UNIVERSITE Paul Verlaine Metz
S.C.D.
N° Inv
Cote S/TB 08/28
LIMBP

U.F.R. : Sciences Fondamentales et Appliquées
Ecole Doctorale : Biologie – Santé - Environnement

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Paul Verlaine, Metz

En Biochimie

par

Cathy FIATTE

Impact des agonistes de PPARγ sur l'adhérence et la migration des cellules colorectales humaines HT29

Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique

Equipe Biochimie Pharmacologique
EA 3940 FR CNRS 2843

Soutenance publique : jeudi 30 octobre 2008

Membres du jury

Rapporteurs

M. Walter Wahli	Professeur, Université de Lausanne (Suisse)
M. Jean-Noël Freund	Directeur de recherche INSERM, Strasbourg

Examinateurs

Mme Denyse Bagrel	Professeur, Université P. Verlaine – Metz
Mme Nelly Kieffer	Professeur, Directeur de recherche CNRS, Shangai (Chine)
Mme Annie Marc	Directeur de recherche CNRS, INPL, Nancy – Université
M. Hervé Schohn	Maître de Conférences, Nancy – Université/Université P. Verlaine – Metz

Invités

M. Michel Dauça	Professeur émérite, Nancy – Université
M. François Plénat	Professeur/Praticien Hospitalier, Nancy – Université/CHRU Nancy Brabois



AVERTISSEMENT

Cette thèse est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et disponible à l'ensemble de la communauté universitaire élargie.
Elle est soumise à la propriété intellectuelle de l'auteur au même titre que sa version papier. Ceci implique une obligation de citation, de référencement dans la rédaction de tous vos documents.
D'autre part, toutes contrefaçons, plagiats, reproductions illicites entraînent une poursuite pénale.
Enfin, l'autorisaton de diffusion a été accordée jusqu' à nouvel ordre.

- Contact SCD Metz : daniel.michel@scd.univ-metz.fr

Ecrire au doctorant:

Code de la Proriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Proriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mes directeurs de thèse et encadrants Monsieur le Professeur Michel Dauça, Madame le Professeur Nelly Kieffer, Madame le Professeur Denyse Bagrel et Monsieur le Docteur Hervé Schohn, pour leur accueil dans leur équipe, leur soutien, leurs conseils et leur aide.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Professeur François Plénat et Madame le Docteur Véronique Rigot pour leur collaboration scientifique fructueuse.

Je remercie Messieurs les Professeurs Walter Wahli et Jean-Noël Freund d'avoir jugé ce travail en tant que rapporteurs.

J'exprime ma reconnaissance envers Dominique Meng, Bernadette Cuny, Claudine Maire et Denise Thiebaut pour leur aide technique et morale.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers le Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche du Luxembourg ainsi que les comités de Moselle et de Meurthe-et-Moselle de la Ligue Contre le Cancer pour leur soutien financier.

Je tiens également à remercier très chaleureusement les membres des laboratoires qui m'ont accueillie, en particulier Lionel Domenjoud, pour sa gentillesse, ses conseils et son précieux soutien scientifique et moral tout au long de ces années.

Un grand merci à Gabriel, à ma famille et à mes amis.

Cette thèse est dédiée à Claude, mon père.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES I
LISTE DES ABREVIATIONS III
I. AVANT PROPOS VI
II. SITUATION DU SUJET 7
A. GÉNÉRALITÉS SUR LES PPAR 7
1. DÉFINITION 7
2. STRUCTURE 8
3. MODE D'ACTION 9
B. LE CANCER DU COLON 17
1. GÉNÉRALITÉS 17
2. PRÉDISPOSITION HÉRÉDITAIRE 18
3. ANOMALIES GÉNÉTIQUES 18
4. FORMATION DES MÉTASTASES 20
C. PPAR ET CANCER DU COLON 23
1. PPAR ET CANCERS 23
2. IMPLICATION DE PPARγ 24
3. IMPLICATION DE PPARα 25
4. IMPLICATION DE PPARB 25
D. PROCESSUS D'ADHÉRENCE ET DE MIGRATION CELLULAIRES LORS DE LA FORMATION DES MÉTASTASES DU CANCER DU COLON. 26
1. GÉNÉRALITÉS 26
2. PPARγ ET ADHÉRENCE/MIGRATION CELLULAIRES 26
3. PPARA ET ADHÉRENCE /MIGRATION CELLULAIRES 29
III. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE 30
IV. MATERIEL ET METHODES 32
MÉTHODES DE BIOLOGIE CELLULAIRE 32
ENTRETIEN ET ENSEMENCEMENT 32
TRAITEMENT DES CELLULES 33
TEST DE PROLIFÉRATION (MTS) 33
TEST D'ADHÉRENCE CELLULAIRE 34
TEST DE MIGRATION 34

