- Schwabe JWR, Chapman L, Finch JT, Rhodes D. 1993. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements. *Cell.* doi:10.1016/0092-8674(93)90390-C
- Sengupta N, Siddiqui E, Mumtaz FH. 2004. Cancers of the bladder. *J R Soc Promot Health.* doi:10.1177/146642400412400520
- Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA. 1998. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR- γ . *Nature.* doi:10.1038/24634
- Shulman AI, Larson C, Mangelsdorf DJ, Ranganathan R. 2004. Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. *Cell* **116**:417–429. doi:10.1016/S0092-8674(04)00119-9
- Sjödahl G, Eriksson P, Liedberg F, Höglund M. 2017. Molecular classification of urothelial carcinoma: global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification. *J Pathol.* doi:10.1002/path.4886
- Sjödahl G, Lauss M, Lövgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, Patschan O, Aine M, Fernö M, Ringnér M, Månsson W, Liedberg F, Lindgren D, Höglund M. 2012. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res.* doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0077-T
- Sjödahl G, Lövgren K, Lauss M, Patschan O, Gudjonsson S, Chebil G, Aine M, Eriksson P, Månsson W, Lindgren D, Fernö M, Liedberg F, Höglund M. 2013. Toward a molecular pathologic classification of urothelial carcinoma. *Am J Pathol* **183**:681–691. doi:10.1016/j.ajpath.2013.05.013
- Skogsberg J, Kannisto K, Roshani L, Gagne E, Hamsten A, Larsson C, Ehrenborg E. 2000. Characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor delta gene and its expression. *Int J Mol Med* **6**:73–81.
- Smyth GK. 2005. limma: Linear Models for Microarray Data Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. New York: Springer-Verlag. pp. 397–420. doi:10.1007/0-387-29362-0_23
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. 2009. TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer, ed. 7 BT - TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer, ed. 7 TNM Classification of Malignant Tumors. UICC International Union Against Cancer, Ed. 7.
- Soccio RE, Chen ER, Lazar MA. 2014. Thiazolidinediones and the Promise of Insulin Sensitization in Type 2 Diabetes. *Cell Metab* **20**:573–591. doi:10.1016/j.cmet.2014.08.005
- Spears M, McSharry C, Thomson NC. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists as potential anti-inflammatory agents in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy* **36**:1494–1504. doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02604.x

- Stephenson JJ, Gregory C, Burris H, Larson T, Verma U, Cohn A, Crawford J, Cohen RB, Martin J, Lum P, Yang X, Amado RG. 2009. An open-label clinical trial evaluating safety and pharmacokinetics of two dosing schedules of panitumumab in patients with solid tumors. *Clin Colorectal Cancer*. doi:10.3816/CCC.2009.n.005
- Sundvold H, Lien S. 2001. Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ promoter in man and transactivation by the nuclear receptor ROR α 1. *Biochem Biophys Res Commun* **287**:383–390. doi:10.1006/bbrc.2001.5602
- Tasdelen I, van Beekum O, Gorbenko O, Fleskens V, van den Broek NJF, Koppen A, Hamers N, Berger R, Coffey PJ, Brenkman AB, Kalkhoven E. 2013. The serine/threonine phosphatase PPM1B (PP2C β) selectively modulates PPAR γ activity. *Biochem J* **451**:45–53. doi:10.1042/BJ20121113
- TCGA. 2014. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* **507**:315–322. doi:10.1038/nature12965
- TCGA. 2017. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell* **171**:540–556.e25. doi:10.1016/j.cell.2017.09.007
- Terashita Y, Sasaki H, Haruki N, Nishiwaki T, Ishiguro H, Shibata Y, Kudo J, Konishi S, Kato J, Koyama H, Kimura M, Sato A, Shinoda N, Kuwabara Y, Fujii Y. 2002. Decreased peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression is correlated with poor prognosis in patients with esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol*. doi:10.1093/jjco/hyf056
- Togashi M, Borngraeber S, Sandler B, Fletterick RJ, Webb P, Baxter JD. 2005. Conformational adaptation of nuclear receptor ligand binding domains to agonists: Potential for novel approaches to ligand design. *J Steroid Biochem Mol Biol* **93**:127–137. doi:10.1016/j.jsbmb.2005.01.004
- Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CD, Brun RP, Mueller E, Altioek S, Oppenheim H, Evans RM, Spiegelman BM. 1997. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:237–41.
- Truong TH, Lange CA. 2018. Deciphering Steroid Receptor Crosstalk in Hormone-Driven Cancers. *Endocrinology* **159**:3897–3907. doi:10.1210/en.2018-00831
- van Rhijn BWG, van Tilborg AAG, Lurkin I, Bonaventure J, de Vries A, Thiery J-P, van der Kwast TH, Zwarthoff EC, Radvanyi F. 2002. Novel fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutations in bladder cancer previously identified in non-lethal skeletal disorders. *Eur J Hum Genet* **10**:819–824. doi:10.1038/sj.ejhg.5200883
- Varley C, Hill G, Pellegrin S, Shaw NJ, Selby PJ, Trejdosiewicz LK, Southgate J. 2005. Autocrine regulation of human urothelial cell proliferation and migration during regenerative responses in vitro. *Exp Cell Res* **306**:216–229. doi:10.1016/j.yexcr.2005.02.004
- Varley CL, Garthwaite M a E, Cross W, Trejdosiewicz LK, Southgate J. 2007. PPAR γ -Regulated Tight Junction Development During Human Urothelial Cytodifferentiation. *Cell* **208**:407–417.
- Varley CL, Stahlschmidt J, Lee W-C, Holder J, Diggle C, Selby PJ, Trejdosiewicz LK, Southgate J. 2004. Role of PPAR γ and EGFR signalling in the urothelial terminal differentiation programme. *J Cell Sci* **117**:2029–2036. doi:10.1242/jcs.01042
- Wang T, Xu J, Yu X, Yang R, Han ZC. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor γ in

- malignant diseases. *Crit Rev Oncol Hematol*. doi:10.1016/j.critrevonc.2005.08.011
- Watanabe M, Kakuta H. 2018. Retinoid X Receptor Antagonists. *Int J Mol Sci* **19**:2354. doi:10.3390/ijms19082354
- Watanabe M, Takahashi H, Saeki Y, Ozaki T, Itoh S, Suzuki M, Mizushima W, Tanaka K, Hatakeyama S. 2015. The E3 ubiquitin ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPAR γ . *Elife* **4**:1–26. doi:10.7554/eLife.05615
- Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjørbæk C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. 1997. Ligand-independent Activation Domain in the N Terminus of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ). *J Biol Chem* **272**:20230–20235. doi:10.1074/jbc.272.32.20230
- Williams S V., Hurst CD, Knowles MA. 2013. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum Mol Genet* **22**:795–803. doi:10.1093/hmg/ddt486
- Wilson TE, Fahrner TJ, Milbrandt J. 1993. The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol Cell Biol* **13**:5794–5804. doi:10.1128/MCB.13.9.5794
- Wong YN, Litwin S, Vaughn D, Cohen S, Plimack ER, Lee J, Song W, Dabrow M, Brody M, Tuttle H, Hudes G. 2012. Phase II trial of cetuximab with or without paclitaxel in patients with advanced urothelial tract carcinoma. *J Clin Oncol*. doi:10.1200/JCO.2012.41.9572
- Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S, Hodge CL, Haase J, Janes J, Huss JW, Su AI. 2009. BioGPS: An extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol*. doi:10.1186/gb-2009-10-11-r130
- Wu X-R. 2005. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* **5**:713–725. doi:10.1038/nrc1697
- Wu X-R, Manabe M, Jun Y, Sun T-T. 1990. Large Scale Purification and Immunolocalization of Bovine Uroplakins I, II, and III. *J Biol Chem* **265**:19170–19179.
- Yamashita D, Yamaguchi T, Shimizu M, Nakata N, Hirose F, Osumi T. 2004. The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor γ is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain. *Genes to Cells* **9**:1017–1029. doi:10.1111/j.1365-2443.2004.00786.x
- Yang DR, Lin SJ, Ding XF, Miyamoto H, Messing E, Li LQ, Wang N, Chang C. 2013. Higher expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ or its activation by agonist thiazolidinedione-rosiglitazone promotes bladder cancer cell migration and invasion. *Urology*. doi:10.1016/j.urology.2012.12.027
- Ye F, Lemieux H, Hoppel CL, Hanson RW, Hakimi P, Croniger CM, Puchowicz M, Anderson VE, Fujioka H, Stavnezer E. 2011. Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Mediates a Ski Oncogene-induced Shift from Glycolysis to Oxidative Energy Metabolism. *J Biol Chem* **286**:40013–40024. doi:10.1074/jbc.M111.292029
- Yoon HG, Chan DW, Huang ZQ, Li J, Fondell JD, Qin J, Wong J. 2003. Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: The roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *EMBO J* **22**:1336–1346. doi:10.1093/emboj/cdg120
- Yoshimura R, Matsuyama M, Segawa Y, Hase T, Mitsunashi M, Tsuchida K, Wada S, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T. 2003. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human urinary bladder carcinoma and growth inhibition by its

- agonists. *Int J Cancer* **104**:597–602. doi:10.1002/ijc.10980
- Yoshinaga SK, Peterson CL, Herskowitz I, Yamamoto KR. 1992. Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science* (80-). doi:10.1126/science.1360703
- Yu J, Manabe M, Wu X, Xu C, Sun T. 1990. Uroplakin I: A 27-kD Protein Associated with the Asymmetric Unit Membrane of Mammalian Urothelium **111**:1207–1216.
- Yu VC, Delsert C, Andersen B, Holloway JM, Devary O V., Näär AM, Kim SY, Boutin JM, Glass CK, Rosenfeld MG. 1991. RXR β : A coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* **67**:1251–1266. doi:10.1016/0092-8674(91)90301-E
- Yuan CX, Ito M, Fondell JD, Fu ZY, Roeder RG. 1998. The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor- associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci*.
- Zamir I, Dawson J, Lavinsky RM, Glass CK, Rosenfeld MG, Lazar MA. 1997. Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex. *Proc Natl Acad Sci* **94**:14400–14405.
- Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoutte J, Johnson DS, Bernstein BE, Nussbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Shirley XS. 2008. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol*. doi:10.1186/gb-2008-9-9-r137
- Zhang Y, Yu J, Grachtchouk V, Qin T, Lumeng CN, Sartor MA, Koenig RJ. 2016. Genomic binding of PAX8-PPARG fusion protein regulates cancer-related pathways and alters the immune landscape of thyroid cancer. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.14050
- Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK. 1997. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem*. doi:10.1074/jbc.272.41.25500
- Zieleniak A, Wójcik M, Woźniak LA. 2008. Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **56**:331–345. doi:10.1007/s00005-008-0037-y

Chapitre I

Caractérisation du rôle protumorigénique de
PPAR γ dans les tumeurs de la vessie

MUTATIONS RECURRENTES ACTIVATRICES DE PPAR γ ASSOCIEES AUX TUMEURS LUMINALES

I. Résumé

L'hétérodimère PPAR γ /RXR α possède un rôle prépondérant dans les tumeurs lumineales de la vessie. Son activité transcriptomique permet une promotion de la viabilité cellulaire au sein de la tumeur, ainsi qu'un remodelage du micro-environnement tumoral menant à une évacion du système immunitaire. Des études ont montré que cette activation de la voie PPAR γ peut avoir lieu par des gains et amplifications de PPAR γ lui-même, mais aussi par des mutations activatrices de RXR α , aboutissant à une sur-expression de leurs gènes cibles. Dans cette étude, nous avons identifié huit mutations récurrentes de PPAR γ associées aux tumeurs du sous-groupe luminal présentant une forte expression de ses gènes cibles.

Six de ces mutations présentent une activité transcriptionnelle plus forte que la forme sauvage dans des expériences de *reporter-assay*. J'ai retrouvé cette augmentation de l'activité de la protéine pour cinq d'entre elles dans un contexte de lignée de tumeur de vessie, en regardant l'impact de la sur-expression des formes sauvage et mutées de la protéine sur l'expression de gènes cibles connus de PPAR γ . Tout comme les tumeurs présentant des amplifications de PPAR γ , celles présentant une mutation de ce gène sont dépendantes de son expression pour leur viabilité cellulaire, comme montré dans un contexte de lignée cellulaire présentant une des cinq mutations récurrentes activatrices identifiées dans cette étude, la mutation T475M.

En collaboration avec les équipes de Natacha Rochel et de Roland Stote de l'IGBMC de Strasbourg, nous avons montré que trois de ces mutations (M280I, I290M et T475M) entraînent une interaction plus forte de la protéine avec les co-activateurs, et ainsi, une activité transcriptionnelle plus forte. La mutation T475M, située à l'interface de dimérisation, tout comme les mutations récurrentes de RXR α , conduisent également à une plus grande affinité entre les deux partenaires. Ces trois mutations sont responsables d'une modification de la conformation de la protéine, qui conduit à une stabilisation de l'hélice H12 en conformation active, et donc, à une sur-activation globale de la protéine.

Il existe donc dans les tumeurs lumineales de vessie, en plus des amplifications de PPAR γ et des mutations activatrices de RXR α , des mutations activatrices de PPAR γ , conduisant à une sur-activation de l'hétérodimère et renforçant son rôle pro-tumorigénique au sein de ce sous-groupe. Cette étude a ainsi permis de mieux comprendre les mécanismes entraînant

l'activation de la voie PPAR γ , cependant, les mécanismes sous-jacent sont encore incompris. Il sera donc essentiel à l'avenir, afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints de ce type de tumeur, de mieux comprendre l'impact de cette activation de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α sur la tumeur et sur le programme transcriptionnel qu'il régule.

II. Recurrent activating mutations of PPAR γ associated with luminal bladder tumors

(Rochel et al., 2019)

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-018-08157-y>

OPEN

Recurrent activating mutations of PPAR γ associated with luminal bladder tumors

Natacha Rochel¹ , Clémentine Krucker^{2,3}, Laure Coutos-Thévenot^{2,3}, Judit Osz¹, Ruiyun Zhang^{2,3,9}, Elodie Guyon^{2,3}, Wayne Zita¹, Séverin Vanthong¹, Oscar Alba Hernandez⁴, Maxime Bourguet⁴, Kays Al Badawy¹, Florent Dufour^{2,3}, Carole Peluso-Iltis¹, Syrine Heckler-Beji¹, Annick Dejaegere¹, Aurélie Kamoun⁵ , Aurélien de Reyniès⁵, Yann Neuzillet^{2,3} , Sandra Rebouissou^{2,3,10}, Claire Béraud⁶, Hervé Lang⁷, Thierry Massfelder⁸, Yves Allory^{2,3}, Sarah Cianférani⁴, Roland H. Stote¹, François Radvanyi^{2,3} & Isabelle Bernard-Pierrot^{2,3}

The upregulation of PPAR γ /RXR α transcriptional activity has emerged as a key event in luminal bladder tumors. It renders tumor cell growth PPAR γ -dependent and modulates the tumor microenvironment to favor escape from immuno-surveillance. The activation of the pathway has been linked to PPARG gains/amplifications resulting in PPAR γ overexpression and to recurrent activating point mutations of RXR α . Here, we report recurrent mutations of PPAR γ that also activate the PPAR γ /RXR α pathway, conferring PPAR γ -dependency and supporting a crucial role of PPAR γ in luminal bladder cancer. These mutations are found throughout the protein—including N-terminal, DNA-binding and ligand-binding domains—and most of them enhance protein activity. Structure-function studies of PPAR γ variants with mutations in the ligand-binding domain allow identifying structural elements that underpin their gain-of-function. Our study reveals genomic alterations of PPARG that lead to pro-tumorigenic PPAR γ /RXR α pathway activation in luminal bladder tumors and may open the way towards alternative options for treatment.

¹ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale (INSERM), U1258/Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), UMR7104/Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France. ² Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR144, Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, 75005 Paris, France. ³ Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, CNRS, UMR144, 75005 Paris, France. ⁴ Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, 67000 Strasbourg, France. ⁵ Ligue Nationale Contre le Cancer, Programme Cartes d'Identité des Tumeurs (CIT), 75013 Paris, France. ⁶ UROLEAD SAS, School of Medicine, 67085 Strasbourg, France. ⁷ Department of Urology, Nouvel Hôpital Civil Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg, France. ⁸ INSERM UMR5113, Section of Cell Signalization and Communication in Kidney and Prostate Cancer, INSERM and University of Strasbourg, School of Medicine, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), 67085 Strasbourg, France. ⁹ Present address: Department of Urology, Ren Ji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China. ¹⁰ Present address: INSERM, UMR-1162 "Génomique Fonctionnelle des tumeurs solides", 75010 Paris, France. These authors contributed equally: Clémentine Krucker, Laure Coutos-Thévenot. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.R. (email: rochel@igbmc.fr) or to I.B.-P. (email: isabelle.bernard-pierrot@curie.fr)

PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) is a transcription factor of the nuclear receptor family that functions predominantly as a heterodimer with RXR α . PPAR γ is a key regulator of glucose homeostasis and adipogenesis^{1,2}. In addition to its well established role in adipocyte differentiation, it has also been shown to be involved in differentiation in several tissues including the urothelium³. Its role in cancer is far less understood. Historically, *PPARG* was considered to be a tumor suppressor⁴, but several studies showed that it displays pro-tumorigenic effects in neuroblastoma, metastatic prostate cancer, and bladder carcinoma^{4–8}.

In bladder cancer, the fourth most frequent cancer in men in industrialized countries, *PPARG* focal amplifications, resulting in PPAR γ and PPAR γ target genes overexpression were observed in 12–17% of the muscle-invasive bladder carcinomas (MIBC) and in 10% of the non-muscle-invasive bladder carcinomas (NMIBCs)^{7,9}. These copy number alterations of *PPARG* are associated with luminal tumors, a subtype of bladder tumors accounting for 75% of non-muscle-invasive bladder carcinomas (NMIBCs)^{9,10} and 60% of muscle-invasive bladder carcinomas (MIBCs)¹¹. The luminal MIBCs have been shown to display a PPAR γ activation signature^{7,12}. We previously demonstrated that PPAR γ overexpression induces an oncogenic addiction in these tumors by showing that the loss of PPAR γ expression inhibited bladder cancer cell viability⁷, most notably observed in cell lines presenting *PPARG* gain or amplification^{6,8}. Recurrent mutations of RXR α (S242F/Y) have also been identified in 5% of MIBCs and the luminal subgroup of MIBC tumors is enriched in these mutations^{9,13}. These RXR α mutations are gain-of-function mutations that promote ligand-independent activation of PPAR γ signaling pathway^{13,14}. They drive proliferation of urothelial organoids in a tumor suppressor loss context¹⁴, render bladder tumor cell growth PPAR γ -dependent¹⁴ and promote immune evasion in MIBCs¹¹. Hyper-activation of PPAR γ signaling, either due to *PPARG* gene amplification or an RXR α hotspot mutation (S427 F/Y), can be pharmacologically inhibited with PPAR γ -selective inverse agonists that decrease the viability of PPAR γ -dependent bladder cancer cells. This highlights PPAR γ as a therapeutic target in luminal bladder tumors⁸.

Given this crucial role of the PPAR γ /RXR α pathway in bladder tumors, in this work, we search for other genetic alterations that could drive its activation in both NMIBC and MIBC. By sequencing PPAR γ and RXR α in 359 tumors and studying publicly available data for 455 MIBC, we identify eight recurrent mutations of PPAR γ associated with luminal tumors. Functional analyses reveal that five of these mutations enhance the transcriptional activity of PPAR γ and that the activation of PPAR γ pathway confers a PPAR-dependence to the cells. Biochemical analyses show that PPAR γ mutations favor the recruitment of coregulators. Finally, by a structure-function analysis of three mutations affecting the ligand-binding domain of PPAR γ , we demonstrate that these mutations promote the adoption of PPAR γ active state accounting for the recruitment of coactivators. Our study provides additional genetic evidence for a pro-tumorigenic role of PPAR γ in bladder cancer and strengthens the importance of the PPAR γ /RXR α pathway in luminal bladder cancer.

Results

Recurrent mutations of PPAR γ and RXR α in bladder tumors.

Using the conventional Sanger's method, we sequenced the *PPARG* and *RXRA* exons in 359 bladder tumors (199 of which were NMIBCs) from our CIT series of tumors (carte d'identité des tumeurs) and from a bank of samples collected at Strasbourg hospital, and in 25 bladder cell lines (Supplementary Table 1). We

detected *PPARG* mutations in 3.9% of the tumors (14/359) and in one cell line, and *RXRA* mutations in 1.7% of the tumors (6/338), all of which being MIBC, and in one cell line (Fig. 1a and Supplementary Tables 2 and 3). We also analyzed publicly available deep sequencing data from The Cancer Genome Atlas⁹ genomic databases (405 MIBC samples)¹⁰ (<http://cancergenome.nih.gov>) and from the Dana Farber & Memorial Sloan Kettering (MSKCC) cohort¹⁵ (50 MIBC samples) (Supplementary Table 1). We detected a comparable *PPARG* mutation rate, 3.1% of the tumors (14/455), but a higher *RXRA* mutation rate, 6.1% of the tumors (28/455) (Fig. 1a and Supplementary Tables 2 and 3) in these tumor series compared to the previous tumor series analyzed. This higher mutation rate was mostly due to the absence of *RXRA* mutation in NMIBC in the CIT series of tumors. *PPARG* mutations were not mutually exclusive with either *RXRA* mutations ($p = 1$ and $p = 0.2105$ for conventional and next-generation sequencing, respectively) or *PPARG* amplification ($p = 1$ and $p = 1$ for conventional and next-generation sequencing, respectively), as shown by Fisher's exact test analyses. Two mutations (E3K and D7N) were specific to the PPAR γ 2 isoform (NM_015869) (Supplementary Table 2). We therefore numbered all mutations relative to this isoform, which is 28 amino acids longer than the PPAR γ 1 isoform (NM_138712) at the N-terminal end. The PPAR γ 2 isoform is expressed principally in adipocyte cells, as well as in urothelial cells, whereas PPAR γ 1 is ubiquitously expressed. As we aimed to identify genetic alterations that could activate the PPAR γ /RXR α pathway, we focused on recurrent mutations that were likely to be gain-of-function mutations. Of the 21 unique PPAR γ mutations identified here in bladder tumors, 6 were recurrent and occurred in both MIBC and NMIBC (Fig. 1b and Supplementary Table 2). Using publicly available data from the COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) or cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) databases, we determined whether the 21 PPAR γ mutations identified here were also present in other bladder tumors or in other tumor types. From this analysis, we found a seventh recurrent mutation (E3K) in bladder tumors (Fig. 1b and Supplementary Tables 2 and 4). Interestingly, four of these seven recurrent mutations and one unique mutation (M280I) identified in bladder tumors were also reported in other type of tumors in these databases, strengthening their likelihood to be activating mutations (Fig. 1b and Supplementary Table 4). We therefore considered in total of eight recurrent mutations of PPAR γ for further studies (Fig. 1b, c). These recurrent PPAR γ mutations ($p = 0.015$) and *PPARG* amplifications ($p = 1.5 \times 10^{-5}$) were significantly enriched in bladder tumors presenting a PPAR γ activation signature, which were mostly luminal tumors ($p = 2.2 \times 10^{-16}$), as shown by Fisher's exact test. These mutations affect different major functional domains of the PPAR γ protein: the N-terminal domain (E3K) including the area around the EGFR phosphorylation sites (S112) (P113S), the DNA-binding domain (R164W, R168K), the ligand-binding domain (S249L, T475M) including the area spatially close to the CDK5 phosphorylation site, S273 [(M280I, I290M)] (Fig. 1b, c). Visualization of recurrent mutations in the three-dimensional (3D) structure of the PPAR γ /RXR α heterodimer revealed that the most frequent recurrent mutation of PPAR γ (T475M) and the hotspot mutation of RXR α (S427Y/F) affected residues that co-localized spatially at the PPAR γ /RXR α dimer interface, suggesting that both these mutations would affect heterodimer formation (Fig. 1c). Accordingly, RXR α (S427Y/F) mutations have been shown to enhance RXR α interaction with PPAR γ and activation of the PPAR γ /RXR α pathway¹³.

Recurrent mutations of PPAR γ are gain-of-function. We investigated the functional impact of seven of the eight recurrent mutations of PPAR γ identified on the transcriptional activity

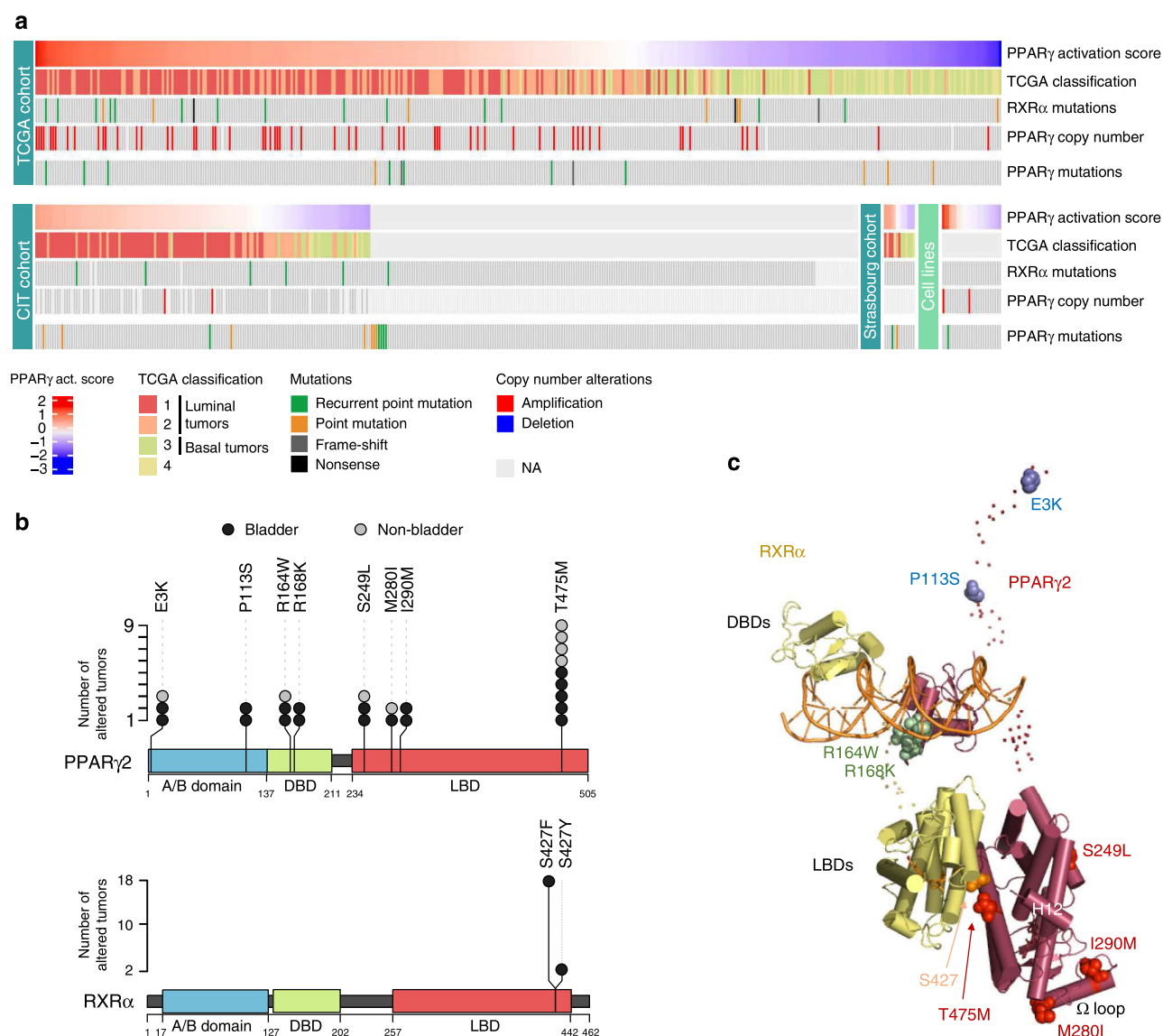


Fig. 1 Mutations of *PPAR γ* and *RXR α* in bladder tumors. **a** Oncoprints of *PPAR γ* and *RXR α* mutations in three series of bladder tumors and a panel of 25 bladder tumor cell lines. Samples were sorted by *PPAR γ* activation score when transcriptomic data were available. Source data are provided as a Source Data file. **b** Lollipop representations of recurrent mutations of *PPAR γ* (upper panel) and *RXR α* (lower panel) identified in the 859 bladder tumors studied here (black circles) or in publicly available data available for other bladder tumors and other types of cancer from the COSMIC and cBioPortal databases (Supplementary Table 4) (gray circles). Sequences are numbered according to the *PPAR γ* 2 isoform. A/B: N-terminal domain; DBD: DNA-binding domain; LBD: ligand-binding domain (LBD). **c** Position of the residues affected by the recurrent *PPAR γ* and *RXR α* mutations on the full-length *PPAR γ* -*RXR α* -DNA-coactivator peptide solution structure⁵¹. The folded domains are shown in cartoon representation and the disordered hinges and NTDs are shown as dots. The mutated residues are shown as spheres. The residues mutated in *PPAR γ* are colored in blue (A/B domain), green (DBD), and red (LBD). The residue mutated in *RXR α* is colored in orange. Source data are provided as a Source Data file

of the protein in HEK293FT cells, using a luciferase reporter gene containing three copies of the DR1 sequence of *PPAR γ* DNA response element (PPRE) arranged in tandem and linked to the thymidine kinase promoter (PPRE-3 $\times$ -TK)¹⁶. The *PPAR γ* P113S, R168K, S249L, M280I, I290M, and T475M mutant proteins had significantly higher levels of transcriptional activity than the wild type (WT) in the absence of exogenous ligand (two to six times higher), whereas the R164W mutant, which is located in the DNA-binding domain, had levels of activity similar to that of the WT (Fig. 2a). Similar results were obtained in the presence of 1 μ M rosiglitazone, a synthetic *PPAR γ* ligand (Supplementary Fig. 1A). Consistent with these findings, overexpression of the *PPAR γ* mutants P113S, S249L, M280I, I290M,

and T475M, in 5637 cells, in the absence of exogenous *PPAR γ* ligand, significantly enhanced the expression of several known *PPAR γ* target genes (*FABP4*, *ACSL5*, and *PLIN2*) relative to the WT, as shown by RT-qPCR (Fig. 2b and Supplementary Fig. 1B, C). However, overproduction of both the R164W and R168W mutant proteins had an impact on *PPAR γ* target gene expression similar to that of the WT protein (Fig. 2b). Similar results were obtained in presence of 500 nM rosiglitazone (Supplementary Fig. 1D). By combining the results of these two different approaches to measure *PPAR γ* transcriptional activity, we clearly showed that five of the seven recurrent *PPAR γ* mutations analyzed were gain-of-function mutations. The remaining two mutations, R164W and R168K, had no clear apparent

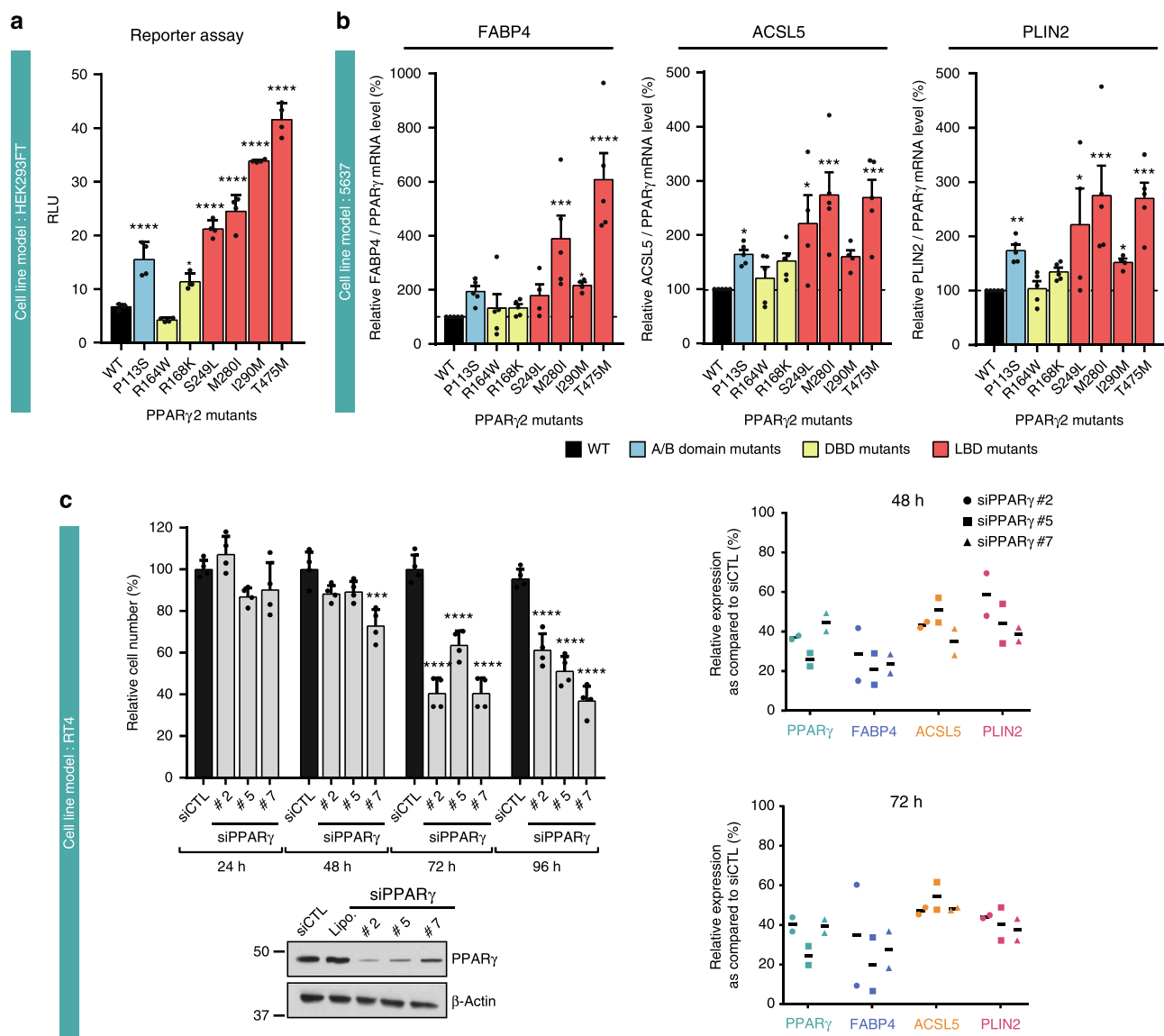


Fig. 2 Transcriptional activity of recurrent PPAR γ mutants. **a** A reporter plasmid containing the firefly luciferase gene under the control of a PPRE-X3-TK promoter was co-expressed in HEK293FT cells with a pcDNA3 vector encoding wild-type (WT) or mutant (P113S, R164W, R168K, S249L, M280I, I290M, T475M) PPAR γ 2. *Renilla* luciferase, expressed under the control of the CMV promoter, was used to normalize the signal. The data shown are the means $\pm$ SD of one representative experiment conducted in sextuplicate. The results for each mutant were compared with those for the WT in Dunnett's multiple comparisons test, * $0.01 < p < 0.05$; **** $p < 0.0001$. **b** 5637 cells were transiently transfected with a pcDNA3 vector encoding WT or mutant (P113S, R164W, R168K, S249L, M280I, I290M, T475M) PPAR γ . The expression of all PPAR γ forms was checked by western blotting and quantified by RT-qPCR (Supplementary Fig. 1B). The effect of WT PPAR γ 2 expression on three PPAR γ target genes was evaluated by RT-qPCR (Supplementary Fig. 1C). The expression of PPAR γ target genes was normalized against PPAR γ expression and is expressed as percentage of stimulation relative to the expression induced by WT PPAR γ . The data are presented as the mean $\pm$ SD of four independent experiments. The results for each mutant were compared with those for the WT in Dunnett's multiple comparisons test: * $0.01 < p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.01$; *** $0.0001 < p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. **c** PPAR γ knockdown with three different siRNAs in RT4 cells harboring the PPAR γ T475M mutation. PPAR γ expression was evaluated by western blotting (lower left panel) 96 h after transfection, living cells were counted (upper left panel) 24, 48, 72, and 96 h after transfection. Data are presented as means $\pm$ SD of three independent experiments performed in duplicate. The results for each mutant were compared with those for the WT in Dunnett's multiple comparisons test: * $0.01 < p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.01$; *** $0.0001 < p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. The expression levels of three PPAR γ target genes were assessed by RT-qPCR for two independent experiments at 48 and 96 h after transfection (right panel). Data for each experiment are represented. **a–d** Source data are provided as a Source Data file

effect on PPAR γ activity in these two assays. Interestingly, the most frequent mutation, T475M, induced a slightly higher increase in the ligand-independent transcriptional function of PPAR γ as compare to any of the recurrent mutations considered (Fig. 2a, b). We used the RT4 cell lines harboring the PPAR γ -T475M mutation to demonstrate that, like *PPARG* WT amplification in SD48 and UMUC9 cells⁷ and RXRA

-S427F mutation in HT1197^{8,13} cells, PPAR γ mutations render tumor cell growth PPAR γ -dependent and regulate PPAR γ target genes expression. Indeed, PPAR γ depletion with siRNAs significantly inhibited, in a time-dependent manner, the growth of RT4 cells (Fig. 2c, left panel) and the expression of several known PPAR γ target genes (*FABP4*, *ACSL5*, and *PLIN2*) (Fig. 2c, right panel).

PPAR γ LBD mutations favor its interactions with coregulators.

We then used biochemical and biophysical analysis to understand how three mutations located in the ligand-binding domain of PPAR γ (M280I, I290M and T475M) promote PPAR γ activity. As bacterially expressed PPAR γ may contain fatty acids¹⁷, the purified PPAR γ LBD WT and mutants (Supplementary Figs. 2 and 3) were analyzed by native electrospray mass spectrometry (Supplementary Fig. 4). The results indicated the absence of any bound ligands. The addition of the potent full PPAR γ agonist, GW1929, an N-aryl tyrosine derivative¹⁸ and coactivator peptide led to the formation of ternary complexes for all constructs (Supplementary Fig. 4, right panel). We characterized the interaction between the ligand-binding domains of the PPAR γ WT and mutants and the WT RXR α monomer by analytical ultracentrifugation (Supplementary Fig. 5A), which showed that as for the WT, all mutant proteins were able to form heterodimer with

RXR α . To further quantify the interaction between monomeric PPAR γ and RXR α ligand-binding domains, we used surface plasmon resonance (SPR) (Fig. 3a and Supplementary Fig. 5B, C). PPAR γ T475M, localized at the dimer interface, exhibits an increase by 2-fold of the binding affinity to RXR α compared to PPAR γ WT (Fig. 3a), as a consequence of a slower dissociation rate of the dimer (Supplementary Fig. 5B, C). In RXR α the S427F mutation is also spatially localized at the PPAR γ /RXR α dimer interface, and it has been shown to similarly stabilize the heterodimer¹³. In contrast, PPAR γ M280I shows similar affinity for RXR α as PPAR γ WT.

