

**PPAR γ ET TUMEURS COLORECTALES HUMAINES :
ALTERATIONS, EXPRESSION, ET RECHERCHE DE GENES CIBLES**

THESE DE DOCTORAT
Ecole doctorale CHIMIE-BIOLOGIE

Discipline : aspects cellulaires et moléculaires de la cellule

Spécialité : physiopathologies intestinales

présentée et soutenue publiquement par

Delphine BOUANCHEAU

Le 28 Octobre 2005 devant le jury ci-dessous :

Président du jury :

M. Patrick LUSTENBERGER, PU-PH, Nantes.

Rapporteurs :

M. Hervé BLOTTIERE, directeur de recherche seconde classe, Jouy-en-Josas.

M. Pascal REYNIER, PU-PH, Angers.

Examinatrice :

Mme Anne JARRY, Chargée de recherche première classe, Nantes.

Directeur de thèse :

M. Marc DENIS, MCU-PH, Nantes.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS CITEES	6
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	12
INTRODUCTION GENERALE	15
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	21
Chapitre I - Les récepteurs nucléaires	23
I. Les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires	27
I.1. Classification des récepteurs nucléaires	27
I.2. Nomenclature des récepteurs nucléaires	28
II. Les ligands des récepteurs nucléaires	28
III. Structure et fonction des récepteurs nucléaires	31
III.1. Structure générale	31
III. 2. La région modulatrice A/B et le domaine AF1	31
III. 3. Le DBD	32
III. 4. La région charnière D	33
III. 5. Le LBD et la région AF2	34
III. 5. A. Structure du LBD	35
III. 5. B. L'hélice H12 et la région AF-2	36
III. 5. C. Rôle des autres hélices α du LBD	37
IV. Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires	38
IV. 1. Reconnaissance de l'ADN par les récepteurs nucléaires	38
IV. 1. A. Les HREs	38
IV. 1. B. Importance du DBD et Dimérisation	40
IV. 2. Activation de la transcription par les récepteurs nucléaires	43
IV. 3. Répression de la transcription par les récepteurs nucléaires	44
IV. 3. A. Répression active	44
IV. 3. B. Les HREs négatifs	44
IV. 3. C. Cross-talk avec les autres voies de signalisation ou trans-répression	46
V. Les protéines interagissant avec les récepteurs nucléaires	47
V. 1. Interactions avec les facteurs de transcription généraux	47
V. 2. Interactions avec les protéines corégulatrices	47
V. 2. A. Les co-activateurs	49
V. 2. B. Les co-répresseurs	50
VI. Modifications post-traductionnelles des récepteurs nucléaires	51
VI. 1. La phosphorylation	51
VI. 2. L'ubiquitinylation	52

Chapitre II - Les PPARs	53
I. Les différents PPARs : aspects moléculaires	55
I. 1. Localisation chromosomique et organisation génomique des gènes PPAR	56
I. 2. Les variants PPAR γ	56
II. Les protéines PPARs : distribution tissulaire	58
II. 1. Expression de PPAR α chez l'homme	59
II. 2. Expression de PPAR δ chez l'homme	59
II. 3. Expression de PPAR γ chez l'homme	59
II. 3. A. Expression de PPAR γ dans le colon humain	61
III. Les ligands des PPARs	62
III. 1. Particularités du LBD des PPARs	62
III. 2. Les ligands de PPAR α	64
III. 2. A. Ligands naturels	64
III. 2. B. Ligands synthétiques	64
III. 3. Les ligands de PPAR δ	65
III. 4. Les ligands de PPAR γ	65
III. 4. A. Ligands naturels	65
III. 4. B. Ligands synthétiques	66
IV. Mode d'action des PPARs	68
IV. 1. Activités de transcription	68
IV. 2. L'hétérodimérisation avec les RXRs	68
IV. 3. Les éléments de réponse aux PPARs : les PPRES	70
V. Les cofacteurs des PPARs	72
VI. Régulation post-traductionnelle des PPARs	73
VI. 1. Phosphorylation	73
VI. 2. Ubiquitinylation	74
VII. Bref aperçu des implications physiologiques des PPARs	74
 Chapitre III - PPARγ et inflammation	 77
I. Résultats obtenus <i>in vitro</i>	80
I. 1. Une action anti-inflammatoire dépendante ou indépendante de PPAR γ	80
I. 2. Mécanismes moléculaires mis en jeu pour l'activité anti-inflammatoire des ligands de PPAR γ	82
I. 2. A. Les principaux facteurs moléculaires de l'inflammation impliqués	82
I. 2. B. Mécanismes d'action des agonistes de PPAR γ	83
I. 2. B. a. Des mécanismes indépendants de l'activation de PPAR γ ?	83
I. 2. B. b. Des évidences pour l'implication de PPAR γ	84
II. Résultats obtenus <i>in vivo</i>	86
II. 1. Les agonistes de PPAR γ atténuent les colites induites chimiquement	86
III. 1. A. Résultats obtenus chez la souris DSS	86
III. 1. B. Résultats obtenus à partir du modèle TNBS	87
III. 1. C. Mécanismes impliqués	87
II. 2. Importance du rôle de l'activation de PPAR γ dans la régulation de la réponse inflammatoire colique	88
III. 2. A. Mise en évidence du rôle physiologique de PPAR γ endogène	89
III. Expression de PPARγ dans les MICIs	91
III. 1. Expression de PPAR γ dans la RCH	91

III. 2. Expression de PPAR γ dans la MC	91
IV. Les TZDs : une approche thérapeutique potentielle pour le traitement des MICIs ?	92
Chapitre IV - PPARγ et cancer colorectal	93
I. Un agent inhibiteur de la prolifération et inducteur de la différenciation cellulaire et de l'apoptose <i>in vitro</i>	96
I. 1. Résultats obtenus <i>in vitro</i>	96
I. 2. Mécanismes impliqués	98
I. 2. A. Induction de la différenciation	98
I. 2. B. Inhibition de la prolifération cellulaire	98
I. 2. C. Adhésion cellulaire	102
I. 2. D. Lien entre PPAR γ et β -caténine dans les cellules épithéliales coliques	102
I. 2. E. Apoptose	103
II. PPARγ en tant que cible pour le traitement du cancer colorectal : la controverse	104
II. 1. Des résultats contradictoires dans les modèles animaux	104
II. 1. A. Les modèles animaux de cancérogenèse colorectale	104
II. 1. A. a. Les rats AOM	104
II. 1. A. b. Les souris Nude xénogreffées	104
II. 1. A. c. Les souris APC ^{Min}	104
II. 1. B. PPAR γ dans les modèles animaux	105
II. 1. B. a. Des effets antinéoplastiques chez le rat AOM et la souris Nude	105
II. 1. B. b. Des effets promoteurs de la cancérogenèse chez les souris APC ^{Min}	105
II. 1. B. c. Données obtenues à partir des souris PPAR γ ^{+/-}	106
II. 2. Les résultats obtenus chez l'homme	108
II. 2. A. Récemment, des résultats ex-vivo	108
II. 2. B. Inefficacité des TZDs pour le traitement du cancer colorectal	108
II. 3. Expression et altérations de PPAR γ dans le cancer colorectal	109
II. 3. A. Expression de PPAR γ dans les tumeurs colorectales humaines	109
II. 3. B. Mutations de PPAR γ dans les cancers colorectaux humains	109
II. 3. B. a. La mutation K422Q	110
II. 3. C. Altérations de la régulation de l'expression de PPAR γ dans les tumeurs colorectales humaines : le dominant négatif ORF4	112
RECAPITULATIF ET PROBLEMATIQUE	115
RESULTATS	119
RESULTATS - PARTIE I – RECHERCHE DE MUTATIONS AU NIVEAU DE L'EXON 6 DU GENE CODANT POUR PPAR γ DANS LES TUMEURS COLORECTALES HUMAINES.	121
I. Introduction	122
II. Objectif	122
III. Principe de la PCR par amplification spécifique d'allèle	123
- Article 1 – La mutation K422Q du gène codant pour PPAR γ n'est pas responsable de l'inefficacité de la Troglitazone dans le traitement du cancer colorectal	125

IV. Résultats marquants	133
V. Question posée par ces résultats	133
VI. Résultats complémentaires : recherche de mutations au niveau de l'exon 6 du gène <i>PPARγ</i> dans des tumeurs colorectales primaires humaines	134
VI. 1. Méthode	134
VI. 1. A. Amplification de l'exon 6 du gène <i>PPARγ</i> par PCR	134
VI. 1. B. Analyse par séquençage	134
VII. Résultats	135
VIII. Questions posées par ces résultats	135
 RESULTATS - PARTIE II – ETUDE DE L'EXPRESSION DE <i>PPARγ</i> ET DE SES PARTENAIRES DANS LES TUMEURS COLIQUES CHEZ L'HOMME	 137
I. Introduction	138
II. Objectifs	138
- Article 2 – L'expression de <i>PPARγ</i> et de ses co-activateurs est altérée dans les carcinomes coliques humains	139
III. RESULTATS MARQUANTS	161
 RESULTATS - PARTIE III – IDENTIFICATION D'UN GENE CIBLE POTENTIEL DE <i>PPARγ</i> : MCT-1	 163
I. Introduction	165
II. Objectif	166
III. Matériel et méthodes	167
III. 1. Modèle de culture cellulaire : les cellules cancéreuses coliques humaines de la lignée HT29 Clone 16.E (HT29CI16.E)	167
III. 2. Isolement de cellules épithéliales de côlon humain normal	168
III. 2. A. Prélèvements de côlon humain normal à distance d'un cancer	168
III. 2. B. Isolement des cellules épithéliales intestinales (CEIs)	168
III. 3. Analyse de la translocation nucléaire de <i>PPARγ</i> dans les cellules HT29CI16.E par immunofluorescence et microscopie confocale	168
III. 4. Analyse de l'expression des ARNms codant pour MCT-1 et la L-FABP par PCR quantitative en temps réel	169
III. 4. A. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)	169
III. 4. B. Amplification par PCR en temps réel	169
IV. Résultats	173
IV. 1. Expression de MCT1 et de <i>PPARγ</i> dans les cellules épithéliales coliques humaines	173
IV. 1. A. Comparaison de l'expression de <i>PPARγ</i> et de MCT1 entre l'intestin grêle et le colon par PCR en temps réel	173

IV. 1. B. Fonctionnalité de PPAR γ dans les cellules épithéliales cancéreuses coliques humaines de la lignée HT29Cl16.E	173
IV. 1. B. a. Translocation nucléaire de PPAR γ dans les cellules HT29Cl16.E	175
IV. 1. B. b. Effet du GW7845 et de la Rosiglitazone sur l'expression de la L-FABP dans les cellules HT29Cl16.E	175
IV. 2. Effets des agonistes de PPAR γ sur l'expression de MCT1 dans les cellules cancéreuses coliques humaines	176
IV. 2. A. Le GW7845 diminue l'expression de MCT1 dans les cellules HT29Cl16.E	176
IV. 2. B. Cinétique d'action du GW7845 sur l'expression de MCT1 dans les cellules HT29Cl16.E	178
IV. 2. C. L'utilisation d'un antagoniste de PPAR γ bloque la diminution de l'expression de MCT1 induite par la Rosiglitazone	180
IV. 2. D. Effet d'un inhibiteur de NF- κ B, le PDTC, sur l'expression de MCT1 dans les cellules HT29Cl16.E	182
V. Résultats marquants	184
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	185
I. Altérations de PPARγ dans les tumeurs colorectales humaines	188
II. Expression de PPARγ et de ses co-activateurs dans les tumeurs colorectales humaines	191
III. Expression du variant d'épissage ORF4 dans les tumeurs colorectales humaines	193
IV. Identification d'un gène cible de PPARγ dans les cellules cancéreuses coliques humaines : MCT1	195
BIBLIOGRAPHIE	201

ABREVIATIONS CITEES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF	Activation Fonction
AOM	Azoxyméthane
AP-1	Activation Protein 1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
BEI	Barrière Epithéliale Intestinale
CBP	CREB Binding Protein
Cdk	Cyclin dependant kinase
CEI	Cellule Epithéliale Intestinale
CHX	Cycloheximide
CIT	Complexe d'Initiation de la Transcription
CKI	Cyclin dependent Kinase Inhibitor
COX	Cyclooxygénase
CTE	C-Terminal Extension
DBD	DNA Binding Domain
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DR	Direct Repeat
DSS	Dextran Sodium Sulfate
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Everted Repeat
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase-3
HDAC	Histone Deacetylase
HDL	High Density Lipoprotein
HETE	Hydroxyeicosatetraenoic acid
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
HODE	Hydroxyoctadecaenoic acid

HRE	Hormone Response Element
IAP	Intestinal Alkaline Phosphatase
IFN γ	Interféron γ
IKK	I κ B Kinase
Il	Interleukine
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
IR	Inverted Repeat
JAK	Janus tyrosine protein Kinases
JNK	Jun N-terminal tyrosine Kinases
LBD	Ligand Binding Domain
LBP	Ligand Binding Pocket
LDL	Low Density Lipoprotein
L-FABP	Liver Fatty Acid Binding Protein
LOF	Loss-Of-Function
LOX	Lipoxygénase
LPS	Lipopolysaccharide
LTB4	Leucotriène B4
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MC	Maladie de Crohn
MCT-1	Monocarboxylate Transporter-1
MICI	Maladie Inflammatoire Chronique Intestinale
MMP	Matrix Metalloproteinase
MPO	Myeloperoxydase
MMR	Mismatch Repair
MSI	Microsatellite Instability
MSS	Microsatellite Stability
NES	Nuclear Export Signal
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
nHRE	negative Hormone Response Element
NLS	Nuclear Localization Signal
ORF	Open Reading Frame
PAF	Polypose Adénomateuse Familiale
PBS	Phosphate Buffer Saline

PCR	Polymerase Chain Reaction
PG	Prostaglandine
PGC1	PPAR γ Coactivator 1
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PPRE	PPAR Response Element
PRIP	Peroxisome proliferator-activated Receptor-Interacting Protein
Ras	membre de la famille des protéines G
RCH	Rectocolite Hémorragique
Reg	Regenerating gene
RXR	Retinoid X Receptor
SMRT	Silencing Mediator for Retinoic acid and Thyroid Hormone receptors
SRC-1	Steroid Receptor Coactivator-1
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SVF	Sérum de Veau Foetal
TAF	TBP Associated Factor
TBP	TATA Binding Protein
Tcf-4	T-cell factor 4
TZD	Thiazolidinédione
TF	Transcription Factor
TNBS	Trinitrobenzène de Sodium
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TSC-22	Transforming growth Factor Simulated Clone 22
VCAM	Vascular Cellular Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
15dPGJ2	15 $\Delta^{12,14}$ -déoxy-Prostaglandin J2

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de la paroi colique (Atlas of colorectal tumors, Hermanek et al., 1983).	18
Figure 2 : Les différents compartiments d'une crypte colique.	18
Figure 3 : Structure Générale des récepteurs nucléaires.	30
Figure 4 : Représentation schématique du domaine de liaison à l'ADN (DBD) des récepteurs nucléaires.	33
Figure 5 : Représentation 3D du domaine de liaison au ligand (LBD) des récepteurs nucléaires, obtenue par cristallographie aux rayons X (Nagy et Schwabe, 2004).	35
Figure 6 : Les différents éléments de réponse (HREs) auxquels se lient les récepteurs nucléaires.	39
Figure 7 : Activation de la transcription et répression active par les récepteurs nucléaires.	42
Figure 8 : Liaison des récepteurs nucléaires au HREs classiques et aux HREs négatifs (d'après Moehren et al., 2004).	45
Figure 9 : Transrépression des activités AP1 (jun/fos) et NF-kB par les récepteurs nucléaires.	46
Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation des gènes codant pour les PPARs chez l'homme.	56
Figure 11 : Représentation schématique du gène codant pour PPAR γ chez l'homme et de ses trois variants d'épissage.	57

Figure 12 : Représentation schématique des protéines PPARs (d'après Rosen et Spiegelman, 2001).	58
Figure 13 : Distribution tissulaire des ARNms de PPAR γ chez l'homme. Analyse en PCR, résultats normalisés avec la β -actine (Dubuquoy et al., 1999).	60
Figure 14 : Schéma d'une villosité colique, expression de PPAR γ dans les cellules épithéliales intestinales.	61
Figure 15 : Représentation 3D par cristallographie aux rayons X du domaine de liaison au ligand de PPAR γ (d'après Nolte et al., 1998).	63
Figure 16 : Exemples de ligands de PPAR γ .	67
Figure 17 : Les PPARs forment des hétérodimères permissifs avec les RXRs.	69
Figure 18 : Les PPARs se lient à leurs éléments de réponse sur l'ADN sous forme d'hétérodimères avec les RXRs.	71
Figure 19 : Echange des cofacteurs de PPAR γ lors de l'activation transcriptionnelle (d'après Grommes et al., 2004).	72
Figure 20 : Modèle hypothétique de l'inhibition des voies de signalisation de l'inflammation par PPAR γ (D'après Délériver et al., 2001).	85
Figure 21 : La progression du cycle cellulaire. Inhibition par les CKIs p27 ^{Kip1} et p21 ^{Cip1/Waf1} (d'après Blottière et Buecher, 2001).	99
Figure 22 : Les mécanismes potentiels par lesquels PPAR γ régule la progression du cycle cellulaire.	101
Figure 23 : Identification de la mutation K422Q <i>in vitro</i> dans des lignées cellulaires cancéreuses coliques humaines (Gupta et al., 2003).	111

Figure 24 : Représentation schématique des protéines PPAR γ 1, 2, et 3 et de la protéine ORF4 chez l'homme (d'après Sabatino et al., 2005).	112
Figure 25 : Principe de l'amplification de la mutation K422Q par PCR spécifique d'allèle.	123
Figure 26 : Analyse par Northern Blot des gènes régulés positivement ou négativement dans les adipocytes par l'activation de PPAR γ . Clonage soustractif (Okuno et al., 2002).	162
Figure 27 : Expression des ARNms codant pour PPAR γ et MCT1 dans des cellules épithéliales isolées (CEIs) issues de colon et d'intestin grêle humains. Analyse en PCR quantitative.	170
Figure 28 : Induction de la translocation nucléaire de PPAR γ par la Rosiglitazone (2 μ M) dans les cellules cancéreuses coliques humaines de la lignée HT29C116.E.	172
Figure 29 : Effet du GW7845 et de la Rosiglitazone sur l'expression des ARNms codant pour la L-FABP dans les cellules HT29C116.E.	173
Figure 30 : Effet de la Rosiglitazone et de l'antagoniste de PPAR γ , le GW9662, sur l'expression de la L-FABP dans les cellules HT29C116.E.	174
Figure 31 : Effet des agonistes de PPAR α (WY14643) et de PPAR γ (GW7845) sur l'expression de la L-FABP et de MCT1 dans les cellules HT29C116.E.	175
Figure 32 : Cinétique d'action du GW7845 (5 μ M) sur l'expression des ARNms codant pour la L-FABP et MCT1 dans les cellules cancéreuses coliques humaines de la lignée HT29C116.E.	177

Figure 33 : Effet de la Rosiglitazone et du GW9662, antagoniste de PPAR γ , sur l'expression des ARNms codant pour la L-FABP et MCT-1 dans les cellules cancéreuses coliques HT29C116.E.	179
Figure 34 : Effet d'un inhibiteur de NF- κ B, le PDTC, sur l'expression des ARNms codant pour la L-FABP et MCT1 dans les HT29C116.E traitées ou non avec le GW7845. Analyse par PCR en temps réel.	181
Figure 35 : Modèle hypothétique pour la régulation de la prolifération des cellules épithéliales coliques humaines par le butyrate, MCT1 et PPAR γ .	195

LISTE DES TABLEAUX

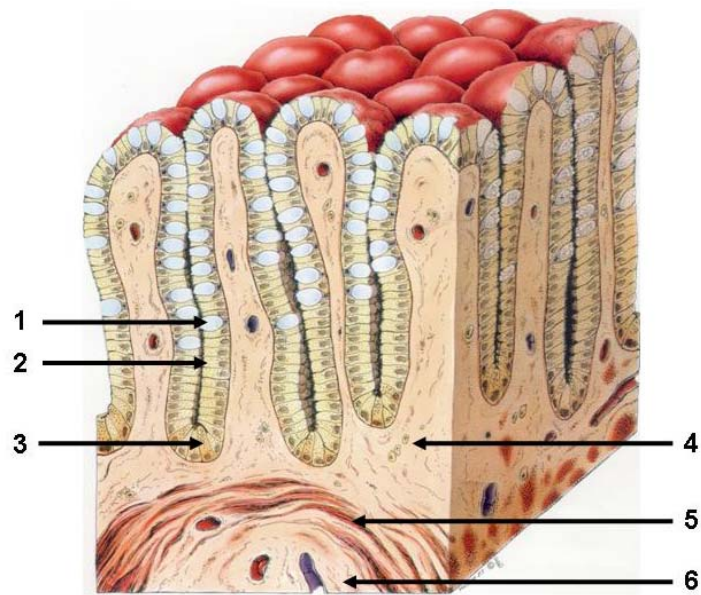
Tableau 1 : Classification des récepteurs nucléaires chez l'homme (d'après Gronemeyer et al., 2004).	26
Tableau 2 : Classes des coactivateurs des récepteurs nucléaires.	48
Tableau 3 : Effets des agonistes de PPAR γ dans les modèles animaux d'inflammation chronique du côlon.	90
Tableau 4 : Effets des agonistes de PPAR γ sur la croissance des cellules épithéliales coliques humaines <i>in vitro</i> .	97
Tableau 5 : Effets des agonistes de PPAR γ dans les modèles animaux de cancérogenèse colorectale.	107
Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour les amplifications par PCR en temps réel.	168

INTRODUCTION GENERALE

La superfamille des récepteurs nucléaires est constituée de facteurs de transcription ligand-dépendants, qui fournissent un lien direct entre les molécules de signalisation et la réponse transcriptionnelle. Les récepteurs nucléaires contrôlent l'expression de gènes en réponse à une grande diversité de facteurs physiologiques et environnementaux. Ils régulent ainsi différents aspects de la reproduction, du développement, de l'homéostasie, de la fonction immunitaire, de la balance minérale, du stress... Un grand nombre d'entre eux sont impliqués dans des pathologies comme le cancer, le diabète, ou des syndromes de résistance aux hormones.

Parmi cette superfamille, les PPARs (pour Peroxisome Proliferator Activated Receptors) sont des récepteurs pour lesquels un intérêt croissant a été porté depuis ces dernières années. Cette sous-famille regroupe trois sous-types : PPAR α , PPAR β/δ , et PPAR γ . Leur rôle dans le contrôle du métabolisme lipidique a été largement décrit. Mais ils possèdent également des implications majeures dans le contrôle du métabolisme glucidique, dans la réponse inflammatoire, et dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Les PPARs constituent donc des cibles thérapeutiques potentielles très intéressantes pour de nombreuses pathologies comme le diabète, l'obésité, l'athérosclérose, et de nombreux cancers. D'ailleurs, de nombreux agents pharmacologiques qui agissent comme des agonistes synthétiques de ces récepteurs nucléaires sont déjà largement utilisés dans le traitement de certaines de ces pathologies. Par exemple, les Thiazolidinédiones (TZDs) sont des ligands synthétiques de haute affinité pour PPAR γ . Elles agissent comme des sensibilisateurs à l'insuline et sont couramment administrées pour le traitement des patients atteints de diabète de type II.

La thématique du laboratoire INSERM U539 de Nantes repose sur l'étude des pathologies intestinales, notamment des mécanismes impliqués dans la cancérogenèse colorectale et dans la progression des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICIs) chez l'homme. Plus précisément, ces mécanismes sont étudiés au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse colique. Les colonocytes forment la barrière épithéliale intestinale (BEI) au niveau du côlon (figures 1 et 2). Deux grands aspects caractérisent la BEI. Tout d'abord, c'est un site important de régulation de la prolifération cellulaire. En effet, les cellules épithéliales du fond des cryptes sont des cellules en prolifération, peu différenciées. Elles migrent progressivement vers la lumière du tube digestif où elles adoptent un phénotype



- | | |
|-------------------------------|---------------------------|
| 1 : cellule caliciforme | 4 : <i>lamina propria</i> |
| 2 : colonocyte | 5 : musculaire muqueuse |
| 3 : cellule entérochromaffine | 6 : sous-muqueuse |

Figure 1 : Schéma de la paroi colique (Atlas of colorectal tumors, Hermanek et al., 1983)

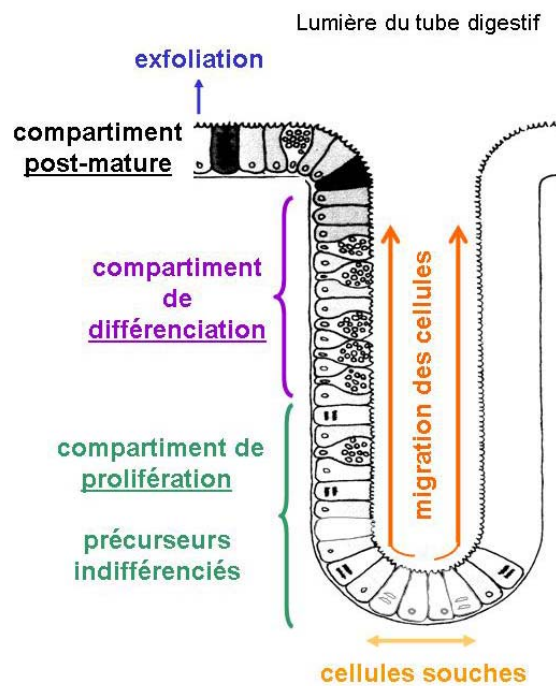


Figure 2 : Les différents compartiments d'une crypte colique.

différencié associé à l'arrêt de leur prolifération cellulaire. Les altérations de ces processus de prolifération/différenciation sont des éléments importants de la tumorigenèse colorectale. Ensuite, la BEI est l'intermédiaire entre la lumière du tube digestif et l'organisme. C'est donc un haut lieu d'échange entre ces deux milieux, site effecteur des mécanismes d'absorption et de sécrétion. C'est également la première ligne de défense contre les agents pathogènes du milieu extérieur. Elle devient alors le site initiateur de la réponse immunitaire et de la réponse inflammatoire. De la même façon, des défauts des mécanismes impliqués sont à l'origine de processus d'inflammation chronique.

Les PPARs sont exprimés dans les cellules épithéliales intestinales. En particulier, PPAR γ est abondant dans les colonocytes. Le colon est le tissu exprimant les plus hauts niveaux de ce récepteur nucléaire dans l'organisme, après le tissu adipeux. Le rôle de PPAR γ dans cet organe a donc été largement étudié ces dernières années. De plus en plus d'évidences l'ont impliqué dans la cancérogenèse colorectale. Les résultats tendent à suggérer qu'il agirait comme un gène suppresseur de tumeur. Mais des contradictions existent et entretiennent une polémique quant au rôle de PPAR γ dans le cancer colorectal. Il apparaît aussi de plus en plus que le récepteur soit impliqué dans le contrôle de la réponse inflammatoire. De nombreuses études ont donc porté sur le lien existant entre PPAR γ et MICIs. Pour ces deux grands aspects des pathologies intestinales, les mécanismes impliquant PPAR γ restent encore largement à élucider. Dans ce sens, il est établi que le récepteur nucléaire contrôle l'expression d'une grande diversité de gènes cibles, mais ils restent encore largement à caractériser dans les cellules épithéliales coliques humaines.

Le travail présenté ici a donc été axé principalement autour de deux aspects. D'une part, il s'agissait d'étudier les altérations de PPAR γ dans le contexte du cancer colorectal. D'autre part, nous avons cherché à identifier de nouveaux gènes cibles de ce récepteur nucléaire dans les cellules épithéliales coliques humaines.

Afin d'introduire nos résultats, la synthèse bibliographique s'articule autour de quatre chapitres. Le premier développe une vue générale de la superfamille des récepteurs nucléaires, avec pour objectif la compréhension de leurs mécanismes d'action. Le second approfondit ces aspects pour la sous-famille des PPARs, plus particulièrement pour PPAR γ , avec un bref aperçu de leurs implications physiologiques. Finalement sont développés les deux grandes problématiques dans lesquelles PPAR γ est impliqué dans le colon humain : l'inflammation et le cancer colorectal.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Les récepteurs nucléaires

Tous les récepteurs nucléaires ont une structure modulaire commune. Activés par la liaison d'un ligand, ils contrôlent l'expression de gènes cibles en interagissant directement avec des éléments de réponse ADN, sous forme de monomères, momodimères, ou hétérodimères avec d'autres récepteurs. Ils peuvent également interagir avec d'autres voies de signalisation.

Il y a un peu plus de vingt ans que le premier membre de cette superfamille a été cloné. Il s'agissait du récepteur aux estrogènes (REF). Depuis, d'autres récepteurs hormonaux ont été clonés et leurs séquences cibles identifiées. Ces dernières années, la croissance spectaculaire des connaissances en matière de régulation des gènes par les récepteurs a conduit à l'observation que l'interaction d'un récepteur avec l'ADN n'était pas le seul événement à prendre en compte pour comprendre les mécanismes de la réponse transcriptionnelle. L'existence de corégulateurs (co-activateurs et co-répresseurs), éléments cruciaux pour la transmission du signal hormonal à la machinerie transcriptionnelle, a également été mise en évidence. D'autre part, les structures des domaines de liaison au ligand des récepteurs nucléaires ont été caractérisées, ce qui a permis de définir la base structurale de leurs fonctions transcriptionnelles.

Les clonages des récepteurs pour les hormones stéroïdes et thyroïdiennes ont montré qu'ils présentaient une grande homologie. Ceci a conduit à la recherche de nouvelles protéines avec des structures similaires. Durant les deux dernières décennies, près de cinquante récepteurs nucléaires ont été caractérisés chez les vertébrés. De nouvelles réponses aux hormones ont ainsi été découvertes, avec le concept "d'endocrinologie inverse", dans lequel la caractérisation du récepteur précède l'étude de sa fonction physiologique. Pour beaucoup de récepteurs nucléaires découverts de cette façon, les ligands régulateurs n'ont pas encore été identifiés. Ils ont donc été qualifiés de récepteurs "orphelins".

Cependant, ces dernières années les ligands de beaucoup de récepteurs orphelins ont été caractérisés. Si certains sont des produits du métabolisme lipidique, il est maintenant acquis que des composés comme les acides gras, les leucotriènes, les dérivés des prostaglandines et du cholestérol, les acides biliaires, ... peuvent réguler l'expression de gènes en se liant à des récepteurs nucléaires. De plus, les récepteurs orphelins sont aussi associés aux pathologies comme l'athérosclérose, le cancer, le diabète ou autres désordres lipidiques. Ces trouvailles ont ouvert de nouvelles stratégies pour le traitement de ces maladies. À ce jour, les récepteurs orphelins constituent des cibles thérapeutiques importantes pour la découverte de nouvelles drogues pharmacologiques, via la recherche de nouveaux agonistes ou antagonistes.

Nom	Abréviation	Nomenclature	Ligands
Thyroid hormone Receptor	TR α TR β	NR1A1 NR1A2	Hormones thyroïdiennes
Retinoic Acid Receptor	RAR α RAR β RAR γ	NR1B1 NR1B2 NR1B3	Acide rétinoïque
Peroxisome Proliferator-Activated Receptor	PPAR α PPAR β/δ PPAR γ	NR1C1 NR1C2 NR1C3	Acides gras, leucotriène B4, fibrates Acides gras Acides gras, prostaglandine J2
Reverse erba	Rev-erba Rev-erb β	NR1D1 NR1D2	Orphelins
RAR-related Orphan Receptor	ROR α ROR β ROR γ	NR1F1 NR1F2 NR1F3	Cholestérol, cholestéryl sulphate Acide rétinoïque Acide Rétinoïque
Liver X Receptor	LXR α LXR β	NR1H3 NR1H2	Oxystérols, T0901317, GW3965
Farsenoid X Receptor	FXR α FXR β	NR1H4 NR1H5	Acides biliaires, Fexaramine, Lanostérol
Vitamin D Receptor	VDR	NR1I1	1,25-dihydroxy-vitamine D ₃ , acide lithocholique
Pregnane X Receptor	PXR	NR1I2	Xénobiotiques, PCN
Constitutive Androstane Receptor	CAR	NR1I3	Xénobiotiques, phénobarbital
Human Nuclear Factor 4	HNF4 α HNF4 γ	NR2A1 NR2A2	Orphelins
Retinoid X Receptor	RXR α RXR β RXR γ	NR2B1 NR2B2 NR2B3	Acide rétinoïque
Testis Receptor	TR2 TR4	NR2C1 NR2C2	Orphelins
Tailless	TLL	NR2E2	Orphelin
Photoreceptor-specific Nuclear Receptor	PNR	NR2E3	Orphelin
Chicken Ovalbumin Upstream Promoteur-Transcription Factor	COUP-TFI COUP-TFII	NR2F1 NR2F2	Orphelins
ErbA2-Related gene-2	EAR2	NR2F6	orphelin
Oestrogen Receptor	Er α ER β	NR3A1 NR3A2	Oestradiol-17b, tamoxifène, raloxifène Oestradiol-17b, différents composés synthétiques
Oestrogen receptor Related Receptor	ERR α ERR β ERR γ	NR3B1 NR3B2 NR3B3	Orphelin DES, 4-hydroxy-tamoxifène
Glucocorticoid Receptor	GR	NR3C1	Cortisol, dexaméthasone, RU486
Mineralocorticoid Receptor	MR	NR3C2	Aldostérone, spirolactone
Progesterone Receptor	PR	NR3C3	Progestérone, acétate de médroxyprogestérone, RU486
Androgen Receptor	AR	NR3C4	Testostérone, flutamide
NGF-Induced factor B	NGFIB	NR4A1	Orphelin
Nur Related Factor 1	NURR1	NR4A2	Orphelin
Neuron-derived Orphan Receptor 1	NOR1	NR4A3	Orphelin
Steroidogenic Factor 1	SF1	NR5A1	Orphelin
Liver Receptor Homologous protein 1	LRH1	NR5A2	Orphelin
Germ Cell Nuclear Factor	GCNF	NR6A1	Orphelin
DSS-AHC critical region on the chromosome, gene 1	DAX1	NR0B1	Orphelin
Short Heterodimeric Partner	SHP	NR0B2	Orphelin

Tableau 1 : Classification des récepteurs nucléaires chez l'homme (d'après Gronemeyer et al., 2004)

I. Les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont regroupés au sein d'une grande superfamille, de par leurs homologies structurales et fonctionnelles. À ce jour, 49 membres ont été identifiés (Gronemyer et al., 2001). Il semble qu'ils soient, pour la majorité, dérivés d'un ancêtre commun.

I.1. Classification des récepteurs nucléaires

Une liste des récepteurs classiques et hormonaux est présentée dans le tableau 1. Celle-ci correspond à la classification retenue actuellement, établie par Laudet en 1997 (Laudet, 1997), et complétée depuis. Se basant sur une analyse évolutive, phylogénétique des récepteurs nucléaires, il aboutit à la subdivision de cette superfamille en 6 groupes. Le premier regroupe les récepteurs hormonaux thyroïdiens (TRs), les récepteurs à l'acide rétinoïque (RARs), les récepteurs à la vitamine D (VDRs), les récepteurs activés par les proliférateurs des peroxisomes (PPARs), ainsi que de différents récepteurs orphelins. Les ligands de certains de ces récepteurs ont récemment été identifiés. Le second groupe contient les récepteurs aux rétinoïdes X (RXRs), les stimulateurs de l'ovalbumine de poulet (COUPs), le facteur nucléaire des hépatocytes (HNF4), les récepteurs testis (TR2) et les récepteurs impliqués dans le développement de l'œil (PNR). Les récepteurs aux hormones stéroïdes et des récepteurs orphelins hautement reliés au récepteur des oestrogènes (ERRs) composent le troisième groupe. Les quatrième, cinquième et sixième groupes contiennent des récepteurs orphelins (Laudet, 1997 ; Giguère, 1999 ; Aranda et Pascual, 2001).

Des homologues ont été identifiés chez les arthropodes pour la plupart des groupes de récepteurs. Seule exception : les récepteurs aux hormones stéroïdes, pour lesquels aucun homologue n'a été trouvé. Il a été suggéré que les récepteurs ancestraux étaient des facteurs de transcription homodimériques constitutifs. Ils auraient évolué pour finalement acquérir la capacité de se lier à un ligand et de former des hétérodimères. Mais il n'est pas à exclure que le récepteur ancestral ait eu une activité ligand dépendante. Il est possible aussi que des mutations aient changé les spécificités de liaison au ligand, ou aient conduit à une perte de cette liaison au cours de l'évolution (Escriva et al., 2004 ; Laudet et al., 1992).

Laudet définit deux grandes étapes de la diversification des récepteurs nucléaires. La première, très précoce, aurait très probablement eu lieu pendant les phénomènes de multicellularisation aboutissant au phylum des métazoaires. La seconde est plus tardive et correspondrait à l'avènement des vertébrés.

La distribution en 6 sous-familles corrèle avec les capacités des récepteurs à se lier sous forme de monomère, homo- ou hétérodimères. Par exemple, les récepteurs se liant sous forme d'hétérodimères avec les RXRs sont regroupés dans les groupes I et IV. Par contre, la classification de Laudet ne fait pas de lien entre la détermination du groupe d'un récepteur nucléaire et son ligand.

I.2. Nomenclature des récepteurs nucléaires

Un système de nomenclature unifiée a été adopté pour la superfamille des récepteurs nucléaires depuis 1999 (Nuclear Receptor Nomenclature Committee, 1999). Il est en accord avec l'analyse phylogénétique réalisée par Laudet. Chaque groupe est divisé en sous-familles référencées par leurs noms (PPAR), chaque membre de ces familles est identifié par une lettre grecque (PPAR γ). Les isoformes sont caractérisés par un chiffre arabe (PPAR γ 1). Les sous-types de récepteurs sont généralement les produits de gènes individuels (ex : PPAR α et PPAR γ). Les isoformes de récepteurs, eux, sont issus d'un même gène. Ils sont des produits d'épissage alternatif, de sélection de promoteur, ou les deux (ex : PPAR γ 1, 2, 3) (Mangelsdoff et al., 1995).

II. Les ligands des récepteurs nucléaires

Le tableau 1 donne des exemples de ligands pour les différentes espèces de récepteurs nucléaires. Ceux-ci peuvent être activés des molécules liposolubles variées, dont les hormones stéroïdes comme l'oestradiol pour le récepteur aux oestrogènes (ER), le cortisol pour le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), la testostérone pour le récepteur aux androgènes (AR). Quelques vitamines exercent aussi leurs effets via des récepteurs nucléaires. L'acide 9-*cis*-

rétinoïque, dérivé de la vitamine A, lie les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR) et aux rétinoïdes X (RXR). La vitamine D3 active directement le récepteur à la vitamine D (VDR).

Un nombre croissant de ligands de faible affinité ont été trouvés pour les récepteurs décrits à l'origine comme orphelins. Ces ligands incluent les acides gras polyinsaturés, l'acide arachidonique et les prostanoïdes pour les PPARs ; les oxystérols pour les LXRs ; les acides biliaires pour le FXR... La capacité des récepteurs nucléaires à lier des ligands si diversifiés chimiquement est reflétée par la structure de leur domaine de liaison au ligand (LBD pour Ligand Binding Domain) (Nagy et Schwabe, 2004 ; Novac et Heinzl, 2004). Cependant, il semble que dans certains cas, la fonction de la protéine ne requiert pas de ligand (Ewan, 2004).

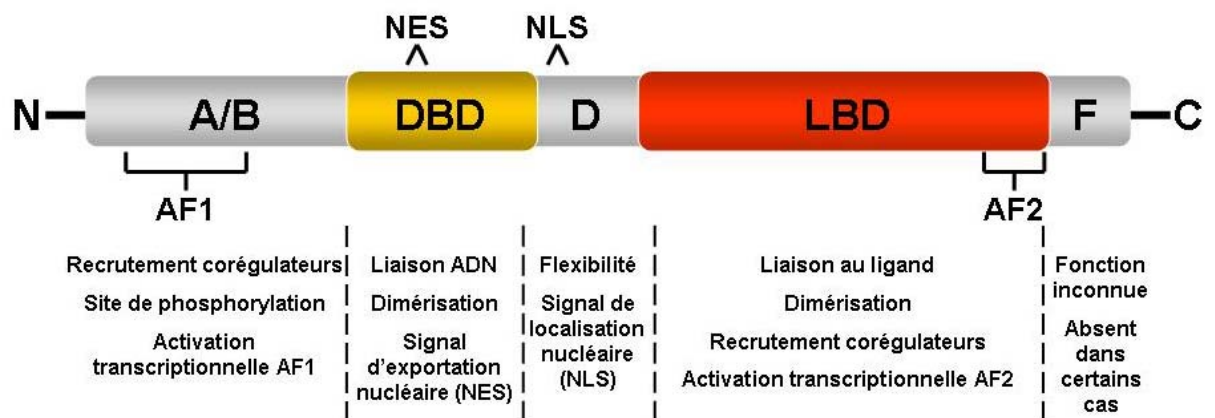


Figure 3 : Structure Générale des récepteurs nucléaires.

N : partie NH2 terminale ; C : partie COOH terminale ; AF : Activation Fonction ; DBD : DNA Binding Domain ; LBD : Ligand Binding Domain ; NES : Nuclear Export Signal ; NLS : Nuclear localization Signal.

III. Structure et fonction des récepteurs nucléaires

III.1. Structure générale

Les récepteurs nucléaires présentent une structure modulaire commune. Ils sont constitués de différentes régions qui correspondent à autant de domaines fonctionnels autonomes, mais interactifs. La figure 3 représente cette structure.

Quatre modules composent typiquement un récepteur nucléaire:

- En partie NH2 terminale, le domaine modulateur ou région A/B, hautement variable
- Un domaine central de liaison à l'ADN (DBD pour DNA Binding Domain) ou région C
- La région lien D
- Un domaine de liaison au ligand (LBD pour Ligand Binding Domain) ou région E, en partie COOH terminale.

Certains récepteurs nucléaires possèdent une région supplémentaire localisée après le LBD, nommée région F. Sa fonction est inconnue (Folkertsma et al., 2004). Hautement conservés, les DBD et LBD sont les véritables signatures de la superfamille (Evans et al., 1988; Green et Chambon, 1988). La majorité des récepteurs possède également deux domaines de transactivation. La région A/B contient le domaine AF1, qui contribue à l'activation constitutive du récepteur, de façon ligand indépendante. Le second, AF2, est localisé en partie COOH terminale du LBD. Il est très conservé parmi les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. A l'inverse d'AF1, son activité est strictement dépendante de la liaison du ligand.

III. 2. La région modulatrice A/B et le domaine AF1

La région A/B est la plus variable en taille et en séquence. De multiples isoformes de récepteurs nucléaires générés par un seul gène divergent au niveau de cette région. A/B présente une activité spécifique du promoteur du gène cible et du type cellulaire. Elle contribue ainsi à la spécificité d'action des isoformes des récepteurs nucléaires (Aranda et

Pascual, 2001). Dans la majorité des cas, cette région contient un domaine de transactivation fort : AF1. Celui-ci est un élément clé pour la régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires. Son action est d'ailleurs indépendante de la liaison du ligand (Kumar et al., 2003).

La fonction des récepteurs nucléaires peut être modulée de façon post-traductionnelle par des phosphorylations, en réponse à certains types d'effecteurs comme les MAPK ou les cdk (cycline dependant kinases). La majorité des sites de phosphorylation des récepteurs réside dans la région A/B, plus particulièrement dans le domaine AF1 (Shao et al., 1999 ; Gronemeyer et al., 2004 ; Mac Ewan et al., 2004). L'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires est également modulée par leurs interactions avec des protéines co-régulatrices lors de leur liaison à l'ADN. AF1 contient également des sites de liaison aux cofacteurs (Kumar et al., 2004). En se liant à des facteurs de transcription généraux, il permet la formation et l'activation du complexe d'initiation de la transcription. Il agirait ensuite en augmentant l'efficacité de l'initiation de la transcription du gène cible, ainsi que de l'élongation (Choudhry et al., 2003).

III. 3. Le DBD

Pour réguler la transcription de leurs gènes cibles, les récepteurs nucléaires lient l'ADN au niveau de séquences régulatrices spécifiques, définies à l'origine en tant qu'éléments de réponse aux hormones (ou HRE pour Hormone Response Element). Le DBD assure la reconnaissance et la liaison à ces séquences cibles. Il est d'ailleurs suffisant pour remplir entièrement cette fonction (Khorasanizadeh et al., 2001). C'est un domaine hautement conservé, commun à presque tous les récepteurs nucléaires. Il existe une exception : le récepteur orphelin SHP (Short Heterodimer Partner) qui ne possède pas de DBD (Nagy et Schwabe, 2004).

Le DBD est composé de 66 à 70 acides aminés qui forment deux motifs en "doigt de Zinc" successifs suivis d'une extension d'environ 25 acides aminés en partie C terminale, la CTE (C Terminal Extension) (figure 4). Tous les DBD contiennent deux hélices α qui se lient de façon perpendiculaire via leurs bases hydrophobes pour former le core de la protéine. La première suit le premier motif doigt de Zinc et est essentielle pour la reconnaissance et l'engagement de contacts spécifiques avec les HREs (Kumar et al., 2004 ; Khorasanizadeh et al., 2001). Elle inclut la "P Box" qui est l'élément clé pour la distinction spécifique des

éléments de réponse ADN (Gronemeyer et al., 1995). La CTE contient une troisième hélice α qui étend les interactions Protéine/ADN de façon moins spécifique (Mangelsdorf et al., 1995). Les récepteurs nucléaires lient l'ADN sous forme de monomères, homodimères ou hétérodimères. Sur le second motif doigt de Zinc du DBD, des résidus forment la "D Box", impliquée dans la dimérisation (Aranda et Pascual, 2001).

Enfin, il a été montré que le DBD contient dans sa partie C terminale un signal de localisation nucléaire (NLS pour Nuclear Localization Signal) requis pour l'entrée du récepteur dans le noyau de la cellule (Nagy et Schwabe, 2004). Il a aussi été suggéré qu'il existe un signal d'exportation nucléaire (NES pour Nuclear Export Signal) au sein même du DBD (Black et al., 2001).

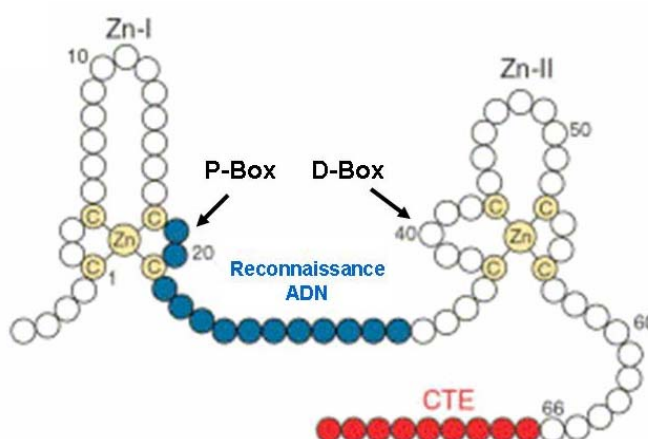


Figure 4 : Représentation schématique du domaine de liaison à l'ADN (DBD) des récepteurs nucléaires.

III. 4. La région charnière D

La région D fait le lien entre le DBD et le LBD. Elle est très variable en taille et en séquence selon les récepteurs. Elle est d'une grande flexibilité, laissant le DBD effectuer des rotations à 180°C autour du LBD. Ceci permet au récepteur d'adopter la bonne conformation pour se lier à l'ADN (Aranda et Pascual, 2001 ; Giguère, 1999). Pendant longtemps, c'est le seul rôle qui lui ait été attribué. Ceci était une vue simpliste. Il a été réalisé depuis que la

région D pouvait avoir des fonctions importantes dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires.

Tout d'abord, des sites de phosphorylation sont présents dans cette région pour bon nombre des membres de la superfamille (Knotts et al., 2001). La région D serait donc une cible pour la régulation de l'activité des récepteurs par les voies de signalisation impliquant des kinases. Plus marquant, Wang et ses collaborateurs rapportent qu'un mutant pour le récepteur aux androgènes, délété pour la région D, présente une activité de transactivation constitutive. Ils suggèrent donc la présence d'un élément inhibiteur dans ce domaine. Son action ne passerait pas par des interactions avec des co-répresseurs (Wang et al., 2001). Un tel domaine de répression fort a été caractérisé pour le récepteur orphelin hB1F/hLRH-1 (Xu et al., 2003). Mais il semble que cette fonction inhibitrice ne soit pas commune à toutes les régions charnière des récepteurs nucléaires. En effet, des études menées sur le récepteur à la vitamine D (VDR) et sur les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR) ont montré que la région D entière est requise pour une activation complète du récepteur. Les résidus de la région D seraient dans ces cas nécessaires à l'établissement d'une géométrie spécifique entre le DBD et le LBD. Par contre, les récepteurs aux rétinoïdes X (RXR) peuvent supporter une délétion d'une grande partie de la région D sans subir une perte de leur activité. Ceci pourrait s'expliquer en partie par le fait que les RXRs sont les partenaires de dimérisation communs à de nombreux récepteurs nucléaires (Shaffer et al, 2005). Enfin, PPAR γ 1 s'associe à la kinase ERK5 α au niveau de la région D. Cette interaction permettrait la libération du co-répresseur SMRT au niveau du LBD, conduisant à l'activation complète de PPAR γ 1 (Akaike et al., 2004)

III. 5. Le LBD et la région AF2

L'activité transcriptionnelle de la plupart des récepteurs nucléaires est principalement contrôlée par la liaison de petites molécules liposolubles au niveau de leur LBD. Ce domaine possède la propriété essentielle de reconnaissance du ligand et assure à la fois la spécificité et la sélectivité de la réponse physiologique. C'est un domaine multifonctionnel, car il a également un rôle dans la dimérisation, dans les interactions avec des protéines chaperonnes, ainsi que dans l'activité transcriptionnelle dépendante du ligand (Aranda et Pascual, 2001; Mangelsdorff et al., 1995).

III. 5. A. Structure du LBD

Positionné au niveau COOH terminal des récepteurs nucléaires, le LBD est composé d'environ 225 acides aminés (figure 5) (Mangelsdorff et al., 1995b). Si leur séquence possède un certain degré de variabilité, tous les LBDs possèdent une structure hélicoïdale primaire commune (Wurtz et al., 1996). Ils sont constitués de 12 hélices α nommées H1 à H12. Elles forment une architecture en "sandwich", qui consiste en 3 couches superposées d'hélices α antiparallèles (Moras et al., 1998). Un premier ensemble de trois hélices forme le core du LBD. Il est empaqueté entre deux couches supplémentaires pour former une cavité non polaire et très hydrophobe : la poche de liaison au ligand, ou LBP (Ligand Binding Pocket). Les hélices α H3, H5, H6, et H11 la constituent principalement (Folkerstma et al., 2004). Du fait de la diversité des ligands, la LBP est très variable d'un récepteur nucléaire à l'autre. En effet, la spécificité du LBD pour certains ligands dépend des acides aminés non polaires contenus dans cette poche interne, ainsi que de sa taille. Son volume varie de 0 à plus de 1000 $\text{\AA}^3$ selon les récepteurs. Les plus grandes cavités, comme celle des PPARs, permettent la liaison de ligands variés dans différentes orientations. D'autres récepteurs nucléaires comme Nurr1 ou DHR3 n'ont pas de LBP. Les hélices α sont alors étroitement liées entre elles par des chaînes hydrophobes. Ceci suggère que ces récepteurs ne sont pas régulés de façon conventionnelle par la liaison d'un ligand. Ils auraient donc une activité constitutive et/ou seraient régulés par d'autres mécanismes (Nagy et Schwabe, 2004).

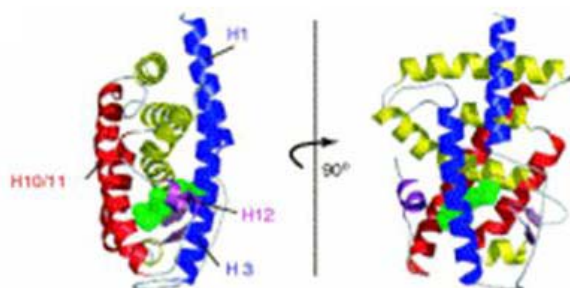


Figure 5 : Représentation 3D du domaine de liaison au ligand (LBD) des récepteurs nucléaires, obtenue par cristallographie aux rayons X (Nagy et Schwabe, 2004).