CYTOMETRIE EN FLUX 35
MESURE DU TAUX DE PROTEINE A LA SURFACE DES CELLULES 35
CYCLE CELLULAIRE ET APOPTOSE 36
ZYMOGRAPHIE 36
IMMUNOREPLIQUE 37
MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE 38
GREFFES ORTHOTOPIQUES SUR SOURIS NUDE 40
TRAITEMENT DES ANIMAUX 40
TECHNIQUES D'IMMUNOHISTOCHIMIE 40
V. RESULTATS 42
A. MISE EN EVIDENCE DE L'IMPACT DES TZD SUR DES MODÈLES CELLULAIRES 42
1. EFFET DE LA PIOGLITAZONE SUR LA PROLIFÉRATION DE DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES DÉRIVANT D'ADÉNOCARCINOMES COLIQUES HUMAINS 42
2. ANALYSE DES TAUX TRANSCRIPTIONNELS DES GÈNES CIBLES DE PPARΓ 42
3. IMPACT D'UN TRAITEMENT À COURT TERME PAR LES TZD SUR LES CELLULES HT29 45
4. IMPACT D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE DE TZD SUR LES CELLULES HT29 48
5. EFFET DU FÉNOFIBRATE SUR LES CELLULES HT29 49
B. INFLUENCE DES TZD OU DU FÉNOFIBRATE SUR LA CROISSANCE TUMORALE IN VIVO 51
1. CROISSANCE TUMORALE 51
2. IMMUNOHISTOCHIMIE 52
VI. DISCUSSION 54
VII. PERSPECTIVES 60
VIII. BIBLIOGRAPHIE 62

LISTE DES ABREVIATIONS

15ΔPGJ2 : 15 deoxyprostaglandine J2

7-AAD : 7-amino-actinomycineD

9cisRA : acide 9-cis rétinoïque

ACF : *aberrant crypt foci*

ADN : acide desoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AF : *activating function*

AINS: anti-inflammatoire non stéroïdien

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AMPK : *AMP-activated protein kinase*

AOM : azoxyméthane

ARN : acide ribonucléique

BGP: *biliary glycoprotein*

BSA : sérum albumine bovine

CARM-1 : *Coactivator-associated arginine methyltransferase 1*

CBP: *CREB-binding protein*

CEA ou ACE : antigène carcino-embryonnaire

CK2 : *casein kinase 2*

CREB : *cyclic-AMP responsive element binding protein*

DBD : *DNA binding domain*

DMEM : milieu minimum de Eagle modifié par Dulbecco

dPBS : tampon Phosphate de Sodium modifié par Dulbecco

DR-1 : *direct repeat 1*

DTT : dithiothréitol

EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique

FACS : *Fluorescence Activated Cell Sorting*

FAK : *focal adhesion kinase*

Féno : fénofibrate

FITC : *Fluorescein IsoThioCyanate*

GAPDH : glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase

GIT : isothiocyanate de guanidium

GSK3 : *glycogen synthase kinase-3*

GyK : glycérol kinase

HAT : histones acétyltransférase

HDAC : histone desacétylase

HMT : histone méthyltransférase

IMDM : milieu Dulbecco modifié par Iscove

iNOS : *inducible Nitric Oxide Synthase*

JNK/SAPK : *Jun N-Terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase*

KO : *knock out*

LBD : *ligand binding domain*

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*

MEC : matrice extracellulaire

MMP : *matrix metalloprotease*

MTS :3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium)

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MTX : méthotrexate

NCA : *non specific cross-reacting antigen*

NCoR : *Nuclear receptor Co-Repressor*

OLR-1 : récepteur au LDL oxydé 1 (oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1)