The functional profile of PPAR γ , analogous to many other nuclear receptors, is determined by the selective use of transcriptional coregulators that ultimately control the transcriptional output of the target genes. The recruitment of coactivators by PPAR γ is primarily determined by the interaction of

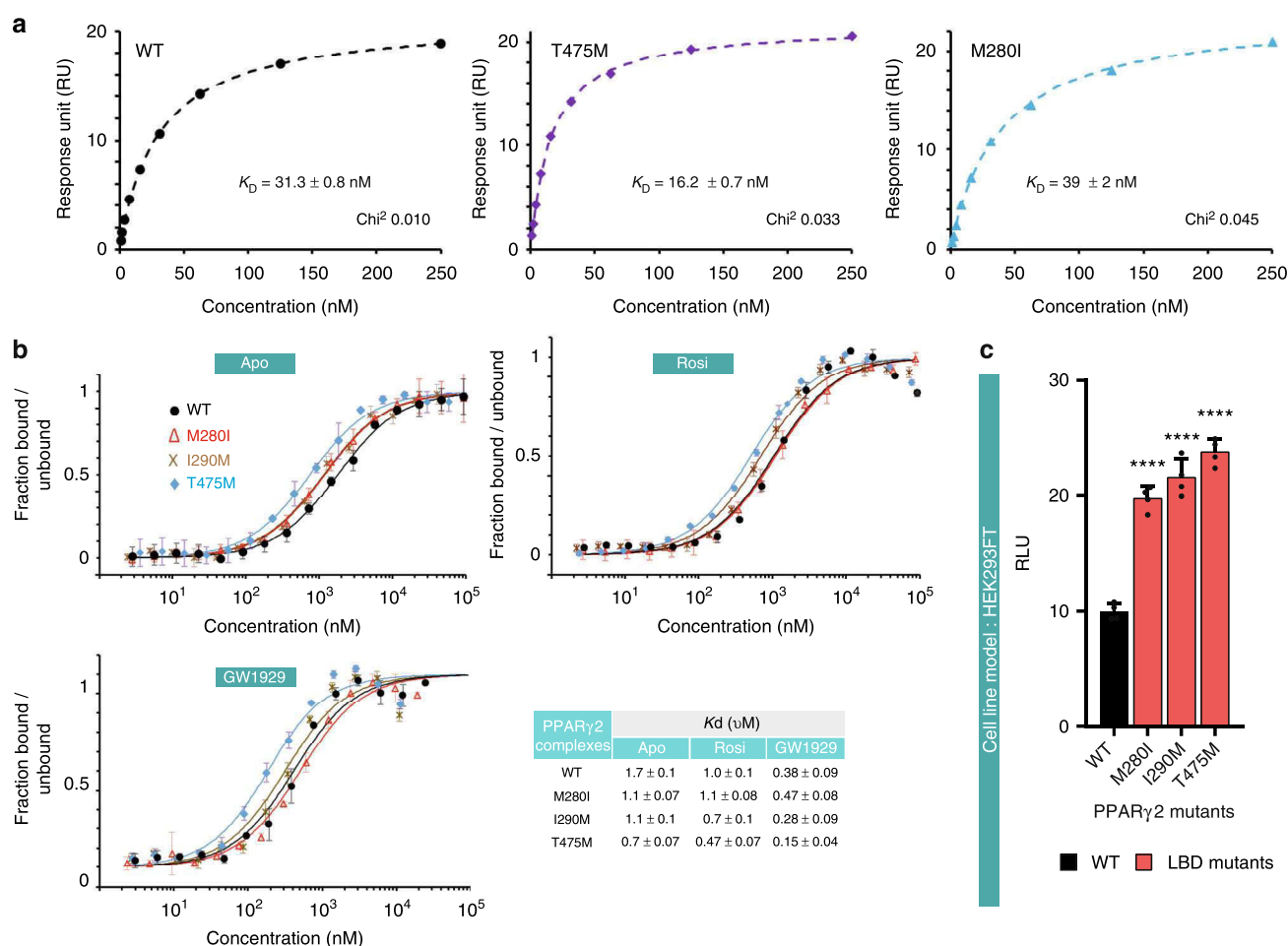


Fig. 3 Effect of the PPAR γ mutations on RXR α and coactivator interactions. **a** Representative data set used for SPR (surface plasmon resonance) analysis of the interactions of PPAR γ WT or mutants with RXR α showing enhanced interaction between PPAR γ T475M and RXR α . Report point 4 s before injection stop was used for the analysis. Equilibrium responses are plotted as a function of total protein concentration and fit to simple 1:1 binding isotherms. Data analysis by 1:1 kinetic model and mean kinetic parameters and equilibrium dissociation constants are reported in Supplementary Fig. 4. **b** Effect of PPAR γ mutations on the PGC1 α peptide interaction. The binding affinity of the PGC1 α NR1 motif for the purified WT and mutant PPAR γ LBDs, as determined by microscale thermophoresis. Unlabeled PPAR γ LBD protein was titrated into a fixed concentration of fluorescently labeled PGC1 α peptide in the absence of ligand (top left), in the presence of three equivalents of rosiglitazone (top right) or of three equivalents of GW1929 (bottom left). Isotherms averaged over three consecutive measurements and fitted according to the law of mass action to yield the apparent K_d . Each plot is representative of at least two independent experiments performed with different batches of protein preparation. **c** Mammalian two-hybrid analysis reveals increased interaction of PPAR γ mutants (M280I, I290M and T475M) with MED1 coactivator domain. pG5-Firefly luciferase reporter plasmid was co-expressed with VP16-PPARG (WT or mutants) and with GAL4-DNA-binding domain-fused MED1. *Renilla* luciferase, expressed under the control of the CMV promoter, was used to normalize the signal. The data shown are the means $\pm$ SD of one representative experiment conducted in quadruplicate. Results (means $\pm$ SD) of three independent experiments are also provided as Supplementary Fig. 16. The results for each mutant were compared with those for the WT in Dunnett's multiple comparisons test, * $0.01 < p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.01$. **a–c** Source data are provided as a Source Data file

coactivator LXXLL motifs with the receptor LBD. To analyze the functional consequences of the mutations in the LBD, coactivator peptide recruitment by the LBD was monitored. We measured the interaction between monomeric WT or mutant forms of PPAR γ and a fluorescently labeled coactivator peptide of PGC1 α (PPARGC1A), by MicroScale Thermophoresis. In the absence of ligand, the three mutations enhanced the interaction with coactivator peptide compared to PPAR γ WT (Fig. 3b). The addition of a full agonist, rosiglitazone (Fig. 3b), enhanced the interaction between PPAR γ and PGC1 α coactivator peptide for PPAR γ I290M and T475M, but not for PPAR γ M280I. The addition of another potent full agonist of PPAR γ , GW1929, enhanced yet again the interaction for all mutants, as well as the WT (Fig. 3b). Consistent with the functional data (Fig. 2a, b), monomeric PPAR γ T475M had the highest affinity for the coactivator peptides (Fig. 3b). This strongest structural stabilizing effect of T475M mutant on PPAR γ -coactivator peptide complex was also observed by ion mobility mass spectrometry which showed significantly improved gas phase stability in collision induced experiments of T475M compared to WT and other PPAR γ mutants (Supplementary Figs. 6 and 7). Mammalian two-hybrid assay in HEK293FT cells using VP16-fused PPAR γ

(WT, M280I, I290M, and T475M), GAL4-DNA-binding domain-fused coactivator MED1 and pG5-LUC reporter confirmed that in the context of full protein, the three mutations enhanced interaction with MED1 coactivator domain compared to PPAR γ WT (Fig. 3c). Together, these data suggest that the three mutations considered, M280I, I290M and T475M, promote the adoption of an agonist conformation by PPAR γ in the absence of ligand, thereby enhancing coactivator interaction.

PPAR γ LBD mutations stabilize an active conformation. To gain structural insight into the mechanism responsible for the increases in activity and coactivator interaction, we analyzed the structures of the PPAR γ LBD T475M, M280I and I290M mutants (Supplementary Table 5). The PPAR γ T475M LBD mutant was crystallized in its apo form and in complex with GW1929 and the PGC1 α coactivator peptide (Fig. 4a and Supplementary Fig. 8). In both functional states, PPAR γ T475M crystallized as a homodimer. More than 150 crystal structures of the PPAR γ LBD have been deposited in the Protein Data Bank (www.rcsb.org)¹⁹, and in many of them, the PPAR γ LBD crystallized as a homodimer displaying the canonical dimer interface observed in the heterodimer complex. Of these structures, the apo protein and some

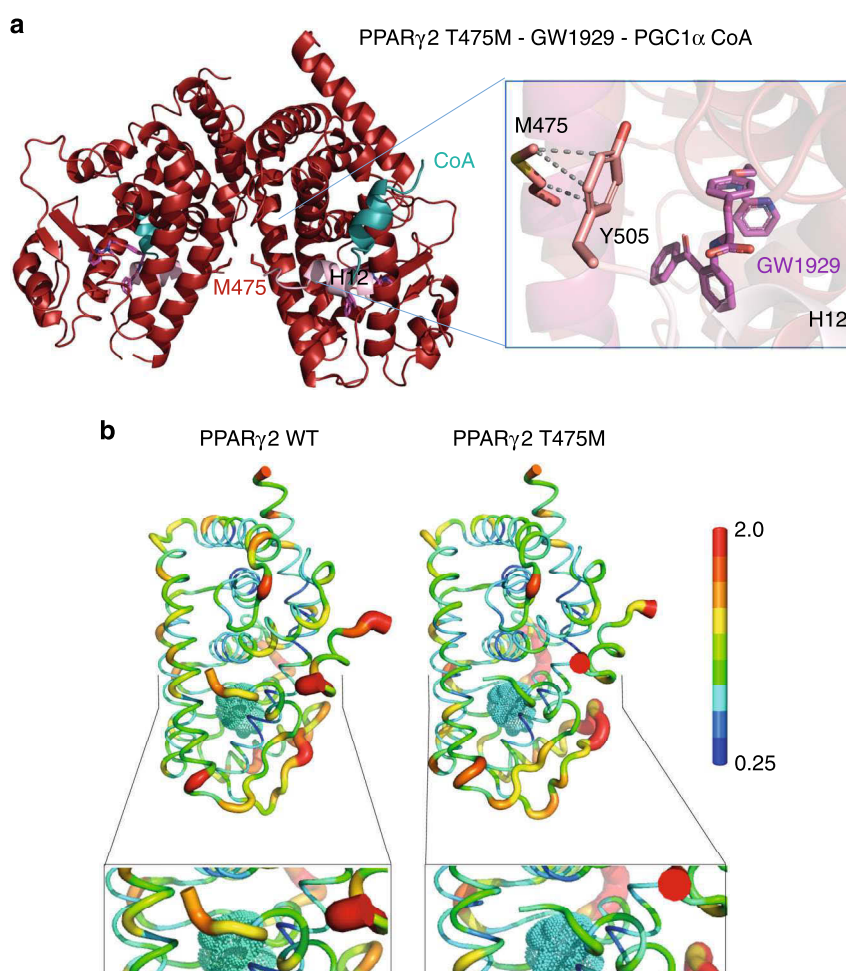


Fig. 4 Structural properties of PPAR γ T475M. **a** Crystal structure of the PPAR γ T475M LBD (red) in complex with GW1929 (violet) and the PGC1 α coactivator peptide (blue). The C-terminal H12 helices are shown in light pink. Overall fold of the homodimer complex, showing the T475M mutations at the dimer interface as a stick representation. Right: Close-up of the regions around the mutation, showing its interactions with the terminal Y505 residue responsible for stabilizing the agonist conformation. **b** The PPAR γ T475M mutation modulates the structural dynamics of the LBD. Mean structure and atomic fluctuations of the holo PPAR γ WT LBD-coactivator (left) and holo PPAR γ T475M LBD-coactivator (right) complexes, with the rosiglitazone ligand (in cyan), and the scale of flexibility shown. Bottom: Close-up of the C-terminal H12 helix of the WT and mutant LBDs, as determined from molecular dynamics simulations

complexes with partial agonists display one monomer in an active conformation and one monomer in an inactive conformation with a different positioning of helix 12^{20,21}. Helix 12 is key regulatory structural element in the activation function 2 interacting with coregulators. These 2 conformations are generally designated as fully active and inactive²¹. Although these helix 12 conformations observed in the crystal structures are influenced to some degree by crystal packing, they reflect the dynamic character of helix 12 in absence or in presence of a partial agonist ligand. This was further confirmed by solution structural methods²². Interestingly, in contrast to the structures of WT PPAR γ in its apo form, PPAR γ T475M apo displays an agonist conformation in both homodimer LBDs, indicating a stabilization of helix 12 in an active conformation even in absence of any agonist ligand (Supplementary Fig. 8).

In a similar way, the holo PPAR γ T475M-GW19129-PGC1 α ternary complex crystallized as a homodimer (Fig. 4a) and the structure agrees with the crystal structure of another N-aryl tyrosine derivative complex, GI262570²³. The GW1929 ligand binds in a U-shaped conformation with the carboxyl group of GW1929 making hydrogen bonds with S317, H351, H477, and Y501 (Supplementary Fig. 9). The pyridinyl tail is directed towards the β -sheet and its nitrogen atom makes an H-bond with a bound water molecule. The benzophenone attached to the N-aryl tyrosine, also present in GI262570, forms additional hydrophobic interactions, not available to rosiglitazone, explaining their increased PPAR γ binding affinity and enhanced coactivator interaction^{18,22,24}. The mutated residue T475M interacts with the C-terminal Y505 (Fig. 4a) stabilizing helix 12 into the active conformation and leading to a more stable interaction with the coactivator peptide. Interestingly, a similar interaction stabilizing PPAR γ in the active agonist conformation was observed in the crystal structure of a heterodimer complex of holo WT PPAR γ and the RXR α S427F mutant¹³. A similar observation was made by molecular dynamics (MD) simulations of the WT²⁰ and T475M PPAR γ LBD (Fig. 4b). Starting from a previously determined crystal structure of the WT protein²⁰, the point mutation was modeled into the WT structure. Separate 100 ns simulations of monomeric WT and T475M mutant PPAR γ LBDs in both apo form and in complex with rosiglitazone were performed. We found that the T475M mutation decreased the structural flexibility of the protein, particularly that of the C-terminal H12 helix (Fig. 4b), through direct interaction between the M475 and the C-terminal Y505, as observed in the structure of PPAR γ T475M in complex with GW1929. In the WT structure, the analogous interaction (between T475 and Y505) does not appear; the M475–Y505 interaction formed during the molecular dynamics simulations (Supplementary Fig. 10). The decrease in the flexibility of the C-terminal H12 helix in the T475M mutant led to a lower flexibility of the coactivator peptide, resulting in a more stable complex. Free energies of coactivator interaction were calculated by the MM/GBSA²⁵ method on 100 structures taken from the MD simulations at regular intervals. This analysis yielded binding energy estimates of -43 ± 7 kcal/mol and -48 ± 5 kcal/mol for WT PPAR γ and for the T475M mutant, respectively, consistent with the trends observed in the experimental data of coactivator interaction. In this application, the MM/GBSA binding energies are used to rank interactions and not to calculate absolute binding-free energies.

As the T475M mutation is located at the dimer interface, we modeled the structure of the heterodimer formed by PPAR γ T475M (Supplementary Fig. 11). The results suggest that T475M will strengthen the heterodimer through interactions with L430 and S427 in contrast to WT, in agreement with the experimental data. Molecular dynamics simulations of a PPAR γ -T475M/RXR α heterodimer model showed that the heterodimer is more

structurally stable than the WT and, as observed in the monomer simulations, the coactivator peptide displayed reduced flexibility (Supplementary Fig. 11C). Thus, our structural analysis of PPAR γ T475M indicates that the mutation stabilizes PPAR γ helix 12 in the active conformation as well as the heterodimer with RXR α , leading to a stronger binding to coactivators. This mechanism may explain PPAR γ -dependent transcription program activation.

The two other mutants of interest here are localized in the Ω loop of the PPAR γ LBD; M280I is in the helix 2' of the Ω loop and I290M is in the loop between helix 2' and helix 3. The Ω loop is often poorly defined in the electron density maps of the published structures of PPAR γ , adopting varying conformations depending on the nature of the ligand. It is thought to serve as a gate to the ligand-binding pocket²⁶ and also serve as an alternative ligand-binding site for some ligands^{27,28}. The PPAR γ M280I LBD crystallized in complex with GW1929 and PGC1 α peptide as a homodimer (Fig. 5a) and PPAR γ I290M in complex with GW1929 as a monomer (Supplementary Fig. 12B). The conformation and interactions of GW1929 in the PPAR γ LBDs is similar in all complexes (Supplementary Fig. 9A). While helix 2' is similarly positioned in all complexes, the flexible loop connecting helix 2' and helix 3 shows different conformations and is partially resolved in some complexes. The M280I mutant stabilizes helix 3, notably through specific interactions with V305 (Fig. 5a), that, in turn stabilizes PPAR γ in the agonist conformation. Recall that the coactivator interaction is via the activation function 2 coregulator surface composed of helix 3, 4, 5, and helix 12²⁰. For the I290M mutant, the surrounding loop connecting helix 2' and helix 3 shows some flexibility as indicated by the poor density of some side chains residues and higher temperature factors. However, the structural analysis of I290M–GW1929 complex indicates that I290M interacts more strongly with I369, which contacts the ligand (Supplementary Fig. 12B) and may stabilize the β -sheet, as well as helix 3. Following the protocol used in the previously described simulations, molecular dynamics simulations of the M280I and I290M LBDs were carried out. From the average structure calculated over the last 10 ns of each simulation, we found interactions that stabilized the Ω loop region via helix 3 and further stabilization of H12 activation function 2 for both the M280I and the I290M mutants. In the case of M280I mutant, I280 formed a stable interaction with V305 of H3, the N-terminal end of H3. This interaction was also seen in the crystal structure of the M280I mutant described above. In the I290M variant, M290 forms an interaction with Phe315 of H3, which interacts with His494 at the N-terminal end of H12. Stabilization of H12 leads to a stabilization of the coactivator peptide, as indicated by the decreased atomic fluctuations shown in Fig. 5b, which shows the rms fluctuations mapped onto the 3D surface of the proteins complexes. The free energies of coactivator binding to M280I and I290M were also estimated by the MM/GBSA method on structures taken from the MD simulations at regular intervals. The binding energies, -40 ± 7 kcal/mol and -45 ± 7 kcal/mol for M280I and I290M, respectively, are consistent with the trends observed in the experimental data of coactivator interaction. In particular, the mutant I290M shows an enhanced binding free energy with respect to the WT.

We used hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry (HDX–MS) to investigate complementary structural information about the effect of T475M and M280I mutations on PPAR γ structure. Of note, due to lack of reproducibility in HDX–MS data acquisition on I290M, these data were excluded from the present study. HDX–MS is a powerful readout to monitor protein conformational dynamics at peptide resolution, by monitoring the D exchange of amide hydrogens with deuterated solvent²⁴. In order to evidence PPAR γ point mutation

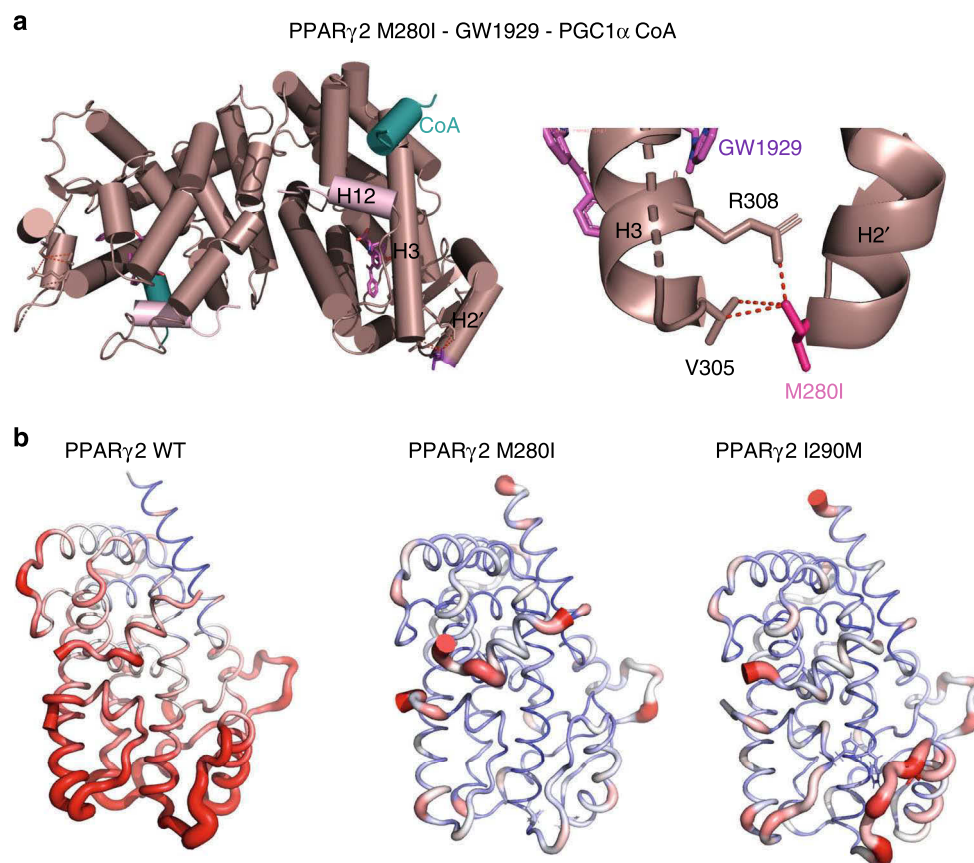


Fig. 5 Impact of PPAR γ M280I and I290M mutations on the structure and dynamics. **a** Crystal structure of the PPAR γ M280I LBD (plum) in complex with GW1929 (light red) and the PGC1 α coactivator peptide (blue). The C-terminal H12 are shown in light pink. Right: Close-up of the regions around the mutation, showing its interactions stabilizing helix 3. **b** The atomic fluctuations calculated from the molecular dynamics simulation (last 10 ns) of the holo form of PPAR γ complexes with rosiglitazone and coactivator peptide. The fluctuations are mapped onto the 3D surface of the proteins complexes. The color scale goes from blue (less flexible) to red (most flexible) between 0 and 2.5 Å. The thickness of the tube also reflects the flexibility (thicker corresponds to more flexible). Left: WT; middle: M280I; right: I290M

effects on secondary structures of PPAR γ /PGC1 α complexes, we performed pairwise comparison of deuterium uptakes of PPAR γ WT/PGC1 α to PPAR γ mutant/PGC1 α (Supplementary Fig. 13). For this, relative fractional uptakes (RFU) of PPAR γ mutants/PGC1 α were subtracted from the PPAR γ WT/PGC1 α RFU and the significance of the RFU difference plots was validated using the MEMHDX software²⁹ ($p < 0.01$, Supplementary Fig. 13). Overall, PPAR γ mutant proteins presented a lower level of deuterium uptake compared to WT when bound to PGC1 α , highlighting the fact that PPAR γ mutant/PGC1 α complexes present several regions less flexible or less exposed to solvent than PPAR γ WT/PGC1 α complex (Supplementary Fig. 14).

Comparison of PPAR γ T475M/PGC1 α to PPAR γ WT/PGC1 α RFUs revealed that different regions of the T475M mutant presented a significant lower deuterium uptake (Supplementary Fig. 14, upper panel), including H2, H2', N-terminal H3, H6, N-terminal H8, helix H10, and the H12 helix. These regions are thus more protected from deuterium exchange for PPAR γ T475M compared to PPAR γ WT, which might be in favor of a decreased conformational flexibility of PPAR γ T475M compared to PPAR γ WT, in agreement with MD simulation data.

For PPAR γ M280I a significantly different behavior was observed compared to PPAR γ T475M (Supplementary Fig. 14, middle panel). Decreased deuterium uptake was observed around the mutation site (from the C-terminal H1 towards the mutation site and until H3, including the Ω loop). In addition, the β -sheet region, H6 helix, the loop between H8 and H9 and finally the

region encompassing H10, H11, and H12 helices showed also significant decrease in deuterium uptake, which might correspond to a decreased conformational flexibility. Our HDX-MS data for the PPAR γ M280I are consistent with MD simulations highlighting a stabilization of the Ω loop, H3 and H12 helices in the M280I mutant protein, compared to WT. Altogether, HDX-MS data are thus in agreement with our structural analysis of the structural elements involved in agonist conformation stabilization of the T475M and M280I mutant proteins.

Discussion

Taken together, our study highlighted the existence of recurrent driver gain-of-function PPAR γ mutations in a particular type of cancer: luminal bladder tumors. Frequent PAX8-PPAR γ fusions have already been reported in follicular thyroid tumors (30% of these tumors), but these proteins, which also have a proto-oncogenic role, are likely to act in a dominant negative manner³⁰. The P113S mutation enhanced PPAR γ activity, probably by inhibiting S112 phosphorylation by MAP kinases, as shown for the only gain-of-function mutation of PPAR γ reported to date, P113G, which is associated with obesity³¹. We have also identified two recurrent mutations affecting the DNA-binding domain of PPAR γ , but the functional impact of these mutations was not as clear as for the other mutants and requires further investigation. However, we clearly showed that the three recurrent mutations affecting the ligand-binding domain of PPAR γ altered the

conformation and structural dynamics of the protein, stabilizing helix H12 and so promoting the adoption of the active form by the receptor even in the absence of ligand. These mutations also favor the recruitment of coactivators. Such effects have already been described for mutations affecting the ligand-binding domain of another hormone receptor, ER, in breast cancer, these mutations however being found exclusively in hormone-resistant metastases, not in primary tumors³². Mutations affecting the ligand-binding domain of the androgen receptor have also been observed in metastatic or castration-resistant prostate cancers and these mutations enable the protein to bind other ligands³³. Our demonstration that the activation of PPAR γ by point mutation, like *PPARG* amplification⁷ or RXR α mutation^{8,13}, confers bladder cancer cells a PPAR γ dependency, provides additional genetic evidence for a pro-tumorigenic role of PPAR γ in bladder cancer and strengthens the importance of the PPAR γ /RXR α pathway in luminal bladder cancer. RXR α hotspot mutations appear to be specific to bladder cancer. By contrast, the PPAR γ gain-of-function mutations identified here are also observed in other types of cancer. In particular, T475M mutations are observed in four different types of cancer (Supplementary Table 4). Moreover, other recurrent mutations not identified in bladder cancer have been observed in different types of cancer, including melanoma and prostate carcinoma (Supplementary Table 6), and these mutations may also likely be activating mutations. The activation of PPAR γ by mutations may, therefore, result in PPAR γ -dependence not only in bladder cancer, but also in other types of cancer, reinforcing the importance of developing new pharmacological approaches targeting the ligand-independent activity of PPAR γ in tumors. Such treatments would also favor the immune response in bladder tumors¹³. A better understanding of the molecular basis of the pro-oncogenic activity of PPAR γ in bladder luminal tumors might also make it possible to propose alternative therapeutic options for targeting this pathway without directly inhibiting PPAR γ , which could lead to diabetes or lipodystrophy³⁴.

Methods

Human bladder samples. We used DNA extracted from 359 bladder tumors. The flash-frozen tumor samples were stored at -80°C immediately after transurethral resection or cystectomy. All tumor samples contained more than 80% tumor cells, as assessed by the hematoxylin and eosin (H&E) staining of histological sections adjacent to the samples used for DNA extraction. All subjects provided informed consent and the study was approved by the institutional review boards of the Henri Mondor, Foch, Institut Gustave Roussy and Strasbourg Hospitals.

Sanger sequencing. The coding exons and splice junctions of *PPARG* and *RXRA* were amplified from genomic DNA by PCR with gene-specific primers available on request and sequenced by the Sanger method. For tumors, the somatic status of the identified mutation was confirmed by sequencing normal DNA from blood. Sequencing was performed for 25 bladder cell lines: 5637, BFTC-905, CAL29, EJ138, HT1376, J82, JMSU1, KK47, L1207, MGHU3, RT112, RT4, SCaBER, SD48, SW1710, T24, TCCSup, UMUC1, UMUC5, UMUC6, UMUC9, UMUC10, UMUC16, VMCUB1, and VMCUB3. The identity of the cell lines used was checked by analyzing genomic alterations with comparative genomic hybridization arrays (CGH array), and FGFR3 and TP53 mutations were checked with the SNaPshot technique (for FGFR3) or by classical sequencing (for TP53). The results obtained were compared with the initial description of the cells. We routinely checked for mycoplasma contamination.

Calculation of a PPAR γ activation score. Based on our previously described PPAR γ activation signature encompassing 148 genes⁷, we defined a subset of 77 genes that were also significantly more expressed in the 25% of tumors with the strongest PPAR γ expression than in the 25% of tumors with the lowest levels of PPAR γ expression in TCGA datasets ($N = 405$ tumors)¹⁰. The PPAR γ activation score is the mean of the centered expressions of these 77 genes for each tumor.

Materials and chemicals. Rosiglitazone and GW1929 were purchased from Tocris Bioscience. The fluorescent PGC1 α peptide (137-EAEEPSLLKLLAPA-152) was purchased from Thermo-Fisher. The PGC1 α peptide (139-EEPSLLKLLAPA-152) was synthesized by Pascal Eberling (IGBMC peptide synthesis common facility).

Plasmid constructs. The pcDNA3-PPAR γ 2 and PPRE-X3-TK-luc were generously provided by Pr. Chatterjee (Institute of Metabolic Science, IMS, Cambridge) and Bruce Spiegelman (Addgene plasmid #1015), respectively. We used pcDNA3.1-PPAR γ 2 and the QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's protocol, to generate all the mutations. Mutations were confirmed by DNA sequencing. The GAL4-DNA-binding domain cloning vector pM and the activation-domain cloning vector pVP16 are part of the Mammalian Matchmaker Two-Hybrid Assay kit (BD Biosciences Clontech). The construct pM-MED1 (510–787) expressing the Gal4 DBD-MED1 nuclear receptor interacting domain was provided by Lieve Verlinden (KU Leuven, Belgium)³⁵.

Cell culture and transfection. The HEK293FT human cell line and the RT4 and 5637 human bladder tumor-derived cell lines were obtained from DSMZ (Heidelberg, Germany). HEK293FT cells were cultured in DMEM, whereas 5637 and RT4 cells were cultured in RPMI. Media were supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Cells were incubated at 37°C , under an atmosphere containing 5% CO_2 .

For reporter gene assays, HEK293FT cells were plated in 96-well plates (30,000 cells per well) and transfected with 30 ng pcDNA3-PPAR γ 2 (WT or mutated), 50 ng PPRE-X3-TK-luc and 6 ng pRL-SV40 (Promega), in the presence of the Eugene HD transfection reagent (Promega), in accordance with the manufacturer's protocol. Luciferase activity was determined 48 h later, with the Dual-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega), according to the manufacturer's instructions, and the results obtained were normalized with the *Renilla* luciferase signal obtained with the pRL-SV40 plasmid.

For PPAR γ 2 overexpression in the 5637 cell line, we used six-well plates, 250,000 cells seeded per well. These cells were transfected 24 h later with 2.5 μg of pcDNA3-PPAR γ 2 (WT or mutated) in the presence of the Eugene HD transfection reagent (Promega). RNAs were extracted with the RNA easy mini kit (Qiagen) and proteins were extracted by cell lysis in Laemmli buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 1% SDS) supplemented with protease inhibitors and phosphatase inhibitors (Roche) 48 h after transfection.

For transfection with siRNA, RT4 cells were used to seed six-well plates at a density of 300,000 cells/well. Cells were transfected with 20 nM siRNA in the presence of Lipofectamine RNAi Max reagent (Invitrogen), in accordance with the manufacturer's protocol. siRNAs were purchased from Qiagen. For the control siRNA, we used a control targeting luciferase (SI03650353). We used three PPAR γ siRNAs designed to knockdown the expression of all known mRNA isoforms. The sense-strand sequences were: PPAR γ siRNA#2: GACAAAUCACCAUUCGUUATT, PPAR γ siRNA#5: GCGACUUGGCAUAUUUUAUTT and PPAR γ siRNA#7: CGGAGAACAAUCAGAUUGATT.

Cells were detached from the plates with trypsin 96 h after transfection, counted using a hemocytometer and lysed in Laemmli buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 1% SDS) supplemented with protease inhibitors and phosphatase inhibitors (Roche).

For mammalian two-hybrid assay, HEK293FT cells were plated in 96-well plate (30,000 cells per well) and transfected with 20 ng pV16-PPAR γ 2 (WT or mutated), 20 ng pM-MED1, 50 ng pG5-luc (Promega) reporter plasmid and 6 ng pRL-SV40 (Promega), in the presence of the Eugene HD transfection reagent (Promega), in accordance with the manufacturer's protocol. Luciferase activity was determined 48 h later, with the Dual-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega), according to the manufacturer's instructions, and the results obtained were normalized with the *Renilla* luciferase signal obtained with the pRL-SV40 plasmid.

Immunoblotting. The 5637 and RT4 cell lysates were clarified by centrifugation. The protein concentration of the supernatants was determined with the BCA protein assay (Thermo Scientific). 10 μg of proteins were resolved by SDS-PAGE in a 4–15% polyacrylamide gels, electrotransferred onto Biorad nitrocellulose membranes and analyzed by incubation with primary antibodies against PPAR γ (Abcam #ab41928, used at 1/1000) and β -actin (Sigma Aldrich #A2228, used at 1/25,000). Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology # 7074, used at 1/3000) was used as the secondary antibody. Protein loading was checked by staining the membrane with Amido Black after electroblotting. Uncropped scans of the western blot are supplied Supplementary Fig. 15.

Real-time reverse transcription-quantitative PCR. Reverse transcription was performed with 1 μg of total RNA, and a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). cDNAs were amplified by PCR in a Roche real-time thermal cycler, with the Roche Taqman master mix (Roche) and Taqman probe/primer pairs as follows:

PLIN2:
Forward primer—TCTGAATCAGCCATCAACTCAG;
Reverse primer—GTGCTGGCCACAGAATCC;
Roche Taqman probe no. 57
ACSL5:
Forward primer—TGTCACCTTCAGTCATGACATTCT;
Reverse primer—TCCAGTCCCCAGGTAATGTAA;
Roche Taqman probe no. 83

FABP4:

Forward primer—GGATGATAAACTGGTGGTGA;

Reverse primer—CACAGAATGTTGTAGAGTTCATGC

Roche Taqman probe no. 85

PPAR γ and TBP were amplified by PCR in a Roche real-time thermal cycler with Roche SYBR green master mix and primers, as follows:

PPAR γ :

Forward primer—GCCCAAGTTTGGTGGTCTG;

Reverse primer—TCAATGGGCTTCACATTCAGC;

TBP:

Forward primer—TTGCTGCGGTAATCATGAGG;

Reverse primer—TTTTCTTGCTGCCAGTCTGG

We used the 4326322E assays on demand for TBP (encompassing primers and Taqman probes) purchased from Applied Life Technologies.

Relative gene expression was analyzed by the delta delta Ct method, with TBP as the reference.

Biochemistry. The sequences encoding the ligand-binding domains of the His-hPPAR γ (231–505) and His-mRXR α (228–467) receptors were inserted into pET15b. Point mutations were introduced into PPAR γ with the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent), in accordance with the manufacturer's instructions.

The corresponding proteins were produced in *Escherichia coli* BL21 DE3 by overnight incubation at 22 °C after induction with 1 mM IPTG at an OD₆₀₀ of ~0.8. Soluble proteins were purified by Ni-NTA chromatography followed by size exclusion chromatography on a Superdex 200 (GE) column equilibrated in 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 5% glycerol, and 1 mM TCEP. The proteins were concentrated to 3–6 mg/ml with an Amicon Ultra 10 kD MWCO. Purity and homogeneity of all proteins were assessed by SDS and Native Page and for PPAR proteins by denaturing and native electrospray ionization mass spectrometry (Supplementary Figs. 3 and 4).

Crystallization, data collection, and structure refinement. Crystallization trials were performed with either apo protein or with the protein in complex with a threefold excess of GW1929 or a threefold excess of GW1929 and PGC1 α peptide. The crystallization experiments were performed by sitting drop vapor diffusion at 290 K, mixing equal volumes (200 nl) of protein at 5 mg/ml and reservoir solution. For all crystal structures, the data were indexed and integrated with XDS³⁶ and scaled with AIMLESS^{37,38}. The structure was solved by molecular replacement in PHASER³⁹ and refined with PHENIX⁴⁰ and BUSTER⁴¹ with TLS refinement, followed by iterative model building in COOT⁴².

Crystals of PPAR γ M280I-GW1929-PGC1 α were grown in 20% PEG 550 MME, 10% PEG 20000, 30 mM sodium fluoride, 30 mM sodium bromide, 30 mM sodium iodide, 0.1 M sodium Hepes/MOPS pH 7.5, transferred to artificial mother liquor containing 15% glycerol and flash-cooled in liquid nitrogen. X-ray diffraction data were collected at PXI beamline of the SOLEIL synchrotron with a wavelength of 0.979 Å. The final structure was refined to R_{work} and R_{free} values of 17.5% and 22.6%, respectively, with excellent geometry (97.99% of residues in favored region of the Ramachandran plot, 2.01% in the allowed region, and 0.0% outliers).

Crystals of PPAR γ T475M-GW1929-PGC1 α were grown in 25% PEG 3350, 0.2 M ammonium sulfate, 0.1 M Bis-Tris pH 6.5, transferred to artificial mother liquor containing 15% glycerol and flash-cooled in liquid nitrogen. X-ray diffraction data were collected at the ID23-1 beamline of ESRF with a wavelength of 0.9724 Å. The final structure was refined to R_{work} and R_{free} values of 15.9% and 19.88%, respectively, with excellent geometry (98.23% of residues in favored region of the Ramachandran plot, 1.77% in the allowed region, and 0.0% outliers).

Crystals of PPAR γ T475M apo were grown in 0.5 M ammonium sulfate, 0.1 M PIPES pH 7, 0.9 M disodium tartrate. Crystals were transferred to artificial mother liquor containing 15% glycerol and flash-cooled in liquid nitrogen. X-ray diffraction data were collected at the ID23-1 beamline of ESRF with a wavelength of 0.9724 Å. The final structure was refined to R_{work} and R_{free} values of 19.5% and 23.48%, respectively, with good geometry (96.05% of residues in favored region of the Ramachandran plot, 3.77% in the allowed region, and 0.19% outliers).

Crystals of PPAR γ WT-GW1929-PGC1 α were grown in 20% PEG 5000 MME, 0.1 M Bis-Tris pH 6.5. Crystals were transferred to artificial mother liquor containing 15% glycerol and flash-cooled in liquid nitrogen. X-ray diffraction data were collected at the ID30A beamline of ESRF with a wavelength of 0.968 Å. The final structure was refined to R_{work} and R_{free} values of 21.9% and 25.2%, respectively, with excellent geometry (96.53% of residues in favored region of the Ramachandran plot, 3.47% in the allowed region, and 0.00% outliers).

Crystals of PPAR γ L290M-GW1929 complex were grown in 25% PEG 3350, 0.2 M NaCl, 0.1 M Hepes pH 7.5 and were transferred to artificial mother liquor containing 35% PEG 3350 before flash-cooling. X-ray diffraction data were collected at the ID23-1 beamline of ESRF with a wavelength of 0.9724 Å. The final structure was refined to R_{work} and R_{free} values of 16.52% and 20.89%, respectively, with excellent geometry (98.54% of residues in favored region of the Ramachandran plot, 1.46% in the allowed region, and 0.00% outliers).

Data collection and refinement statistics are provided in Supplementary Table 5. GW1929 and side chains of the mutated residues could be modeled

with confidence in all chains and all complexes as shown into the Polder omit maps⁴³ displaying reduced model bias and exclusion of solvent molecules (Supplementary Figs. 9A and 12A). All structural figures were prepared with PyMOL (www.pymol.org/).

Molecular dynamics simulations. hPPAR γ PDB:2PRG²⁰ was used for all calculations. For the WT holo form, we used chain A, the ligand and coactivator peptide segment from the crystal structure. For the WT apo form, we used the same structure, but we removed the ligand and the coactivator peptide from the structure. For the corresponding mutant forms, the point mutation was built into this experimental crystal structure with CHARMM program version c37b1⁴⁴. All forms were subjected to the PROPKA program⁴⁵ to determine the protonation states of titratable residues. These calculations indicated that the H217, H266, H323, His449, and H466 residues of chain A were protonated on the Ne, but that H425 could be considered doubly protonated. We modified the PDB file accordingly to incorporate the correct protonation states. Hydrogen atom positions were positioned with the HBUILD⁴⁶ module of the CHARMM program. The parameters for rosiglitazone were determined in a previous study⁴⁷, MD simulations were performed with NAMD software⁴⁸ and the CHARMM all-atom force field, version 36⁴⁹. Crystal water molecules associated with the hPPAR γ protein were retained. Energy minimization was performed for the protein, in 700 steps, with the steepest descent (SD) algorithm in CHARMM software. Non-bonded interactions were truncated at a 14 Å cutoff distance, using switch and shift functions for van der Waals and electrostatic forces, respectively. The protein was then placed in a cubic TIP3P explicit water box of dimensions 80 × 80 × 80 Å. Chloride and sodium counter ions were added to the water box to neutralize the charge of the system and additional ions were added to yield a final concentration of 0.15 M. MD simulations were initiated with two rounds of energy minimization and heating while the atomic coordinates of the protein complex were fixed. In the first phase, water was minimized by 1000 steps of conjugate gradient (CG) and then heated to 600 K. In the second phase, the water was minimized by 250 steps of CG, followed by heating to 300 K. The constraints on the protein were then removed and the entire system was subjected to energy minimization through 2000 steps of CG and subsequent heating to 300 K. The system was then equilibrated for 150 ps. With a 1 fs time step, the production phase extended over a total of 107 ns. This protocol was used for all forms studied. The root-mean-square deviation (RMSD) and root-mean-square fluctuation (RMSF) were calculated using the CHARMM program and the coactivator peptide binding energies were estimated by an MM/GBSA procedure²⁵ using the CHARMM program combined with in-house programs.