Le LBD est constitué de trois couches d'hélices- α . Ces trois couches sont indiquées en bleu, rouge et jaune. Ces trois couches forment une cavité non polaire dans laquelle le ligand peut se lier. L'hélice α H12 (mauve) ferme la cavité. La structure représentée ici est celle du récepteur nucléaire RAR γ .

III. 5. B. L'hélice H12 et la région AF-2

Certains LBDs présentent deux conformations : « liés » et « non liés ». Le passage de l'une à l'autre implique un réarrangement majeur des hélices H1 et H12. Mais dans la majorité des cas, les structures des LBDs en absence ou en présence d'un ligand sont similaires. La différence réside dans le fait que la structure du récepteur en absence de ligand est relativement instable. Les mécanismes entrant en jeu sont alors plus subtils et impliquent surtout l'hélice H12. Elle est la gardienne de l'entrée de la LBP, et forme un couvercle amovible sur la cavité. En l'absence de ligand, H12 est particulièrement mobile par rapport au reste du LBD et se trouve dans l'incapacité de s'y associer de manière stable. La liaison d'un agoniste dans la LBP provoque des changements allostériques complexes qui permettent à H12 de se repositionner dans sa conformation active (ou holoforme). Elle s'associe alors avec le reste du LBD pour refermer la cavité autour du ligand. Ces événements ont pour effet de stabiliser de façon significative la structure globale du récepteur, en la rendant plus rigide et plus compacte (Gronemeyer et al., 2004 ; Pissios et al., 2001). Ceci a d'ailleurs été clairement démontré pour PPAR γ (Cronet et al., 2001).

Mais le repositionnement de l'hélice H12 après la liaison du ligand a également un rôle essentiel pour le recrutement de cofacteurs du récepteur. D'une part, il a pour conséquence la dissociation des corépresseurs liés au récepteur (Giguère et al., 1999). D'autre part, H12 contient dans sa région COOH terminale un domaine de transactivation ligand-dépendant très conservé, nommé AF2 (Activation Fonction 2). Lorsque H12 vient se replier contre le reste du LBD, les résidus d'AF2 forment un nouvel interface qui permet des interactions avec des coactivateurs (Folkerstma et al., 2004; Gampe et al., 2000; Giguère et al., 1999). AF2 est majoritairement responsable du recrutement des coactivateurs de la famille p160, comme SRC1 (Stéroïd Receptor Coactivator 1) (Kucera et al., 2002).

L'orientation de l'hélice H12 est donc la conséquence des effets allostériques induits par la structure chimique particulière du ligand spécifique qui se lie au LBD (Gronemeyer et al., 2004). H12 peut ainsi adopter de manière dynamique au moins deux types de positions stables : active et inactive. Liée à un agoniste, elle crée la surface requise pour la liaison de coactivateurs. Un autre positionnement entraîne des changements de distribution de charges et structuraux, et aucune interaction ne peut se faire avec les coactivateurs. De ce fait, les ligands induisant une position inactive de H12 agissent comme des antagonistes du récepteur nucléaire (Kumar et al., 2004 ; Moras et al., 1998).

III. 5. C. Rôle des autres hélices α du LBD

Comme dit précédemment, le LBD constitue également une interface pour la dimérisation du récepteur. Peu de données existent à ce propos, mais il semble que l'hélice α H10 ait un rôle clé dans ce processus. Les hélices H7, H8 et H9 contribueraient à la stabilité du dimère (Moras et al., 1998).

IV. Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires

Comme il l'a été mentionné, les récepteurs nucléaires peuvent former dans le noyau des monomères, des homodimères ou des hétérodimères. Ils se lient alors sur des éléments de réponse situés dans les régions régulatrices de leurs gènes cibles : les HREs (Hormone Response Element). Les mécanismes de reconnaissance de l'ADN permettent aux récepteurs nucléaires de réguler l'expression de ces gènes. Selon les cofacteurs qu'ils recrutent, et/ou l'absence ou la présence d'un ligand, ils peuvent activer ou réprimer la transcription de leurs gènes cibles.

IV. 1. Reconnaissance de l'ADN par les récepteurs nucléaires

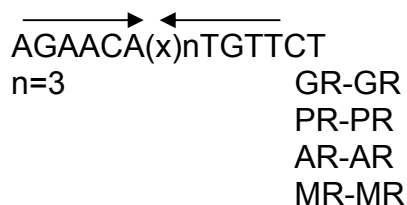
IV. 1. A. Les HREs

Les HREs sont les éléments de réponse aux récepteurs nucléaires. La liaison d'un récepteur nucléaire à son HRE peut moduler la structure et l'activité biologique du récepteur, et par là même influencer le recrutement de protéines corégulatrices au niveau du promoteur des gènes cibles (Kumar et Thompson, 2005).

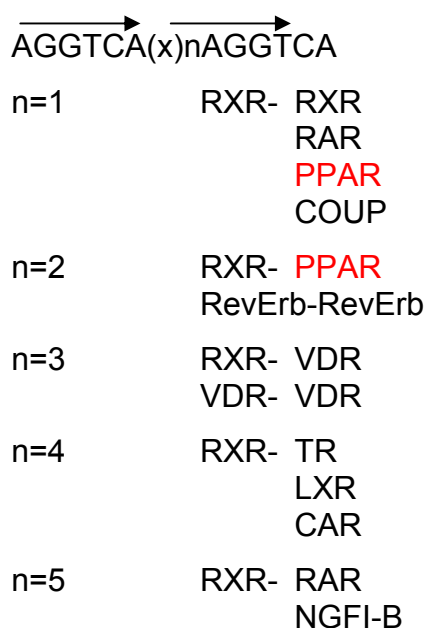
Les HREs sont généralement trouvés relativement près du promoteur, mais dans certains cas ils sont situés dans des régions "enhancer", à plusieurs kilobases en amont du site d'initiation de la transcription (Aranda et Pascual, 2001). Les HREs sont tous dérivés de la séquence canonique 5'- RGGTCA -3' (où R est une base purique). Au cours de l'évolution, les modifications, extensions et duplications de cette séquence ont généré des éléments qui sont sélectifs d'une classe de récepteurs ou d'un récepteur nucléaire donné (Gronemeyer et al., 2004). En fait, un HRE consiste en une ou deux copies de séquences hexamériques, généralement 5'- AGAACA -3' pour les récepteurs de classe I ou 5'- AGGTCA -3' pour les autres récepteurs. La figure 6 indique les exemples de séquences consensus reconnues par certains récepteurs nucléaires.

Avec seulement deux types de séquences consensus pour chaque demi-site pour environ cinquante récepteurs nucléaires chez l'homme, il est surprenant d'assister à une telle spécificité de reconnaissance des gènes cibles. Une diversité additionnelle des HREs réside dans la variation des orientations relatives des demi-sites les uns par rapport aux autres. Des

Répétitions inversées :



Répétitions directes :



Sites monomériques :

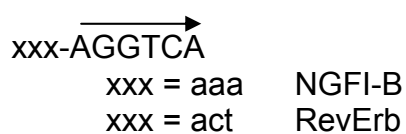


Figure 6 : Les différents éléments de réponse (HREs) auxquels se lient les récepteurs nucléaires.

Les répétitions inversées sont des sites auxquels les récepteurs nucléaires se lient sous forme d'homodimères. Les répétitions directes concernent les hétérodimères avec le récepteur RXR. Le nombre de nucléotides entre les deux demi séquences spécifie le partenaire.

répétitions directes (DR pour Direct Repeat), inversées (IR : Inverted Repeat) ou palindromiques (ER : Everted Repeat) restreignent les espèces de récepteurs nucléaires pouvant se lier aux HREs (figure 6). De plus, l'espace séparant les deux demi-sites varie de un à cinq nucléotides. Par exemple, si un nucléotide sépare deux séquences hexamériques consensus en répétition directe, le HRE est défini comme DR1. Dans ce sens, les DR1, 2, 3, 4, et 5 sont chacune reconnues par des dimères spécifiques de récepteurs nucléaires. Ceci a été nommé "la loi 1-5" (Khorasanizadeh et al., 2001 ; Claessens et al., 2004).

Bien qu'il n'y ait que deux séquences demi-sites dans un HRE, celles-ci ne semblent pas avoir une importance équivalente. Généralement, un demi-site serait très proche de la séquence consensus tandis qu'il est possible que l'autre demi-site diverge considérablement de cette séquence. Mais ce dernier, par son degré de conservation, peut moduler l'affinité du récepteur nucléaire pour le HRE. En fait, les HREs naturels contiennent rarement deux demi-sites consensus parfaits (Giguère 1999 ; Claessens et al., 2004).

IV. 1. B. Importance du DBD et Dimérisation

Comme mentionné précédemment, la P-box, située dans le premier motif en doigt de Zinc du DBD des récepteurs nucléaires, contient les résidus nécessaires à la discrimination des séquences ADN. Une petite partie de la CTE du DBD joue également un rôle important : les CTE agiraient comme des "contrôleurs" moléculaires en empêchant la liaison du récepteur à des HREs avec des espaces entre les demi-sites incorrects. Le second motif en doigt de Zinc du DBD, par contre, sert de surface de dimérisation. Car une propriété importante de nombreux DBDs de récepteurs nucléaires est leur capacité à enclencher la dimérisation en présence de leur HRE. Un premier modèle soutient qu'en absence de liaison à l'ADN, les interactions protéines-protéines entre DBDs ne se font pas car les surfaces de dimérisation potentielle sont trop petites. La dimérisation dépendante de l'ADN ajoute à la spécificité de la reconnaissance des séquences d'une part, et à la diversité des éléments de séquences qui peuvent être reconnus d'autre part. Dans ce cas, le mécanisme proposé est le suivant : le demi-site HRE conservé, proche de la séquence consensus, est reconnu en premier avec une haute affinité. La liaison du premier DBD sur ce demi-site induit un changement conformationnel du récepteur qui forme l'interface de dimérisation. Ceci permet au second récepteur de se lier de façon coopérative à l'autre demi-site du HRE, moins conservé (Claessens et al., 2004).

Mais il semble également que le LBD des récepteurs nucléaires soit important pour la dimérisation, peut-être dans une moindre mesure que le DBD. Un autre modèle en deux étapes a alors été proposé : les récepteurs partenaires formeraient dans un premier temps des hétérodimères en solution via leurs interfaces situés dans le LBD, ce qui rendrait les DBDs capables de reconnaître les HREs et de se lier à l'ADN. Dans ce modèle, les ligands joueraient donc un rôle dans la dimérisation et dans la liaison à l'ADN. De cette manière, ils favoriseraient la liaison d'hétérodimères et non d'homodimères dans certains cas. Dans d'autres, ils augmenteraient l'affinité des récepteurs nucléaires pour leurs HREs (Aranda et Pascual, 2001).

Finalement, ces deux modèles indiquent que le rôle d'un HRE dans la promotion de la dimérisation coopérative est équivalent à celui de la dimérisation pour une liaison à l'ADN efficace (Khorasanizadeh et al., 2001).

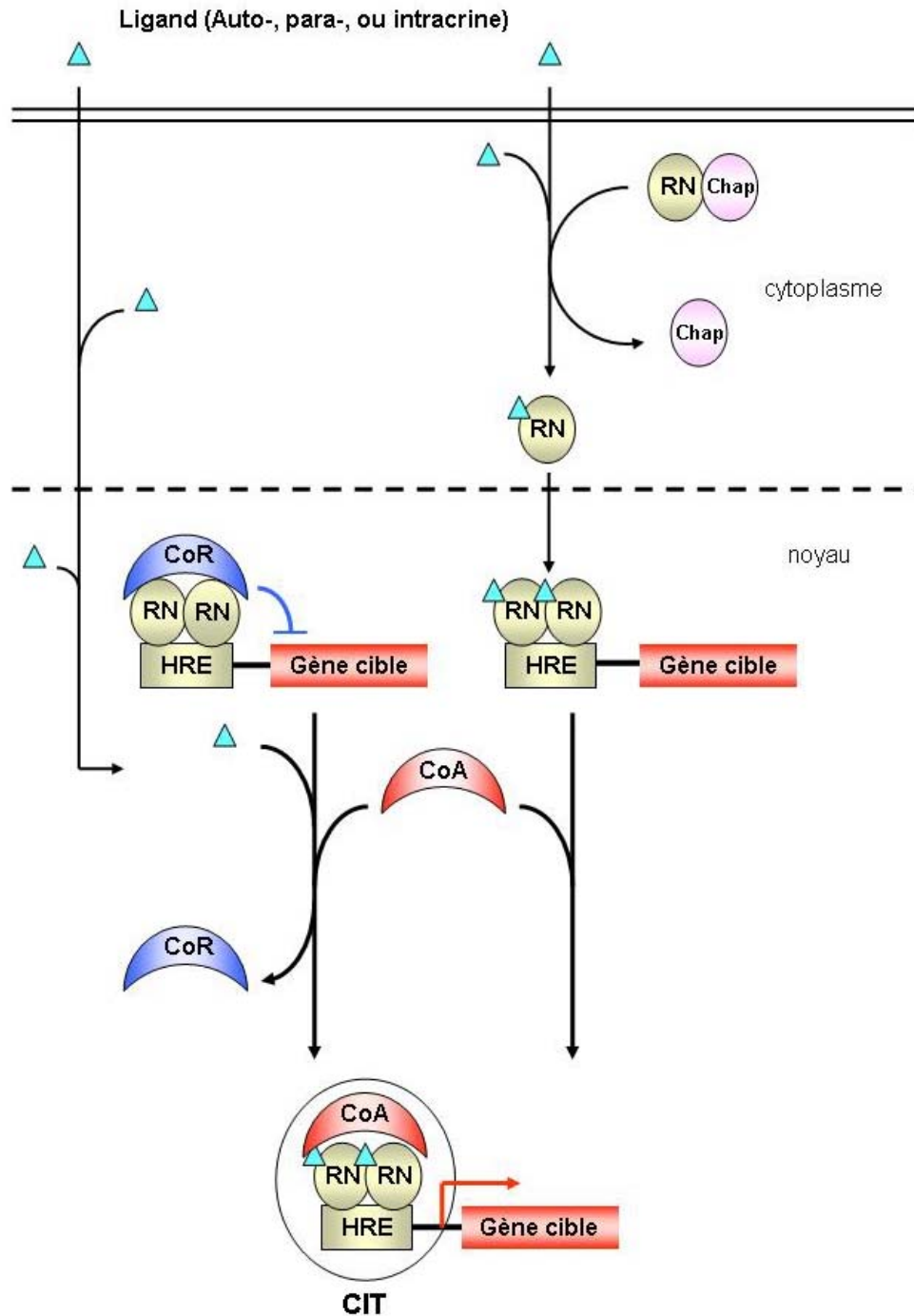


Figure 7 : Activation de la transcription et répression active par les récepteurs nucléaires.

Dans le cas de l'activation transcriptionnelle, la liaison d'un ligand entraîne la dissociation des récepteurs nucléaires (RN) des protéines chaperonnes (Chap) puis leur translocation nucléaire. Dans le noyau, les récepteurs se lient à leurs éléments de réponse (HRE) situés dans les régions promotrices de leurs gènes cibles. A ce niveau ils recrutent des complexes coactivateurs (CoA) qui permettent la formation d'un complexe d'initiation de la transcription (CIT) stable). Dans le cas de la répression active, les récepteurs nucléaires sont présents de façon constitutive dans le noyau, liés à leurs HRE et complexés à des ensembles corépresseurs (CoR), qui inhibent la transcription du gène cible. Dans ce cas, la liaison d'un ligand entraîne la dissociation de ces complexes corépresseurs, le recrutement de complexes coactivateurs et ainsi l'activation de la transcription. Ces deux voies peuvent coexister pour un récepteur nucléaire donné.

IV. 2. Activation de la transcription par les récepteurs nucléaires

Le modèle de base pour l'action des récepteurs nucléaires est souvent représenté par un récepteur cytoplasmique inactif, complexé avec des protéines chaperonnes (figure 7). La liaison d'un ligand (d'origine auto-, para- ou endocrine) induit des changements conformationnels du récepteur qui est alors dissocié de ces protéines. Les motifs de localisation nucléaire sont exposés et le récepteur est transporté au noyau de la cellule. Là il forme des mono-, homo- ou hétérodimères qui se lient sur leurs HREs spécifiques, puis activent la transcription de leurs gènes cibles. Ce modèle est valable pour quelques récepteurs aux hormones stéroïdes, mais une grande partie des récepteurs nucléaires est localisée de façon constitutive dans le noyau des cellules, où ils lient souvent l'ADN en absence de leurs ligands (figure 7) (Giguère, 1999). Certains récepteurs sont donc présents dans le cytoplasme, ont leur trafic nucléaire clairement régi par la liaison de leur ligand, mais sont également présents de façon constitutive dans le noyau (Hager et al., 2005). En fait, le rapport localisation cytoplasmique/localisation nucléaire varie selon les récepteurs et est affecté par la nature et la présence du ligand. La liaison de celui-ci module l'interaction du récepteur nucléaire avec de nombreux facteurs (Gronemeyer et al., 2004).

En effet, une fois complexés et liés à l'ADN sur les HREs, les récepteurs nucléaires interagissent avec des protéines corégulatrices pour moduler la transcription de leurs gènes cibles. Dans le cas de l'activation transcriptionnelle, le but ultime de ces interactions est de permettre la formation d'un complexe d'initiation de la transcription (CIT) stable au niveau du promoteur du gène cible. La liaison des récepteurs nucléaires activés par leur ligand à leur HRE favorise donc dans un premier temps l'assemblage du CIT, par des contacts directs avec des composants de la machinerie transcriptionnelle basale, comme TFIID et TFIIB. D'autre part, les récepteurs activés recrutent des coactivateurs qui favorisent également l'assemblage du CIT par le renforcement des contacts directs avec les composants de la machinerie transcriptionnelle ; mais qui peuvent aussi modifier la structure de la chromatine (déméthylations, acétylations d'histones,...) pour permettre l'action du CIT et de la RNA polymérase II (Alcevedo et Kraus, 2004). Les rôles des coactivateurs des récepteurs nucléaires sont développés plus tard dans ce chapitre.

IV. 3. Répression de la transcription par les récepteurs nucléaires

IV. 3. A. Répression active

Il a été mentionné dans la partie précédente que de nombreux récepteurs nucléaires étaient localisés de façon constitutive dans le noyau des cellules. Il est reconnu qu'en absence de ligand, les récepteurs nucléaires liés à leurs HREs peuvent être des répresseurs forts de l'expression des gènes (Giguère, 1999). Ils recrutent dans ce cas un complexe corépresseur, qui génère un environnement inhibiteur pour la transcription du gène cible (figure 7). Ils sont en effet capables de réprimer les gènes en changeant la structure de la chromatine et son accessibilité. Ceci se fait par le recrutement de corépresseurs, qui recrutent à leur tour des facteurs avec des activités enzymatiques telles que des histones déacétylases. Ces enzymes génèrent une structure condensée de la chromatine, qui résulte en la répression de l'expression du gène (Gronemeyer et al., 2004). De plus, ces complexes corépresseurs agiraient en interférant avec la machinerie transcriptionnelle basale, en empêchant le recrutement des facteurs de transcription et/ou en inhibant l'activité du CIT (Moehren et al., 2004). Cependant, ces mécanismes sont encore mal définis.

La liaison d'un ligand dans ce contexte induit des changements conformationnels des récepteurs nucléaires, qui induisent la libération du complexe corépresseur du promoteur et le recrutement séquentiel de complexes coactivateurs. Ceci a pour conséquence l'initiation de la transcription (figure 7) (Hinojos et al., 2004).

IV. 3. B. Les HREs négatifs

Il existe des HREs dits négatifs (ou nHREs) qui lient le récepteur nucléaire et induisent une régulation négative de l'expression du gène cible suite à la liaison d'un ligand (figure 8). La plupart des nHREs connus lient des hétérodimères à la fois en présence et en absence d'un ligand. Il est généralement décrit que sur ces nHREs le récepteur sans ligand augmente l'expression du gène cible, tandis que le ligand induit l'inhibition de la transcription (Moehren et al., 2004). Les propriétés des nHREs ne sont pas clairement comprises, mais leur localisation semble avoir un rôle. Ils sont généralement très proches des sites d'initiation de la transcription ; certains sont positionnés en aval de la TATA box, voire même

ont une localisation inhabituelle dans les régions 3' non traduites. Ces séquences ont donc des propriétés qui pourraient dépendre de leur position sur les régions régulatrices des gènes (Aranda et Pascual, 2001).

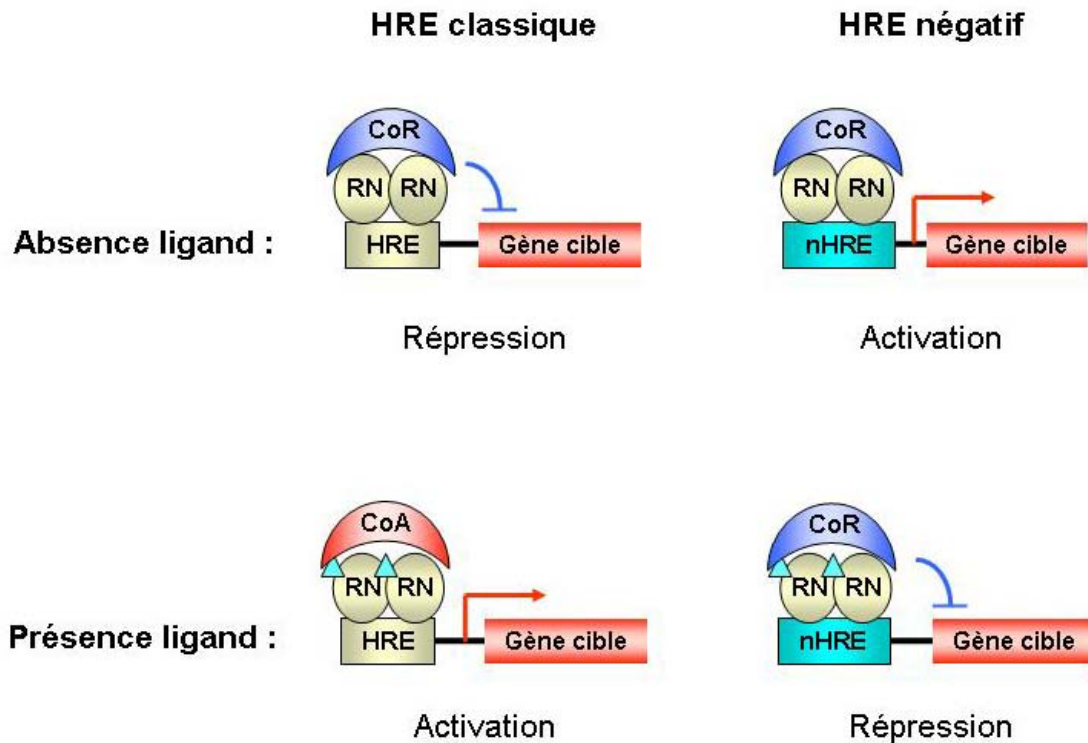


Figure 8 : Liaison des récepteurs nucléaires aux HREs classiques et aux HREs négatifs (d'après Moehren et al., 2004).

En absence de ligand, les récepteurs nucléaires (RN) liés à des HREs classiques recrutent des complexes corépresseurs (CoR) pour réprimer activement la transcription de leurs gènes cibles. A l'inverse, les récepteurs liés à des HREs négatifs (nHRE) recrutent ces mêmes complexes pour l'activation de la transcription du gène cible. La liaison d'un ligand (triangle bleu) aux récepteurs nucléaires liés à un HRE classique induit la dissociation des complexes corépresseurs puis le recrutement de coactivateurs (CoA) et donc l'activation subséquente de la transcription. Sur les HREs négatifs, il a été montré que la liaison du ligand induit la répression de la transcription par le recrutement de complexes de corépresseurs comprenant des histones déacétylases (Moehren et al., 2004).

IV. 3. C. Cross-talk avec les autres voies de signalisation ou trans-répression

Les récepteurs nucléaires peuvent aussi moduler la transcription par des mécanismes indépendants de la liaison aux HREs, qualifiés de *trans*-répression. Ils peuvent altérer l'expression de gènes qui ne contiennent pas de HRE par des interférences avec les activités d'autres facteurs de transcription. Il a ainsi été découvert que de nombreux récepteurs comme les TRs, les RARs, les GRs ou les PPARs peuvent agir sous forme de monomères liés à leurs ligands pour interagir directement avec des facteurs de transcription comme AP-1(Jun/Fos) ou NF- κ B, et inhiber leurs activités transcriptionnelles (figure 9) (Gronemeyer et al., 2004 ; Moehren et al., 2004).

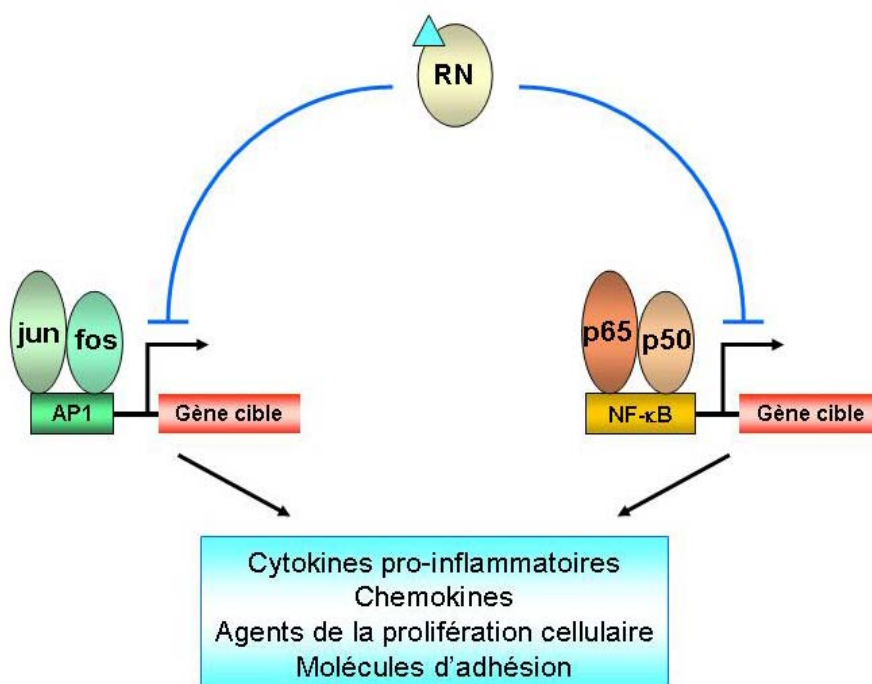


Figure 9 : transrépression des activités AP1 (jun/fos) et NF- κ B par les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires peuvent interférer avec les activités de facteurs de transcription comme AP1 ou NF- κ B. Les récepteurs nucléaires agissent alors sous forme de monomères activés par la liaison d'un ligand. Ce mode de répression se ferait par interaction directe avec les sous-unités de ces facteurs de transcription, ce qui les empêcherait de se lier à leurs éléments de réponse situés dans les régions régulatrices de leurs gènes cibles.

V. Les protéines interagissant avec les récepteurs nucléaires

V. 1. Interactions avec les facteurs de transcription généraux

Dans la partie précédente, il a été décrit que les récepteurs nucléaires peuvent établir des contacts directs avec les composants de la machinerie basale, avec la forme holoenzyme de la RNA polymérase II qui contient entre autres TFIID et TFIIB. TFIID est un complexe constitué des protéines liant la boîte TATA (TBP pour TATA Binding Protein) et un certain nombre de facteurs associés aux TBPs : les TAFs (TBP Associated Factors). Ces derniers sont nécessaires pour l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires. De nombreux TAFs du complexe TFIID et les TBPs établissent des contacts directs avec les récepteurs, ce qui aide au recrutement et/ou à la stabilisation du complexe TFIID au promoteur. TFIID peut également agir de façon synergistique avec d'autres complexes de cofacteurs des récepteurs nucléaires, ce qui stabilise les interactions coactivateurs/récepteur nucléaires (Alcevedo et Kraus, 2004).

V. 2. Interactions avec les protéines corégulatrices

Il a donc été vu que certaines protéines corégulatrices spécifiques interagissent avec les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ces interactions conduisent à la stabilisation de la liaison des récepteurs aux promoteurs de leurs gènes cibles, ainsi qu'à des modifications covalentes d'histones qui facilitent ou inhibent l'arrivée du CIT sur l'ADN. Ces protéines corégulatrices fonctionnent donc en remodelant la chromatine et/ou en agissant comme des molécules adaptatrices entre les récepteurs nucléaires et les composants de la machinerie transcriptionnelle. De nombreuses études ont permis l'identification d'une série de ces protéines. La majorité interagit avec les domaines AF1, AF2 des récepteurs nucléaires, ou les deux (Kumar et al., 2004). Ici, ne seront présentés que les corégulateurs les plus décrits, car il apparaît de plus en plus que de nombreux types de protéines sont capables de réguler la fonction des récepteurs nucléaires. La complexité des modèles transcriptionnels s'accroît rapidement, et la plupart du temps les cas observés sont très spécifiques des récepteurs nucléaires, des facteurs présents, du type cellulaire... (Kumar et al., 2004).

Classe	Exemples	Fonctions
Facteurs associés à la machinerie transcriptionnelle basale :		
TAFs	TAF _{II} 30	Assurent les interactions entre les récepteurs nucléaires et la machinerie transcriptionnelle
Complexes médiateurs	TRAP, DRIP	basale pour favoriser la formation d'un CIT stable au promoteur des gènes cibles
Coactivateurs « ponts » :		
	SRCs, SRA	Favorisent l'assemblage des complexes coactivateurs. Agissent comme des ponts entre les récepteurs nucléaires liés à l'ADN et les autres coactivateurs.
Enzymes modifiant les histones et les facteurs de transcription :		
Acétyltransférases	CBP, p300, pCAF	Induisent des modifications covalentes des histones nucléosomales et des facteurs liés à la transcription pour réguler leurs activités
Méthyltransférases	CARM1, PRMT1	
Kinases	Rsk2, cdk2	
Ligases ubiquitine	UBE3A/E6-AP	
Complexes remodelant la chromatine :		
	SWI/SNF	Modifient les structures des nucléosomes de façon dépendante de l'ATP pour augmenter l'accessibilité à l'ADN
Contrôleurs de l'épissage alternatif		
	PGC1	Stimulent l'expression de gène endogènes contenant des introns

Tableau 2 : classes des coactivateurs des récepteurs nucléaires.

CBP : cAMP response element binding protein Binding Protein ; pCAF : p300/CBP Associated Factor ; TRAP : Thyroid hormone Receptor Associated Protein ; DRIP : vitamin D Receptor Interacting Protein ; CARM1 : Coactivator Associated arginine Methyltransferase 1 ; PGC1 : PPAR γ Coactivator 1 ; PRMT1 : Protein arginine Methyltransferase 1 ; SRC : Steroid Receptor Coactivator ; SRA : Steroid receptor RNA Activator ; UBE3A/E6-AP : Ubiquitin protein ligase 3A/E6 Associated Protein.

V. 2. A. Les co-activateurs

Les co-activateurs constituent un groupe de protéines qui ont pour fonction de favoriser la transcription induite par les récepteurs nucléaires. Ils sont structurellement et fonctionnellement très variés, mais ils partagent quelques propriétés communes.

Ainsi, les co-activateurs interagissent directement ou indirectement avec les récepteurs nucléaires, typiquement en présence d'un ligand agoniste. Ils peuvent également interagir avec les facteurs de transcription généraux comme TBP, TFIIB, la RNA polymérase II. Ils ne possèdent généralement pas d'activité de liaison à l'ADN (Alcevedo et Kraus, 2004). Ils possèdent pour la plupart un domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires. Celui-ci est conservé, et consiste en la répétition de trois motifs LxxLL (où L est une Leucine et x un acide aminé quelconque) (Smith et O'Mallet, 2004). Le tableau 2 indique des exemples de coactivateurs ainsi que leurs fonctions. Il montre que ceux-ci peuvent par exemple servir d'adaptateurs entre le récepteur nucléaire et la machinerie transcriptionnelle, comme le complexe TRAP/DRIP (cf tableau pour les désignations). Cependant, beaucoup de coactivateurs présentent des activités enzymatiques qui favorisent la transcription en remodelant la chromatine. Les familles SRC et CBP/p300 possèdent des activités acétyltransférases. Leur expression est ubiquitaire chez l'homme. CARM1 et PRMT1 agissent comme des méthyltransférases. Le complexe SWI/SNF augmente l'accessibilité des autres facteurs de transcription et de la RNA polymérase II au promoteur par une activité de remodelage de la chromatine dépendante de l'ATP. Certains, comme PGC1, serviraient de lien entre les récepteurs nucléaires et le programme transcriptionnel en contrôlant l'épissage alternatif des gènes cibles des récepteurs nucléaires. PGC1 a été identifié à l'origine comme co-activateur du récepteur PPAR γ . Des travaux ont révélé qu'il possédait un motif de reconnaissance de facteurs d'épissage qui lui permettait de stimuler l'expression de gènes endogènes contenant des introns (Lonard et O'Mallet, 2005).

V. 2. B. Les corépresseurs

Bien qu'il existe beaucoup moins de corépresseurs décrits pour les récepteurs nucléaires, il est établi qu'ils jouent un rôle important dans la régulation négative de l'expression des gènes cibles de ceux-ci. Les corépresseurs ne lient pas l'ADN et ils auraient pour la plupart un domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires correspondant au motif LxxxIxxx(I/L) (Nagy et Schwabe, 2004). Tous les corépresseurs connus pour les récepteurs nucléaires sont associés à des protéines possédant des activités histone déacétylase (HDAC), qui donnent à la chromatine une structure condensée et donc moins accessible. Mais les corépresseurs peuvent être classés selon leur mode d'interaction avec les récepteurs nucléaires. Les corépresseurs identifiés les mieux connus sont SMRT (Silencing Mediator for Retinoic acid receptor and Thyroid hormone receptor) et NcoR (Nuclear receptor corepressor). Ils lient les domaines AF2 des TRs, RARs ainsi que de nombreux autres récepteurs nucléaires, uniquement en l'absence de ligand (Smith et O'Mallet, 2004). D'autres corépresseurs moins bien décrits interagissent avec les récepteurs en l'absence de ligand : Alien pour les TRs et VDR ; ou Hr (Hairless) pour les TRs. Certains peuvent établir des contacts de façon constitutive avec les récepteurs, en absence ou en présence de ligand. Il s'agit par exemple de PSF pour les TRs et RXRs ; ou de SUN-CoR pour de nombreux récepteurs. Enfin, il existe des corépresseurs qui interagissent uniquement avec les récepteurs liés à leur agoniste. Ceux-ci peuvent entrer en compétition avec des coactivateurs comme SRC1 pour la liaison aux récepteurs nucléaires. Il s'agit de RIP140 (Receptor Interacting Protein 140) pour le GR, RAR/RXR ou les PPARs ; ou LcoR pour le VDR (Moehren et al., 2004).

VI. Modifications post-traductionnelles des récepteurs nucléaires

La réponse aux récepteurs nucléaires est intégrée dans la signalisation intracellulaire, avec des voies de transduction du signal qui interagissent entre elles. Ainsi, des signaux extracellulaires sont transmis aux facteurs de transcription nucléaires via des récepteurs membranaires et des cascades d'activation de protéines kinases. Ces différents mécanismes permettent aux récepteurs nucléaires de moduler de nombreuses réponses spécifiques dans une grande variété de types cellulaires. Leurs effets particuliers dépendent alors du contexte physiologique, cellulaire et génétique. Les récepteurs nucléaires sont donc les cibles pour des modifications post-traductionnelles, qui peuvent soit réguler leurs interactions avec leur cofacteurs, soit moduler leur activité transcriptionnelle, soit affecter leur distribution entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire (Novac et Heinzel, 2004).

Les deux formes principales de régulation post-traductionnelle des récepteurs nucléaires sont la phosphorylation et l'ubiquitinylation entraînant la dégradation par la voie du protéasome.

VI. 1. La phosphorylation

Les changements environnementaux et les signaux extracellulaires modifient l'état de phosphorylation des protéines cellulaires. La phosphorylation des récepteurs nucléaires est un déterminant majeur de leur activité transcriptionnelle. Elle peut affecter les domaines majeurs de ceux-ci, comme la région AF-1, le LBD ou le DBD. Les acteurs de cette phosphorylation peuvent être des kinases associées avec les facteurs de transcription de la machinerie transcriptionnelle de base, comme par exemple CDK7 qui fait partie du complexe TFIIH. Ce sont également des kinases activées en réponse à des signaux transmis par les MAPKs (Mitogen-activated Protein Kinases), les protéines kinases A (PKA) ou C (PKC) (Gronemeyer et al., 2004).

La phosphorylation facilite souvent le recrutement de coactivateurs ou de composants de la machinerie transcriptionnelle basale. Dans ce cas elle coopère avec le ligand pour favoriser l'activation de la transcription, notamment en intervenant dans le recrutement des cofacteurs des récepteurs nucléaires. Par exemple, la phosphorylation de TR β 1 ou ER α sur

des résidus sérines spécifiques induit la dissociation du corépresseur SMRT et favorise la liaison du coactivateur SRA (Novac et Heinzl, 2004).

Mais la phosphorylation peut à l'inverse agir négativement sur la réponse transcriptionnelle, par exemple en diminuant l'affinité du récepteur pour son ligand, en induisant des changements conformationnels au niveau du LBD.

VI. 2. L'ubiquitinylation

Dans certains cas, la phosphorylation peut aussi contribuer à l'achèvement de la réponse au ligand en induisant la dissociation du récepteur nucléaire de l'ADN puis sa dégradation par la voie du protéasome. Des données récentes démontrent que le système ubiquitine-protéasome affecte l'activité de nombreux récepteurs nucléaires. Cette voie de dégradation est impliquée dans la régulation de beaucoup de protéines impliquées dans les fonctions cellulaires essentielles comme le contrôle du cycle cellulaire, la régulation de la transcription et la transduction du signal. Les protéines dégradées par cette voie sont dans un premier temps modifiées de façon covalente par la fixation sur des résidus lysines de molécules d'ubiquitine, qui est rapidement suivie par la reconnaissance et la dégradation de la protéine par le protéasome 26S (Blanquart et al., 2003).

Pour les récepteurs nucléaires, la phosphorylation et la dégradation semblent couplées à la transactivation. Par exemple, la phosphorylation du PR par les MAPK couple l'activité transcriptionnelle du récepteur à sa dégradation dépendante du ligand (Kinyamu et al., 2005). Souvent, les actions du protéasome sont requises pour une activité transcriptionnelle maximale des récepteurs nucléaires, ce qui permettrait un "nettoyage" rapide du site de transcription en prévision d'une nouvelle réponse transcriptionnelle à venir (Alcevedo et Kraus, 2004).

Chapitre II

Les PPARs

Parmi la superfamille des récepteurs nucléaires, le sous-groupe des PPARs suscite énormément d'intérêt depuis leur découverte il y a un peu plus de dix ans. Identifiés dans les années 1990 chez les rongeurs (Issemann et Greene, 1990), le xénope, et chez l'homme, ils furent initialement décrits comme les récepteurs nucléaires qui induisaient la prolifération des peroxisomes chez les rongeurs, d'où leur nom. A ce jour, trois isotypes ont été identifiés : PPAR α , PPAR β/δ , et PPAR γ . Ils sont très proches d'un point de vue structurel et fonctionnel. Mais chacun possède des caractéristiques physiologiques distinctes. Ils sont exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme, mais présentent des patrons d'expression qui leur sont propres.

Activés par la liaison d'un ligand, ils forment des hétérodimères avec les RXRs et se lient à des HREs nommés PPREs (PPAR Response Elements). Leurs ligands sont très diversifiés, il s'agit surtout de prostaglandines et d'acides gras, qui en les activant initient la transcription d'une grande variété de gènes impliqués dans l'homéostasie énergétique. Il a d'ailleurs été montré que les PPARs sont des "sensors" essentiels des niveaux cellulaires en acides gras et dérivés. La famille des PPARs joue donc un rôle central dans la régulation du stockage et du catabolisme des acides gras apportés par l'alimentation. Leur implication dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines est donc établie, mais ne s'arrête pas là. En effet, il a aussi été montré que les PPARs jouent un rôle dans l'homéostasie du glucose, le contrôle de la réponse inflammatoire, mais également dans la prolifération et la différenciation cellulaires, l'apoptose, et de par ces mécanismes dans la cancérogenèse. Les PPARs constituent donc des cibles thérapeutiques potentielles très intéressantes pour de nombreuses pathologies comme le diabète, l'obésité, l'athérosclérose, et de nombreux cancers, dans lesquelles leur rôle a été démontré. A ceci s'ajoute le fait que ces récepteurs sont activés directement par des composés déjà utilisés en clinique pour le traitement de certaines maladies. Il s'agit de la classe des fibrates pour PPAR α , qui sont des substances hypolipémiantes ; et des thiazolidinediones pour PPAR γ , qui agissent comme des sensibilisateurs à l'insuline et sont utilisés pour le traitement du diabète de type II. De nombreuses études sont donc menées pour comprendre les liens moléculaires existant entre les PPARs et les pathologies dans lesquelles ils sont impliqués, par la détermination de leurs mécanismes d'action, de leurs gènes cibles, mais aussi de leurs cofacteurs.

Nos recherches au laboratoire ont porté essentiellement sur PPAR γ . Les caractéristiques de celui-ci sont donc développées préférentiellement, comparativement aux deux autres isotypes, dans ce chapitre.

I. Les différents PPARs : aspects moléculaires

En 1990, Issemann et Greene rapportèrent le clonage et la caractérisation d'un nouveau récepteur nucléaire murin, qui était activé par une gamme de proliférateurs des peroxisomes (Issemann and Greene, 1990). Ce nouveau récepteur fut alors nommé PPAR (pour Peroxisome Proliferator Activated Receptor). Il est maintenant référencé sous le nom de PPAR α . Deux ans plus tard, le laboratoire de Wahli annonça le clonage de l'orthologue de PPAR α chez le xénope (*Xenopus laevis*) (Dreyer et al., 1992). Comme le récepteur murin, celui-ci était activé par des concentrations de l'ordre du micromolaire de proliférateurs des peroxisomes. Le groupe Wahli clona également deux autres récepteurs nucléaires orphelins étroitement reliés à PPAR α , mais codés par des gènes distincts. Ils furent désignés PPAR β et PPAR γ . Par la suite, de nombreux groupes clonèrent les orthologues de PPAR β et PPAR γ chez les mammifères, y compris chez l'homme. PPAR α et PPAR γ sont très conservés selon les espèces, mais le troisième sous-type PPAR diverge considérablement du xénope aux mammifères. Le clone caractérisé chez le rongeur a été désigné PPAR δ à cause de cette divergence (Kliwer et al., 1994). Cependant, le clonage récent du gène codant pour PPAR β chez le poulet a permis de construire un arbre phylogénétique, dans lequel il apparaît que les gènes codant pour PPAR β chez le xénope et pour PPAR δ chez les mammifères sont en fait des orthologues divergeant (Takada et al., 2000).

I. 1. Localisation chromosomique et organisation génomique des gènes PPAR

La localisation chromosomique des gènes codant pour les PPARs a été définie chez l'homme. *hPPAR α* a été cartographié sur le chromosome 22, en région 22q12-q13.1 (Sher et al., 1993). Le gène *hPPAR γ* est localisé sur le chromosome 3, en position 3p25 (Greene et al., 1995 ; Beamer et al., 1997). Enfin, le gène *hPPAR δ* est situé sur le chromosome 6, en 6p21.1-p21.2 (Yoshikawa et al., 1996).

Les gènes *PPAR* qui ont été caractérisés à ce jour chez l'homme révèlent une organisation commune de leur région codante en 6 exons (figure 10). Le premier code pour la région modulatrice A/B, les deux suivants codent pour le DBD - un pour chaque motif en doigt de zinc-, un exon code pour la région charnière, et les deux derniers codent pour le LBD (Desvergne et Wahli, 1999).

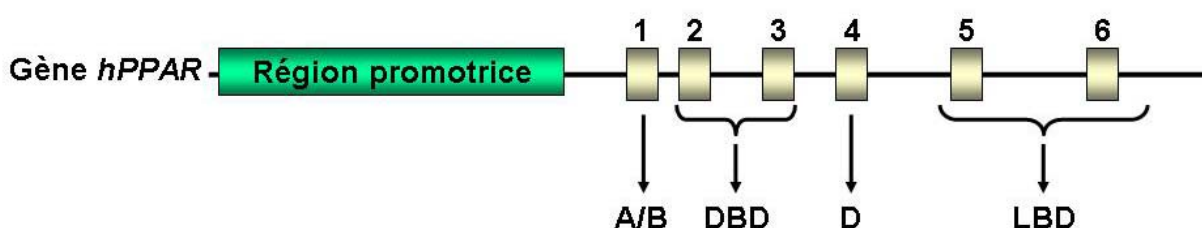


Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation des gènes codant pour les PPARs chez l'homme.

I. 2. Les variants PPAR γ

Le gène *PPAR γ* chez l'homme contient 9 exons et s'étend sur plus de 100 kilobases d'ADN génomique (figure 11). En s'intéressant à sa structure, des équipes ont montré que ce gène pouvait produire trois transcrits différents par épissage alternatif (Elbrecht et al., 1996 ; Fajas et al., 1997 ; Fajas et al., 1998). Les trois isoformes produits ont été nommés PPAR γ 1, 2, et 3. La figure 11 illustre la structure du gène *PPAR γ* et de ses trois transcrits. Les trois ARNm produits ont les six exons codants, 1 à 6, en commun. Mais ils diffèrent par leurs extrémités 5'. Ainsi, l'ARNm codant pour PPAR γ 1 comprend huit exons : A1 et A2, non codants, en amont des six derniers. PPAR γ 2 est codé par sept exons, dont B, qui contient un codon d'initiation de la transcription et est traduit. Au niveau protéique, ces deux transcrits

conduisent à la production de deux protéines différentes, PPAR γ 2 contenant 28 acides aminés supplémentaires que PPAR γ 1 (figure 12). Un troisième ARNm, PPAR γ 3, est sous le contrôle d'un autre promoteur alternatif localisé dans la région flanquant l'exon A2. Il produit une protéine identique à PPAR γ 1. Les mécanismes responsables du contrôle de ces épissages alternatifs sont encore mal connus, et la signification physiologique de l'existence de deux protéines différentes est obscure. Cependant, comme il le sera décrit plus tard, il existe une distribution tissu-spécifique de l'expression de ces trois variants.

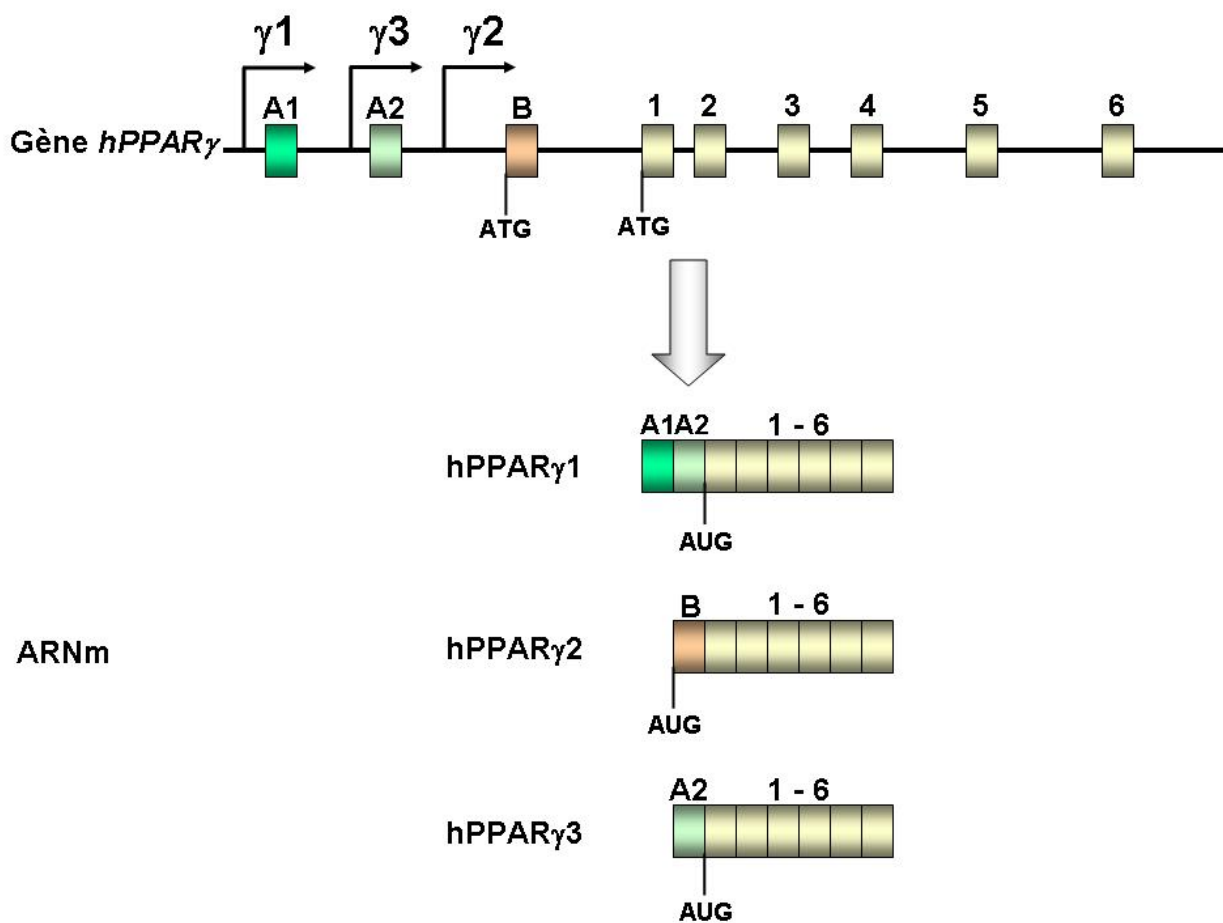


Figure 11 : Représentation schématique du gène codant pour PPAR γ chez l'homme et de ses trois principaux variants d'épissage.

II. Les protéines PPARs : distribution tissulaire

Les trois sous-types PPARs possèdent les propriétés structurales et fonctionnelles communes aux récepteurs nucléaires (cf première partie). Ils possèdent donc un DBD, fortement conservé. Par contre, le LBD des PPARs a un niveau de conservation moins élevé. La figure 12 représente les identités des séquences peptidiques des PPARs. Les trois isoformes possèdent des patrons d'expression distincts dans les tissus humains.

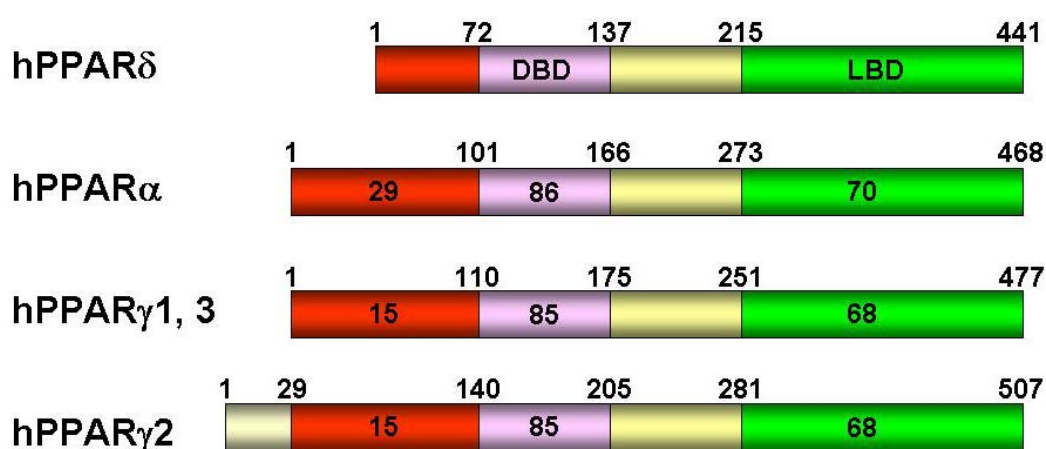


Figure 12 : Représentation schématique des protéines PPARs (d'après Rosen et Spiegelman, 2001).

Les chiffres au-dessus des barres indiquent la position des acides aminés délimitant chaque domaine. Les chiffres à l'intérieur des barres représentent les pourcentages d'identité d'un isotype PPAR à l'autre. La région A/B (en rouge) est la plus variable d'un PPAR à l'autre. Le DBD (Mauve) et le LBD (vert) sont plus conservés. PPAR γ 2 contient dans sa région N terminale 28 acides aminés additionnels par rapport aux autres variants PPAR γ . Les transcrits PPAR γ 1 et PPAR γ 3 donnent la même protéine.