PBP : *PPAR Binding Protein*

PBST : tampon phosphate salin-Tween

PGC-1α : *PPARγ coactivator 1α*

PIMT : *PRIP Interacting Protein with Methyltransferase domain*

Pio : pioglitazone

PKA et PKC : *protein kinase A, protein kinase C*

PPAR : récepteurs activables par les proliférateurs de peroxysomes

PPRE : *Peroxisome Proliferator Responsive Element*

PRIP : *PPARγ interacting protein*

PRMT-1 : *protein arginine N-methyltransferase 1*

PTEN : *Phosphatase and TENsin homolog*

PVDF : polyvinyl difluoride

Ro ou rosi : rosiglitazone

RT-PCR : transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne

RXR : récepteur à l'acide 9cis-rétinoïque

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : *sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis*

siRNA *: small interfering RNA*

SMRT : *Silencing Mediator for Retinoic acid and Thyroid hormone Receptor*

SPARM : *Selective PPARs Receptor Modulators*

SRC-1 : *steroid receptor coactivator 1*

SUMO : *small ubiquitin-like modifiers*

TBE : tampon Tris Borate EDTA

TBS : *Tris-Buffered Saline*

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

TIMP : *tissue inhibitor of MMP*

TZD : thiazolidinedione

I. AVANT PROPOS

Les récepteurs activables par les proliférateurs de peroxysomes ou PPAR sont des facteurs de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires des hormones. Il existe trois isotypes de PPAR appelés PPARα PPARβ/δ et PPARγ. Ces récepteurs sont ubiquitaires et participent à la transcription/répression de gènes dits cibles appartenant au domaine génique de ces récepteurs. Les PPAR interviennent dans de nombreux métabolismes et ils sont impliqués dans de nombreuses pathologies telles que les cancers.

Le cancer du colon représente une pathologie fréquente. Il a été rapidement démontré que les trois isotypes étaient présents dans les cellules épithéliales coliques normales. Il a été démontré également que l'isotype PPARγ participait au processus de cancérogenèse et de progression des cancers du colon. Il n'existe que peu de données sur l'impact possible de PPARα dans des modèles de cancers coliques.

L'utilisation d'agoniste de PPARγ telles que les thiazolidinediones a permis de mettre en évidence une action anti proliférative vis-à-vis des cellules cancéreuses humaines *in vitro* mais également sur des modèles de greffes de cellules sur la souris nue. Les effets observés tendent à montrer que l'action de ces molécules passe soit par des mécanismes PPAR dépendants, qui impliquent l'activation du récepteur PPARγ avec un accroissement des gènes cibles et/ou une répression pour un certain nombre d'entre eux ; soit par des mécanismes indépendants, les effets seraient uniquement dus à la réactivité du ligand ou de l'agoniste.

Les travaux présentés dans ce mémoire font partie du projet sur *le rôle des PPAR dans les adénocarcinomes coliques humains.* Plus spécifiquement, l'objectif principal de ce travail est de montrer **l'implication de PPARγ dans les processus d'adhérence et de migration des cellules coliques humaines HT29.** Deux approches expérimentales ont été utilisées : Premièrement, *in vitro* en utilisant des lignées dérivant d'adénocarcinome colique humain et deuxièmement en utilisant des souris nues greffées en orthotopique *id est* des cellules HT29 ont été injectées dans la paroi du caecum. Dans ces deux approches nous avons utilisé deux agonistes de PPARγ, la pioglitazone et la rosiglitazone. Nous montrerons que *in vitro* les thiazolidinediones ont un impact sur l'expression des protéines d'adhérence, avec des modifications de la migration de ces cellules. Cet impact diffère suivant la molécule utilisée. *In vivo*, nous montrerons l'efficacité des traitements par les thiazolidinediones sur la croissance des tumeurs mais aussi sur la

dissémination des cellules cancéreuses. Dans ce cadre, les résultats présentés seront comparés à ceux obtenus lorsque les souris sont traitées par le fénofibrate, agoniste de PPARα. De plus, les résultats de l'impact du fénofibrate sur les cellules HT29 seront également exposés. L'ensemble des résultats sera finalement discuté et nous présenterons quelques perspectives à la suite de ce travail.

Ce projet de thèse est le résultat de la collaboration étroite avec le Laboratoire de Biologie et Physiologie Intégrée dirigé par le Pr N. Kieffer (Luxembourg) et le laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques dirigé par le Pr F. Plénat (Vandoeuvre-Lès-Nancy). Il a été financé par le Ministère de la Recherche du Grand Duché du Luxembourg, la Ligue Contre le Cancer (Comité de Moselle et de Meurthe et Moselle), la région Lorraine et le Ministère de la Recherche.