Microscale thermophoresis. Measurements were performed with a Monolith NT.115 instrument (NanoTemper Technologies GmbH, Munchen, Germany). The PPAR γ complexes were prepared in 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20. Each measurement consists of 16 reaction mixtures where the fluorescent-labeled peptide concentration was constant (150 nM) and serial dilutions of PPAR γ LBD from a concentration of 100 μ M down to 2 nM. Measurements were made with standard glass capillaries (Nanotemper) at 25 °C, at 30% LED excitation and 40–80% MST power, with a laser-on time of 30 s and a laser-off time of 5 s. NanoTemper Analysis 2.2.4 software was used to fit the data and to determine the K_d .

Analytical ultracentrifugation. Sedimentation velocity experiments were performed at 4 °C, with a Beckman Optima XL-A analytical ultracentrifuge equipped with absorbance optics and an An50-Ti rotor in a buffer containing 20 mM Tris, pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM Glycerol, 1 mM TCEP. For this analysis, the heterodimer was formed by mixing the monomeric PPAR γ and RXR α proteins into a 1:1 molar ratio. Protein concentrations were in the range of 0.8 to 0.9 mg/ml. The sedimentation velocity analysis was conducted at 165,500xg. Values were normalized to standard conditions by correcting for buffer density and viscosity. Sedimentation coefficient distributions were calculated from the sedimentation velocity data using the SEDFIT software program (www.analyticalultracentrifugation.com).

Surface plasmon resonance. The SPR measurements were performed by Biacore T100 sensitivity enhanced T200 equipment (GE Healthcare) using CM5 series S sensor chip. The RXR α LBD monomer was immobilized on the chip surface using standard amino-coupling protocol in 10 mM Na-acetate buffer pH 5.5. The resulting immobilized RXR was in the range of 400–500 response units. The running buffer was 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0.005% Tween 20 and for regeneration 1 M sodium chloride solution was used. Interactions of the RXR α LBD with the LBDs of PPAR γ WT, T475M and M280I mutants were analyzed in the manner of dose response using twofold dilution series of PPAR γ LBDs ranging from 1 to 250 nM. The association phase was 120 s and the dissociation phase was 120 s. After subtracting the reference and buffer signal, the data were fit to a steady state binding model and 1:1 kinetic model to define the K_D and k_{off} using the Biacore T200 Evaluation software (GE Healthcare).

Mass spectrometry analysis. Prior to mass spectrometry analysis, PPAR γ and all the different mutant proteins were buffer exchanged against 200 mM of ammonium

acetate at pH 6.8, using five cycles of concentration/dilution with a micro-concentrator (Vivaspin, 10-kD cutoff, Sartorius, Göttingen, Germany). All the samples were diluted either in H₂O/ACN/HCOOH (denaturing MS conditions) or in 200 mM ACNH₄ (native MS conditions) to a final concentration of 5 μ M and infused with an automated chip based nanoelectrospray device (TriVersa Nanomate, Advion Bioscience, Ithaca, USA) operating in the positive ion mode, coupled to a Synapt G2 HDMS mass spectrometer (Waters, Manchester, UK). Under denaturing mass spectrometry conditions, the backing pressure, the cone voltage and the extraction voltage of the mass spectrometer were set to 1.47 mbar, 20 V, and 4 V, respectively. The trap cell was operating under a constant Ar pressure of 9×10^{-3} mbar (2 ml/min). The voltage within the trap cell and the trap DC bias were set to 7 V and 2 V, respectively. In this case, the traveling wave-based helium cell and ion mobility cell were used as ion guides under 1.2×10^{-4} mbar and 8×10^{-5} mbar, respectively. In the transfer cell, ions were transmitted using an acceleration voltage of 7 V under a constant pressure of 10^{-6} mbar. The pressure within the time of flight analyzer was kept at 6.4×10^{-7} mbar. For native mass spectrometry analysis, the cone voltage, the extraction voltage and the backing pressure of the mass spectrometer were set to 20 V, 5 V, and 6 mbar, respectively, in order to improve the transmission of the “native-like” molecular ions and avoiding ion heating. Ions were efficiently trapped with a constant Ar flow rate of 4.5 ml/min (leading to a final pressure in the trap cell of 8.8×10^{-3} mbar) and 4 V and then they were pulse driven with a trap DC bias of 2 V. During mass spectrometry analysis, the pressure within the helium cell and ion mobility cell were kept at 1.2×10^{-4} and 8×10^{-5} mbar. Ions were transferred from the ion mobility cell to the analyzer by applying a constant voltage of 2 V under a constant pressure of 10^{-6} mbar in the transfer cell. Finally, ions were analyzed within the time of flight analyzer under high vacuum conditions (6.3×10^{-7} mbar) in order to ensure highly accurate mass measurements. Mass spectra recorded with Synapt G2 platform were analyzed with MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK).

Native IM-MS. Ion mobility experiments were performed on the Synapt G2 HDMS (Waters, Manchester, UK). The backing pressure, the cone voltage and the extraction cone was set to 6 mbar, 40 V, and 5 V, respectively. The traveling wave-based ion trap was filled with a continuous Ar flow of 6 ml per min and the trap collision energy was set to 4 V. Ions were pulse-driven with a trap DC bias of 60 V and subsequently separated in the TWIMS (Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry) cell under a constant N₂ pressure of 5.36 mbar (N₂ flow rate of 25 ml per min). The IM wave velocity and height were set to 1250 m/s, and 40 V, respectively. The other mass spectrometer parameters not described in this section remained the same as those used during the native mass spectrometry analysis. IM data were calibrated as described elsewhere. Briefly, three charge states of two external calibrants (Cytochrome C and β -lactoglobuline) were used to determine the rotationally averaged collision cross section (CCS) of the ion of interest. MassLynx 4.1 was used to perform IM data interpretation. Reported TWCCSN2 values correspond to the average TWCCSN2 measurement performed in triplicate under the same experimental conditions.

Collision-induced unfolding (CIU) experiments. Prior to IM separation, ions were progressively activated in the trap cell by increasing the acceleration voltage in 5 V steps from 0 to 60 V. Ion mobility data at each individual voltage were acquired during 1 min, and finally compiled to give rise to the CIU fingerprints. The arrival time distribution (ATD) of each individual charge state of the protein complexes were extracted with the open-source CIU-Suite software⁵⁰. CIU experiments have been performed in triplicate for each individual complex leading to a standard deviation lower than 4%, calculated with the CIUSuite-Stat module included in the CIU-Suite package.

HDX-MS experiments. HDX of PPAR γ WT, M280I and T475M proteins were carried out with and without PGC1 α peptide, with 1:3 concentration ratios in 20 mM Tris (pH 8.0), 200 mM NaCl, 5% glycerol. Samples were incubated for a range of exchange times (0 min, 0.5 min, 2 min, 10 min, 30 and 60 min) in 95% of deuterated buffer (20 mM Tris (pH 8.0), 200 mM NaCl) before quenching the exchange reaction by adding a quench solution (100 mM glycine, 2 M GDHCl, pH 2.2) at 1 °C during 30 s. Protein digestion of quenched samples (120 pmol) was then performed through a pepsin-immobilized cartridge in 0.1% aqueous formic acid solution at a 200 μ l/min. The digested peptides were then trapped on UPLC pre-column (ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard pre-column, 2.1 mm I.D. $\times$ 5 mm, 1.7 μ M particle diameter, Waters) and separated on UPLC column (ACQUITY UPLC BEH C18, 1.0 mm I.D. $\times$ 100 mm, 1.7 μ M particle diameter, Waters) at 0 °C. Preparation and injection of the samples were automatically conducted by the CTC PAL robot (Leap Technologies, Zwingen, Switzerland), while chromatographic step was carried out on Acquity UPLC system with HDX technology (Waters, Milford, MA, USA). Mass spectrometry measurements were acquired with Synapt G2Si HDMS (Waters) with electrospray ionization, using data-independent acquisition mode (MS^E) over an m/z range of 50–2000 and with 100 fmol/ μ l Glu-Fibrinopeptide as lock-mass correction. HDX experiments were realized in triplicate for each time point. Peptide identification was performed using ProteinLynx Global Server 2.5.3 (Waters) with a custom protein sequence library, where peptide and fragment tolerances

were automatically adjusted by PLGS, while oxidized methionine was set as variable modification. Deuterium uptakes for all identified peptides were checked and validated manually using DynamX 3.0 (Waters): only peptides—with a length range of 5–25 residues—identified in all replicates were kept with a minimum products per amino acid of 0.3. Only one charge state was kept for each peptide and deuterium uptakes were not corrected for back-exchange, representing as relative. HDX-MS results were statistically validated using Mixed-Effects Model for HDX experiments (MEMHDX)²⁹, using Wald tests, where statistical significance thresholds were set to 0.01.

Reporting summary. Further information on experimental design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

Atomic coordinates and related structure factors have been deposited in the Protein Data Bank with accession codes: 6FZY (PPAR γ T475M apo), 6FZF (PPAR γ T475M-GW1929-PGC1 α), 6FZJ (PPAR γ M280I-GW1929-PGC1 α), 6FZG (PPAR γ I290M-GW1929) and 6FZP (PPAR γ -GW1929-PGC1 α). The source data underlying Figs. 1–3 and Supplementary Figs. 1, 13 and 14 are provided as a Source Data file. A reporting summary for this Article is available as a Supplementary Information file. All other data supporting the findings of this study are available from the corresponding authors on reasonable request.

Received: 16 March 2018 Accepted: 18 December 2018

Published online: 16 January 2019

References

1. Tontonoz, P. & Spiegelman, B. M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 289–312 (2008).
2. Ahmadian, M. et al. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* **19**, 557–566 (2013).
3. Varley, C. L. et al. Role of PPARgamma and EGFR signalling in the urothelial terminal differentiation programme. *J. Cell. Sci.* **117**, 2029–2036 (2004).
4. Peters, J. M., Shah, Y. M. & Gonzalez, F. J. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nature Rev. Cancer* **12**, 181–195 (2012).
5. Lee, J. J., Drakaki, A., Iliopoulos, D. & Struhl, K. MiR-27b targets PPARgamma to inhibit growth, tumor progression and the inflammatory response in neuroblastoma cells. *Oncogene* **31**, 3818–3825 (2012).
6. Ahmad, I. et al. Sleeping Beauty screen reveals Pparg activation in metastatic prostate cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113**, 8290–8295 (2016).
7. Biton, A. et al. Independent component analysis uncovers the landscape of the bladder tumor transcriptome and reveals insights into luminal and basal subtypes. *Cell Rep.* **9**, 1235–1245 (2014).
8. Goldstein, J. T. et al. Genomic activation of PPARG reveals a candidate therapeutic axis in bladder cancer. *Cancer Res.* **77**, 6987–6998 (2017).
9. Cancer Genome Atlas Research, N. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* **507**, 315–322 (2014).
10. Robertson, A. G. et al. Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive bladder. *Cell* **171**, 540–556 (2017).
11. Hedegaard, J. et al. Comprehensive transcriptional analysis of early-stage urothelial carcinoma. *Cancer Cell* **30**, 27–42 (2016).
12. Choi, W. et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* **25**, 152–165 (2014).
13. Korpai, M. et al. Evasion of immunosurveillance by genomic alterations of PPARgamma/RXRalpha in bladder cancer. *Nat. Commun.* **8**, 103 (2017).
14. Halstead, A. M. et al. Bladder-cancer-associated mutations in RXRA activate peroxisome proliferator-activated receptors to drive urothelial proliferation. *eLife* **6**, e30862 (2017).
15. Van Allen, E. M. et al. Somatic ERCC2 mutations correlate with cisplatin sensitivity in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Cancer Discov.* **4**, 1140–1153 (2014).
16. Kim, J. B., Wright, H. M., Wright, M. & Spiegelman, B. M. ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 4333–4337 (1998).
17. Liberato, M. V. et al. Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) γ activators and pan-PPAR partial agonists. *PLoS ONE* **7**, e36297 (2012).
18. Brown, K. K. et al. A novel N-aryl tyrosine activator of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma reverses the diabetic phenotype of the Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* **48**, 1415–1424 (1999).

19. Berman, H. M. et al. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
20. Nolte, R. T. et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* **395**, 137–143 (1998).
21. Ohashi, M., Oyama, T. & Miyachi, H. Different structures of the two peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligand-binding domains in homodimeric complex with partial agonist, but not full agonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 2639–2644 (2015).
22. Chrisman, I. M. et al. Defining a conformational ensemble that directs activation of PPAR γ . *Nat. Commun.* **9**, 1794 (2018).
23. Gampe, R. T. et al. Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol. Cell* **5**, 545–555 (2000).
24. Hamuro, Y. et al. Hydrogen/deuterium-exchange (H/D-Ex) of PPARgamma LBD in the presence of various modulators. *Protein Sci.* **15**, 1883–1892 (2006).
25. Kollman, P. A. et al. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc. Chem. Res.* **33**, 889–897 (2000).
26. Genest, D. et al. Ligand-escape pathways from the ligand-binding domain of PPARgamma receptor as probed by molecular dynamics simulations. *Eur. Biophys. J.* **37**, 369–379 (2008).
27. Hughes, T. S. et al. An alternate binding site for PPARgamma ligands. *Nat. Commun.* **5**, 3571 (2014).
28. Capelli, D. et al. Structural basis for PPAR partial or full activation revealed by a novel ligand binding mode. *Sci. Rep.* **6**, 34792 (2016).
29. Hourdel, V. et al. MEMHDX: an interactive tool to expedite the statistical validation and visualization of large HDX-MS datasets. *Bioinformatics* **32**, 3413 (2016).
30. Raman, P. & Koenig, R. J. Pax-8-PPAR-gamma fusion protein in thyroid carcinoma. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 616–623 (2014).
31. Ristow, M., Muller-Wieland, D., Pfeiffer, A., Krone, W. & Kahn, C. R. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N. Engl. J. Med.* **339**, 953–959 (1998).
32. Robinson, D. R. et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat. Genet.* **45**, 1446–1451 (2013).
33. Shukla, G. C., Plaga, A. R., Shankar, E. & Gupta, S. Androgen receptor-related diseases: what do we know? *Andrology* **4**, 366–381 (2016).
34. Semple, R. K., Chatterjee, V. K. & O'Rahilly, S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **116**, 581–589 (2006).
35. Eelen, G. et al. Superagonistic action of 14-epi-analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D explained by vitamin D receptor-coactivator interaction. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1566–1573 (2005).
36. Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
37. Evans, P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62**, 72–82 (2006).
38. Collaborative Computational Project, N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760–763 (1994).
39. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Storoni, L. C. & Read, R. J. Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **61**, 458–464 (2005).
40. Adams, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
41. Smart, O. S. et al. Exploiting structure similarity in refinement: automated NCS and target-structure restraints in BUSTER. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68**, 368–380 (2012).
42. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
43. Liebschner, D. et al. Polder maps: improving OMIT maps by excluding bulk solvent. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **73**, 148–157 (2017).
44. Brooks, B. R. et al. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* **30**, 1545–1614 (2009).
45. Olsson, M. H., Sondergaard, C. R., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 525–537 (2011).
46. Brunger, A. T. & Karplus, M. Polar hydrogen positions in proteins: empirical energy placement and neutron diffraction comparison. *Proteins* **4**, 148–156 (1988).
47. Fidelak, J. et al. Dynamic correlation networks in human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma nuclear receptor protein. *Eur. Biophys. J.* **39**, 1503–1512 (2010).
48. Phillips, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**, 1781–1802 (2005).
49. MacKerell, A. D. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586–3616 (1998).
50. Eschweiler, J. D., Rabuck-Gibbons, J. N., Tian, Y. & Ruotolo, B. T. CIUSuite: a quantitative analysis package for collision induced unfolding measurements of gas-phase protein ions. *Anal. Chem.* **87**, 11516–11522 (2015).
51. Osz, J. et al. Solution structures of PPARgamma2/RXRalpha complexes. *PPAR Res.* **2012**, 701412 (2012).

Acknowledgements

This work was supported by a grant from *Ligue Nationale Contre le Cancer* (C.K., L.C.-T., E.G., R.Z., S.R., Y.N., Y.A., F.R., I.B.-P.) as an associated team (*Equipe labellisée*), the “*Carte d'Identité des Tumeurs*” program initiated, developed and funded by *Ligue Nationale Contre le Cancer*, by a “PL-Bio” project funded by INCa (2016–146), the French Ministry of Education and Research, the CNRS, and the Institut Curie. The project was also supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the University of Strasbourg. We acknowledge the support and the use of resources of the French Infrastructure for Integrated Structural Biology FRISBI ANR-10-INBS-05, the Instruct-ERIC and the French Proteomic Infrastructure ProFI ANR-10-INBS-08–03. We would like to thank the staff of Proxima 1 at SOLEIL as well as of ID23 and ID30A at ESRF for assistance in using the beamlines. We also thank Alastair McEwen (IGBMC) for help in X-ray data collections and structural refinement and Camille Kostmann (IGBMC) for assistance in SPR. We would like to thank Simone Benhamou (IGR) and Thierry Lebre (Foch Hospital) for their help in setting up the CIT series of bladder tumors. We thank GIS IBSa and Région Alsace for financial support in purchasing a Synapt G2 HDMS instrument. We acknowledge the Strasbourg University High Performance Computing Center and their staff for providing access to computing resources and for their support. We also acknowledge GENCI (Grand Équipement National de Calcul Intensif) for computing resources and the Equipex Equip@Meso project (Programme Investissements d'Avenir). MB was supported by a fellowship from the Région Alsace. OA-H acknowledges the IdEx program of the University of Strasbourg for funding his postdoctoral fellowship.

Author contributions

N.R., R.H.S. F.R. and I.B.-P. designed the study. H.L., C.B. and T.M. provided and characterized the tumors from the Strasbourg cohort. C.K., R.Z. and E.G. sequenced PPARG and RXRA and analyzed the data together with L.C.-T., A.K. and A.D.R. who carried out the bioinformatics analysis. A.K., A.D.R. and Y.A. classified the tumors according to pathological status and to the different subgroups identified by the TCGA. C.K., L.C.-T., F.D., S.R., Y.N. and I.B.-P. performed the functional studies and analyzed the data. J.O., W.Z., C.P.-I. and S.H.-B. performed the biochemical, biophysical, and structural studies, and J.O. and N.R. analyzed the data. S.V. and K.A. performed the molecular dynamics, and A.D. and R.H.S. analyzed the MD data. O.A.H. and M.B. performed the mass spectrometry experiments. O.A.H., M.B. and S.C. analyzed the mass spectrometry data. N.R., C.K., L.C.-T., R.H.S., F.R. and I.B.-P. wrote the manuscript. All authors made comments on the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08157-y>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Journal peer review information: *Nature Communications* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Supplementary Table 1: clinical and pathological characteristics of bladder tumors within the different cohorts studied figure 1A.

	TCGA	CIT Cohorte	Strasbourg Cohorte	Dana Farber & MSKCC	Bladder cell lines
Total population	405	346	13	50	25
Sex					
Male	299	234		37	13
Female	106	53		13	7
NA	0	59		0	5
Tumor stage					
Ta	0	119	0	0	
T1	2	78	2	0	
T2	130	51	0	37	
T3	138	55	4	10	
T4	133	30	7	3	
NA	2	13	0	0	

Supplementary Table 2: somatic mutations of PPAR γ identified in bladder cancer.

Numbering was carried out according to PPAR γ 2 isoform ORF.*; Recurrent mutations in cancers (see supplementary Table 4). NA: Not available. CNA: copy number alterations

	ID	Stage	Grade	Nucleotide change	Amino acid change	PPAR γ CNA	2013 TCGA Classification	RXR α mutation	PPAR γ activation Score
Curie cohort	CIT.503	Ta	G3	7G>A	E3K*	NA	NA	WT	NA
	CIT.8	T4	G3	19G>A	D7N	None	2	WT	0,11588697
	CIT.38	T2	G3	221C>G	S74C	None	3	WT	-0,9308443
	CIT.534	Ta	G2	688G>A	D230N	NA	NA	WT	NA
	CIT.86	Ta	G2	824T>C	F275S	None	1	WT	0,58828407
	CIT.263	Ta	G2	870C>G	I290M *	NA	1	WT	0,17102139
	CIT.161	T2	G3	337C>T; 840G>A	P113S*; M280I *	NA	NA	WT	NA
	CIT.508	Ta	G2	IVS3-3C>T		NA	NA	WT	NA
	CIT.545	Ta	G2	1260T>G	I420M	NA	NA	WT	NA
	CIT.58	TX	G2	1424C>T	T475M *	NA	NA	WT	NA
	CIT.123	T3a	G2	1424C>T	T475M *	NA	NA	WT	NA
	CIT.244	T1a	G3	1513T>C	Y505H	None	1	WT	0,70273917
Strasbourg samples	B521	T1	G3	1424C>T	T475M *	NA	1	WT	0,60041641
	M559	T3a	G3	1017G>C	L339F	NA	2	WT	0,04137641
TCGA cohort	TCGA-E5-A4U1	T2b	Gx	57-58insA	T20fs	None	1	WT	0,52777145
	TCGA-DK-AA71	T2b	Gx	244C>G	P82A	None	1	WT	0,56326549
	TCGA-FJ-A3ZE	Tx	Gx	325-326insC	S131Fs	Amplification	1	WT	0,1474166
	TCGA-2F-A9KQ	T3a	Gx	490C>T	R164W *	None	1	S427F	1,41119579
	TCGA-KQ-A41Q	T3b	Gx	490C>T	R164W *	None	1	WT	0,549532
	TCGA-E7-A7PW	T3a	Gx	503G>A	R168K *	None	1	WT	1,1003681
	TCGA-4Z-AA84	T3a	Gx	746C>T	S249L *	None	2	WT	0,02784423
	TCGA-ZF-AA5P	T2b	Gx	746C>T	S249L *	Amplification	2	WT	0,52463475
	TCGA-G2-A2EO	T3a	Gx	870C>G	I290M *	None	2	WT	0,21891667
	TCGA-XF-A9T8	T3b	Gx	929T>C	F310S	None	3	WT	-1,1530952
	TCGA-E7-A7XN	T3	Gx	1363G>C	E455Q	None	3	WT	-1,2658891
	TCGA-CF-A9FF	T2	Gx	1424C>T	T475M *	None	1	WT	1,13001792
	TCGA-GD-A3OS	Tx	Gx	1480C>T	H494Y	None	4	WT	-1,5173828
Dana Farber & MSKCC NA	MSKCC-0567_NR	Tx	Gx	337C>T; 503G>A	P113S*; R168K *	NA	NA	S427F	
Cell lines	RT4_Bladder	T2	Gx	1424C>T	T475M *	None	NA	WT	

Supplementary Table 3: somatic mutations of RXR α identified in bladder cancer.

*, Recurrent mutations in bladder cancer . NA: Not available. CNA: copy number alterations

	ID	Stage	Grade	Nucleotide change	Amino acide change	PPAR γ CNA	2013 TCGA Classification
Curie cohort	CIT.7	T4a	G3	1280C>T	S427F*	None	2
	CIT.70	T3b	G3	1280C>T	S427F*	None	4
	CIT.179	T4a	G3	1280C>T	S427F*	None	2
	CIT.190	T3	G3	1280C>T	S427F*	None	3
	CIT.195	T4	G3	1280C>T	S427F*	Gain	NA
	CIT.259	T2	G3	1280C>T	S427F*	Gain	1
TCGA cohort	TCGA-DK-A3IQ	T3	Gx	80C>G	S27C	None	2
	TCGA-FD-A3B5	T2b	Gx	139C>G	L47V	None	3
	TCGA-G2-A2EF	NA	Gx	200T>C	V67A	None	4
	TCGA-4Z-AA82	T2a	Gx	229_230insT	M77fs	None	3
	TCGA-E5-A4TZ	T4b	Gx	428C>G	S143X	None	3
	TCGA-KQ-A41R	T2	Gx	518_520delACA ; 1378C>T	N174del ; Q460X	Amplification	1
	TCGA-H4-A2HO	T4a	Gx	532C>G	L178V	Amplification	1
	TCGA-XF-AAMH	T3b	Gx	692C>T	P231L	None	3
	TCGA-GV-A40G	T2a	Gx	985G>A	G329R	None	1
	TCGA-4Z-AA80	T2a	Gx	1035C>G	I345M	Amplification	1
	TCGA-2F-A9KQ	T3a	Gx	1280C>T	S427F*	None	1
	TCGA-BT-A3PH	T3b	Gx	1280C>T	S427F*	None	1
	TCGA-CF-A47X	T2	Gx	1280C>T	S427F*	None	1
	TCGA-DK-A1AC	T3b	Gx	1280C>T	S427F*	Amplification	2
	TCGA-DK-A1AF	T3	Gx	1280C>T	S427F*	None	2
	TCGA-DK-A3IL	T3	Gx	1280C>T	S427F*	None	2
	TCGA-DK-AA76	NA	Gx	1280C>T	S427F*	None	1
	TCGA-E7-A541	T2b	Gx	1280C>T	S427F*	None	1
	TCGA-FD-A3SN	T3b	Gx	1280C>T	S427F*	None	2
	TCGA-FD-A5BX	T3b	Gx	1280C>T	S427F*	None	4
	TCGA-UY-A9PF	T3a	Gx	1280C>T	S427F*	None	2
	TCGA-ZF-AA53	T2	Gx	1280C>T	S427F*	None	3
	TCGA-FJ-A3ZF	NA	Gx	1280C>A	S427Y*	None	1
	TCGA-GV-A3QH	NA	Gx	1280C>A	S427Y*	None	1
Dana Farber & MSKCC NA	DFCI-33_NR	Tx	Gx	1280C>T	S247F*	NA	NA
	MSKCC-0331_NR	Tx	Gx	1280C>T	S247F*	NA	NA
	MSKCC-0567_NR	Tx	Gx	1280C>T	S247F*	NA	NA
	MSKCC-0100_R	Tx	Gx	1280C>T	S247F*	NA	NA
Cell lines	HT1197	T2	G4	1280C>T	S427F*	None	NA

Supplementary Table 4: somatic mutations of PPAR γ identified in bladder cancer (Figure 1 and supplementary Table 2) and also found in other cancers as reported in cosmic (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) or cbiportal (<http://www.cbiportal.org/>) data bases. Numbering according to PPAR γ 2 isoform ORF.

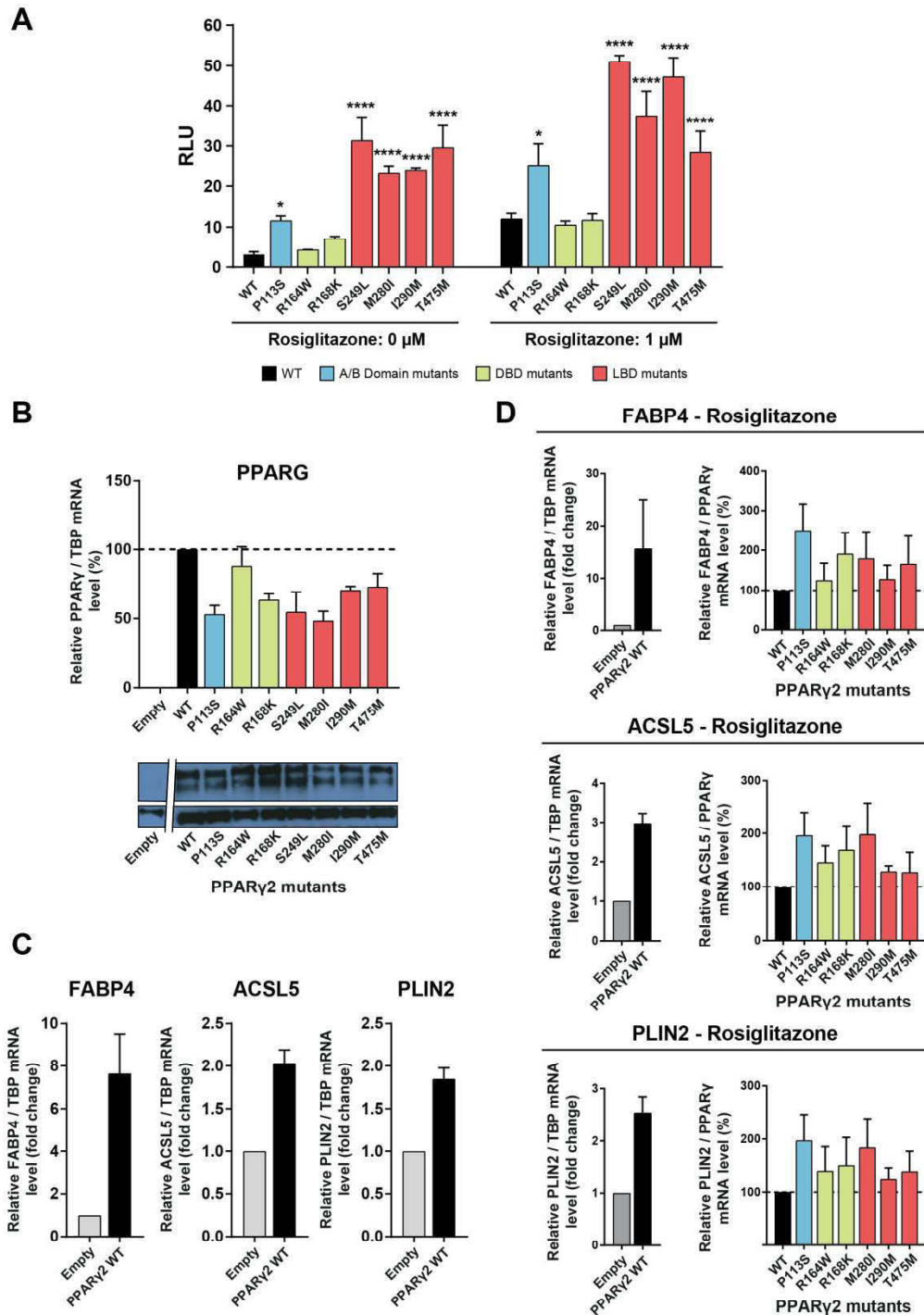
PPARG Mutation	ID	Cancer type
E3K	TCGA-49-6742-01	Lung
	B52	Bladder
S249L	C0051T	Kidney
M280I	HEC251	Endometer cell line
R164W	Pt11	Cutaneous Melanoma
T475M	TCGA-Q9-A6FW-01	Esophageal Adenocarcinoma
	CAC_3810	Ampulla of Vater
	TCGA-TQ-A7RW-01	Diffuse Glioma
	PCSI-0508-Pa-P-526	Pancreas ductal carcinoma

Supplementary Table 5: crystallographic data and refinement.

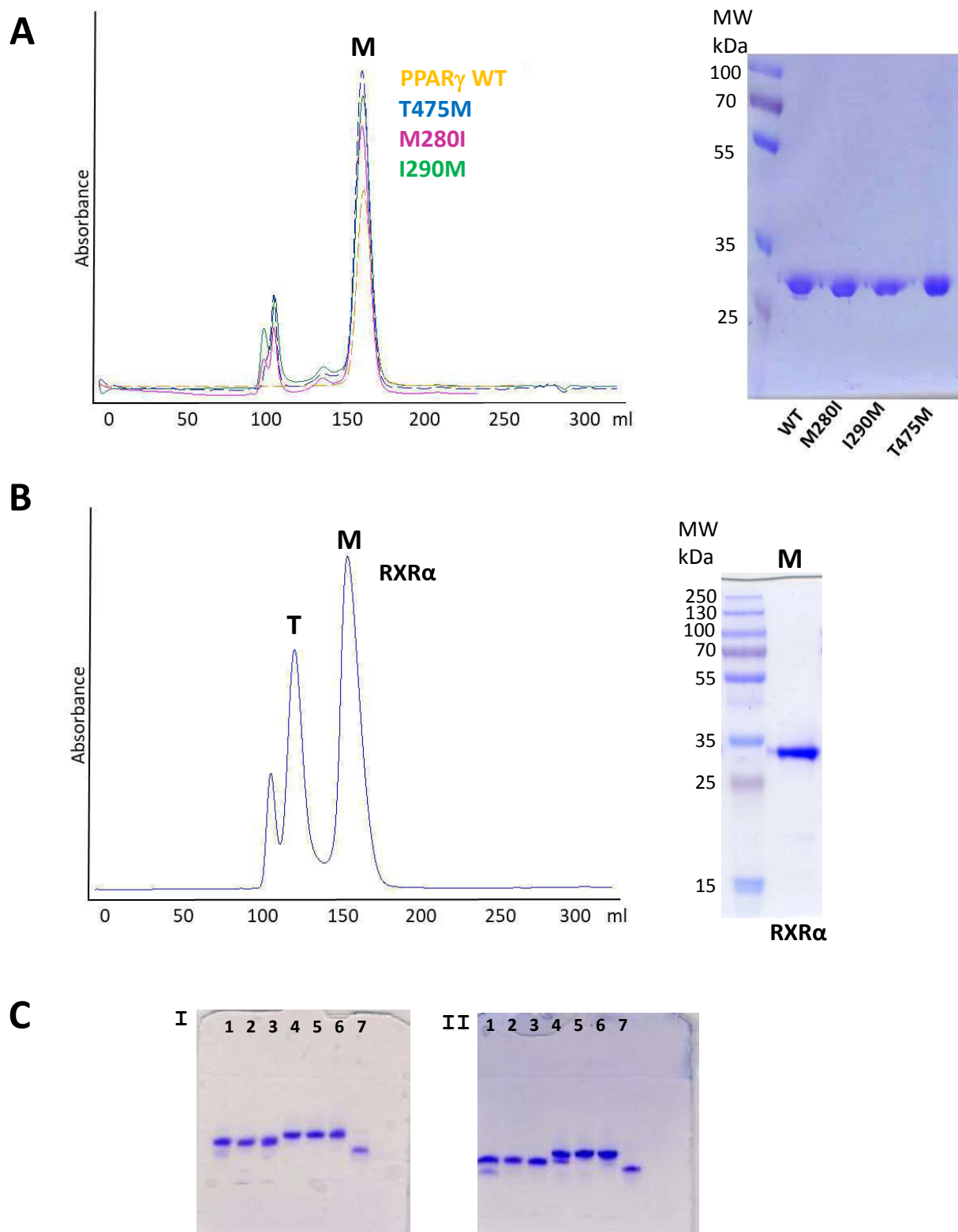
	PPAR γ 2 T475M	PPAR γ 2 T475M- GW1929-PGC1 α	PPAR γ 2 M280I- GW1929-PGC1 α	PPAR γ 2 I290M- GW1929	PPAR γ 2 WT- GW1929-PGC1 α
PDB ID	6FZY	6FZF	6FZJ	6FZG	6FZP
Data collection					
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P12 ₁ 1	P12 ₁ 1	P4 ₁ 2 ₁ 2	C222 ₁
Cell dimensions					
a, b, c (Å)	62.19, 62.67, 165.53	53.64, 123.68, 54.47	52.27, 126.43, 54.72	60.37, 60.37, 162.17	53.59, 86.27, 122.69
a, b, γ (°)	90, 90, 90	90, 95.3, 90	90, 94.9, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	42.65-3.1	17.63-1.95	15.18-2.01	48.43-2.1	17.32-2.3
Rmerge (%)	0.080 (0.841)	0.055 (0.753)	0.115 (0.727)	0.079 (0.54)	0.016 (0.264)
Rpim (%)	0.030 (0.307)	0.036 (0.510)	0.072 (0.469)	0.024 (0.153)	0.016 (0.264)
I/ σ I	16.78 (2.28)	12.42 (1.41)	9.77 (1.76)	18.02 (4.12)	19.73 (2.9)
Completeness (%)	99.85 (99.92)	98.56 (97.64)	97.28 (84.43)	99.96 (100)	96.55 (97.85)
Redundancy	7.9 (8.4)	3.3 (3.0)	3.4 (3.3)	12.3 (13.3)	2.0 (2.0)
CC(1/2)	1 (0.964)	0.998 (0.63)	0.992 (0.617)	0.999 (0.963)	1 (0.903)
Refinement					
Resolution	42.65-3.1	17.63-1.95	15.18-2.01	48.43-2.1	17.32-2.3
N° reflections	12292	50664	45617	18327	12557
Rwork/Rfree	0.195/0.23	0.159/0.199	0.175/0.226	0.165/0.209	0.219/0.252
N° atoms					
Protein	4260	4783	4636	2269	2138
Ligand/ion		74	80	38	40
Water	47	567	404	210	48
B-factors					
Protein	125.24	44.14	37.97	55.93	83.70
Ligand/ion		33.31	30.02	50.81	73.57
Water	86.82	52.00	42.89	58.19	72.17
R.m.s. deviations					
Bond lengths (Å)	0.013	0.007	0.009	0.007	0.005
Bond angles	1.67	1.16	1.16	1.12	0.52

Supplementary Table 6: recurrent somatic mutations of PPAR γ identified in different cancer types but in bladder cancer (supplementary Table 2) as reported in cosmic (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) or cbiportal (<http://www.cbiportal.org/>) data bases. Numbering according to PPAR γ 2 isoform ORF.