Les informations sur les différents patrons d'expression des PPARs sont une première étape pour comprendre la signification biologique de l'existence des trois isotypes, et des isoformes de PPAR γ . Les PPARs sont souvent co-exprimés dans des tissus aussi bien d'origine ectodermique, mésodermique ou endodermique chez l'embryon. Mais leurs niveaux relatifs peuvent varier considérablement d'un type cellulaire à l'autre (Desvergne et Wahli, 1999).

II. 1. Expression de PPAR α chez l'homme

PPAR α est hautement exprimé dans le foie, le cœur, le cortex rénal (Guan et al., 1997), et le muscle squelettique (Ferré, 2004). Il est également retrouvé dans l'endothélium vasculaire, ainsi que dans les monocytes/macrophages, les lymphocytes T (Marx et al., 2004), et les entérocytes situés au sommet des villosités de l'intestin grêle (Desvergne et Wahli, 1999).

D'un point de vue quantitatif, le muscle squelettique est le site majeur de l'oxydation des acides gras au repos et pendant l'exercice. Le muscle cardiaque repose lui aussi principalement sur ce processus comme source d'énergie (Desvergne et al., 2004). En résumé, l'expression de PPAR α corrèlerait avec ses activités mitochondriales et de β -oxydation peroxisomale.

II. 2. Expression de PPAR δ chez l'homme

PPAR δ semble être exprimé de façon ubiquitaire chez l'homme, à des niveaux généralement supérieurs à ceux des deux autres isotypes (Vanden Heuvel, 1999), sauf dans le tissu adipeux (Youssef et Badr, 2004). En effet, PPAR δ a été retrouvé dans tous les tissus testés. Il est présent dans le foie, l'intestin, les reins, le tissu adipeux abdominal, le muscle squelettique ; autant de tissus qui sont impliqués dans divers aspects du métabolisme lipidique (Willson et al., 2000).

II. 3. Expression de PPAR γ chez l'homme

Les deux tissus exprimant les plus hauts niveaux de PPAR γ sont le tissu adipeux et le colon, qui en présentent des taux comparables (Dubuquoy et al., 1999). Des niveaux intermédiaires de PPAR γ sont retrouvés dans les reins, le foie, le cœur, l'intestin grêle (Guan et al., 1997 ; Vidal-Puig et al., 1997), la prostate (Mueller et al., 2000), les macrophages (Willson et al., 2000). Enfin, de faibles quantités de PPAR γ sont détectées dans le muscle squelettique (Fajas et al., 1997). La figure 13 illustre les niveaux relatifs de PPAR γ dans certains tissus chez l'homme.

Mais la distribution tissulaire des différents isoformes de PPAR γ est hétérogène (Dubuquoy et al., 1999). PPAR γ 1 est toujours majoritaire par rapport à PPAR γ 2. Ce dernier est surtout exprimé dans le tissu adipeux, où il représente 20% des ARNms PPAR γ totaux. Mais le rapport PPAR γ 1/PPAR γ 2 peut varier d'un individu à l'autre (Mukherjee et al., 1997 ; Yanase et al., 1997). PPAR γ 3 est retrouvé seulement dans le tissu adipeux, le colon et les macrophages (Willson et al., 2000). Son expression serait d'ailleurs prédominante relativement aux autres isoformes dans les macrophages (Ricote et al., 1998).

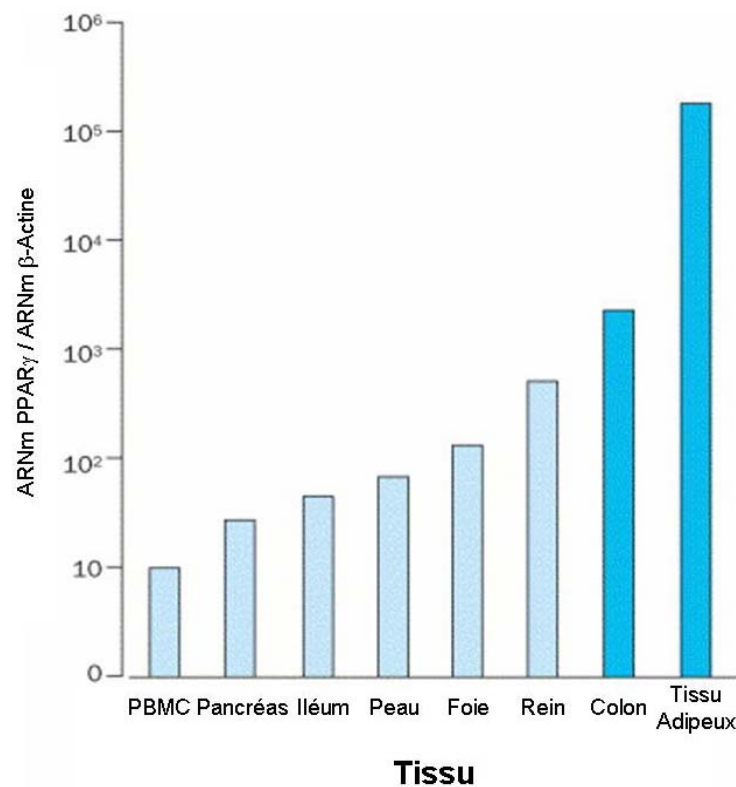


Figure 13 : Distribution tissulaire des ARNms de PPAR γ chez l'homme. Analyse en PCR, résultats normalisés avec la β -actine (Dubuquoy et al., 1999).

Le colon est la deuxième source de PPAR γ chez l'homme après le tissu adipeux. (PBMC : Peripheric Blood Mononucleated Cells)

II. 3. A. Expression de PPAR γ dans le colon humain

Le colon est le second site majeur d'expression de PPAR γ après le tissu adipeux. Les plus hauts niveaux d'expression sont trouvés dans les cellules épithéliales coliques différenciées, post-mitotiques, qui font face à la lumière du tube digestif. Les cellules moins différenciées qui se situent au fond des cryptes coliques expriment de faibles taux de PPAR γ . Il a été montré aussi que les niveaux de PPAR γ augmentaient du segment colique proximal vers le segment distal (Lefebvre et al., 1999). PPAR γ 1 est l'isoforme qui prédomine largement dans le colon. En effet, PPAR γ 2 n'est pas détecté dans la muqueuse colique (Gupta et al., 2002). PPAR γ 3 est également présent dans le colon, mais il existe peu de données précises à ce sujet.

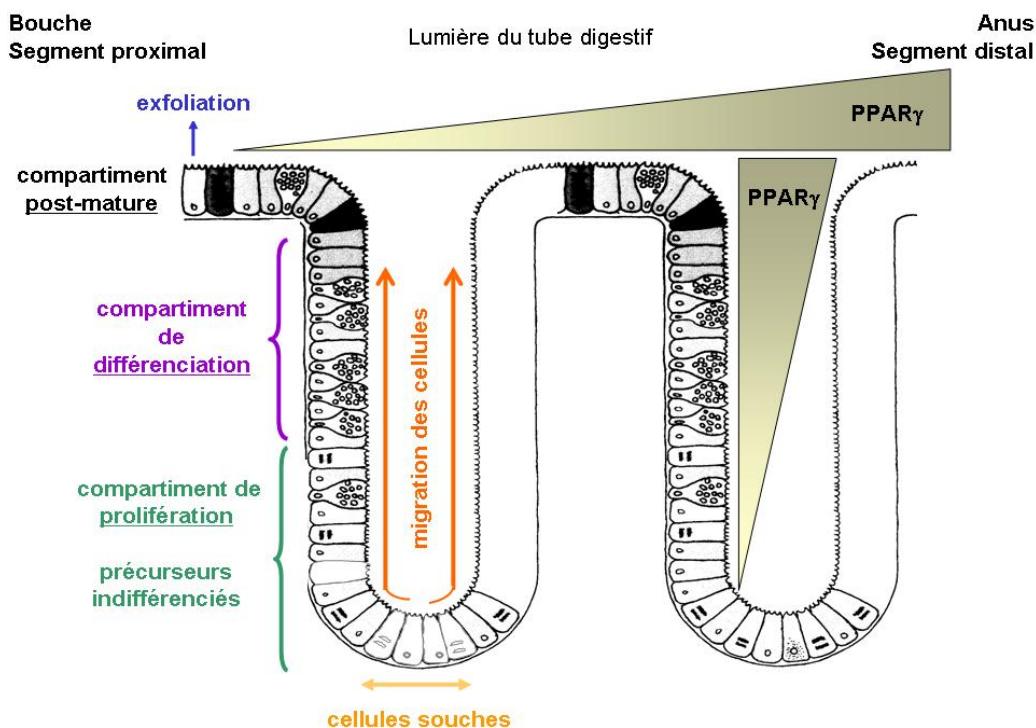


Figure 14 : Schéma d'une villosité colique, expression de PPAR γ dans les cellules épithéliales intestinales.

L'expression de PPAR γ suivrait un gradient croissant le long du tube digestif, et serait la plus élevée dans le segment colique distal. PPAR γ est également plus exprimé dans les cellules épithéliales coliques différenciées, situées dans le compartiment post-mature.

III. Les ligands des PPARs

L'une des raisons expliquant l'engouement actuel pour les PPARs réside dans leurs propriétés de liaison aux ligands, qui par leurs particularités en font des cibles thérapeutiques intéressantes. Les PPARs sont en fait passés du statut de récepteurs orphelins à celui d'hôtes capables d'interagir spécifiquement avec plusieurs ligands, de conformation et de taille variées. Les ligands naturels identifiés pour les PPARs sont les acides gras insaturés. Au moins une partie de l'activité transcriptionnelle dépendante des PPARs est le résultat de leur interaction directe avec ces molécules. Ces acides gras lient les trois isotypes PPARs, mais PPAR α présente la plus haute affinité pour ceux-ci, à un niveau correspondant aux concentrations circulantes dans le sang. Les acides gras saturés sont de moins bons ligands pour les PPARs en général (Desvergne et Wahli, 1999).

Les eicosanoïdes sont une classe d'acides gras principalement dérivés de l'acide arachidonique, soit par la voie des lipoxygénases (LOXs) qui mène à la formation des leucotriènes (LTs) et des acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs) ; soit par la voie des cyclooxygénases (COXs) qui produit des prostaglandines (PGs). De nombreux eicosanoïdes sont des activateurs endogènes des différents PPARs, et certains sont des ligands établis.

III. 1. Particularités du LBD des PPARs

Par cristallographie aux rayons X, il apparaît que les apoformes, c'est à dire les formes non liées, des LBD de PPAR γ et PPAR δ ont des structures très similaires à celles des autres récepteurs nucléaires. Cependant, les LBDs des PPARs présentent quelques particularités.

Pour les PPARs, l'absence de ligand ne permet pas au LBD d'adopter une structure stable. Le ligand agit donc comme un squelette, qui stabilise le corps du LBD et lui permet d'interagir avec des cofacteurs (Cronet et al., 2001). Le domaine d'activation AF2 est positionné vis à vis de la LBP dans une conformation similaire en absence ou en présence de ligand. Ensuite, L'hélice α H12 ne se place pas de la même façon chez les PPARs que chez les autres récepteurs nucléaires. De plus, Il existe dans le LBD des PPARs une hélice α supplémentaire, H2', placée juste avant H3. Tous ces éléments fournissent au final un accès plus facile des ligands à la LBP hydrophobe. Ils contribuent également à lui donner sa taille exceptionnelle, d'environ 1300 Å³. Le ligand n'y occupe en général que 30 à 40% du volume

final. Ainsi, la LBP des PPARs est la plus grande et la plus accessible des récepteurs nucléaires. Ajouté à ceci, seuls quelques résidus hydrophobes au sein de la cavité sont des éléments clés pour les interactions avec les ligands. Ceux-ci peuvent donc développer un grand nombre d'interactions non spécifiques dans la LBP, et adopter plusieurs conformations. Des activités fonctionnelles différentes d'un même ligand pourraient donc être le reflet de ses différentes conformations de liaison dans la cavité (Xu et al, 1999). Pour conclure, la souplesse des interactions avec les ligands et l'accès facilité à la LBP suggèrent que les PPARs auraient évolué pour se lier à de multiples ligands naturels avec des affinités peu élevées (Desvergne et Wahli, 1999).

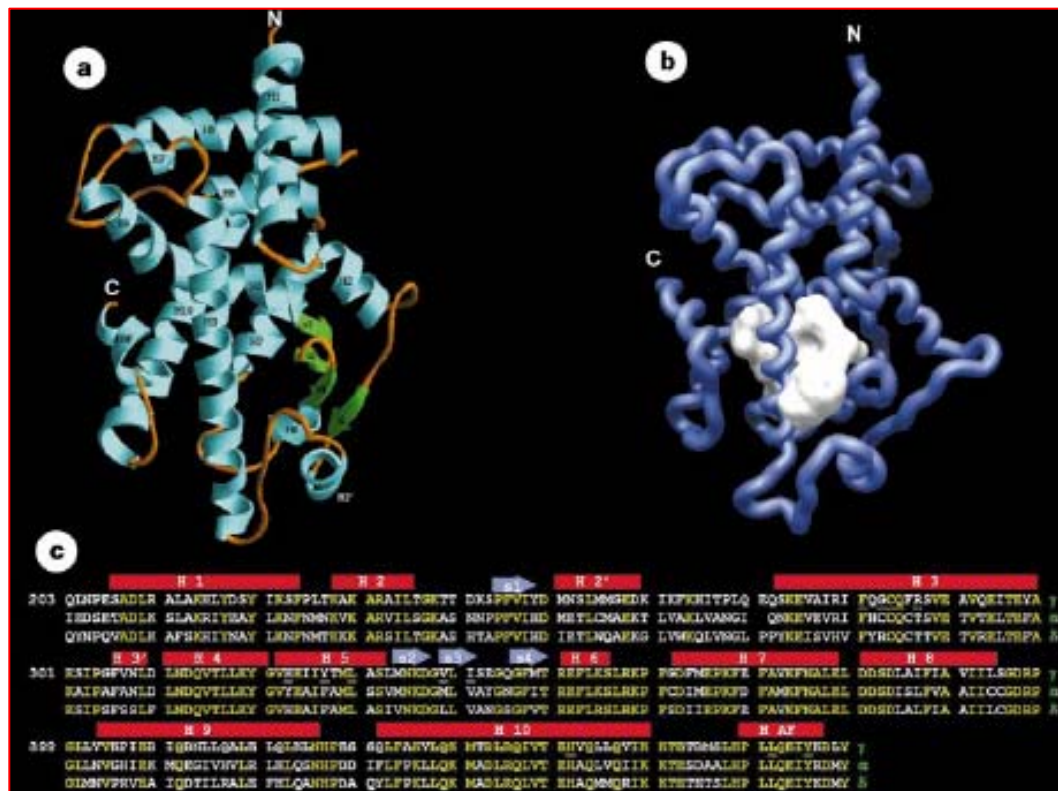


Figure 15 : Représentation 3D par cristallographie aux rayons X du domaine de liaison au ligand de PPARγ (d'après Nolte et al., 1998).

(a) : Forme non liée au ligand ou apo-forme. (b) : Forme liée au ligand (en blanc) ou holo-forme. (c) : Séquence peptidique

III. 2. Les ligands de PPAR α

III. 2. A. Ligands naturels

PPAR α lie une grande diversité d'acides gras insaturés, dont l'acide linoléïque ou l'acide arachidonique. Outre ces composés, il a été montré que PPAR α est capable de lier l'eicosanoïde 8-(S)-HETE, associé à l'inflammation induite par les esters de phorbol. Le leucotriène B4 (LTB4), un médiateur chimiotactique de l'inflammation, lie aussi PPAR α . Il est important de noter que la constante de dissociation (K_d) de PPAR α pour tous ces ligands naturels endogènes se situe entre 2 et 50 $\mu\text{mol/L}$. Ceci représente une affinité moindre comparée à celles des autres récepteurs nucléaires pour leurs ligands. Cependant il a été établi que PPAR α interagit directement avec ces molécules. La faible affinité du récepteur pour celles-ci s'expliquerait donc par la grande taille de sa LBP, qui permet la liaison de substrats dérivés de lipides très variés (Ferré, 2004).

III. 2. B. Ligands synthétiques

Les ligands synthétiques identifiés pour PPAR α sont des molécules de la famille des fibrates (gemfibrozil, fenofibrate, bezafibrate...). Cette classe de drogues est largement prescrite dans les pays occidentaux pour le traitement des maladies cardiovasculaires associées à une augmentation des taux de triglycérides dans le sang. En plus de leur effet hypolipidémiant, les fibrates augmentent les concentrations en lipoprotéines de haute densité (HDL pour High Density Lipoprotein) et diminuent celles des lipoprotéines de basse densité (LDL pour Low Density Lipoprotein). Il a été établi que les fibrates exercent leurs effets thérapeutiques en se liant directement à PPAR α (Kliwer et al., 2001).

III. 3. Les ligands de PPAR δ

PPAR δ est aussi un récepteur pour les acides gras naturels. Il lie aussi bien les acides gras saturés que les acides gras insaturés. Parmi ceux-ci, les acides gras polyinsaturés comme l'acide dihomog γ -linoléique ou l'acide arachidonique ont une bonne affinité pour PPAR δ et l'active à des concentrations de l'ordre du micromolaire. De nombreux eicosanoïdes activent également le récepteur, comme PGA1 et PGD2

Contrairement aux deux autres isoformes PPARs, aucune drogue pouvant servir de ligand synthétique efficace n'a été identifiée pour PPAR δ . Les affinités des ligands publiés sont généralement faibles et/ou peu sélectives de PPAR δ par rapport aux autres PPARs (Willson et al., 2000 ; Kliewer et al., 2001).

III. 4. Les ligands de PPAR γ

III. 4. A. Ligands naturels

Parmi les ligands naturels de PPAR γ se trouvent de nombreux acides gras et des dérivés d'eicosanoïdes qui lient et activent le récepteur à des concentrations de l'ordre du micromolaire. PPAR γ a une préférence affichée pour les acides gras polyinsaturés comme les acides oléique, linoléique, eicosapentaénoïque, et arachidonique. Tous lient et activent le récepteur à des concentrations équivalentes à celles trouvées dans le sérum humain, de l'ordre du micromolaire. Mais il n'est pas clairement établi que de telles concentrations soient retrouvées dans la cellule. En fait, les acides gras ne sont pas particulièrement des activateurs efficaces de PPAR γ , et il a été démontré que la conversion intracellulaire de ceux-ci en eicosanoïdes par la voie de la 15-LOX conduisait à une meilleure activation de PPAR γ . Les métabolites de l'acide linoléique par la 15-LOX, 9-HODE et 13-HODE (acides hydroxyoctadécaénoïques) sont des agonistes efficaces de PPAR γ . Ainsi la conversion métabolique des acides gras polyinsaturés dans les cellules fournirait un niveau supplémentaire de la régulation hormonale de PPAR γ . Les prostaglandines (PG) dérivées de PGD2 ont également été identifiées comme des ligands de PPAR γ . Le métabolite terminal 15-d-12,14-prostaglandine J2 (15dPGJ2) active le récepteur à des concentrations de l'ordre du

micromolaire également. Cette prostaglandine est devenue le ligand naturel de PPAR γ le plus largement utilisé dans les expériences menées (figure 16). Cependant, il est important de noter que la 15dPGJ2 peut avoir des effets indépendants de l'activation du récepteur et la prudence est recommandée quand il s'agit d'interpréter les résultats obtenus sur les effets biologiques de cette prostaglandine (Willson et al., 2000).

III. 4. B. Ligands synthétiques

Il est maintenant clairement reconnu que les drogues de la famille des thiazolidinediones (TZD) sont des ligands spécifiques de PPAR γ , avec un K_d de l'ordre de 100 nmol/L (Lehmann et al., 1995). Ces drogues ont été développées à l'origine pour leur effet anti-diabétique, sans aucune connaissance de leur sélectivité pour PPAR γ (Ferré, 2004). Dans les années 1980, les scientifiques de la compagnie pharmaceutique Takeda décrivent le premier membre d'une nouvelle classe de molécules appelées glitazones (Sohda et al., 1982). Celles-ci diminuaient la glycémie dans des modèles de rongeurs de résistance à l'insuline. Cet effet n'était pas accompagné d'une augmentation de la sécrétion de l'insuline par le pancréas, d'où leur appellation de "sensibilisateurs à l'insuline". A l'origine, les glitazones ont été dérivées du clofibrate, qui présentait une faible activité antihyperglycémiant chez les rongeurs. L'association de chimie médicale traditionnelle et de pharmacologie a permis d'optimiser cette activité et a conduit à la première glitazone, la Ciglitazone. En plus de ces effets antihyperglycémiants, cette molécule réduisait les concentrations circulantes en insuline et en lipides, dont les triglycérides et les acides gras non estérifiés. L'amélioration subséquente de ces activités chez les modèles animaux a conduit à la synthèse de nouveaux membres de la famille des glitazones, plus efficaces. Il s'agit de la Troglitazone, de la Pioglitazone et de la Rosiglitazone ou BRL49653 (figure 16) (Spiegelman et al., 1998). Ces deux dernières sont actuellement largement prescrites pour le traitement du diabète de type 2 sous les noms respectifs de AvandiaTM et ActosTM. La Troglitazone, première glitazone à avoir reçu l'approbation de l'USFDA (U. S. Food and Drug Administration), a été finalement retirée du marché à cause de son hépatotoxicité (Kliwer et al., 2001). Les TZDs lient et activent PPAR γ à des concentrations équivalentes à celles requises pour leurs activités antidiabétiques chez l'homme, et aucun autre récepteur pour les TZDs n'a été identifié (Spiegelman, 1998).

En plus de ce groupe, d'autres agonistes synthétiques de PPAR γ ont été développés. Ils ont également des effets anti-diabétiques comparables, voire supérieurs à ceux des TZDs dans les modèles animaux. Parmi ceux-ci, le GW7845 (figure 16) (Alarcon de la Lastra et al., 2004). Enfin, certains anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont capables de se lier et d'activer PPAR γ à de fortes concentrations, de l'ordre du micromolaire. Il s'agit de l'indométhacine, de l'ibuprofène, du fénoprofène et de l'acide fuflenamique (Lehmann et al., 1997).

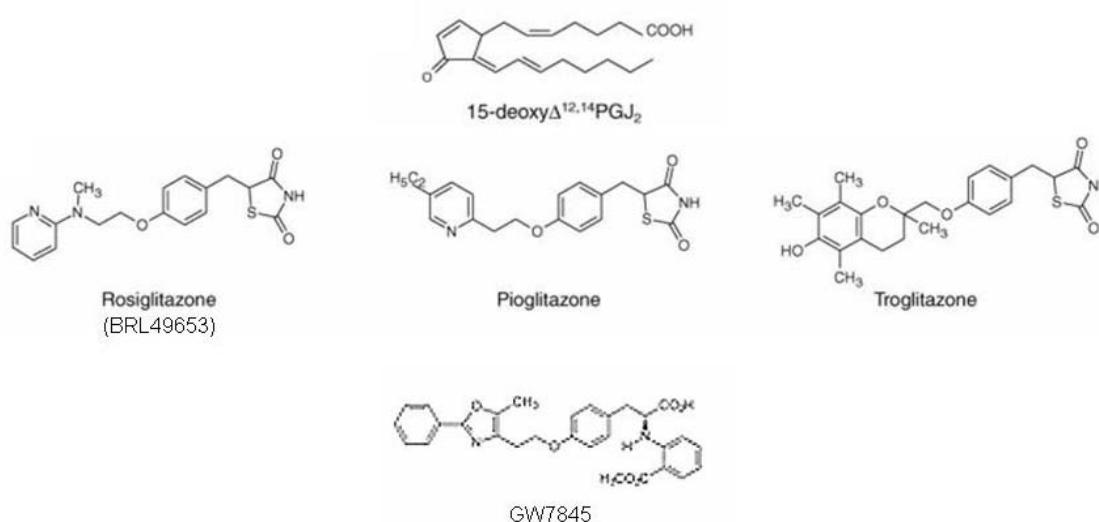


Figure 16 : Exemples de ligands de PPAR γ .

La 15dPGJ₂ est le principal ligand naturel connu pour le récepteur. Les thiazolidinédiones (Rosiglitazone, Pioglitazone, Troglitazone) sont des ligands synthétiques de PPAR γ . Le GW7845 également, mais ce composé n'appartient pas à la famille des TZDs.

IV. Mode d'action des PPARs

IV. 1. Activités de transcription

Les PPARs régulent l'expression de leurs gènes cibles sous la forme d'hétérodimères avec les RXRs, qui sont leurs partenaires obligés. Ils se lient à des HREs qui leur sont spécifiques: les PPREs (pour Peroxisome Proliferator Responsive Element) (Kliwer et al., 1992 ; Tugwood et al., 1992). Les PPARs agissent selon les trois types d'activités transcriptionnelles décrites dans le chapitre I (figures 7,8, et 9) (Li et al., 2004). Tout d'abord, les hétérodimères PPAR:RXR peuvent se lier aux PPREs en absence de ligand et réprimer activement la transcription des gènes cibles en établissant des interactions avec des complexes de corépresseurs. Ceci est valable uniquement pour PPAR α et PPAR δ , car PPAR γ ne s'associe à des corépresseurs que sous forme soluble, non liée à l'ADN (Murphy et al., 2000 ; Soon Tan et al., 2005). Le deuxième type d'activité est la liaison de l'hétérodimère PPAR:RXR à l'ADN en présence d'un ligand, ce qui active la transcription du gène cible (Murphy et al., 2000). Enfin, les PPARs sont capables de réguler négativement la transcription de gènes par transrépression. Cette activité serait responsable des effets anti-inflammatoires des PPARs (Li et al., 2004). Via la transrépression, les PPARs interféreraient avec d'autres voies de signalisation, en modulant des interactions avec des corépresseurs selon un mode dépendant de la liaison d'un ligand (Marx et al., 2004; Lee et al., 2003). Il a ainsi été montré que les PPARs pouvaient interférer avec la voie NF- κ B, la voie de signalisation SMAD3, ou avec des activateurs de transcription ou des transducteurs de signaux, AP-1, les facteurs nucléaires des cellules T activées (Blanquart et al., 2003 ; Barbier et al., 2002).

IV. 2. L'hétérodimérisation avec les RXRs

Les PPARs sont incapables de se lier à leurs éléments de réponse sur leurs gènes cibles sous forme de monomères ou d'homodimères. Ils ont pour partenaire unique et obligatoire le récepteur à l'acide rétinoïque X ou RXR (Retinoïd X Receptor) (Gearing et al., 1993 ; Kliwer et al., 1992). Il en existe trois isotypes: RXR α , β , et γ . Ils sont codés par des gènes individuels. Tous lient de façon sélective l'acide 9-*cis* rétinoïque, dérivé de la vitamine A. La liaison d'un RXR à l'ADN semble être l'événement important pour permettre la

formation de l'hétérodimère PPAR:RXR sur son élément de réponse, plus que la capacité des PPARs à reconnaître celui-ci (Temple et al., 2005). L'hétérodimère PPAR:RXR est permissif, c'est à dire qu'il peut être activé par la liaison du ligand de l'un ou de l'autre des récepteurs. La liaison simultanée des deux ligands rend le complexe plus efficace pour activer la transcription du gène cible (Ferré et al., 2004 ; Kliewer et al., 1992) (figure 17). Le fait que l'hétérodimère puisse être activé par un seul des deux ligands a été en partie expliqué par le fait que chaque récepteur soit capable de recruter des coactivateurs différents (Ijpenberg et al., 2004 ; Drenzo et al., 1997). Par exemple, DRIP205 et SRC1 sont des coactivateurs recrutés de façon différentielle par les ligands de PPAR et de RXR, respectivement (Yang et al., 2000). Par contre, les PPARs seraient dans l'incapacité de recruter SRC1 (Ijpenberg et al., 2004). Le recrutement sélectif de coactivateurs par un récepteur donné est une notion encore récente. Cependant, elle suggère la possibilité pour les hétérodimères de former des complexes de transcription spécifiques, qui résulteraient dans des cascades de signalisation différentes. Dans ce sens, des ligands différents pour un récepteur nucléaire donné pourraient être considérés comme des modulateurs sélectifs du recrutement des cofacteurs, ce qui conduirait à l'activation d'un ensemble de gènes cibles spécifiques (Ijpenberg et al., 2004).

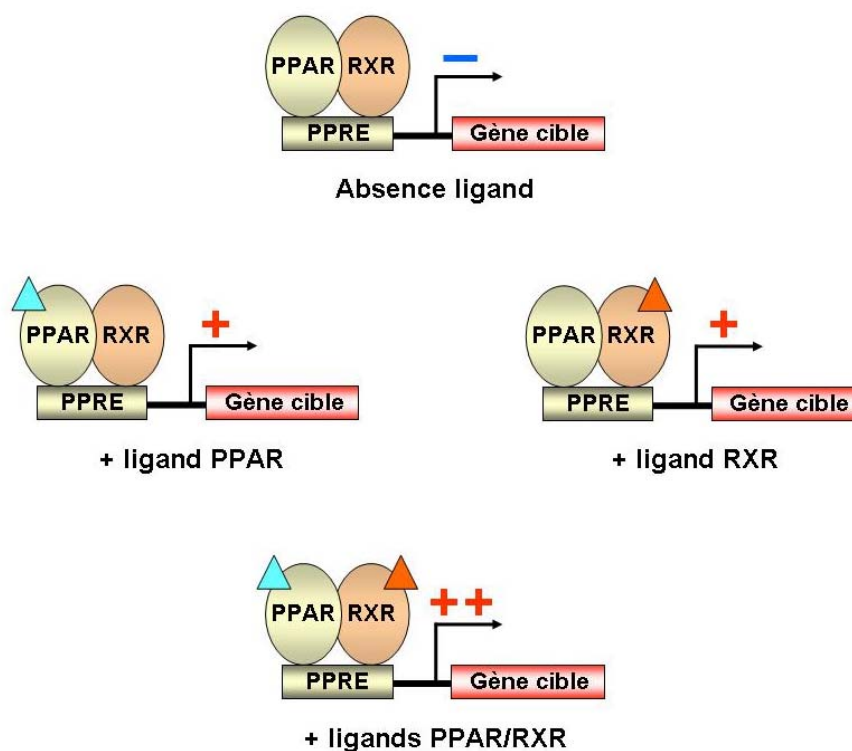


Figure 17 : Les PPARs forment des hétérodimères permissifs avec les RXRs.

IV. 3. Les éléments de réponse aux PPARs : les PPRES

Le PPRE a été défini à l'origine par la répétition directe de deux hexanucléotides de séquence consensus AGGTCA, séparés par un nucléotide (DR1) (Kliwer et al., 1992), ou deux nucléotides (DR2) (Gervois et al., 1999). Le premier PPRE naturel a été trouvé sur le promoteur du gène codant pour l'acyl-CoA oxydase chez le rat (Tugwood et al., 1992). La structure du PPRE en motif en DR impose une polarité à la liaison de l'hétérodimère PPAR:RXR. Ainsi, PPAR interagit avec l'hexamère AGGTCA situé en amont de la répétition (en 5'), tandis que RXR occupe l'hexamère en aval (3') (Ijpenberg et al., 1997 ; Drenzo et al., 1997).

Le bilan des capacités de liaison à l'ADN relatives des trois isotypes PPARs à 16 PPRES natifs a conduit à la classification des PPRES en trois groupes fonctionnels : fort, intermédiaire et faible. Ces groupes correspondent au niveau de conformité du PPRE à la séquence consensus. Étonnamment, ce n'est pas le nombre de nucléotides identiques au sein de la répétition qui est déterminant pour ce classement, mais principalement le nombre d'identités nucléotidiques au niveau de la région en 5' flanquant la répétition (Juge-Aubry et al., 1997). Dans tous les cas, PPAR γ se lie à l'ADN plus fortement que PPAR α et PPAR δ , et est donc moins dépendant de la conservation de l'extension nucléotidique en 5' du PPRE. Par contre, celle-ci est essentielle pour la liaison de PPAR α (Desvergne et Wahli, 1999). La région 5' flanquante, plus particulièrement les 6 nucléotides flanquant le motif de répétition en 5', contribue donc à la spécificité de liaison des isotypes PPARs aux PPRES (Murphy et al., 2000).

L'activité de liaison à l'ADN des PPARs est également modulée par l'isotype RXR qui constitue l'hétérodimère. Par exemple, la liaison de PPAR:RXR à un élément de réponse fort est renforcée quand le partenaire de PPAR est RXR γ . L'hétérodimérisation avec RXR α conduit plutôt à la liaison à des PPRES faibles (Desvergne et Wahli, 1999). PPAR γ en combinaison avec RXR α ou RXR γ lie l'ADN avec plus d'affinité que PPAR α ou PPAR δ sur les PPRES (Juge-Aubry et al., 1997).

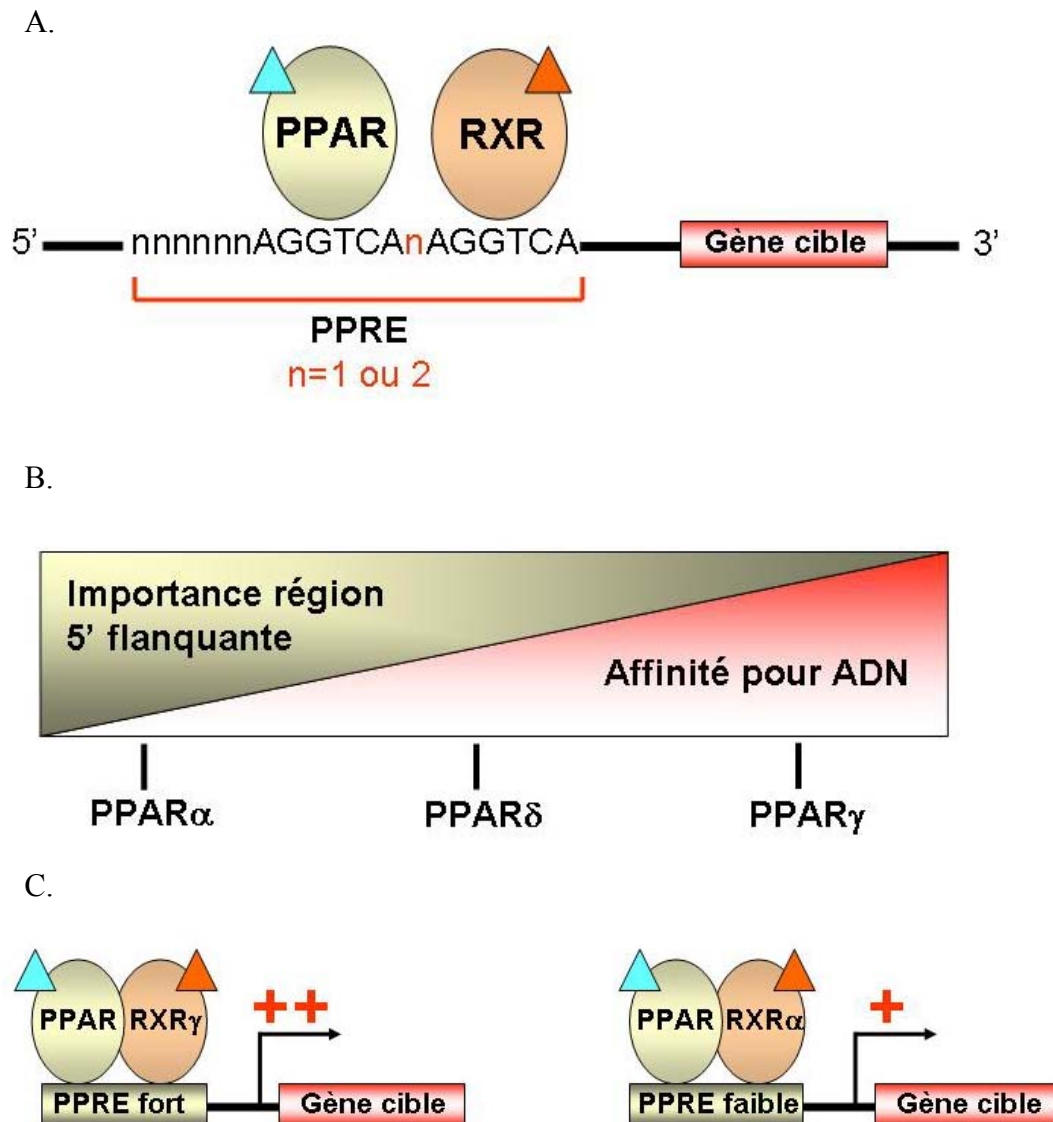


Figure 18 : Les PPARs se lient à leurs éléments de réponse sur l'ADN sous forme d'hétérodimères avec les RXRs.

Le PPRE consiste en la répétition directe de la séquence consensus AGGTCA, les deux demi-sites étant séparés par un ou deux nucléotides (A). Les six nucléotides qui flanquent le PPRE en 5' sont des éléments impliqués dans la fonctionnalité du PPRE. L'importance de ces six nucléotides n'est pas la même pour les trois PPARs (B), ainsi que leurs affinités de liaison à l'ADN. Enfin, l'hétérodimérisation d'un PPAR avec RXR γ conduit à la liaison du complexe sur un PPRE fort, tandis que RXR α est un partenaire conduisant plutôt à la liaison d'un PPRE faible (C).

V. Les cofacteurs des PPARs

Les principaux cofacteurs identifiés pour les PPARs sont listés ci-dessous. Aucun n'est spécifique des PPARs ou d'un isoforme en particulier, et ils sont répertoriés dans le premier chapitre. La figure 19 illustre leur recrutement lors de l'activation de la transcription.

Parmi les coactivateurs des PPARs, se trouvent tout d'abord les deux facteurs étroitement liés que sont CBP et p300. CBP/p300 interagit avec les LBDs de PPAR α et PPAR γ de façon dépendante de la présence d'un ligand. L'interaction de SRC-1 avec le LBD de PPAR γ a aussi été établie, et semble également dépendante de la liaison d'un ligand au récepteur. SRC-1 est aussi un coactivateur des PPARs. PBP (PPAR Binding Protein) est un cofacteur de la famille TRAPP/DRIP. Il est associé de manière constitutive à PPAR γ *in vitro* et *in vivo*. La présence d'un ligand renforce son interaction avec les PPARs (Willson et al., 2000). Malgré son nom, PBP n'est pas spécifique des PPARs, d'autres récepteurs établissant des interactions avec lui ont été identifiés depuis sa découverte. Finalement, PGC-1 est fortement associé à PPAR γ . Il est d'ailleurs exprimé dans les tissus où le récepteur est localisé.

Les trois corépresseurs principaux identifiés pour les PPARs sont la protéine RIP-140 (Receptor Interacting Protein), N-CoR2 et SMRT. RIP-140 est surtout associée à PPAR α , souvent de façon constitutive *in vivo* (Gelman et al., 1999 ; Desvergne et Wahli, 1999).

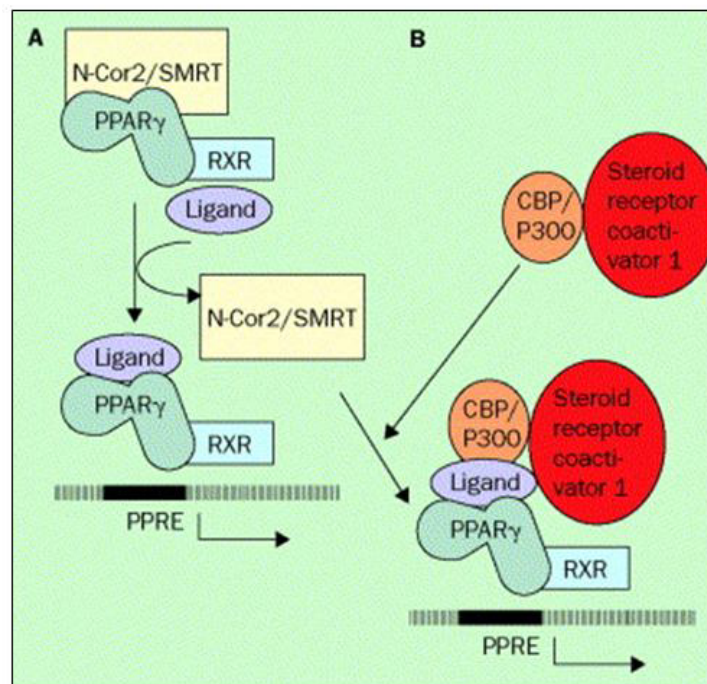


Figure 19 : Echange des cofacteurs de PPAR γ lors de l'activation transcriptionnelle (d'après Grommes et al., 2004)

VI. Régulation post-traductionnelle des PPARs

VI. 1. Phosphorylation

Les PPARs sont phosphorylés par de nombreuses kinases comme la PKA, PKC, les MAPKs. PPAR α est une phosphoprotéine et son activité peut être modulée par son état de Phosphorylation. Il a été démontré que PPAR α est phosphorylé par la voie des MAPKs en réponse à l'insuline, ce qui augmente son activité AF-1 (Juge-Aubry et al., 1999). Dans les cardiomyocytes de rat, p38, une MAPK activée dans des conditions de stress comme l'ischémie ou l'hypoxie, phosphoryle PPAR α et augmente son activité transcriptionnelle en renforçant ses interactions avec le coactivateur PGC-1 (Barger et al., 2001). Chez la souris, PPAR α est phosphorylé par la Protéine Kinase A (PKA), ce qui stabilise sa liaison à l'ADN (Lazennec et al., 2000). PPAR α est donc une cible pour différentes voies de phosphorylation et son activité serait modulée par des signaux extracellulaires liés à différents processus physiologiques (Blanquart et al., 2003).

PPAR γ est également une phosphoprotéine. Mais contrairement à PPAR α , il a été montré chez la souris que sa phosphorylation par les MAPK induit l'inhibition de son activité transcriptionnelle (Hu et al., 1996). La protéine PPAR γ 1 humaine est phosphorylée par les MAPK ERK2 et JNK, ce qui là aussi diminue son activité (Adams et al., 1997 ; Hsi et al., 2001). L'effet de la phosphorylation de PPAR γ par les MAPKs sur son activité transcriptionnelle serait expliqué en partie par la modification d'un interdomaine qui réduirait l'affinité du LBD pour le ligand (Shao et al., 1998).

La phosphorylation par les MAPKs influence donc différemment les activités de PPAR α et PPAR γ : elle active le premier et inhibe le second (Blanquart et al., 2003 ; Diradourian et al., 2005).

Le contrôle post-traductionnel de PPAR δ a été peu étudié comparativement aux deux autres PPARs. Il semble cependant que la PKA augmenterait l'activité transcriptionnelle de ce récepteur (Blanquart et al., 2003).

VI. 2. Ubiquitinylation

Le repositionnement de l'hélice H12 de PPAR γ lors de la liaison d'un ligand serait essentiel pour son ubiquitinylation et sa dégradation subséquente par la voie du protéasome. De façon intéressante, les interactions de PPAR γ avec des corépresseurs protègent le récepteur de la dégradation tandis que les interactions avec des coactivateurs la favorisent. Un des modèles adoptés pour ce processus est que les ligands réguleraient la dégradation des PPARs dans le temps. D'abord, la liaison d'un ligand protégerait le récepteur de la dégradation avec un effet promoteur de l'activation de la transcription. Puis le repositionnement de l'hélice H12 et le recrutement de cofacteurs entraîneraient l'ubiquitinylation des PPARs et leur dégradation, mécanisme qui permettrait l'arrêt de la transcription. En contrôlant leurs niveaux protéiques intracellulaires, la voie du protéasome serait donc un mécanisme important pour le contrôle de l'activité transcriptionnelle des PPARs (Blanquart et al., 2003).

VII. Bref aperçu des implications physiologiques des PPARs

Les PPARs ont été impliqués dans de nombreux processus biologiques. De façon consistante avec sa distribution dans des tissus présentant des taux élevés de catabolites des acides gras, le rôle principal de PPAR α est la régulation de l'homéostasie énergétique. Le fait que PPAR α régule la β -oxydation des acides gras est bien établi. Il stimule de plus la gluconéogenèse et est impliqué dans le contrôle de l'assemblage des lipoprotéines.

Le premier rôle caractérisé pour PPAR γ est sa capacité à induire la différenciation des adipocytes, et donc à réguler le stockage des lipides dans le tissu adipeux blanc et la dissipation de l'énergie dans le tissu adipeux brun (Spiegelman, 1998). De plus PPAR γ est impliqué dans le contrôle du métabolisme du glucose en améliorant la sensibilité à l'insuline (Michalik et al., 2004).

En accord avec sa large distribution tissulaire, PPAR δ a été impliqué dans de nombreux processus biologiques comme le transport du cholestérol ou la β -oxydation des lipides dans le muscle (Soon Tan et al., 2004).

Dans un premier temps, les PPARs sont donc des régulateurs majeurs des métabolismes des lipides et du glucose, et permettent l'adaptation de l'organisme au contexte nutritionnel (Ferré, 2004). Ils sont donc impliqués dans de nombreuses pathologies liées à des désordres métaboliques, comme le diabète de type 2, l'obésité ou l'athérosclérose (Barbier et al., 2002 ; Berger et al., 2005).

Ensuite, Les activateurs des PPARs, particulièrement PPAR α et γ , exercent des activités anti-inflammatoires dans des types cellulaires variés en inhibant l'expression de gènes proinflammatoires codant pour des cytokines ou des métalloprotéases. Les PPARs régulent négativement la transcription de tels gènes en bloquant l'activité des facteurs de transcription qui les contrôlent, comme AP-1 (Activating Protein 1) ou NF- κ B (Nuclear Factor κ B), et en stimulant le catabolisme des eicosanoïdes proinflammatoires (Délérive et al., 2001). Le rôle modulateur des PPARs dans l'inflammation permet d'envisager des applications thérapeutiques potentielles dans les maladies inflammatoires chroniques chez l'homme. Dans les chapitres qui suivent, le rôle de PPAR γ et le potentiel thérapeutique des TZDs dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICIs) sont développés.

Le rôle spécifique de PPAR γ dans le colon est reflété en partie par son expression dans ce tissu. Les hauts niveaux d'expression de PPAR γ dans le colon distal, et sa localisation primaire dans les cellules épithéliales différenciées coïncide avec les nombreux rapports indiquant que le récepteur est associé à un phénotype différencié dans les cellules épithéliales coliques (Bull, 2003). Ces observations ont été à la base de l'hypothèse d'un rôle de PPAR γ dans la cancérogenèse colique, un point développé dans les chapitres qui suivent.

Les gènes cibles de PPAR γ codent donc pour des protéines impliquées dans le transport et le stockage des lipides, mais aussi dans les voies de régulation de la croissance cellulaire, dans la prolifération cellulaire et l'immunomodulation. Ce sont sur ces aspects, dans le contexte du colon, que nous avons particulièrement porté notre intérêt dans les travaux présentés ici.

Chapitre III

PPAR γ et inflammation

Les deux formes principales des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) sont la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Ces deux pathologies altèrent la structure et la fonction du tractus gastro-intestinal sur le long terme, souvent de façon irréversible. La RCH se caractérise par des lésions inflammatoires continues qui progressent du rectum jusqu'au colon proximal. La MC se traduit par lésions discontinues qui peuvent toucher tout le tractus gastro-intestinal, de la bouche à l'anus, avec une prédominance dans l'iléon, le colon et l'anus (Colombel et al., 1993). Les MICIs touchent environ 10 à 200 individus sur 100 000 en Amérique du Nord et en Europe. Leur incidence est la plus forte dans les pays développés et industrialisés.

L'étiologie des MICIs est très complexe et serait une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Au niveau cellulaire, l'inflammation de la muqueuse intestinale est la conséquence d'une réponse immunitaire exagérée et inappropriée à des constituants normaux de la microflore bactérienne. La barrière épithéliale est altérée, mais il est difficile d'établir s'il s'agit d'un événement primaire ou secondaire dans l'apparition de ces pathologies. Deux grandes voies sont impliquées dans ce déséquilibre. La première est une réponse cellulaire T Helper 1 (T_H1) excessive, qui conduit à une sécrétion accrue d'Il-12, d'IFN γ et/ou de TNF α . Ce profil est retrouvé dans le contexte de la MC. La RCH serait par contre la résultante d'une réponse T_H2 excessive entraînant l'augmentation de la sécrétion d'Il-4, d'Il-5 et/ou d'Il-13 (Bouma et al., 2003). Au niveau moléculaire, la surexpression de ces cytokines pro-inflammatoires pathogènes est associée à l'activation de facteurs de transcription comme NF- κ B, AP-1 ou STAT1; ainsi que des voies des MAPK JNK et/ou p38 (Meyer et al., 1996 ; Hirano et al., 1996 ; Carpentier et al., 1995). Ceux-ci contrôlent l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, des molécules d'adhésion ou autres médiateurs de l'inflammation (Alarcon de la Lastra et al., 2004 ; Wada et al., 2001).

Il y a quelques années, des observations suggéraient une utilité possible de l'activation de PPAR γ dans le traitement de l'inflammation colique. D'abord, son haut niveau d'expression dans les cellules épithéliales coliques. Ensuite, les acides gras polyinsaturés (comme ceux fournis par l'huile de poisson), ligands naturels de PPAR γ (Kliwer et al., 1997), se sont révélés efficaces dans le traitement des MICIs (Belluzi et al., 1996). Enfin, les TZDs diminuent la résistance à l'insuline en réduisant la production de TNF α dans le tissu adipeux et/ou en inhibant la transduction du signal dépendant du TNF α (Peraldi et al., 1997). Depuis, les études menées apportent de plus en plus d'arguments en faveur de l'implication de

PPAR γ et de ses agonistes dans le contrôle de la réponse inflammatoire. Cependant, la contribution exacte de PPAR γ dans des conditions physiologiques reste à éclaircir. Les études menées *in vitro* dans différents types cellulaires, dont les cellules épithéliales intestinales, tendent à montrer que les agonistes de PPAR γ ont une activité anti-inflammatoire. Mais le rôle du récepteur reste à éclaircir *in vivo*. Pour cela, des modèles animaux pour les MICI ont été mis en place. De plus, la question se pose de savoir si les effets anti-inflammatoires des agonistes de PPAR γ sont strictement dépendants de l'activation du récepteur, ou s'ils passent par d'autres voies.

I. Résultats obtenus *in vitro*

De nombreuses études ont permis d'observer que les agonistes de PPAR γ pouvaient bloquer au moins partiellement la production de médiateurs de l'inflammation. Ainsi, les ligands de PPAR γ inhibent l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF α , Il-6 et Il-1 β dans les monocytes activés par les esters de phorbol (Jiang et al., 1998 ; Ji et al., 2001). Dans les macrophages activés par l'IFN γ , ils bloquent la production de la nitric oxide synthase (iNOS), de la métalloprotéase MMP-9 (Matrix Metalloprotease 9), et du récepteur scavenger A, des éléments cytotoxiques qui contribuent aux altérations des tissus inflammés (Ricote et al., 1998 ; Welch et al., 2003 ; Chen et al., 2003). Dans les cellules endothéliales vasculaires, il a été observé que les ligands de PPAR γ inhibent l'expression des molécules d'adhésion comme ICAM-1, VCAM-1 et Mad-CAM-1 (Wang et al., 2002 ; Sasaki et al., 2005). Celles-ci sont exprimées dans les modèles de colite expérimentale ainsi que dans le colon humain inflammatoire.

Les cellules épithéliales coliques jouent également un rôle actif dans la réponse immunitaire par la muqueuse intestinale. Elles peuvent en effet exprimer des récepteurs immunitaires et produire une large gamme de substances immunomodulatrices comme des cytokines et des facteurs du complément (Su et al., 1999). Dans ces cellules aussi, les ligands de PPAR γ présenteraient une activité anti-inflammatoire. Peu de données existent à ce propos, mais il a été montré que la 15dPGJ2 et la Rosiglitazone inhibent de façon dose dépendante la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire Il-8 et de la protéine MCP1 dans les lignées cellulaires cancéreuses coliques humaines Caco2 et HT29 (Su et al., 1999).