II. SITUATION DU SUJET

Les peroxysomes sont des organelles intracellulaires ubiquitaires impliqués dans le métabolisme lipidique et la détoxication cellulaire. Il a été démontré que les agents hypolipémiants de la classe des fibrates induisent une prolifération des peroxysomes chez les Rongeurs (Hawkins *et coll*, 1987). Ensuite, d'autres composés proliférateurs de peroxysomes ont été identifiés chez les Rongeurs, comme certains herbicides et les AINS, par exemple. La prolifération des peroxysomes est accompagnée d'une induction de l'activité de plusieurs enzymes de la β-oxydation peroxysomale (Lock *et coll*, 1989). Cependant, la prolifération des peroxysomes ne se produit pas chez l'Homme (Lock *et coll*, 1989). Les proliférateurs de peroxysomes, ou PPs, étant des molécules lipophiliques ayant des fonctions régulatrices au niveau génomique, l'hypothèse de l'existence de récepteurs nucléaires a été émise. Ces récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs de peroxysomes, ou PPAR, ont d'abord été clonés et identifiés chez la souris, par Issemann et Green, en 1990 (Isseman and Green, 1990).

A. GÉNÉRALITÉS SUR LES PPAR

1. DÉFINITION

Les récepteurs activables par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones, qui comprend les récepteurs aux stéroïdes, à l'hormone thyroïdienne, à la vitamine D et aux rétinoïdes (Desvergne and Wahli, 1999; Kuenzli and Saurat, 2003). Trois isotypes de PPAR ont été identifiés : PPARα, PPARβ/δ et PPARγ. Ces trois isotypes sont codés par des gènes différents (Isseman and Green, 1990; Göttlicher *et coll*, 1992; Zhu *et coll*, 1993; Tontonoz *et coll*, 1994).

Il existe deux isoformes de la protéine PPARγ chez l'Homme, les rongeurs et le singe (Elbrecht *et coll*, 1996; Greene *et coll*, 1997; Zhou *et coll*, 2002) et elles sont appelées PPARγ1 et PPARγ2. PPARγ2 possède 30 acides aminés supplémentaires à l'extrémité NH_2-terminale de la protéine chez la souris et le rat, et 28 acides aminés chez l'Homme, par rapport à la protéine PPARγ1 (Zhu *et coll*, 1993; Elbrecht *et coll*, 1996; Fajas *et coll*, 1997). La présence des PPAR a été mise en évidence dans les tissus de nombreuses espèces animales, des amphibiens à l'Homme en passant par les rongeurs (Dreyer *et coll*, 1992; Göttlicher *et coll*, 1992; Schmidt *et coll*, 1992; Chen *et coll*, 1993; Sher *et coll*, 1993; Zhu *et coll*, 1993; Kliewer *et coll*, 1994;

Tontonoz *et coll*, 1994; Amri *et coll*, 1995; Greene *et coll*, 1997; Wahli *et coll*, 1999; Schohn *et coll*, 2001; Kuenzli and Saurat, 2003). Les trois isotypes sont ubiquitaires (Braissant *et coll*, 1996), mais ont une distribution tissulaire distincte (Escher and Wahli, 2000). PPARα est exprimé dans les tissus présentant un catabolisme des acides gras élevé, comme le foie, le cœur, le tissu adipeux brun, le rein ou l'intestin (Braissant *et coll*, 1996; Auboeuf *et coll*, 1997; Gonzalez, 1997; Palmer *et coll*, 1998). Les 2 isoformes PPARγ1 et γ2 sont impliquées dans la différenciation adipocytaire et le métabolisme lipidique (Chawla and Lazar, 1994; Tontonoz *et coll*, 1994; Tontonoz *et coll*, 1994; Escher and Wahli, 2000). Seule l'expression de PPARγ1 est étendue à d'autres tissus comme l'intestin, le rein, le pancréas, la rétine et les cellules hématopoïétiques, par exemple. PPARβ est ubiquitaire mais ses principales fonctions concernent le muscle squelettique, le tissu adipeux, la peau, l'intestin et le cerveau (Amri *et coll*, 1995; Braissant *et coll*, 1996; Desvergne and Wahli, 1999; Michalik *et coll*, 2000; Escher *et coll*, 2001).

D'une manière générale, chez les mammifères adultes, les PPAR sont impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique, dans l'homéostasie du glucose, dans la prolifération cellulaire et dans la réponse inflammatoire (pour revues, (Grommes *et coll*, 2004; Michalik *et coll*, 2004).