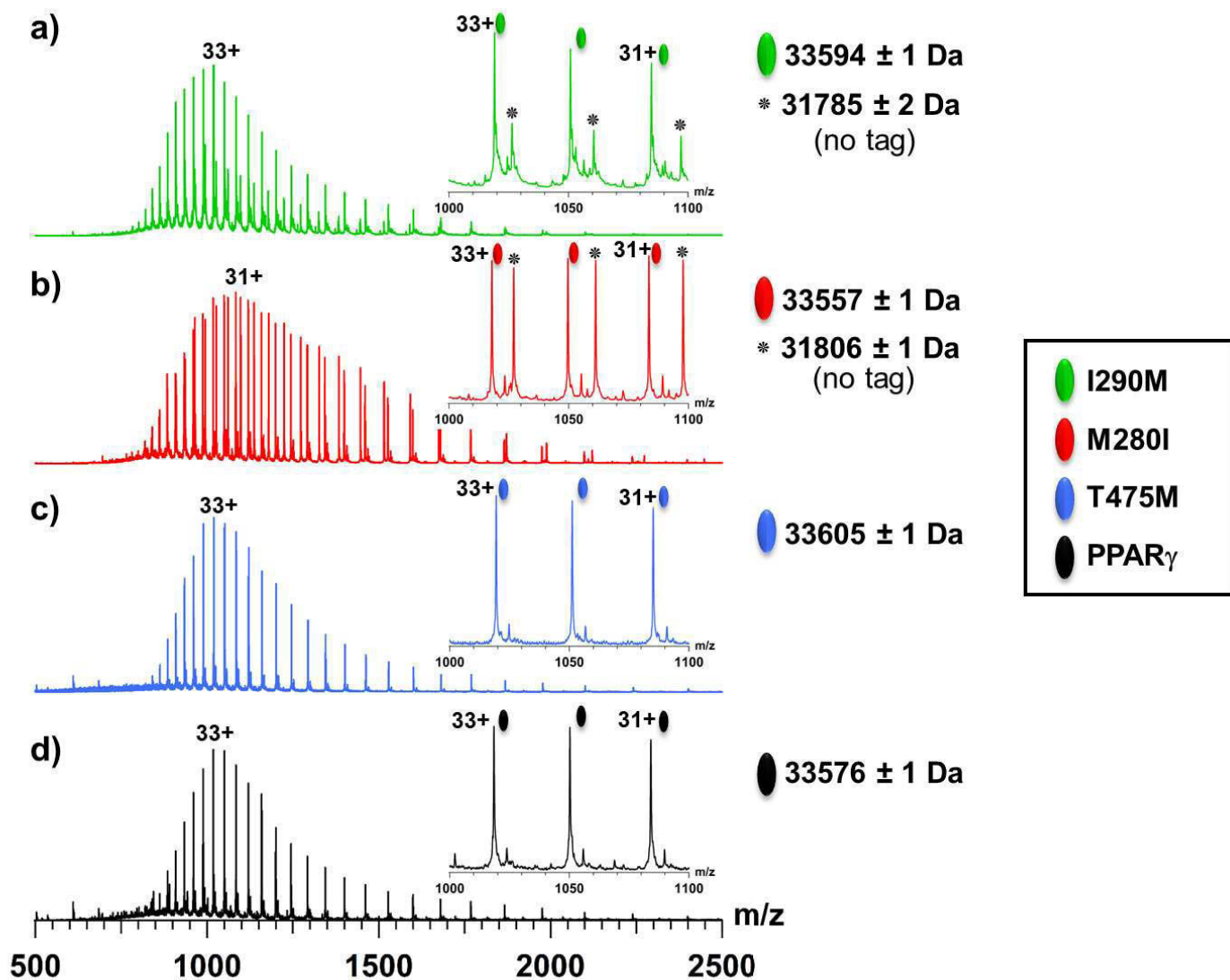
Mutation	Type	Tumor type	Sample ID
E352K	Missense_Mutation	Uterine Corpus Endometrial Carcinoma (TCGA, Provisional)	TCGA-AP-A0LD-01
E352K	Missense_Mutation	Cutaneous squamous cell carcinoma (DFCI, Clin Cancer Res 2015)	S03-45671-TP-S05-31806-NT
G372S	Missense_Mutation	Skin Cutaneous Melanoma (TCGA, Provisional)	TCGA-EE-A3AF-06
G372S	Missense_Mutation	Skin Cutaneous Melanoma (TCGA, Provisional)	TCGA-EE-A2GD-06
I208S	Missense_Mutation	Prostate Adenocarcinoma (Fred Hutchinson CRC, Nat Med 2016)	05-165K5_LUNG
I208S	Missense_Mutation	Prostate Adenocarcinoma (Fred Hutchinson CRC, Nat Med 2016)	05-165M1_LN
I208S	Missense_Mutation	Prostate Adenocarcinoma (Fred Hutchinson CRC, Nat Med 2016)	05-165O_ADRENAL
K450Q	Missense_Mutation	Cancer Cell Line Encyclopedia (Novartis/Broad, Nature 2012)	HCT15_LARGE_INTESTINE
K450Q	Missense_Mutation	Cancer Cell Line Encyclopedia (Novartis/Broad, Nature 2012)	HRT18_LARGE_INTESTINE
L242V	Missense_Mutation	Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Provisional)	TCGA-OL-A66H-01
L242V	Missense_Mutation	Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Provisional)	TCGA-A2-A0YC-01
R308C	Missense_Mutation	Pancreatic Adenocarcinoma (TCGA, Provisional)	TCGA-IB-7651-01
R308C	Missense_Mutation	Uterine Corpus Endometrial Carcinoma (TCGA, Nature 2013)	TCGA-BS-A0UV-01
R316C	Missense_Mutation	Skin Cutaneous Melanoma (Broad, Cell 2012)	MEL-Ma-Mel-65
R316C	Missense_Mutation	Skin Cutaneous Melanoma (TCGA, Provisional)	TCGA-D3-A1Q4-06
R316C	Missense_Mutation	Whole-exome sequences (WES) of pretreatment melanoma tumors (UCLA, Cell 2016)	Pt1
S186G	Missense_Mutation	Colorectal Adenocarcinoma (DFCI, Cell Reports 2016)	coadread_dfci_2016_3658
S186G	Missense_Mutation	Stomach Adenocarcinoma (UHK, Nat Genet 2011)	pfg008T
S186Kfs*2	Frame_Shift_Ins	Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Cell 2015)	TCGA-AN-A0FW-01
S186Kfs*2	Frame_Shift_Ins	Cancer Cell Line Encyclopedia (Novartis/Broad, Nature 2012)	MEG01_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE
S186Vfs*47	Frame_Shift_Del	Colorectal Adenocarcinoma (DFCI, Cell Reports 2016)	coadread_dfci_2016_3152
S186Vfs*47	Frame_Shift_Del	Esophageal Carcinoma (TCGA, Provisional)	TCGA-L5-A4OI-01
S186Vfs*47	Frame_Shift_Del	Pancreatic Adenocarcinoma (QCMG, Nature 2016)	ICGC_0076
S186Vfs*47	Frame_Shift_Del	Stomach Adenocarcinoma (TCGA, Nature 2014)	TCGA-BR-4363-01
S186Vfs*47	Frame_Shift_Del	Stomach Adenocarcinoma (TCGA, Nature 2014)	TCGA-CG-4305-01
S186Vfs*47	Frame_Shift_Del	Targeted Sequencing of 341 samples from metastatic esophagogastric cancer patients (MSK, Cancer Discovery 2017)	P-0017370-T01-IM6



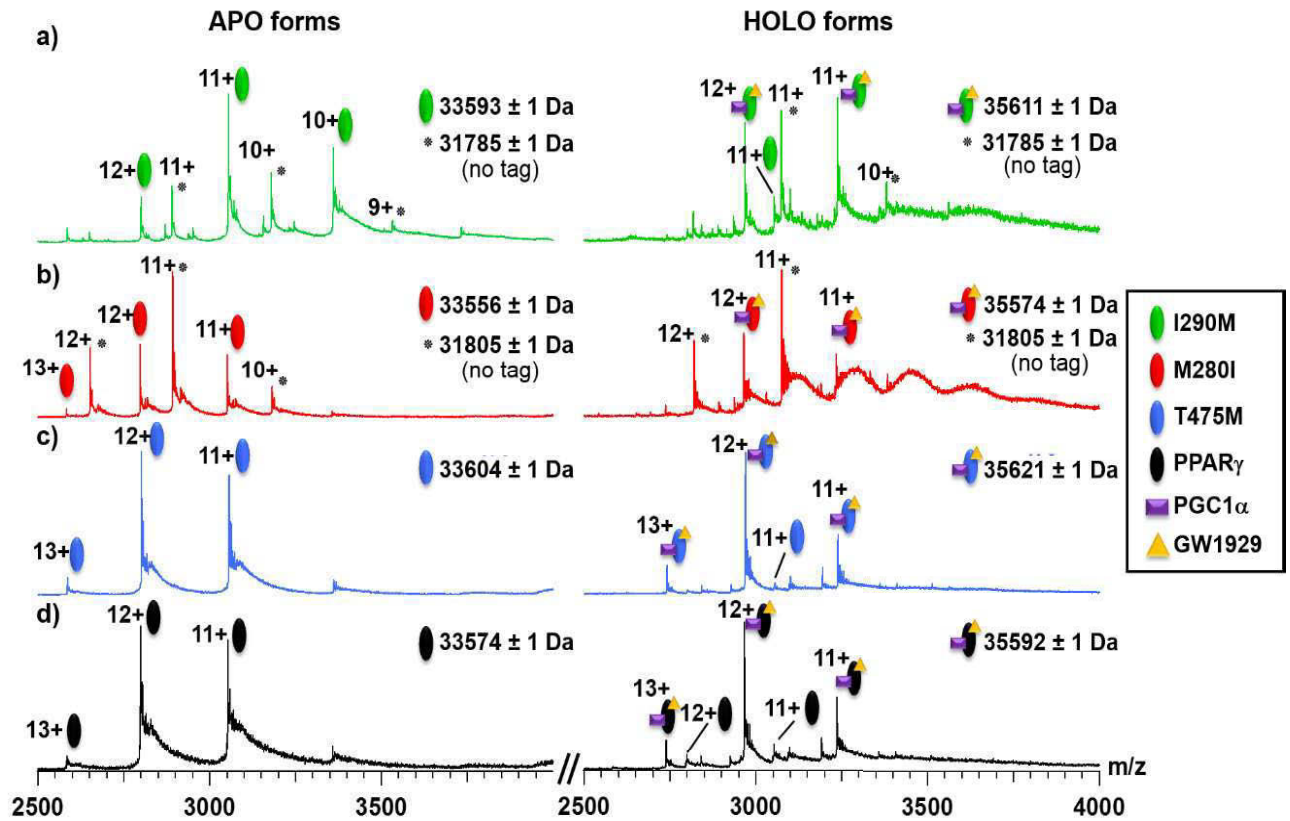
Supplementary Figure 1: evaluation of PPAR γ transcriptional activity. **A)** reporter assay using the firefly luciferase gene under the control of a PPRE-X3-TK promoter in HEK293FT. *Renilla* luciferase, expressed under the control of the CMV promoter, was used to normalize the signal. The data shown are the means $\pm$ SD of one representative experiment conducted in quadruplicate. The results for each mutant were compared with those for the wild-type in Dunnett's multiple comparisons test, * $0.01 < p < 0.05$; **** $p < 0.0001$ **B-D)** 5637 cells were transiently transfected with a pcDNA3 vector encoding wild-type (WT) or mutant (P113S, R164W, R168K, S249C, M280I, I290M, T475M) PPAR γ . The expression of all PPAR γ forms was checked by western blotting and quantified by RT-qPCR (A). The effect of wild-type PPAR γ 2 expression on three PPAR γ target genes was evaluated by RT-qPCR with or without 500 nM rosiglitazone stimulation (C, D left panels). The data were normalized relative to TBP, and are expressed as fold-induction relative to empty vector and as the mean $\pm$ SD of two independent experiments are presented. The expression of PPAR γ target genes was normalized against PPAR γ expression and is expressed as fold-stimulation relative to the expression induced by wild-type PPAR γ . The data are presented as the mean $\pm$ SD of four independent experiments (D, right panel and fig.2B). Source data are provided as a Source Data file.



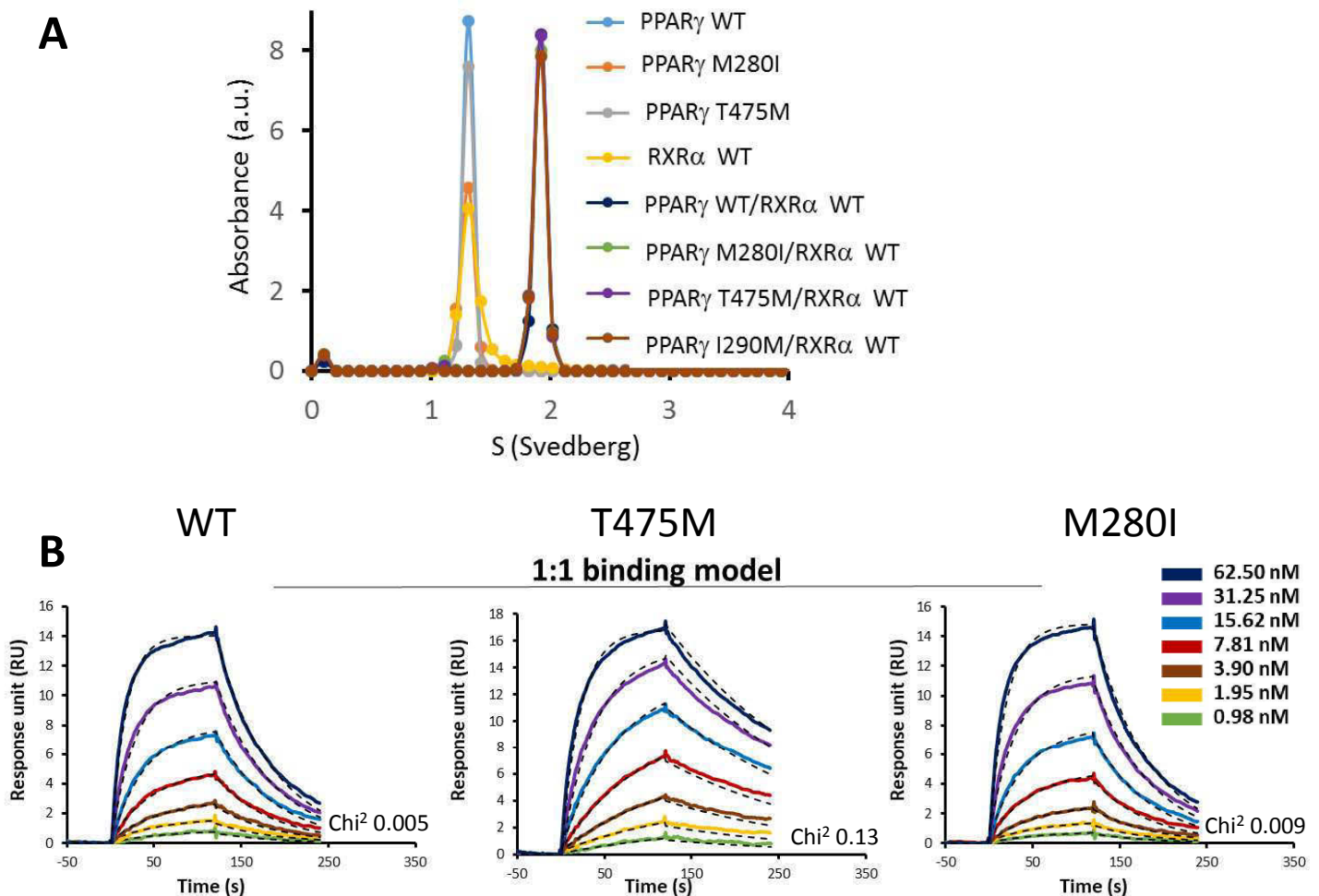
Supplementary Figure 2: characterization of PPAR γ mutants. A) Left: Gel filtration (S75 26/60) elution profile of apo PPAR γ WT and mutants that elute as monomers. Right: coomassie stained SDS gel corresponding to the PPAR γ wild-type (WT) and mutants monomeric peaks. **B)** Left: Gel filtration (S75 26/60) elution profile of apo RXR α WT. The protein elutes as a tetramer (T) and a second peak corresponding to a monomer (M). Right: coomassie stained gel of the monomeric peak of RXR α WT. **C)** (I) Native PAGE of PPAR γ WT (lane 1), M280I (lane 2), T475M (lane 3), PPAR γ WT with 1 equivalent of RXR α WT (lane 4), M280I with 1 equivalent of RXR α WT (lane 5), T475M with 1 equivalent of RXR α WT (lane 6) and RXR α monomeric WT (lane 7). (II) Native PAGE of PPAR γ WT (lane 1), I290M (lane 2), PPAR γ WT with 1 equivalent of RXR α WT (lane 4), I290M with 1 equivalent of RXR α WT (lane 5), and RXR α WT (lane 7).



Supplementary Figure 3: denaturing mass spectra of PPAR γ LBD I290M (a), M280I (b), T475M (c), and PPAR γ WT (d). The insets highlight the most intense charge states of each individual protein between the 1000-1500 m/z range. The experimental measured masses of the proteins are depicted in the right side of the mass spectra.



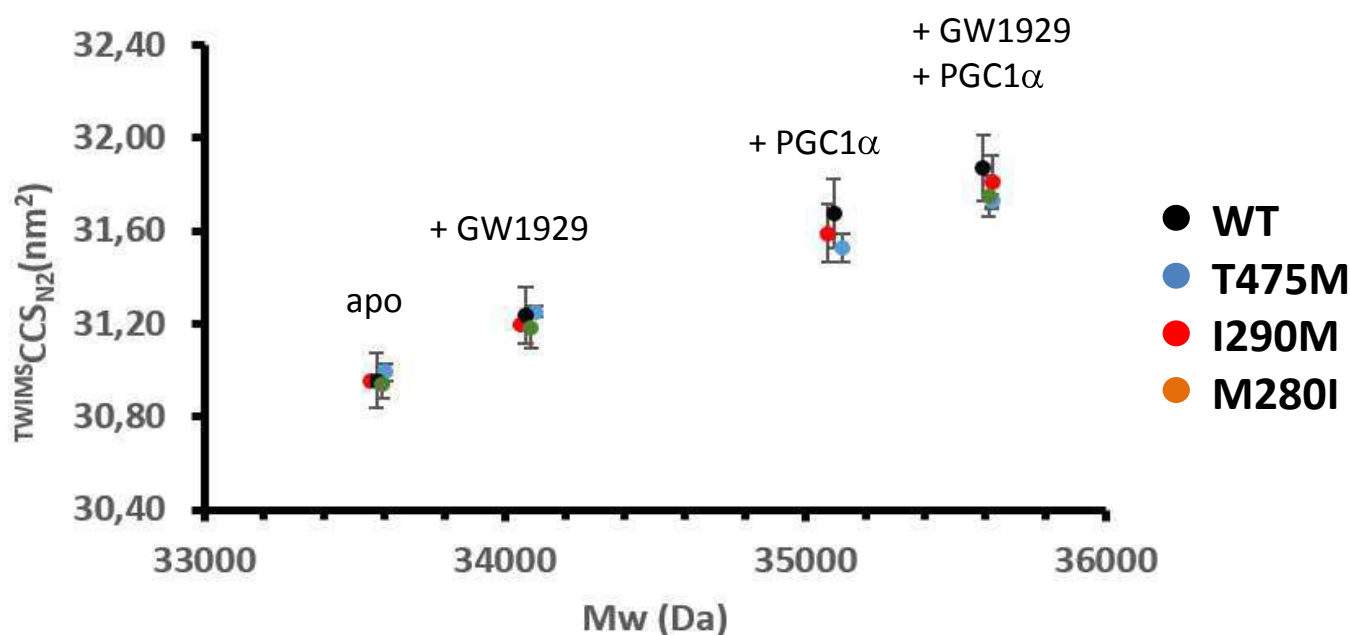
Supplementary Figure 4: native electrospray ionization mass spectra of PPAR γ LBD I290M (a), M280I (b), T475M (c), and WT (d). Left panels correspond to the mass spectra of apo proteins while right panels show the mass spectra of the ternary complexes obtained after addition of GW1929, and PGC1 α coactivator peptide. These spectra indicate the absence of any unexpected bound ligand in apo proteins and the formation of ternary complexes upon addition of GW1929 and PGC1 α peptide



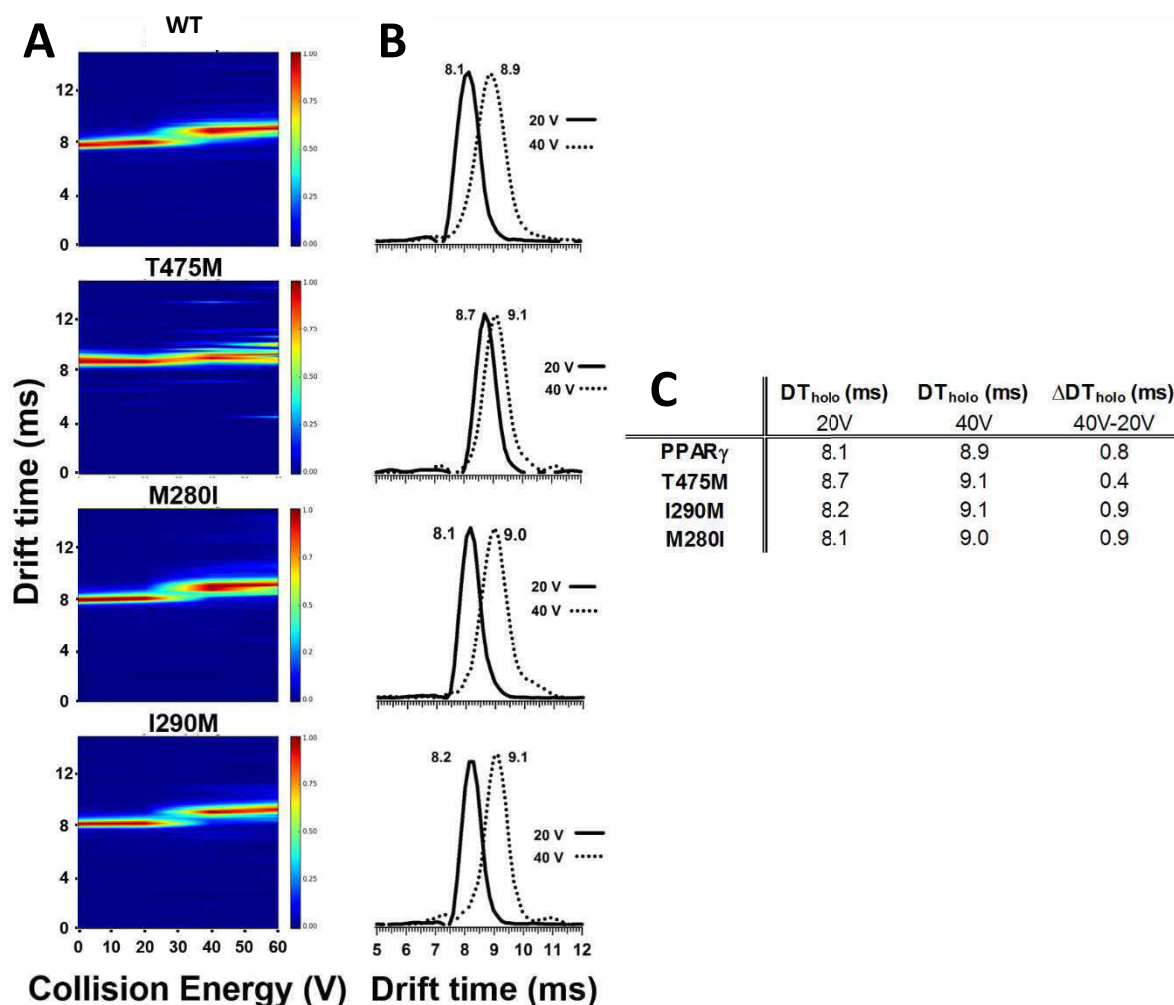
C

	steady state affinity	1:1 kinetic model		
	K_D (nM)	k_{off}/k_{on} (nM)	k_{on} (10^{-4} nMs ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)
PPAR γ 2 WT	31.5 ± 0.2	23 ± 1	7.4 ± 0.1	0.0169 ± 0.0001
PPAR γ 2 T475M	16.6 ± 0.4	7.1 ± 0.4	6.9 ± 0.2	0.0049 ± 0.0002
PPAR γ 2 M280I	38 ± 2	39 ± 10	4.9 ± 0.7	0.019 ± 0.004

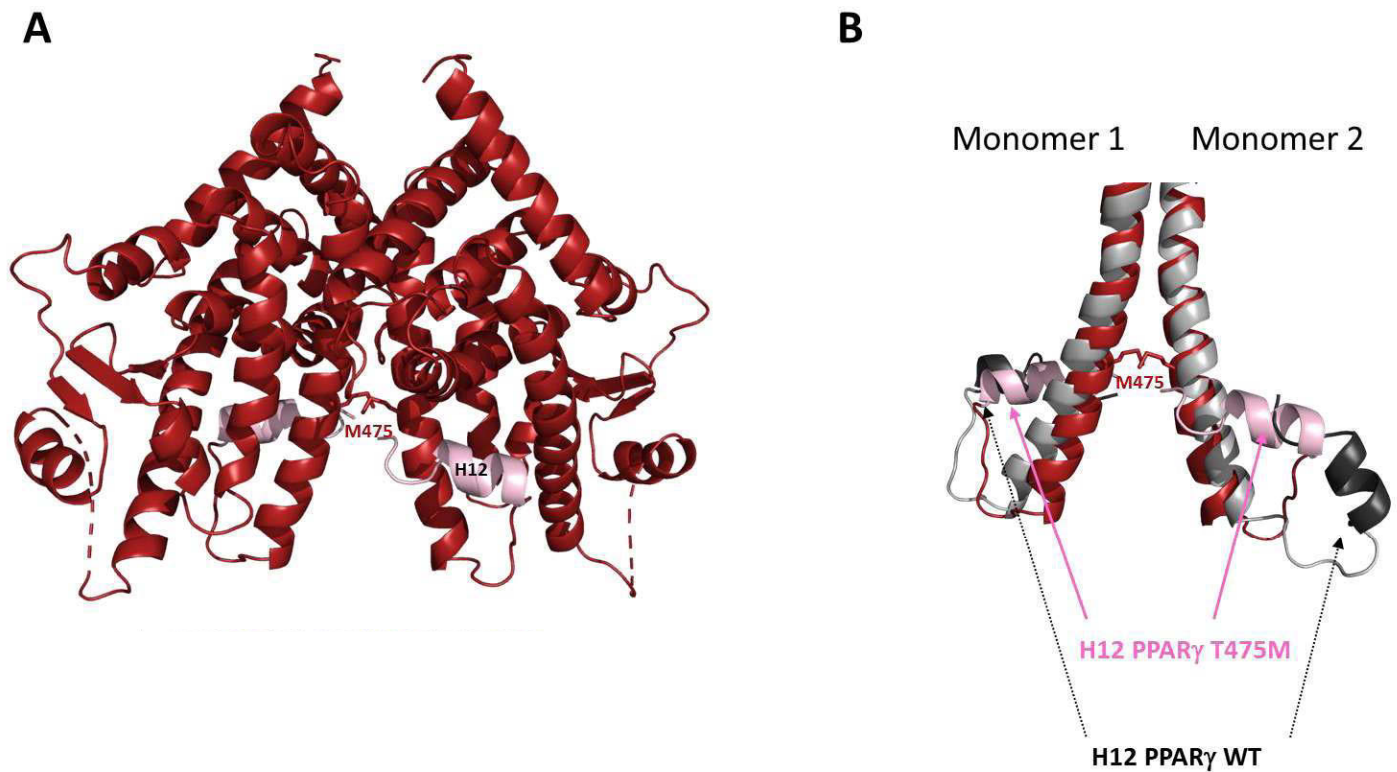
Supplementary Figure 5: ability of PPAR γ mutants to form heterodimer with RXR α . **A)** Analytical ultracentrifugation analysis in sedimentation velocity. Both RXR α , PPAR γ WT and mutants LBDs run as monomers. When mixed in a 1:1 stoichiometry, PPAR γ mutants form an heterodimer with RXR α similarly to PPAR γ WT. **(B-C) SPR data analysis of PPAR γ interaction with RXR α .** **B)** Kinetic model for 1:1 binding. The obtained response curves and the corresponding fittings (dashed lines) are showed in the 62.5-1 nM concentration range of PPAR γ . **C)** Summary of the kinetic and equilibrium affinity parameters of the interactions. The mean binding parameters from two independent sets of kinetic experiments are reported. Errors represent standard deviations of the experimental values derived from independent kinetic measurements. The steady state affinity and the 1:1 binding kinetic model are consistent, and both indicate that T475M interacts with RXR α more tightly than PPAR γ WT and M280I with similar affinity.



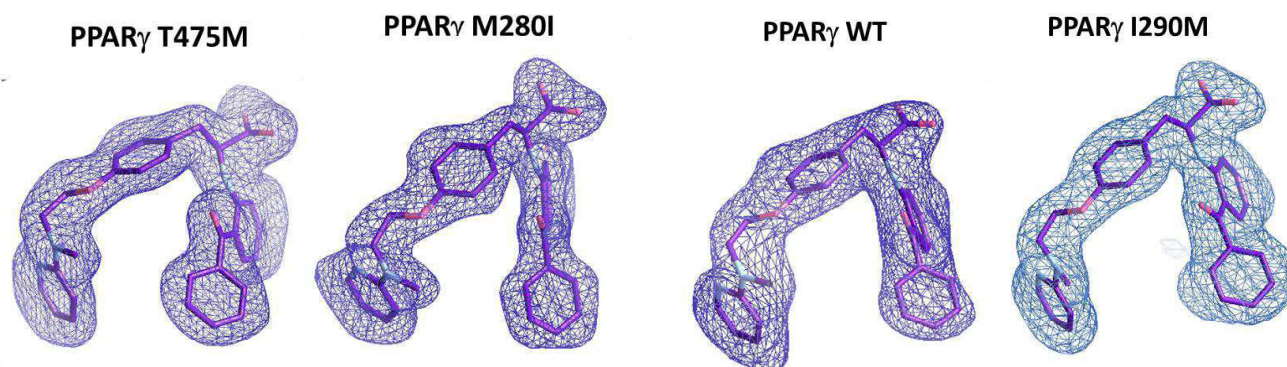
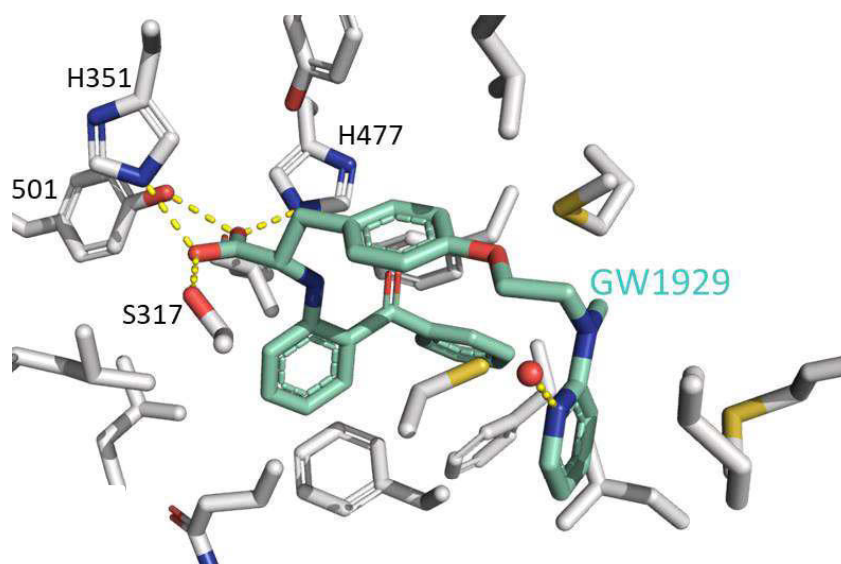
Supplementary Figure 6: variation of the collision cross sections (CCS) from ion mobility mass spectrometry experiments of PPAR γ WT and mutants (T475M, I290M and M280I) after addition of GW1929 and PGC1 α coactivator peptide. The TWCCSN2 values of the binary (PPAR γ /PGC1 α or PPAR γ /GW1929) or ternary (PPAR γ /PGC1 α /GW1929) complexes are higher compared to the apo forms, in agreement with the mass increase owing to the addition of the GW1929 and the PGC1 α coactivator peptide. Overall, the TWCCSN2 variation of all the proteins/protein complexes as a function of the Mw follow the same trend and only very minor, not significant differences can be observed between PPAR γ WT and the three mutants in the two states (apo and holo forms).



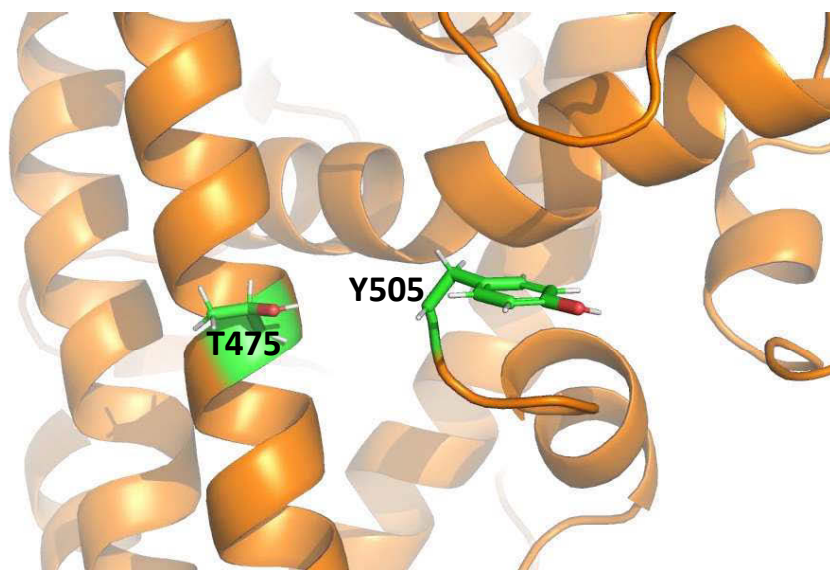
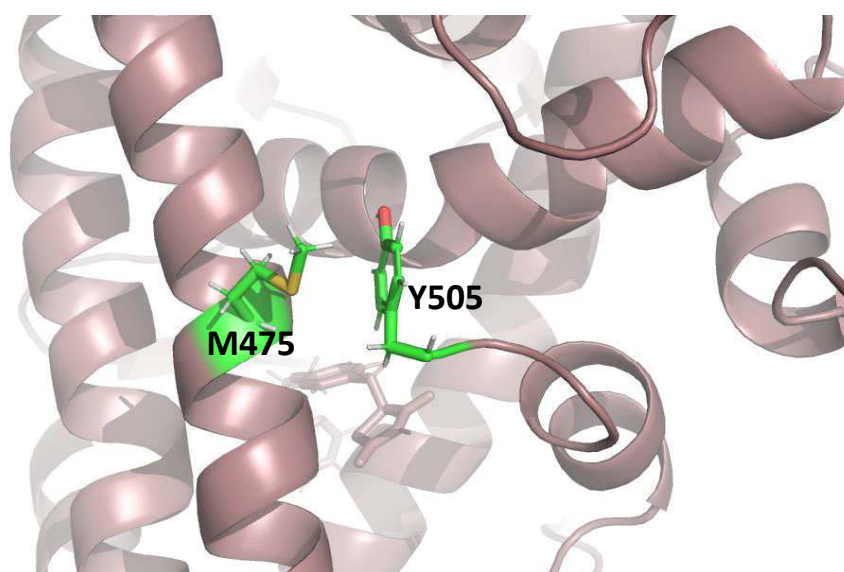
Supplementary Figure 7: collision induced unfolding experiments of PPAR_γ WT, T475M, M280I, and I290M proteins in presence of PGC1 α and GW1929. **A)** CIU fingerprints of the 12+ charge state of PPAR_γ/PGC1 α /GW1929 complexes. **B)** Extracted ATDs of each individual complex at 20 V (solid lines) and 40V (dashed lines). **C)** Table summarizing the ion mobility drift times and drift time differences for the WT and mutant PPAR_γ proteins. An increase of the ion mobility drift times of the four PPAR_γ/PGC1 α /GW1929 complexes can be observed when the acceleration voltage is set between 20 and 40 V, which corresponds to an increase of the global unfolding process between the two voltages. Even if the four PPAR_γ/PGC1 α /GW1929 complexes exhibit one transition at the same collision energy, the drift time difference between the 20V state and the 40V state of the T475M mutant complex is lower compared to the other complexes (panel B and C), leading to the conclusion that the PPAR_γ T475M/PGC1 α /GW1929 complex is less prone to the unfolding process than the other complexes. These results highlight and improved gas-phase stability of the T475M mutant complex compared to other constructs (PPAR_γ WT, I290M, and M280I complexes).



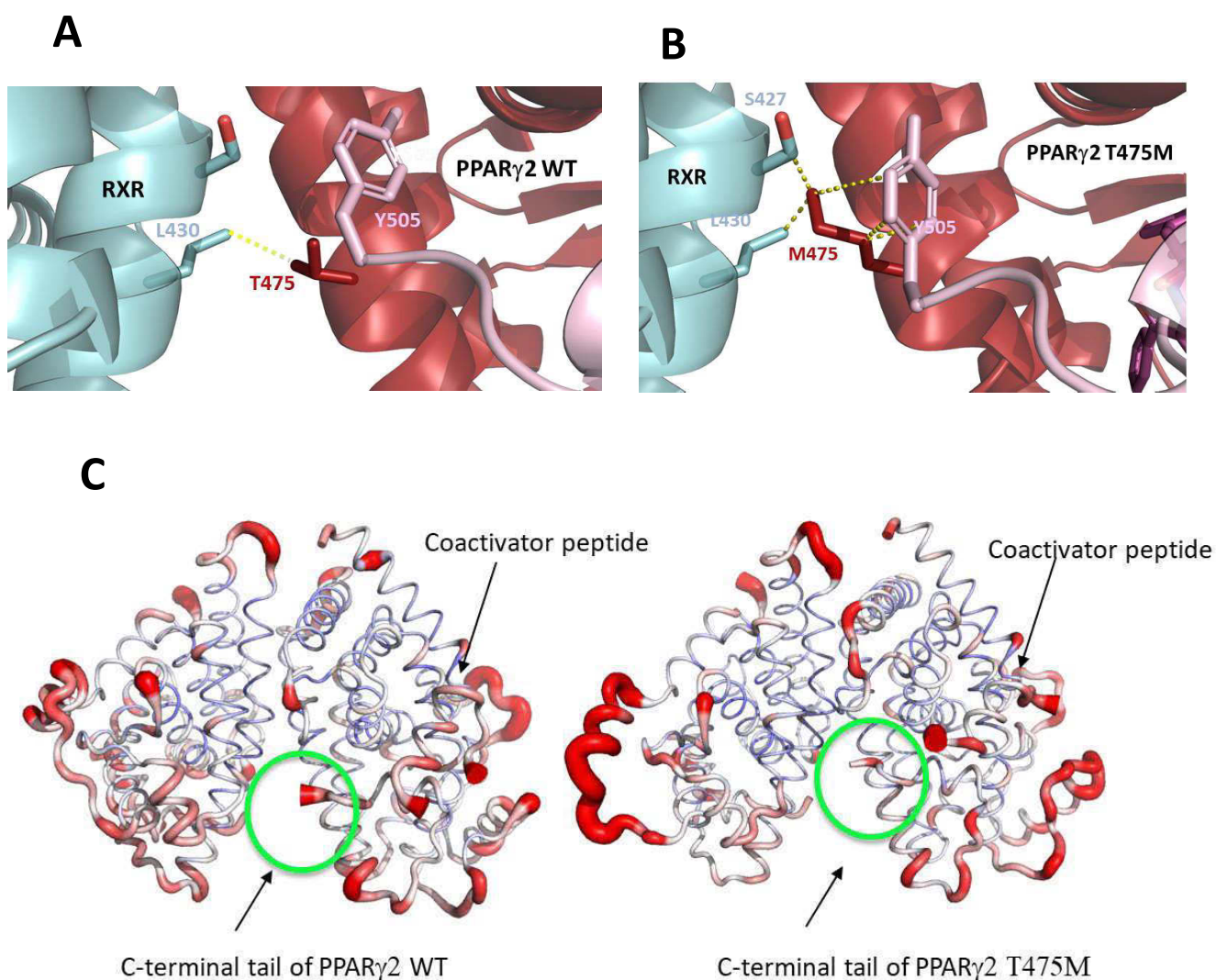
Supplementary Figure 8: **A)** overall structure of the apo PPAR γ T475M homodimer. **B)** Superposition of the homodimer interface of PPAR γ T475M apo in purple and of PPAR γ 2 WT apo (PDB ID: 1PRG) in grey. The AF-2 helix (H12) are highlighted in pink and black for PPAR γ T475M and WT, respectively. Residue 475 are shown in stick representation. In contrast to PPAR γ WT apo, in PPAR γ T475M apo, both LBDs forming the homodimer have a fully active conformation.

A**B**

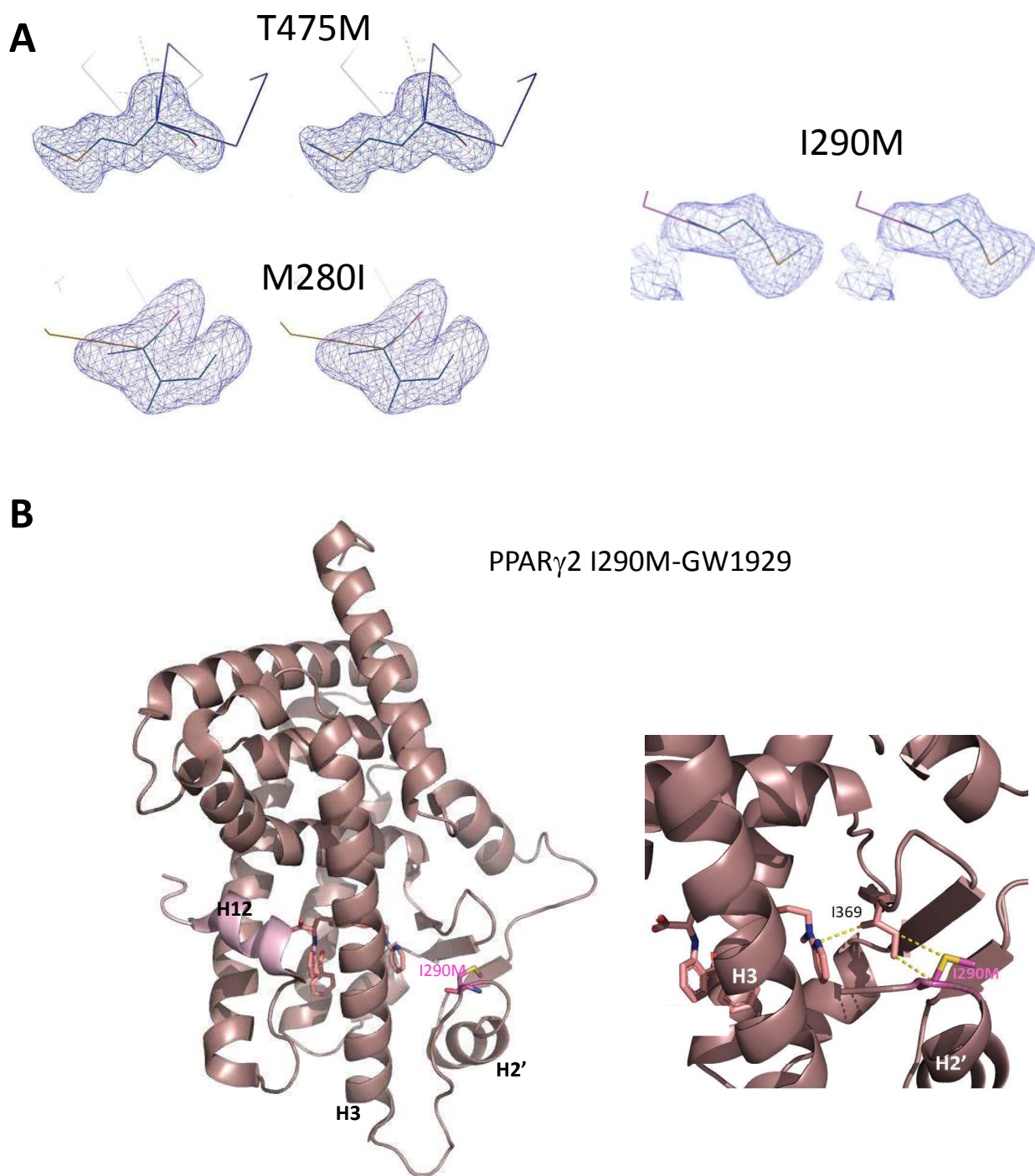
Supplementary Figure 9: A) GW1929 modelled into the difference density of the PPAR γ WT and mutants crystal structures. Shown is an unbiased omit Polder map contoured at 3.5σ , with model bias reduction and exclusion of solvent density. **B)** Interactions made between GW1929 and residues lining the ligand binding pocket of PPAR γ WT. Contributing side chains are shown as grey sticks, with residue forming hydrogen bonds (yellow dashed lines) identities labelled.