I. 1. Une action anti-inflammatoire dépendante ou indépendante de PPAR γ

Pour l'ensemble de ces études, les agonistes de PPAR γ inhibent l'expression de ces gènes au niveau transcriptionnel. En effet, les niveaux d'ARNms de ceux-ci diminuent. Cependant, il est surprenant de voir que les effets les plus prononcés sont obtenus avec la 15dPGJ2, ligand naturel mais peu sélectif de PPAR γ , plutôt qu'avec les ligands synthétiques, spécifiques du récepteur (Ricote et al., 1998 ; Chen et al., 2003). De plus, l'obtention de ces activités anti-inflammatoires nécessite des concentrations en TZDs très élevées, de l'ordre du micromolaire. Or l'affinité de liaison de ces ligands pour PPAR γ est plutôt de l'ordre du

nanomolaire (Ricote et al., 1998 ; Jiang et al., 1998). Ces données pharmacologiques suggèrent donc que les ligands de PPAR γ agissent au moins en partie via des mécanismes indépendants de l'activation de PPAR γ (Delerive et al., 2001). Allant dans ce sens, des équipes ont rapporté que la 15dPGJ2 pouvait aussi réguler négativement la réponse inflammatoire dans des cellules n'exprimant pas PPAR γ (Petrova et al., 1999 ; Vaidya et al., 1999). Récemment, Crosby et ses collaborateurs ont observé que la Rosiglitazone et la Pioglitazone inhibaient la production de iNOS dans des lignées de macrophages exprimant ou non PPAR γ (Crosby et al., 2003). Ceci était en contradiction avec les résultats obtenus par l'équipe de Ricote, où l'expression de PPAR γ était requise pour l'action inhibitrice anti-inflammatoire de la 15dPGJ2 (Ricote et al., 1998). Finalement, une étude récente a montré qu'à faible concentration, la Rosiglitazone inhibait l'induction de l'expression de gènes induite par l'IFN γ et par le lipopolysaccharide (LPS) dans des macrophages de façon dépendante de PPAR γ . Par contre, la Rosiglitazone à forte concentration inhibait aussi ces mêmes gènes dans des macrophages n'exprimant pas PPAR γ (Welch et al., 2003).

L'élucidation partielle des mécanismes mis en jeu permet en fait d'interpréter ces informations par le fait que les ligands de PPAR γ exerceraient leurs actions anti-inflammatoires de façon à la fois dépendante et indépendante de l'activation du récepteur nucléaire.

I. 2. Mécanismes moléculaires mis en jeu pour l'activité anti-inflammatoire des ligands de PPAR γ

Il a été proposé que PPAR γ soit un inhibiteur clé de l'inflammation colique via l'atténuation de l'activité de facteurs de transcription comme NF- κ B, AP-1 (Activating Protein 1) et STAT1 dans les cellules épithéliales coliques. Ces facteurs de transcription contrôlent l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires comme l'Il-1 β , l'Il-6, l'Il-8, le TNF α ou l'IFN γ .

I. 2. A. Les principaux facteurs moléculaires de l'inflammation impliqués

NF- κ B est un facteur de transcription clé dans l'inflammation intestinale. Dans le colon, les complexes dimériques p65-p50 sont prédominants dans les cellules épithéliales en prolifération ; tandis que les dimères p50-p50 sont les complexes majoritaires dans les cellules épithéliales matures (Alarcon de la Lastra et al., 2004). Dans les cellules normales, NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par son association avec une protéine inhibitrice, I κ B. En réponse aux voies de signalisation enclenchées par les cytokines pro-inflammatoires, La kinase pour I κ B, IKK, est activée et phosphoryle I κ B sur deux résidus sérine. Ceci conduit à l'ubiquitinylation de I κ B et à sa dégradation par la voie du protéasome. NF- κ B est alors libéré et migre dans le noyau de la cellule où il contrôle la transcription de ses gènes cibles (Strauss : Ghosh et al., 1998). La voie « classique » NF- κ B est celle impliquée dans la signalisation pro-inflammatoire. Elle résulte dans la transcription d'une myriade de gènes codant pour des cytokines (Il-1 β , Il-6, TNF α , GM-CSF, Il-4...), des chimiokines (Il-8, Il-6...), des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, VCAM1, ICAM1, E-sélectine), des protéines anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-X_L, FLIP), des enzymes inductibles (COX2, MMP9, iNOS (Li et al., 2005).

STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription) est un facteur de transcription cytoplasmique. Il est phosphorylé par des kinases de la famille des JAKs (Janus tyrosine protein Kinases). A l'état phosphorylé, STAT1 forme un homodimère qui peut être transloqué au noyau des cellules, où il active la transcription de ses gènes cibles. De hauts niveaux d'expression et d'activation de STAT1 ont été relevés dans les cellules épithéliales coliques de patients atteints de RCH (Lastra et al., 2004).

AP1 est un autre facteur de transcription impliqué dans l'inflammation. Plus précisément, AP1 consiste en une famille de facteurs de transcription composée des isoformes jun (v-jun, c-jun, junB, junD) qui forment des hétérodimères avec les protéines fos (v-fos, c-fos, fosB). La voie AP1 est activée par les kinases JNK (Jun N-terminal tyrosine Kinases) qui phosphorylent jun et induisent la transcription des gènes cibles possédant un élément de réponse AP1 dans leur région promotrice (Kovalovsky et al., 2000). Ces voies sont connues pour induire l'apoptose et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules épithéliales intestinales.

1. 2. B. Mécanismes d'action des agonistes de PPAR γ

1. 2. B. a. Des mécanismes indépendants de l'activation de PPAR γ ?

La relation entre PPAR γ et NF- κ B, ainsi que d'autres facteurs de transcription activant l'expression de gènes de l'inflammation comme AP-1 et STAT1, reste difficile à établir précisément. Plusieurs groupes ont démontré que les ligands de PPAR γ réduisaient l'activité de NF- κ B, ainsi que celles d'AP-1 et de STAT1, sans toujours se prononcer sur le fait que les effets observés soient dépendants ou non de l'activation de PPAR γ . Il a été clairement établi que la 15dPGJ2 réprime l'activation de NF- κ B en inhibant la phosphorylation de I κ B α par IKK (figure 20) (Castrillo et al., 2000 ; Rossi et al., 2000). Ceci a été observé dans les cellules épithéliales coliques, avec la 15dPGJ2 mais également avec la Rosiglitazone (Su et al., 1999). Mais il n'a pas été déterminé si ces actions étaient dépendantes de PPAR γ . Straus et ses collaborateurs ont rapporté qu'en plus de cette action sur IKK, la 15dPGJ2 réduisait aussi efficacement l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B en alkylant les dimères p50/p65 (Straus et al., 2000). Dans ce cas, l'activité de l'agoniste naturel de PPAR γ est clairement indépendante du récepteur, puisqu'elle relève d'une interaction directe de la 15dPGJ2 avec les éléments de NF- κ B. Plus récemment, l'équipe de Chen a observé l'inhibition de la phosphorylation et de l'activité de STAT1 par la 15dPGJ2, mais pas par les TZDs (Chen et al., 2003). L'utilisation d'un antagoniste de PPAR γ n'enrayait en rien cette inhibition, suggérant que là encore, les mécanismes impliqués étaient indépendants de PPAR γ .

1. 2. B. b. Des évidences pour l'implication de PPAR γ

Cependant, plusieurs études ont aussi mis en évidence que PPAR γ lui-même pouvait réguler directement l'expression des gènes de la réponse inflammatoire. Mais les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore clairs. De plus en plus d'évidences obtenues *in vitro* suggèrent en fait que PPAR γ exerce son activité anti-inflammatoire principalement par le mécanisme de transrépression décrit précédemment. Grâce à des expériences de transfection transitoire dans les macrophages, Ricote et ses collaborateurs ont démontré que PPAR γ inhibait l'expression de la iNOS et de la MMP9 en diminuant les activités de liaison à l'ADN d'AP-1, de STAT1 et de NF- κ B (Ricote et al., 1998). Plus récemment, l'équipe de Wang a mis au point un adénovirus exprimant une forme mutée de PPAR γ , active de façon constitutive. Ceci leur a permis d'observer les effets de l'activation du récepteur sans utiliser d'agoniste. L'infection de cellules endothéliales vasculaires avec ce virus entraînait la diminution des activités de liaison à l'ADN de NF- κ B et AP-1 (Wang et al., 2002). L'action inhibitrice de PPAR γ sur AP-1 pourrait être la conséquence de l'interaction directe du récepteur avec c-jun (figure 20) (Delerive et al., 1999). PPAR γ est aussi capable d'inhiber la transcription induite par NF- κ B en interagissant physiquement avec les sous unités p50 et p65 (figure 20) (Delerive : Chung et al., 2000). Enfin, l'équipe de Li a proposé un modèle pour l'inhibition de l'expression de la iNOS : PPAR γ réprimerait les activités transcriptionnelles de STAT1, AP-1 et NF- κ B en interagissant directement avec le co-activateur de transcription CBP, établissant des ponts avec des co-répresseurs comme SRC-1 (Li et al., 2000).

Il a aussi été émis l'hypothèse que si l'activation de PPAR γ régule négativement l'activité de NF- κ B, ceci pourrait se faire via une régulation différentielle des isoformes de NF- κ B favorisant l'expression de p50 et inhibant celle de p65 (Bassaganya-Riera et al., 2002). Dans les cellules endothéliales vasculaires, la Troglitazone inhibe la phosphorylation de p65 induite par le TNF α (Sasaki et al., 2005). Le groupe ne se prononce pas sur l'implication de PPAR γ dans cette action, mais dans les adipocytes, Ruan et coll. ont montré par des expériences de transfections transitoires que l'expression ectopique du récepteur PPAR γ actif abolissait l'induction d'un gène rapporteur codant pour la p65 (Ruan et al., 2003).

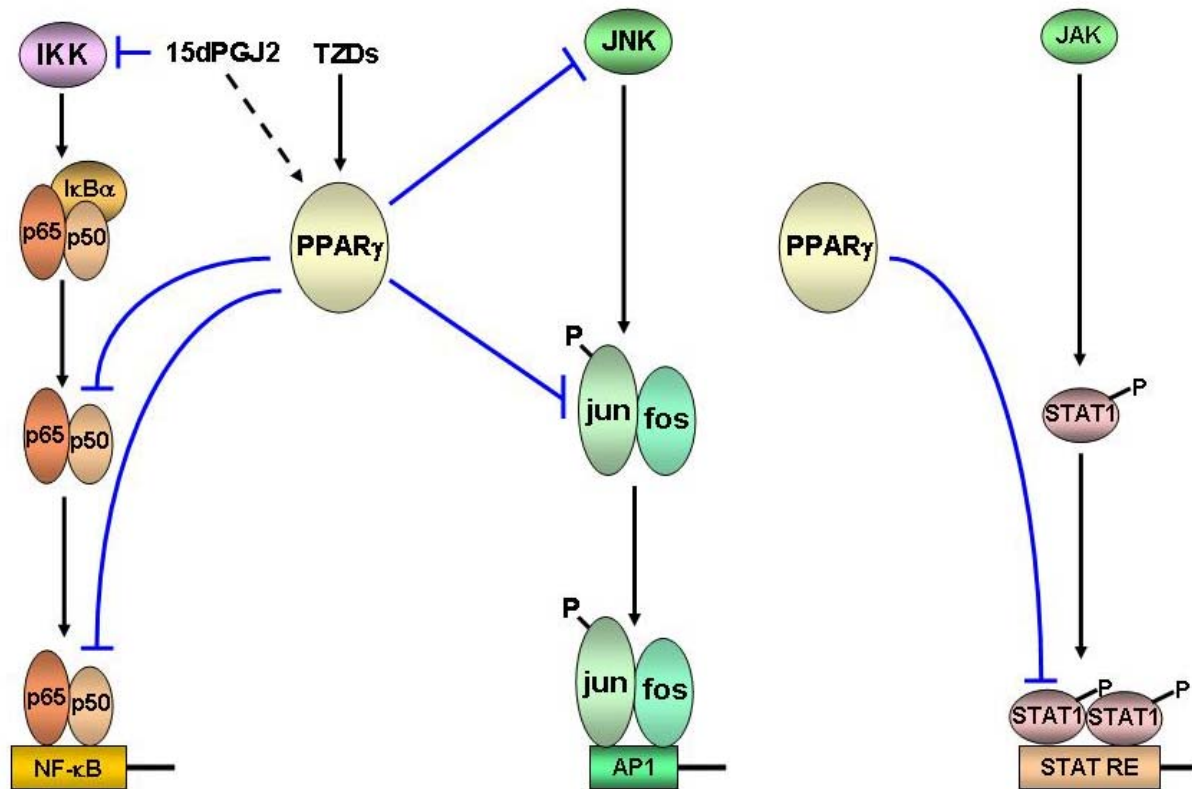


Figure 20 : Modèle hypothétique de l'inhibition des voies de signalisation de l'inflammation par PPAR γ (D'après Delerive et al., 2001).

PPAR γ inhiberait les voies NF- κ B, AP1 et STAT1. La 15dPGJ2 inhiberait directement IKK, de façon indépendante de l'activation du récepteur (TZD : Thiazolidinédione ; IKK : I κ B Kinase ; NF- κ B : Nuclear Factor κ B ; AP1 : Activation Protein 1 ; STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription ; JNK : Jun N-terminal Kinase ; JAK : Janus tyrosine Kinase ; STAT RE : STAT Response Element)

II. Résultats obtenus *in vivo*

Les études menées *in vitro* dans différents types cellulaires établissent clairement un rôle pour PPAR γ dans l'inflammation. Cependant, l'interprétation des résultats obtenus *in vitro* est toujours à effectuer avec prudence, puisque les paramètres de la culture cellulaire sont très éloignés des conditions physiologiques. Des modèles murins d'inflammation chronique de la muqueuse colique ont été mis au point. Il s'agit de colites induites chimiquement soit par l'administration de Dextran Sodium Sulfate (DSS) chez les souris, soit par celle de trinitrobenzène de sodium (TNBS) chez les souris et les rats. L'utilisation de ces modèles animaux et les observations obtenues chez l'homme renseignent sur l'implication de PPAR γ dans le contrôle de la réponse inflammatoire.

II. 1. Les agonistes de PPAR γ atténuent les colites induites chimiquement

II. 1. A. Résultats obtenus chez la souris DSS

En 1999, un premier rapport indique que le traitement de souris avec la Troglitazone ou la Rosiglitazone diminue la colite induite par le DSS de façon significative, de 50 à 70% (Su et al., 1999). Ceci se vérifiait sur la base d'un calcul d'indice d'activité de la maladie, mais également au niveau histologique. Les TZDs réduisaient en effet visiblement l'inflammation de la muqueuse colique, qui ne présentait alors aucun œdème et un infiltrat inflammatoire modéré comparé à la muqueuse des souris traitées au DSS. Des immunomarquages révélaient que PPAR γ était exprimé majoritairement dans les cellules épithéliales coliques, particulièrement au niveau des compartiments prolifératifs des cryptes. Ceci était valable aussi bien pour la muqueuse saine que pour la muqueuse inflammée, suggérant que les cellules épithéliales coliques étaient les cibles majeures des ligands de PPAR γ dans ce modèle (Su et al., 1999). Des résultats similaires ont été obtenus par la suite dans ce modèle, avec quelques divergences cependant. Contrairement à l'équipe de Su, Saubermann et ses collaborateurs n'obtinrent aucun effet curatif des TZDs (Troglitazone, Rosiglitazone, et Pioglitazone) sur l'inflammation colique induite par le DSS (Saubermann et al., 2002). Par contre, l'administration préventive des agonistes de PPAR γ , avant celle du

DSS, inhibait significativement la progression de la colite de façon dose-dépendante. Ceci était accompagné au niveau moléculaire d'une diminution des niveaux d'ARNms codant pour les cytokines pro-inflammatoires IFN γ et TNF α dans la muqueuse colique. En utilisant des puces à ADN, l'équipe de Nakajima a pu établir un profil d'expression de gènes après l'administration d'agonistes de PPAR γ , toujours dans des souris DSS. Ils notèrent que les TZDs régulaient négativement l'expression de certains gènes médiateurs de l'inflammation. L'inhibition de l'expression de l'IFN γ et du TNF α était significative (Nakajima et al., 2002).

II. 1. B. Résultats obtenus à partir du modèle TNBS

L'autre modèle de colite induite chimiquement, le modèle TNBS, permet aussi de constater les effets protecteurs des agonistes de PPAR γ . La Rosiglitazone diminuerait les lésions inflammatoires de la muqueuse aussi bien en traitement préventif que curatif (Dubuquoy et al., 2000). Là encore, les niveaux d'ARNms codant pour le TNF α sont normalisés, ainsi que ceux codant pour l'Il-1 β . L'activité myeloperoxidase (MPO) diminue également. L'équipe de Desreumaux a aussi observé cette activité anti-inflammatoire de la Rosiglitazone chez la souris TNBS. Cependant son administration préventive se révélait plus efficace que lorsqu'elle était curative (Desreumaux et al., 2001). Mais dans les deux cas, le taux de survie augmentait, l'indice de maladie diminuait. Toutes ces observations ont été retrouvées récemment chez le rat TNBS (Sanchez-Hidalgo et al, 2005). La Rosiglitazone, administrée sur un mode curatif, corrigeait les désordres morphologiques associés aux lésions inflammatoires. Chez le rat aussi, le ligand de PPAR γ induisait les normalisations des niveaux de TNF α et d'activité de la MPO.

II. 1. C. Mécanismes impliqués

Les études menées avec les modèles animaux apportent donc des arguments complémentaires en faveur du rôle protecteur des agonistes de PPAR γ vis-à-vis de l'inflammation colique. Les mécanismes moléculaires impliqués restent cependant à élucider. Récemment, il a été montré dans les deux modèles de colite expérimentale que la Pioglitazone diminuait de façon significative l'expression d'une chimiokine produite par les lymphocytes

TH1, la CXLC10, dans la muqueuse colique (Schaeffer et al., 2005). Dans d'autres modèles animaux de l'inflammation, autre que colique, il avait déjà été observé que les TZDs pouvaient agir de façon bénéfique sur la balance TH1/TH2. Mais cet aspect reste à approfondir.

Certains ont mis en évidence une action des TZDs sur l'activité de NF- κ B. Chez les souris TNBS, la Rosiglitazone et la Troglitazone induisent une baisse de l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B, ainsi que des activités des MAPK JNK et p38 (Desreumaux et al., 2001). Chez le rat TNBS, la Rosiglitazone induit une diminution de l'expression de p65 dans les cellules coliques (Sanchez-Hidalgo et al., 2005). Ces résultats corrélerent avec ceux obtenus *in vitro*, impliquant les mêmes mécanismes pour l'activité anti-inflammatoire des ligands de PPAR γ .

II. 2. Importance du rôle de l'activation de PPAR γ dans la régulation de la réponse inflammatoire colique

Toutes les données obtenues à partir des modèles animaux de colite induite chimiquement n'indiquent pas la nature de l'activité des agonistes de PPAR γ , à savoir si les effets observés passent par l'activation du récepteur ou par des voies indépendantes. Ces expériences ont soulevé la question de savoir si le récepteur PPAR γ endogène jouait un rôle anti-inflammatoire dans des conditions physiologiques. De plus, le fait que l'administration des TZDs sur un mode curatif soit dans certains cas moins efficace qu'un traitement préventif, voire inefficace, pose aussi le problème de savoir si dans le contexte d'une inflammation chronique intestinale, les niveaux d'expression de la protéine PPAR γ dans la muqueuse sont diminués par rapport à la muqueuse saine. Il a alors été émis l'hypothèse qu'il advienne un défaut d'expression de PPAR γ de façon précoce dans le processus inflammatoire. Ceci limiterait l'action des TZDs dans le traitement des MICIs.

II. 2. A. Mise en évidence du rôle physiologique de PPAR γ endogène

Afin de clarifier le rôle anti-inflammatoire de PPAR γ endogène, l'équipe de Nakajima a induit une inflammation intestinale par ischémie/reperfusion chez des souris déficientes hétérozygotes pour le récepteur (PPAR $\gamma^{+/-}$). Leur rapport indique une nette aggravation des dommages causés par l'ischémie chez les souris PPAR $\gamma^{+/-}$ comparées aux souris de type sauvage (Nakajima et al., 2001). De la même façon, la déficience pour le récepteur augmente la susceptibilité des souris à la colite induite par le DSS (Saubermann et al., 2002). L'équipe de Desreumaux a utilisé des souris PPAR $\gamma^{+/-}$ et des souris RXR $\alpha^{+/-}$. Les deux types de souris présentaient une inflammation induite par le TNBS accrue par rapport aux souris de type sauvage. Ils mirent ainsi en évidence le rôle endogène des deux partenaires de dimérisation (Desreumaux et al., 2001).

Suivant une stratégie opposée, une équipe a utilisé un adénovirus exprimant le récepteur PPAR γ pour infecter des souris présentant une colite induite chimiquement par administration de DSS. La seule augmentation de l'expression de PPAR γ , sans utilisation d'agoniste, suffisait à atténuer de façon significative l'inflammation colique induite par le DSS. Ceci était accompagné d'une diminution de l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 et de la cytokine pro-inflammatoire TNF α dans les cellules mononucléées (Katayama et al., 2003).

Plusieurs rapports ont montré que les ligands de PPAR γ exerçaient leur action de façon indépendante du récepteur. Cependant, les résultats obtenus avec les souris déficientes pour PPAR γ et les adénovirus permettent d'affirmer que les voies endogènes passant par l'activation de PPAR γ jouent un rôle central dans la réponse anti-inflammatoire au niveau du colon. Le tableau 3, page suivante, récapitule les résultats obtenus sur l'utilisation des agonistes de PPAR γ dans les modèles animaux d'inflammation chronique intestinale.

Modèle	Agoniste	Effet	Référence
Souris DSS	Rosiglitazone	Diminution colite induite par le DSS	Su et al., 1999
	Troglitazone	en curatif et préventif	
		Aucun effet en curatif	Saubermann et al., 2002
	Rosiglitazone	Diminution de la colite en traitement	
	Troglitazone	préventif : Normalisation des	Nakajima et al., 2002
	Pioglitazone	niveaux d'ARNms codant pour	
		TNF α et IFN γ	
Souris TNBS		Diminution lésions inflammatoires	Dubuquoy et al., 2000
		muqueuse colique.	
		Normalisation ARNms TNF α , IL1 β , activité MPO	
Rats TNBS	Rosiglitazone	Augmentation du taux de survie, diminution indice de maladie.	Desreumaux et al., 2001
		Effets préventifs supérieurs à effets curatifs	Sanchez-Hidalgo et al., 2005
Souris PPARγ^{+/-}			Desreumaux et al., 2001
Ischémie/reperfusion		Aggravation des dommages causés	Nakajima et al., 2001
DSS		par l'inducteur de colite chez les	
TNBS		souris déficientes pour PPAR γ	Saubermann et al., 2002

Tableau 3 : Effets des agonistes de PPAR γ dans les modèles animaux d'inflammation chronique du colon.

III. Expression de PPAR γ dans les MICIs

L'utilisation de souris déficientes pour PPAR γ a été un élément supplémentaire pour soulever la question du niveau d'expression du récepteur nucléaire dans la muqueuse colique dans le contexte des MICIs. Aucune information précise n'apparaît sur ce point dans les études portant sur les modèles animaux. Quelques immunomarquages tendaient à suggérer une diminution des niveaux protéiques du récepteur dans la muqueuse inflammée.

III. 1. Expression de PPAR γ dans la RCH

Récemment, une étude est parue chez l'homme, et portait sur 111 biopsies de patients atteints de MC ou de RCH (Dubuquoy et al., 2003). Les niveaux d'ARNms codant pour PPAR γ étaient diminués dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MICIs en général, mais la diminution était clairement significative dans le contexte de la RCH. Celle-ci était observée à la fois dans les tissus sains et dans les tissus inflammatoires des patients RCH. La protéine PPAR γ était difficilement détectable chez ces patients. De façon intéressante, la diminution de l'expression de PPAR γ était confinée aux cellules épithéliales coliques. Les cellules du sang périphérique ainsi que les macrophages conservaient des niveaux d'expression normaux. A noter que les auteurs n'ont détecté de mutation du gène codant pour PPAR γ dans aucun des prélèvements issus de patients atteints de MICIs (30 RCH et 38 MC). Des altérations de l'expression de PPAR γ existeraient donc dans le contexte de l'inflammation intestinale chronique. Aux vues des expériences menées sur les modèles animaux, il est possible d'imaginer que cette déficience puisse expliquer la prédisposition des patients atteints de MICI à une inflammation chronique, non restreinte (Wada et al., 2001).

III. 2. Expression de PPAR γ dans la MC

Contrairement à la RCH, l'expression de PPAR γ est normale dans la muqueuse colique des patients atteints de MC. Par contre, dans le contexte de cette pathologie, PPAR γ et le TNF α sont surexprimés par les adipocytes mésentériques (Desreumaux et al., 1999). PPAR γ a un rôle dans l'adipogenèse et l'homéostasie lipidique. La dérégulation de son

expression confinée au mésentère pourrait contribuer à l'hypertrophie mésentérique du tissu adipeux blanc, caractéristique de la MC. Celle-ci pourrait entraîner la synthèse accrue de TNF α par les adipocytes mésentériques, ce qui soutiendrait des réactions inflammatoires locales et causerait des ulcérations de la muqueuse le long de la frontière mésentérique (Dubuquoy et al., 2002).

IV. Les TZDs : une approche thérapeutique potentielle pour le traitement des MICIs ?

La définition de PPAR γ en tant qu'acteur de la régulation de la réponse inflammatoire en a fait une cible thérapeutique potentielle intéressante pour le traitement des patients atteints de MICI. Les TZDs sont déjà largement utilisées pour le traitement du diabète de type II. L'usage de ces molécules pour la thérapie des MICIs est rendu d'autant plus attractif que les doses appliquées dans les études animales correspondent aux doses nécessaires à la sensibilisation à l'insuline (Sarraf et al., 1998). De nombreuses études cliniques sont en cours actuellement. L'une d'entre elles, plutôt préliminaire, a été publiée. Dans celle-ci, 15 patients atteints de RCH moyennement ou modérément active étaient traités avec de la Rosiglitazone pendant douze semaines. Les doses correspondaient à celles validées pour le traitement du diabète. Sur les 15 patients, un fut exclu de l'étude pour un syndrome néphrétique non relié à la RCH ou au traitement ; deux durent subir une colectomie consécutive à l'aggravation de la RCH. Sur les douze restant, quatre présentèrent une rémission clinique, dont trois une rémission endoscopique ; quatre ne présentèrent qu'une réponse partielle ; et enfin quatre ne présentèrent aucune réponse au traitement à la Rosiglitazone (Lewis et al., 2001). Ces résultats préliminaires, s'ils tendent à montrer qu'il est possible que le traitement des patients atteints de RCH avec la Rosiglitazone puisse conduire à une rémission, ne permettent en aucun cas d'affirmer avec certitude que les ligands de PPAR γ soient efficaces en tant que molécules thérapeutiques pour la RCH. La publication des résultats des études cliniques en cours permettra sûrement d'infirmer ou de confirmer cette tendance.

Chapitre IV

PPAR γ

et

cancer colorectal

Le cancer colorectal est une cause majeure de mortalité dans le monde, particulièrement dans les pays industrialisés. C'est le second cancer le plus fréquent, tous sexes confondus, dans ces pays (Moehler et al., 2005). Aux Etats-Unis, il a été estimé qu'un homme sur 17 et une femme sur 18 seraient atteints d'un cancer du colon durant leur vie (Ozer et Diasio, 2004).

La cancérogenèse colorectale résulte de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Elle débouche sur trois grands types de syndromes : le cancer colorectal sporadique et deux formes de cancers héréditaires : la Polypose Adénomateuse Familiale (PAF) et le cancer colorectal héréditaire ne présentant pas de polypose (ou syndrome HNPCC pour Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer). Au niveau moléculaire, de nombreux mécanismes impliqués dans la cancérogenèse colorectale restent encore à établir.

Du fait que son niveau d'expression soit élevé dans l'épithélium de la muqueuse colorectale, et qu'il ait un rôle dans l'homéostasie de nombreux types cellulaires, il a été suggéré très tôt que PPAR γ puisse avoir un rôle dans le cancer colorectal. Mais les données épidémiologiques permettant d'établir un lien hypothétique entre le cancer du colon et PPAR γ sont en contradiction. En effet, d'une part il a été établi une forte corrélation entre l'augmentation du risque de cancer et la consommation d'acides gras poly-insaturés qui sont des activateurs de PPAR γ (Giovanucci et al., 1994 ; Wasan et al., 1997). D'autre part, la réduction du risque de cancer a été associée à la prise d'Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS), qui sont également des activateurs de PPAR γ (Lehmann et al., 1995).

D'un point de vue expérimental, l'implication de PPAR γ dans le cancer du colon est toujours une source de polémique. L'activation de PPAR γ dans les cellules épithéliales cancéreuses coliques humaines a des effets anti-tumorigènes, caractérisés par des activités anti-prolifératives et pro-différenciatrices. Afin de mieux définir le rôle de PPAR γ dans des conditions physiologiques, des modèles animaux de cancérogenèse colorectale ont été utilisés. Mais sous certains paramètres expérimentaux et dans certaines situations in vivo, l'activation du récepteur semble avoir des conséquences délétères, cancérigènes. Ceci a ouvert une grande polémique quant au rôle de PPAR γ dans la cancérogenèse colorectale. Certains le définissent en effet comme un suppresseur de tumeur tandis que d'autres le considèrent au contraire comme un agent pro-tumorigène.

I. Un agent inhibiteur de la prolifération et inducteur de la différenciation cellulaire et de l'apoptose *in vitro*

I. 1. Résultats obtenus *in vitro*

A l'origine, PPAR γ a été défini en tant que régulateur dominant de la différenciation des adipocytes (Rosen et al., 2000). Une partie de la réponse cellulaire des lignées pré-adipogéniques aux agonistes de PPAR γ inclut l'inhibition de la croissance, caractérisée par un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Altioek et al., 1997). L'activation de PPAR γ inhibe également la prolifération de lignées cellulaires de liposarcome *in vitro* (Tontonoz et al., 2001). Comme de nombreux types cellulaires expriment au moins de bas niveaux de PPAR γ , la capacité du récepteur à réguler les voies de la différenciation et de la croissance cellulaire a été testée dans de nombreux types cellulaires. Il a ainsi été montré que les agonistes de PPAR γ exerçaient ces effets sur l'ensemble des lignées testées, comme entre autres les cellules épithéliales dérivées de tumeurs du sein (Mueller et al., 1998), de la prostate (Mueller et al., 2000 ; Shappell et al., 2001), de l'estomac (Takahashi et al., 2000), du poumon (Chang et al., 2000), de neuroblastomes (Wei Han et al., 2001), et de carcinomes thyroïdiens (Martelli et al., 2002).

Comme il l'a été dit précédemment, les niveaux des ARNms de PPAR γ dans le colon sont presque aussi élevés que ceux trouvés dans les adipocytes (Fajas et al., 1997). Les plus hauts niveaux d'expression sont trouvés dans les cellules épithéliales post-mitotiques, différenciées, qui font face à la lumière du tube digestif (Lefebvre et al., 1999). PPAR γ est exprimé dans les lignées cellulaires cancéreuses coliques humaines (Sarraf et al., 1998 ; Brockman et al., 1998). Son niveau d'expression augmente dans ces cellules lors de leur différenciation (Lefebvre et al., 1999 ; Wächtershäuser et al., 2000 ; Huin et al., 2002). L'activation de PPAR γ dans ces lignées conduit là aussi à l'inhibition de la croissance cellulaire et à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (tableau 4). Ces phénomènes sont accompagnés de changements morphologiques et moléculaires caractéristiques du processus de différenciation (Willson et al., 2000 ; Gupta et al., 2002). Les ligands de PPAR γ induisent également l'apoptose des cellules épithéliales cancéreuses coliques humaines, de façon dose-dépendante (tableau 4) (Shimada et al., 2001 ; Yang et al., 2001 ; Kato et al., 2004). Il est

admis que les mécanismes mis en jeu par les agonistes de PPAR γ pour leur activité anti-néoplasique sont dépendants de l'activation du récepteur. En effet, L'inhibition de la croissance des cellules épithéliales coliques humaines et l'induction de leur différenciation est fonction du niveau d'expression de PPAR γ fonctionnel dans celle-ci (Brockman et al., 1998 ; Kato et al., 2004). De plus, la transfection des cellules avec un vecteur exprimant un dominant négatif pour PPAR γ bloque les effets anti-prolifératifs et pro-différenciateurs des agonistes du récepteur (Hawcroft et al., 2003). Cependant, il n'est pas à exclure qu'au moins une partie de leur activité ne passe pas par PPAR γ . S'il est clairement établi maintenant *in vitro* que PPAR γ est un agent anti-tumorigène, les mécanismes cellulaires et moléculaire mis en jeu ne sont pas encore clairement définis.

Lignées	Agoniste PPARγ	Effet	Références
HT29, Caco2, SW480, DLD-1, LoVo, T84	Troglitazone Rosiglitazone	-Inhibition de la prolifération -Induction de la différenciation	Brockman et al., 1998 ; Kitamura et al., 1999; yoshimuzi et al., 2004
DLD-1, HT29	Troglitazone 15dPGJ2	-Inhibition de la prolifération -Induction de l'apoptose	Shimada et al., 2002 ; Kato et al., 2004
HCT-15, HCT-116, HCA-7, Moser	Rosiglitazone	Inhibition de la prolifération	Brockman et al., 1998 ; Gupta et al., 2003

Tableau 4 : Effets des agonistes de PPAR γ sur la croissance des cellules épithéliales coliques humaines *in vitro*.

I. 2. Mécanismes impliqués

I. 2. A. Induction de la différenciation

L'induction de la différenciation cellulaire est un processus complexe qui requiert l'initiation d'un pattern d'expression de gènes qui résulte à la fois en l'arrêt du cycle cellulaire et en l'expression d'un ensemble de protéines nécessaires pour la fonction spécifique de la cellule différenciée. Le cancer est essentiellement un état de « dé-différenciation » dans lequel les cellules malignes ne vont pas dans le sens du processus de maturation normal.

L'activation de PPAR γ par ses agonistes semble conduire à une reprogrammation importante de la machinerie transcriptionnelle et donc de l'expression génique. L'induction de la différenciation des cellules épithéliales coliques par les ligands de PPAR γ est visible d'un point de vue morphologique (Sarraf et al., 1998). De plus, les agonistes de PPAR γ induisent ou augmentent l'expression de gènes marqueurs de la différenciation cellulaire. C'est le cas pour des gènes de la famille de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE), pour ceux codant pour les cytokératines 18, 19 et 20, pour la villine ainsi que la phosphatase alcaline (Sarraf et al. 1998 ; Kitamura et al., 1999 ; Gupta et al., 2001). A l'inverse, des gènes codant pour des protéines inhibitrices de la maturation des cellules épithéliales coliques ou inductrices de prolifération ont leur expression réprimée par les ligands de PPAR γ . Parmi celles-ci, le facteur mitogène RegIA (Regenerating gene IA) et le gène codant pour Gob4 (Gupta et al., 2001).

I. 2. B. Inhibition de la prolifération cellulaire

Tout d'abord, il est possible que le fait que PPAR γ inhibe l'expression ou l'activité de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de transcription tels que NF- κ B puisse contribuer à ralentir la croissance des cellules tumorales, du fait de la variété de gènes régulés par ces voies (Koeffler et al., 2003).

Cependant, dans les cellules épithéliales coliques, l'action anti-proliférative de PPAR γ a surtout été expliquée en partie par la régulation de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Celui-ci est étroitement contrôlé par de nombreuses kinases cyclines dépendantes (Cdk pour Cyclin dependent kinases) (figure 21). Elles sont régulées positivement par leur sous-unité cycline régulatrice correspondante, et

négativement par les inhibiteurs de Cdk, les CKI (Cycline dependent Kinase Inhibitor). $p21^{Waf1}$ et $p27^{Kip1}$ sont deux CKI qui inhibent efficacement des complexes cycline-Cdk requis pour l'entrée en phase S du cycle cellulaire (figure 21). Leur expression est la plus haute pendant les phases de quiescence (G0) et de pré-réplication (G1). Elle décroît lors de la rentrée dans le cycle cellulaire. Leurs niveaux d'expression protéiques sont régulés en partie par des mécanismes post-traductionnels, dont la voie de dégradation par le protéasome (Grommes et al., 2004).

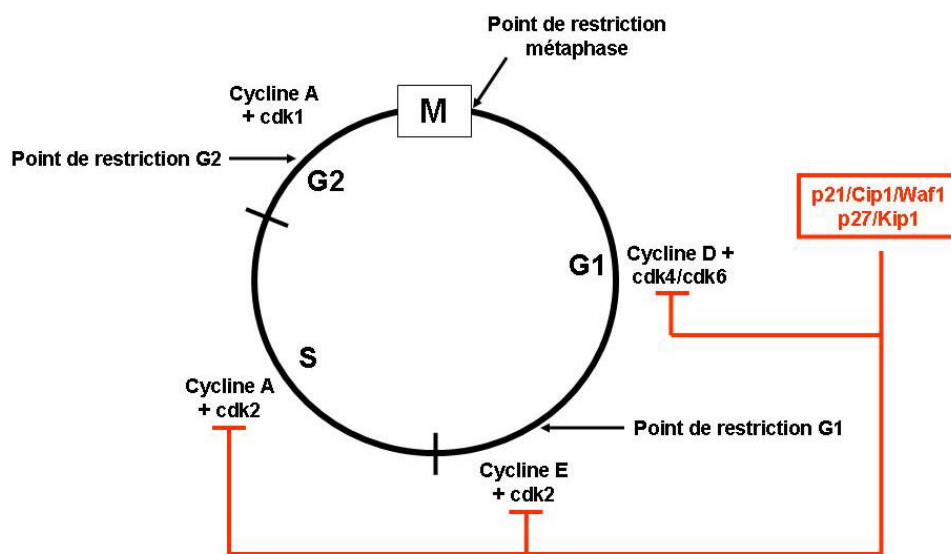


Figure 21 : La progression du cycle cellulaire. Inhibition par les CKIs $p27^{Kip1}$ et $p21^{Cip1/Waf1}$ (d'après Blottière et Buecher, 2001).

Il a été observé très tôt que l'activation de PPAR γ cible ces deux CKI et induit leur expression dans les adipocytes (Morrison et Farmer, 1999). Cet effet n'a été testé que récemment dans les cellules épithéliales cancéreuses coliques humaines. Dans les cellules de la lignée HT29, la Troglitazone induit un arrêt du cycle en phase G1, accompagné d'une augmentation de l'expression des ARNms codant pour p21^{Waf1} en 24 heures (Yoshimuzi et al., 2004). De la même façon, la Ciglitazone augmente l'expression de p27^{Kip1} dans les cellules HT29 (Chen et al., 2005). L'augmentation était visible au niveau transcriptionnel après 24 heures de traitement, et elle était suivie d'une augmentation de synthèse protéique dans les 72 heures. Ajouté à cela, les auteurs notaient une diminution des taux de phosphorylation de p27^{Kip1} et de sa dégradation par le protéasome. Les mécanismes impliqués dans les cellules de la lignée HT29 étaient donc à la fois transcriptionnels et post-traductionnels. Cependant, l'effet de la Ciglitazone sur l'expression de p27^{Kip1} était indépendant de la liaison de PPAR γ à un PPRE sur le promoteur du gène *p27^{Kip1}*, ce qui suggère que l'effet observé soit indépendant de l'activation de PPAR γ ou bien que la régulation ne soit pas directe, passant par des intermédiaires.

Il est donc possible que l'augmentation de l'expression des CKI soit due à l'activation d'autres facteurs de transcription par PPAR γ . L'équipe de Gupta a d'ailleurs montré que PPAR γ inhibait la croissance des cellules cancéreuses coliques humaines en partie en passant par l'activation de TSC-22 (Transforming growth Factor Simulated Clone 22). Ce facteur de transcription est très peu connu chez les mammifères, mais son homologue chez la drosophile (*Bunched*) joue un rôle important dans le développement des ailes. Gupta et ses collaborateurs ont montré que l'activation de PPAR γ induisait l'expression de TSC-22 dans des lignées cellulaires cancéreuses coliques humaines. La transfection de ces cellules avec un vecteur exprimant de façon constitutive TSC-22 suffisait seule à induire la diminution du taux de croissance et l'augmentation des ARNms codant pour p21^{Waf1}, comparativement aux cellules transfectées avec un vecteur vide. Enfin, l'utilisation d'un vecteur exprimant un dominant négatif TSC-22 réprimait l'inhibition de la prolifération cellulaire par PPAR γ , ainsi que l'induction de l'expression de p21^{Waf1} (Gupta et al., 2003). Ces données suggèrent que TSC-22 serait un composant important pour la signalisation en aval de l'activation de PPAR γ . La figure 22 récapitule les mécanismes potentiels par lesquels PPAR γ régulerait la progression du cycle cellulaire.

A ces effets de PPAR γ sur les CKI, viennent s'ajouter quelques données concernant d'autres acteurs de la progression du cycle cellulaire. Récemment, il a été montré dans les

cellules de la lignée Moser que l'activation de PPAR γ supprimait l'expression de la Cycline D1, un élément qui permet l'avancée de la cellule dans la phase de réplication en se liant aux Cdk's (figure 22). L'expression du gène codant pour le facteur de croissance EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) était également diminuée par PPAR γ . A noter que ces deux gènes sont surexprimés dans la plupart des cancers colorectaux (Chen et al., 2005)

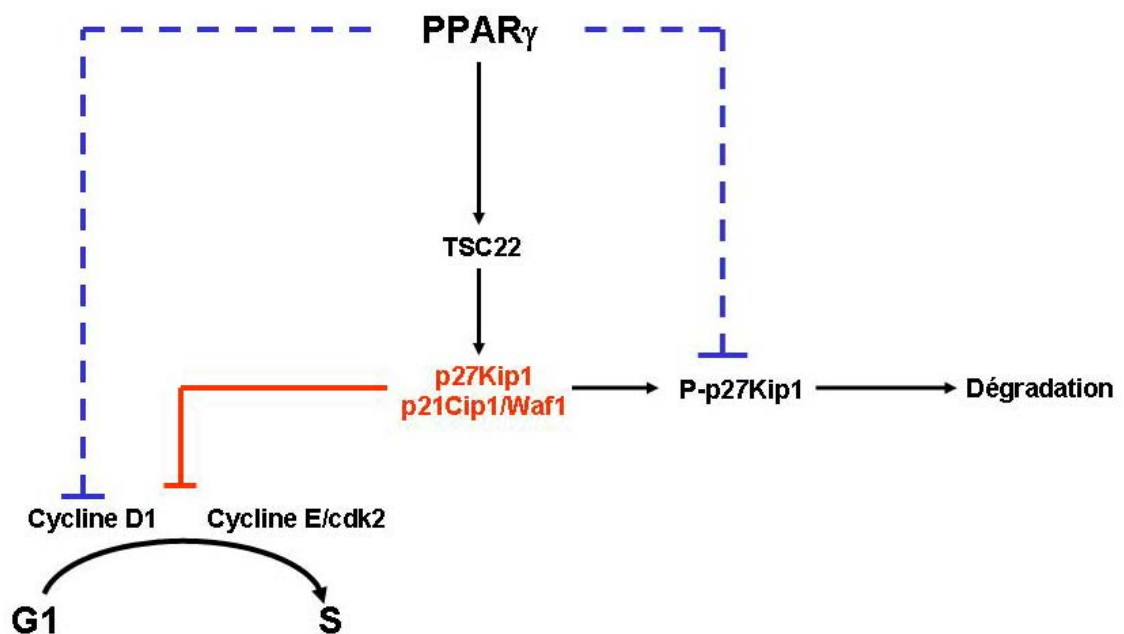


Figure 22 : Les mécanismes potentiels par lesquels PPAR γ régule la progression du cycle cellulaire.

1. 2. C. Adhésion cellulaire

La croissance des cellules épithéliales coliques est également régulée par leur capacité à adhérer à la matrice extracellulaire. L'équipe de Sunami a mis en évidence la capacité de la Troglitazone à agir sur le potentiel métastatique des cellules cancéreuses coliques humaines des lignées HT29 Clone 21 (HT29Cl21) et HT29Cl3 (Sunami et al., 2002). L'agoniste de PPAR γ induisait l'inhibition de la croissance cellulaire de façon dose dépendante, et réprimait l'expression du gène codant pour la métalloprotéinase MMP-7, ou matrilysine. Cette protéine est sur-exprimée dans environ 90% des cancers colorectaux. Elle serait un facteur important de l'invasion stromale, mais pourrait aussi avoir un rôle dans les stades précoces de la cancérogénèse. Son expression serait en partie induite par le complexe β -caténine/Tcf-4 (cf prochain paragraphe) (Wong et Pignatelli, 2002).

1. 2. D. Lien entre PPAR γ et β -caténine dans les cellules épithéliales coliques

Un facteur essentiel lié à la cancérogénèse colique est la protéine β -caténine. Dans la cellule normale, elle est complexée dans le cytoplasme avec la protéine APC et la kinase glycogène synthase-3 (GSK-3). Cette dernière induit la phosphorylation des deux autres ce qui entraîne leur dégradation par la voie du protéasome. L'excès de β -caténine s'hétérodimérise avec le facteur de transcription T-cell factor 4 (Tcf-4), le complexe est transloqué au noyau où il régule l'expression de gènes contribuant à la tumorigénèse colique. En plus de ce rôle transcriptionnel, la β -caténine régule aussi l'adhésion cellule-cellule par son association avec la E-cadhérine à la membrane plasmique. Cette dernière est impliquée à la fois dans l'initiation des tumeurs et dans la formation de métastases (Wong et Pignatelli, 2002).

Peu de données *in vitro* existent sur le fait que l'activation du récepteur PPAR γ puisse avoir des conséquences sur l'activité de la β -caténine dans les cellules épithéliales coliques humaines. Il semblerait que dans les cellules HT29 en culture, la β -caténine soit localisée indifféremment dans le noyau et dans le cytoplasme. Le traitement avec la Troglitazone induirait un shift de la β -caténine à la membrane plasmique, et une baisse du taux de phosphorylation de celle-ci. Ceci serait associé à l'augmentation de l'expression de la E-

cadhérine à ce locus (Yoshimuzi et al., 2004). De plus, l'expression des ARNms codant pour la β -caténine serait augmentée par la Rosiglitazone et la Troglitazone dans ces cellules (Lefebvre et al., 1998).

1. 2. E. Apoptose

Outre l'arrêt de la croissance cellulaire, les agonistes de PPAR γ peuvent induire l'apoptose des cellules cancéreuses épithéliales coliques humaines (Yang et al., 2001 ; Kato et al., 2004). La modulation de l'expression des gènes reliés à l'apoptose par les ligands de PPAR γ a été étudiée dans les cellules cancéreuses coliques humaines de la lignée HT29 (Shimada et al., 2001). La 15dPGJ2 et la Troglitazone supprimaient la synthèse d'ADN dans ces cellules, alors que les ligands de PPAR α et PPAR β n'avaient pas d'effet significatif sur celle-ci. L'induction de la mort cellulaire par les deux agonistes de PPAR γ était dose dépendante et associée avec une augmentation de la fragmentation de l'ADN. L'utilisation d'un inhibiteur de caspase empêchait cette mort cellulaire. Combinant puces à ADN et RT-PCR quantitative, les auteurs ont pu identifier certains des gènes reliés à l'apoptose dont l'expression était modulée par la 15dPGJ2 et la Troglitazone. Ainsi, l'expression de c-myc était régulée négativement par les ligands de PPAR γ , celles de c-jun et du facteur de transcription GADD153 étaient régulées positivement. C-myc est un oncogène qui contrôle la prolifération cellulaire et l'apoptose. C'est une cible majeure de la voie APC/ β -caténine. L'activation de la signalisation induite par PPAR γ semblerait donc compenser la dérégulation de l'expression de c-myc causée par la mutation d'APC dans les cellules tumorales coliques (Theocharis et al., 2004). C-jun et GADD153 sont des agents inducteurs de l'arrêt de la croissance cellulaire et de l'apoptose.

II. PPAR_γ en tant que cible pour le traitement du cancer colorectal : la controverse

II. 1. Des résultats contradictoires dans les modèles animaux

II. 1. A. Les modèles animaux de cancérogenèse colorectale

II. 1. A. a. Les rats AOM

Les rongeurs comme le rat développent peu de cancers colorectaux de façon spontanée. L'administration d'agents carcinogènes est donc nécessaire pour induire la formation de tumeurs colorectales. Les agents généralement utilisés sont des dérivés de la diméthylhydrazine. Celle-ci est métabolisée par le rat en azoxyméthane (AOM), d'où la désignation de ces animaux. Les tumeurs induites par l'AOM possèdent de nombreux points communs avec les tumeurs colorectales humaines sur le plan histopathologique. Comme chez l'homme, elles portent souvent des mutations sur des gènes suppresseurs de tumeurs comme K-ras, ou sur le gène codant pour la β -caténine. Par contre, à l'inverse des tumeurs humaines, elles présentent peu de mutation du gène *apc* (15%) et ont peu tendance à former des métastases (Corpet et Pierre, 2003).

II. 1. A. b. Les souris Nude xénogreffées

Les souris Nude ont été utilisées à l'origine comme modèles pour l'étude des déficiences immunologiques dans la réponse cellulaire. Ce sont des souris athymiques de façon congénitale. Elles possèdent un thymus vestigial qui est incapable de produire des lymphocytes T matures (Pelletier et Montplaisir, 1975). Cette déficience immunitaire permet de greffer des cellules tumorales à ces souris, qui ne les rejettent pas. Les cellules forment alors de véritables tumeurs dont il est facile d'observer la croissance.

II. 1. A. c. Les souris APC^{Min}

Les souris APC^{Min} portent une mutation inactivatrice sur le gène *apc*, de façon similaire aux patients atteints de PAF ou de cancer colorectal sporadique. Ce modèle animal mime le développement rapide de polypes adénomateux qui affecte les humains présentant une mutation germinale du gène *APC*. Les tumeurs des souris APC^{Min} ne présentent pas de mutation sur d'autres gènes suppresseurs de tumeurs comme *K-ras* ou p53. Depuis la

découverte de la première souris APC^{Min} , mutée sur le gène APC en position 850, d'autres souches de souris génétiquement modifiées ont été générées. Il existe donc plusieurs types de souris APC^{Min} portant des mutations germinales du gène APC à des positions différentes (exemple, en position 1638 pour la souris $APC^{+/1638N}$) (Corpet et Pierre, 2003).

II. 1. B. PPAR γ dans les modèles animaux

II. 1. B. a. Des effets antinéoplastiques chez le rat AOM et la souris Nude

In vivo, les activités anti-néoplastiques de PPAR γ ont été retrouvées chez le rat AOM et la souris Nude xéno greffée. L'administration de Troglitazone aux rats AOM réduisait de façon significative le nombre de foyers de cryptes aberrantes (FCA) (Tanaka et al., 2001). Cependant, il n'est pas su actuellement dans ce modèle si ces effets s'étendent à la réduction du nombre d'adénocarcinomes dans le colon. La Troglitazone entraînait également la diminution du volume de tumeurs xéno greffées chez la souris Nude (tableau 5 pour récapitulatif) (Sarraf et al., 1998). Le traitement avec la Troglitazone ne provoquait pas de changement rapide, mais un ralentissement graduel de la croissance tumorale. Cet effet statique pouvait être mis en parallèle avec celui observé *in vitro* en culture cellulaire, et reflétait probablement la maturation des cellules épithéliales coliques dans les tumeurs chez ces souris.

II. 1. B. b. Des effets promoteurs de la cancérogenèse chez les souris APC^{Min}

De façon très contradictoire, il a été montré que les ligands de PPAR γ favorisaient la tumorigenèse dans le colon des souris APC^{Min} (tableau 5). Deux groupes indépendants ont indiqué que la Rosiglitazone et la Troglitazone augmentaient légèrement le nombre de polypes coliques, la moyenne passant de un polype pour les souris contrôles à trois pour les souris traitées (Lefebvre et al., 1998 ; Saez et al., 1998). La taille des polypes coliques augmentait également, et sur le plan morphologique ils présentaient des anomalies cytologiques et architecturales, caractéristiques d'adénocarcinomes. Aucun effet n'était observé sur le nombre et la taille des polypes au niveau de l'intestin grêle. Ces effets ressemblent à ceux obtenus lorsque ces souris sont nourries avec des régimes riches en graisse. Les acides gras étant des activateurs endogènes de PPAR γ , le récepteur aurait pu agir en tant que lien moléculaire entre ceux-ci et la cancérogenèse. Cependant, il existe des

différences importantes entre ces deux types de traitement : les souris APC^{Min} soumises à un régime gras présentent des augmentations significatives du nombre de polypes, et ce à la fois dans l'intestin grêle et le colon (Gupta et al., 2002). Ces deux études se basent exclusivement sur la Troglitazone et la Rosiglitazone. Plus récemment, dans le même modèle de souris, il a été indiqué que la Pioglitazone diminuait légèrement le nombre de polypes coliques, et de façon significative (63 à 69%) celui des polypes de l'intestin grêle (tableau 5) (Niho et al., 2003). Les effets observés avec les TZDs chez les souris APC^{Min} sont donc contradictoires et peu importants au niveau du colon. De plus, l'expression de $PPAR\gamma$ le long du tractus digestif est loin d'être majoritaire dans l'intestin grêle. Il est donc possible d'imaginer que ces résultats ne soient pas reliés à l'activation de $PPAR\gamma$.

II. 1. B. c. Données obtenues à partir des souris $PPAR\gamma^{+/-}$

Une autre explication possible pour ces divergences réside dans l'hypothèse que les conséquences de l'activation de $PPAR\gamma$ soient dépendantes de la présence de mutation du gène codant pour la protéine APC. L'équipe de Girnun a utilisé des souris hétérozygotes pour $PPAR\gamma$ ($PPAR\gamma^{+/-}$) et réalisé des croisements de celles-ci avec des souris $APC^{+/1638N}$ (Girnun et al., 2002). Dans un premier temps, les auteurs ont observé que les souris $PPAR\gamma^{+/-}$ étaient significativement plus sensibles à la cancérogenèse colique induite par l'AOM que les souris $PPAR\gamma^{+/+}$ (tableau 5). Ceci démontrait clairement que $PPAR\gamma$ est un suppresseur de la cancérogenèse colorectale, et que l'haplo-insuffisance au locus *Ppar γ* peut accroître la sensibilité vis-à-vis de la cancérogenèse induite chimiquement. Dans un second temps, la seule perte de l'expression de $PPAR\gamma$ suffisait à observer une augmentation significative de l'expression de la β -caténine dans l'épithélium colique, comparée aux niveaux observés chez les souris $PPAR\gamma^{+/+}$. Seulement, une fois que la formation des polypes était accomplie sous l'effet de l'AOM, il n'apparaissait aucune différence de niveau d'expression de la β -caténine entre les deux génotypes. Ces données suggéraient que $PPAR\gamma$ agisse comme un suppresseur de tumeur en contrôlant les niveaux de β -caténine dans l'épithélium colique, et ce uniquement dans les stades précoces de la cancérogenèse colique. Enfin, les souris $APC^{+/1638N} : PPAR\gamma^{+/+}$ et les souris $APC^{+/1638N} : PPAR\gamma^{+/-}$ ne présentaient pas de différence de niveau d'expression de β -caténine. De plus, la tumorigenèse était équivalente pour ces deux génotypes. Le récepteur ne semble donc pas avoir d'effet sur les niveaux de β -caténine en présence d'un dysfonctionnement préexistant de la protéine APC. Ces données suggèrent que la présence

d'une voie APC normale et fonctionnelle serait donc essentielle au maintien de bas niveaux de β -caténine par PPAR γ .

L'utilisation de souris hétérozygotes pour PPAR γ a permis de trouver un consensus concernant le rôle du récepteur dans le cancer du colon. Chez les animaux qui présentent des altérations de la voie APC, la modification de l'activité de PPAR γ ne serait pas efficace pour contrôler l'expression de la β -caténine et donc la formation subséquente de tumeurs. Cependant, les agonistes de PPAR γ sont efficaces pour réguler la prolifération de lignées cellulaires mutées pour le gène APC (Sarraf et al., 1998). Les mécanismes par lesquels PPAR γ régule la β -caténine et le fait qu'une légère augmentation de la tumorigénèse soit causée par les ligands de PPAR γ dans les souris APC^{Min} sont des points qui restent à élucider.

Modèle	Agoniste	Effet	Référence
Rats AOM	Troglitazone	Diminution significative du nombre de FCA	Tanaka et al., 2001
Souris Nude xénogreffée	Troglitazone	Diminution significative du volume des tumeurs	Sarraf et al., 1998
Souris APC ^{Min}	Rosiglitazone	Augmentation du nombre de polypes coliques	Lefebvre et al., 1998
	Troglitazone		Saez et al., 1998
	Pioglitazone	Diminution du nombre de polypes coliques, diminution significative du nombre de polypes dans l'intestin grêle	Niho et al., 2003
Souris PPAR γ ^{+/-}	-	Sensibilité accrue à la cancérogenèse induite par AOM	Girnun et al., 2002

Tableau 5 : Effets des agonistes de PPAR γ dans les modèles animaux de cancérogenèse colorectale.

II. 2. Les résultats obtenus chez l'homme

II. 2. A. Récemment, des résultats ex-vivo

Le problème de la relevance des modèles animaux a été posé et l'interprétation chez l'homme de ces résultats est encore très difficile à réaliser. Le rôle des ligands de PPAR γ dans le colon humain normal est encore inconnu. Une étude préliminaire intéressante a été menée récemment. Dans celle-ci, des cultures à court terme de cellules épithéliales coliques humaines normales étaient établies à partir de biopsies obtenues chez 42 patients présentant une coloscopie normale (Matthiessen et al., 2005). Les cellules normales exprimaient PPAR γ et celui-ci était fonctionnel. Les agonistes de PPAR γ n'avaient pas d'effet sur la viabilité cellulaire, mais ils inhibaient la prolifération de 25%. Ces résultats *ex-vivo* apportent un argument supplémentaire en faveur du rôle anti-prolifératif des ligands de PPAR γ plutôt que d'un rôle promoteur de la cancérogenèse dans le colon normal humain.

II. 2. B. Inefficacité des TZDs pour le traitement du cancer colorectal

Une équipe a pu tester l'efficacité de la Troglitazone dans le traitement du cancer colorectal à un stade métastatique chez l'homme (Kulke et al., 2002). Celle-ci a été administrée oralement à 25 patients. Si le traitement était bien toléré, aucune réponse tumorale n'a été observée. Il apparaissait donc que la Troglitazone n'était pas un agent actif pour le traitement de ce type de cancer. Cette étude est actuellement la seule effectuée chez l'homme atteint de cancer colorectal. Les TZDs se sont déjà révélées efficaces pour le traitement d'autre types de cancer, comme les liposarcomes (Demetri et al., 1999). Ces résultats décevants pouvaient s'expliquer dans un premier temps par le fait que les patients de cette étude étaient tous à un stade avancé de cancer colorectal. L'effet des TZDs sur des cancers à des stades plus précoces reste à tester. Dans un deuxième temps, il est possible d'imaginer que des altérations fonctionnelles de PPAR γ existent dans le contexte du cancer colorectal. Ces altérations peuvent correspondre à une dérégulation de l'expression du récepteur, ou bien à des mutations du gène codant pour celui-ci.

II. 3. Expression et altérations de PPAR γ dans le cancer colorectal

Les expériences menées à partir des cultures de cellules cancéreuses coliques humaines et des modèles animaux tendent fortement à amener à considérer PPAR γ comme un suppresseur de tumeur. Ceci suggérerait que son expression et/ou sa fonction pouvaient être altérées dans les tumeurs colorectales.

II. 3. A. Expression de PPAR γ dans les tumeurs colorectales humaines

Les données concernant l'expression de PPAR γ dans les cancers colorectaux chez l'homme sont peu nombreuses et quelque fois contradictoires. Dans les polypes coliques de patients atteints d'acromégalie, les niveaux de messagers et de protéine PPAR γ sont inférieurs à ceux détectés dans la muqueuse colique saine adjacente. Ceci amenait les auteurs à considérer le récepteur comme un agent suppresseur de tumeur (Bogazzi et al., 2003). Chez les patients atteints de cancer colorectal, les patrons d'expression de PPAR γ semblent hétérogènes. Comparativement à la muqueuse normale, les niveaux du récepteur peuvent être augmentés, diminués, ou équivalents dans les tumeurs colorectales (Feilchenfeldt et al., 2003).

Ces résultats ont été obtenus dans des cancers établis. Si des altérations de l'expression de PPAR γ existent, il est possible d'imaginer qu'elles constituent un événement précoce de la cancérogenèse colique. Récemment, une équipe s'est intéressée à l'expression du gène codant pour PPAR γ dans la muqueuse colique normale d'un point de vue morphologique, chez des individus ayant une histoire familiale de cancer sporadique, mais qui présentaient une coloscopie normale (Hao et al., 2005). L'expression de PPAR γ était diminuée de façon significative dans ces muqueuses par rapport aux contrôles issus d'individus sains sans antécédents familiaux. L'altération de l'expression du récepteur pourrait alors constituer un événement précoce prédisposant à la cancérogenèse colorectale.

II. 3. B. Mutations de PPAR γ dans les cancers colorectaux humains

Plusieurs recherches de mutations LOF (Loss Of Function) au niveau du locus *Ppar γ* dans les cancers colorectaux humains ont été menées. En 1999, Sarraf et ses collaborateurs rapportent que 8% des tumeurs colorectales primaires contenaient de telles mutations,

ponctuelles, sur un allèle du gène codant pour PPAR γ (Sarraf et al., 1999). Ils identifiaient au niveau des exons 3 et 5 quatre mutations uniques sur un ensemble de 55 tumeurs colorectales : une non-sens, deux faux-sens, un décalage de cadre de lecture (ou ORF pour Open Reading Frame). Ces altérations affectaient la fonction de PPAR γ et n'étaient pas trouvées dans les leucocytes du sang périphérique, indiquant que ces mutations étaient somatiques. Pour la plupart des gènes suppresseurs de tumeurs, la mutation d'un allèle est associée à la perte de l'autre allèle. Ce n'est pas le cas pour PPAR γ dans le cancer du colon, où un mutant PPAR γ porte également un allèle valide. Ceci suggère que la protéine altérée pourrait exercer un effet dominant négatif sur le récepteur fonctionnel, ou bien que la perte de 50% de l'expression de PPAR γ serait à l'origine de la promotion de la cancérogenèse colique (Koeffler, 2003).

Mais depuis ces observations, des études supplémentaires ont été menées, et la fréquence des mutations de PPAR γ dans le cancer du colon n'est pas claire. Sur 55 (Hisatake et al., 2000) et 58 (Ikezoe et al., 2001) tumeurs colorectales humaines supplémentaires, aucune mutation de PPAR γ n'a été détectée. De la même façon, les polypes coliques des patients acromégaliques ne sont pas associés à des mutations de PPAR γ (Bogazzi et al., 2003). Il semble donc que les mutations du gène codant pour PPAR γ peuvent survenir dans les cancers colorectaux, mais elles sont excessivement rares. Cependant, dans la plupart de ces études, l'intérêt a été porté sur une partie du gène codant pour PPAR γ , notamment les exons 3 et 5. Quoiqu'il en soit, ces résultats semblent s'appliquer à de nombreux cancers : aucune mutation de PPAR γ n'a été détectée dans les cancers du sein, les glioblastomes, les lymphomes (Posch et al., 2004), ou dans les adénocarcinomes de la jonction de l'oesophage (Wishoven et al., 2001).

II. 3. B. a. La mutation K422Q

Si d'une façon générale les agonistes de PPAR γ inhibent la prolifération cellulaire, certaines lignées cellulaires cancéreuses coliques humaines sont insensibles à ceux-ci *in vitro*. Afin de cibler une mutation de PPAR γ potentiellement existante dans ces lignées, une équipe a séquencé le gène codant pour le récepteur dans ces cellules (Gupta et al., 2003). Sur 8 lignées testées, 4 étaient réfractaires à l'inhibition de la prolifération cellulaire par les ligands de PPAR γ . Toutes portaient la même mutation au niveau de l'exon 6 du gène codant pour PPAR γ : la mutation K422Q (figure 23B). Le codon K422 est situé au niveau de l'hélice α H9 du LBD ; il est localisé à la surface du récepteur, exposé aux solvants. Il est possible qu'il soit

impliqué dans les interactions de PPAR γ avec des cofacteurs. La mutation K422Q n'entraînait pas de défaut de la liaison du récepteur à l'ADN, ni de l'hétérodimérisation avec le récepteur RXR. Ajouté à ceci, le récepteur PPAR γ K422Q était transcriptionnellement actif dans les cellules épithéliales coliques. Par contre, seule la transduction rétrovirale de la forme sauvage, non mutée de PPAR γ dans les cellules mutées K422Q pouvait restaurer l'inhibition de la croissance et la différenciation cellulaire (figure 23C).

Il semble donc que le codon 422 soit une partie nécessaire pour permettre au récepteur PPAR γ d'induire la différenciation terminale des cellules épithéliales coliques. Ces résultats ont été obtenus *in vitro*, il n'est pas su actuellement si la mutation K422Q est exprimée dans les cancers colorectaux humains.

A.



B.

PPAR γ ligand sensitivity and PPAR γ receptor mutations in a panel of human colorectal cancer cell lines

Cell line	% Growth ^a	Codon altered
HCT 15	103 $\pm$ 4.0	K422Q
MIP 101	96.0 $\pm$ 2.1	K422Q
Clone A	98.2 $\pm$ 3.0	K422Q
COLO 205	95.3 $\pm$ 1.8	K422Q
MOSER	44.4 $\pm$ 0.5	
HCT 116	66.1 $\pm$ 1.1	
HCA-7	69.0 $\pm$ 2.5	
HT-29	62.3 $\pm$ 1.8	

C.

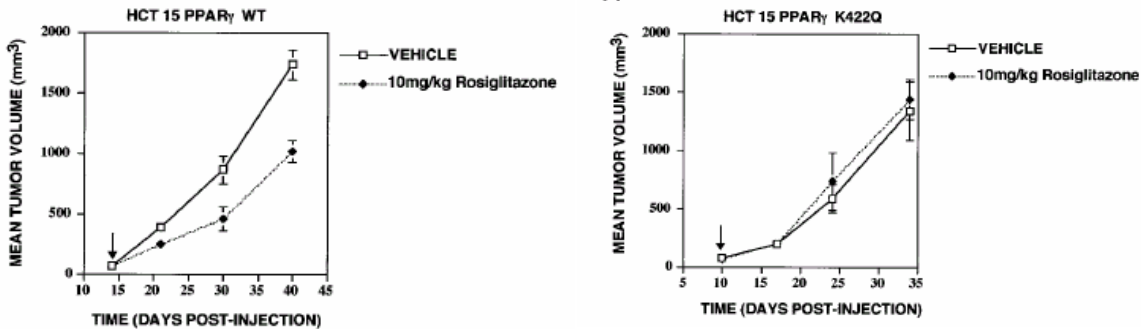


Figure 23 : Identification de la mutation K422Q *in vitro* dans des lignées cellulaires cancéreuses coliques humaines (Gupta et al., 2003).

(A) Analyse de l'expression de la protéine PPAR γ dans 8 lignées cellulaires cancéreuses coliques humaines par western Blot. Toutes exprimaient la protéine. (B) Quatre d'entre elles portaient la mutation K422Q sur l'exon 6 du gène codant pour PPAR γ (encadré rouge). (C) Lorsque la lignée HCT15, portant la mutation K422Q était xéno greffée chez la souris nude, l'administration de Rosiglitazone n'avait aucun effet sur la prolifération tumorale (HCT15 PPAR γ K422Q). Par contre la xéno greffe de la lignée HCT15 transfectée de façon stable avec le gène codant pour PPAR γ sauvage (HCT15 PPAR γ WT) était sensible à l'effet anti-prolifératif exercé par la Rosiglitazone.

II. 3. C. Altérations de la régulation de l'expression de $PPAR\gamma$ dans tumeurs colorectales humaines : le dominant négatif ORF4

Un autre mécanisme entraînant la perte de fonction d'un gène dans la tumorigenèse a été identifié. Il s'agit de défauts d'épissage alternatif conduisant à la production de protéines non fonctionnelles (Venables, 2004). Ces 20 dernières années, de nombreuses études ont relaté des phénomènes d'épissage alternatif spécifiques des cancers, en l'absence de mutations des gènes concernés. Ceci concerne de nombreux gènes codant pour des facteurs de transcription, des transducteurs de signal, et des composants de la matrice extracellulaire. Les mutations de $PPAR\gamma$ dans les cancers colorectaux sont rares, il a donc été émis l'hypothèse que si la perte de fonction de $PPAR\gamma$ dans les tumeurs colorectales humaines existait, elle pouvait être la conséquence d'un tel phénomène.

Récemment, un nouveau transcrit $PPAR\gamma$ contenant une zone de lecture dans l'intron 4 avec un codon stop a été identifié. Celui-ci a été nommé ORF4 (Sabatino et al., 2005). La protéine correspondante avait perdu l'ensemble de son LBD, codée par les exons 5 et 6 du gène $PPAR\gamma$ (figure 24).

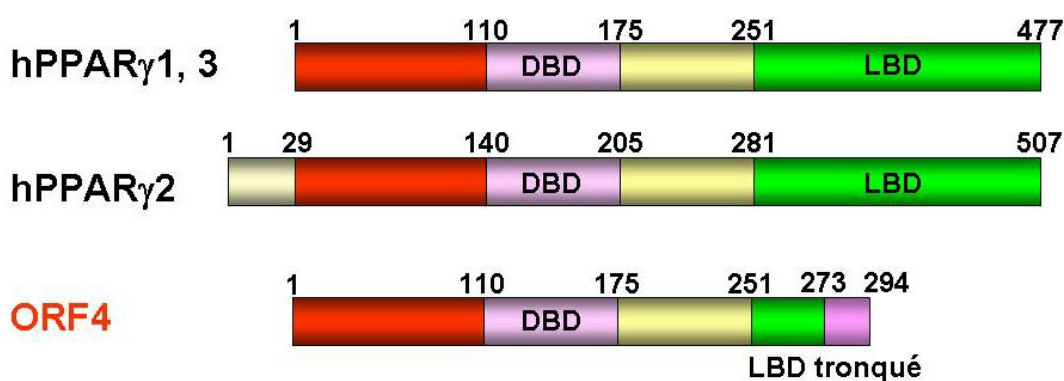


Figure 24 : Représentation schématique des protéines $PPAR\gamma$ 1, 2, et 3 et de la protéine ORF4 chez l'homme (d'après Sabatino et al., 2005).

Le transcrit ORF4 contient un codon stop situé dans l'intron 4 du gène $hPPAR\gamma$. Il est à l'origine d'une protéine non fonctionnelle, qui a perdu presque entièrement son domaine de liaison au ligand (LBD). DBD : DNA Binding Domain. Les chiffres représentent les positions des acides aminés qui délimitent chaque domaine.

ORF4 était détecté dans les cellules épithéliales coliques des lignées Caco2 et HT29, à des niveaux équivalents à ceux de PPAR γ . Cloné dans des vecteurs d'expression, le cDNA ORF4 était traduit en une protéine dont l'expression prédominait dans les noyaux des cellules. De plus, ORF4 avait non seulement perdu la capacité de transactiver un gène rapporteur en réponse à des ligands de PPAR γ , mais interférait de façon significative avec les propriétés de transactivation de PPAR γ . ORF4 avait également perdu la propriété d'inhiber la prolifération cellulaire et interférait avec la fonction inhibitrice de PPAR γ . De façon préliminaire, il a été montré que ORF4 était détectée dans les tissus cancéreux colorectaux humains. Sur 25 échantillons issus de cancers colorectaux sporadiques, 12 exprimaient ORF dans les tumeurs uniquement, 4 dans les tumeurs et la muqueuse saine adjacente. ORF4 n'était pas détectée dans les tissus coliques prélevés sur des patients sains.

Exprimée *in vivo*, la protéine ORF4 a perdu certaines propriétés de PPAR γ , et agit en tant que dominant négatif sur l'activité du récepteur fonctionnel *in vitro*. ORF4 pourrait donc jouer un rôle dans la pathogenèse des cancers colorectaux.

RECAPITULATIF ET PROBLEMATIQUE

Les PPARs sont des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils agissent comme des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de nombreux gènes cibles de façon à la fois dépendante et indépendante de la liaison d'un ligand. PPAR γ est fortement exprimé dans le colon, particulièrement au niveau des cellules épithéliales coliques différenciées qui font face à la lumière du tube digestif. Il a été impliqué dans le processus de la cancérogenèse colorectale. Des études effectuées dans le modèle de souris APC^{Min} l'ont décrit comme un inducteur de la formation des tumeurs colique. Mais de nombreux autres arguments contredisent ces résultats, et un nombre croissant d'évidences fait de ce récepteur nucléaire un agent suppresseur de tumeurs. Notamment, l'activité anti-proliférative des TZDs observée in vitro suggèrent que PPAR γ pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du cancer colorectal. Mais l'administration de Troglitazone à des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques n'avait aucun effet sur la progression de la maladie. Ce résultat décevant peut s'expliquer par le fait que des altérations fonctionnelles de PPAR γ existent dans le contexte du cancer colorectal, le rendant insensible à l'activation par ses agonistes. Le premier objectif de ce travail était de définir ces altérations de PPAR γ dans les cancers colorectaux.

Dans la synthèse bibliographique, nous avons vu que ces altérations peuvent consister en des mutations inactivatrices du gène codant pour PPAR γ . Récemment, l'une d'entre elles, la mutation K422Q, a été décrite in vitro au niveau de l'exon 6 de ce gène. Une première étape était donc de déterminer la fréquence de cette mutation dans les tumeurs coliques humaines. Aucune recherche de mutation au niveau de l'exon 6 n'ayant été décrite dans la littérature, il s'agissait également d'étendre nos investigations à l'ensemble de cet exon dans les tumeurs coliques humaines.

Les mutations inactivatrices du gène codant pour PPAR γ ne constituent pas la seule explication possible pour l'inefficacité des TZDs dans le traitement du cancer colorectal. Les altérations de PPAR γ peuvent aussi avoir des origines épigénétiques. Elles pourraient donc consister en une expression dérégulée de PPAR γ et/ou de ses cofacteurs. De plus, un variant d'épissage alternatif de PPAR γ , ORF4, est exprimé dans les tumeurs coliques humaines. Celui-ci agit comme un dominant négatif sur le récepteur normal et pourrait constituer une autre explication pour l'inefficacité des TZDs. Mais ses niveaux d'expression relatifs par rapport à PPAR γ normal dans les tumeurs colorectales humaines sont inconnus. La seconde étape de ce travail était donc d'analyser l'expression de PPAR γ , mais également celle de ces

principaux co-activateurs et du variant d'épissage ORF4 dans les cancers colorectaux humains.

Les mécanismes par lesquels PPAR γ agit restent encore à élucider. Notamment, de nombreux gènes cibles de PPAR γ n'ont pas encore été identifiés dans les cellules épithéliales coliques humaines. Parallèlement à ce travail, nous nous sommes donc attachés à rechercher de nouveaux gènes cibles de PPAR γ dans les cellules épithéliales intestinales. Nous avons pu mettre en évidence dans un modèle de cellules cancéreuses coliques humaines différenciées que les agonistes de PPAR γ régulaient l'expression d'un gène codant pour le transporteur des monocarboxylates, MCT1 (Monocarboxylate Transporter 1).

RESULTATS

RESULTATS

PARTIE I

RECHERCHE DE MUTATIONS AU NIVEAU DE
L'EXON 6 DU GENE CODANT POUR PPAR γ
DANS LES TUMEURS COLORECTALES
HUMAINES.

I. Introduction

Dans la synthèse bibliographique, nous avons vu que les études menées indiquent que les mutations du gène codant pour PPAR γ semblent constituer des événements rares dans les tumeurs colorectales humaines. Cependant, alors que le gène codant pour PPAR γ contient six exons dans sa séquence codante, la plupart des observations mentionnées dans la littérature ont été réalisées sur les exons 3 et 5. L'équipe de Gupta et coll. a identifié *in vitro* la mutation "perte de fonction" K422Q, sur l'exon 6 du gène codant pour PPAR γ . Les cellules qui présentaient cette altération perdaient leur sensibilité vis à vis des effets anti-prolifératifs et pro-différenciateurs des agonistes de PPAR γ . Cette mutation était donc un argument potentiel pour expliquer l'inefficacité des TZDs dans le traitement des patients atteints de cancer colorectal. Seulement, il n'existait pas d'information concernant l'existence de la mutation K422Q *in vivo*.

II. Objectif

Déterminer la fréquence de la mutation K422Q, inactivatrice du gène codant pour PPAR γ , dans les tumeurs coliques humaines.

III. Principe de la PCR par amplification spécifique d'allèle

Afin de détecter la mutation K422Q dans les échantillons de tumeurs, nous avons mis au point une méthode d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) spécifique d'allèle. La figure 27 en schématise le principe.

La mutation K422Q est hétérozygote et consiste en le remplacement d'une base adénine par une base cytosine au codon 422, sur l'exon 6 du gène *PPAR γ* . Nous avons dans un premier temps dessiné des oligonucléotides qui nous permettaient d'amplifier la région contenant le codon 422 de façon non spécifique de la mutation (Amorces S et AS, figure 25). Les PCR réalisées avec ce couple d'amorces servaient de contrôle positif pour chaque échantillon testé. Nous avons également dessiné une amorce anti-sens, l'amorce Q. Celle-ci était conçue pour s'hybrider spécifiquement sur le codon 422 muté. En effet, le nucléotide situé à l'extrémité 3' de l'amorce Q est une base guanine (G). L'amorce Q ne peut donc s'hybrider entièrement que sur le gène *PPAR γ* muté (figure 27). Les PCR effectuées avec le couple d'amorces Q et S ne conduisaient donc qu'à l'amplification de l'ADN muté au codon 422 uniquement. Ceci permettait la détection de la mutation.

Les deux PCRs, contrôle (S/AS) et spécifiques (S/Q), étaient réalisées en parallèle pour chaque échantillon d'ADN extrait de tumeurs coliques humaines.

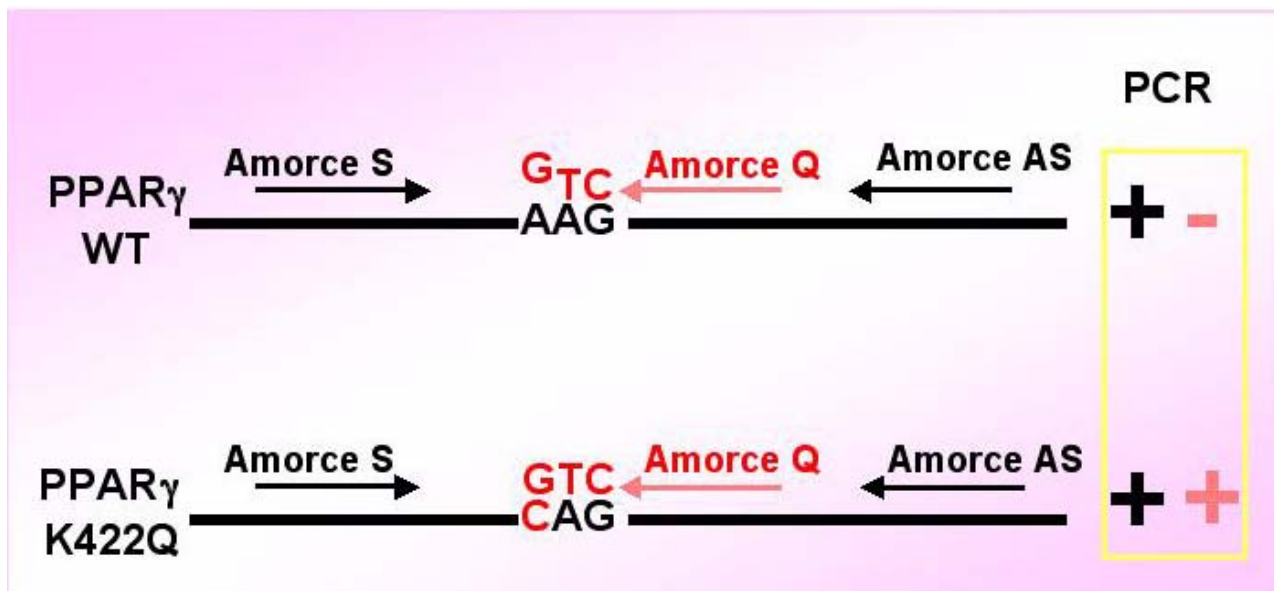


Figure 25 : Principe de l'amplification de la mutation K422Q par PCR spécifique d'allèle.

Article 1

**La mutation K422Q du gène codant
pour PPAR γ n'est pas responsable
de l'inefficacité de la Troglitazone
dans le traitement du cancer colorectal**

IV. Résultats marquants

Grâce à la technique de PCR en temps réel spécifique d'allèle que nous avons mis au point, nous avons pu analyser 170 tumeurs colorectales primaires et 12 métastases hépatiques de cancer colorectal. Nous n'avons détecté la mutation K422Q dans aucun de ces échantillons. Nous en avons conclu que si la mutation K422Q du gène codant pour PPAR γ existe dans les tumeurs colorectales chez l'homme, c'est un phénomène rare.

V. Question posée par ces résultats

L'équipe de Gupta a identifié *in vitro* la mutation K422Q, portée par l'exon 6 du gène PPAR γ . Nous avons dans un premier temps ciblé notre étude sur la détection *in vivo* de cette mutation ponctuelle. Mais il restait à déterminer si d'autres mutations touchaient l'exon 6 du gène codant pour PPAR γ dans les tumeurs colorectales humaines.

VI. Résultats complémentaires : recherche de mutations au niveau de l'exon 6 du gène *PPAR γ* dans des tumeurs colorectales primaires humaines

VI. 1. Méthode

Nous avons donc analysé par séquençage l'exon 6 du gène codant pour *PPAR γ* . Pour cela, nous avons travaillé à partir des échantillons d'ADN obtenus à partir de 40 des 170 tumeurs colorectales primaires utilisées pour la détection de la mutation K422Q. L'exon 6 du gène codant pour *PPAR γ* était tout d'abord amplifié dans ces échantillons par PCR. Puis les produits de PCR étaient purifiés et envoyés pour séquençage au LEPA (Laboratoire d'Etude des Polymorphismes de l'ADN) à Nantes.

VI. 1. A. Amplification de l'exon 6 du gène *PPAR γ* par PCR

Le couple d'amorce 6S (5'-CCCCTGTTGTGTTTTCCATA-3') et 6AS (5'-TGTTGGCAGTGGCTCAGGAC-3') a été utilisé pour amplifier l'exon 6 du gène *ppar γ* . Les conditions d'amplifications ont été optimisées en PCR semi-quantitative pour le thermocycleur PCR express (HybaidTM). Le mélange réactionnel était le même que celui utilisé dans l'article, il y était ajouté 5 μ L d'ADN génomique pour une concentration finale de 2ng.ml⁻¹. Les paramètres d'amplifications étaient également les mêmes, avec une température d'hybridation de 65°C. Chaque produit de PCR était ensuite déposé sur un gel d'électrophorèse (Ready to oneTM) afin de vérifier le bon fonctionnement des amplifications.

VI. 1. B. Analyse par séquençage

Les produits des PCRs étaient tout d'abord purifiés par centrifugation, afin d'éliminer les contaminants issus de l'amplification comme les doublets d'amorces. Après une nouvelle vérification des échantillons sur gel d'électrophorèse, les amplicons étaient analysés par séquençage automatique par le LEPA. La réaction de séquence utilisait les amorces 6S et 6AS.

VII. Résultats

Nous avons analysé 40 tumeurs colorectales primaires humaines issues de biopsies de patients. Nous n'avons détecté aucune mutation au niveau de l'exon 6 du gène codant pour PPAR γ .

VIII. Questions posées par ces résultats

Nous n'avons détecté la mutation K422Q ni aucune autre dans l'exon 6 du gène codant pour PPAR γ . Nos résultats sont en corrélation avec les observations réalisées jusque là, à savoir que les mutations du gène *PPAR γ* constituent un phénomène rare dans le contexte du cancer colorectal. Elles ne constitueraient donc pas un argument majeur pour expliquer l'inefficacité des TZDs dans le traitement de ce cancer. Mais d'autres types d'altérations de PPAR γ pouvaient exister dans le contexte du cancer colorectal chez l'homme. Les questions soulevées étaient donc les suivantes :

- Qu'en est-il de l'expression de PPAR γ dans les tumeurs colorectales humaines comparativement au colon sain ?
- Les niveaux d'expression des co-facteurs de PPAR γ sont-ils altérés dans ces tumeurs ?

RESULTATS

PARTIE II

ETUDE DE L'EXPRESSION DE PPAR_γ ET DE
SES PARTENAIRES DANS LES TUMEURS
COLIQUES CHEZ L'HOMME

I. Introduction

Nous venons de voir dans la partie I des résultats que les mutations du gène codant pour PPAR γ constituent des événements rares et ne sont donc pas un argument majeur pour expliquer l'inefficacité des TZDs dans le traitement du cancer colorectal. La fonction de PPAR γ dépend d'autres paramètres comme son niveau d'expression, le niveau d'expression de son partenaire principal de dimérisation RXR α , et ses interactions avec des co-activateurs. Ces derniers ont été présentés dans la synthèse bibliographique. Des résultats préliminaires ont montré que l'expression de PPAR γ semblait hétérogène dans les tumeurs coliques chez l'homme et que l'expression de son co-activateur PGC1 était diminuée dans ces mêmes tumeurs (Feilchenfeldt et al., 2004). Il était donc intéressant d'obtenir une analyse globale de l'expression des autres co-facteurs principaux de PPAR γ .

Un autre processus pouvant altérer la fonction de PPAR γ dans les tumeurs colorectales chez l'homme est l'épissage alternatif aberrant. La protéine ORF4, isoforme tronquée inactive de PPAR γ , décrite dans la synthèse bibliographique, est issue de ce mécanisme. L'équipe qui l'a identifiée a caractérisé son effet dominant négatif sur la fonction du récepteur PPAR γ normal. Ils ont également observé que ORF4 était exprimé dans les cancers colorectaux humains (Sabatino et al., 2005). Mais ses niveaux d'expression relatifs par rapport au récepteur normal n'ont pas été décrits dans les tumeurs coliques humaines.

II. Objectifs

- Quantifier l'expression de PPAR γ dans les cellules épithéliales cancéreuses coliques et dans les cellules saines chez l'homme.
- Quantifier les niveaux d'expression des co-activateurs de PPAR γ dans les cancers colorectaux humains.
- Comparer les niveaux relatifs d'expression de PPAR γ et d'ORF4 dans les cancers colorectaux humains.

Article 2

**L'expression de PPAR γ et de ses
co-activateurs est altérée dans
les carcinomes coliques humains**

Altered expression of PPAR γ and its co-activators in human colon carcinoma

Delphine Bouancheau, Anne Jarry, Claire Toquet, Damien Masson, Christian L. Laboisie, Marc G. Denis ¹

INSERM U539, Nantes University Hospital, Nantes, France

¹ Corresponding author. Present address: UMR CNRS 6061, Faculté de Médecine, 2 avenue Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France. E-mail address : marc.denis@univ-rennes1.fr.

2 The abbreviations used are: PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; CBP, CREB-binding protein; PRIP, peroxisome proliferator-activated receptor-interacting protein; p300, adenovirus E1A-binding protein; PGC1, PPAR γ coactivator 1; SRC1, steroid receptor coactivator-1; PBP, PPAR-binding protein.

Abstract

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) agonists have been demonstrated to exert an inhibitory effect on cell growth, and to induce cell differentiation and apoptosis of colorectal cancer cells. PPAR γ was therefore proposed as a therapeutic target. In an effort to evaluate the significance of alterations in the expression of PPAR γ and its co-activators in colon cancer, we have determined the expression level of PPAR γ , RXR α and 6 co-activators in a series of 18 human colon tumors by real-time PCR. PPAR γ expression was found to be heterogeneous between tumors. RXR α , PGC-1 α , and SRC1 were often down-regulated. In contrast, PRIP, p300, PBP and CBP were up-regulated in most tumors. We have also measured the expression level of a recently described variant of PPAR γ that functions as a dominant negative (ORF4), and found it to be over-expressed in the majority of these tumors. We propose that deregulation of PPAR γ function in colon tumors involves aberrant expression of PPAR γ and of its co-activators.

Keywords: Colon cancer; PPAR γ ; co-activator; splicing variant; dominant negative

Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcriptional factors. Numerous studies showed that PPAR γ is also expressed in a variety of malignant tissues including prostate, breast, and colon. The implication of PPAR γ in colorectal carcinogenesis is still debated. In fact, contrasting with the observation of an increase in the number and burden of naturally occurring intestinal tumors in APC^{Min} mice fed with a diet containing a PPAR γ agonist [1,2], several *in vitro* and *in vivo* models suggest that PPAR γ ligands have colonic anticancer activity. First, treatment of colorectal carcinoma cell lines with PPAR γ ligands induces cell-cycle blockade resulting in the inhibition of cell proliferation, stimulates cell differentiation and/or promotes cell death [3,4]. *In vivo*, thiazolidinediones decrease the development of tumors derived from colon cancer cells in a xenograft model [5] and are able to reduce the number of chemically-induced aberrant crypt foci, which are early precursor lesions of colon cancer [6]. Consistent with these findings, PPAR γ heterozygous knockout mice (PPAR $\gamma^{+/-}$) have an increased susceptibility to develop tumors, including colon tumors, after administration of a carcinogen [7]. The antiproliferative activity of PPAR γ ligands observed in many human colorectal cell lines suggests that they may have promise as anticancer drugs. However, the expression of wild-type functional PPAR γ in cancer cells is a prerequisite for a successful treatment with PPAR γ agonists. Unfortunately, no significant effect could be observed when troglitazone was administered in patients with metastatic colorectal cancer included in a phase II clinical trial [8]. This disappointing result could be explained by a loss-of-function mutation in the *PPAR γ* gene, or a defect in expression.

Mutations of PPAR γ have been reported in very few colon cancers. Sarraf *et al.* [9] examined 55 primary sporadic colorectal carcinoma samples for somatic mutations. Four somatic mutations were found, that affect function of PPAR γ . By contrast, Ikezoe *et al.* [10] did not find any mutation in the 58 colorectal tumors examined. Finally, a previously unidentified monoallelic point mutation located in exon 6 at codon 422 (K422Q) identified by Gupta *et al.* [11] was not found in a series of 170 colorectal tumors [12].

The conclusion therefore is that somatic mutations in the *PPAR γ* gene are exceedingly rare events in colon cancer cells. The resistance to troglitazone in clinical trials might be due to effects other than genetic alterations. The transcriptional activity of PPAR γ depends not

only on its expression level, but also on its interaction with co-activators [13,14]. These include the p160/steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) family with three members (SRC-1, TIF2/GRIP1/SRC2, and pCIP/ACTR/AIB1/ RAC3/TRAM1/SRC-3), CREB-binding protein (CBP) [15], adenovirus E1A-binding protein p300 [16], and PPAR-binding protein PBP (TRAP220/DRIP205) [17,18], PGC-1 α [19], and PRIP/ASC-2/RAP250/TRBP/NRC [20,21]. They all contain one or more conserved LXXLL motif, which has been found to be necessary and sufficient for ligand-dependent interactions with AF-2 domain present in the C-terminal ligand-binding domain of the nuclear receptor. These co-activators exert their nuclear receptor transactivation enhancing function by forming large multiprotein complexes.

In an effort to evaluate the significance of alterations in the expression of PPAR γ and its co-activators in colon cancer, we have measured the expression of PPAR γ , RXR α and 6 co-activators in a series of 18 human colon tumors by real-time PCR. We also measured the level of a recently described variant of PPAR γ that functions as a dominant negative. We propose that deregulation of PPAR γ function in colon tumors involves aberrant expression of PPAR γ and of several co-activators.

Materials and methods

Tumor samples. Eighteen consecutive patients with primary colon carcinomas treated at the Department of Surgery (Centre Hospitalier Universitaire of Nantes, France) were included in the study. There were 12 men and 6 women with a median of 74 years (mean 72,1 ; range 59 – 83). Patients condition was assessed according to the system of staging primary tumor / regional lymph nodes / distant metastasis (TNM) described in the AJCC Cancer Manuel. The World Health Organization Classification of tumors was used to determine histological classification. The 18 patients were classified into the TNM stages as follows: stage 1, 2 patients; stage 2, 10 patients; stage 3, 4 patients; stage 4, 2 patients. Histologically, the tumors were divided into 7 well differentiated, 9 moderately differentiated, 2 poorly differentiated adenocarcinomas. Ten tumors originated in the right colon, 1 in the transverse colon, 3 in the left colon and 4 in the sigmoid colon. None of these patients underwent radiotherapy or chemotherapy before surgery. For these 18 patients, snap frozen tumor samples and paired normal colonic tissue were available.

cDNA synthesis and real time PCR. Total RNA was extracted from tumor samples and paired normal colonic tissue using TRIzol[®] protocol (<http://www.invitrogen.com/search.cfm>), and the Fast Prep cell disrupter (Bio 101). cDNA were synthesized as previously detailed [22].

The amplification conditions of the different templates were optimized for the Rotorgene 2000 instrument (Corbett Research). Primers were designed from the sequence of the human cDNAs using the GeneJockey software. They were selected for binding to separate exons to avoid false positive results arising from amplification of contaminating genomic DNA. We verified that all amplifications did not yield any product when reverse transcriptase was omitted in the cDNA synthesis reaction. The sequences of these primers are presented in Table 1. PCR amplifications were performed using Titanium Taq DNA polymerase (Clontech, Palo Alto, CA, USA). The reaction mixture contained 2 µl of the supplied 10x Titanium Taq PCR buffer (containing magnesium chloride), 2 µl of a 1/1,000 dilution of SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France), 1 µl of each primer (0.4 µM each), 0.2 µl of Titanium Taq DNA polymerase, 0.5 µl of dNTPs (10 mM each) and PCR-grade water to a volume of 10 µl. Microtubes (0.2 ml) were loaded with 10 µl of this master mix and 10 µl of the template (cDNA diluted 1/20) and the run was initiated. The cycling conditions were as follows: denaturation for 5 min at 95°C; amplification for 35

cycles, with denaturation for 5 s at 95°C, annealing for 5 s and extension for 5 s at 72°C. To exclude primer-dimer artifacts, fluorescence was not measured at the end of the extension step, but a separate detection step was added (10 s) at a temperature above the melting point of primer-dimers and below the melting point of the specific PCR product (Table 1). After completion of the cycling process, samples were subjected to a temperature ramp from 63°C to 99°C, with continuous fluorescence monitoring for melting curve analysis. For each amplification, apart from primer-dimers, a single narrow peak was obtained at the expected melting temperature, indicating specific amplification without significant byproducts. A standard curve was generated with serial dilutions of pooled cDNAs samples. The reference curve was constructed by plotting the relative amounts of these dilutions vs the corresponding Ct (threshold cycle) values. The correlation coefficient of these curves was always greater than 0.99. The amount of transcripts was calculated from these standard curves using the RotorGene software. For each sample, the ratio between the relative amount of each specific transcript and β -actin was then calculated to compensate for variations in quantity or quality of starting mRNA as well as for differences in reverse transcriptase efficiency.

LASER microdissection and RNA extraction. Frozen tissues from 9 tumors and paired normal mucosa were randomly selected for LCM. 8- μ m section was first fixed with acetone for 5 min, stained with hematoxylin–eosin, dehydrated in graded alcohol and xylene, and then air-dried for 5 min. Small tumor areas (about 50 cells) on the section were selected and captured by using a PixCell laser capture microscope (Arcturus Engineering Inc., USA). The LCM parameters were as follows: a laser power of 70 mW, laser pulse duration of 1.2–3.5 ms, and laser spot size of 7.5–15 μ m diameter. About 5000 to 7000 spots from epithelium were pooled and then mixed with Picopure extraction buffer (Arcturus), incubated at 42 °C for 30 min, microcentrifuged at 800 $\times$ g for 2 min and subjected to RNA extraction using the Picopure RNA Isolation kit (Arcturus Engineering, CA, USA) according to the manufacturer's recommendation. cDNA synthesis was performed as described above. PPAR γ and β -actin mRNA were quantified using commercially available kits (TaqMan Gene Expression Assays Hs00234592 and Hs99999903, respectively) according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems). Amplifications were performed in a 7700 thermocycler (Applied Biosystems). External standard curves were generated with serial five-fold dilutions of pooled cDNA samples. The reference curve was constructed by plotting the relative amounts of these dilutions versus the corresponding Ct (threshold cycle) values. The relative amount of PPAR γ and β -actin transcripts was calculated from these standard curves using the ABI Prism 7000 SDS software.

Results and Discussion

We first tested the expression of PPAR γ in colon cancer, at the mRNA level, by real time PCR. The oligonucleotides used were selected on exons 3 and 5, thus enabling to quantify only the “normal” functional PPAR γ transcripts, not the dominant negative variant ORF4 –Fig. 1A). The expression levels are represented relative to the normal mucosa of the same patient. We considered as overexpression when the ratio tumor vs normal colon was higher than 1.5, and decreased expression when the ratio was below 0.5. As shown in Figure 1, PPAR γ mRNAs was highly different between patients, ranging from 0.03 to 4.9 (median 1.4). It was overexpressed in 9 out of 18 cases (50%, range 1.5 – 4.9, median 2). By contrast, a 50% decreased expression was seen in 4 patients (22.2%), and no significant change was observed in 5 samples (27.8%). This heterogeneity has also been reported by Feilchenfeldt et al. [23], although they use oligonucleotides spanning exons 1 and 2. Thus, they quantify the different PPAR γ variants altogether.

PPAR γ is expressed in colonic epithelial cells, but also in stromal cells. Therefore, in order to determine whether the difference in expression observed in whole tumors was dependent of expression in epithelial cells, we used laser capture microdissection (LCM) to isolate normal and tumorous epithelial cells from 9 patients. The results, presented by fig. 2 are consistent with those described above : 3 tumors presented an increased expression (patients 1, 3 and 5), 3 a decrease (2, 7 and 9), and the remaining 3 (4, 6 and 8) did not show significant modification. These results demonstrate for the first time that epithelial colon cancer cells can show up- or down-regulation of PPAR γ expression. This was further confirmed at the protein level by immunohistochemical analysis performed on paraffin-embedded sections using an antibody directed towards the C-terminal region of the protein (data not shown).

PPAR γ function as a heterodimer associated with RXR α . We then determined RXR α expression in the same samples. RXR α was decreased in 8 out of 18 samples (44.4%), which is consistent with the data presented by Feilchenfeldt et al. [23]. In the other samples, the expression level varied from 0.6 – 2.0 (median increase 1.1).

Interactions between PPAR γ and many cofactors are required for a successful completion of gene transcription. We first analyzed expression of the PGC-1 α gene. An increased expression was seen in 4 cases (22.2%), with an intriguing 85-fold increase in one

case (tumor N°6). More interestingly, a clear down-regulation was seen in 9 in 18 tumors (50%, median decrease 0.25). This in agreement with the results of Feilchenfeldt et al. [23] who also described a down regulation of more than 50%, in 9 out of the 17 tumors they analyzed (52.9%). However, they limited their analysis to this co-activator. We completed our work by analysing the expression of 5 other PPAR γ coactivators which have been demonstrated to interact with PPAR γ .

SRC-1 expression was also heterogeneous (median value 0.94), as it was decreased in 5/18 tumors (27.8%), was not significantly modified in 6/18 tumors (33.3%) and increased by more than 50% in the remaining 7 tumors (38.9%; median value 3.0).

By contrast, the other 4 co-activators tested showed overexpression in colon tumors compared to paired normal mucosa. PRIP was overexpressed in 12/18 tumors (66.7%, median increase 3.6). The *p300* gene was overexpressed in 14/18 tumors (77.8%, 2.1- to 31.3-fold increase, median increase 3.7). The *PBP* gene was overexpressed in almost all tumors (17/18, 94.4%, 1.8- to 20.7-fold increase, median increase 5.5). Finally the *CBP* gene showed an increased expression in all the tumors we analyzed (18/18, 100%, 2- to 586-fold increase, median increase 51.3). To the best of our knowledge, this is the first demonstration that these genes are overexpressed in colon tumors. The consequences are not known, but we cannot exclude that, for instance when PGC-1 α and SRC1 level are low, CBP is high enough to compensate this decrease and allow for an efficient transcriptional activity. This might be the case of patient N° 9 for instance, which shows very low levels of PGC-1 α and SRC1, but a 200-fold increase of CBP in its tumor.

PBP gene overexpression and amplification have been described in breast tumors [24]. We do not know at present whether the increased level of PBP and CBP expression in colon tumors is linked to gene amplification.

One should mention that these co-activators are not specific for PPAR γ , and interact with several nuclear receptors. For instance, SRC1 was cloned through its ability to interact with the ligand-bound progesterone, estrogen and thyroid hormone receptors [25-27]. PGC-1 α has been shown to interact with the glucocorticoid receptor GR and the mineralocorticoid receptor MR [28], the estrogen receptor ER [29], and PPAR α [30].

It is also of importance to note that analysis has been performed at the mRNA level. Analysis at the protein level by immunohistochemistry should be performed to confirm these data. Finally, the protein can be present but not functional, for instance in a dephosphorylated state [31].

During completion of our work, Sabatino et al. [32] identified a new *PPAR* γ transcript, that they called ORF4, which harbors a readthrough in intron 4. The expected translated protein lacks the ligand-binding domain encoded by exons 5 and 6. This protein does not transactivate a reporter gene. Moreover, the isoform is dominant negative *versus* *PPAR* γ . Furthermore, ORF4 has not only lost the capacity to restrain cell growth but has acquired the potential to stimulate it. They conclude that the ability to counteract *PPAR* γ suggests that ORF4 plays a role in the pathogenesis of colorectal cancers. We therefore decided to quantify expression of this transcript in our samples. This was performed using the same sense oligonucleotide that was used for *PPAR* γ (exon 3), and an anti-sense probe located on intron 4 (Fig. 1A).

Real-time amplifications were performed. The data are presented on figure 5. *PPAR* γ and ORF4 levels are presented for each patient. Different situations can be seen. The 4 tumors that do not express *PPAR* γ do not express ORF4 (patients 4, 7, 11 and 16). This may be related to a general decreased transcription of the *PPAR* γ gene. Several tumors (4/18, N° 12, 13, 14, 18) present similar *PPAR* γ and ORF4 expression levels. Finally, and more interestingly, the remaining 10 tumors (55.6%) present the ORF4 variant at a much higher level than the “normal” *PPAR* γ transcript. In these cases, therefore, it is tempting to speculate that *PPAR* γ ligands would not induce gene transcription, and might even stimulate cell proliferation. If this turned out to be true, then *PPAR* γ ligands would not be efficient in treating colon cancer in these patients.

Alternative splicing has been associated with several pathologies including cancer [33]. Nuclear receptors have been involved in this context. For instance, an altered androgen receptor presenting an in-frame alternative splice lacking exon 3, which removes 36 amino acids in-frame from the DNA-binding domain, was detected in all of 8 breast tumors but not in any of 5 normal samples [34].

The most common forms of splicing defects are genomic splice site point mutations. For instance, a recent survey found 29 different p53 splice site mutations in different types of cancer [35]. Exons are usually flanked by the intronic dinucleotides GT and AG at the 5' and 3' splice sites respectively, and mutation of these sites usually causes exclusion of the adjacent exon. In the case of ORF4, intron 4 is not eliminated during the process. Sabatino et al. [32] did not find any mutation in the exon-intron junctions that could explain the readthrough in intron 4.

Antibodies specific for ORF4 are not yet available. These tools will be of great interest to analyze ORF4 expression at the protein level in colon tumors, but also in other tumors, and to compare this expression with disease progression in a large series of patients.

In conclusion, the PPAR γ signalling pathway could be affected by (1) rare loss-of-function mutations of the *PPAR γ* gene, (2) variations in its expression, (3) variations in the expression of co-activators, and (4) variations in the ratio of different isoforms generated by alternative splicing. Further studies are required to understand the mechanisms responsible for the expression of ORF4, and to determine in which situation PPAR γ agonist administration could be useful in the clinic.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Ligue Départementale contre le Cancer (44 and 56).