A**PPAR γ 2 WT****B****PPAR γ 2 T475M**

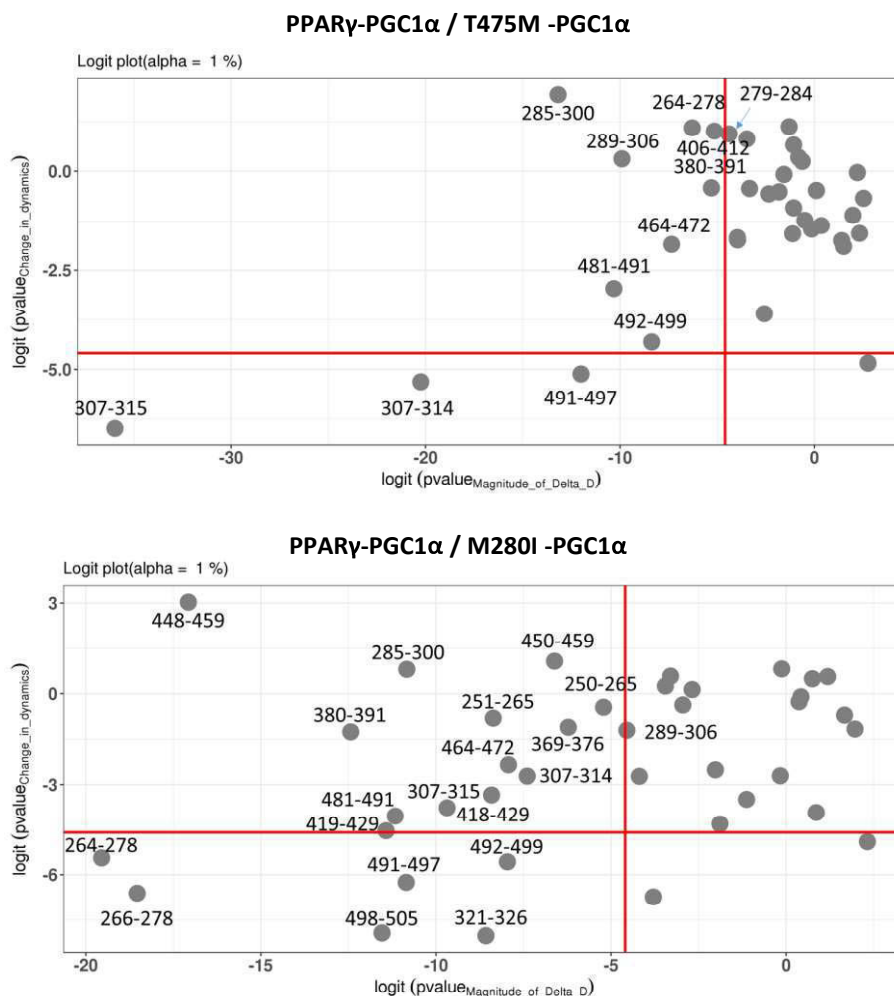
Supplementary Figure 10: representation of the average structures of PPAR γ WT (**A**) and PPAR γ T475M (**B**). Zoom around T475M that interacts with Y505.



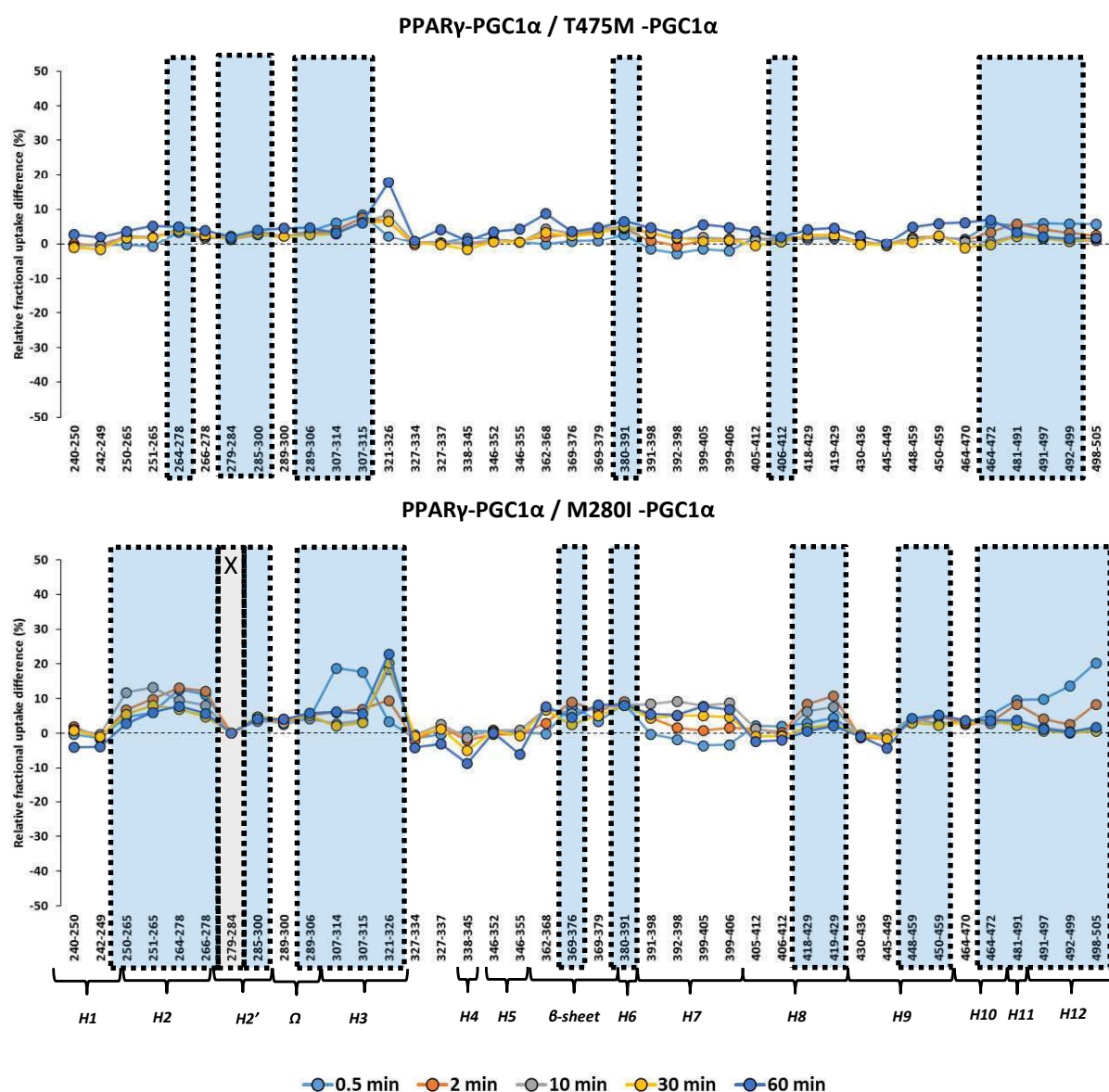
Supplementary Figure 11: zoom in the heterodimer interface around residue 475 of PPAR γ -RXR α WT (PDB: 1FM6) (**A**) and modelled PPAR γ T475M-RXR α (**B**). Interactions of residue 475 are shown by yellow dashed lines. **C**) The atomic fluctuations calculated from the molecular dynamics simulation (last 10 ns) of the holo form of PPAR γ /RXR α complexes with rosiglitazone and coactivator peptide. The fluctuations are mapped onto the 3-D surface of the proteins complexes. The color scale goes from blue (less flexible) to red (most flexible) between 0 and 2.5 Å. The thickness of the tube also reflects the flexibility (thicker corresponds to more flexible). Left: WT; right: T475M mutant. Indicated in the Fig. are the C-terminal ends of the PPAR γ and the location of the coactivator peptides.



Supplementary Figure 12: **A)** stereo views of the unbiased omit Polder maps contoured at 3.5σ , with model bias reduction and exclusion of solvent density of the mutated residues. **B)** Crystal structure of the PPAR γ 2 I290M LBD-GW1929 complex. Right: zoom around the mutated M290 residue that interacts with I369 contacting the ligand.

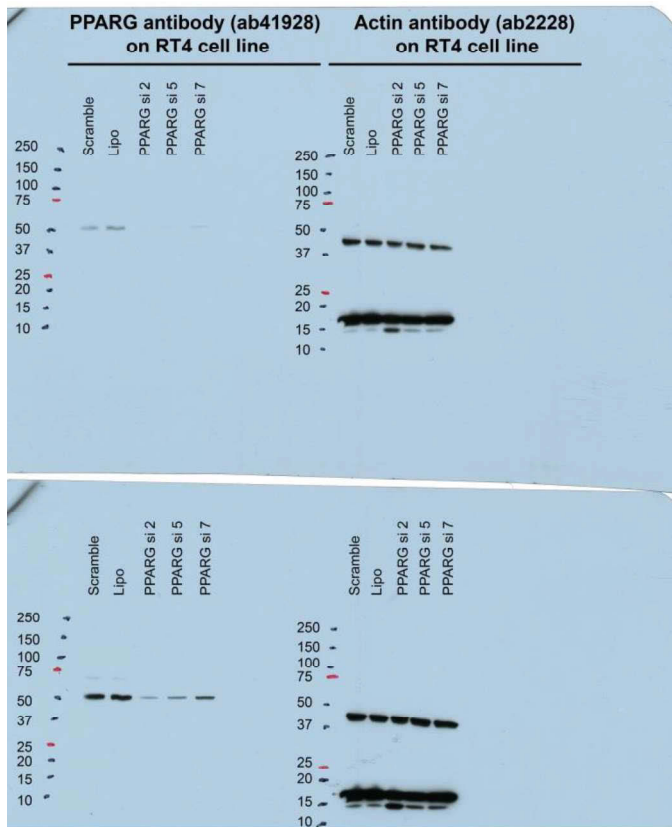


Supplementary Figure 13: logit representation of the statistical results for experiment in MEMHDX. Each point represents a single identified peptide. The red bars represent the statistical significance limits : the vertical one is for the magnitude of the difference between the two states while the horizontal one is for the change in dynamics. Peptides which are at the left of the vertical bar present a statistically significance of the difference between the two compared states (statistical significance value set to 0.01). Source data are provided as a Source Data file.

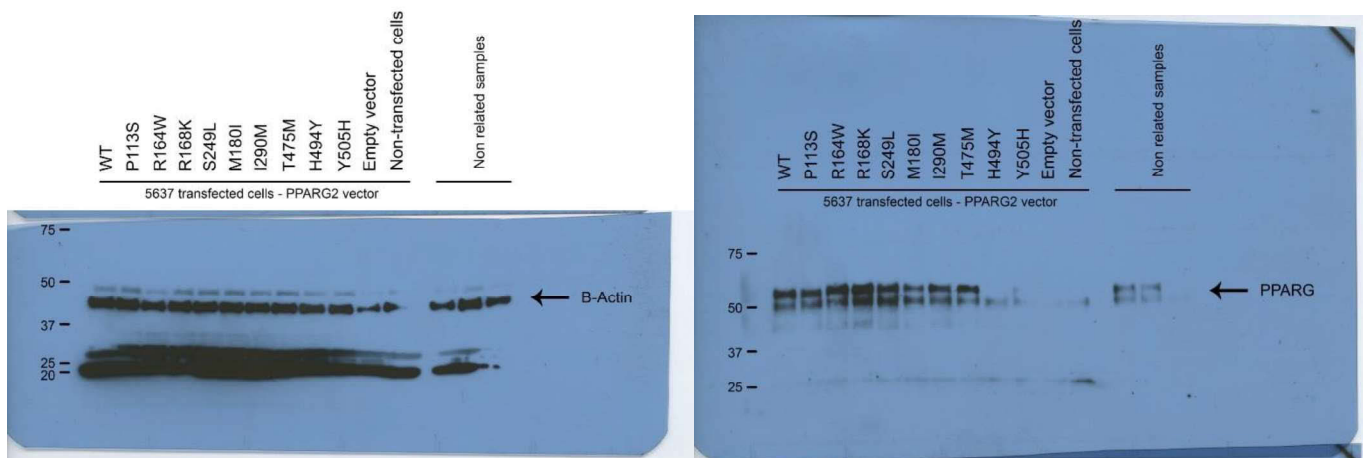


Supplementary Figure 14: HDX-MS analysis of the effect of PPAR γ T475M and M280I mutations on PPAR γ -PGC1 α complexes. Relative uptake difference plots are represented by subtracted RFU of mutant-PGC1 α complexes from PPAR γ -PGC1 α complex RFU. Peptides highlighted in blue represent peptides with a difference statistically significant (using MEMHDX, $p < 0.01$, see supplementary Fig13). Peptides highlighted in grey represent peptides carrying the mutation site of the corresponding mutant and were not identified. Source data are provided as a Source Data file.

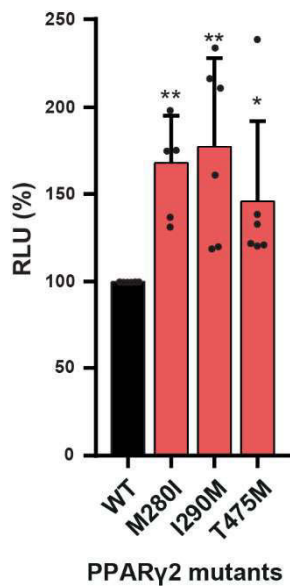
A



B



Supplementary Figure 15: uncropped scans of western-blot for figure 2C (**A**) and Supplementary figure 1C (**B**). **A**) Long and short exposures are shown for both antibodies (PPARG and actin)



Supplementary Figure 16/ Effect of the PPAR γ mutations on coactivator interactions.

Mammalian two-hybrid analysis reveals increased interaction of PPAR γ mutants (M280I, I290M and T475M) with MED1 coactivator peptide. pG5-Firefly luciferase reporter plasmid was co-expressed with VP16-PPARG (wild-type or mutants) and with GAL4-DNA-binding-domain-fused MED1. *Renilla* luciferase, expressed under the control of the CMV promoter, was used to normalize the signal. The data shown are the means $\pm$ SD of four independent experiment conducted in quadruplicate. The results for each mutant were compared with those for the wild-type in Dunnett's multiple comparisons test, * $0.01 < p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.01$.

IDENTIFICATION DE GENES CIBLES CANDIDATS DE PPAR γ IMPLIQUES DANS SON ROLE PROTUMORIGENIQUE

Les modalités d'activation de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α dans les tumeurs luminales de la vessie ont été largement étudiées ces dernières années, conduisant à l'identification, par plusieurs équipes de recherche incluant la nôtre, de mutations et d'amplifications de PPAR γ ainsi que de mutations de RXR α .

En revanche, la voie PPAR γ est encore très mal connue au sein de ces tumeurs. Des efforts ont récemment été mis en œuvre pour mieux comprendre les conséquences de l'activation de l'hétérodimère sur la cellule tumorale, qui ont conduits à la mise en évidence d'un effet sur le micro-environnement et l'échappement au système immunitaire, ainsi que sur la croissance de la cellule elle-même. Cependant, il reste encore de nombreuses zones d'ombre, et les gènes impliqués dans ces mécanismes sont encore inconnus. Cette partie de mon projet a visé à identifier, parmi les gènes cibles de PPAR γ , quels sont les gènes qui pourraient médier son rôle pro-tumorigénique.

Pour cela, j'ai commencé par identifier les gènes régulés par l'hétérodimère PPAR γ /RXR α . En effet, en plus des études réalisées sur les mutations activatrices de RXR α , j'ai montré que l'inhibition de l'expression de RXR α par des siRNA entraîne un effet sur la viabilité cellulaire qui est identique à celui obtenu par l'inhibition de l'expression de PPAR γ (FIGURE 9.A, PAGE 99).

Ensuite, j'ai identifié, parmi ces gènes, ceux qui sont régulés directement par l'hétérodimère PPAR γ /RXR α grâce à une expérience de ChIP-sequencing. Enfin, parmi ces gènes cibles directs, j'ai sélectionné 30 gènes candidats en étudiant leurs caractéristiques dans les tumeurs de la vessie, dans le but de réaliser à l'avenir un mini-screening par siRNA, et ainsi identifier les gènes cibles direct de PPAR γ médiant son rôle protumorigénique dans les tumeurs luminales de la vessie.

I. Identification des gènes régulés par PPAR γ dans les tumeurs luminales de vessie

Gènes régulés par l'hétérodimère PPAR γ /RXR α dans un modèle de lignée cellulaire de carcinome luminal de vessie

En 2014, notre équipe a publié une signature d'activation de PPAR γ issue d'une analyse transcriptomique sur puce des gènes différenciellement régulés après extinction de l'expression de PPAR γ . Cette expérience a été réalisée dans une lignée cellulaire de carcinome de vessie présentant un gain de PPAR γ et une forte expression des marqueurs de la différenciation urothéliale, la lignée SD48 (Biton et al., 2014). J'ai utilisé ce jeu de données afin d'identifier les gènes régulés par PPAR γ dans un contexte de cancer luminal de la vessie. Etant donné l'importance de RXR α dans le rôle protumorigénique de PPAR γ , j'ai également analysé les gènes différenciellement régulés après extinction de l'expression de RXR α par siRNA, au sein de la même lignée SD48.

Les gènes significativement régulés ($p\text{-value} \leq 0,1$) après extinction de l'expression de PPAR γ et RXR α sont respectivement au nombre de 272 et 260, pour seulement 33 gènes communs. Ce nombre réduit de gènes est dû au design expérimental qui avait été choisi, adapté à la création d'une signature globale, mais entraînant une perte de précision : chaque jeu de donnée comprend trois échantillons contrôle transfectés par un siRNA dirigé contre la luciférase, et trois échantillons transfecté chacun par un siRNA dirigé contre PPAR γ ou RXR α . Ceci permet de limiter les effets non spécifiques de chaque siRNA, mais entraîne une diminution de la précision due à des variations de l'efficacité des siRNA et donc de l'effet sur les gènes cibles de la protéine, entraînant une trop forte variabilité entre les échantillons (FIGURE 9.B, PAGE 99). Afin de palier à ce problème, j'ai choisi d'utiliser une sélection des gènes non pas selon leur significativité, mais selon la différence moyenne d'expression entre les différentes conditions ($| \text{Log fold change} | \geq 0,3$).

J'ai ainsi identifié 579 gènes positivement et 687 gènes négativement régulés après extinction de l'expression de PPAR γ et RXR α . Ces gènes incluent des gènes cibles de PPAR γ précédemment décrits dans l'abiogenèse, tels que FABP4 ou ACSL5, ainsi que des gènes de la différenciation urothéliale tels qu'UPK1B. En revanche, certains gènes cibles connus de l'hétérodimère semblent être régulés uniquement suite à l'extinction de l'expression de PPAR γ , tels que PDK4 ou PLIN2 (FIGURE 9.C, PAGE 99).

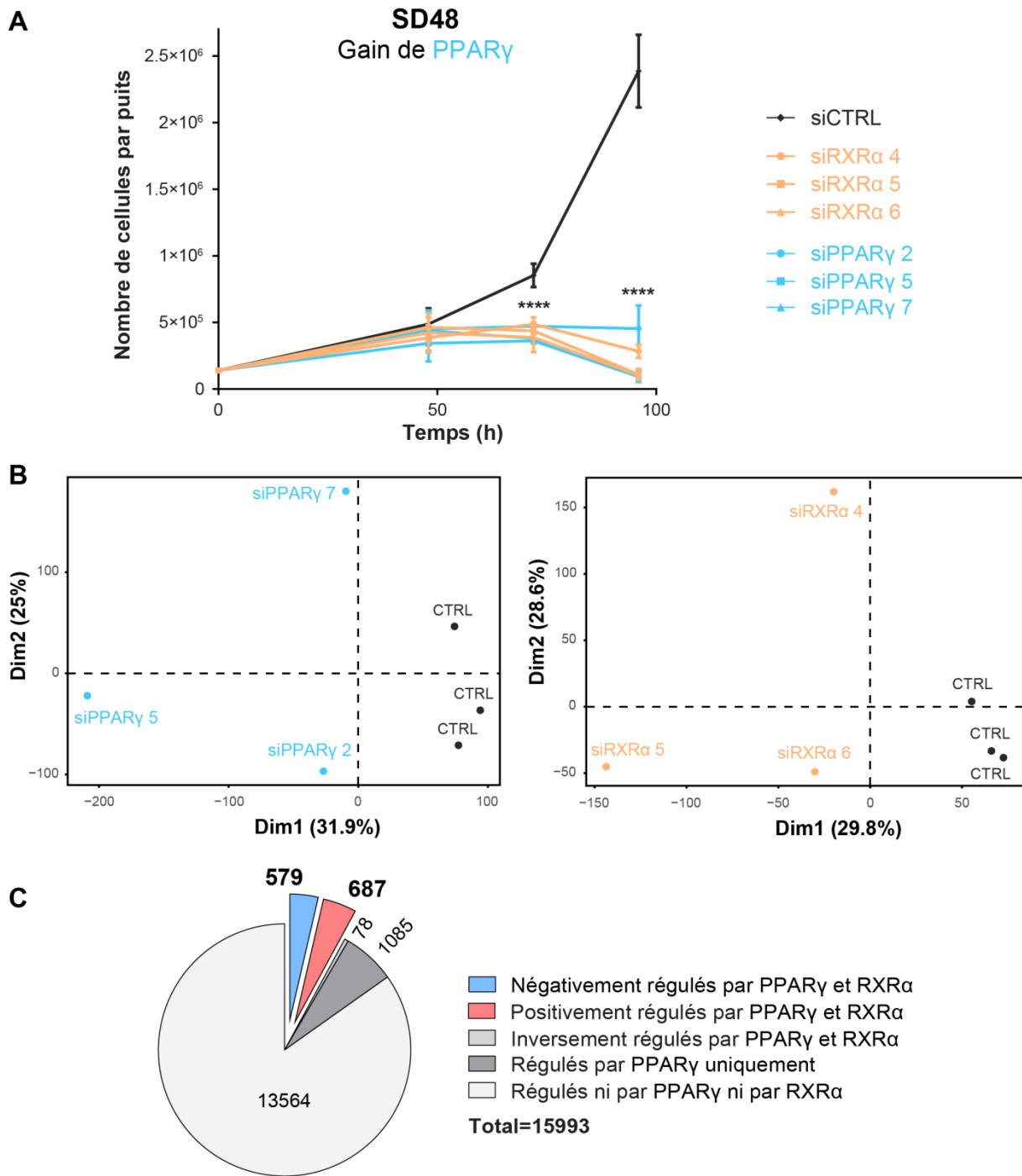


Figure 9 : Gènes différenciellement exprimés après extinction de l'expression de PPAR γ et RXR α

A. Nombre de cellules par puits après extinction de l'expression de PPAR γ ou RXR α par un siRNA dans la lignée SD48. Les résultats représentés sont issus de deux expériences indépendantes réalisées en dupliquât. Les différences de nombre de cellules ont été évaluées par le test de comparaisons multiples de Dunnett : **** $p < 0.0001$. **B.** Analyse en composante principale des transcriptomes des échantillons après extinction de l'expression de PPAR γ ou RXR α par siRNA dans la lignée SD48. **C.** Statut de régulation des gènes après extinction de l'expression de PPAR γ ou RXR α . Les gènes sélectionnés comme régulés positivement et négativement par l'hétérodimère PPAR γ /RXR α sont respectivement indiqués en rouge et bleu. Les gènes considérés comme non régulés par l'hétérodimère sont indiqués en gris.

Expression des potentiels gènes cibles de PPAR γ dans les tumeurs de vessie

Le choix d'une sélection selon le *fold change* et non selon la p.value augmente le risque d'artefacts dus aux effets non significatifs des siRNA, et l'utilisation d'une lignée cellulaire est peu représentatif des conditions existant dans une tumeur. Il est possible de compenser ces risques en prenant en compte davantage de jeux de données d'origine et de contexte différent : pour observer des effets plus représentatifs d'un modèle tumoral, j'ai utilisé deux jeux de données de transcriptomes de tumeurs de vessie. Le premier jeu de données est celui disponible au sein de notre laboratoire (Biton et al., 2014) composé de 196 tumeurs dont 101 NMIBC analysées sur puces. Le second jeu de données est celui publié par le TCGA (TCGA, 2017) composé de 405 MIBC primitives, analysées par RNA-seq.

L'expression de PPAR γ au niveau transcriptomique étant fortement corrélé à son activité et à l'expression de ses gènes cibles, j'ai utilisé ce critère afin de séparer les tumeurs présentant d'une part une forte activité et d'autre part une faible activité de PPAR γ . Les tumeurs présentant une expression de PPAR γ supérieures au 3^{ème} quartile ont été considérées comme PPAR γ^{high} et celles présentant une expression inférieure au 1^{er} quartile ont été considérées comme PPAR γ^{low} , permettant ainsi d'identifier les gènes différenciellement régulés entre les tumeurs PPAR γ^{high} et PPAR γ^{low} dans ces deux jeux de données de tumeurs (FIGURE 10.A, PAGE 101).

Si un gène cible de PPAR γ est important pour son rôle dans la viabilité cellulaire des tumeurs de vessie, son expression dans les tumeurs est supposément cohérente avec la régulation exercée par l'hétérodimère PPAR γ /RXR α . Ainsi, les gènes négativement régulés après extinction de l'expression des deux partenaires sont de bons candidats s'ils sont davantage exprimés dans les tumeurs PPAR γ^{high} , et inversement.

J'ai donc sélectionné les gènes négativement régulés après extinction de PPAR γ et RXR α présentant une expression plus importante dans les tumeurs PPAR γ^{high} que dans les tumeurs PPAR γ^{low} (*fold change* ≥ 0) et les gènes positivement régulés après extinction de PPAR γ et RXR α présentant une expression moins importante dans les tumeurs PPAR γ^{high} que dans les tumeurs PPAR γ^{low} (*fold change* ≤ 0). J'ai ainsi identifié 171 gènes positivement et 223 gènes négativement régulés par l'hétérodimère PPAR γ et RXR α dans les tumeurs de vessie (FIGURE 10.B, PAGE 101).

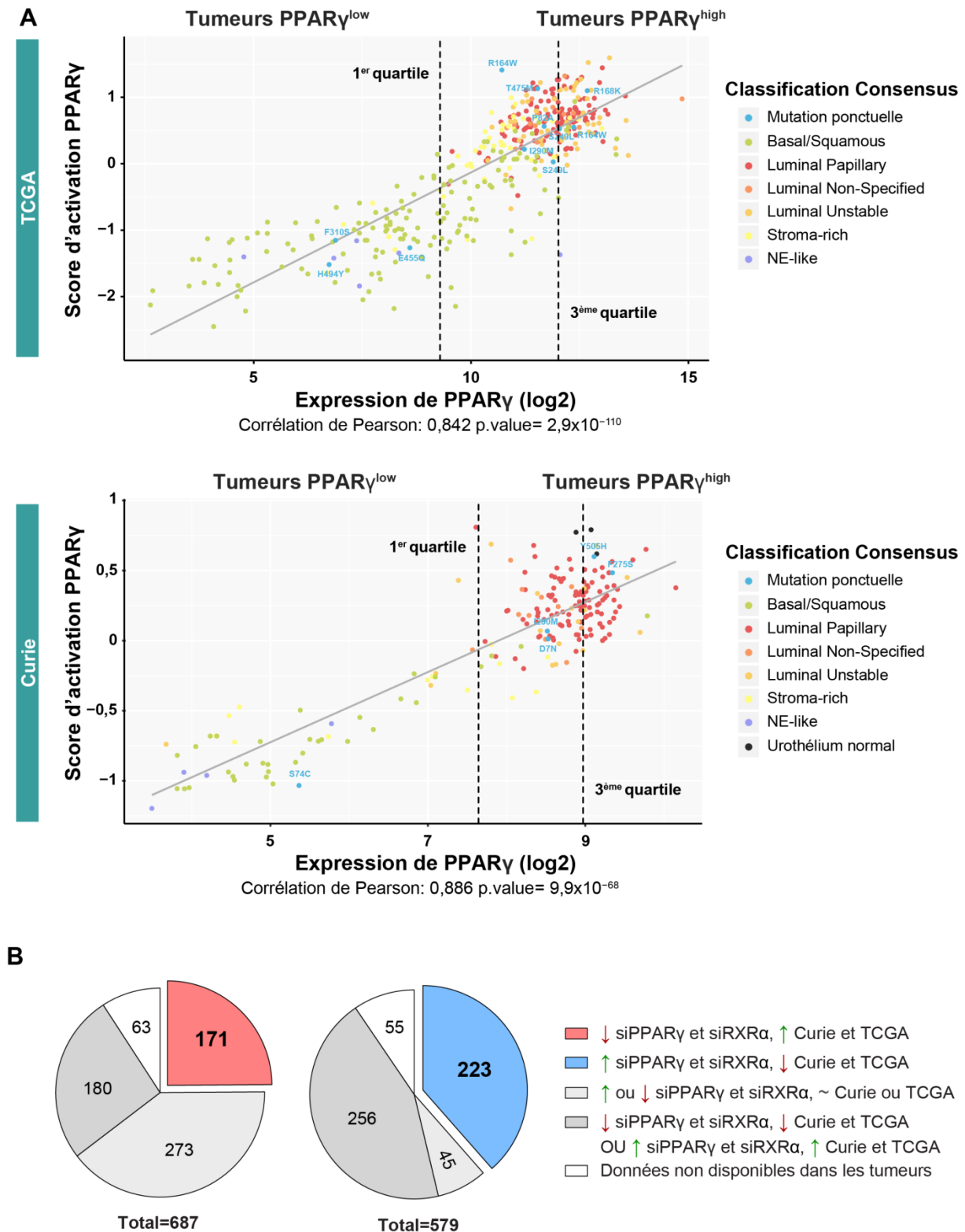


Figure 10 : Gènes régulés par PPAR γ dans les tumeurs de vessie

A. Corrélation de l'activité de PPAR γ selon le Score d'activation de PPAR γ (Rochel et al. 2019) et de l'expression de PPAR γ dans les jeux de données de tumeurs du TCGA (haut) et de Curie (bas). Les pointillés représentent la séparation des tumeurs PPAR γ^{high} et PPAR γ^{low} selon l'expression de PPAR γ . **B.** Statut de l'expression des gènes positivement (gauche) et négativement (droite) régulés par PPAR γ et RXR α dans les tumeurs du TCGA et de Curie.

Les voies et processus biologiques régulés par l'hétérodimère PPAR γ /RXR α

Considérant le large panel de fonctions biologiques de PPAR γ , les processus pouvant être régulés dans les tumeurs de vessie sont nombreux. J'ai réalisé une analyse DAVID des gènes régulés dans les tumeurs déterminés ci-dessus. Les voies du peroxydome et de la voie de signalisation PPAR font partie des premières voies de signalisation enrichies dans la liste des gènes régulés par l'hétérodimère.

Parmi les voies enrichies, DAVID a également identifié des voies du métabolisme, et en particulier du métabolisme lipidique. Cet enrichissement (*Enrichment Score* = 1,4) est d'autant plus marqué dans les gènes positivement régulés par l'hétérodimère PPAR γ /RXR α : un cluster d'annotations fonctionnelles est fortement enrichi dans cette sous-liste de gènes (*Enrichment Score* = 2,94), associant la voie de régulation PPAR et le métabolisme lipidique, en particulier au niveau de différentes étapes de la β -oxydation (FIGURE 11, PAGE 102), alors que ces voies ne sont pas enrichies dans les gènes négativement régulés.

La voie PI3K-Akt est également enrichie dans les gènes régulés par PPAR γ (p.value = 0,063), mais à l'inverse du métabolisme lipidique, cette voie est davantage enrichie dans les gènes négativement régulée (p.value = 0,0065), et n'est pas présente dans les voies enrichies pour les gènes positivement régulés.

Les clusters d'annotations fonctionnelles liés à l'immunité et à l'inflammation sont enrichis dans une moindre mesure (*Enrichment Score* = 0,94), dans les gènes positivement (*Enrichment Score* = 0,74) et négativement (*Enrichment Score* = 0,94 et 1,33) régulés, avec un enrichissement plus marqué dans le dernier groupe.

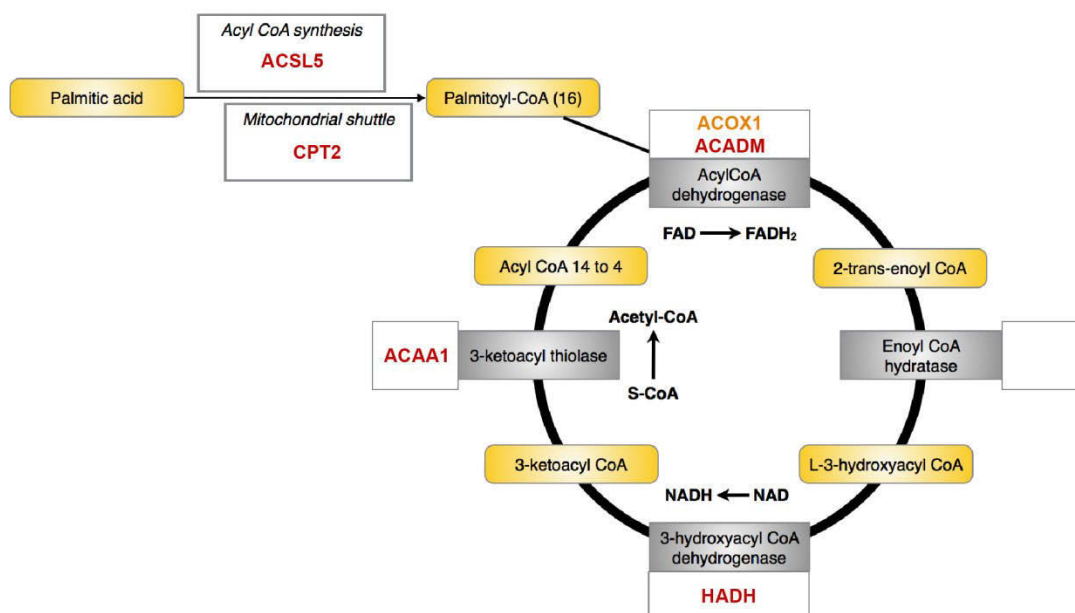


Figure 11 : Enzymes de la β -oxydation des acides gras régulés par PPAR γ dans les tumeurs de la vessie.

Les gènes sélectionnés comme régulés par l'hétérodimère PPAR γ /RXR α sont indiqués en rouges, tandis que les gènes régulés par PPAR γ uniquement sont indiqués en orange.

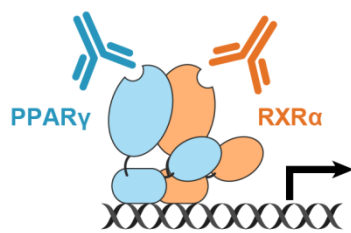
II. Caractérisation des sites de fixation de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α

Cette analyse a pour but d'identifier les gènes régulés par l'hétérodimère PPAR γ /RXR α ayant un rôle dans son effet protumorigénique en réalisant un mini-screening par siRNA. Afin de réduire le nombre de gènes candidats, j'ai choisi de limiter cette analyse aux gènes dont l'hétérodimère régule directement la transcription, permettant ainsi d'identifier l'étape suivante de l'activation de la voie PPAR γ dans les tumeurs luminales de vessie. Afin d'identifier les gènes directement régulés par l'hétérodimère PPAR γ /RXR α , j'ai réalisé une expérience de ChIP-sequencing de chacun des deux partenaires dans la lignée cellulaire de tumeur luminale de vessie SD48 (qui présente un gain de PPAR γ) afin d'identifier leurs sites de liaison à l'ADN et les gènes situés à proximité.

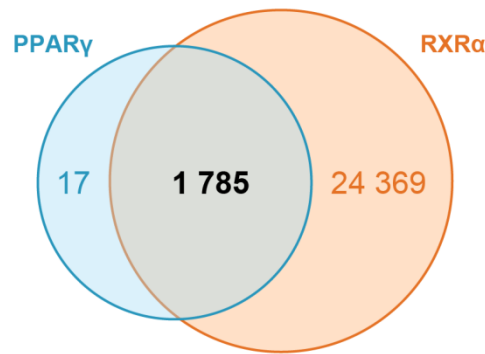
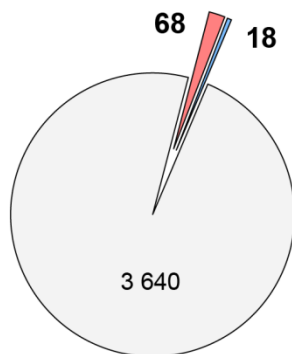
Le *peak calling* ainsi que la comparaison des deux répliquats indépendants ont permis d'identifier 1 796 sites de liaison de PPAR γ et 26 154 sites de liaison de RXR α , incluant 1 785 sites chevauchants entre les sites de liaison de PPAR γ et de RXR α (FIGURE 12.A, PAGE 104).

Etant donné l'objectif de cette étude, il a semblé préférable de considérer un nombre maximal de gènes comme étant potentiellement des cibles directes de l'hétérodimère, puis de s'appuyer sur les analyses transcriptomiques réalisée précédemment pour sélectionner les gènes réellement régulés au sein de la voie PPAR γ . J'ai donc sélectionné les gènes potentiellement régulés par ces sites de liaison en considérant une zone promotrice de 50kB en amont du gène, 30kB en aval, ainsi que le gène en lui-même. Ces critères m'ont permis d'identifier 3 726 gènes possédant un site de liaison au sein de cette zone promotrice, dont 68 précédemment identifiés comme positivement et 18 comme négativement régulés par l'hétérodimère PPAR γ /RXR α , soit un total de 86 gènes (FIGURE 12.B, PAGE 104).

Parmi les 1 613 sites ayant été attribués à un gène, 1 172 sites contiennent un PPRE (Pparg:Rxra MA0065.2) (Khan et al., 2018), pouvant potentiellement réguler 2 975 gènes, dont 73 gènes identifiés ci-dessus comme régulés par l'hétérodimère PPAR γ /RXR α . Seuls 13 gènes régulés par l'hétérodimère ne contiennent pas de PPRE dans les site de liaison identifié à proximité (FIGURE 12.C, PAGE 104). Une identification de novo des motifs enrichis dans les sites de liaison de l'hétérodimère a également identifié, en plus du motif PPRE cité précédemment (FIGURE 12.D, PAGE 104), des motifs de liaison de FOS/JUN (MA0489.1, MA0478.1, MA0490.1), GRHL1 (MA0647.1), GATA3 (MA0037.2), TEAD1 (MA0090.1, MA0090.2) ou encore STAT1 (MA0137.3).