References

- [1] Lefebvre am 1998 (APC)
- [2] E. Saez, P. Tontonoz, M.C. Nelson, J.G. Alvarez, U.T. Ming, S.M. Baird, V.A. Thomazy, R.M. Evans, Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation, *Nat. Med.* 4 (1998) 1058-1061.
- [3] H.P. Koeffler, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 1-9.
- [4] L. Michalik, B. Desvergne, W. Wahli, Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories, *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 61-70.
- [5] P. Sarraf, E. Mueller, D. Jones, F.J. King, D.J. Deangelo, J.B. Partridge, S.A. Holden, L.B. Chen, S. Singer, C. Fletcher, B.M. Spiegelman, Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma, *Nat. Med.* 4 (1998) 1046-1052.
- [6] T. Tanaka, H. Kohno, S. Yoshitani, S. Takashima, A. Okumura, A. Murakami, M. Hosokawa, Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats, *Cancer Res.* 61 (2001) 2424-2428.
- [7] G.D. Girnun, W.M. Smith, S. Drori, P. Sarraf, E. Mueller, C. Eng, P. Nambiar, D.W. Rosenberg, R.T. Bronson, W. Edelmann, R. Kucherlapati, F.J. Gonzalez, B.M. Spiegelman, APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPARgamma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 13771-13776.
- [8] M.H. Kulke, G.D. Demetri, N.E. Sharpless, D.P. Ryan, R. Shivdasani, J.S. Clark, B.M. Spiegelman, H. Kim, R.J. Mayer, C.S. Fuchs, A phase II study of troglitazone, an activator of the PPARgamma receptor, in patients with chemotherapy-resistant metastatic colorectal cancer, *Cancer J.* 8 (2002) 395-399.
- [9] P. Sarraf, E. Mueller, W.M. Smith, H.M. Wright, J.B. Kum, L.A. Aaltonen, A. de La Chapelle, B.M. Spiegelman, C. Eng, Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer, *Mol. Cell.* 3 (1999) 799-804.
- [10] T. Ikezoe, C.W. Miller, S. Kawano, A. Heaney, E.A. Williamson, J. Hisatake, E. Green, W. Hofmann, H. Taguchi, H.P. Koeffler, Mutational analysis of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in human malignancies, *Cancer Res.* 61 (2001) 5307-5310.
- [11] R.A. Gupta, P. Sarraf, E. Mueller, J.A. Brockman, J.J. Prusakiewicz, C. Eng, T.M. Willson, R.N. Dubois, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated differentiation: a mutation in colon cancer cells reveals divergent and cell type-specific mechanisms, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 22669-22677.
- [12] D. Bouancheau, B. Buecher, A. Jarry, B. Simon, D. Masson, E. Cassagnau, R. Hamelin, C.L. Labois, S. Bezieau, M.G. Denis, The PPAR(gamma) K422Q mutation does not contribute to troglitazone inefficiency in colon cancer treatment, *Cancer Lett.* 224 (2005) 111-116.
- [13] M.G. Rosenfeld, C.K. Glass, Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 36865-36868.
- [14] N.J. McKenna, B.W. O'Malley, Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators, *Cell* 108 (2002) 465-474.
- [15] J.C. Chrivia, R.P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M.R. Montminy, R.H. Goodman, Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP, *Nature* 365 (1993) 855-859.

- [16] R. Eckner, M.E. Ewen, D. Newsome, M. Gerdes, J.A. Decaprio, J.B. Lawrence, D.M. Livingston, Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor, *Genes Dev.* 8 (1994) 869-884.
- [17] Y. Zhu, C. Qi, S. Jain, M.S. Rao, J.K. Reddy, Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 25500-25506.
- [18] C.X. Yuan, M. Ito, J.D. Fondell, Z.Y. Fu, R.G. Roeder, 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. U. S. A.* 95 (1998) 7939-7944.
- [19] J. Lin, P. Puigserver, J. Donovan, P. Tarr, B.M. Spiegelman, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 1645-1648.
- [20] Y. Zhu, L. Kan, C. Qi, Y.S. Kanwar, A.V. Yeldandi, M.S. Rao, J.K. Reddy, Isolation and characterization of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) interacting protein (PRIP) as a coactivator for PPAR, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 13510-13516.
- [21] P. Misra, C. Qi, S. Yu, S.H. Shah, W.Q. Cao, M.S. Rao, B. Thimmapaya, Y. Zhu, J.K. Reddy, Interaction of PIMT with transcriptional coactivators CBP, p300, and PBP differential role in transcriptional regulation, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 20011-20009.
- [22] F. Blanchot-Jossic, A. Jarry, D. Masson, K. Bach-Ngohou, J. Paineau, M.G. Denis, C.L. Laboissee, J.F. Mosnier, Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells, *J. Pathol.* 207 (2005) 156-163.
- [23] J. Feilchenfeldt, M.A. Brundler, C. Soravia, M. Totsch, C.A. Meier, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and associated transcription factors in colon cancer: reduced expression of PPARgamma-coactivator 1 (PGC-1), *Cancer Lett.* 203 (2004) 25-33.
- [24] Zhu redy 1999
- [25] S.A. Onate, S.Y. Tsai, M.J. Tsai, B.W. O'Malley, Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily, *Science* 270 (1995) 1354-1357.
- [26] A. Takeshita, P.M. Yen, S. Misiti, G.R. Cardona, Y. Liu, W.W. Chin, Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator, *Endocrinology* 137 (1996) 3594-3597.
- [27] Y. Kamei, L. Xu, T. Heinzel, J. Torchia, R. Kurokawa, B. Gloss, S.C. Lin, R.A. Heyman, D.W. Rose, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors, *Cell* 85 (1996) 403-414.
- [28] D. Knutti, A. Kaul, A. Kralli, A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 2411-2422.
- [29] I. Tcherepanova, P. Puigserver, J.D. Norris, B.M. Spiegelman, D.P. McDonnell, Modulation of estrogen receptor-alpha transcriptional activity by the coactivator PGC-1, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 16302-16308.
- [30] R.B. Vega, J.M. Huss, D.P. Kelly, The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 1868-1876.
- [31] P. Misra, E.D. Owuor, W. Li, S. Yu, C. Qi, K. Meyer, Y.J. Zhu, M.S. Rao, A.N. Kong, J.K. Reddy, Phosphorylation of transcriptional coactivator peroxisome proliferator-

- activated receptor (PPAR)-binding protein (PBP). Stimulation of transcriptional regulation by mitogen-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 48745-48754.
- [32] L. Sabatino, A. Casamassimi, G. Peluso, M.V. Barone, D. Capaccio, C. Migliore, P. Bonelli, A. Pedicini, A. Febbraro, A. Ciccodicola, V. Colantuoni, A novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoform with dominant negative activity generated by alternative splicing, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 26517-26525.
 - [33] J.P. Venables, Aberrant and alternative splicing in cancer, *Cancer Res.* 64 (2004) 7647-7654.
 - [34] X. Zhu, A.A. Daffada, C.M. Chan, M. Dowsett, Identification of an exon 3 deletion splice variant androgen receptor mRNA in human breast cancer, *Int. J. Cancer* 72 (1997) 574-580.
 - [35] R. Holmila, C. Fouquet, J. Cadranel, G. Zalcman, T. Soussi, Splice mutations in the p53 gene: case report and review of the literature, *Hum. Mutat.* 21 (2003) 101-102.

Table 1. Primers for real time RT-PCR analysis

Primer sequences (5'-3')	Size of the amplicon (bp)	Annealing temperature (°C)	Acquisition temperature (°C)
β-actin CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT G GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC	202	63	87
PPAR_γ (ORF-1) CAG TGG GGA TGT CTC ATA ATG C ACC TCT TTG CTC TGC TCC T	316	65	87
PPAR_γ ORF-4 CAG TGG GGA TGT CTC ATA ATG C AAA CCC AAA ACA ACT TCC CGT	275	65	87
RXR_α TTC TCC ACC CAG GTG AAC TC GAG CTG ATG ACC GAG AAA GG	179	65	90
CBP CAG AGC GGA TCA TCC ATG ACT A GCT TCT CCA TGG TGG CAT AC	348	66	86
p300 CCT GAG TAG GGG CAA CAA GA GTG TCT CCA CAT GGT GCT TG	353	66	87
PBP GCT ATC TCA CAC CAA GGA GTG G CTG TTG GCA CTG GTG ATT GAG G	261	65	83
PGC-1_α GAA CGA CTT GGA TAC AGA CAG C AGC CTC ATT GTC AGT GGT CAC G	241	66	83
PRIP AGC AAC CAC CAA ACC AGG TGT TGC TGA GGT TCA CTT GAG G	344	65	87
SRC-1 ATG GTG AGC AGA GGC ATG ACA AAA CGG TGA TGC TCA TGT TG	349	66	85

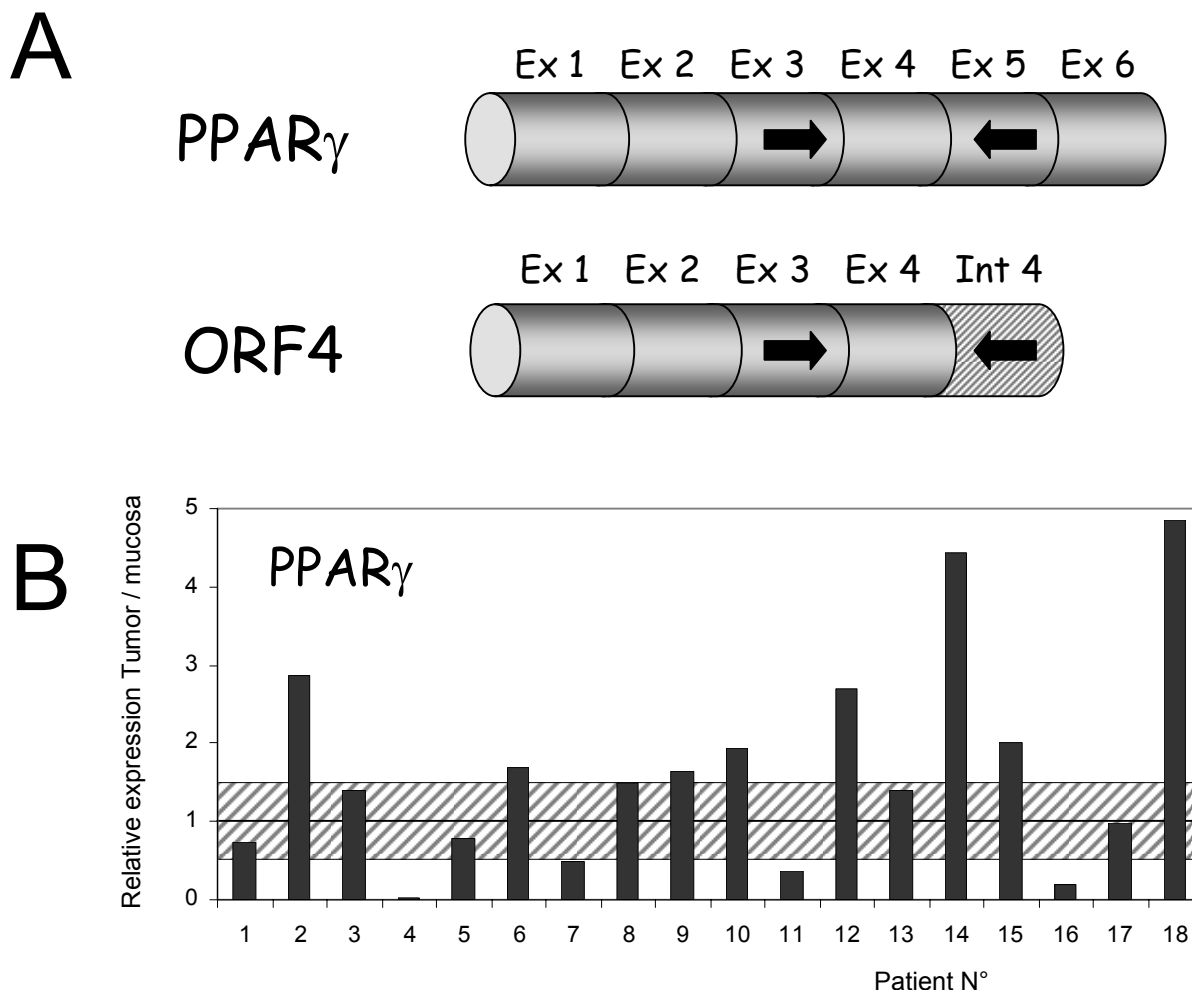


Fig. 1. Expression the *PPAR_γ* gene in colon tumors. **A.** Schematic representation of *PPAR_γ* and *ORF4* transcripts. The oligonucleotides used for the specific amplifications are represented by arrows. **B.** Expression of *PPAR_γ* in colon tumors. ARNs were extracted from the different samples, converted to cDNA, and quantified by real time PCR as detailed in Materials and Methods. The results are presented as ratios between expression in the tumor and expression in the normal mucosa. The hatched region corresponds to a similar expression in the tumor and in the normal colon (ratio above 0.5 and below 1.5).

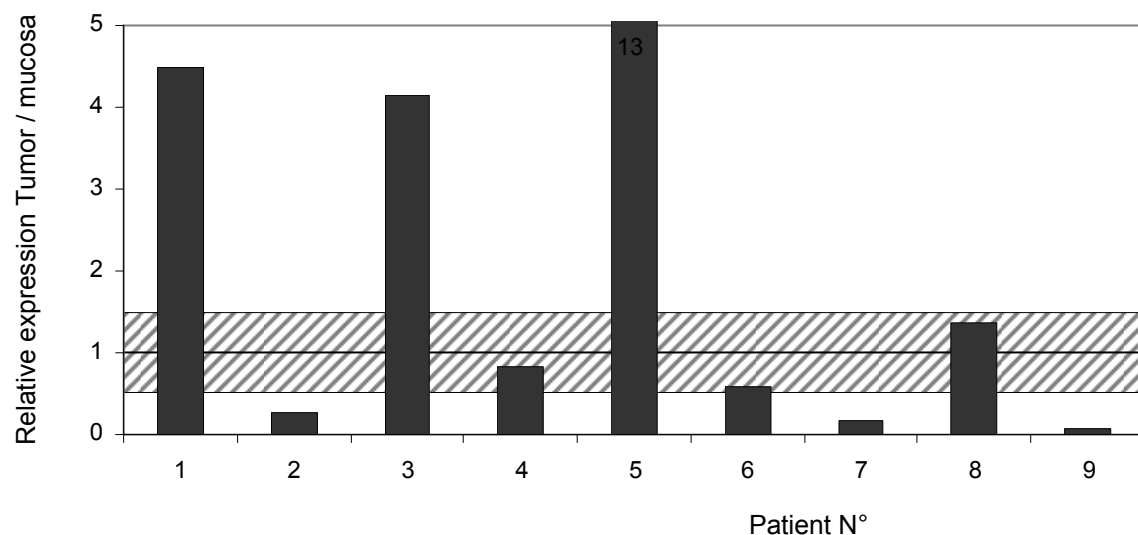


Fig. 2. Expression the *PPARγ* gene in colon tumors following LASER microdissection. Epithelial cells from tumors and normal mucosa were isolated by LASER capture microscopy as detailed in Material and Methods. ARNs were then extracted, converted to cDNA and amplified. Quantification was performed using fluorescent probes as described in Material and Methods. The results are presented as in Fig. 1.

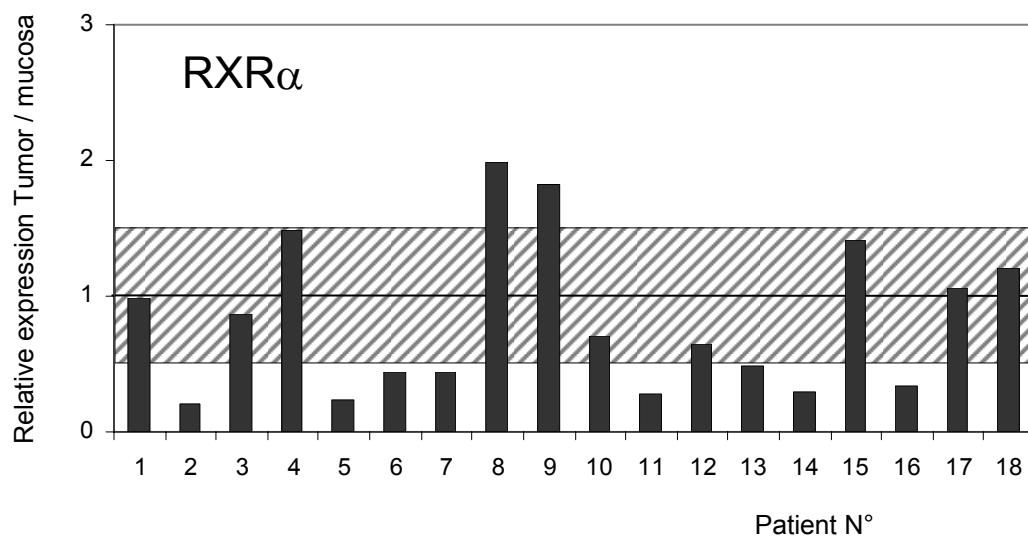


Fig. 3. Expression of the *RXRα* gene in colon tumors. ARNs were extracted from the different samples, converted to cDNA, and quantified by real time PCR as described in details in Materials and Methods. The results are presented as in Fig. 1.

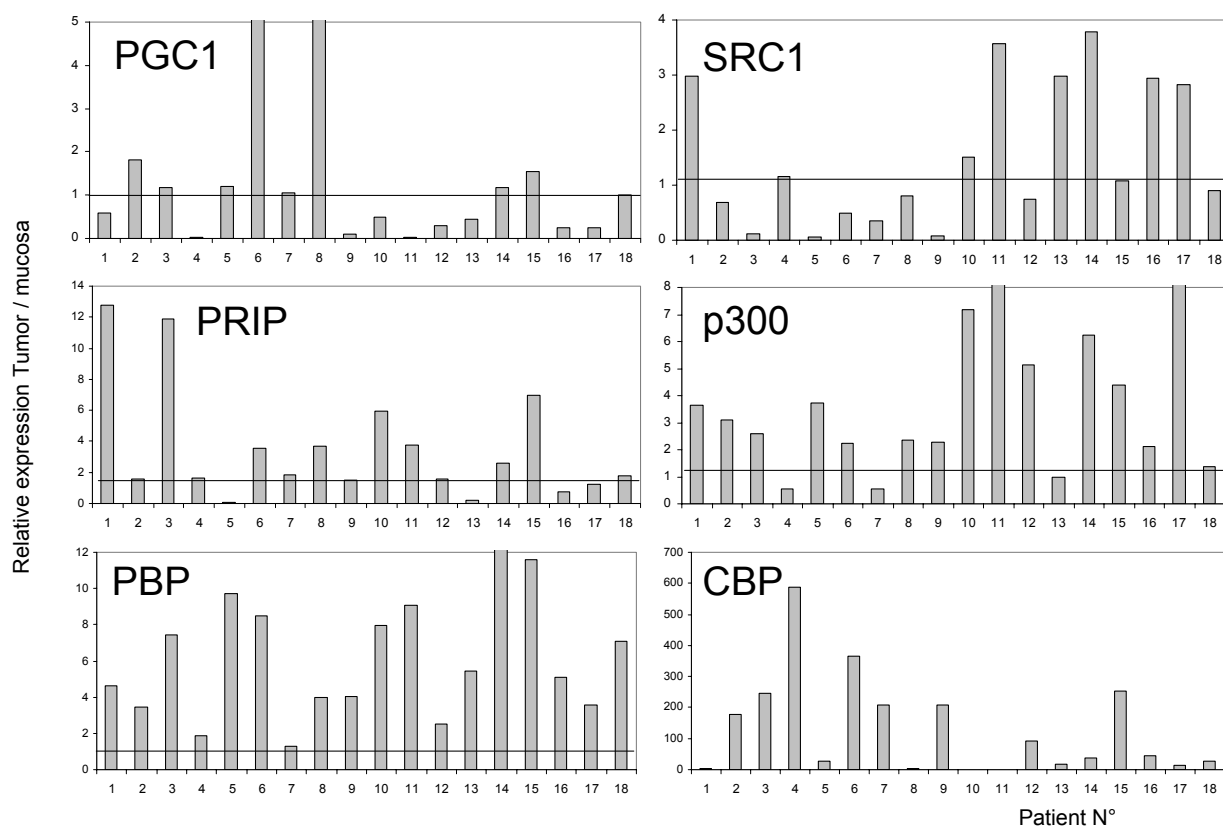


Fig. 4. Expression of PPAR γ co-activators in colon tumors. ARNs were extracted from the different samples, converted to cDNA, and quantified by real time PCR as described in details in Materials and Methods. The results are presented as ratios between expression in the tumor and expression in the normal mucosa.

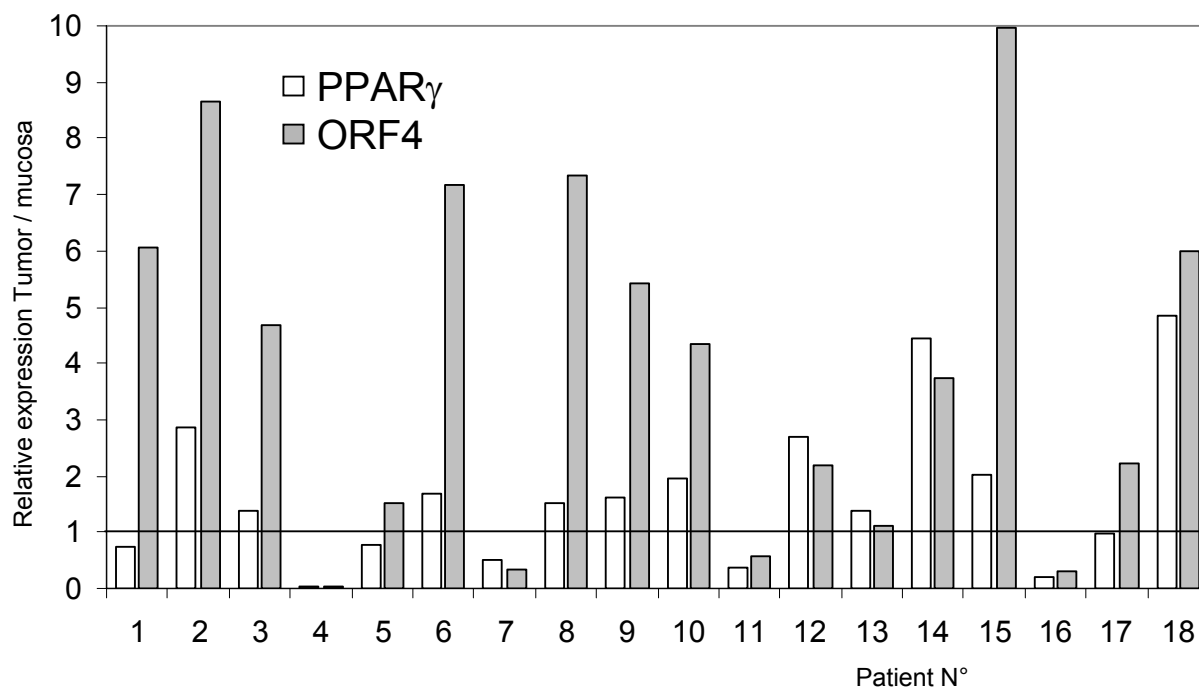


Fig. 5. Expression of the ORF4 variant of the *PPAR γ* gene in colon tumors. ARNs were extracted from the different samples, converted to cDNA, and quantified by real time PCR as described in details in Materials and Methods. The results are presented as ratios between expression in the tumor and expression in the normal mucosa. For each patient, the PPAR γ and the ORF4 expression levels are presented.

III. RESULTATS MARQUANTS

Nous avons confirmé que l'expression de PPAR γ était hétérogène dans les cancers colorectaux humains. Nous avons pu cibler notre analyse dans les cellules épithéliales des tumeurs coliques humaines grâce la technique de microdissection LASER. Nous avons également confirmé que l'expression de RXR α était diminuée dans près de la moitié des tumeurs coliques. En ce qui concerne les co-activateurs de PPAR γ , l'expression de SRC-1 était hétérogène dans les cancers colorectaux comparativement à la muqueuse saine, mais les niveaux d'expression de PRIP, PBP, p300 et CBP étaient augmentés dans la majorité des cas. L'augmentation la plus significative était celle de CBP, atteignant près de 600 fois dans une tumeur. Finalement, nous avons observé que les ARNms codant pour ORF4 étaient exprimés dans toutes les tumeurs où PPAR γ était détectable. Leurs niveaux d'expression étaient supérieurs à ceux du récepteur normal dans plus de la moitié de ces tumeurs.

RESULTATS

PARTIE III

IDENTIFICATION D'UN GENE CIBLE
POTENTIEL DE PPAR γ : MCT-1

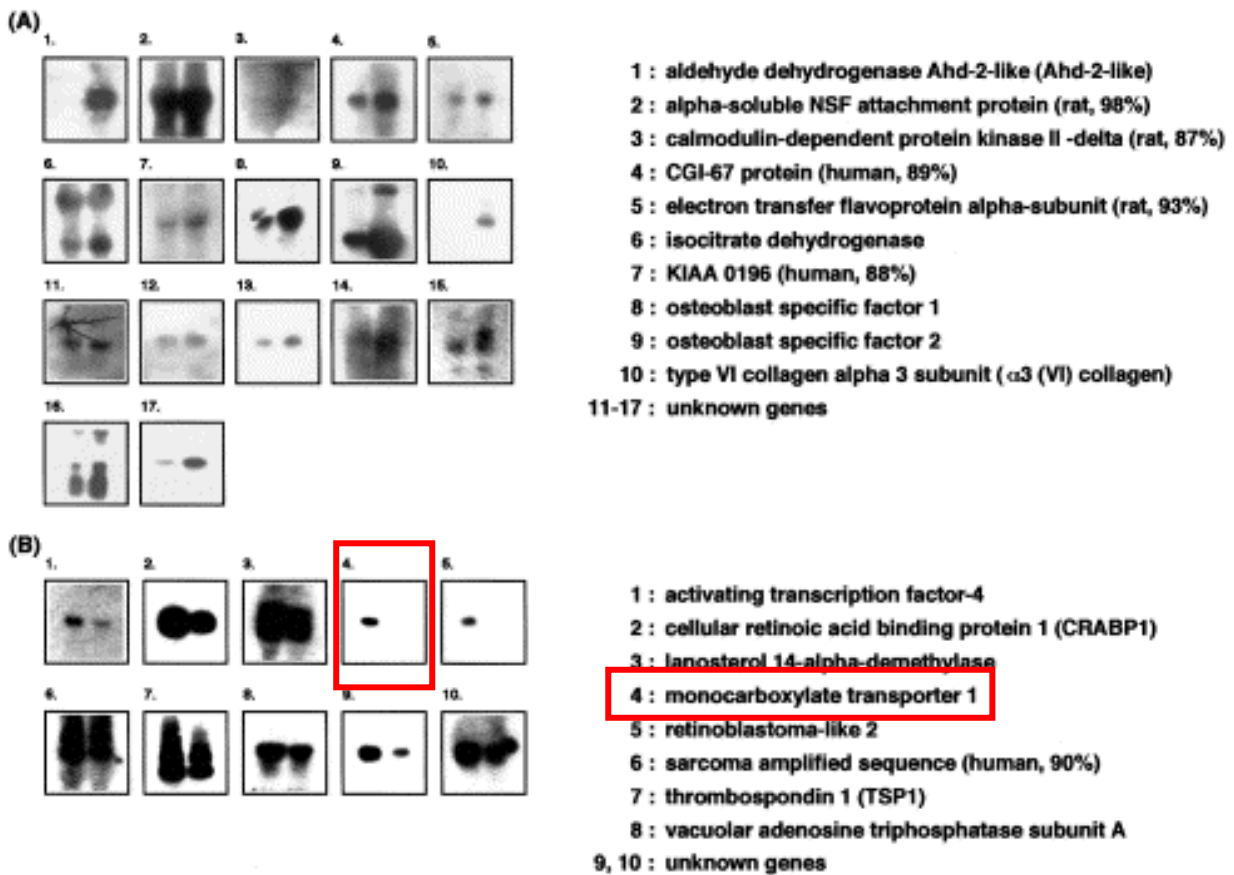


Figure 26 : Analyse par Northern Blot des gènes régulés positivement (A) ou négativement (B) dans les adipocytes par l'activation de PPAR γ . Clonage soustractif (Okuno et al., 2002).

Les encadrés rouges mettent en évidence la suppression de l'expression du gène codant pour MCT1 (MonoCarboxylate Transporter 1) induite par l'activation de PPAR γ .

I. Introduction

La seconde partie de notre travail consistait à tenter d'identifier des gènes cibles de PPAR γ dans les cellules épithéliales coliques humaines. En effectuant des recherches dans la littérature, notre intérêt s'est porté sur une étude réalisée par l'équipe de Okuno et coll.. Par clonage soustractif dans des adipocytes, les auteurs ont identifié des gènes dont l'expression était régulée positivement ou négativement par l'activation de PPAR γ . Ils ont ainsi mis en évidence que les agonistes de PPAR γ diminuaient l'expression du gène codant pour le Monocarboxylate Transporter 1 ou MCT1 (figure 26) (Okuno et al., 2002).

MCT1 fait partie d'une famille de neuf membres (MCT1 à 9), des transporteurs qui catalysent la diffusion facilitée d'acides gras à chaîne courte comme le lactate, le pyruvate ou le butyrate, couplés à un proton. La seule énergie qu'ils utilisent pour ce transport vient des gradients de concentrations en acides gras et en protons. MCT1 jouerait un rôle important dans le transport à la cellule du lactate, du pyruvate et d'autres acides gras à chaîne courte, comme le butyrate et le propionate. MCT1 est exprimé de façon quasi-ubiquitaire, mais en général il présente des localisations cellulaires spécifiques dans les tissus où il est exprimé. Ainsi les études menées sur la distribution de MCT1 le long du tube digestif ont indiqué une expression restreinte au colon chez l'homme (Halestrap et Price, 1999 ; Ravinder et al., 2005).

Au niveau du colon, la protéine MCT-1 est exprimée à la membrane apicale des cellules épithéliales. Elle y est impliquée principalement dans le transport du butyrate à la membrane luminale des colonocytes (Cuff et al., 2002). Le butyrate est l'acide gras à chaîne courte qui constitue la source majeure d'énergie pour les cellules épithéliales coliques. Il a un rôle important dans la régulation de la prolifération de ces cellules, ainsi que dans l'induction de leur différenciation. Il a d'ailleurs été montré que le traitement des cellules coliques au butyrate entraînait l'augmentation de l'expression de la CKI p21Waf1/Cip1, et la régulation des gènes codant pour la phosphatase alcaline intestinale ainsi que pour la cycline D1 (Siavoshian et al., 1997 ; Stokrova et al., 1999 ; Tureckova et al., 2005). Récemment, il a été montré que l'inhibition de l'expression de MCT1 dans les cellules épithéliales coliques avait des effets inhibiteurs forts sur la capacité du butyrate à réguler leur prolifération et leur différenciation (Cuff et al., 2005). Ces résultats indiquaient l'importance de MCT1 pour la capacité du butyrate à réguler la croissance des cellules épithéliales coliques humaines. MCT1 constituerait donc un facteur important pour l'homéostasie de la muqueuse colique. D'ailleurs, une équipe a observé par immuno-empreinte que l'expression de MCT-1 à la

membrane des cellules épithéliales coliques était diminuée dans les carcinomes comparativement aux tissus sains (Ritzhaupt et al. 1998).

Peu de données existent concernant la régulation de son expression dans les différents tissus où il est présent. Mais l'analyse de la région promotrice du gène codant pour MCT-1 a permis d'identifier de nombreux sites potentiels de liaison à des facteurs de transcription, dont AP-1 et NF- κ B (Cuff et Shirazi-Beechey, 2002).

MCT1 aurait donc un rôle important dans la physiologie du colon humain. Son expression est altérée dans les cancers colorectaux. Dans les adipocytes, l'activation de PPAR γ induit la diminution de son expression. Nous avons donc voulu savoir si MCT1 constituait une cible de l'activation de PPAR γ dans les cellules épithéliales coliques humaines.

II. Objectif

Déterminer si MCT1 constituait une cible, directe ou indirecte, de PPAR γ dans les cellules épithéliales cancéreuses coliques humaines.

III. Matériel et méthodes

III. 1. Modèle de culture cellulaire : les cellules cancéreuses coliques humaines de la lignée HT29 Clone 16.E (HT29Cl16.E)

Les cellules de la lignée HT29Cl16.E ont été dérivées de la lignée cellulaire cancéreuse colique humaine indifférenciée HT29. Elles sont issues d'un adénocarcinome colorectal humain. La lignée HT29Cl16.E est bien caractérisée (Augeron et al., 1984). Lorsqu'elles sont cultivées sur filtre, ces cellules présentent à confluence un phénotype différencié, polarisé, organisé en monocouche, muco-sécrétant, et transporteur d'ions (Bouhanna et al., 1994 ; Jarry et al., 1994). MCT-1 est un transporteur membranaire exprimé au pôle apical des cellules épithéliales coliques. La lignée HT29Cl16.E constitue donc un modèle d'étude *in vitro* approprié pour l'étude de l'expression de cette protéine.

Dans nos expériences, les cellules HT29Cl16.E sont cultivées sur filtres dans des plaques de culture de 12 puits (Costar). Elles sontensemencées à raison de 5 millions de cellules par puits, en présence de milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 10% (v/v) SVF (Sérum de Veau Fœtal). Au bout de quinze jours de culture, les cellules sont confluentes et présentent un phénotype différencié et polarisé. Pour l'étude de la régulation de l'expression de MCT-1 par les agonistes de PPAR γ , elles sont alors traitées pendant 24 heures avec le GW7845 (5 μ M) ou la Rosiglitazone (2 μ M). Afin de distinguer les effets dépendants et indépendants de l'activation du récepteur, l'administration des agonistes est effectuée en présence ou en absence d'un antagoniste spécifique de PPAR γ : le GW9662 (10 μ M). Tous les agents pharmacologiques sont dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), dont la concentration finale dans le milieu est de 0,05%. Dans toutes les expériences effectuées, une condition contrôle est réalisée. Pour celle-ci, les cellules sont traitées avec le DMSO seul, à la concentration de 0,05%.

III. 2. Isolement de cellules épithéliales de côlon humain normal

III. 2. A. Prélèvements de côlon humain normal à distance d'un cancer

Des prélèvements de muqueuse d'environ 4 à 5cm de largeur sont effectués en anathomo-pathologie à partir de pièces de résection chirurgicale. Ils se font à distance de la tumeur (8 à 10cm). Ils sont ensuite transportés dans une solution de lavage (solution I : PBS, Citrate de sodium 10mM, et glucose 5mM), dans la glace.

III. 2. B. Isolement des cellules épithéliales intestinales (CEIs)

Les CEI sont isolées selon le protocole établi (Branka et al., 1997). Les fragments de muqueuse sont rincés dans la solution I. Ils sont dépourvus des couches musculaires par dissection dans une boîte de Pétri. La muqueuse est ensuite traitée avec une solution destinée à dissocier les jonctions serrées intercellulaires (Solution II : EDTA 1mM, PBS 1X, citrate de sodium 10mM, et glucose 5mM). L'incubation dure 30 minutes à température ambiante sous agitation douce.

Les fragments de muqueuse sont alors récupérés et lavés dans la solution I. Ils sont grattés avec une pince courbe afin de récupérer des lambeaux de CEI. Celles-ci finissent d'être dissociées à la pipette, puis la suspension cellulaire est filtrée (Nytex 150mm). Le filtrat est récupéré, un échantillon est prélevé pour comptage, et le reste est centrifugé à 10 000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.

III. 3. Analyse de la translocation nucléaire de PPAR γ dans les cellules HT29Cl16.E par immunofluorescence et microscopie confocale

Pour le marquage immunofluorescent, Les cellules cultivées sur filtre et différenciées sont traitées pendant 24 et 48 heures avec de la Rosiglitazone (2 μ M). Après deux lavages de 5 minutes au PBS (1X Ca- Mg-), les cellules sont fixées dans du paraformaldéhyde dilué à 4% dans du PBS Dulbecco (In Vitrogen) 1X à pH 7,2-7,4, pendant 10 à 15 minutes à température ambiante. Après cette étape, les cellules sont incubées pendant 30 minutes dans une solution

(solution A) de PBS 1X supplémenté à 4% en sérum de cheval pour bloquer les marquages non spécifiques et à 0,1% de Triton 100X pour les perméabiliser. Puis elles sont mises en présence de l'anticorps primaire, dirigé contre PPAR γ (polyclonal de lapin), dilué au 1/500 dans la solution A, pendant une heure. Des témoins négatifs sont réalisés pour chaque condition. Les cellules sont alors incubées en présence de solution A sans anticorps primaire. Après deux nouveaux lavages au PBS, l'anticorps secondaire (polyclonal de chèvre, anti-lapin, Molecular Probes), couplé à un fluorochrome vert (alexa green, longueur d'onde d'émission 488nm), est incubé avec les cellules, dilué au 1/200 dans la solution A pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Les cellules sont à nouveau lavées deux fois. Puis un marquage nucléaire est réalisé en les incubant pendant 30 minutes à l'abri de la lumière avec un anticorps couplé à un fluorochrome rouge, dirigé contre la chromatine des noyaux (TOPRO-3, longueur d'onde 570nm). Finalement, les cellules fixées sur filtre et marquées sont montées entre lame et lamelle dans un milieu anti-polymérisant (Molecular Probes). Ces montages sont mis à 4°C pendant au moins 48 heures pour que la fluorescence se développe et sont lus en microscopie confocale.

III. 4. Analyse de l'expression des ARNms codant pour MCT-1 et la L-FABP par PCR quantitative en temps réel

III. 4. A. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)

Les ARNs totaux sont extraits des cellules cancéreuses coliques humaines par la technique QIAGEN. Ils sont ensuite dénaturés à 72°C pendant 3 minutes, puis une réaction de transcription inverse est réalisée pendant 60 minutes à 42°C dans un volume final de 20 μ L (50mM Tris-HCl pH 8,3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT). Ce mélange réactionnel contient 0,5 μ g d'amorces aléatoires (Promega), des dNTPs (1mM de chaque), un inhibiteur de RNases (RNasin, 50 unités), et une transcriptase inverse (RNase HMMLV, 200 unités).

III. 4. B. Amplification par PCR en temps réel

Les conditions d'amplifications ont été optimisées pour l'appareil Rotorgene 2000 (Corbett Research). Les amorces sont dessinées à partir des séquences d'ADNc du génome

humain publiées dans les bases de données internationales puis par l'utilisation du logiciel GeneJockey. Ces amorces sont sélectionnées selon qu'elles s'hybrident sur plusieurs exons. Ceci permet d'éviter l'amplification d'ADN génomique contaminant. Les séquences des amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau ?.

Gène	Amorce Sens	Amorce antisens	Température d'acquisition (°C)
β-actine	5'-CCTTCCTGGGCATGGAG TCCTG-3'	5'-GGAGCAATGATCTTGAT CTTC-3'	87
L-FABP	5'-TCAAGTTCACCATCACC GCTGG-3'	5'-GGTATTGGTGATTATGT CGC-3'	85
MCT-1	5'-GTATGGTGGAGGTCCTA TCAGC-3'	5'-AGTTGAAGGAAGCCCA AGACC-3'	84

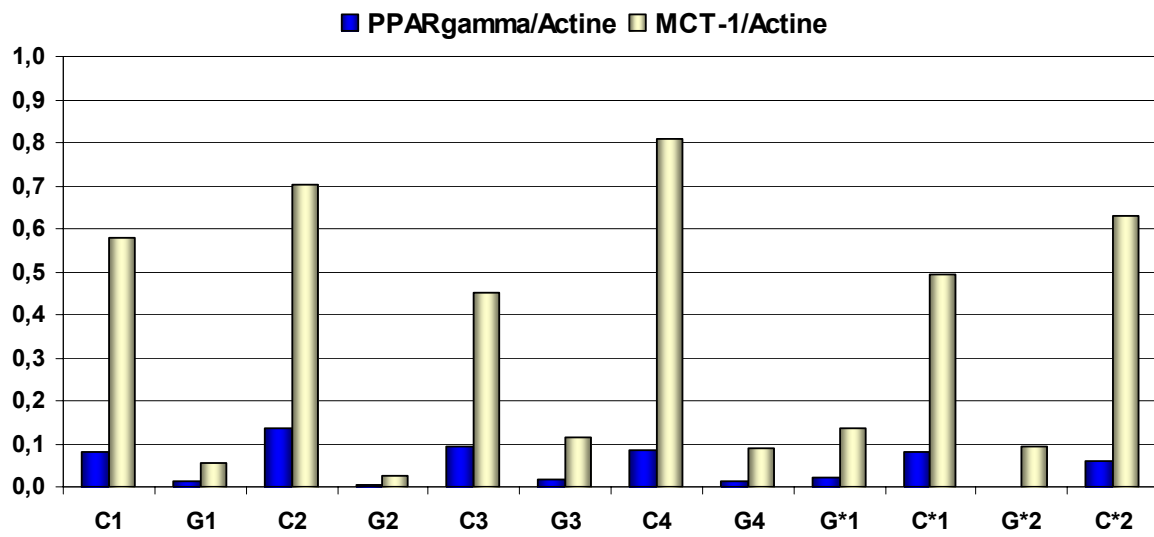
Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour les amplifications par PCR en temps réel

Les amplifications sont réalisées avec la Taq DNA polymérase Titanium (Clontech, Palo Alto, CA, USA). La solution de réaction est la suivante : 2µL du tampon de PCR Titanium 10X fournit par le kit (qui contient du chlorure de magnésium), 2µL de SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicls, Meylan, France) dilué au 1/1000, 1µL de chaque amorce (à une concentration finale de 0,4µM), 0,5µL de dNTPs (concentration finale de 10mM pour chacun), et 0,2µL d'enzyme, dans un volume final de 10µL par réaction, complété avec de l'eau distillée. A ce mélange réactionnel sont ajoutés 10µL de solution d'ADNc dilués au 1/20. La réaction d'amplification se fait dans les conditions suivantes : une étape de dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, puis 35 cycles avec dénaturation à 95°C pendant 5 secondes, hybridation des amorces à 63°C pendant 5 secondes, acquisition de la fluorescence pendant 10 secondes (Tableau ?), puis élongation pendant 5 secondes à 72°C.

L'étape d'acquisition permet de supprimer les artéfacts dus à la formation de dimères d'amorces. A la fin des 35 cycles d'amplification, les échantillons sont soumis à un gradient de température allant de 66 à 93°C, et la fluorescence est mesurée en continu pendant cette étape. Pour chaque amplification, un pic de fluorescence unique est obtenu à la température optimale pour l'acquisition des données.

Pour la quantification, une courbe de référence est générée à partir d'une série de dilutions au 1/5 d'échantillons d'ADNc mélangés. Cette courbe exprime les niveaux de fluorescence mesurés dans ces dilutions en fonction du Ct (Treshold Cycle), qui correspond au cycle auquel la valeur seuil de fluorescence est atteinte au cours de l'amplification. Le coefficient de corrélation de ces courbes est toujours supérieur à 0,99. Les transcrits sont quantifiés dans les échantillons d'intérêt à partir de ces courbes standard. Pour chaque échantillon est calculé le rapport entre le taux de transcrit spécifique et celui de la β -actine. Ceci compense les variations en quantité et en qualité des ARNms de départ, ainsi que les différences d'efficacité de la transcription inverse. Tous les résultats présentés ici expriment donc le rapport entre la quantification des ARNms d'intérêt et celle des ARNms codant pour la β -actine, pour chaque condition.

A.



B.

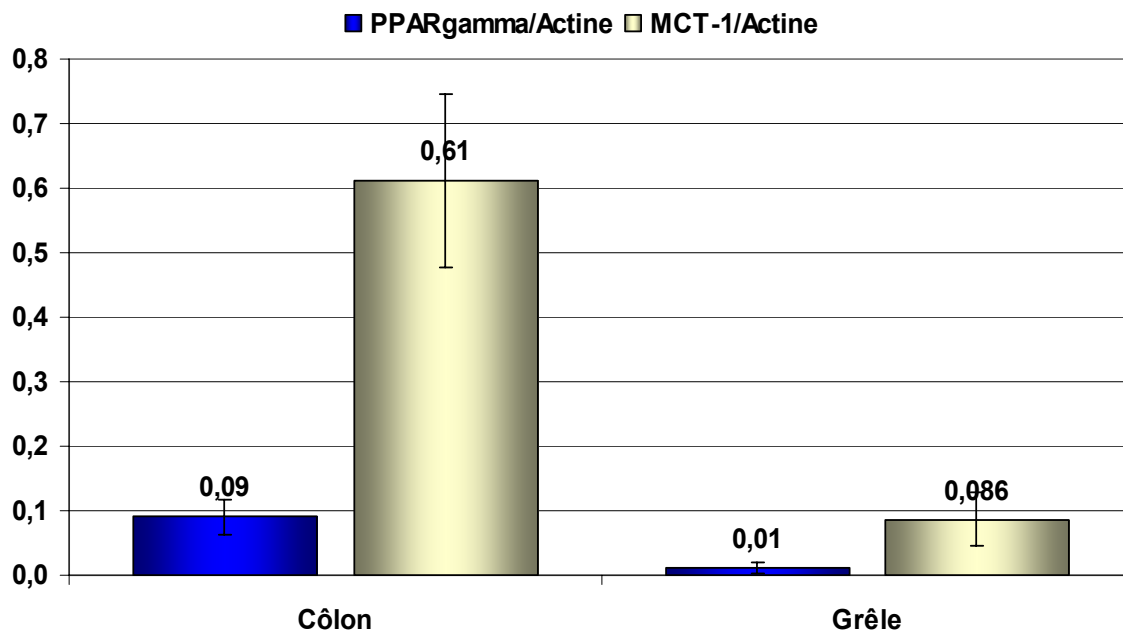


Figure 27 : Expression des ARNms codant pour PPAR γ et MCT1 dans des cellules épithéliales isolées (CEIs) issues de colon et d'intestin grêle humains. Analyse en PCR quantitative.

A : Résultats obtenus échantillon par échantillon. C : extrait provenant de CEI de colon. G: extrait provenant de CEI d'intestin grêle. Les couples C1/G1, C2/G2, C3/G3 et C4/G4 proviennent chacun d'un même patient. Les échantillons C*1, G*1, C*2 et G*2 sont issus de patients distincts. B. Résultats exprimés par la moyenne des données obtenues en A.

IV. Résultats

IV. 1. Expression de MCT1 et de PPAR γ dans les cellules épithéliales coliques humaines

IV. 1. A. Comparaison de l'expression de PPAR γ et de MCT1 entre l'intestin grêle et le colon par PCR en temps réel

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si nous étions capables de quantifier l'expression de MCT1 et de PPAR γ dans les cellules épithéliales coliques grâce à la technique de PCR en temps réel. Nous avons pour ceci utilisé des échantillons de cellules épithéliales isolées issus de prélèvements d'intestin grêle et de colon sains issus de patients. Après extraction des ARNs et transcription inverse, nous avons réalisé des amplifications spécifiques de MCT1 et de PPAR γ (Figure 27).

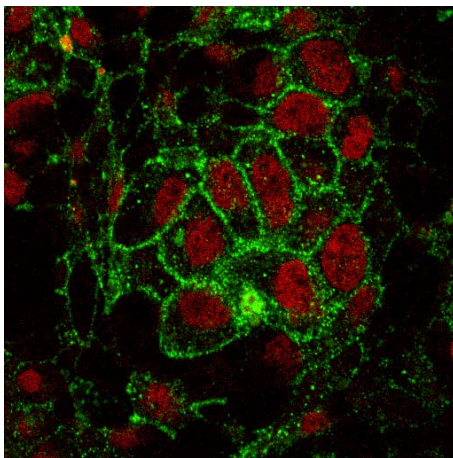
Les cellules épithéliales intestinales expriment MCT1 et PPAR γ . Il apparaît clairement que leur niveau d'expression est supérieur dans le colon par rapport à l'intestin grêle. Ces résultats correspondent aux données de la littérature, ce qui valide notre technique de PCR en temps réel.

IV. 1. B. Fonctionnalité de PPAR γ dans les cellules épithéliales cancéreuses coliques humaines de la lignée HT29C16.E

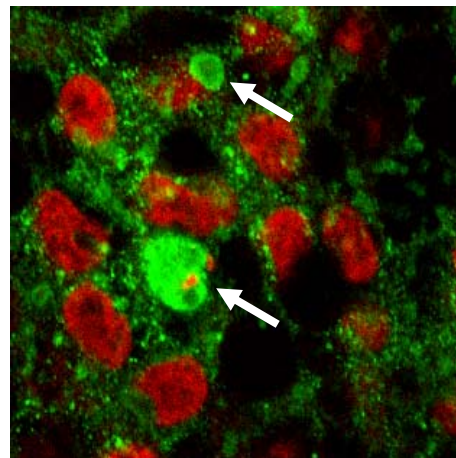
Il s'agissait de déterminer si PPAR γ était fonctionnel et actif dans les cellules de la lignée HT29C16.E. Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier que l'activation de PPAR γ par ses agonistes induisait sa translocation dans le noyau des cellules, site de son activité. Ensuite, nous avons mis en place une amplification servant de contrôle positif pour la régulation d'expression de gène par PPAR γ . Il s'agit de la LFABP (Liver Fatty Acid Binding Protein). Le gène codant pour celle-ci a été identifié comme étant une cible directe de PPAR γ dans les cellules épithéliales coliques (Gupta et al., 2001).

IV. 1. B. a. Translocation nucléaire de PPAR γ dans les cellules HT29C16.E

Les cellules cancéreuses coliques humaines, cultivées sur filtres et différenciées, ont été traitées pendant 24 heures en absence (DMSO 0,5%) ou en présence de Rosiglitazone. Puis des immunomarquages en fluorescence utilisant des anticorps dirigés contre PPAR γ ont été réalisés et analysés en microscopie confocale (figure 28). La Rosiglitazone induit la translocation nucléaire de PPAR γ dans les cellules HT29C16.E (flèches blanches). Ce phénomène n'est observé que dans une partie des cellules, mais ceci peut s'expliquer par différents aspects. Tout d'abord, la fixation des cellules avec le paraformaldéhyde avant l'immunomarcage est susceptible d'entraîner la "fuite" des récepteurs nucléaires des noyaux vers le cytoplasme des cellules. Ensuite, la translocation nucléaire est un phénomène rapide et transitoire, et lors de la fixation, toutes les cellules n'en sont pas au même stade de leur réponse à l'agoniste de PPAR γ . Le récepteur a en effet peut-être déjà été transloqué dans le noyau de certaines et en a déjà été exporté. L'importance de ces résultats réside donc dans le fait que la translocation nucléaire de PPAR γ est observable dans les cellules HT29C16.E lorsque celles-ci sont traitées avec un agoniste de celui-ci.



DMSO 0,5%



Rosiglitazone 2 μ M 24H

Figure 28 : induction de la translocation nucléaire de PPAR γ par la Rosiglitazone (2 μ M) dans les cellules cancéreuses coliques humaines de la lignée HT29C16.E.

Immunomarcage en fluorescence (TOPRO3 et Alexa green 488) analysé en microscopie confocale.

Les flèches blanches indiquent les cellules pour lesquelles la translocation du récepteur est observée.

IV. 1. B. b. Effet du GW7845 et de la Rosiglitazone sur l'expression de la L-FABP dans les cellules HT29C16.E

Les cellules HT29C16.E cultivées sur filtres et différenciées ont été traitées pendant 24h avec le GW7845 ou la Rosiglitazone. Après extraction des ARNs et transcription inverse, des PCRs en temps réel ont été réalisées pour la L-FABP (Figure 29). Le GW7845 induit l'augmentation de la L-FABP d'un facteur 25, la Rosiglitazone d'un facteur 18. Ces résultats corrélerent avec les données de la littérature.

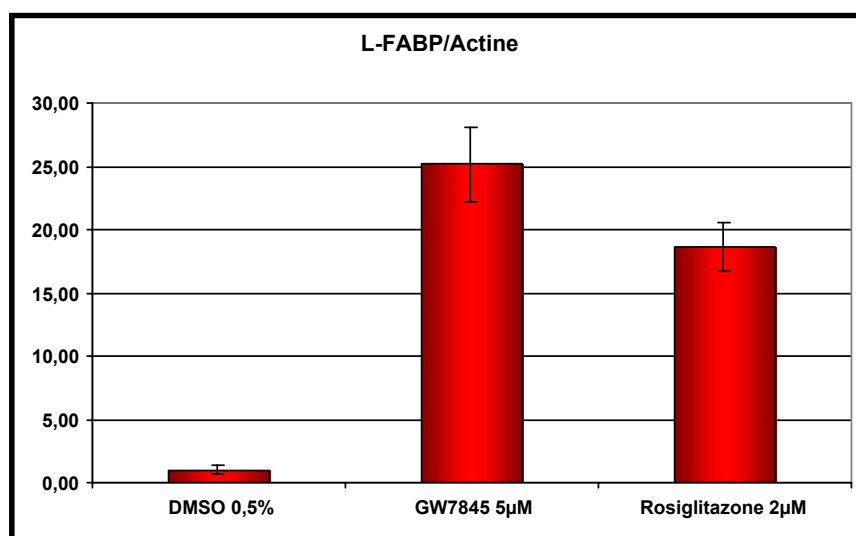


Figure 29 : Effet du GW7845 et de la Rosiglitazone sur l'expression des ARNms codant pour la L-FABP dans les cellules HT29C16.E

Afin de vérifier que l'induction de la L-FABP par les agonistes de PPAR γ était bien dépendante de l'activation du récepteur, les cellules HT29C16.E ont été de nouveau traitées avec la Rosiglitazone, cette fois en présence ou en absence d'un antagoniste de PPAR γ , le GW9662, à une concentration de 10µM. Nous avons également testé le fait de ne traiter les cellules qu'au niveau apical ou basolatéral uniquement (Figure 30). La Rosiglitazone induit là encore fortement l'augmentation de l'expression des ARNms codant pour la L-FABP, d'un facteur 24 environ. Ceci est observé de la même façon, que les cellules soient traitées au pôle apical, basolatéral, ou les deux. L'administration de l'antagoniste de PPAR γ empêche presque complètement cette induction par la Rosiglitazone. Ceci illustre le fait que la régulation de l'expression de la L-FABP par les agonistes de PPAR γ est bien dépendante de l'activation du récepteur. Ce marqueur a donc servi de contrôle positif en PCR pour l'ensemble de nos expériences. Ces résultats indiquent aussi que PPAR γ est fonctionnel et capable de réguler l'expression de ses gènes cibles dans les cellules cancéreuses coliques humaines de la lignée

HT29Cl16.E. Ceci valide l'utilisation de cette lignée comme modèle d'étude de gènes cibles de PPAR γ .

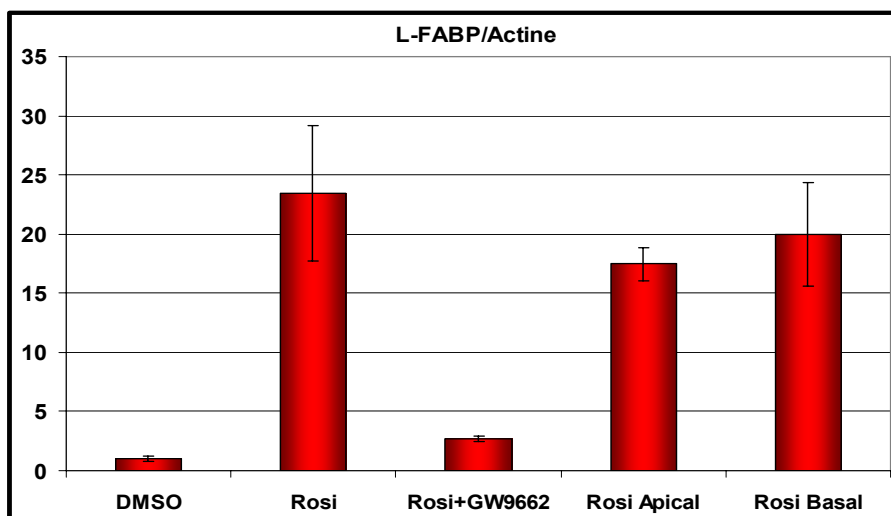


Figure 30 : Effet de la Rosiglitazone et de l'antagoniste de PPAR γ , le GW9662, sur l'expression de la L-FABP dans les cellules HT29Cl16.E.

(Rosi : Rosiglitazone 2 μ M ; Concentration en GW9662 : 10 μ M ; DMSO 0.5%)

IV. 2. Effets des agonistes de PPAR γ sur l'expression de MCT1 dans les cellules cancéreuses coliques humaines

IV. 2. A. Le GW7845 diminue l'expression de MCT1 dans les cellules HT29Cl16.E

Nous avons voulu savoir si les agonistes de PPAR γ régulaient l'expression de MCT1 *in vitro* dans des cellules épithéliales cancéreuses coliques humaines. Il s'agissait aussi de définir si cette régulation serait propre à PPAR γ , et non à PPAR α , isotype exprimé lui aussi dans ce type cellulaire. Les effets sur l'expression de MCT1 du GW7845 et du WY14643, un agoniste de PPAR α , sur l'expression de MCT1 ont donc été testés dans les cellules cancéreuses coliques humaines de la lignée HT29Cl16.E. Pour ceci, les cellules cultivées sur filtres et différenciées étaient traitées pendant 24h avec du GW7845 ou du WY14643 à des concentrations de 5 μ M et de 10 μ M dans le milieu respectivement. Des PCRs spécifiques de MCT1 et de la L-FABP ont ensuite été effectuées sur les ADNcs obtenus à partir de ces cellules (Figure 31).

MCT1 est fortement exprimé dans les cellules de la lignée HT29C116.E. L'agoniste de PPAR α , le WY14643, n'a aucun effet sur l'expression des ARNms codant pour la L-FABP. Le GW7845 induit l'augmentation de ce marqueur d'un facteur 40 au bout de 24h. Ces observations indiquent que la régulation de la L-FABP est spécifique de PPAR γ , et non d'un autre isotype PPAR.

De la même façon, le traitement des cellules HT29C116.E avec le WY14643 n'a pas de conséquence sur l'expression de MCT1. Par contre le GW7845 induit une diminution significative de l'expression des ARNms codant pour MCT1, d'un facteur 10. Ce résultat est reproductible et observé pour l'ensemble des expériences réalisées.

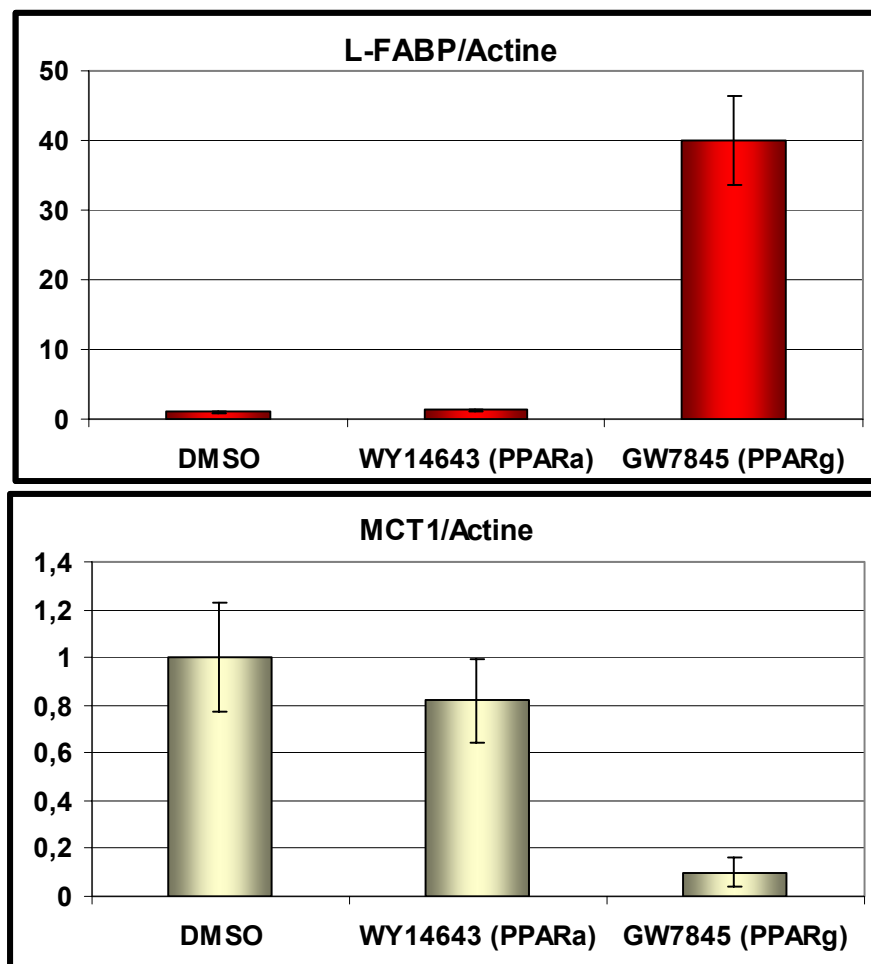


Figure 31 : Effet des agonistes de PPAR α (WY14643) et de PPAR γ (GW7845) sur l'expression de la L-FABP et de MCT1 dans les cellules HT29C116.E.

PCR en temps réel. (DMSO 0.5% ; WY14643 : 10 μ M ; GW7845 : 5 μ M ; PPAR α : PPAR α ; PPAR γ : PPAR γ).

IV. 2. B. Cinétique d'action du GW7845 sur l'expression de MCT1 dans les cellules HT29Cl16.E

Nous avons ensuite déterminé le temps nécessaire pour observer une diminution significative de l'expression des ARNms codant pour MCT1 par le GW7845. Deux types de cinétiques, longue et courte, ont donc été réalisés. Dans le premier cas, les cellules ont été traitées pendant 0, 3, 6, et 12h avec le GW7845 avant extraction des ARNs (figure 32 A). Dans le second cas, les traitements ont été effectués pendant 0, 24, 48, et 72h (figure 32 B).

Le GW7845 induit l'augmentation de la L-FABP de façon significative dès 3h de traitement. Cet effet s'amplifie jusqu'à 48h puis stagne jusqu'à 72h. La diminution de l'expression des ARNms codant pour MCT1 par le GW7845 est observée plus tardivement. Elle n'est significative qu'à partir de 12h de traitement. Les niveaux d'ARNms codant pour MCT1 sont minimaux à 24h, puis ont tendance à remonter lentement jusqu'à 72h de traitement.

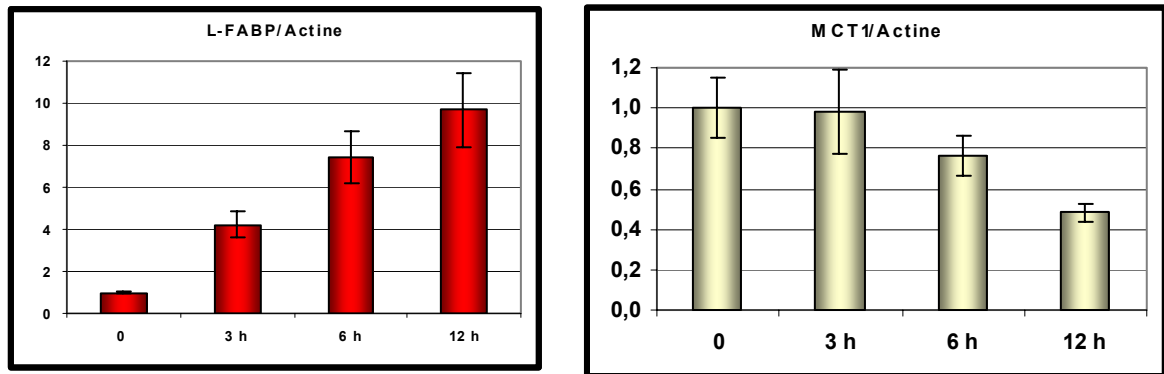


Figure 32 A : Cinétique courte. Traitement de 0, 3, 6 et 12 heures avec le GW7845

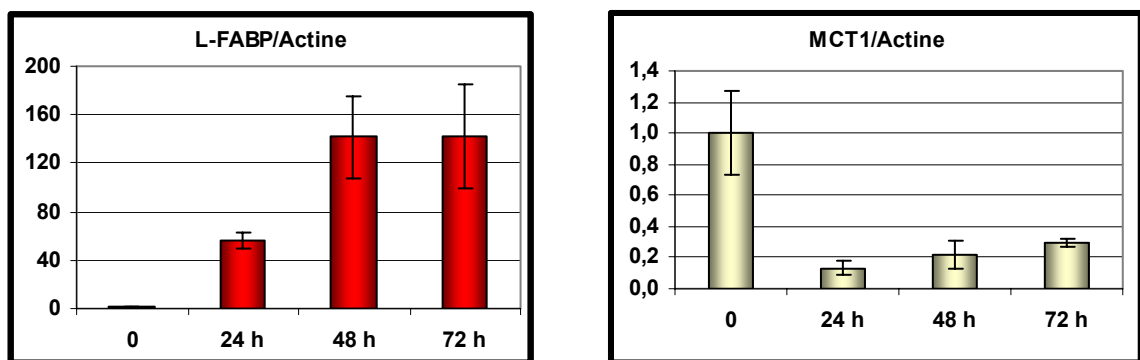


Figure 32 B : cinétique longue. 0, 24, 48 et 72 h de traitement avec le GW7845

Figure 32 : cinétique d'action du GW7845 (5 μ M) sur l'expression des ARNms codant pour la L-FABP et MCT1 dans les cellules cancéreuses coliques humaines de la lignée HT29Cl16.E.

IV. 2. C. L'utilisation d'un antagoniste de $PPAR\gamma$ bloque la diminution de l'expression de MCT1 induite par la Rosiglitazone

Nous avons voulu déterminer si la diminution de l'expression de MCT1 par les agonistes de $PPAR\gamma$ était dépendante ou non de l'activation du récepteur. Pour ceci, les cellules de la lignée HT29C116.E différenciées cultivées sur filtre ont été traitées pendant 24h en présence ou en absence de Rosiglitazone (2 μ M), ceci associé ou non à l'administration d'un antagoniste de $PPAR\gamma$, le GW9662. Les niveaux d'ARNms codant pour la L-FABP et MCT1 dans ces différentes conditions ont ensuite été mesurés par PCR en temps réel (Figure 33).

Comme attendu, la Rosiglitazone induit l'augmentation de l'expression de la L-FABP de façon significative, et ceci est inhibé par le GW9662.

De la même façon, la Rosiglitazone entraîne la diminution des niveaux d'ARNms codant pour MCT1, et le GW9662 bloque complètement cet effet. La régulation de l'expression de MCT1 par les agonistes de $PPAR\gamma$ est donc une activité dépendante de l'activation du récepteur.

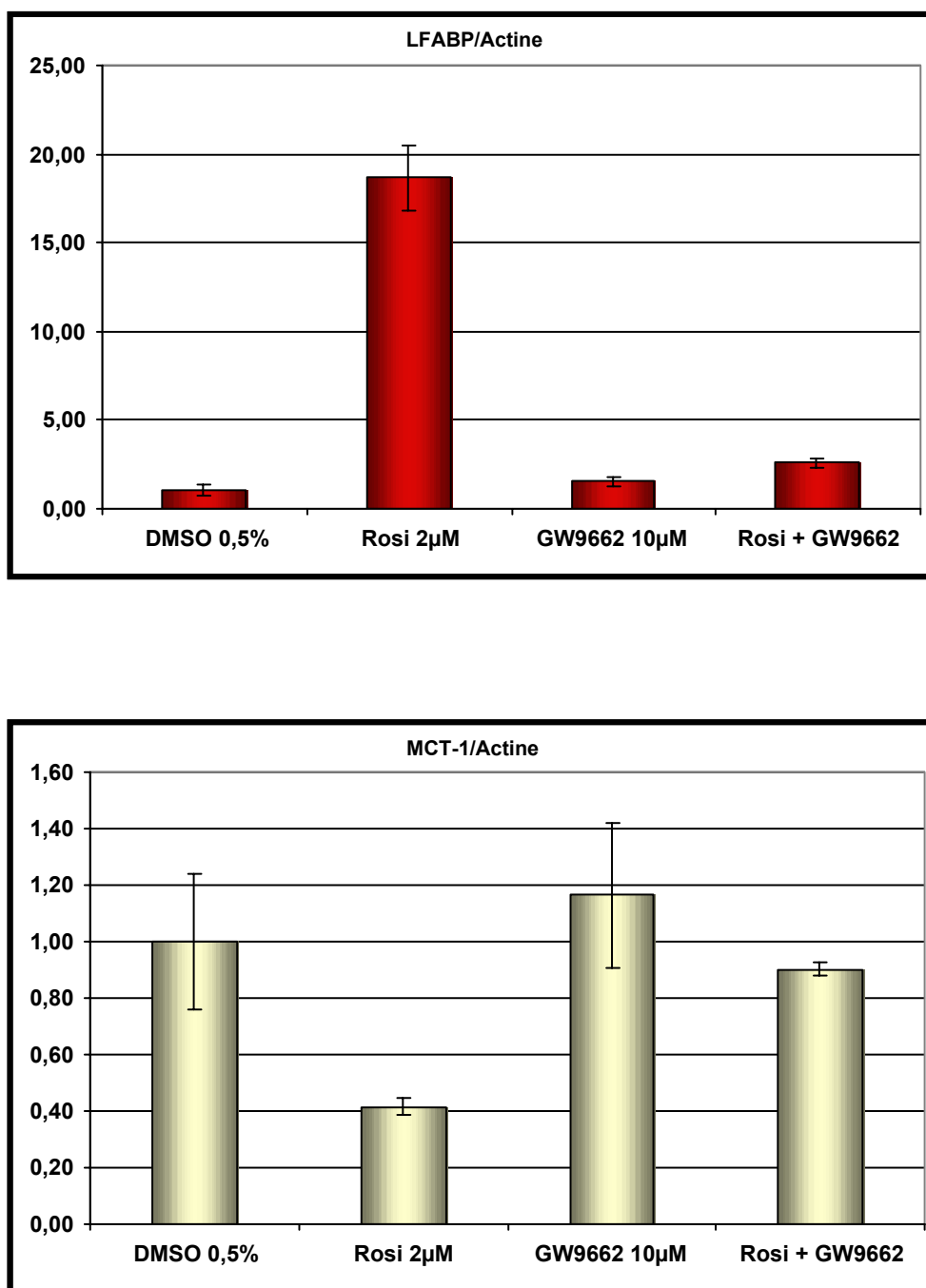


Figure 33 : Effet de la Rosiglitazone et du GW9662, antagoniste de PPAR γ , sur l'expression des ARNms codant pour la L-FABP et MCT-1 dans les cellules cancéreuses coliques HT29Cl16.E

IV. 2. D. Effet d'un inhibiteur de NF- κ B, le PDTC, sur l'expression de MCT1 dans les cellules HT29C116.E

L'activation de PPAR γ par ses agonistes régule de façon négative l'expression de MCT-1 dans les cellules de la lignée HT29C116.E. Nous avons alors émis l'hypothèse que cela implique un mécanisme de *transrépression*. Le promoteur du gène codant pour MCT1 contient des éléments de réponse au facteur de transcription NF- κ B qui active son expression. Comme il l'a été décrit dans la synthèse bibliographique, l'activation de PPAR γ par la liaison d'un ligand peut entraîner son association avec NF- κ B, ce qui résulte en l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de ce dernier. Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé un inhibiteur de NF- κ B, le PDTC. Les cellules HT29C116.E différenciées cultivées sur filtre ont traitées pendant 24 heures en absence ou en présence soit de GW7845, soit de PDTC, ou les deux simultanément. Puis les PCRs en temps réel spécifiques de la L-FABP et de MCT1 ont été réalisées (Figure 34).

Le GW7845 augmente l'expression de la L-FABP. Le PDTC seul n'a aucun effet sur les niveaux basaux d'ARNms de ce marqueur. Le traitement des cellules avec le PDTC n'affecte pas l'augmentation de la L-FABP induite par le GW7845.

L'expression des ARNms codant pour MCT1 est réduite de 70% par le GW7845 seul. L'administration de PDTC seul la diminue de façon presque équivalente, d'environ 50%. L'inhibition du facteur de transcription NF- κ B est donc suffisante à elle seule pour réguler négativement et de façon significative la transcription du gène codant pour MCT1. Quand les cellules sont traitées avec le GW7845 et le PDTC, les niveaux d'ARNms codant pour MCT1 sont équivalents à ceux observés avec le GW7845 seul. Les effets de ces deux agents ne sont donc pas cumulatifs. Ceci suggère que les mécanismes impliqués soient les mêmes, en partie.

Il est donc possible d'imaginer que l'activation de PPAR γ par ses agonistes entraîne la diminution de l'expression de MCT1 dans les cellules HT29C116.E en passant par l'inhibition de l'activité de NF- κ B. Ces résultats suggèrent également que l'inhibition de ce facteur ne soit pas l'unique mécanisme impliqué, et que PPAR γ inhibe les activités d'autres facteurs de transcription contrôlant l'expression du gène codant pour MCT1, comme AP1, par exemple.

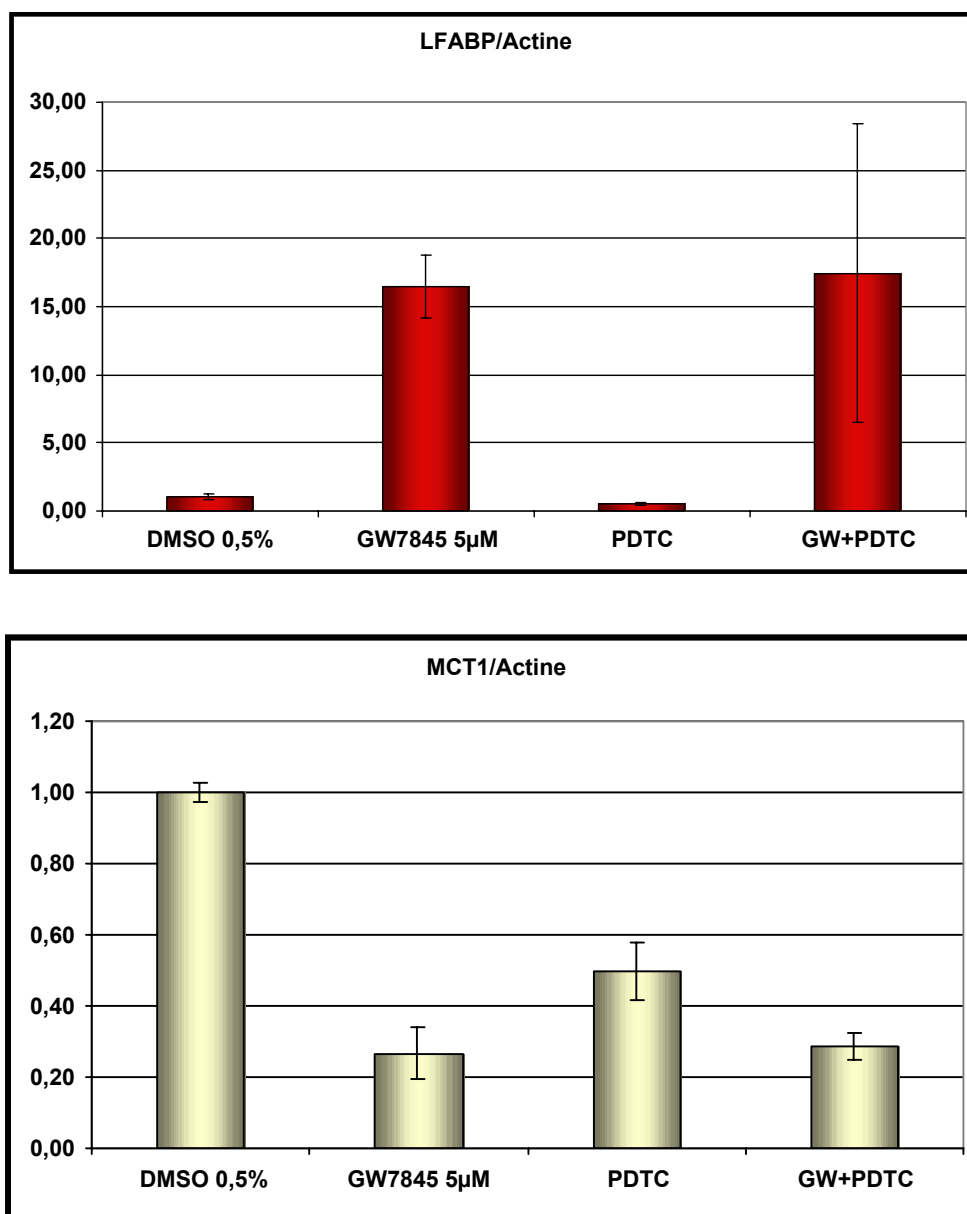


Figure 34 : Effet d'un inhibiteur de NF- κ B, le PDTC, sur l'expression des ARNms codant pour la L-FABP et MCT1 dans les HT29Cl16.E traitées ou non avec le GW7845. Analyse par PCR en temps réel.

V. Résultats marquants

En effectuant des recherches dans la littérature, notre intérêt s'est porté sur une étude rapportant la régulation négative de l'expression de MCT1 par les agonistes de PPAR γ . Nous avons démontré que la Rosiglitazone et le GW7845 induisent la diminution de l'expression de MCT1 dans un modèle de lignée cellulaire cancéreuses coliques humaines différenciées et polarisées, les HT29C16.E. Cette inhibition est dépendante de l'activation de PPAR γ . Mais MCT-1 ne constituerait pas une cible directe du récepteur. Nous avons émis l'hypothèse que PPAR γ régule indirectement l'expression de MCT1 par un mécanisme de transrépression, et que NF- κ B soit le facteur intermédiaire impliqué. Nos résultats apportent des éléments qui suggèrent fortement que l'activation de PPAR γ par ses agonistes entraîne l'inhibition de l'activité de NF- κ B, ce qui l'empêcherait d'induire l'expression de MCT1.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

PPAR γ est un récepteur nucléaire qui contrôle l'expression de nombreux gènes cibles dans les tissus où il est exprimé. Dans le côlon, il a été montré que PPAR γ avait un rôle dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales de la muqueuse colique. Il a ainsi été impliqué dans la cancérogenèse colorectale. Les études *in vitro* et *in vivo* suggèrent fortement que PPAR γ serait un suppresseur de tumeur. Cependant, l'inefficacité des TZDs dans le traitement du cancer colorectal (Kulke et al., 2002) conduit à penser que PPAR γ perdrait sa fonctionnalité dans le contexte de cette pathologie. Nous nous sommes donc intéressés à plusieurs types de mécanismes pouvant conduire à l'altération de la fonction de PPAR γ dans les tumeurs colorectales humaines.

Dans un premier temps, nous avons analysé la présence de mutations inactivatrices au niveau du gène codant pour le récepteur nucléaire dans ces tumeurs. Nous avons pu développer et mettre au point une technique de PCR en temps réel spécifique d'allèle qui nous permettait de détecter avec une grande sensibilité la mutation K422Q, identifiée *in vitro* dans la littérature (Gupta et al., 2002). Nous avons ainsi testé 170 tumeurs colorectales primaires humaines et 12 métastases hépatiques dérivées de cancers colorectaux. Nous n'avons jamais décelé la mutation K422Q. Nous avons alors étendu nos investigations à l'ensemble de l'exon 6 du gène codant pour PPAR γ . Nous avons séquencé cet exon dans 40 tumeurs colorectales primaires humaines et n'avons détecté aucune mutation. Nous en avons conclu que si des mutations inactivatrices de PPAR γ existaient au niveau de l'exon 6 du gène codant pour le récepteur, alors elles constituaient des événements extrêmement rares.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'expression de PPAR γ et de ses co-activateurs dans les tumeurs colorectales humaines. Nous avons observé par PCR quantitative en temps réel que l'expression de PPAR γ était hétérogène dans la muqueuse colique tumorale comparée à ses niveaux d'expression dans la muqueuse saine. Dans les biopsies, l'expression de SRC-1 était aussi hétérogène, tandis que celles de RXR α et PGC-1 diminuaient dans la moitié des tumeurs. Celles de PRIP, PBP, p300 et CBP étaient toutes augmentées de façon significative dans la majorité, voire dans 100% des tumeurs colorectales humaines pour CBP. Ces résultats nous ont amenés à conclure que la dérégulation de la fonction de PPAR γ dans les cancers colorectaux implique l'expression aberrante de PPAR γ et de ses co-activateurs. Nous avons aussi analysé l'expression du dominant négatif de PPAR γ décrit dans la littérature, ORF4. Nous avons montré qu'ORF4 n'était exprimé que dans les tumeurs dans lesquelles PPAR γ était détecté. Sur quatorze tumeurs exprimant les deux transcrits, dix présentaient des niveaux d'ORF4 supérieurs à ceux de PPAR γ . Dans les quatre

restantes, les deux variants étaient exprimés à des niveaux comparables. ORF4 constitue donc un argument majeur pour expliquer l'incapacité des TZDs à exercer des effets anti-cancérigènes dans le contexte du cancer colorectal.

Enfin, parallèlement à ces travaux, nous avons recherché des gènes cibles de PPAR γ dans les cellules cancéreuses coliques humaines. Nous avons montré dans ces cellules que le transporteur membranaire des monocarboxylates MCT-1 était une cible indirecte du récepteur nucléaire. Nos résultats suggèrent que PPAR γ inhibe l'expression de MCT-1 par un mécanisme de transrépression vis-à-vis de NF- κ B.

I. Altérations de PPAR γ dans les tumeurs colorectales humaines

Nous avons ciblé notre recherche sur l'exon 6 du gène *PPAR γ* , pour plusieurs raisons. Tout d'abord, parce que les études effectuées dans les tumeurs colorectales humaines parues jusqu'ici ne concernaient que les exons 3 et 5 de ce gène. Nous avons vu dans la synthèse bibliographique que l'exon 6 code pour la partie C-terminale du LBD de PPAR γ , qui contient la région AF2. Cette région est impliquée dans le recrutement et les interactions avec les cofacteurs de PPAR γ . Elle est donc primordiale pour l'activité transcriptionnelle du récepteur. Il était donc pertinent de s'intéresser à l'exon 6 du gène codant pour PPAR γ du fait de son importance fonctionnelle. Finalement, la mutation K422Q inactivatrice de PPAR γ avait déjà été identifiée *in vitro* au niveau de cet exon. La première étape de ce travail a donc été d'analyser l'existence de cette mutation dans des tumeurs colorectales humaines.

Nos résultats ne sont pas surprenants dans la mesure où d'après la littérature, les mutations inactivatrices de PPAR γ dans le contexte des cancers constituent des événements rares. L'exemple de l'étude menée par l'équipe d'Ikezoe est éloquent. Les auteurs n'ont détecté aucune mutation du gène codant pour PPAR γ (exons 3 et 5) sur un ensemble de 339 tumeurs humaines issues de cancers du colon, du sein, du poumon, de la prostate, d'ostéosarcomes, de liposarcomes, de lymphomes et issues de leucémies. De la même façon, ils ne détectèrent aucune mutation dans des lignées cellulaires cancéreuses humaines correspondantes. En ce qui concerne le cancer colorectal, sur 168 tumeurs humaines (Sarraf et al., 1999 ; Hisatake et al., 2000 ; Ikezoe et al., 2001), seules 4 mutations somatiques inactivatrices de PPAR γ ont été identifiées (Sarraf et al., 1998). Celles-ci, comme la mutation

K422Q, étaient toutes mono-alléliques, sans perte d'hétérozygotie apparente. Il se peut que dans ces cas, la signalisation induite par PPAR γ soit perturbée par un mécanisme d'haplo-insuffisance ou de dominant négatif. Comme les autres molécules qui forment des complexes hétérodimériques, les protéines PPAR γ qui portent ces mutations somatiques hétérozygotes tout en conservant la capacité de se lier aux récepteurs RXRs et/ou à l'ADN pourraient exercer un effet dominant négatif. Il est donc probable que l'haplo-insuffisance au locus *ppary* soit un mécanisme permettant de relier des mutations à ce site avec les tumeurs. Il existe déjà des exemples illustrant l'importance et les conséquences fonctionnelles de l'haplo-insuffisance dans des conditions néoplastiques. Les mutations mono-alléliques germinales de PTEN entraînent le syndrome de Cowden. Ce syndrome est associé avec de hauts risques de développer des tumeurs bénignes et malignes dans des organes comme le sein ou la thyroïde (Marsh et al., 1998a). Souvent, ces tumeurs ne présentent pas d'inactivation bi-allélique (Marsh et al., 1998b). La modélisation stochastique de l'expression des gènes confirme ces données en démontrant l'importance de l'implication de l'haplo-insuffisance dans le cancer (Cook et al., 1998). Ainsi il est devenu évident qu'une inactivation bi-allélique solitaire au niveau d'un locus à l'origine du cancer est une vue simpliste. Le cancer est le résultat d'un ensemble de défauts génétiques et épigénétiques. Dans ce contexte, PPAR γ constitue probablement l'un des gènes importants dans le processus de la cancérogenèse colorectale.

Mais comment expliquer que jusque là, une seule étude ait mis en évidence 4 mutations inactivatrices du gène codant pour PPAR γ dans les cancers colorectaux quand aucune autre n'en ait détectée? D'une part, seule une partie du gène *PPAR γ* a été analysée. Il est donc possible que des altérations de ce gène existent dans d'autres régions. D'autre part, il se pourrait que le taux de mutation soit lié à la stabilité génétique des tumeurs testées. L'instabilité génétique est un catalyseur moléculaire nécessaire à la cancérogenèse. Il existe deux grandes voies de la cancérogenèse colorectale : l'instabilité chromosomique et l'instabilité microsatellitaire. Les bases de l'instabilité chromosomique sont inconnues à ce jour. Elle a été montrée dans des tumeurs stables qui présentaient des réarrangements chromosomiques (Markowitz et al., 2002). Les tumeurs sont alors dites MSS (pour MicroSatellite Stability). Près de 80% des cancers colorectaux sporadiques (Houlston et al., 2001) et 100% des cas de PAF (Tejpar et al., 2001) présentent une instabilité chromosomique. L'instabilité microsatellite est due à des mutations au niveau d'un ou de plusieurs gènes de réparation de l'ADN. Ce sont des composants du complexe MMR (pour DNA MisMatch

Repair). L'inactivation d'un gène MMR n'est pas oncogénique en elle-même, mais elle confère un phénotype mutateur qui peut accélérer le développement du cancer colorectal en moins de 36 mois. En effet, elle peut induire une augmentation du taux de mutations spontanées mille fois plus importante qu'en temps normal (Markowitz et al., 2002). Les tumeurs déficientes pour un gène MMR accumulent également des mutations dans environ 40% au niveau de séquences répétitives non codantes microsatellites (Houlston et al., 2001). Ces tumeurs instables au niveau microsatellite sont dites MSI (pour MicroSatellite Instability). Environ 95% des cancers héréditaires non polyposiques HNPCC (Markowitz et al., 2002) et 15% des cancers sporadiques (Houlston et al., 2001) sont MSI. Dans notre étude, 125 tumeurs colorectales humaines ont été analysées pour l'instabilité microsatellite. Soixante trois ont été classées MSI, 62 MSS. Nous n'avons pas détecté de mutation au niveau de l'exon 6 du gène codant pour PPAR γ quelque soit le statut de ces tumeurs. De façon décevante, l'étude de Sarraf et de ses collaborateurs, où les 4 mutations inactivatrices de PPAR γ ont été identifiées, ne donne aucun renseignement sur le statut microsatellite des tumeurs colorectales humaines analysées. Connaissant le statut microsatellite des tumeurs que nous avons à notre disposition, il serait intéressant d'effectuer le séquençage des autres exons du gène codant pour PPAR γ dans ces tumeurs.

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons montré que l'expression de PPAR γ était hétérogène dans les tumeurs colorectales humaines comparativement aux tissus sains. Nous nous sommes également intéressés à l'expression du dominant négatif de PPAR γ , ORF4. Celui-ci est généré par épissage alternatif aberrant dans le cancer colorectal. Ceci est dû à des mutations des sites d'épissage situés au niveau des introns du gène codant pour PPAR γ . Actuellement, il n'existe pas d'information sur la fréquence de ce type de mutation pour le récepteur nucléaire dans le cancer du côlon. Le séquençage des sites d'épissage au niveau des introns du gène PPAR γ dans les tumeurs colorectales humaines éclaircira l'importance de ces mutations dans la cancérogenèse colique. Cela permettra également de déterminer si d'autres transcrits aberrants de PPAR γ existent. Si tel est le cas, ceci pourrait apporter un élément d'explication pour l'hétérogénéité de l'expression du récepteur nucléaire sauvage dans les tumeurs colorectales humaines.

II. Expression de PPAR γ et de ses co-activateurs dans les tumeurs colorectales humaines

La résistance du cancer à la Troglitazone dans les études cliniques peut avoir d'autres origines que des altérations génétiques. L'activité de PPAR γ ne dépend pas uniquement de son activation par un ligand, mais également de son niveau d'expression, de son activation indépendante de la présence d'un ligand, de son état de phosphorylation, de la présence ou de l'absence de ses cofacteurs. D'autres explications pour l'inefficacité des TZDs dans le traitement du cancer colorectal peuvent donc résider dans des altérations de l'expression de PPAR γ et/ou de ses co-activateurs dans le contexte du cancer colorectal.

Pendant la réalisation de nos travaux, une autre équipe s'est intéressée à l'expression de PPAR γ et de PGC-1 dans les tumeurs colorectales humaines. Leurs résultats corrèlent avec les nôtres (Feilchenfeldt et al. 2004). Sur 17 prélèvements, ils ont aussi observé que l'expression de PPAR γ est dérégulée dans la majorité des cancers colorectaux, mais que cette dérégulation peut aussi bien aller dans le sens d'une augmentation que d'une diminution. De la même façon, ils indiquaient aussi la diminution de RXR α et de PGC1 dans la majorité des carcinomes colorectaux par rapport aux tissus sains appariés.

Tous ces résultats ont été obtenus au niveau transcriptionnel. Des marquages immunohistochimiques utilisant un anticorps dirigé contre la protéine PPAR γ ont été réalisés sur des coupes des tumeurs colorectales humaines au sein du laboratoire (résultats non montrés). Ces travaux ont permis de retrouver l'hétérogénéité de l'expression de PPAR γ au niveau protéique. Ils restent à réaliser pour les co-facteurs de PPAR γ .

L'expression de PPAR γ dans les tumeurs colorectales humaines serait donc hétérogène comparativement aux tissus sains à la fois au niveau transcriptionnel et protéique, mais il reste le problème de la fonctionnalité du récepteur quelque soit son expression. Notre technique de PCR en temps réel pour PPAR γ était spécifique des transcrits possédant la séquence codante pour le LBD du récepteur. Ceci nous permettait d'éliminer la quantification du récepteur dominant négatif ORF4. Mais d'autres mécanismes peuvent altérer la fonction de PPAR γ dans le contexte du cancer colorectal, comme la dérégulation des voies de signalisation régulant l'activité de PPAR γ . Notamment, nous avons vu dans la synthèse bibliographique que l'activité de PPAR γ dépend entre autres de son état de phosphorylation. Les altérations du gène codant pour la protéine kinase RAS sont extrêmement fréquentes dans le cancer

colorectal. Celles-ci induisent l'hyperactivation des voies des MAPK ERK1/2 et JNK (Webb et al., 1998), qui inhibent la fonction de PPAR γ en le phosphorylant directement (Hu et al., 1996 ; Adams et al., 1997). Ce mécanisme a été impliqué dans la résistance aux TZDs dans au moins un cancer du sein (Mueller et al., 1998). Dans quelle mesure est-il impliqué dans la cancérogenèse colorectale chez l'homme ? L'étude du statut de phosphorylation de PPAR γ dans les tumeurs coliques humaines permettrait d'apporter des éléments de réponse à cette question. Il s'agirait pour cela de réaliser des immunoprécipitations grâce à des anticorps dirigés contre PPAR γ à partir de ces tumeurs, puis d'effectuer des immunoempreintes utilisant des anticorps dirigés contre les résidus sérine et tyrosine phosphorylés.

Nous avons montré que les niveaux d'expression des co-facteurs de PPAR γ étaient également dérégulés dans les tumeurs colorectales humaines comparativement aux tissus sains. Les conséquences physiologiques de l'ensemble de ces dérégulations restent encore largement à élucider. Nos résultats ne font pas apparaître de corrélation évidente entre les types de dérégulation d'expression de chacun des facteurs que nous avons analysés. Quelques tendances apparaissent cependant. Par exemple, l'expression de RXR α ne varie pas dans les tumeurs colorectales dans lesquelles celle de PPAR γ non plus. De la même façon, quand l'expression de PPAR γ diminue dans les tumeurs, celle de RXR α aussi. Par contre, quand les niveaux du transcrit PPAR γ augmentent, ceux de RXR α deviennent hétérogènes. Ensuite, l'expression de PGC-1 augmente seulement dans les cas où celle de PPAR γ diminue. Les niveaux de PRIP et de p300 diminuent seulement dans les tumeurs où ceux de PPAR γ diminuent. L'interprétation de ces résultats est difficile, car les voies de régulation de ces facteurs leurs sont à la fois communes et propres. A tout ceci s'ajoute le fait que les co-activateurs auxquels nous nous sommes intéressés ne sont pas spécifiques de PPAR γ , et la dérégulation de leur expression doit toucher d'autres voies de signalisations. CBP, par exemple, est surexprimé dans l'ensemble des tumeurs colorectales coliques que nous avons testées. Dans quelle mesure ce phénomène consiste en une compensation de la diminution de l'expression d'autres facteurs ? Les voies régulant son expression sont-elles dérégulées ? Ces aspects demandent à être approfondis. CBP est un co-activateur pour de nombreux autres récepteurs nucléaires, il est fortement probable que l'augmentation de son expression affecte les voies de signalisation contrôlées par ceux-ci. CBP est également un partenaire pour des facteurs de transcription comme AP1. Ce dernier est impliqué dans le contrôle de l'expression de gènes cibles codant pour des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire. La

surexpression de CBP dans les tumeurs colorectales humaines pourrait donc être un élément à l'origine de la dérégulation des voies de contrôle de la prolifération cellulaire dans le cancer colorectal. Il reste à déterminer si cette expression aberrante est un événement précoce ou plus tardif dans le processus de la cancérogenèse colique. L'analyse sera réalisée en immunohistochimie.

Il serait intéressant aussi de tester l'expression des co-répresseurs de PPAR γ dans les cancers colorectaux humains. Nous avons tenté de mettre au point une PCR en temps réel spécifique de SMRT, mais les couples d'amorces que nous avons dessinés jusque-là ne possèdent pas une spécificité convenable pour ce transcrit.

III. Expression du variant d'épissage ORF4 dans les tumeurs colorectales humaines

Pendant la réalisation de nos travaux, l'équipe de Sabatino a identifié dans les cancers colorectaux humains un variant d'épissage pour PPAR γ qui agit comme un dominant négatif sur le récepteur sauvage. Il s'agit d'ORF4. La protéine issue de ce variant ne possède pas de LBD. *In vitro*, ORF4 n'a pas d'effet anti-prolifératif et au contraire active la prolifération des cellules cancéreuses coliques humaines. De plus, ORF4 était exprimé dans les tumeurs colorectales humaines (Sabatino et al., 2005). Du fait qu'ORF4 ne possède pas de LBD, son incapacité à activer la transcription des gènes cibles serait probablement due à l'impossibilité de lier un ligand ainsi que de recruter des cofacteurs. Cependant, ORF4 contient toujours un DBD fonctionnel, ce qui lui permet de se lier à l'ADN et de former des hétérodimères avec les RXRs (Sabatino et al., 2005). Ces complexes seraient alors inactifs d'un point de vue transcriptionnel et entreraient en compétition avec les hétérodimères formés avec PPAR γ sauvage. ORF4 constituait donc un élément d'explication potentiel pour l'inefficacité des TZDs pour le traitement du cancer colorectal. Nos résultats vont dans ce sens, puisque nous avons montré non seulement qu'ORF4 était exprimé dans les tumeurs dans lesquelles PPAR γ était détecté, mais aussi que ses niveaux d'expression étaient supérieurs sinon équivalents à ceux du récepteur nucléaire sauvage.

Le cas du dominant négatif ORF4 n'est pas un cas isolé. Une caractéristique générale du génome est sa plasticité, c'est-à-dire que sa capacité codante est supérieure au nombre de gènes identifiés. La génération de protéines avec des fonctions distinctes à partir d'un seul transcrit est fréquemment due à l'épissage alternatif. C'est le processus par lequel des molécules de pré-ARNm identiques sont épissées de différentes façons. Ce mécanisme est important dans le développement normal des organismes complexes, car il crée la diversité des protéines. Il est donc impliqué dans des activités physiologiques, mais également dans le processus de la cancérogenèse ou dans la progression d'autres pathologies quand il est aberrant. En ce qui concerne les récepteurs nucléaires, les protéines issues de l'épissage alternatif qui présentent des fonctions distinctes, voire opposées au produit sauvage du gène peuvent représenter un mécanisme général qui permettrait de moduler la fonction du récepteur en réponse à différentes conditions physiologiques. Mais l'épissage alternatif est également associé à de nombreuses pathologies comme la déficience en hormone de croissance, le syndrome de Frasier, la maladie de Parkinson, la fibrose kystique, l'atrophie musculaire spinale, et la dystrophie myotonique. Les défauts d'épissage de l'ARNm sont également des causes importantes de cancer (Venables, 2004). Les formes les plus communes de ces défauts d'épissage sont les mutations ponctuelles au niveau de sites génomiques d'épissage. Une étude récente a identifié 29 mutations sur le site d'épissage de p53 dans plus de 12 types de cancers différents (Holmila et al., 2003). La production par épissage alternatif de protéines exerçant une activité répressive vis-à-vis de leur homologue sauvage a donc déjà été observée pour de nombreux facteurs, en particulier pour des récepteurs nucléaires (Desbois et al., 1991).

D'autres types d'altérations épigénétiques peuvent être à l'origine de la production d'un récepteur PPAR γ non fonctionnel. Il s'agit entre autres des phénomènes de translocation chromosomique. Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, le locus *ppar γ* est un site pour l'utilisation différentielle de promoteurs, ce qui donne naissance à au moins trois transcrits différents, PPAR γ 1, 2, et 3. Des translocations chromosomiques peuvent aussi survenir à ce locus. En effet, l'équipe de Kroll a montré que cinq carcinomes folliculaires sur huit présentaient une translocation chromosomique (t(2;3) (q13;p25) qui résultait en l'expression d'une protéine de fusion chimérique entre PAX8 (un facteur de transcription thyroïdien) et PPAR γ . Ce transcrit inhibait l'activation transcriptionnelle de PPAR γ par les TZDs en agissant comme un dominant négatif (Kroll et al., 2000 ; Martelli et al., 2002).

Cependant, la contribution de ce produit de fusion dans la cancérogenèse thyroïdienne reste à préciser.

La voie de signalisation PPAR γ pourrait donc être affectée par des variations du rapport entre les différents isoformes générés par épissage alternatif, un processus activé par des conditions de croissance variées. ORF4 constituerait un de ces éléments alternatifs. L'équipe de Sabatino suggère que ce transcrit puisse être considéré comme un marqueur diagnostique. Nos résultats s'accordent avec cette suggestion. Il est cependant nécessaire d'analyser de plus grandes séries de biopsies avant de pouvoir inclure ORF4 dans l'inventaire diagnostique tumoral. De la même façon, les mécanismes moléculaires qui permettent la progression vers un phénotype transformé restent encore largement à élucider. Il est également d'intérêt de mettre au point l'étude de l'expression d'ORF4 dans les tumeurs colorectales humaines au niveau protéique, par immunohistochimie. Il sera nécessaire pour cela de produire des anticorps polyclonaux spécifiques de la protéine ORF4.

Enfin, la découverte du variant ORF4 dans les cancers colorectaux soulève aussi la question de savoir si celui-ci est exprimé dans d'autres types de cancers, comme celui du rein, de la prostate ou du sein, dans lesquels PPAR γ a été impliqué.

IV. Identification d'un gène cible de PPAR γ dans les cellules cancéreuses coliques humaines : MCT1

MCT1 est un transporteur pour les monocarboxylates. Exprimé à la membrane apicale des cellules épithéliales coliques, il permet le transport du butyrate de la lumière du tube digestif aux colonocytes. Le butyrate est un acide gras à chaîne courte (AGCC) qui constitue la source majeure d'énergie de ces cellules et qui a un rôle régulateur de leur prolifération et de leur différenciation. L'implication de MCT1 dans son transport est donc importante d'un point de vue physiologique. Il avait été montré dans les adipocytes que l'expression de MCT1 était diminuée par l'activation de PPAR γ , et nous avons voulu savoir si le récepteur régulait également l'expression du transporteur dans les cellules épithéliales cancéreuses coliques humaines. Nous avons pour cela utilisé une lignée différenciée et polarisée, la lignée HT29Cl16.E. Par PCR quantitative en temps réel, nous avons observé que le traitement de ces cellules avec des agonistes de PPAR γ , la Rosiglitazone et le GW7845 induisait la diminution

de l'expression des ARNms codant pour MCT1 de façon significative, et de façon dépendante de l'activation de PPAR γ . Nos résultats suggèrent que la régulation de l'expression de MCT1 par PPAR γ dans les cellules épithéliales cancéreuses coliques humaines passe par l'inhibition de l'activité de NF- κ B par un mécanisme de transrépression. Le promoteur du gène codant pour MCT1 contient des sites de réponse à ce facteur de transcription, qui active son expression.

Une équipe a montré que l'expression de MCT1 était réduite dans les tumeurs colorectales humaines, comparativement à la muqueuse saine (Ritzhaupt et al. 1998). Ceci impliquerait un défaut dans le transport et le métabolisme des AGCCs comme le butyrate, requis pour maintenir les événements intracellulaires qui régulent la différenciation normale et la prolifération dans la muqueuse colique. Or le métabolisme des AGCCs fournit 60 à 70% de l'énergie des colonocytes sains. Plus récemment, l'équipe de Lambert a également observé le déclin de l'expression de MCT-1 pendant la cancérogenèse (Lambert et al., 2002). Dans leur étude, ils indiquaient que les tumeurs colorectales humaines qui présentaient de bas niveaux de MCT-1 exprimaient fortement le transporteur du glucose GLUT1. L'augmentation du métabolisme du glucose est l'un des changements majeurs survenant dans les tissus cancéreux (Hatanaka, 1974). Il a d'ailleurs été suggéré que GLUT1 puisse être considéré comme un marqueur diagnostique du cancer colorectal (Sakashita et al., 2001). L'étude de Lambert et de ses collaborateurs suggère que l'augmentation de l'expression de GLUT1 corrèle avec la diminution de celle de MCT-1 (Lambert et al., 2002). Nous allons déterminer si c'est le cas dans les cellules cancéreuses coliques humaines de la lignée HT29Cl16.E, et si l'induction de la diminution de l'expression de MCT1 par les agonistes de PPAR γ entraîne l'augmentation de GLUT1 dans ces cellules. La mise au point de la PCR spécifique de Glut1 est en cours.

Nous avons montré que l'expression de PPAR γ était très hétérogène dans les tumeurs colorectales humaines, ce qui rend pour le moment le lien entre ces deux protagonistes difficile à établir *in vivo*. Une autre étude a rapporté que le butyrate induisait l'expression de PPAR γ dans les cellules épithéliales cancéreuses coliques humaines de la lignée Caco2 (Wächtershäuser et al., 2000). De la même façon, il augmenterait l'expression de MCT1 à la membrane apicale des cellules de la lignée AA/C1, une autre lignée cellulaire cancéreuse colique humaine (Cuff et al., 2002). Ajouté à nos résultats, cela peut constituer une contradiction apparente, dans la mesure où nous avons observé que PPAR γ induisait la diminution de l'expression de MCT1. Dans la synthèse bibliographique, il a été mentionné

que l'activation de PPAR γ entraîne l'augmentation de l'expression de la CKI p21^{Cip1/Waf1} dans les cellules épithéliales coliques humaines. Ce mécanisme est en partie responsable de l'inhibition de la prolifération cellulaire par le récepteur nucléaire. Le butyrate induit également l'augmentation de l'expression de cette CKI, ainsi que celle de la phosphatase alcaline intestinale (IAP), dans ce type cellulaire (Siavoshian et al., 1997 ; Stokrova et al., 1999 ; Blottière et al., 2003 ; Tureckova et al., 2005). D'autre part, il a été montré que le butyrate inhibe l'activité de NF- κ B dans les cellules épithéliales cancéreuses coliques humaines (Inan et al., 2000 ; Yin et al., 2001).

Il est alors possible d'imaginer un modèle de boucle de régulation négative entre PPAR γ , MCT1 et le butyrate, qui participerait à l'homéostasie de la muqueuse colorectale dans des conditions physiologiques (figure 35).