A

Sites de liaison chevauchants

**B**

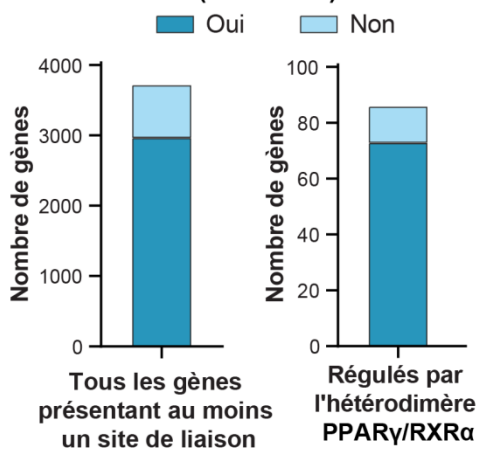
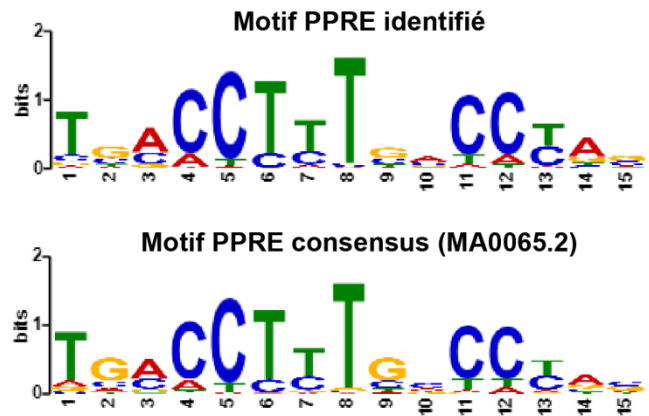
Gènes possédant un site de liaison dans la zone promotrice

- Positivement régulés par PPARγ et RXRα
- Négativement régulés par PPARγ et RXRα
- Non régulés par PPARγ et RXRα

Total=3726

C

Présence du motif PPRE Consensus (MA0065.2)

**D****Figure 12 : Caractérisation des sites de fixation de l'hétérodimère PPARγ/RXRα**

A. Chevauchement des sites de liaison de PPARγ et RXRα. Deux sites sont estimés comme chevauchants à partir de 1 base en commun. **B.** Statut de régulation des gènes présentant un site de liaison de l'hétérodimère PPARγ/RXRα dans leur zone promotrice. Les gènes régulés positivement et négativement par l'hétérodimère PPARγ/RXRα sont respectivement indiqués en rouge et bleu. Les gènes considérés comme non régulés par l'hétérodimère sont indiqués en gris. **C.** Comparaison des motifs identifiés de novo (haut) et du motif consensus MA0065.2. **D.** Présence ou non du motif consensus MA0065.2 dans les sites de liaisons situés dans les régions promotrices des gènes régulés (droite) ou non (gauche) par l'hétérodimère PPARγ/RXRα.

III. Sélection des gènes candidats

Les analyses transcriptomiques et les expériences de ChIP-sequencing ont permis d'identifier 86 gènes dont la transcription est potentiellement régulée directement par l'hétérodimère PPAR γ /RXR α . Cependant, certains critères peuvent permettre de sélectionner, parmi ces gènes, un nombre réduit de gènes candidats.

Le rôle protumorigénique de PPAR γ dans les tumeurs luminale de vessie a été au départ mis en évidence dans des modèles de lignées cellulaires de cancer de vessie, et l'effet de l'extinction de l'expression de PPAR γ sur la viabilité cellulaire diminue avec l'expression de PPAR γ . Les gènes candidats devraient donc présenter une expression plus importante dans des lignées de tumeurs luminales de vessie avec une forte expression de PPAR γ , que dans les tumeurs basales présentant une faible expression de PPAR γ et une faible dépendance à son expression, ou inversement (FIGURE 13.A, PAGE 106). J'ai donc sélectionné trois lignées cellulaires dans lesquelles PPAR γ tient un rôle protumorigénique prépondérant, les lignées SD48, UMUC9 et RT4 qui présentent respectivement un gain, une amplification et une mutation activatrice de PPAR γ , et trois lignées cellulaires dans lesquelles PPAR γ présente une expression et une signature d'activation faible, les lignées UMUC3, VMCUB1 et UMUC6, afin de comparer l'expression des 86 gènes cibles de PPAR γ /RXR α dans de ces lignées.

De plus, si ces gènes présentent un intérêt conséquent pour la cellule tumorale, il est possible qu'ils soient sur-activés par un autre biais que les altérations de PPAR γ et RXR α . J'ai donc calculé, dans les tumeurs du TCGA appartenant à un des trois sous-groupes lumaux, les pourcentages de mutations non silencieuses et d'amplification de chacun de ces 86 gènes, permettant ainsi de préférer certains candidats présentant des taux d'altérations intéressants.

Ces critères m'ont ainsi permis de sélectionner manuellement 25 gènes candidats (FIGURE 13.B, PAGE 106) présentant un profil d'expression dans les lignées cellulaires ou d'altérations dans les tumeurs lumaux intéressants (FIGURE 13.C, PAGE 106).

J'ai également sélectionné quatre gènes cibles de PPAR γ non régulés par les siRNA dirigés contre RXR α . Les trois premiers, PDK4, PLIN2 et ACOX1 sont des gènes cible bien connus de PPAR γ , et sont impliqués dans le métabolisme lipidique qu'ils régulent. Ils font également partie des gènes dont l'écart d'expression après extinction de l'expression de PPAR γ est non seulement significatif, mais également parmi les plus conséquents. Le quatrième gène, VGLL1, présente un intérêt pour ce projet mais également pour le laboratoire, car des analyses de réseaux réalisées par notre équipe et nos collaborateurs ont suggéré un rôle central de ce gène dans la régulation du profil d'expression transcriptomique des tumeurs lumaux, et il pourrait être relié à PPAR γ par des gènes cibles communs (données non publiées).

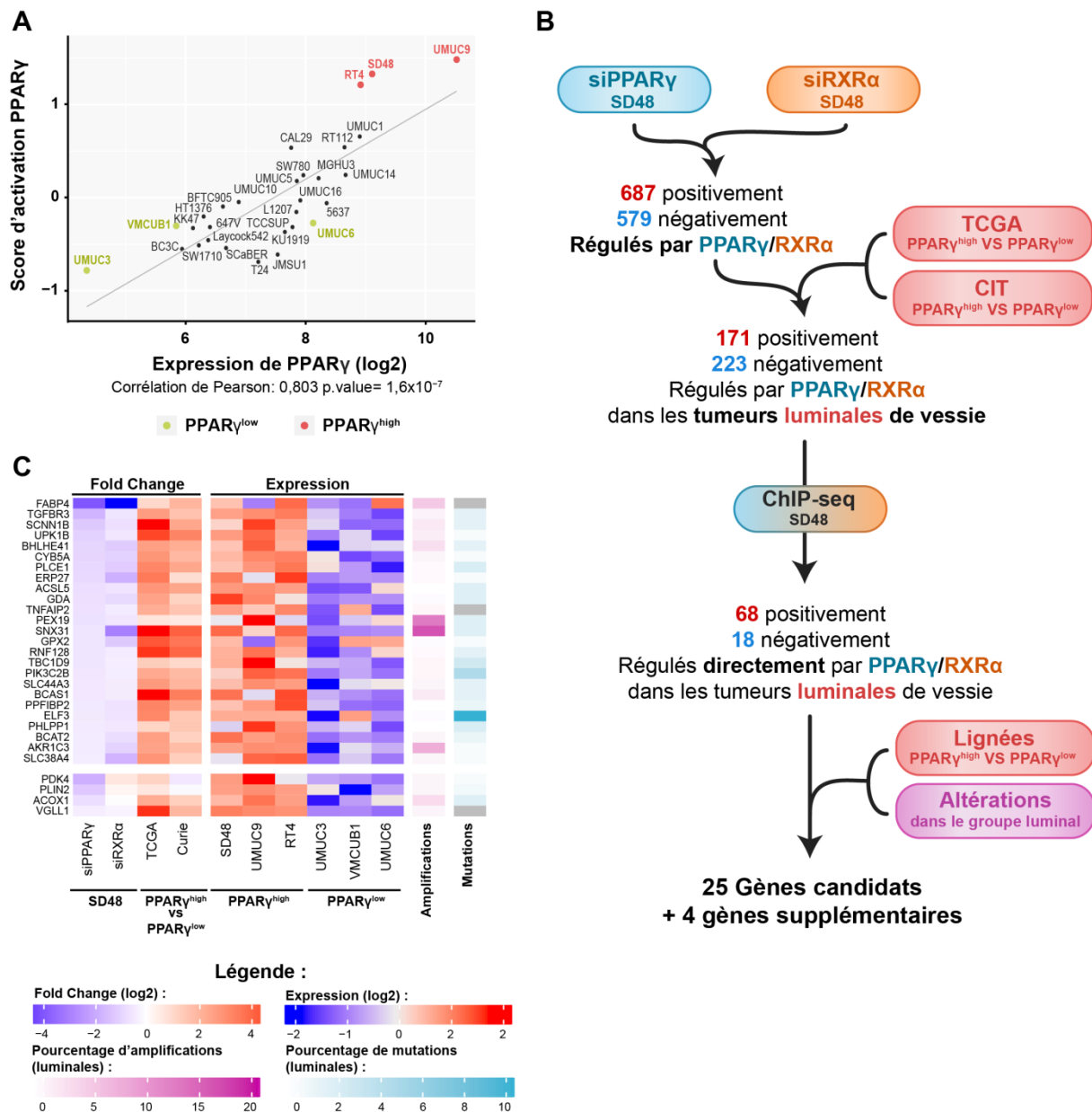


Figure 13 : Sélection des gènes cibles candidats

A. Corrélation de l'activité de PPAR γ selon le Score d'activation de PPAR γ (Rochel et al. 2019) et de l'expression de PPAR γ dans les lignées cellulaires disponibles au sein de notre laboratoire. Les lignées utilisées comme PPAR γ ^{high} sont indiquées en rouges, et les lignées utilisées comme PPAR γ ^{low} en vert. **B.** Schéma récapitulatif du cheminement de sélection des gènes candidats. **C.** Heatmap des caractéristiques des gènes cibles candidats sélectionnés dans les différents jeux de données utilisés pour leur sélection.

Les gènes cibles candidats sélectionnés dans cette étude seront dans les prochains mois intégrés dans un mini-screening siRNA qui sera réalisé sur les lignées luminales SD48, UMUC9 et RT4, permettant d'évaluer l'impact de l'extinction de leur expression sur la viabilité cellulaire, mais également sur la différenciation urothéliale et sur le stockage des lipides des lignées cellulaires de carcinome luminal de vessie, en les comparant à une lignée contrôle de carcinome basal de vessie.

IV. Matériels et Méthodes

Analyses transcriptomiques

Les transcriptomes des tumeurs et de lignées cellulaires de notre banque ainsi que de la lignée cellulaire transfectée par les siRNA dirigés contre PPAR γ ont été analysées sur puces *human exon 1.0 st* tandis que la lignée cellulaire transfectée par les siRNA dirigés contre RXR α a été analysée sur puce *Human Genome U133 Plus 2.0*. Les résultats ont été normalisés par la méthode RMA (Irizarry et al., 2012) à l'aide des CDF personnalisés Brainarray (Dai et al., 2005). Les données de RNA-sequencing et d'altérations génomiques issues du TCGA ont été téléchargées depuis le répertoire HTTP du TCGA (https://tcga-data.nci.nih.gov/tcgafiles/ftp_auth/distro_ftpusers/anonymous/tumor/). Les gènes différenciellement exprimés ont été analysés par LIMMA (Smyth, 2005) et les gènes présentant un FDR inférieur à 10% ont été considérés comme significativement régulés. DAVID (Huang et al., 2009a, 2009b) a été utilisé pour analyser les processus biologiques enrichis, et le clustering des annotations fonctionnelles a été réalisé avec une stringence de classification définie comme « *low* ».

Culture cellulaire

La lignée SD48 a été cultivée en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) obtenu chez Gibco-BRL, à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les transfections par siRNA ont été réalisées grâce à la lipofectamine RNAimax selon les instructions du fournisseur (Invitrogen, #13778100) dans un milieu de culture contenant 1% de SVF. Les siRNA dirigés contre PPAR γ (Qiagen, siPPAR γ 2 : #00071680, siPPAR γ 5: #02634275, siPPAR γ 7 : #03115266) et RXR α (Dharmacon, siRXR α 4 : #J-003443-11, siRXR α 5: #J-003443-12, siRXR α 6 : #J-003443-13) ont été utilisés à des concentrations de 20 et 5nM et comparés à un siRNA dirigé contre la luciférase (Qiagen, siCTRL : #1022070). Les ARN ont été extraits 72h après transfection grâce au kit RNeasy Mini (Qiagen, #74104). Les cellules ont été ensemencées en plaques 6 puits, à une densité de 130 000 cellules par puits, et comptées sur cellule de Malassez.

ChIP-sequencing

Les expériences de ChIP-sequencing, réalisées en deux répliquât indépendants, ont été réalisées grâce au kit ChIP-IT High Sensitivity (Active Motif, #53040) en utilisant 5 μ g d'anticorps anti-IgG (Abcam, #Ab37415), anti-PPAR γ (Santa-Cruz, #SC-7196) ou anti-RXR α (Santa-Cruz, #SC-553). Le séquençage et l'analyse des résultats ont été réalisées en collaboration avec la plateforme de séquençage de l'IGBMC de Strasbourg (<http://www.igbmc.fr/technologies/5/team/54/>). Les séquences ont été alignées sur le génome de référence Hg38 grâce à Bowtie (Langmead et al., 2009), et le *peak calling* grâce à MACS2

(Zhang et al., 2008). Les deux répliquât ont été comparés selon l'IDR (*Irreproducibility Discovery Rate*, <https://sites.google.com/site/anshulkundaje/projects/idr>) et l'annotation des peaks a été réalisée grâce au package R « ChIPpeakAnno » (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/ChIPpeakAnno.html>). L'analyse de motifs a été réalisée en utilisant la suite MEME (Bailey et al., 2009).

DISCUSSION

L'article publié en 2019, dans lequel je suis co-deuxième auteur, a révélé l'existence de mutations activatrices récurrentes entraînant une sur-activation de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α dans les tumeurs lumineales de vessie. Les résultats de l'étude des gènes cibles de PPAR γ au sein de ces tumeurs m'ont permis d'identifier 86 gènes cibles directs de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α , et de sélectionner 29 gènes candidats potentiellement impliqués dans son rôle protumorigénique dans les tumeurs lumineales de la vessie.

Dans les mois à venir, ceci devrait permettre d'identifier, parmi ces gènes, ceux qui médient l'effet pro-tumorigénique de PPAR γ , ainsi que leur éventuel impact sur la différenciation et le métabolisme des cellules tumorales. Ces gènes pourraient ainsi former des cibles thérapeutiques intéressantes, ne présentant pas le large panel de rôles physiologiques de PPAR γ , et donc d'effets secondaires sur le patient.

Les analyses transcriptomiques de gènes différenciellement régulés après extinction de l'expression des deux partenaires ont montré que si RXR α est impliqué dans ce rôle protumorigénique de PPAR γ , il n'est cependant pas nécessaire pour la régulation de certains gènes cibles de ce dernier. En effet, des gènes cibles directs connus de PPAR γ , tels que PDK4, PLIN2 ou ACOX1, voient leur expression diminuer fortement après inhibition de l'expression de PPAR γ , alors que celle de RXR α a peu ou pas d'impact sur leur expression. Ces résultats suggèrent que la régulation de l'expression de ces gènes pourrait se réaliser par un autre mécanisme que la formation d'un hétérodimère avec RXR α . RXR β étant exprimé dans ces cellules, il est probable qu'il agisse également en tant que partenaire de PPAR γ pour se fixer sur le promoteur de ses gènes cibles. Une seconde possibilité serait la formation d'un homodimère PPAR γ /PPAR γ . Cependant, si la formation de cet homodimère est possible, ses capacités fonctionnelles sont inconnues, il n'est donc pas établi qu'un homodimère pourrait réguler la transcription de ces gènes.

En revanche, les expériences de ChIP-sequencing ont bien mis en évidence un site de liaison de RXR α commun avec les sites de liaison PPAR γ dans la zone promotrice de ces gènes. Malgré la possibilité d'un défaut de spécificité de l'anticorps utilisé lors de l'immunoprécipitation de RXR α , il semble donc qu'il y a une redondance entre RXR α et ce potentiel second partenaire (qu'il soit PPAR γ lui-même, RXR β ou un autre), et que PPAR γ soit capable de s'associer aussi bien à l'un qu'à l'autre pour réguler un certain panel de ses gènes cibles.

Les expériences de ChIP-sequencing ont également soulevé une autre question sur les mécanismes de régulations des gènes cibles de PPAR γ dans les tumeurs de la vessie : certains sites de liaison ne présentent pas de motif PPRE, malgré parfois la présence à proximité d'un gène régulé par l'hétérodimère. Il est donc possible que PPAR γ régule ces gènes par un mécanisme ne correspondant pas au mode d'action classique de ce récepteur nucléaire.

Des mécanismes de trans-activation et de trans-répression de certains gènes cibles ont été mis en évidence dans d'autres modèles de cellules, impliquant le recrutement de PPAR γ sur l'ADN par le biais d'un autre facteur de transcription (Ricote & Glass, 2007). Il est possible que la liaison de PPAR γ sur ces sites sans motif PPRE s'opère par ce mécanisme, en particulier par le biais d'un des motifs identifiés tels que FOS/JUN, GRHL1 ou GATA3.

Ceci soulève la nécessité de mieux comprendre la voie PPAR γ dans son ensemble dans le contexte des tumeurs de la vessie, en commençant par ses partenaires et co-régulateurs. En effet, certains co-régulateurs connus de PPAR γ sont fréquemment altérés dans les tumeurs de vessie, comme EP300, CBP ou encore des membres du complexe SWI/SNF. Nous avons cherché à identifier les co-régulateurs de PPAR γ dans les tumeurs de la vessie grâce à des expériences de *Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins* (RIME), mais nos efforts sont restés sans succès jusqu'à présent. Le rôle des altérations de ces co-régulateurs et leur éventuel impact sur la voie PPAR γ n'a pas encore été décrit. Il est possible que ces altérations soient un autre moyen de sur-activer cette voie, ce qui pourrait élargir le nombre de tumeurs qui pourraient bénéficier d'un traitement ciblant la voie PPAR γ , et aider à la compréhension de cette voie au sein de ces tumeurs.

Un autre moyen de sur-activer la voie PPAR γ est la régulation de l'expression de PPAR γ lui-même. Les amplifications aboutissent à une expression plus forte, mais d'autres mécanismes peuvent entraîner un résultat similaire, notamment la sur-activation de protéines réglant son expression, aussi bien au niveau transcriptionnel que protéique, ou son activité par des modifications post-traductionnelles. Identifier les gènes situés en amont de la voie PPAR γ pourrait donc présenter un intérêt aussi bien fondamental que clinique.

Bien entendu, l'identification des gènes cibles directs de l'hétérodimère, et en particulier ceux impliqués dans son rôle protumorigénique, va permettre une meilleure compréhension de cette voie. Les mutations récurrentes situées dans DBD ne présentent pas d'augmentation de l'activité transcriptionnelle, mais leur localisation pourrait entraîner un profil de fixation sur l'ADN et de régulation des gènes cibles différents de la protéine sauvage, et l'identification des gènes cibles essentiels au rôle protumorigénique de PPAR γ pourraient permettre de mettre en évidence ce type de gain de fonction. En suivant la logique inverse, identifier les sites de liaison de ces formes mutées de PPAR γ pourrait guider l'identification des gènes cibles

importants. De manière plus générale, ceci facilitera l'identification des altérations aboutissant à la sur-activation de la voie PPAR γ , qu'elles concernent les co-régulateurs ou les gènes situés en amont de celui-ci, en mesurant directement leur effet sur les gènes concernés.

Mais le principal intérêt dans la mise en évidence des ces gènes cibles tient dans l'identification des voies et mécanismes impliqués dans cet effet protumorigénique. Pour le moment, les mécanismes par lesquels PPAR γ favorise la viabilité cellulaire sont encore inconnus. La diminution du nombre de cellules par puits entre 72 et 96h après extinction de son expression par siRNA suggère une mort cellulaire, mais la nature de celle-ci ainsi que l'existence d'une éventuelle diminution de la prolifération est encore flou, de même que sa cause.

Une des voies régulées par PPAR γ présente un intérêt majeur dans ce contexte : le métabolisme lipidique. De nombreuses études ont montré l'importance du métabolisme dans le développement des cellules tumorales, et des études citées précédemment ont montré que PPAR γ joue un rôle important dans le métabolisme de certaines cellules cancéreuses. Une altération du métabolisme des cellules tumorales et donc de l'énergie disponible pourrait expliquer la diminution de la viabilité cellulaire observée après diminution de l'expression de PPAR γ . Le mini-screening permettra de répondre en partie à cette question, en identifiant les gènes et les voies importantes dans ce phénomène, mais la méconnaissance du métabolisme des tumeurs de vessie complexifie la prévision du rôle de ces gènes dans la viabilité de ces cellules.

La régulation de l'inflammation et de l'immunité a également été soulignée par cette étude. Ces résultats se recoupent avec ceux obtenus par Korpál *et al.* (Korpál *et al.*, 2017), qui ont mis en évidence le rôle de PPAR γ dans l'évasion de l'immunosurveillance, doublant ainsi l'intérêt de la sur-activation de PPAR γ pour la cellule tumorale.

De nombreux gènes pouvant interagir avec la voie PPAR γ sont activées dans les tumeurs lumineales de la vessie, tels que FOXA1 ou GATA3, mais pour le moment, la nature et le fonctionnement de ces interactions sont encore inconnus. De même, les altérations de FGFR3 sont également enrichies dans les tumeurs lumineales, et en particulier les tumeurs lumineales papillaires, mais nous ignorons pour le moment s'il existe un lien entre ces deux voies. La compréhension du dialogue pouvant exister entre ces voies nécessite une meilleure compréhension de chacun des réseaux de signalisation, ainsi qu'une meilleure vue d'ensemble des altérations de ces réseaux dans les tumeurs lumineales.

De plus, si PPAR α n'est pas exprimé dans les cellules de carcinomes luminaux de la vessie, l'expression de PPAR δ pourrait impacter la voie PPAR γ . Pour le moment, le rôle de PPAR δ dans les tumeurs luminales de la vessie est encore inconnu, mais les nombreux gènes cibles qu'il partage avec PPAR γ pourraient faire de ce gène un axe de recherche intéressant.

PPAR γ est actif dans les tumeurs luminales de la vessie, mais également dans les cellules normales de l'urothélium, dont il régule la différenciation. De manière générale, la différenciation est associée à un arrêt du cycle cellulaire, et les cellules de l'urothélium ne font pas exception, or, le fait qu'un gène dont la voie peut aboutir à un arrêt du cycle présente un effet pro-tumorigénique peut paraître contre-productif. Cependant, d'autres récepteurs ont montré un rôle similaire, tels que les récepteurs aux estrogènes et aux androgènes, respectivement dans les cancers du sein et de la prostate, qui tiennent également un rôle essentiel dans la différenciation des tissus normaux.

La pleine compréhension du rôle protumorigénique de PPAR γ , et de la manière dont il va promouvoir la viabilité des tumeurs sans altérer leur développement, nécessite donc une meilleure compréhension de la voie PPAR γ dans les cellules normales de l'urothélium, pouvant potentiellement aboutir à l'identification de différences entre la voie activée dans l'urothélium normal et celle activée dans les tumeurs luminales de la vessie.

Chapitre II

Mise en évidence du rôle suppresseur de tumeurs
de PPAR γ dans les tumeurs basales

DELETIONS ET MUTATIONS PERTE DE FONCTIONS DE PPAR γ ASSOCIEES A UN ROLE SUPPRESSEUR DE TUMEURS DANS LES TUMEURS BASALES DE VESSIE

I. Résumé

L'activation de PPAR γ s'avère être un évènement clé dans la tumorigenèse des tumeurs lumineales de la vessie, favorisant à la fois la croissance cellulaire et le remodelage du micro-environnement tumoral en faveur d'une évacion de l'immunosurveillance. A l'inverse, la diminution de l'activité de PPAR γ dans les tumeurs basales de la vessie suggère un effet suppresseur de tumeurs dans ce sous-groupe. Dans cette étude, nous avons apporté des évidences génétiques et fonctionnelles soutenant le rôle suppresseur de tumeurs de PPAR γ dans les tumeurs basales de la vessie.

Nous avons montré que le sous-groupe basal est associé à une diminution de l'expression et de l'activité de PPAR γ , et nous avons mis en évidence des délétions hétérozygotes de ce gène enrichies dans le sous-groupe basal, entraînant une diminution de son expression. Nous avons également identifié des mutations pertes de fonctions de PPAR γ associées au sous-groupe basal, au sein de tumeurs présentant une expression et une activité faible de ce gène.

L'étude de l'impact de ces mutations sur le fonctionnement de la protéine a montré que deux de ces formes mutées (F310S et H494Y) présentent un défaut de libération des co-represseurs, ainsi qu'une altération du recrutement des co-activateurs. Les expériences de cristallographie montrent que ces mutants favorisent une conformation inactive de la protéine, altérant ainsi son activité transcriptionnelle, et donc l'activité de PPAR γ dans les tumeurs mutées.

Nous avons enfin montré que la ré-expression de PPAR γ dans les cellules tumorales conduit à une activation de la transcription de ses gènes cibles, et à une réduction de la croissance cellulaire, mettant en évidence son rôle suppresseur de tumeurs.

L'identification de ce rôle dual de PPAR γ dans les tumeurs de vessie selon le sous-type tumoral renforce le rôle clé de PPAR γ dans les tumeurs de vessies, et souligne l'importance de prendre en compte le sous-type tumoral aussi bien dans le cadre de la recherche que pour le développement d'une médecine personnalisée.

II. Deletions and loss-of-function mutations highlight a tumor suppressive role of PPAR γ in basal bladder tumors.

(Coutos-Thevenot et al., en cours de rédaction)

Deletions and loss-of-function mutations highlight a tumor suppressive role of *PPAR γ* in basal bladder tumors.

Laure Coutos-Thévenot^{1,2}, Syrine Beji³, Quentin Pippo³, Hélène Neyret-Kahn^{1,2}, Clémentine Krucker^{1,2}, Judit Osz³, Florent Dufour^{1,2}, Jacqueline Fontugne^{1,2}, Elodie Chapeaublanc^{1,2}, Aurélie Kamoun⁴, Aurélien de Reynies⁴, François Radvanyi^{1,2}, Natacha Rochel^{3,*} and Isabelle Bernard-Pierrot^{1,2, *}.

¹Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR144, Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, 75005 Paris, France

²Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, CNRS, UMR144, 75005 Paris, France

³Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale (INSERM), U1158/Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), UMR7104/Université de Strasbourg, Illkirch, France

⁴Ligue Nationale Contre le Cancer, Programme Cartes d'Identité des Tumeurs (CIT), Paris, France

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: isabelle.bernard-pierrot@curie.fr

E-mail: rochel@igbmc.fr

Abstract

PPAR γ activation appears to be a critical event in luminal bladder cancer tumorigenesis, favoring both tumor cell growth and microenvironment modulation toward tumor immune escape. Conversely, the down-regulation of PPAR γ activity in basal bladder cancer suggests tumor suppressive effects in this subgroup. Here, we report genetic and functional evidences to support the tumor suppressor role of *PPAR γ* in basal bladder tumors. We identified both heterozygous deletions and loss-of-function mutations of *PPAR γ* in basal bladder tumors, associated with *PPAR γ* under-expression. Re-expression of *PPAR γ* in basal tumor cells resulted in an activation of *PPAR γ* -dependent transcription and reduced cell growth. Structure-function studies of two *PPAR γ* mutant proteins allowed the identification of structural elements that underpin their loss-of-function and should help develop potent molecules to transactivate *PPAR γ* as therapeutic strategies. The identification of this subtype-dependent dual role of *PPAR γ* in bladder cancer strengthens the critical role of *PPAR γ* in bladder tumorigenesis and reinforces the interest in stratified medicine based on tumor molecular subtyping.

Introduction

PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) is a member of the nuclear receptor transcription family that functions as a permissive heterodimer with retinoid X receptor (RXR α) and recognizes specific sequence motifs, defined as PPRE (peroxisome proliferative response element) in the regulatory regions of target genes. In the absence of ligand, PPAR γ is complexed with corepressor proteins such as NCoR1 (Nuclear receptor corepressor 1) or SMRT (silencing mediator of retinoic acid receptor) recruiting HDACs (histone deacetylase) and PPAR γ suppresses transcription. Upon ligand binding, a conformational change allows the release of corepressors and recruitment of coactivators such as MED1 (Mediator complex subunit 1) or PGC1 α (PPARGC1A, PPARG coactivator 1 alpha) and PPAR γ acts as a transcriptional activator. A variety of natural ligands, such as polyunsaturated fatty acid or prostaglandin J2 derivatives, and synthetic ligands, such as thiazolinediones, can activate PPAR γ . PPAR γ is involved in regulating glucose homeostasis and adipogenesis^{1,2} but also in differentiation in several tissues including the urothelium³. Its role in cancer is less clear and seems to be dual, tumor suppressive (as in colon, lung cancers and neuroblastoma) or pro-tumorigenic (as in pancreatic or bladder cancers) depending on the cell context⁴⁻⁸.

In bladder cancer, the 4th most frequent cancer in men in industrialized countries, luminal muscle-invasive bladder carcinomas (MIBCs), a subtype of bladder tumors accounting for 60% of MIBCs^{9,10}, have been shown to display a PPAR γ activation signature^{7,11}. This activation is due to genetic alterations - DNA gain and amplification (30%), recurrent activating mutations of *RXR α* (5%) and *PPAR γ* (4%) - associated with luminal tumors^{9,12-15}. PPAR γ activation renders bladder tumor cell growth PPAR γ -dependent^{13,15} and promotes immune evasion in MIBCs¹⁶ highlighting a crucial pro-tumorigenic role of the PPAR γ /RXR α pathway in luminal bladder tumors.

Interestingly, PPAR γ activation signature or regulon activity is dramatically decreased in basal bladder tumors, a subtype accounting for 30% of MIBCs and presenting a poor prognosis, suggesting that PPAR γ could display an opposite role in these tumors^{9-11,17}. The loss of PPAR γ activity could be essential for the tumorigenesis of these basal tumors. In this work, we searched for genetic alterations that could drive PPAR γ inactivation in basal bladder tumors and could support a tumor suppressor role of PPAR γ . We identified heterozygous deletions of *PPAR γ* associated with PPAR γ loss of expression enriched in basal tumors. Among the non-recurrent mutations of *PPAR γ* that we previously identified by sequencing *PPAR γ* in 359 tumors and studying publicly available data for 455 MIBCs¹⁵, we identified four mutations associated with basal tumors. Functional analysis revealed that these four mutations reduce the transcriptional activity of PPAR γ . Biochemical analysis of two mutations affecting the ligand-binding domain of PPAR γ revealed that they inhibit the release of corepressors and the recruitment of coactivators by PPAR γ . A structure-function analysis of these two mutations revealed that they favor the adoption of PPAR γ inactive state due to the destabilization of helix H12 accounting for the impaired release of corepressor and recruitment of coactivators. We finally showed that PPAR γ displays tumor suppressive activity in basal tumors since PPAR γ expression in basal bladder cancer cell lines activates PPAR γ -dependent transcription and decreases cell viability whereas it displays no effect on cell viability of luminal cells. Our study provides genetic and functional evidences for a tumor suppressive role of PPAR γ in basal bladder cancer and therefore support the use of PPAR γ synthetic agonists as a therapeutic option for these tumors. It reinforces the critical central role of *PPAR γ* in bladder tumorigenesis that appears to be context dependent: pro-tumorigenic in differentiated luminal tumors and tumor suppressive in basal tumors.

Results

Heterozygous deletions and loss of expression of PPARG associated with basal MIBC

We studied *PPAR γ* expression in 197 bladder tumors (101 of which were NMIBCs) in our CIT series of tumors (carte d'identité des tumeurs) using U133 plus 2.0 Affymetrix transcriptomic data^{7,17} and in 405 MIBC samples using publicly available RNAseq data from The Cancer Genome Atlas^{9,12} genomic database (<http://cancergenome.nih.gov>) (Fig. 1A). Tumors were grouped in six molecular classes according to a molecular consensus classification derived from six independent classification systems previously described for MIBC¹⁰ (Supplementary Table 1). In good agreement with the loss of activity of PPARG observed in basal tumors⁹⁻¹¹, we observed a significantly lower expression of *PPAR γ* in Basal/Squamous tumors but also in Neuroendocrine-like and Stroma-rich tumors compared to luminal tumors, encompassing Luminal Papillary, Luminal Non-Specified and Luminal Unstable tumors (Fig.1A). Using available copy number data for 385 MIBCs from the TCGA, we observed heterozygous deletions of *PPAR γ* that were significantly associated with a low expression (Fig.1B left panel) and activity (Fig.1B right panel) of *PPAR γ* . Conversely, gains and amplifications were associated with overexpression and hyper-activity of *PPAR γ* as previously described^{7,8,13,15}. We further noticed that these heterozygous deletions were significantly enriched in basal/squamous tumors and could therefore account for part of the losses of expression of *PPAR γ* in these tumors (Fig. 1C). These genomic deletions of *PPAR γ* in basal tumors were a first genomic evidence supporting a tumor suppressor role of PPARG in these tumors. It has been proposed that broad H3K4me3 peaks (above 4kb) in promotor regions could be a feature of tumor suppressor genes¹⁸. We took advantage of our ChIP-seq data for H3K4me3, H3K27ac and H3K9me3 in two bladder cell lines (RT112 and L1207 that are respectively luminal papillary and basal/squamous models) to study the epigenetic marks in *PPAR γ* regulatory regions (Supplementary Fig. 1). In good agreement with its protumorigenic role in luminal tumors, *PPAR γ* was associated with a

super-enhancer in RT112 luminal cells but not in L1207. On the contrary, *PPAR γ* displayed increased H3K9me3 repression marks in L1207 basal cell line. In both cell lines, a broad peak of H3K4me3 was observed in the promoter region of *PPAR γ* , reinforcing the possibility that *PPAR γ* could display a tumor suppressive role in bladder cancers.

Loss-of-function mutations of PPARG in basal tumors

Loss-of-function mutations are also a hallmark of tumor suppressor genes. We therefore searched for such alterations of *PPAR γ* in basal bladder tumors. We recently sequenced *PPAR γ* in 359 bladder tumors and studied publicly available data for 455 MIBCs, which allowed us to identify recurrent activating mutations of *PPAR γ* in 4% of bladder tumors. These mutations were enriched in tumors presenting a high *PPAR γ* activation score, which were mostly luminal tumors, supporting a protumorigenic role of *PPAR γ* in this subgroup¹⁵. We also identified eleven non recurrent *PPAR γ* mutations that we did not further study previously¹⁵ (Fig.2A). We numbered all mutations relative to *PPAR γ* 2 isoform (NM_015869), which is 28 amino acids longer than the *PPAR γ* 1 isoform (NM_138712) at the N-terminal end (Fig.2A). Four of these non-recurrent mutations, S74C, F310S, E455Q and H494Y, were associated with basal tumors which presented a low *PPAR γ* activation score (Fig.2B). We therefore assumed that these four mutations could be loss-of-function mutations and investigated their functional impact on the transcriptional activity of *PPAR γ* (Fig.2C and 2D). We used, in HEK293FT cells, a luciferase reporter gene containing three copies of the DR1 sequence of *PPAR γ* DNA response element (PPRE) arranged in tandem and linked to the thymidine kinase promoter (PPRE-3X-TK)¹⁹. The four *PPAR γ* mutant proteins had significantly lower levels of transcriptional activity than the wild type even in the presence of 1 μ M of rosiglitazone, a synthetic *PPAR γ* ligand (activity reduced by 25% to 90%) (Fig. 2C). We further focused on the two most inactive mutants that affect the ligand binding domain (LBD) of *PPAR γ* , F310S and

H494Y. We showed that their overexpression in bladder 5637 cells induced a significantly lower expression of several known PPAR γ target genes (*FABP4* and *ACSL5*) compared to the wild-type protein as shown by RT-qPCR (Fig.2D). The effects of the mutants were comparable to that of the empty plasmid, suggesting an absence of transcriptional activity of the proteins in this system. The results of these two different approaches to measure PPAR γ transcriptional activity clearly showed that PPAR γ mutations F310S and Y494Y are loss-of-function mutations affecting basal tumors.

Loss-of-function mutations impair the release of corepressor and recruitment of coactivators by PPAR γ in presence of ligand.

We then used biochemical and biophysical analyses to understand how these two mutations impair PPAR γ activity. The H494Y mutation involves a residue at the N-terminal boundary of helix 12 whereas F310S is located in the N-ter of helix 3 facing the loop between helices 11 and 12 (Fig. 3A). We previously showed by native electrospray mass spectrometry that the LBD wild-type and mutants produced in bacteria were not bound to ligand¹⁵. We used nano differential scanning fluorimetry to compare the thermal stability of the purified PPAR γ WT and mutants (Supplementary Fig.2) alone and upon binding to the agonist ligand, GW1929 (Supplementary Fig. 2C). The two mutants in their apo form exhibit a smaller melting temperature (T_m) than the WT (Sup) with a ΔT_m of 1°C and 2°C for F310S and H494Y, respectively. Of note, GW1929 induced a strong stabilization of the WT, as well as of the 2 mutants, suggesting that the 2 mutations do not significantly affect the binding of the ligands. Both mutants efficiently form heterodimer with RXR α similarly to PPAR γ wild-type (Supplementary Fig. 2B). We therefore focused on the ability of mutations to modulate PPAR γ binding to corepressors and coactivators, which involves recognition of motifs on coregulators by the LBD, and ultimately regulates the transcriptional output of target genes. Mammalian two-hybrid assay in HEK293FT cells using VP16-fused PPAR γ (wild-type, F310S and H494Y), GAL4-DNA-binding-domain-fused co-repressor (NCoR1 or SMRT) or

co-activator MED1 and pG5-LUC reporter showed that in the context of full protein and in presence of 1 μ M exogenous ligand (rosiglitazone), the two mutations significantly favor the binding of the two co-repressor peptides and inhibit the recruitment of MED1 coactivator peptide compared to PPAR γ wild-type (Fig. 3B). The lower recruitment of the coactivator by the two mutants was confirmed by monitoring coactivator recruitment by the different LBDs. We measured the interaction between monomeric wild-type or mutant forms of PPAR γ and a fluorescently labeled coactivator peptide of PGC1 α (PPARGC1A), by MicroScale Thermophoresis. In the absence of ligand, the WT recruits the coactivator peptide with higher affinity than the two mutants (Fig. 3C). Together, these data suggest that the two considered mutations, F310S and H494Y, impair the adoption of an agonist conformation by PPAR γ in the absence of ligand, thereby enhancing corepressor interactions and inhibiting coactivator interaction.

PPAR γ LBD mutations F310S and H494Y favor an inactive conformation

To elucidate the structural basis for the deleterious functional effects of the mutations, we analyzed the crystal structures of PPAR γ LBD F310S and H494Y (Supplementary Table 2). PPAR γ F310 LBD mutant was crystallized in complex with GW1929 and PPAR γ H494Y LBD in complex with GW1929 and the PGC1 α coactivator peptide. Although the two mutants are less active than the wild-type protein, the ligand and coactivator peptide concentration used for crystallization allowed the proteins complexes to be crystallized in an active conformation. The GW1929 agonist ligand in the two mutant complexes maintains the same position as the WT complex forming similar interactions¹⁵ with the exception, in the F310S mutant, of the presence of two water molecules due to a larger binding pocket (and ligand interactions with S310 instead of F310) (Supplementary Fig.3).

In the WT complex, His494 in helix 12 packs on top of Val318 (H3) and forms intra-helical interactions with Pro495 and Leu496 that both contribute to a hydrophobic surface on which the coactivator packs (Fig. 4A). In the H494Y mutant, the side chain pointed toward loop 2-3 and the

side interactions with Pro495 and Leu496 were lost suggesting a destabilization of helix 12. Due to the Tyr494 side chain re-orientation, Tyr494 forms new interactions with residues Phe315 (H3) and Phe292 and His294 (loop 2-3) of the mutant.

In the other mutant of interest, the bulky Phe310 side chain faces the loop 11-12 and is involved in van der Waals interactions with Phe388 (H7), Ile484 (H11) and Met491 (loop 11-12). Because of the smaller size of the Ser310 side chain, these interactions are lost (Fig. 4B) and induce a different conformation of the loop 11-12. Instead Ser310 hydroxyl group interacts with the carbonyl moiety of Gln311 and a water molecule. These variations in helix 11 and loop 11-12 interactions will result in H12 destabilization and less efficient recruitment of coactivator. Overall, these data suggest that the two studied mutations, F310S and H494Y, are important residues for proper stabilization of helix 12 of PPAR γ , preventing proper corepressor release and coactivator interaction.