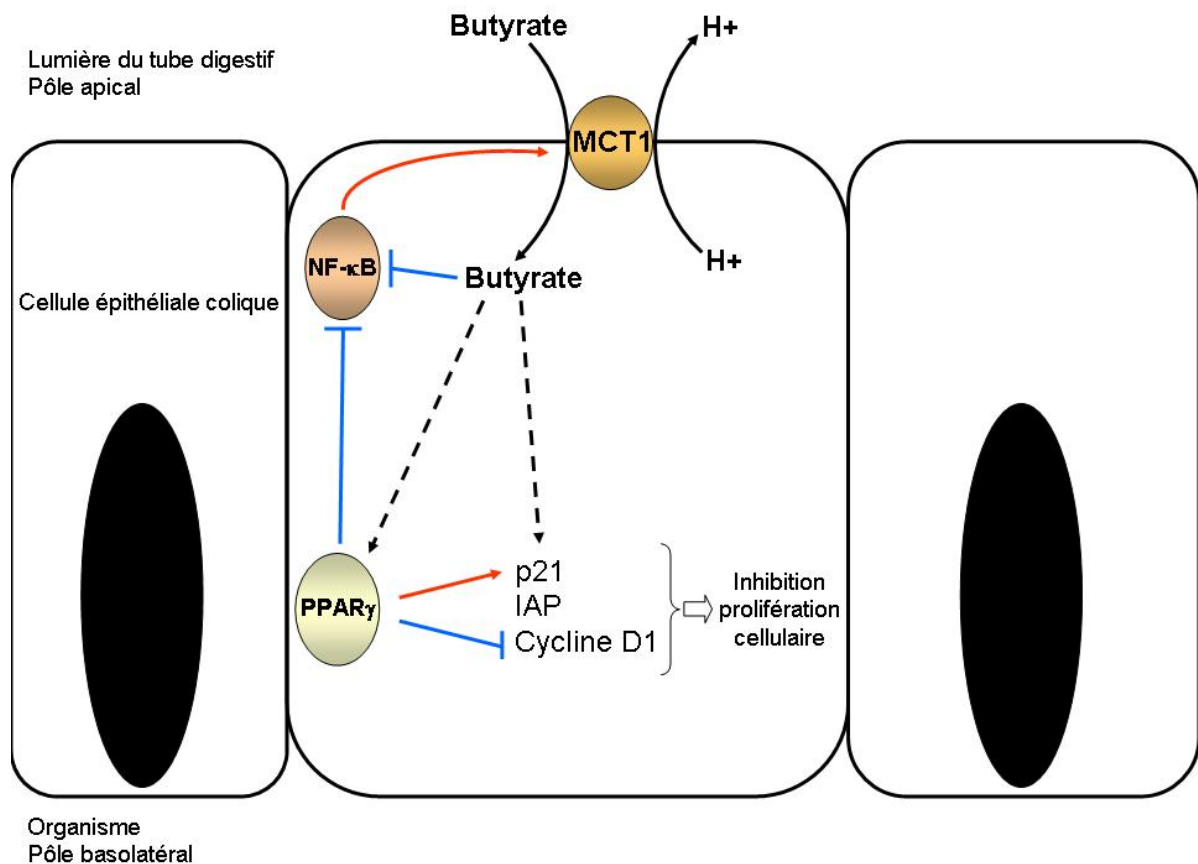


Figure 35 : modèle hypothétique pour la régulation de la prolifération des cellules épithéliales coliques humaines par le butyrate, MCT1 et PPAR γ .

Le modèle proposé est le suivant : MCT1 (Monocarboxylate transporter 1) est présent à la membrane apicale des colonocytes. Son expression est en partie contrôlée par NF- κ B (Nuclear Factor κ B). Il permet l'acheminement du butyrate de la lumière du tube digestif à la cellule. Cet AGCC inhibe l'activité de NF- κ B, et augmente l'expression de PPAR γ , autre agent inhibiteur de NF- κ B. Ces mécanismes constituent une boucle de régulation négative qui contribue au contrôle de l'expression de MCT-1. D'autre part, le butyrate induit l'augmentation de la CKI p21^{Waf1/Cip1} et de l'IAP (Intestinal alkaline Phosphatase). PPAR γ également augmente p21^{Waf1/Cip1} et inhibe l'expression de la Cycline D1. Ces mécanismes, associés, participent au contrôle de la prolifération cellulaire dans le colonocyte.

Nos résultats nécessitent d'être confirmés au niveau protéique. Au laboratoire, et en collaboration avec l'UFDNH (Unité des Fonctions Digestives et de Nutrition Humaine) de l'INRA de Nantes, nous mettons actuellement au point une technique d'immunoempreinte (Western Blot) pour analyser la régulation de la protéine MCT1 par les agonistes de PPAR γ dans les cellules de la lignée HT29C116.E.

Nous nous penchons aussi sur l'aspect fonctionnel de cette régulation. Nous nous sommes basés sur l'idée que si les agonistes de PPAR γ induisaient à terme une diminution de l'expression de la protéine MCT1, subséquente à l'inhibition de l'expression des ARNms, alors le transport de butyrate du milieu vers les cellules serait ralenti. Nous développons donc des tests de transport de butyrate marqué au carbone 14 dans les cellules de la lignée HT29C116.E traitées ou non avec la Rosiglitazone ou le GW7845.

Dans la BEI, MCT-1 est exprimé au niveau apical des colonocytes, avec un gradient croissant du fond des cryptes coliques vers la lumière du tube digestif (Lambert et al., 2002). Nous avons donc choisi de travailler sur un modèle cellulaire polarisé et différencié. Il nous faut encore tester la régulation de MCT-1 par les agonistes de PPAR γ dans d'autres lignées cellulaires cancéreuses coliques humaines que nous utilisons au laboratoire : Caco2, SW1116, LS174T,... Ceci nous permettra de nous assurer que les effets que nous avons observés avec les agonistes de PPAR γ ne sont pas spécifiques de la lignée HT29C116.E.

Nous avons identifié MCT-1 comme étant un gène cible de PPAR γ dans les cellules cancéreuses coliques humaines. Cette étape s'inscrit dans un projet global de recherche des gènes dont l'expression est régulée par PPAR γ dans ces cellules. Il existe en effet très peu de travaux à ce sujet. Une seule étude aborde la recherche de gènes régulés par une approche transcriptomique (Gupta et al., 2001). Mais dans ce travail, les cellules ont été traitées en phase de prolifération, et les cibles identifiées correspondent à des gènes impliqués directement dans la prolifération et/ou la différenciation cellulaire. Il nous paraissait donc intéressant d'effectuer cette recherche dans des cellules différenciées et qui ne prolifèrent plus. Le projet en cours au laboratoire est donc d'identifier les gènes cibles de PPAR γ dans les cellules cancéreuses coliques humaines HT29C116.E par hybridation de puces à ADN. La première partie de ce projet a été initiée au début de l'année. Les cellules HT29C116.E ont été cultivées sur filtres jusqu'à différenciation puis traitées avec de la Rosiglitazone (2 μ M) pendant 24 heures. Afin de distinguer les effets dépendants et indépendants de l'activation de PPAR γ , des cellules ont été traitées avec l'agoniste en l'absence ou en présence de

l'antagoniste GW9662 (10 μ M). Les ARNs extraits de ces expériences ont été utilisés pour procéder aux marquages et aux hybridations sur des puces Agilent 44K. Celles-ci permettent d'étudier 41 000 gènes. Les données issues de ces hybridations sont actuellement en cours d'interprétation. Elles serviront de base à la suite du projet.

BIBLIOGRAPHIE

- A -

(1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, **97**, 161-3.

A, I.J., Tan, N.S., Gelman, L., Kersten, S., Seydoux, J., Xu, J., Metzger, D., Canaple, L., Chambon, P., Wahli, W. and Desvergne, B. (2004) In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *Embo J*, **23**, 2083-91.

Acevedo, M.L. and Kraus, W.L. (2004) Transcriptional activation by nuclear receptors. *Essays Biochem*, **40**, 73-88.

Adams, M., Reginato, M.J., Shao, D., Lazar, M.A. and Chatterjee, V.K. (1997) Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem*, **272**, 5128-32.

Akaike, M., Che, W., Marmarosh, N.L., Ohta, S., Osawa, M., Ding, B., Berk, B.C., Yan, C. and Abe, J. (2004) The hinge-helix 1 region of peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) mediates interaction with extracellular signal-regulated kinase 5 and PPARgamma1 transcriptional activation: involvement in flow-induced PPARgamma activation in endothelial cells. *Mol Cell Biol*, **24**, 8691-704.

Alarcon de la Lastra, C., Sanchez-Fidalgo, S., Villegas, I. and Motilva, V. (2004) New pharmacological perspectives and therapeutic potential of PPAR-gamma agonists. *Curr Pharm Des*, **10**, 3505-24.

Altiook, S., Xu, M. and Spiegelman, B.M. (1997) PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev*, **11**, 1987-98.

Aranda, A. and Pascual, A. (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*, **81**, 1269-304.

Augeron, C. and Labois, C.L. (1984) Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res*, **44**, 3961-9.

- B -

Barbier, O., Torra, I.P., Duguay, Y., Blanquart, C., Fruchart, J.C., Glineur, C. and Staels, B. (2002) Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **22**, 717-26.

Barger, P.M., Browning, A.C., Garner, A.N. and Kelly, D.P. (2001) p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha: a potential role in the cardiac metabolic stress response. *J Biol Chem*, **276**, 44495-501.

Bassaganya-Riera, J., Hontecillas, R. and Beitz, D.C. (2002) Colonic anti-inflammatory mechanisms of conjugated linoleic acid. *Clin Nutr*, **21**, 451-9.

Beamer, B.A., Negri, C., Yen, C.J., Gavrilova, O., Rumberger, J.M., Durcan, M.J., Yarnall, D.P., Hawkins, A.L., Griffin, C.A., Burns, D.K., Roth, J., Reitman, M. and Shuldiner, A.R. (1997) Chromosomal localization and partial genomic structure of the human peroxisome proliferator activated receptor-gamma (hPPAR gamma) gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **233**, 756-9.

Belluzzi, A., Brignola, C., Campieri, M., Pera, A., Boschi, S. and Miglioli, M. (1996) Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med*, **334**, 1557-60.

Berger, J.P., Akiyama, T.E. and Meinke, P.T. (2005) PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci*, **26**, 244-51.

Blanquart, C., Barbier, O., Fruchart, J.C., Staels, B. and Glineur, C. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **85**, 267-73.

Blottière H., Buecher B., Galmiche JP., and Cherbut C. (2003) Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *PNAS*, **062**, 101-6.

Bogazzi, F., Ultimieri, F., Raggi, F., Russo, D., Brogioni, S., Cosci, C., Gasperi, M., Costa, A., Viacava, P., Mosca, F., Bartalena, L. and Martino, E. (2003) Colonic polyps of acromegalic patients are not associated with mutations of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene. *J Endocrinol Invest*, **26**, 1054-8.

Bou-Hanna, C., Berthon, B., Combettes, L., Claret, M. and Laboisse, C.L. (1994) Role of calcium in carbachol- and neurotensin-induced mucin exocytosis in a human colonic goblet cell line and cross-talk with the cyclic AMP pathway. *Biochem J*, **299 (Pt 2)**, 579-85.

Bouma, G. and Strober, W. (2003) The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, **3**, 521-33.

Branka, J.E., Vallette, G., Jarry, A. and Laboisse, C.L. (1997) Stimulation of mucin exocytosis from human epithelial cells by nitric oxide: evidence for a cGMP-dependent and a cGMP-independent pathway. *Biochem J*, **323 (Pt 2)**, 521-4.

Brockman, J.A., Gupta, R.A. and Dubois, R.N. (1998) Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology*, **115**, 1049-55.

Buecher, B., Heymann, M.F., and Blottière, H.M. (2001) [Rationale and prospects for the use of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in colorectal cancer. *Gastroenterol Clin Biol*, **25**, 967-78.

Bull, A.W., Steffensen, K.R., Leers, J. and Rafter, J.J. (2003) Activation of PPAR gamma in colon tumor cell lines by oxidized metabolites of linoleic acid, endogenous ligands for PPAR gamma. *Carcinogenesis*, **24**, 1717-22.

- C -

Castrillo, A., Diaz-Guerra, M.J., Hortelano, S., Martin-Sanz, P. and Bosca, L. (2000) Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol*, **20**, 1692-8.

Chang, T.H. and Szabo, E. (2000) Induction of differentiation and apoptosis by ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, **60**, 1129-38.

Chen, A. and Xu, J. (2005) Activation of PPAR{gamma} by curcumin inhibits Moser cell growth and mediates suppression of gene expression of cyclin D1 and EGFR. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **288**, G447-56.

Chen, C.W., Chang, Y.H., Tsi, C.J. and Lin, W.W. (2003) Inhibition of IFN-gamma-mediated inducible nitric oxide synthase induction by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2, involves inhibition of the upstream Janus kinase/STAT1 signaling pathway. *J Immunol*, **171**, 979-88.

Chen, F. and Harrison, L.E. (2005) Ciglitazone-induced cellular anti-proliferation increases p27kip1 protein levels through both increased transcriptional activity and inhibition of proteasome degradation. *Cell Signal*, **17**, 809-16.

Choudhry, M.A. and McEwan, I.J. (2004) In vitro regulation of reporter gene transcription by the androgen receptor AF1 domain. *Biochem Soc Trans*, **32**, 1103-6.

Chung, S.W., Kang, B.Y., Kim, S.H., Pak, Y.K., Cho, D., Trinchieri, G. and Kim, T.S. (2000) Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem*, **275**, 32681-7.

Claessens, F. and Gewirth, D.T. (2004) DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem*, **40**, 59-72.

Colombel, J.F. and Gower-Rousseau, C. (1993) [Crohn disease: will epidemiology find the key?]. *Rev Med Interne*, **14**, 147-8.

Cook, D.L., Gerber, A.N. and Tapscott, S.J. (1998) Modeling stochastic gene expression: implications for haploinsufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15641-6.

Corpet, D.E. and Pierre, F. (2003) Point: From animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **12**, 391-400.

Cronet, P., Petersen, J.F., Folmer, R., Blomberg, N., Sjoblom, K., Karlsson, U., Lindstedt, E.L. and Bamberg, K. (2001) Structure of the PPARalpha and -gamma ligand binding domain in complex with AZ 242; ligand selectivity and agonist activation in the PPAR family. *Structure (Camb)*, **9**, 699-706.

Crosby, M.B., Svenson, J.L., Zhang, J., Nicol, C.J., Gonzalez, F.J. and Gilkeson, G.S. (2005) Peroxisome proliferation-activated receptor (PPAR)gamma is not necessary for synthetic PPARgamma agonist inhibition of inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*, **312**, 69-76.

Cuff, M., Dyer, J., Jones, M. and Shirazi-Beechey, S. (2005) The human colonic monocarboxylate transporter Isoform 1: its potential importance to colonic tissue homeostasis. *Gastroenterology*, **128**, 676-86.

Cuff, M.A. and Shirazi-Beechey, S.P. (2002) The human monocarboxylate transporter, MCT1: genomic organization and promoter analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, **292**, 1048-56.

- D -

Delerive, P., Fruchart, J.C. and Staels, B. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol*, **169**, 453-9.

Demetri, G.D., Fletcher, C.D., Mueller, E., Sarraf, P., Nujols, R., Campbell, N., Spiegelman, B.M. and Singer, S. (1999) Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3951-6.

Desbois, C., Pain, B., Guilhot, C., Benchaibi, M., Ffrench, M., Ghysdael, J., Madjar, J.J. and Samarut, J. (1991) v-erbA oncogene abrogates growth inhibition of chicken embryo fibroblasts induced by retinoic acid. *Oncogene*, **6**, 2129-35.

Desreumaux, P., Dubuquoy, L., Nutten, S., Peuchmaur, M., Englaro, W., Schoonjans, K., Derijard, B., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P., Leibowitz, M.D., Colombel, J.F. and Auwerx, J. (2001) Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med*, **193**, 827-38.

Desreumaux, P., Ernst, O., Geboes, K., Gambiez, L., Berrebi, D., Muller-Alouf, H., Hafraoui, S., Emilie, D., Ectors, N., Peuchmaur, M., Cortot, A., Capron, M., Auwerx, J. and Colombel, J.F. (1999) Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gastroenterology*, **117**, 73-81.

Desvergne, B., Michalik, L. and Wahli, W. (2004) Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. *Mol Endocrinol*, **18**, 1321-32.

Desvergne, B. and Wahli, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, **20**, 649-88.

Diradourian, C., Girard, J. and Pegorier, J.P. (2005) Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie*, **87**, 33-8.

DiRenzo, J., Soderstrom, M., Kurokawa, R., Ogliastro, M.H., Ricote, M., Ingrey, S., Horlein, A., Rosenfeld, M.G. and Glass, C.K. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol Cell Biol*, **17**, 2166-76.

Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. and Wahli, W. (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, **68**, 879-87.

Dubuquoy, L., Bourdon, C., Peuchmaur, M., Leibowitz, M.D., Nutton, S., Colombel, J.F., Auwerx, J. and Desreumaux, P. (2000) [Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: a new target for the treatment of inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol Clin Biol*, **24**, 719-24.

Dubuquoy, L., Dharancy, S., Nutton, S., Pettersson, S., Auwerx, J. and Desreumaux, P. (2002) Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. *Lancet*, **360**, 1410-8.

Dubuquoy, L., Jansson, E.A., Deeb, S., Rakotobe, S., Karoui, M., Colombel, J.F., Auwerx, J., Pettersson, S. and Desreumaux, P. (2003) Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, **124**, 1265-76.

- E -

Elbrecht, A., Chen, Y., Cullinan, C.A., Hayes, N., Leibowitz, M., Moller, D.E. and Berger, J. (1996) Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun*, **224**, 431-7.

Escriva, H., Bertrand, S. and Laudet, V. (2004) The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem*, **40**, 11-26.

Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**, 889-95.

- F -

Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J.C., Deeb, S., Vidal-Puig, A., Flier, J., Briggs, M.R., Staels, B., Vidal, H. and Auwerx, J. (1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*, **272**, 18779-89.

Fajas, L., Fruchart, J.C. and Auwerx, J. (1998) PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett*, **438**, 55-60.

Feilchenfeldt, J., Brundler, M.A., Soravia, C., Totsch, M. and Meier, C.A. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and associated transcription factors in colon cancer: reduced expression of PPARgamma-coactivator 1 (PGC-1). *Cancer Lett*, **203**, 25-33.

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

Folkertsma, S., van Noort, P., Van Durme, J., Joosten, H.J., Bettler, E., Fleuren, W., Oliveira, L., Horn, F., de Vlieg, J. and Vriend, G. (2004) A family-based approach reveals the function of residues in the nuclear receptor ligand-binding domain. *J Mol Biol*, **341**, 321-35.

- G -

Gampe, R.T., Jr., Montana, V.G., Lambert, M.H., Wisely, G.B., Milburn, M.V. and Xu, H.E. (2000) Structural basis for autorepression of retinoid X receptor by tetramer formation and the AF-2 helix. *Genes Dev*, **14**, 2229-41.

Gearing, K.L., Gottlicher, M., Teboul, M., Widmark, E. and Gustafsson, J.A. (1993) Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1440-4.

Gelman, L., Fruchart, J.C. and Auwerx, J. (1999) An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 932-43.

Gervois, P., Torra, I.P., Chinetti, G., Grotzinger, T., Dubois, G., Fruchart, J.C., Fruchart-Najib, J., Leitersdorf, E. and Staels, B. (1999) A truncated human peroxisome proliferator-activated receptor alpha splice variant with dominant negative activity. *Mol Endocrinol*, **13**, 1535-49.

- Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B.** (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, **16**, 225-60.
- Giguere, V.** (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev*, **20**, 689-725.
- Giles, R.H., van Es, J.H. and Clevers, H.** (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1653**, 1-24.
- Gill, R.K., Saksena, S., Alrefai, W.A., Sarwar, Z., Goldstein, J.L., Carroll, R.E., Ramaswamy, K. and Dudeja, P.K.** (2005) Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *Am J Physiol Cell Physiol*, **289**, C846-52.
- Giovannucci, E. and Willett, W.C.** (1994) Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med*, **26**, 443-52.
- Girnun, G.D., Smith, W.M., Drori, S., Sarraf, P., Mueller, E., Eng, C., Nambiar, P., Rosenberg, D.W., Bronson, R.T., Edelman, W., Kucherlapati, R., Gonzalez, F.J. and Spiegelman, B.M.** (2002) APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13771-6.
- Green, S. and Chambon, P.** (1988) Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet*, **4**, 309-14.
- Greene, M.E., Blumberg, B., McBride, O.W., Yi, H.F., Kronquist, K., Kwan, K., Hsieh, L., Greene, G. and Nimer, S.D.** (1995) Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr*, **4**, 281-99.
- Grommes, C., Landreth, G.E. and Heneka, M.T.** (2004) Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol*, **5**, 419-29.

Gronemeyer, H., Gustafsson, J.A. and Laudet, V. (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 950-64.

Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995) Nuclear receptors. How to finger DNA. *Nature*, **375**, 190-1.

Guan, Y., Zhang, Y., Davis, L. and Breyer, M.D. (1997) Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in urinary tract of rabbits and humans. *Am J Physiol*, **273**, F1013-22.

Gupta, R.A., Brockman, J.A., Sarraf, P., Willson, T.M. and DuBois, R.N. (2001) Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells. *J Biol Chem*, **276**, 29681-7.

Gupta, R.A. and Dubois, R.N. (2002) Controversy: PPARgamma as a target for treatment of colorectal cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **283**, G266-9.

Gupta, R.A., Sarraf, P., Brockman, J.A., Shappell, S.B., Raftery, L.A., Willson, T.M. and DuBois, R.N. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and transforming growth factor-beta pathways inhibit intestinal epithelial cell growth by regulating levels of TSC-22. *J Biol Chem*, **278**, 7431-8.

Gupta, R.A., Sarraf, P., Mueller, E., Brockman, J.A., Prusakiewicz, J.J., Eng, C., Willson, T.M. and DuBois, R.N. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated differentiation: a mutation in colon cancer cells reveals divergent and cell type-specific mechanisms. *J Biol Chem*, **278**, 22669-77.

- H -

Hager, G.L., Nagaich, A.K., Johnson, T.A., Walker, D.A. and John, S. (2004) Dynamics of nuclear receptor movement and transcription. *Biochim Biophys Acta*, **1677**, 46-51.

Halestrap, A.P. and Price, N.T. (1999) The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J*, **343 Pt 2**, 281-99.

Han, S.W., Greene, M.E., Pitts, J., Wada, R.K. and Sidell, N. (2001) Novel expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human neuroblastoma cells. *Clin Cancer Res*, **7**, 98-104.

Hao, C.Y., Moore, D.H., Wong, P., Bennington, J.L., Lee, N.M. and Chen, L.C. (2005) Alteration of gene expression in macroscopically normal colonic mucosa from individuals with a family history of sporadic colon cancer. *Clin Cancer Res*, **11**, 1400-7.

Hatanaka, M. (1974) Transport of sugars in tumor cell membranes. *Biochim Biophys Acta*, **355**, 77-104.

Hawcroft, G., Gardner, S.H. and Hull, M.A. (2003) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not explain the antiproliferative activity of the nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin on human colorectal cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **305**, 632-7.

Hinojos, C.A., Sharp, Z.D. and Mancini, M.A. (2005) Molecular dynamics and nuclear receptor function. *Trends Endocrinol Metab*, **16**, 12-8.

Hirano, M., Osada, S., Aoki, T., Hirai, S., Hosaka, M., Inoue, J. and Ohno, S. (1996) MEK kinase is involved in tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation and degradation of IkappaB-alpha. *J Biol Chem*, **271**, 13234-8.

Holmila, R., Fouquet, C., Cadranel, J., Zalcman, G. and Soussi, T. (2003) Splice mutations in the p53 gene: case report and review of the literature. *Hum Mutat*, **21**, 101-2.

Houlston, R.S. (2001) What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol*, **54**, 206-14.

Hsi, L.C., Wilson, L., Nixon, J. and Eling, T.E. (2001) 15-lipoxygenase-1 metabolites down-regulate peroxisome proliferator-activated receptor gamma via the MAPK signaling pathway. *J Biol Chem*, **276**, 34545-52.

Hu, E., Kim, J.B., Sarraf, P. and Spiegelman, B.M. (1996) Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science*, **274**, 2100-3.

Huin, C., Schohn, H., Hatier, R., Bentejac, M., Antunes, L., Plenat, F., Bugaut, M. and Dauca, M. (2002) Expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma in differentiating human colon carcinoma Caco-2 cells. *Biol Cell*, **94**, 15-27.

- I -

Ikezo, T., Miller, C.W., Kawano, S., Heaney, A., Williamson, E.A., Hisatake, J., Green, E., Hofmann, W., Taguchi, H. and Koeffler, H.P. (2001) Mutational analysis of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in human malignancies. *Cancer Res*, **61**, 5307-10.

Inan, M., Rasoulpour, R., Yin, L., Hubbard, A., Rosenberg, D., and Giardina, C. (2000) The luminal short-chain acid butyrate modulates NF-κB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*, **118**, 724-34.

Issemann, I. and Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, **347**, 645-50.

- J -

Jarry, A., Merlin, D., Hopfer, U. and Laboisse, C.L. (1994) Cyclic AMP-induced mucin exocytosis is independent of Cl⁻ movements in human colonic epithelial cells (HT29-Cl.16E). *Biochem J*, **304** (Pt 3), 675-8.

Ji, J.D., Cheon, H., Jun, J.B., Choi, S.J., Kim, Y.R., Lee, Y.H., Kim, T.H., Chae, I.J., Song, G.G., Yoo, D.H., Kim, S.Y. and Sohn, J. (2001) Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) on the expression of inflammatory cytokines and apoptosis induction in rheumatoid synovial fibroblasts and monocytes. *J Autoimmun*, **17**, 215-21.

Jiang, C., Ting, A.T. and Seed, B. (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, **391**, 82-6.

Juge-Aubry, C., Pernin, A., Favez, T., Burger, A.G., Wahli, W., Meier, C.A. and Desvergne, B. (1997) DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem*, **272**, 25252-9.

Juge-Aubry, C.E., Hammar, E., Siegrist-Kaiser, C., Pernin, A., Takeshita, A., Chin, W.W., Burger, A.G. and Meier, C.A. (1999) Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J Biol Chem*, **274**, 10505-10.

- K -

Katayama, K., Wada, K., Nakajima, A., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Nakagawa, S., Kadowaki, T., Nagai, R., Kamisaki, Y., Blumberg, R.S. and Mayumi, T. (2003) A novel PPAR gamma gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology*, **124**, 1315-24.

Kato, M., Kusumi, T., Tsuchida, S., Tanaka, M., Sasaki, M. and Kudo, H. (2004) Induction of differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in colon cancer cell lines by troglitazone. *J Cancer Res Clin Oncol*, **130**, 73-9.

Khorasanizadeh, S. and Rastinejad, F. (2001) Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem Sci*, **26**, 384-90.

Kitamura, S., Miyazaki, Y., Shinomura, Y., Kondo, S., Kanayama, S. and Matsuzawa, Y. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Jpn J Cancer Res*, **90**, 75-80.

Kliwer, S.A., Forman, B.M., Blumberg, B., Ong, E.S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D.J., Umesono, K. and Evans, R.M. (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7355-9.

Kliewer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M. and Lehmann, J.M. (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4318-23.

Kliewer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A. and Evans, R.M. (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, **358**, 771-4.

Kliewer, S.A., Xu, H.E., Lambert, M.H. and Willson, T.M. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res*, **56**, 239-63.

Knotts, T.A., Orkiszewski, R.S., Cook, R.G., Edwards, D.P. and Weigel, N.L. (2001) Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J Biol Chem*, **276**, 8475-83.

Koeffler, H.P. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin Cancer Res*, **9**, 1-9.

Kovalovsky, D., Refojo, D., Holsboer, F. and Arzt, E. (2000) Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. *J Neuroimmunol*, **109**, 23-9.

Kroll, T.G., Sarraf, P., Pecciarini, L., Chen, C.J., Mueller, E., Spiegelman, B.M. and Fletcher, J.A. (2000) PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science*, **289**, 1357-60.

Kucera, T., Waltner-Law, M., Scott, D.K., Prasad, R. and Granner, D.K. (2002) A point mutation of the AF2 transactivation domain of the glucocorticoid receptor disrupts its interaction with steroid receptor coactivator 1. *J Biol Chem*, **277**, 26098-102.

Kulke, M.H., Demetri, G.D., Sharpless, N.E., Ryan, D.P., Shivdasani, R., Clark, J.S., Spiegelman, B.M., Kim, H., Mayer, R.J. and Fuchs, C.S. (2002) A phase II study of troglitazone, an activator of the PPARgamma receptor, in patients with chemotherapy-resistant metastatic colorectal cancer. *Cancer J*, **8**, 395-9.

Kumar, R., Betney, R., Li, J., Thompson, E.B. and McEwan, I.J. (2004) Induced alpha-helix structure in AF1 of the androgen receptor upon binding transcription factor TFIIF. *Biochemistry*, **43**, 3008-13.

Kumar, R. and Thompson, E.B. (2003) Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol*, **17**, 1-10.

Kumar, R. and Thompson, E.B. (2005) Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **94**, 383-94.

- L -

Lambert, D.W., Wood, I.S., Ellis, A. and Shirazi-Beechey, S.P. (2002) Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy. *Br J Cancer*, **86**, 1262-9.

Laudet, V. (1997) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol*, **19**, 207-26.

Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F. and Stehelin, D. (1992) Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *Embo J*, **11**, 1003-13.

Lazennec, G., Canaple, L., Saugy, D. and Wahli, W. (2000) Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol Endocrinol*, **14**, 1962-75.

Lee, C.H., Olson, P. and Evans, R.M. (2003) Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology*, **144**, 2201-7.

Lefebvre, A.M., Chen, I., Desreumaux, P., Najib, J., Fruchart, J.C., Geboes, K., Briggs, M., Heyman, R. and Auwerx, J. (1998) Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med*, **4**, 1053-7.

Lefebvre, M., Paulweber, B., Fajas, L., Woods, J., McCrary, C., Colombel, J.F., Najib, J., Fruchart, J.C., Datz, C., Vidal, H., Desreumaux, P. and Auwerx, J. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J Endocrinol*, **162**, 331-40.

Lehmann, J.M., Lenhard, J.M., Oliver, B.B., Ringold, G.M. and Kliewer, S.A. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*, **272**, 3406-10.

Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M. and Kliewer, S.A. (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*, **270**, 12953-6.

Lewis, J.D., Lichtenstein, G.R., Stein, R.B., Deren, J.J., Judge, T.A., Fogt, F., Furth, E.E., Demissie, E.J., Hurd, L.B., Su, C.G., Keilbaugh, S.A., Lazar, M.A. and Wu, G.D. (2001) An open-label trial of the PPAR-gamma ligand rosiglitazone for active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*, **96**, 3323-8.

Li, A.C. and Glass, C.K. (2004) PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J Lipid Res*, **45**, 2161-73.

Li, A.C. and Palinski, W. (2005) Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: How Their Effects on Macrophages Can Lead to the Development of a New Drug Therapy Against Atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.

Li, M., Pascual, G. and Glass, C.K. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol*, **20**, 4699-707.

Lonard, D.M. and O'Malley, B.W. (2005) Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem Sci*, **30**, 126-32.

- M -

Mangelsdorf, D.J. and Evans, R.M. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, **83**, 841-50.

Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. and Evans, R.M. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**, 835-9.

Markowitz, S.D., Dawson, D.M., Willis, J. and Willson, J.K. (2002) Focus on colon cancer. *Cancer Cell*, **1**, 233-6.

Marsh, D.J., Dahia, P.L., Caron, S., Kum, J.B., Frayling, I.M., Tomlinson, I.P., Hughes, K.S., Eeles, R.A., Hodgson, S.V., Murday, V.A., Houlston, R. and Eng, C. (1998) Germline PTEN mutations in Cowden syndrome-like families. *J Med Genet*, **35**, 881-5.

Marsh, D.J., Dahia, P.L., Caron, S., Kum, J.B., Frayling, I.M., Tomlinson, I.P., Hughes, K.S., Eeles, R.A., Hodgson, S.V., Murday, V.A., Houlston, R. and Eng, C. (1998) Germline PTEN mutations in Cowden syndrome-like families. *J Med Genet*, **35**, 881-5.

Marsh, D.J., Dahia, P.L., Coulon, V., Zheng, Z., Dorion-Bonnet, F., Call, K.M., Little, R., Lin, A.Y., Eeles, R.A., Goldstein, A.M., Hodgson, S.V., Richardson, A.L., Robinson, B.G., Weber, H.C., Longy, M. and Eng, C. (1998) Allelic imbalance, including deletion of PTEN/MMAC1, at the Cowden disease locus on 10q22-23, in hamartomas from patients with Cowden syndrome and germline PTEN mutation. *Genes Chromosomes Cancer*, **21**, 61-9.

Martelli, M.L., Iuliano, R., Le Pera, I., Sama, I., Monaco, C., Cammarota, S., Kroll, T., Chiariotti, L., Santoro, M. and Fusco, A. (2002) Inhibitory effects of peroxisome poliferator-activated receptor gamma on thyroid carcinoma cell growth. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 4728-35.

Marx, N., Duez, H., Fruchart, J.C. and Staels, B. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res*, **94**, 1168-78.

Matthiessen, M.W., Pedersen, G., Albrechtsen, T., Adamsen, S., Fleckner, J. and Brynskov, J. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor expression and activation in normal human colonic epithelial cells and tubular adenomas. *Scand J Gastroenterol*, **40**, 198-205.

McEwan, I.J. (2004) Sex, drugs and gene expression: signalling by members of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem*, **40**, 1-10.

Meyer, C.F., Wang, X., Chang, C., Templeton, D. and Tan, T.H. (1996) Interaction between c-Rel and the mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 signaling cascade in mediating kappaB enhancer activation. *J Biol Chem*, **271**, 8971-6.

Michalik, L., Desvergne, B. and Wahli, W. (2004) Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*, **4**, 61-70.

Moehler, M., Teufel, A. and Galle, P.R. (2005) New chemotherapeutic strategies in colorectal cancer. *Recent Results Cancer Res*, **165**, 250-9.

Moehren, U., Eckey, M. and Baniahmad, A. (2004) Gene repression by nuclear hormone receptors. *Essays Biochem*, **40**, 89-104.

Moras, D. and Gronemeyer, H. (1998) The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 384-91.

Morrison, R.F. and Farmer, S.R. (1999) Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J Biol Chem*, **274**, 17088-97.

Mueller, E., Sarraf, P., Tontonoz, P., Evans, R.M., Martin, K.J., Zhang, M., Fletcher, C., Singer, S. and Spiegelman, B.M. (1998) Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell*, **1**, 465-70.

Mueller, E., Smith, M., Sarraf, P., Kroll, T., Aiyer, A., Kaufman, D.S., Oh, W., Demetri, G., Figg, W.D., Zhou, X.P., Eng, C., Spiegelman, B.M. and Kantoff, P.W. (2000) Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10990-5.

Mukherjee, R., Jow, L., Croston, G.E. and Paterniti, J.R., Jr. (1997) Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem*, **272**, 8071-6.

Murphy, G.J. and Holder, J.C. (2000) PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 469-74.

- N -

Nagamine, M., Okumura, T., Tanno, S., Sawamukai, M., Motomura, W., Takahashi, N. and Kohgo, Y. (2003) PPAR gamma ligand-induced apoptosis through a p53-dependent mechanism in human gastric cancer cells. *Cancer Sci*, **94**, 338-43.

Nagy, L. and Schwabe, J.W. (2004) Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci*, **29**, 317-24.

Nakajima, A., Wada, K., Katayama, K., Saubermann, L., Osawa, E., Nagase, H., Ueno, N., Matsuhashi, N. and Aburatani, H. (2002) Gene expression profile after peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligand administration in dextran sodium sulfate mice. *J Gastroenterol*, **37 Suppl 14**, 62-6.

Nakajima, A., Wada, K., Miki, H., Kubota, N., Nakajima, N., Terauchi, Y., Ohnishi, S., Saubermann, L.J., Kadowaki, T., Blumberg, R.S., Nagai, R. and Matsuhashi, N. (2001) Endogenous PPAR gamma mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology*, **120**, 460-9.

Niho, N., Takahashi, M., Kitamura, T., Shoji, Y., Itoh, M., Noda, T., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (2003) Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Apc-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Cancer Res*, **63**, 6090-5.

Niho, N., Takahashi, M., Shoji, Y., Takeuchi, Y., Matsubara, S., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (2003) Dose-dependent suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Min mice by pioglitazone, a PPAR gamma ligand. *Cancer Sci*, **94**, 960-4.

Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K. and Milburn, M.V. (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*, **395**, 137-43.

Novac, N. and Heinzl, T. (2004) Nuclear receptors: overview and classification. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, **3**, 335-46.

- O -

Okuno, M., Arimoto, E., Nishizuka, M., Nishihara, T. and Imagawa, M. (2002) Isolation of up- or down-regulated genes in PPARgamma-expressing NIH-3T3 cells during differentiation into adipocytes. *FEBS Lett*, **519**, 108-12.

Ozer, H. and Diasio, R.B. (2004) Perspectives in the treatment of colorectal cancer. *Semin Oncol*, **31**, 14-8.

- P -

Pelletier, M. and Montplaisir, S. (1975) The nude mouse: a model of deficient T-cell function. *Methods Achiev Exp Pathol*, **7**, 149-66.

Peraldi, P., Xu, M. and Spiegelman, B.M. (1997) Thiazolidinediones block tumor necrosis factor-alpha-induced inhibition of insulin signaling. *J Clin Invest*, **100**, 1863-9.

Petrova, T.V., Akama, K.T. and Van Eldik, L.J. (1999) Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4668-73.

Pissios, P., Tzamelis, I. and Moore, D.D. (2001) New insights into receptor ligand binding domains from a novel assembly assay. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **76**, 3-7.

Posch, M.G., Zang, C., Mueller, W., Lass, U., von Deimling, A. and Elstner, E. (2004) Somatic mutations in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma are rare events in human cancer cells. *Med Sci Monit*, **10**, BR250-4.

- R -

Ricote, M., Huang, J., Fajas, L., Li, A., Welch, J., Najib, J., Witztum, J.L., Auwerx, J., Palinski, W. and Glass, C.K. (1998) Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7614-9.

Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J. and Glass, C.K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, **391**, 79-82.

Ritzhaupt, A., Wood, I.S., Ellis, A., Hosie, K.B. and Shirazi-Beechey, S.P. (1998) Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport L-lactate as well as butyrate. *J Physiol*, **513 (Pt 3)**, 719-32.

Ritzhaupt, A., Wood, I.S., Ellis, A., Hosie, K.B. and Shirazi-Beechey, S.P. (1998) Identification of a monocarboxylate transporter isoform type 1 (MCT1) on the luminal membrane of human and pig colon. *Biochem Soc Trans*, **26**, S120.

Rosen, E.D. and Spiegelman, B.M. (2001) PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem*, **276**, 37731-4.

Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M. and Santoro, M.G. (2000) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature*, **403**, 103-8.

Ruan, H., Pownall, H.J. and Lodish, H.F. (2003) Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor-alpha-induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF-kappaB. *J Biol Chem*, **278**, 28181-92.

- S -

Sabatino, L., Casamassimi, A., Peluso, G., Barone, M.V., Capaccio, D., Migliore, C., Bonelli, P., Pedicini, A., Febbraro, A., Ciccodicola, A. and Colantuoni, V. (2005) A novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoform with dominant negative activity generated by alternative splicing. *J Biol Chem*, **280**, 26517-25.

Saez, E., Tontonoz, P., Nelson, M.C., Alvarez, J.G., Ming, U.T., Baird, S.M., Thomazy, V.A. and Evans, R.M. (1998) Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat Med*, **4**, 1058-61.

Sakashita, M., Aoyama, N., Minami, R., Maekawa, S., Kuroda, K., Shirasaka, D., Ichihara, T., Kuroda, Y., Maeda, S. and Kasuga, M. (2001) Glut1 expression in T1 and T2 stage colorectal carcinomas: its relationship to clinicopathological features. *Eur J Cancer*, **37**, 204-9.

Sanchez-Hidalgo, M., Martin, A.R., Villegas, I. and Alarcon De La Lastra, C. (2005) Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol*, **69**, 1733-44.

Sarraf, P., Mueller, E., Jones, D., King, F.J., DeAngelo, D.J., Partridge, J.B., Holden, S.A., Chen, L.B., Singer, S., Fletcher, C. and Spiegelman, B.M. (1998) Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med*, **4**, 1046-52.

Sarraf, P., Mueller, E., Smith, W.M., Wright, H.M., Kum, J.B., Aaltonen, L.A., de la Chapelle, A., Spiegelman, B.M. and Eng, C. (1999) Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. *Mol Cell*, **3**, 799-804.

Sasaki, M., Jordan, P., Welbourne, T., Minagar, A., Joh, T., Itoh, M., Elrod, J.W. and Alexander, J.S. (2005) Troglitazone, a PPAR-gamma activator prevents endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion mediated by TNF-alpha. *BMC Physiol*, **5**, 3.

Saubermann, L.J., Nakajima, A., Wada, K., Zhao, S., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Aburatani, H., Matsushashi, N., Nagai, R. and Blumberg, R.S. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis. *Inflamm Bowel Dis*, **8**, 330-9.

Schaefer, K.L., Denevich, S., Ma, C., Cooley, S.R., Nakajima, A., Wada, K., Schlezinger, J., Sherr, D. and Saubermann, L.J. (2005) Intestinal antiinflammatory effects of thiazolidenedione peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands on T helper type 1 chemokine regulation include nontranscriptional control mechanisms. *Inflamm Bowel Dis*, **11**, 244-52.

Shaffer, P.L., McDonnell, D.P. and Gewirth, D.T. (2005) Characterization of transcriptional activation and DNA-binding functions in the hinge region of the vitamin D receptor. *Biochemistry*, **44**, 2678-85.

Shao, D. and Lazar, M.A. (1999) Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J Clin Invest*, **103**, 1617-8.

Shao, D., Rangwala, S.M., Bailey, S.T., Krakow, S.L., Reginato, M.J. and Lazar, M.A. (1998) Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature*, **396**, 377-80.

Shappell, S.B., Gupta, R.A., Manning, S., Whitehead, R., Boeglin, W.E., Schneider, C., Case, T., Price, J., Jack, G.S., Wheeler, T.M., Matusik, R.J., Brash, A.R. and Dubois, R.N. (2001) 15S-Hydroxyeicosatetraenoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma and inhibits proliferation in PC3 prostate carcinoma cells. *Cancer Res*, **61**, 497-503.

Sher, T., Yi, H.F., McBride, O.W. and Gonzalez, F.J. (1993) cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*, **32**, 5598-604.

Shimada, T., Kojima, K., Yoshiura, K., Hiraishi, H. and Terano, A. (2002) Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut*, **50**, 658-64.

Siavoshian, S., Blottiere, H.M., Cherbut, C. and Galmiche, J.P. (1997) Butyrate stimulates cyclin D and p21 and inhibits cyclin-dependent kinase 2 expression in HT-29 colonic epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **232**, 169-72.

Smith, C.L. and O'Malley, B.W. (2004) Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev*, **25**, 45-71.

Sohda, T., Mizuno, K., Imamiya, E., Sugiyama, Y., Fujita, T. and Kawamatsu, Y. (1982) Studies on antidiabetic agents. II. Synthesis of 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)-benzyl]thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878) and its derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **30**, 3580-600.

Sohda, T., Mizuno, K., Tawada, H., Sugiyama, Y., Fujita, T. and Kawamatsu, Y. (1982) Studies on antidiabetic agents. I. Synthesis of 5-[4-(2-methyl-2-phenylpropoxy)-benzyl]thiazolidine-2,4-dione (AL-321) and related compounds. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **30**, 3563-73.

Spiegelman, B.M. (1998) PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*, **47**, 507-14.

Stokrova, J., Sovova, V., Sloncova, E. and Korb, J. (1999) Different morphological changes of two colorectal adenocarcinoma cell lines after sodium butyrate treatment. *Int J Mol Med*, **4**, 669-74.

Straus, D.S., Pascual, G., Li, M., Welch, J.S., Ricote, M., Hsiang, C.H., Sengchanthalangsy, L.L., Ghosh, G. and Glass, C.K. (2000) 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4844-9.

Su, C.G., Wen, X., Bailey, S.T., Jiang, W., Rangwala, S.M., Keilbaugh, S.A., Flanigan, A., Murthy, S., Lazar, M.A. and Wu, G.D. (1999) A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest*, **104**, 383-9.

Sunami, E., Tsuno, N.H., Kitayama, J., Saito, S., Osada, T., Yamaguchi, H., Tomozawa, S., Tsuruo, T., Shibata, Y. and Nagawa, H. (2002) Decreased synthesis of matrix metalloproteinase-7 and adhesion to the extracellular matrix proteins of human colon cancer cells treated with troglitazone. *Surg Today*, **32**, 343-50.

- T -

Takada, I., Yu, R.T., Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Kliewer, S.A., Evans, R.M. and Umesono, K. (2000) Alteration of a single amino acid in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR alpha) generates a PPAR delta phenotype. *Mol Endocrinol*, **14**, 733-40.

Tanaka, T., Kohno, H., Yoshitani, S., Takashima, S., Okumura, A., Murakami, A. and Hosokawa, M. (2001) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res*, **61**, 2424-8.

Tejpar, S., Cassiman, J.J. and Van Cutsem, E. (2001) The molecular basis of colorectal cancer. *Acta Gastroenterol Belg*, **64**, 249-54.

Temple, K.A., Cohen, R.N., Wondisford, S.R., Yu, C., Deplewski, D. and Wondisford, F.E. (2005) An intact DNA-binding domain is not required for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) binding and activation on some PPAR response elements. *J Biol Chem*, **280**, 3529-40.

Theocharis, S., Margeli, A., Vielh, P. and Kouraklis, G. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands as cell-cycle modulators. *Cancer Treat Rev*, **30**, 545-54. 203.

Tontonoz, P., Singer, S., Forman, B.M., Sarraf, P., Fletcher, J.A., Fletcher, C.D., Brun, R.P., Mueller, E., Altioik, S., Oppenheim, H., Evans, R.M. and Spiegelman, B.M. (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.

Tugwood, J.D., Issemann, I., Anderson, R.G., Bundell, K.R., McPheat, W.L. and Green, S. (1992) The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *Embo J*, **11**, 433-9.

Tureckova, J., Vojtechova, M., Kuceroval, D., Velek, J. and Tuhackova, Z. (2005) Sodium butyrate-mediated differentiation of colorectal cancer cells: regulation of PKCbetaII by PI 3-kinase. *Int J Mol Med*, **15**, 329-35.

- V -

Vaidya, S., Somers, E.P., Wright, S.D., Detmers, P.A. and Bansal, V.S. (1999) 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits the beta2 integrin-dependent oxidative burst: involvement of a mechanism distinct from peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligation. *J Immunol*, **163**, 6187-92.

Vanden Heuvel, J.P. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical link among fatty acids, gene expression and carcinogenesis. *J Nutr*, **129**, 575S-580S.

208. **Venables, J.P.** (2004) Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res*, **64**, 7647-54.

Vidal-Puig, A.J., Considine, R.V., Jimenez-Linan, M., Werman, A., Pories, W.J., Caro, J.F. and Flier, J.S. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest*, **99**, 2416-22.

- W -

Wachtershauser, A., Loitsch, S.M. and Stein, J. (2000) PPAR-gamma is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate. *Biochem Biophys Res Commun*, **272**, 380-5.

Wada, K., Nakajima, A. and Blumberg, R.S. (2001) PPARgamma and inflammatory bowel disease: a new therapeutic target for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Trends Mol Med*, **7**, 329-31.

Wang, N., Verna, L., Chen, N.G., Chen, J., Li, H., Forman, B.M. and Stemerman, M.B. (2002) Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, **277**, 34176-81.

Wang, Q., Lu, J. and Yong, E.L. (2001) Ligand- and coactivator-mediated transactivation function (AF2) of the androgen receptor ligand-binding domain is inhibited by the cognate hinge region. *J Biol Chem*, **276**, 7493-9.

Wasan, H.S., Novelli, M., Bee, J. and Bodmer, W.F. (1997) Dietary fat influences on polyp phenotype in multiple intestinal neoplasia mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3308-13.

Webb, C.P., Van Aelst, L., Wigler, M.H. and Woude, G.F. (1998) Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8773-8.

Welch, J.S., Ricote, M., Akiyama, T.E., Gonzalez, F.J. and Glass, C.K. (2003) PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6712-7.

Wijnhoven, B.P., Lindstedt, E.W., Abbou, M., Ijzendoorn, Y., de Krijger, R.R., Tilanus, H.W. and Dinjens, W.N. (2001) Molecular genetic analysis of the von Hippel-Lindau and human peroxisome proliferator-activated receptor gamma tumor-suppressor genes in adenocarcinomas of the gastroesophageal junction. *Int J Cancer*, **94**, 891-5.

Willson, T.M., Brown, P.J., Sternbach, D.D. and Henke, B.R. (2000) The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem*, **43**, 527-50.

Wong, N.A. and Pignatelli, M. (2002) Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol*, **160**, 389-401.

Wurtz, J.M., Bourguet, W., Renaud, J.P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D. and Gronemeyer, H. (1996) A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol*, **3**, 206.

- X -

Xu, M., Modarress, K.J., Meeker, J.E. and Simons, S.S., Jr. (1999) Steroid-induced conformational changes of rat glucocorticoid receptor cause altered trypsin cleavage of the putative helix 6 in the ligand binding domain. *Mol Cell Endocrinol*, **155**, 85-100.

Xu, P.L., Shan, S.F., Kong, Y.Y., Xie, Y.H. and Wang, Y. (2003) Characterization of a strong repression domain in the hinge region of orphan nuclear receptor hB1F/hLRH-1. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, **35**, 909-16.

- Y -

Yanase, T., Yashiro, T., Takitani, K., Kato, S., Taniguchi, S., Takayanagi, R. and Nawata, H. (1997) Differential expression of PPAR gamma1 and gamma2 isoforms in human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, **233**, 320-4.

Yang, W., Rachez, C. and Freedman, L.P. (2000) Discrete roles for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators. *Mol Cell Biol*, **20**, 8008-17.

Yang, W.L. and Frucht, H. (2001) Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, **22**, 1379-83.

Yin, L., Laevsky, G., and Giardina, C. (2001) Butyrate suppression of colonocyte NF- κ B activation and cellular proteasome activity. *J. Biol. Chem.*, **276**, 44641-6.

Yoshikawa, T., Brkanac, Z., Dupont, B.R., Xing, G.Q., Leach, R.J. and Detera-Wadleigh, S.D. (1996) Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics*, **35**, 637-8.

Yoshizumi, T., Ohta, T., Ninomiya, I., Terada, I., Fushida, S., Fujimura, T., Nishimura, G., Shimizu, K., Yi, S. and Miwa, K. (2004) Thiazolidinedione, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, inhibits growth and metastasis of HT-29 human colon cancer cells through differentiation-promoting effects. *Int J Oncol*, **25**, 631-9.

Youssef, J. and Badr, M. (2004) Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Inflammation Control. *J Biomed Biotechnol*, **2004**, 156-166.

PPAR gamma et tumeurs colorectales humaines : altérations, expression et gènes cibles

RESUME

PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ) est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires. Les agonistes de PPAR γ ont des effets anti-prolifératifs et induisent la différenciation et l'apoptose des cellules cancéreuses coliques. PPAR γ serait donc une cible thérapeutique potentielle pour le cancer du colon. Le premier objectif de notre travail était de rechercher des altérations génétiques et de quantifier l'expression de PPAR γ dans des tumeurs colorectales humaines. Nous n'avons pas retrouvé de mutations du gène *PPAR γ* dans les échantillons testés (codon 422 et exon 6). En revanche, nous avons pu montrer que les dérégulations de la fonction de PPAR γ impliquent l'expression aberrante de PPAR γ , de ses co-activateurs, et d'un variant d'épissage qui agit comme un dominant négatif. L'autre partie de notre travail consistait en la recherche de gènes cibles de PPAR γ . Nos résultats indiquent que dans la lignée HT29.cl16E, les agonistes de PPAR γ régulent l'expression du gène *MCT1* (Monocarboxylate Transporter 1). Cette régulation semble indirecte, et impliquerait une inhibition de la voie NF-KB.

Mots clés : PPAR γ , cancer colorectal, co-activateurs, Monocarboxylate Transporter 1

PPAR gamma and human colorectal tumours: alterations, expression, and target genes

SUMMARY

PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ) is a member of the nuclear receptor superfamily. PPAR γ agonists have anti-proliferative effects and induce cell differentiation and apoptosis of colorectal cancer cells. PPAR γ was therefore proposed as a therapeutic target for colon cancer. We first aimed to search for alterations and determine the expression level of PPAR γ in human colorectal tumours. We have not found mutated *PPAR γ* gene in the samples analyzed (codon 422 and exon 6). By contrast, we have shown that deregulation of PPAR γ function involved aberrant expression of PPAR γ , of its co-activators, and of a splicing variant that acts as a dominant negative. The other goal of our work was to identify PPAR γ targets in human colorectal epithelial cells. Our results indicate that PPAR γ ligands regulate *MCT1* (Monocarboxylate Transporter 1) gene expression in HT29.cl16E cells. This is probably an indirect effect, involving NF-KB inhibition.

Key words: PPAR γ , colorectal cancer, co-activators, Monocarboxylate Transporter 1

BOUANCHEAU Delphine
INSERM UMR539
Faculté de Médecine
1, rue Gaston VEIL
44035 NANTES Cedex 1