PPARG displays an inhibitory effect on basal bladder cancer cells growth

The down-regulation of PPARG in basal tumors suggested a potential tumor suppressive activity of PPAR γ in these tumors. Association of PPAR γ downregulation with genomic deletions and of loss-of-function mutations, although rare events in basal tumors (observed in 4 out of 188 basal tumors, Fig. 2B), strongly reinforced this hypothesis. Activation of PPAR γ by synthetic agonists has been a matter of debate regarding the PPAR γ independent-effects of such molecules²⁰. Therefore to study the ability of

PPAR γ activation to inhibit basal bladder cancer cell proliferation, we transiently expressed PPAR γ in three cell lines presenting a low PPAR γ activation score and a low PPAR γ expression level (UMUC-3, unclassified; UMUC-6 and VMCUB-1, Basal/Squamous cell lines), as well as in one luminal papillary cell line, SD48, which displays a high expression level of PPARG, a high PPARG activation score and relies on PPARG expression for its growth⁷ (Fig. 5A and 5B). PPARG overexpression, observed by western-blotting (Fig. 5B, upper panel) or RT-qPCR analysis (Supplementary Figure 4A), activated a PPAR γ -dependent transcription program (Supplementary Figure 4A) in the four cell lines. PPARG overexpression induced a significant decrease in cell viability in the three cell lines expressing low levels of endogenous PPARG, but did not affect the growth of SD48 cells (Figure 5B, lower panel). Using UMUC-6 cells, we confirmed that the observed effects with the wild-type receptor or the activating mutation T475M were dependent on PPARG activity since the overexpression of the inactive mutant of PPARG, H494Y, had no effect neither on cell viability nor on PPAR γ target gene expression (Fig. 5C and supplementary Figure 4B). The tumor suppressive role of PPAR γ in basal tumors was further supported by our attempt to establish stable clones of UMUC-6 cells. We were only able to obtain a few clones with the wild-type or T475M PPARG constructs, which turned out not to express PPARG, whereas we obtained PPARG-expressing clones using H494Y PPARG construct (Supplementary Figure 4C).

Discussion

Previous studies have already suggested a tumor suppressive role of PPAR γ in bladder tumors based on its down-regulation and the inhibitory effects of PPAR γ agonist on bladder cancer cell lines²¹⁻²⁴. Simvastatin-induced inhibition of bladder cancer cell growth was also attributed to the decrease of the PPAR γ pathway suggesting its tumor suppressive role in bladder tumors²⁵. In this study, we provided strong genetic evidences supporting this tumor suppressive role and we associated this role to a particular

subgroup of tumors, the basal tumors. We overexpressed PPAR γ to demonstrate its tumor suppressive properties and we observed, in UMUC-3 cells, comparable results to those observed using agonists²², suggesting that the observed effects using these molecules were indeed PPAR γ -dependent and supporting therefore the use of PPAR γ synthetic agonists as a therapeutic option for these basal tumors. A better understanding of the molecular basis of this tumor suppressive activity of PPAR γ in basal

bladder tumors might also make it possible to propose alternative therapeutic options for targeting this pathway without directly activating PPAR γ , the available synthetic agonist displaying various side effects^{26,27}. The better knowledge of the structure/function effects of the loss-of-function mutation of PPAR γ could also guide the design of new potent agonists.

Together with our previous studies that pointed out a pro-tumorigenic role of PPAR γ associated with DNA amplification and gain-of-function mutations^{7,15} in luminal tumors, this study highlights a dual role of PPAR γ in bladder cancers. The therapeutic strategies

targeting PPAR γ should therefore depend of the subtype of the tumors strengthening the interest for molecular classification in clinics. This dual role of PPAR γ can also revive the debate about the risk of bladder cancer associated with the use of pioglitazone^{28,29}. This cell context dependent effect of PPAR γ has already been shown in breast and colon cancer^{30–32}. A better understanding of the signaling pathways activated by the receptor to mediate both its pro-tumorigenic and tumor suppressive effects should help understanding the relation between cell context, in particular cell differentiation, and PPAR γ activity in bladder cancer but also in other tumor types.

Methods

Materials and chemicals. Rosiglitazone and GW1929 were purchased from Tocris Bioscience. The fluorescent PGC1 α peptide (137-EAEEPSLLKKLLLAPA-152) was purchased from Thermo-Fisher. The PGC1 α peptide (139-EEPSLLKKLLLAPA-152) was synthesized by Pascal Eberling (IGBMC peptide synthesis common facility).

Transcriptomic and genomic data. We used transcriptomic data available for our CIT series of tumors^{7,17} and for 405 MIBC from TCGA (<http://cancergenome.nih.gov>). We used our affymetrix exon st.0 transcriptomic data available for RT112, L1207, VMCUB-1, UMUC-3, UMUC-6 cell lines. Tumors and cell lines were classified using a molecular consensus classification system¹⁰ and PPARG activation score were calculated as previously described taking into consideration the expression levels of 77 PPARG target genes¹⁵. We used copy number data available for 402 MIBC from TCGA (<http://cancergenome.nih.gov>).

Plasmid constructs. The pcDNA3-PPAR γ 2 and PPRE X3-TK-luc were generously provided by Pr. Chatterjee (Institute of Metabolic Science, IMS, Cambridge) and Bruce Spiegelman (Addgene plasmid #1015), respectively. We used pcDNA3.1-PPAR γ 2 and the QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's protocol, to

generate all the mutations. Mutations were confirmed by DNA sequencing. The GAL4 DNA-binding domain cloning vector pM and the activation-domain cloning vector pVP16 are part of the Mammalian Matchmaker Two-Hybrid Assay kit (BD Biosciences Clontech). The construct pM-MED1 (510-787) expressing the Gal4 DBD-MED1 nuclear receptor interacting domain was provided by Lieve Verlinden (KU Leuven, Belgium). The pCMX-GAL4N-SMRT was a gift of Makoto Makishima (Nihon University School of Medicine). The Gal4 DBD-NCoR1 NRID was kindly provided by William Bourget (Centre de Biochimie Structurale, Montpellier, France).

Cell culture and transfection. The HEK293FT human cell line and the UMUC-6, UMUC-3, VMCUB-1, RT112 and 5637 human bladder tumor-derived cell lines were obtained from DSMZ (Heidelberg, Germany). HEK293FT, UMUC-6, UMUC-3, VMCUB-1, L1207 cells were cultured in DMEM, whereas 5637 and RT112 cells were cultured in RPMI. Media were supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Cells were incubated at 37°C, under an atmosphere containing 5% CO₂. The identity of the cell lines used was checked by analyzing genomic alterations with comparative genomic hybridization arrays (CGH array), and FGFR3 and TP53 mutations were checked with the SNaPshot technique (for FGFR3) or by classical sequencing (for TP53). The results obtained were compared

with the initial description of the cells. We routinely checked for mycoplasma contamination.

For reporter gene assays, HEK293FT cells were plated in 96-well plates (30,000 cells/well) and transfected with 30 ng pcDNA3-PPAR γ 2 (wild-type or mutated), 50 ng PPRE X3-TK-luc and 6 ng pRL-SV40 (Promega), in the presence of the Fugene HD transfection reagent (Promega), in accordance with the manufacturer's protocol. 24 hours later, cells were stimulated by 1 μ M rosiglitazone. Luciferase activity was determined 24 hours later, with the Dual-Glo $\circledR$ Luciferase Assay System (Promega), according to the manufacturer's instructions, and the results obtained were normalized with the *Renilla* luciferase signal obtained with the pRL-SV40 plasmid.

For PPAR γ 2 transient overexpression in the 5637 cell line, we used six-well plates, 250,000 cells seeded per well. These cells were transfected 24 h later with 2.5 μ g of pcDNA3-PPAR γ 2 (wild-type or mutated) in the presence of the Fugene HD transfection reagent (Promega). PPAR γ 2 transient overexpression in the UMUC3, UMUC6, VMCUB1 and SD48 cell lines were performed in six-well plates, 500,000 cells were seeded per well for the UMUC3 cell line, and 250,000 cells for the three other cell lines. 24 h later, cells were transfected with 2.5 μ g of pRP-PPARG2 wild-type or mutated vector (Vector Builder) in the presence of Fugene HD transfection reagent according to manufacturer's instructions (Promega). The cells were selected 24h after transfection with 4 μ g/mL of puromycin for 24h, and then seeded at respectively 7,000, 3,000, 3,000 and 2,500 cells per wells in ninety-six-well plates. Cell viability was assessed by CellTiter-Glo $\circledR$ Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 72h later and normalized by the signal obtained just after plating.

RNAs were extracted with the RNA easy mini kit (Qiagen) and proteins were extracted by cell lysis in Laemmli buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 1% SDS) supplemented with protease inhibitors and phosphatase inhibitors (Roche) 48 h after transfection.

For mammalian two-hybrid assay, HEK293FT cells were plated in 96-well plate (30 000 cells/well) and transfected with 20 ng pV16-PPAR γ 2 (wild-type or mutated), 20 ng pM-MED1, 50 ng

pG5-luc (Promega) reporter plasmid and 6 ng pRL-SV40 (Promega), in the presence of the Fugene HD transfection reagent (Promega), in accordance with the manufacturer's protocol. Luciferase activity was determined 48 hours later, with the Dual-Glo $\circledR$ Luciferase Assay System (Promega), according to the manufacturer's instructions, and the results obtained were normalized with the *Renilla* luciferase signal obtained with the pRL-SV40 plasmid.

Immunoblotting. Cell lysates were clarified by centrifugation. The protein concentration of the supernatants was determined with the BCA protein assay (Thermo Scientific). 10 μ g of proteins were resolved by SDS-PAGE in a 4-15% polyacrylamide gels, electrotransferred onto Biorad nitrocellulose membranes and analyzed by incubation with primary antibodies against PPAR γ (Abcam #ab41928, used at 1/1000) and β -actin (Sigma Aldrich #A2228, used at 1/25,000). Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology # 7074, used at 1/3,000) was used as the secondary antibody. Protein loading was checked by staining the membrane with Amido Black after electroblotting.

Real-time reverse transcription-quantitative PCR. Reverse transcription was performed with 1 μ g of total RNA, and a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). cDNAs were amplified by PCR in a Roche real-time thermal cycler, with the Roche Taqman master mix (Roche) and Taqman probe/primer pairs that we previously used and described¹⁵. Relative gene expression was analyzed by the delta delta Ct method, with TBP as the reference.

Biochemistry. The sequences encoding the ligand-binding domain of the His-hPPAR γ (231-505) receptors was inserted into pET15b. Point mutations were introduced into PPAR γ with the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent), in accordance with the manufacturer's instructions.

The corresponding proteins were produced in *Escherichia coli* BL21 DE3 by overnight incubation at 22°C after induction with 1 mM IPTG at an OD₆₀₀ of ~0.8. Soluble proteins were purified

by Ni-NTA chromatography followed by size exclusion chromatography on a Superdex 200 (GE) column equilibrated in 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 5% glycerol, and 1 mM TCEP. The proteins were concentrated to 3-6 mg/ml with an Amicon Ultra 10 kDa MWCO. Purity and homogeneity of all proteins were assessed by SDS and Native Page.

Crystallization, X-ray data collection and crystal structure refinement. The crystallization experiments were performed by sitting drop vapor diffusion at 290 K, mixing equal volumes (200 nl) of protein at 5 mg/ml and reservoir solution. For all crystal structures, the data were indexed and integrated with XDS³³ and scaled with AIMLESS^{34,35}. The structure was solved by molecular replacement in PHASER³⁶ and refined with PHENIX³⁷ and BUSTER³⁸ with TLS refinement, followed by iterative model building in COOT³⁹.

Crystals of PPAR γ F310S-GW1929 were grown in 25% PEG3350, 0.2 M LiSO₄, BisTris 0.1M pH 6.5, transferred to artificial mother liquor containing 35% PEG3350 and flash-cooled in liquid nitrogen. X-ray diffraction data were collected at PX1 beamline of the SOLEIL synchrotron with a wavelength of 0.979 Å. The final structure was refined to Rwork and Rfree values of 16.8 and 20.6%, respectively, with excellent geometry (95.54% of residues in favored region of the Ramachandran plot, 4.09% in the allowed region, and 0.37% outliers).

Crystals of PPAR γ H494Y-GW1929-PGC1 α were grown in 0.2 M ammonium acetate, 0.1 M Hepes pH 7.5, trisodium citrate 1.2M, transferred to artificial mother liquor containing 15% glycerol and flash-cooled in liquid nitrogen. X-ray diffraction data were collected at the ID30A3 beamline of ESRF with a wavelength of 0.968 Å. The final structure was refined to Rwork and

Rfree values of 18.37 and 19.79%, respectively, with excellent geometry (96.97% of residues in favored region of the Ramachandran plot, 2.27% in the allowed region, and 0.76% outliers).

Data collection and refinement statistics are provided in Supplementary Table 1. GW1929 and side chains of the mutated residues of H494Y and F310S complexes could be modelled with confidence as shown into the Polder omit maps⁴⁰ displaying reduced model bias and exclusion of solvent molecules (Supplementary Fig. 3B and 3C). All structural figures were prepared with PyMOL (www.pymol.org/).

Microscale thermophoresis measurements were performed with a Monolith NT.115 instrument (NanoTemper Technologies GmbH, Munchen, Germany). The PPAR γ complexes were prepared in 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20. Each measurement consists of 16 reaction mixtures where the fluorescent-labeled peptide concentration was constant (70 nM) and serial dilutions of PPAR γ LBD from a concentration of 100 μ M down to 2 nM. Measurements were made with standard glass capillaries (Nanotemper) at 25°C, at 40% LED excitation and 40–80% MST power, with a laser-on time of 30 s and a laser-off time of 5s. NanoTemper Analysis 2.2.4 software was used to fit the data and to determine the *K_d*.

Thermal unfolding, nanoDSF. Fluorescence based thermal experiments were performed using Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies, Germany) with capillaries containing 10 μ l PPAR γ WT or mutants at 4mg/ml. The temperature was increased by a rate of 1 °C/min from 20 to 95 °C and the fluorescence at emission wavelengths of 330 nm and 350 nm was measured.

References

1. Tontonoz, P. & Spiegelman, B. M. Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR γ . *Annu. Rev. Biochem.* (2008). doi:10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829
2. Ahmadian, M. *et al.* Ppar γ signaling and metabolism: The good, the bad and the future. *Nat. Med.* (2013). doi:10.1038/nm.3159
3. Varley, C. L. *et al.* Role of PPARgamma and EGFR signalling in the urothelial terminal differentiation programme. *J. Cell Sci.* **117**, 2029–2036 (2004).
4. Peters, J. M., Shah, Y. M. & Gonzalez, F. J. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nature Reviews Cancer* (2012). doi:10.1038/nrc3214

5. Lee, J. J., Drakaki, A., Iliopoulos, D. & Struhl, K. MiR-27b targets PPAR γ to inhibit growth, tumor progression and the inflammatory response in neuroblastoma cells. *Oncogene* (2012). doi:10.1038/onc.2011.543
6. Ahmad, I. *et al.* Sleeping Beauty screen reveals Pparg activation in metastatic prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2016). doi:10.1073/pnas.1601571113
7. Biton, A. *et al.* Independent Component Analysis Uncovers the Landscape of the Bladder Tumor Transcriptome and Reveals Insights into Luminal and Basal Subtypes. *Cell Rep.* **9**, 1235–1245 (2014).
8. Goldstein, J. T. *et al.* Genomic Activation of PPARG Reveals a Candidate Therapeutic Axis in Bladder Cancer. *Cancer Res.* **77**, 6987–6998 (2017).
9. Robertson, A. G. *et al.* Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell* (2017). doi:10.1016/j.cell.2017.09.007
10. Kamoun, A. *et al.* The consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer. *bioRxiv* (2018). doi:10.1101/488460
11. Choi, W. *et al.* Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell* **25**, 152–165 (2014).
12. TCGA. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* **507**, 315–322 (2014).
13. Halstead, A. M. *et al.* Bladder-cancer-associated mutations in RXRA activate peroxisome proliferator-activated receptors to drive urothelial proliferation. *Elife* **6**, 1–27 (2017).
14. Korpai, M. *et al.* Evasion of immunosurveillance by genomic alterations of PPAR γ /RXR α in bladder cancer. *Nat. Commun.* **8**, 103 (2017).
15. Rochel, N. *et al.* Recurrent activating mutations of PPAR γ associated with luminal bladder tumors. *Nat. Commun.* (2019). doi:10.1038/s41467-018-08157-y
16. Hedegaard, J. *et al.* Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell* (2016). doi:10.1016/j.ccell.2016.05.004
17. Rebouissou, S. *et al.* EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype. *Sci. Transl. Med.* **6**, 244ra91 (2014).
18. Chen, K. *et al.* Broad H3K4me3 is associated with increased transcription elongation and enhancer activity at tumor-suppressor genes. *Nat. Genet.* (2015). doi:10.1038/ng.3385
19. Kim, J. B., Wright, H. M., Wright, M. & Spiegelman, B. M. ADD1/SREBP1 activates PPAR through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2002). doi:10.1073/pnas.95.8.4333
20. Chaffer, C. L., Thomas, D. M., Thompson, E. W. & Williams, E. D. PPAR γ -independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma. *BMC Cancer* (2006). doi:10.1186/1471-2407-6-53
21. Yan, S., Yang, X., Chen, T., Xi, Z. & Jiang, X. The PPAR γ agonist Troglitazone induces autophagy, apoptosis and necroptosis in bladder cancer cells. *Cancer Gene Ther.* (2014). doi:10.1038/cgt.2014.16
22. Lv, S., Wang, W., Wang, H., Zhu, Y. & Lei, C. PPAR γ activation serves as therapeutic strategy against bladder cancer via inhibiting PI3K-Akt signaling pathway. *BMC Cancer* **19**, 204 (2019).
23. Guan, Y. F., Zhang, Y. H., Breyer, R. M., Davis, L. & Breyer, M. D. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human transitional bladder cancer and its role in inducing cell death. *Neoplasia* **1**, 330–9 (1999).
24. Yoshimura, R. *et al.* Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human urinary bladder carcinoma and growth inhibition by its agonists. *Int. J. Cancer* **104**, 597–602 (2003).
25. Wang, G. *et al.* Simvastatin induces cell cycle arrest and inhibits proliferation of bladder cancer cells via PPAR γ signalling pathway. *Sci. Rep.* (2016). doi:10.1038/srep35783
26. Colhoun, H. M. *et al.* Hospitalised hip fracture risk with rosiglitazone and pioglitazone use compared with other glucose-lowering drugs. *Diabetologia* **55**, 2929–2937 (2012).
27. Guan, Y. *et al.* Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPAR γ stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat. Med.* **11**, 861–866 (2005).
28. Lewis, J. D. *et al.* Pioglitazone use and risk of bladder cancer and other common cancers in persons with diabetes. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* (2015). doi:10.1001/jama.2015.7996
29. Mamtani, R. *et al.* Association between longer therapy with thiazolidinediones and risk of bladder cancer: A cohort study. *J. Natl. Cancer Inst.* (2012). doi:10.1093/jnci/djs328
30. Saez, E. *et al.* Activators of the nuclear receptor PPAR γ enhance colon polyp formation. *Nat. Med.* **4**, 1058–1061 (1998).
31. Lefebvre, A.-M. *et al.* Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat. Med.* **4**, 1053–1057 (1998).
32. Menendez, J. A. Fine-tuning the lipogenic/lipolytic balance to optimize the metabolic requirements of cancer cell growth: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1801**, 381–391 (2010).
33. Kabsch, W. Software XDS for image rotation, recognition and crystal symmetry assignment. *Acta Crystallogr., Sect. D Biol. Crystallogr.* (2010). doi:10.1107/S0907444909047337
34. Collaborative Computational Project, N. 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **50**,

- 760–763 (1994).
35. Evans, P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* (2006). doi:10.1107/S0907444905036693
36. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Storoni, L. C. & Read, R. J. Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* (2005). doi:10.1107/S0907444905001617
37. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* (2010). doi:10.1107/S0907444909052925
38. Smart, O. S. *et al.* Exploiting structure similarity in refinement: Automated NCS and target-structure restraints in BUSTER. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* (2012). doi:10.1107/S0907444911056058
39. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* (2004). doi:10.1107/S0907444904019158
40. Liebschner, D. *et al.* Polder maps: improving OMIT maps by excluding bulk solvent. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* (2017). doi:10.1107/s2059798316018210
41. Osz, J. *et al.* Solution structures of PPAR γ 2/RXR α complexes. *PPAR Res.* (2012). doi:10.1155/2012/701412

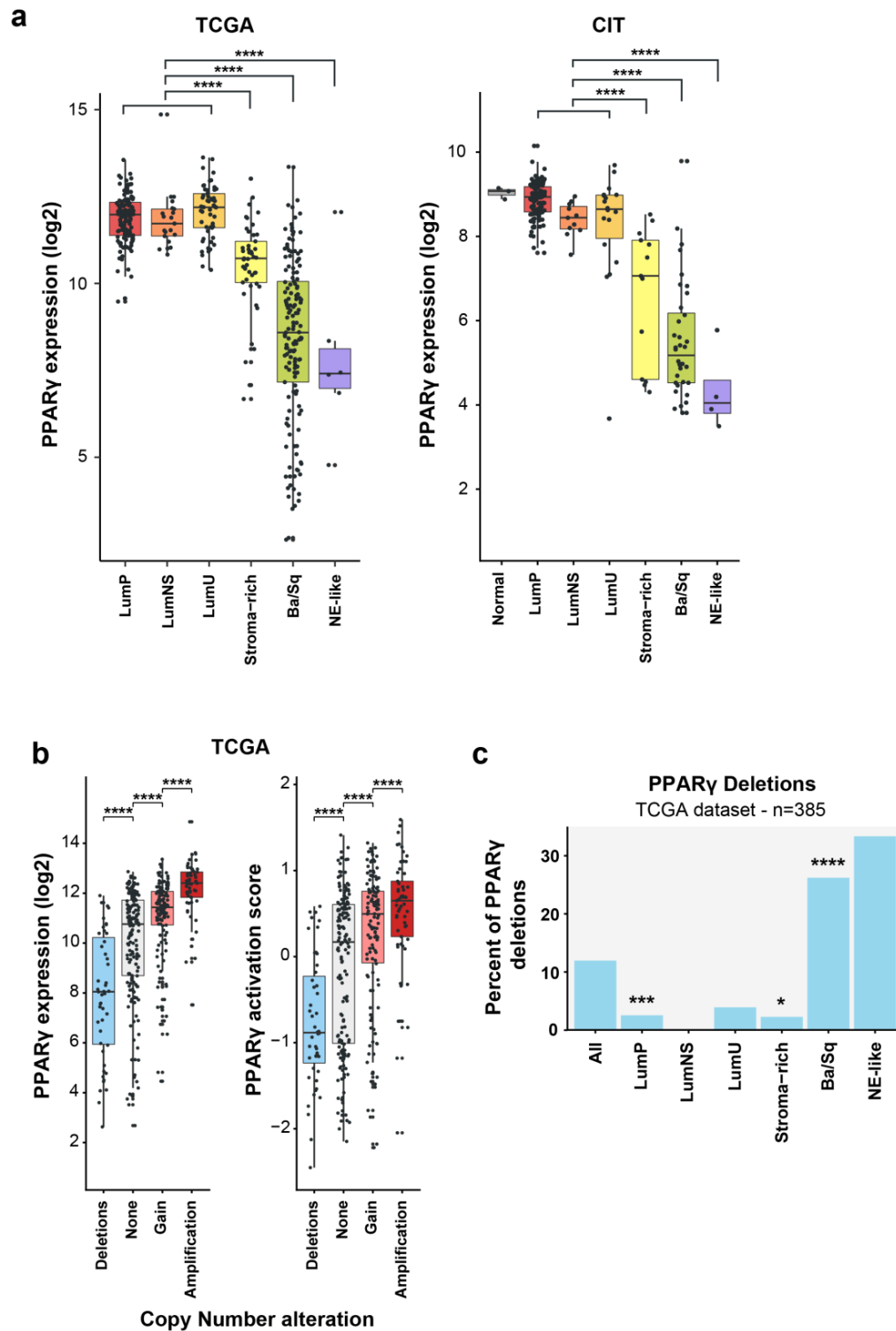


Figure 1: Heterozygous deletions associated with loss of expression of PPAR γ in basal bladder tumors. A) Expression level of PPAR γ in 336 bladder tumors from our CIT series of tumors (Affymetrix U133 plus2.0 signal) and in 405 MIBCs from TCGA (RNAseq signal). Tumors were classified according to a consensus molecular classification that defines six subgroups of MIBC (Kamon et al., 2018). PPAR γ expression levels in stroma-rich, basal/squamous (Ba/Sq) and in Neuroendocrine-like (NE-like) tumors were compared to those in luminal tumors, comprising luminal papillary (LumP), Luminal non specified (LumNS) and Luminal unstable (LumU) tumors using Dunnett's multiple comparison test, **** $p < 0.0001$. **B)** Expression level and activity of PPAR γ were compared in relation to PPAR γ copy number alterations in 385 MIBCs from TCGA using Dunnett's multiple comparison test, **** $p < 0.0001$. **C)** Frequency of genomic heterozygous deletion of PPAR γ in the different consensus subgroups of MIBC. Enrichment or depletion in genomic PPAR γ deletion in the different subgroups were evaluated using Fisher exact t-test, * $0.01 < p < 0.05$; *** $0.0001 < p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

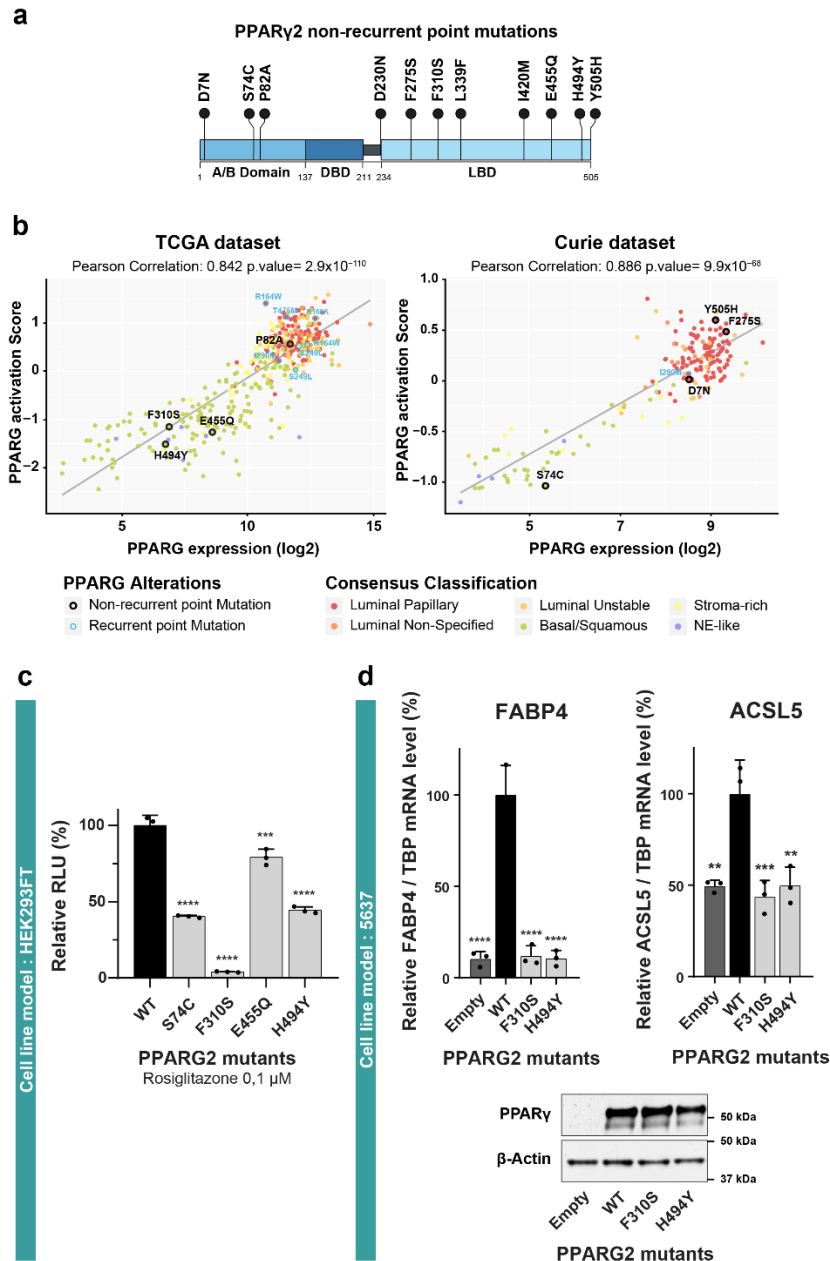


Figure 2: Transcriptional activity of non-recurrent PPAR γ mutants identified in basal tumors.

A) Lollipop representation of non-recurrent mutations of PPAR γ that we previously identified in 859 bladder tumors (Rochel et al., 2019). Sequences are numbered according to the PPAR γ 2 isoform. A/B: N-terminal domain; DBD: DNA-binding domain; LBD: ligand-binding domain (LBD). **B)** PPAR γ expression levels and activation scores in 403 and 196 tumors from TCGA and CIT series respectively, for which both PPAR γ mutation data and transcriptomic data were available. **C)** A reporter plasmid containing the firefly luciferase gene under the control of a PPARE-X3-TK promoter was co-expressed in HEK293FT cells with a pcDNA3 vector encoding wild-type (WT) or mutant associated with basal tumors (S74C, F310S, E455Q, H494Y) PPAR γ 2. *Renilla* luciferase, expressed under the control of the CMV promoter, was used to normalize the signal. The data shown are the means $\pm$ SD of one representative experiment conducted in triplicate. The results for each mutant were compared with those for the wild-type using Dunnett's multiple comparison test, *** $0.0001 < p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ **B)** 5637 cells were transiently transfected with a pcDNA3 vector encoding wild-type (WT) or mutant of the LBD domain (F310S, H494Y) PPAR γ . The expression of all PPAR γ forms was checked by western blotting, β -actin was used as loading control (lower panel). The expression of two PPAR γ target genes was normalized against TBP expression and is expressed as percentage relative to the expression induced by wild-type PPAR γ (upper panel). The data are presented as the mean $\pm$ SD of three independent experiments. The results for each mutant were compared with those for the wild type using Dunnett's multiple comparison test: ** $0.001 < p < 0.01$; *** $0.0001 < p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

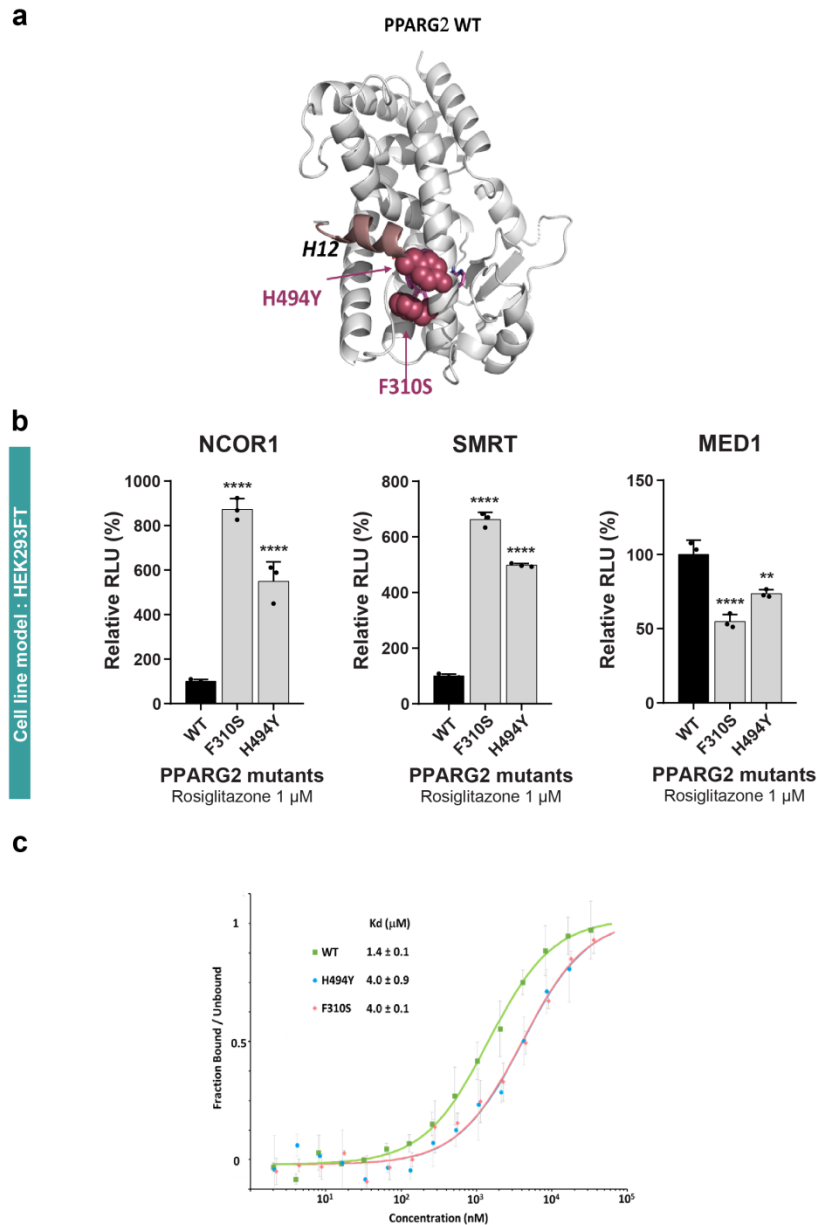


Figure 3: Effect of PPAR γ F310S and H494Y mutations on coregulator interactions. **A)** Position of the residues affected by non-recurrent PPAR γ mutations associated with basal tumors on the full-length PPAR γ -RXR α -DNA-coactivator peptide solution structure⁴¹. The folded domains are shown in cartoon representation and the disordered hinges and NTDs are shown as dots. The mutated residues are shown as spheres. The mutated residues are colored in blue (A/B domain) or red (LBD). **B)** Mammalian two-hybrid analysis in HEK293T cells. pG5-Firefly luciferase reporter plasmid was co-expressed with VP16-PPARG (wild-type or mutants) and with GAL4-DNA-binding-domain-fused NCoR1 or SMRT corepressor or MED1 coactivator. *Renilla* luciferase, expressed under the control of the CMV promoter, was used to normalize the signal. The data shown are the means $\pm$ SD of one representative experiment conducted in quadruplicate. The results for each mutant were compared with those for the wild-type using Dunnett's multiple comparison test, ** 0.001 < p < 0.01, **** p < 0.0001. **C)** The binding affinity of the PGC1 α NR1 motif for the purified WT and mutant PPAR γ LBDs, as determined by microscale thermophoresis. Unlabeled PPAR γ LBD protein was titrated into a fixed concentration of fluorescently labeled PGC1 α peptide in the absence of ligand. Isotherms were averaged over three consecutive measurements and fitted according to the law of mass action to yield the apparent K_d .

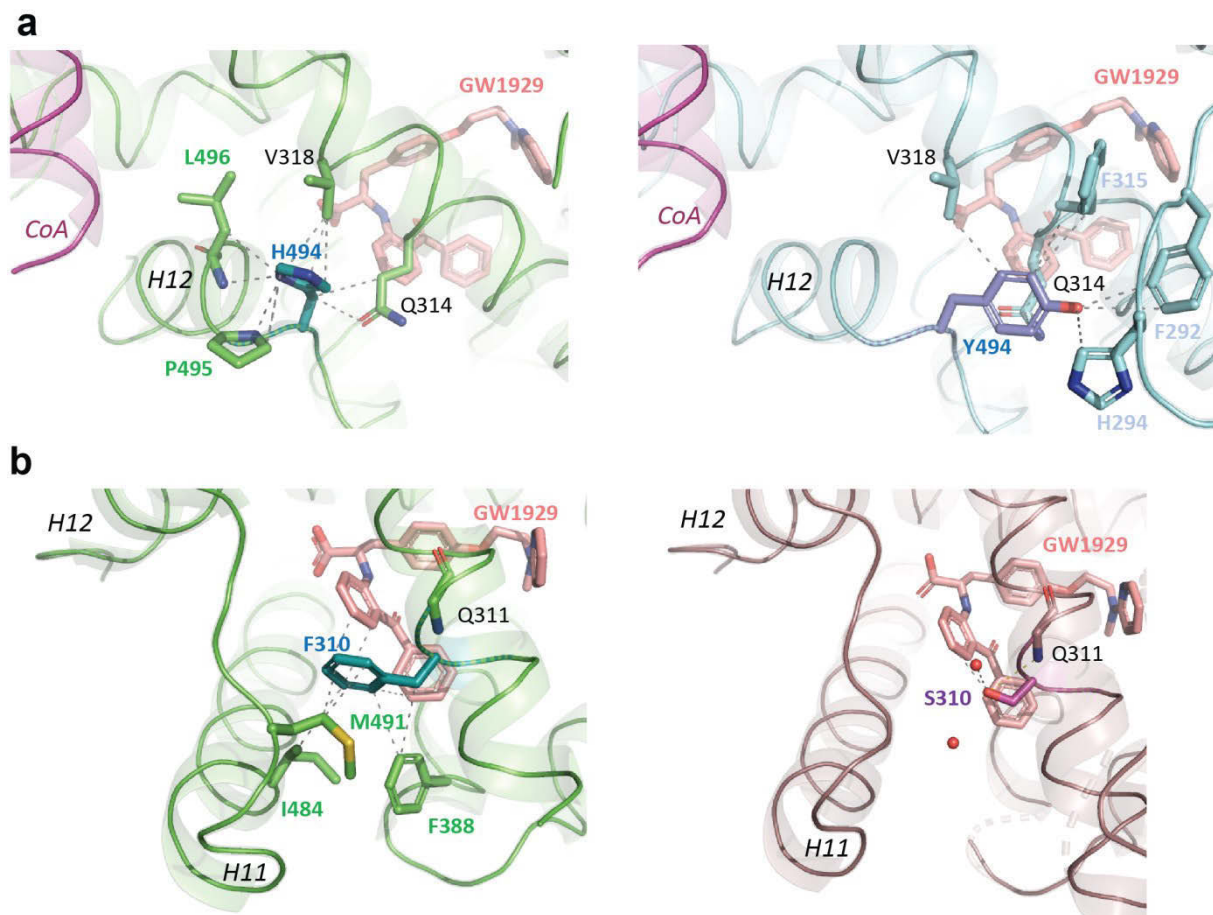


Figure 4: Impact of PPAR γ F310S and H494Y mutations on the crystal structure of the protein.

A) Close-up of the regions around the H494Y mutation, showing its interactions in the WT complex (left) and in the mutant complex (right). PPAR γ WT and H494Y are in green and cyan, respectively, with the coactivator peptide in plum. **B)** Close-up of the regions around the F310S mutation, showing its interactions in the WT complex (left) and in the mutant complex (right).

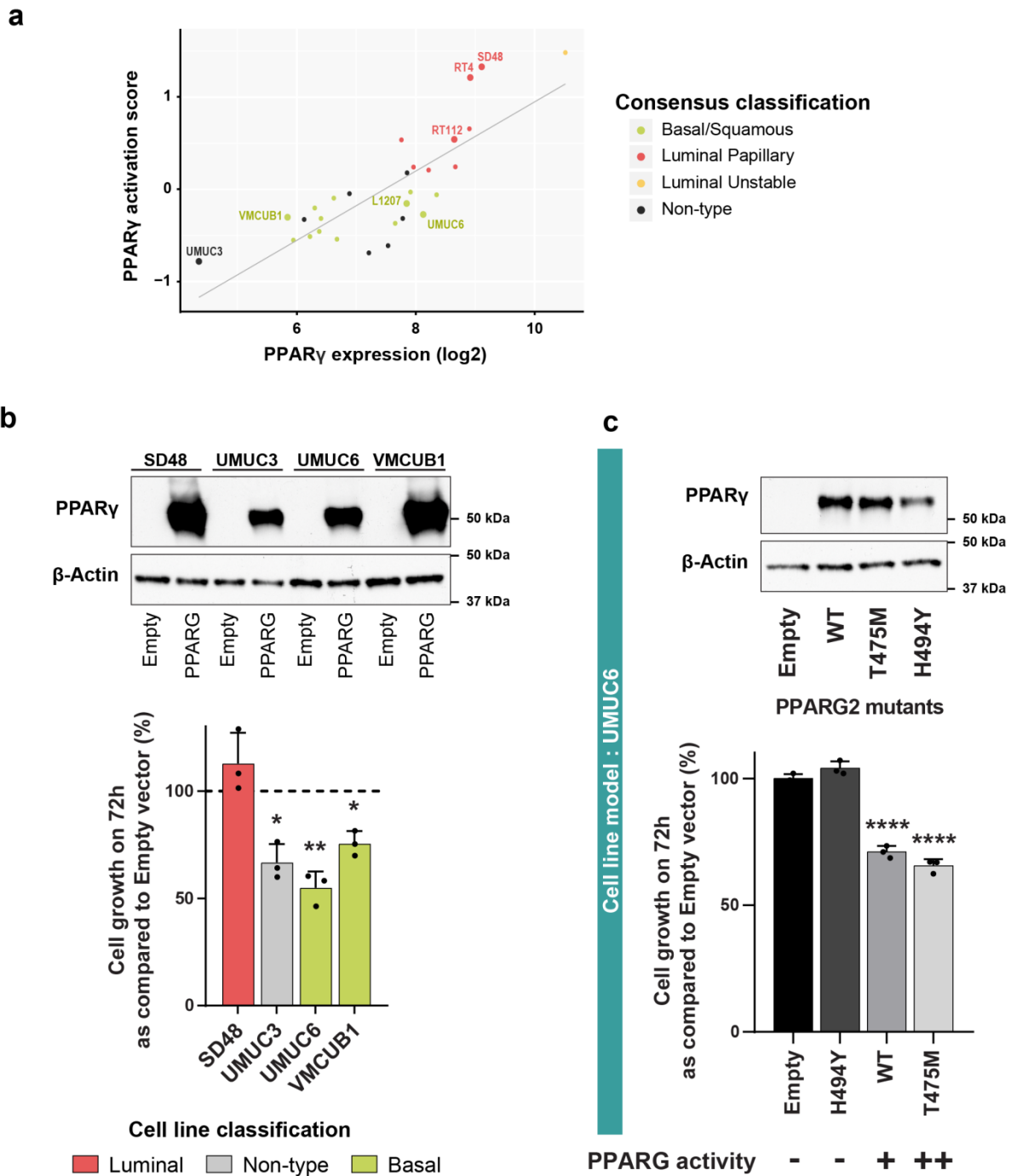


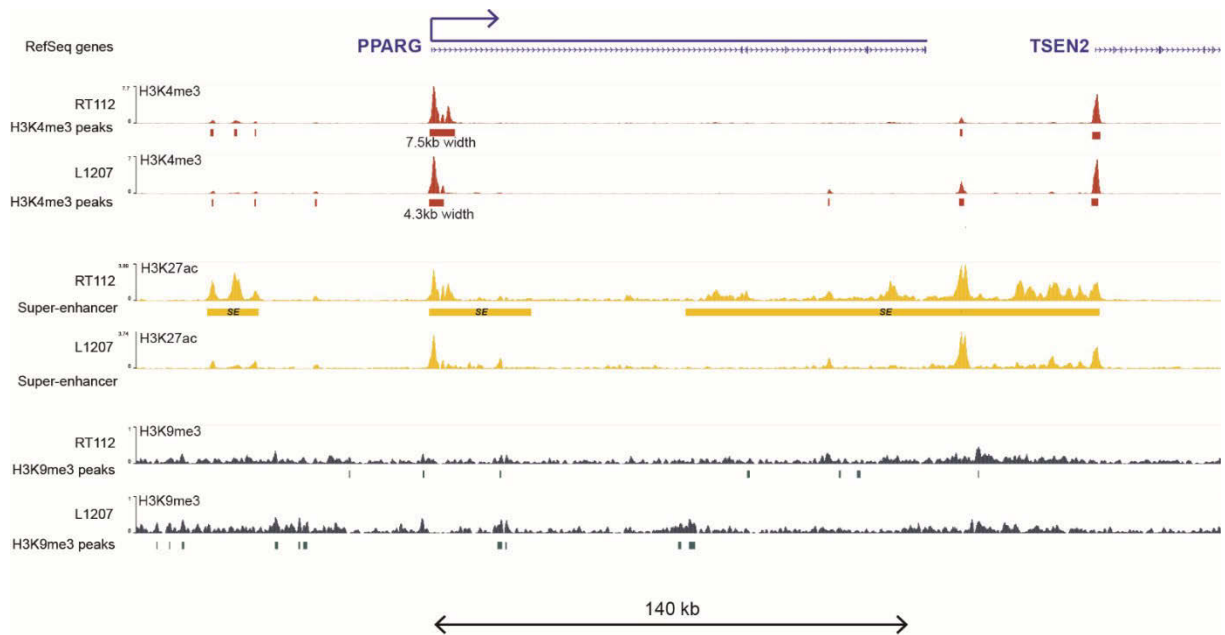
Figure 5: Effects of PPAR γ overexpression on basal bladder cancer cell growth. A) PPAR γ expression and activation score in a panel of bladder cancer cell lines. **B)** Four bladder cancer cell lines were transfected by a pRP vector encoding wild-type (WT) PPAR γ . 48h later, expression of PPAR γ was estimated by western-blot analysis (upper panel). The number of viable cells was quantified by CellTiter-Glo at 72h (lower panel). **C)** UMUC-6 cells were transfected by a pRP vector encoding wild-type (WT), inactive mutant (H494Y) or active mutant (T475M) PPAR γ . 48h later, expression of PPAR γ was estimated by western-blot analysis (upper panel). The number of viable cells was quantified by CellTiter-Glo at 72h (lower panel). B-C: results with PPAR γ (WT or mutant) were compared to those obtained with an empty vector using Dunnett's multiple comparison test, * $0.01 < p < 0.05$, ** $0.001 < p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Supplementary Table 1: Clinical and pathological characteristics of TCGA and CIT tumors.

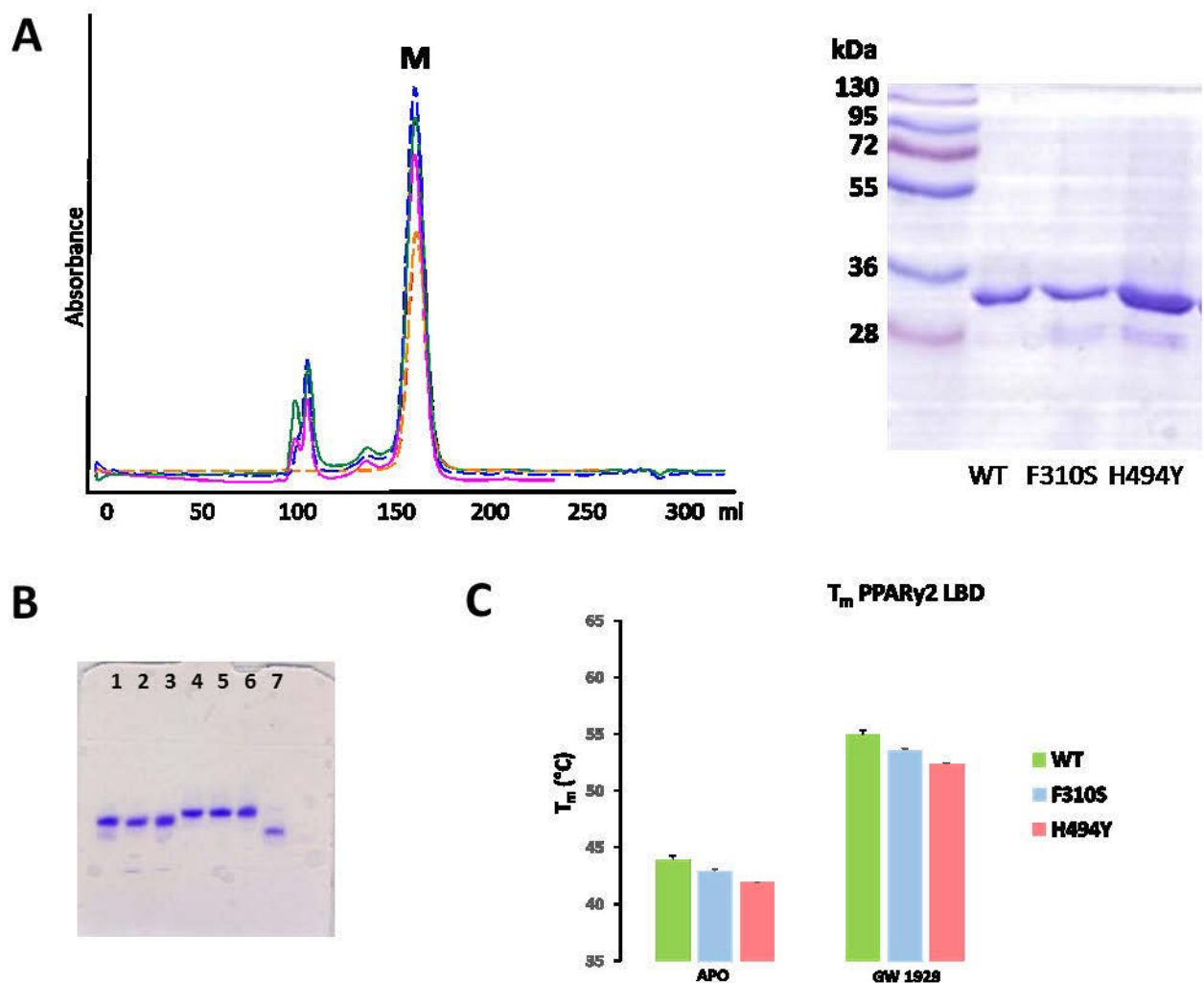
	TCGA	CIT Cohorte
Total population	405	196
Sex		
Male	299	156
Female	106	36
NA	0	4
Tumor stage		
Ta	0	56
T1	2	45
T2	130	28
T3	138	44
T4	133	22
NA	2	1
Tumor classification		
LumP	127	114
LumU	53	18
LumNS	20	11
Stroma-rich	45	13
Ba/Sq	152	36
NE-like	6	4
NA	2	0

Supplementary Table 2: crystallographic data and refinement.

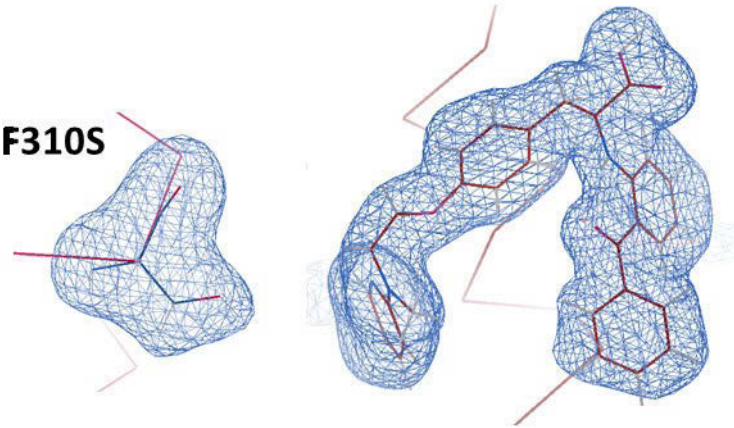
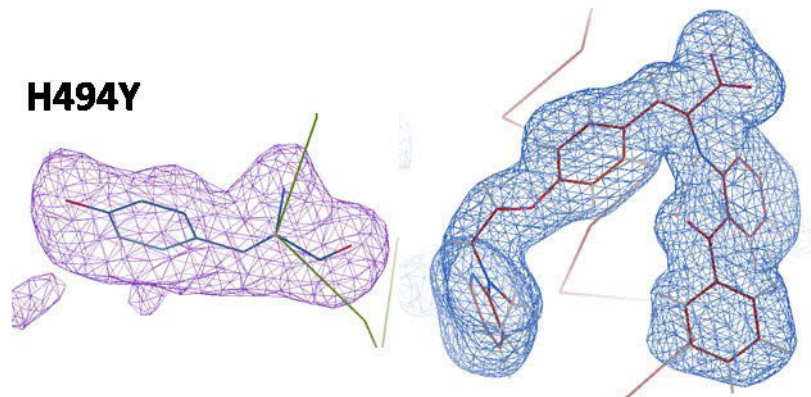
	PPAR γ 2 F310S-GW1929	PPAR γ 2 H494Y-GW1929-PGC1 α
PDB ID		
Data collection		
Space group	P4 ₁ 2 ₁ 2	I 2 2 2
Cell dimensions		
a, b, c (Å)	60.66 60.66 169.52	56.35, 120.74, 149.84
a, b, c (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	49.33-1.65	52.74-2.21
Rmerge (%)	0.0096 (0.675)	0.026 (0.291)
R _{pin} (%)	0.0096 (0.675)	0.026 (0.291)
I/ σ I	25.77 (1.0)	17.90 (2.43)
Completeness (%)	99.72 (97.31)	99.75 (99.96)
Redundancy	2.0 (2.0)	2.0 (2.0)
CC(1/2)	1 (0.524)	0.999 (0.842)
Refinement		
Resolution	49.33-1.65	56.35-2.21
N° reflections	39253	25889
R _{work} /R _{free}	0.168/0.206	0.184/0.198
N° atoms		
Protein	2206	2250
Ligand/ion	52	37
Water	243	169
B-factors		
Protein	48.34	48.46
Ligand/ion	50.88	36.02
Water	48.29	50.99
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.016	0.004
Bond angles	1.74	0.98



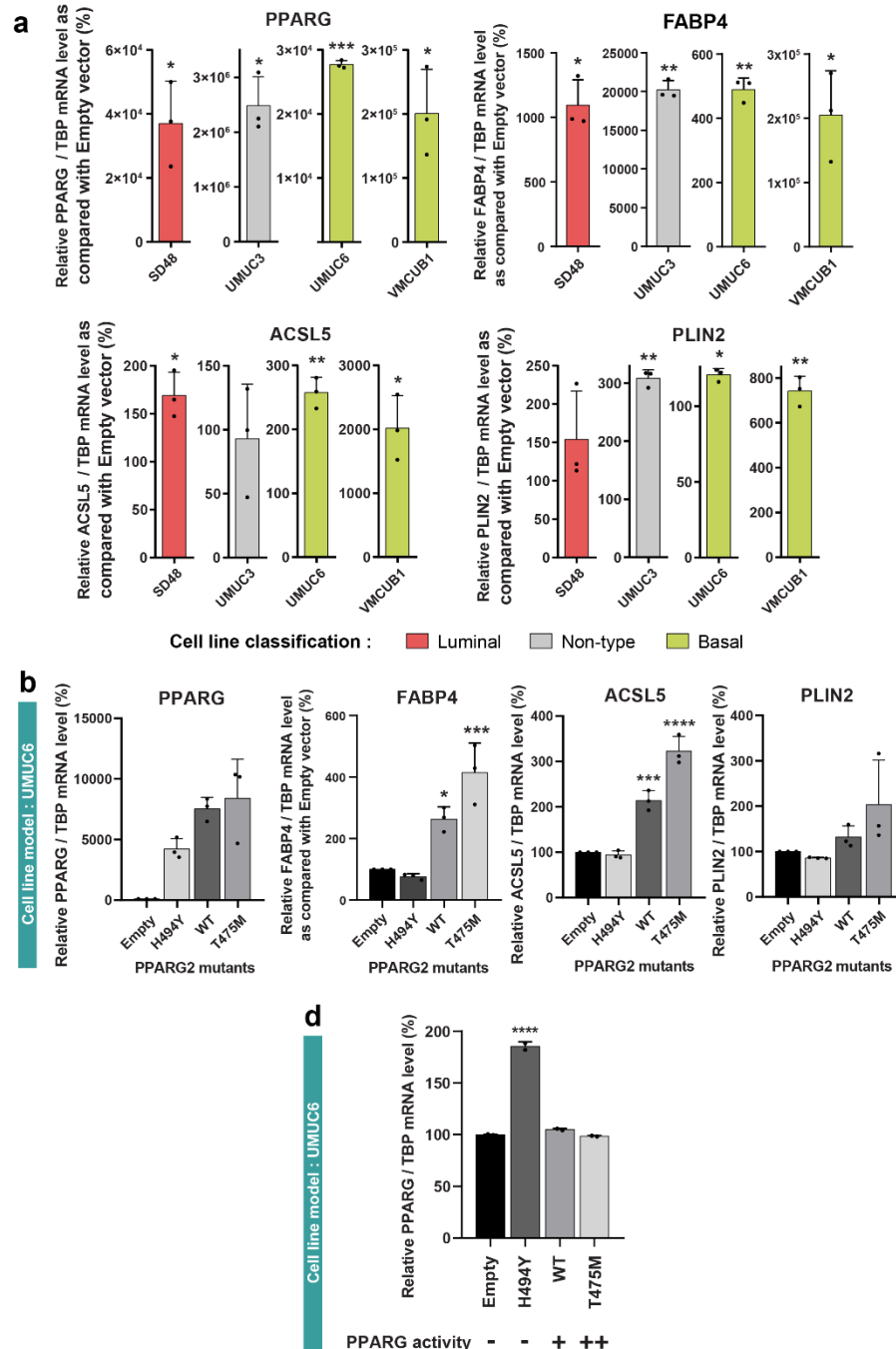
Supplementary Figure 1: Genome Browser view of ChIPseq analysis for PPAR γ locus in RT112 (luminal) and L1207 (Basal) cell lines. H3K4me3 ChIPseq aligned reads and associated peaks are represented in red. H3K4me3 broad peaks (wider than 4kb) are annotated. H3K27ac ChIPseq aligned reads and ROSE detected super-enhancers (SE) are represented in yellow. H3K9me3 ChIPseq aligned reads and associated peaks are represented in grey.



Supplementary Figure 2: characterization of PPAR γ mutants. **A)** Left: Gel filtration (S75 26/60) elution profile of apo PPAR γ WT and mutants that elute as monomers. Right: coomassie stained SDS gel corresponding to the PPAR γ wild-type (WT) and mutants monomeric peaks. **B)** Native PAGE of PPAR γ WT (lane 1), F310S (lane 2), H494Y (lane 3), PPAR γ WT with 1 equivalent of RXR α WT (lane 4), F310S with 1 equivalent of RXR α WT (lane 5), H494Y with 1 equivalent of RXR α WT (lane 6) and RXR α monomeric WT (lane 7). **C)** Nano differential scanning fluorimetry comparing the thermal stability of the purified PPAR γ WT and mutants alone and upon binding to the agonist ligand.

A**F310S****B****H494Y**

Supplementary Figure 3: GW1929 modelled into the difference density of the PPAR γ **A)** F310S and **B)** H494Y crystal structures. Shown is an unbiased omit Polder map contoured at 3.5σ , with model bias reduction and exclusion of solvent density.



Supplementary figure 4: Transient expression of *PPARG* induces a *PPARG*-dependent transcription in basal bladder cancer cell lines. **A)** Expression of *PPAR γ* and *PPAR γ* -target genes 72 h after transfection by a pRP vector encoding *PPAR γ 2* in 4 different bladder cancer cell lines. **B)** Expression of *PPAR γ* and *PPAR γ* target genes 72 h after transfection by a pRP vector encoding wt, gain-of-function (T475M) or loss-of-function mutant (H494Y) *PPAR γ 2* in UMUC-6 basal bladder cancer cell lines. **C)** Expression of *PPARG* in pooled-UMUC6 cells transfected by a pRP vector encoding wt, gain-of-function (T475M) or loss-of-function mutant (H494Y) *PPAR γ 2*. **A-C)** results obtained after *PPARG* transfection were compared to those obtained after transfection with the backbone vector using Dunnett's multiple comparison test, * 0.01 < *p* < 0.05, ** 0.001 < *p* < 0.01, **** *p* < 0.0001.

DISCUSSION

Cet axe du projet a permis d'apporter des évidences génétiques, au travers de délétions hémizygotiques et de mutations inactivatrices de *PPARG*, ainsi que des éléments fonctionnels démontrant que PPAR γ agit comme gène suppresseur de tumeurs dans les tumeurs basales de la vessie. Ceci met en avant le rôle dual de PPAR γ dans les tumeurs de vessie : protumorigénique dans les tumeurs lumineuses et suppresseur de tumeurs dans les tumeurs basales. L'article présentant ce travail, où je serai premier auteur et qui est en cours de finalisation, sera soumis dans quelques mois.

Il reste cependant des points que nous souhaiterions éclairer avant la soumission. Nous avons pu mettre en évidence un rôle suppresseur de tumeurs, déjà proposé précédemment par d'autres équipes grâce à l'utilisation de ligands agonistes de PPAR γ . Cependant, les effets obtenus par un traitement par les ligands de PPAR γ peuvent être dus à un effet PPAR γ -indépendant de ces ligands. Nos résultats apportent donc une preuve de la spécificité de ce rôle suppresseur de tumeurs, notamment grâce à l'utilisation du mutant inactivateur en tant que contrôle. En revanche, les mécanismes impliqués dans ce rôle sont encore peu connus. Afin de mieux comprendre comment PPAR γ joue son rôle tumeur suppresseur dans les tumeurs basales de la vessie, mais aussi ce qui différencie ce rôle tumeur suppresseur du rôle protumorigénique dans les tumeurs lumineuses, nous avons commencé une analyse du transcriptome de la lignée cellulaire UMUC6 sur-exprimant ou non la forme sauvage de PPAR γ 2.

Les analyses transcriptomiques réalisées dans le **CHAPITRE I** montrent que PPAR γ régule négativement la voie PI3K-AKT, ce qui confirme la capacité de PPAR γ à inhiber cette voie dans les tumeurs de vessie comme montré par Lv et al. (Lv et al., 2019). Si le modèle de lignée cellulaire, qui est ici une lignée lumineuse, n'est pas adapté à l'étude du rôle suppresseur de tumeurs dans les tumeurs basales, nous espérons en revanche obtenir le même type de résultats pour la lignée basale UMUC6. Ceci découlera éventuellement sur la validation de candidats intéressants, tels que la régulation de la voie PI3K-AKT par PTEN, permettant de valider cette hypothèse.

Lors des expériences de sur-expression de PPAR γ dans les lignées présentées ici, j'ai vérifié l'activité de PPAR γ en mesurant l'expression de certains gènes cibles. Si les gènes présentés ici montrent bien une variation après sur-expression du gène qui les régule, l'expression d'autres gènes cibles connus, tels que PDK4 (résultats non présentés) n'est en revanche pas modifiée, alors que l'extinction de l'expression de PPAR γ dans les SD48 entraîne bien une régulation de leur expression.

Ceci montre que les gènes régulés par PPAR γ dans le contexte d'une tumeur luminale et d'une tumeur basale peuvent être différents, ce qui pourrait expliquer ce rôle dual. La comparaison avec les analyses transcriptomiques réalisées dans le [CHAPITRE I](#) pourrait donc montrer la voie pour l'identification des spécificités contextuelles de chacun des rôles de PPAR γ .

Tout comme pour le rôle protumorigénique discuté dans le [CHAPITRE I](#), la compréhension de la globalité de la voie PPAR γ pourrait réellement bénéficier à la caractérisation de son rôle suppresseur de tumeurs.

D'une part, les co-régulateurs de PPAR γ et leurs altérations pourraient également être impliqués dans cette facette de son rôle dans les tumeurs de vessie, et pourraient expliquer en partie les spécificités propres à ces deux rôles.

D'autre part les délétions et mutations inactivatrices de PPAR γ n'expliquent la diminution de son expression et de son activité que dans une partie des tumeurs basales de la vessie. Les marques épigénétiques identifiées dans le promoteur de PPAR γ dans la lignée L1207, qui ne présente aucune de ces altérations, pourraient expliquer cette diminution d'expression, mais une étude plus approfondie des modifications épigénétiques et des événements conduisant à ces modifications semble essentielle pour comprendre cette diminution d'expression. Nous allons notamment étudier les données de méthylations du promoteur de PPAR γ aussi bien dans les tumeurs du TCGA que dans nos tumeurs du CIT. Les données sont disponibles et en cours d'analyse.

Nous avons centré cette étude sur les mutations inactivatrices de PPAR γ dans les tumeurs basales, soutenant son rôle suppresseur de tumeurs. Cependant des résultats non montrés ici ont mis en évidence des mutations non récurrentes inactivatrices présentes dans des tumeurs luminales ayant une forte expression et activité de PPAR γ , les mutations Y505H et D7N. Ces résultats semblent contradictoires, étant donné le rôle protumorigénique de PPAR γ dans ces tumeurs, et le haut score d'activation de PPAR γ de ces tumeurs montre que la nature inactivatrice de ces mutations ne suffit pas à diminuer l'activité de PPAR γ .

Ces tumeurs faisant partie de notre banque de tumeurs, nous souhaitons séquencer leur ADN dans le but d'identifier des éventuelles altérations qui pourraient expliquer la présence d'une forte expression et activité de PPAR γ . Ces résultats pourraient mettre en évidence, outre la possible présence d'amplification ou de gain de PPAR γ pouvant compenser la perte de l'activité d'une copie, un mécanisme de sur-expression de PPAR γ dans les tumeurs luminales par des altérations d'un gène régulant son expression, ou de sur-activation de l'hétérodimère par des altérations des co-régulateurs, en augmentant l'activité des co-activateurs ou en inhibant celle des co-répresseurs. Ceci pourrait ainsi permettre de mieux comprendre les modalités de régulation de l'expression et de l'activité de PPAR γ dans les tumeurs de vessie.

Conclusion et perspectives

Au cours de cette thèse, j'ai mis en évidence un rôle dual de PPAR γ dans les tumeurs de vessie : protumorigénique dans les tumeurs lumineuses porté par des amplifications de PPAR γ et des mutations activatrices récurrentes de PPAR γ et RXR α , et suppresseur de tumeurs dans les tumeurs basales, porté par des délétions et des mutations perte de fonction de PPAR γ (FIGURE 14, PAGE 147). Dans le premier cas, la sur-activation de la voie PPAR γ entraîne un effet sur le micro-environnement tumoral, permettant à la tumeur d'échapper à l'immunosurveillance, ainsi qu'un effet sur la cellule elle-même, en favorisant sa croissance. Elle provoque notamment une activation des gènes du métabolisme lipidique, potentiellement impliqués dans cet effet *cell-autonomous* de PPAR γ . A l'inverse, dans le deuxième cas, la diminution de l'expression et de l'activité de PPAR γ favorise le développement de la tumeur, potentiellement en empêchant sa probable inhibition de la voie PI3K-AKT. Les expériences qui seront menées dans les prochains mois, que ce soit l'analyse des transcriptomes après sur-expression de PPAR γ dans la lignée basale UMUC6 ou la réalisation du mini-screening siRNA dans les lignées lumineuses, nous permettront de préciser les mécanismes en aval de la voie impliqués dans ce rôle dual de PPAR γ .

Un des points clés, encore méconnu dans les tumeurs de la vessie, concerne les partenaires et co-régulateurs de PPAR γ . Peu de choses sont connues sur l'identité de ces co-régulateurs dans le contexte de l'urothélium (qu'il soit normal ou tumoral), sur leur expression ou sur l'impact de leurs altérations dans la voie PPAR γ . Que ce soit pour le rôle suppresseur de tumeurs ou pour le rôle protumorigénique, l'identification de ces partenaires et la caractérisation du rôle de leurs altérations est un point central qui sera certainement le sujet de projets de recherche dans les années à venir. Ceci peut également être étendu aux autres mécanismes de régulation de l'activité de PPAR γ , tels que les modifications post-traductionnelles, ou encore la régulation de son expression qui est intimement liée à son activité dans les tumeurs de vessie.

Les résultats obtenus au cours de ce projet, aboutissant à la mise en évidence de ce rôle dual de PPAR γ , permettent de remettre en perspective de nombreux résultats, parfois considérés comme contradictoires, obtenus jusqu'à ce jour. Retrospectivement, en regardant les études qui, depuis plus de 20 ans, ont montré un effet inhibiteur de la croissance tumoral des ligands agonistes de PPAR γ , il s'avère que les modèles de lignées cellulaires correspondaient toujours à une lignée non lumineuse. Il existe de nombreux modèles de lignées cellulaires de tumeurs de vessie, représentatifs de sous-types variés, et le choix d'un modèle cellulaire adapté peut être un point essentiel dans le cas de certaines études, en particulier concernant PPAR γ . De manière plus générale, la prise en compte du sous-type tumoral est très souvent mise de côté. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont été publiées sur le rôle de PPAR γ dans les tumeurs de vessie sans prendre compte ces sous-types. La mise en évidence de ce rôle dual et de l'importance du contexte tumoral dans la spécificité de ce rôle devrait conduire à l'avenir à une meilleure prise en compte de ces sous-types.

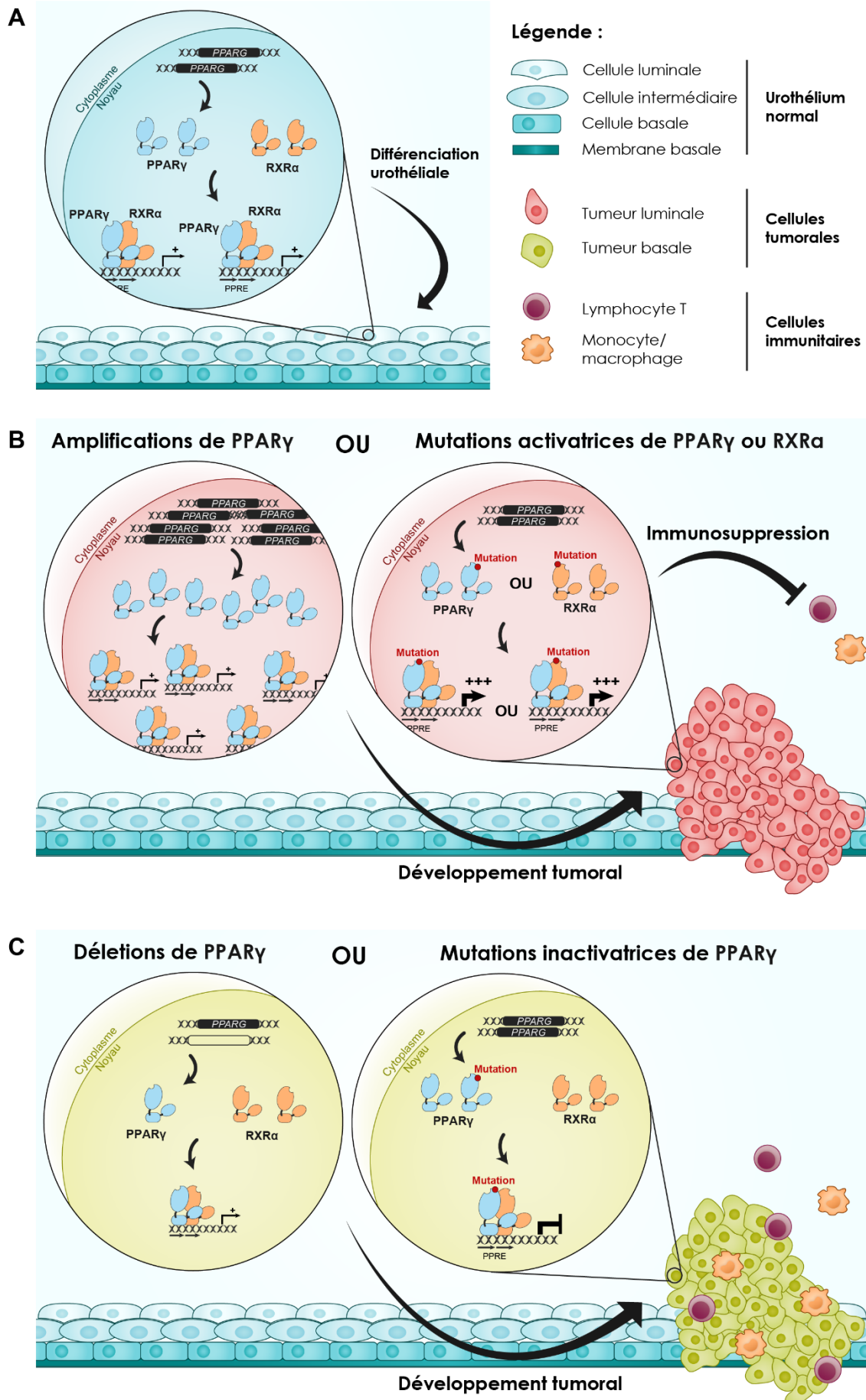


Figure 14 : Rôle dual de PPAR γ dans les tumeurs de la vessie.

A. Dans les cellules de l'urothélium normal, les deux copies de PPAR γ sont exprimées, entraînant une expression de ses gènes cibles, qui aboutit à la différenciation urothéliale. **B.** Dans les tumeurs lumineuses, des amplifications de PPAR γ entraînent une sur-expression de PPAR γ , ou des mutations activatrices récurrentes de PPAR γ ou RXR α entraînent une sur-activation de l'hétérodimère, aboutissant à une sur-expression des gènes cibles de PPAR γ . Ceci conduit à une immunosuppression responsable de l'échappement à l'immunosurveillance, ainsi qu'à un effet favorisant le développement de la cellule elle-même. **C.** Dans les tumeurs basales, des délétions et mutations inactivatrices de PPAR γ entraînent une diminution de son expression ou de son activité transcriptionnelle, ce qui aboutit à une expression réduite de ses gènes cibles et favorise le développement de la tumeur.

La capacité de la pioglitazone à induire une augmentation du risque de cancers de la vessie est sujet à débat encore aujourd'hui. Cependant, les résultats obtenus dans ce projet poussent à reconsidérer les études réalisées jusqu'à présent : il serait intéressant de comparer, entre les patients traités par la pioglitazone et les patients n'ayant pas reçu ce traitement, l'incidence des sous-types de tumeurs de vessie, puisque nos résultats suggèrent un potentiel enrichissement en tumeurs lumineuses chez les patients exposés à ces agonistes de PPAR γ .

De nombreux ligands agonistes et antagonistes de PPAR γ ont été développés depuis sa découverte. Cependant, les résultats obtenus grâce à ces ligands posent de nombreuses questions. Les thiazolidinédiones sont particulièrement efficaces pour activer PPAR γ , cependant, ils ont également de nombreux effets indépendants de l'activité de la protéine. De plus, les effets secondaires PPAR γ -dépendant de ses différents ligands ont été largement étudiés dans le cadre du traitement du diabète de type 2, et complexifient l'utilisation éventuelle de ces ligands dans le traitement des tumeurs de vessie.

Du côté des antagonistes et des agonistes inverses, le problème est ailleurs. Les résultats obtenus avec ces derniers sur les lignées lumineuses de la vessie sont modestes, et n'apparaissent qu'après une exposition prolongée des cellules à ce traitement. De plus, certaines études ainsi que des tentatives de reproduire ces résultats au sein de notre laboratoire ont montré une absence d'effet de ces molécules. Une des explications potentielles de cet absence d'effet tient dans l'efficacité de l'inhibition de PPAR γ . En effet, la transfection par siRNA dirigés contre PPAR γ et RXR α entraîne une diminution drastique de l'expression de ces gènes, et donc par extension, de l'expression de leurs gènes cibles. L'effet des antagonistes et agonistes inverses sur l'expression des gènes cibles de l'hétérodimère est plus modeste (résultats non présentés), pouvant expliquer cette différence d'effet entre les siRNA et les molécules capables d'inhiber l'activité de l'hétérodimère.

Cibler directement PPAR γ pour traiter les tumeurs de vessie semble donc difficile, surtout que le potentiel des tumeurs à passer d'un phénotype basal à un phénotype luminal, ou inversement, ainsi que la potentielle hétérogénéité intratumorale, qui pourrait entraîner des

réponses différentes selon les populations cellulaires, sont encore peu étudiés. C'est pourquoi il est important d'identifier les gènes et mécanismes impliqués dans les rôles de PPAR γ dans les tumeurs de la vessie, car ils pourraient représenter des cibles plus abordables pour le traitement ciblé de ces tumeurs aussi bien pour freiner le développement tumoral que pour réactiver la réponse immunitaire au sein des tumeurs lumineales.

Enfin, la mise en évidence de ce rôle dual remet en perspective les résultats contradictoires obtenus dans certains cancers, et pourrait révéler un rôle dual non seulement dans la vessie, mais dans le cancer en général, avec un rôle protumorigénique dans les sous-groupes de tumeurs différenciées et un rôle suppresseur de tumeurs dans les sous-groupes de tumeurs peu différenciées.

Titre : Rôle dual de PPAR γ dans les tumeurs de la vessie

Mots clés : PPAR γ , Récepteurs nucléaires, Tumeurs de vessie, Protumorigénique, Suppresseur de tumeurs, Mutations

Résumé : Les tumeurs de la vessie sont le quatrième cancer en termes de fréquence chez l'homme dans les pays industrialisés. Elles peuvent schématiquement être séparées en deux sous-groupes principaux : les tumeurs basales, peu différenciées, et les tumeurs lumineuses, différenciées. PPAR γ est un récepteur nucléaire fortement exprimé dans ce second groupe, qui agit en hétérodimère avec un co-récepteur partenaire, RXR α , et possède un rôle essentiel dans la différenciation des cellules de l'urothélium normal. Récemment, un rôle protumorigénique de PPAR γ a été mis en évidence dans les tumeurs lumineuses de vessie, où son activité est augmentée par le biais d'amplifications de PPAR γ , ainsi que des mutations activatrices de son partenaire, RXR α . Le premier axe de mon projet a consisté à mieux caractériser ce rôle protumorigénique de PPAR γ . J'ai d'abord participé à la mise en évidence de mutations récurrentes activatrices de PPAR γ dans les tumeurs lumineuses de la vessie renforçant le rôle protumorigénique du récepteur dans ces tumeurs. J'ai ensuite cherché à identifier les gènes cibles de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α pouvant médier cet effet protumorigénique. Grâce à des analyses transcriptomiques après extinction de l'expression PPAR γ ou de RXR α et des expériences de CHIP-sequencing de PPAR γ et RXR α , j'ai pu identifier 30 gènes candidats. L'étude de l'implication de ces gènes dans la progression tumorale des tumeurs lumineuses présentant des altérations de la voie PPAR γ /RXR α est actuellement en cours. Parallèlement à ce rôle protumorigénique dans les tumeurs lumineuses, des résultats suggéraient que ce gène pourrait posséder un rôle suppresseur de tumeurs dans le sous-groupe basal. La deuxième partie de mon projet a consisté à explorer cette hypothèse. J'ai pu montrer que des délétions hétérozygotes de PPAR γ sont associées à ce sous-groupe de tumeurs basales, qui présente également une diminution globale de l'expression de PPAR γ . De plus, parmi les mutations non-récurrentes de PPAR γ identifiées dans ces tumeurs, certaines sont des mutations inactivatrices, capables d'inhiber l'activité transcriptomique de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α en favorisant la fixation de co-répresseurs de l'hétérodimère. J'ai également pu montrer un rôle anti-tumoral de PPAR γ dans les tumeurs basales puisque l'expression de PPAR γ dans des lignées cellulaires basales à la suite de leur transfection avec un plasmide codant pour PPAR γ est capable d'inhiber leur viabilité. Ce projet a ainsi permis de mettre en évidence un rôle dual de PPAR γ dans les tumeurs de vessie, avec un rôle protumorigénique dans les tumeurs lumineuses, où il est suractivé par des amplifications et des mutations activatrices, et un rôle suppresseur de tumeurs dans les tumeurs basales, où il est réprimé par des délétions et de mutations inactivatrices.

Title: Dual role of PPAR γ in bladder tumors

Keywords: PPAR γ , Nuclear Receptors, Bladder tumors, Protumorigenic, Tumor suppressor, Mutations

Abstract: Bladder tumors are the fourth cancer in terms of frequency in men, in industrialized countries. Bladder cancers can be divided into two main subgroups: undifferentiated basal tumors and differentiated luminal tumors. The nuclear receptor PPAR γ , which is highly expressed in the second subgroup, forms a heterodimer with its partner, the nuclear receptor RXR α , and plays a key role in normal urothelial differentiation. A protumorigenic role of PPAR γ has been established in luminal bladder cancer, with an increased activity through PPAR γ genomic amplification or activating mutations of its partner, RXR α . The first part of my project aimed to better characterize this protumorigenic effect. I first participated in the identification of recurrent activating mutations of PPAR γ in the luminal subgroup, enhancing its protumorigenic role in those tumors. Then, I tried to identify the PPAR γ /RXR α heterodimer target genes that drive its protumorigenic role. By analyzing transcriptomic data following down regulation of PPAR γ and RXR α , as well as CHIP-sequencing data for each of them, I identified 30 candidate target genes. The implication of the candidate genes in tumor progression of luminal cancer carrying PPAR γ /RXR α pathway alteration is in progress. As opposed to its protumorigenic role in luminal tumors, some results suggested that PPAR γ could play a tumor suppressor role in the basal subgroup. The second part of my project explored this hypothesis. I characterized PPAR γ deletions associated with the basal subgroup, which presents a global PPAR γ downregulation. Moreover, some of the non-recurrent mutations identified in this subgroup are inactivating mutations, able to inhibit the transcriptomic activity of the PPAR γ /RXR α heterodimer, by an enhanced affinity of the heterodimer for co-repressors. I also showed an antitumor effect of PPAR γ in basal tumors: its expression in basal bladder cell lines after transfection with a plasmid coding for PPAR γ was able to inhibit cell viability. This project highlighted the dual role of PPAR γ in bladder tumors, with a protumorigenic effect in luminal tumors through amplifications and activating mutations, and a tumor suppressor effect in basal tumors through deletions and inactivating mutations.