2. Structure

Quel que soit l'isotype considéré, les PPAR présentent une organisation structurale commune à celle des récepteurs nucléaires (Isseman and Green, 1990; Dreyer *et coll*, 1992). Ils sont constitués de domaines structuraux et fonctionnels (figure 1, page 8bis):

- un domaine NH_2-terminal A/B, peu conservé entre les isotypes de PPAR. Il permet la transactivation indépendante du ligand grâce à une région activatrice AF-1 (pour *Activating Function 1),* comportant des sites de phosphorylation (pour revue, (Diradourian *et coll*, 2005).
- Un domaine C (ou DBD pour *DNA Binding Domain*), permettant la liaison à l'ADN au niveau de séquences spécifiques localisées dans les promoteurs des gènes cibles. Ce domaine présente une structure en doigts de zinc caractéristique des récepteurs nucléaires. Cette structure comporte des séquences en acides aminés très conservées, dont 2 séquences invariantes. La première, boîte P, conduit à une reconnaissance spécifique entre le récepteur et l'ADN. La seconde, boîte D, est impliquée dans la reconnaissance de

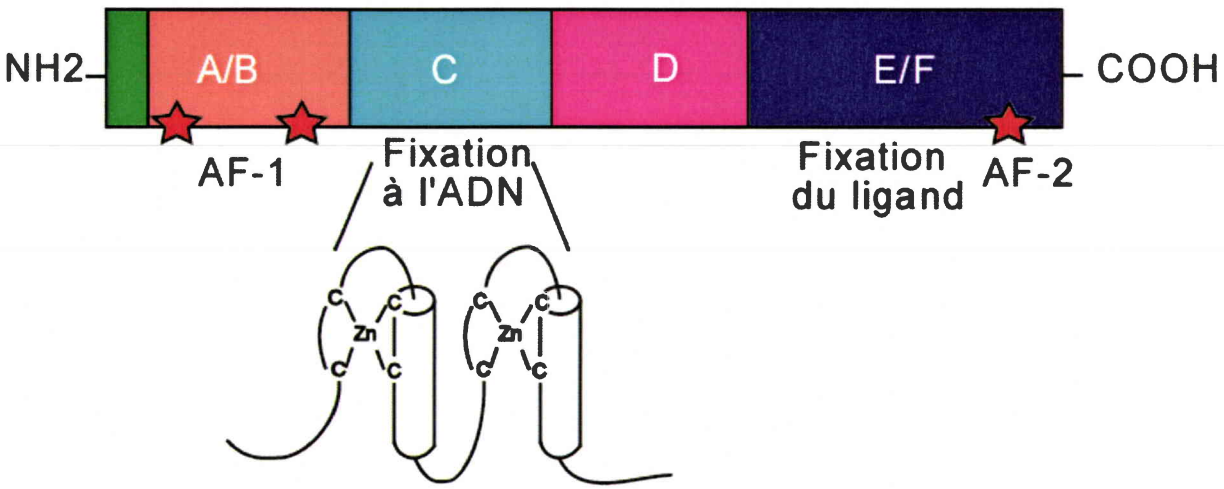


Figure 1 : Structure des PPAR

Chaque isotype de PPAR se compose, de l'extrémité NH_2 terminale à l'extrémité COOH terminale, de :

un domaine A/B de transactivation indépendante du ligand grâce à une région activatrice AF-1 (pour *activated function-1 domain*),

un domaine C de liaison à l'ADN (DBD), qui présente une structure en doigts de zinc,

un domaine D souple charnière et comprenant une séquence d'adressage au noyau,

un domaine E/F de fixation du ligand (LBD) possédant une région activatrice AF-2.

(d'après Tan *et coll.*, 2005)

l'élément de réponse de l'ADN et dans la dimérisation des récepteurs (pour revue, (Wahli *et coll*, 1999).

- Un domaine D, qui constitue une zone charnière souple. Il contient une séquence d'adressage vers le noyau (pour revue, (Wahli *et coll*, 1999).
- Un domaine COOH terminal E/F, ou LBD (pour *Ligand Binding Domain*), intervient dans la fixation du ligand et la transactivation dépendante du ligand grâce à une région activatrice AF-2. Il est également impliqué dans la dimérisation du récepteur et dans la fixation des cofacteurs (pour revue, (Wahli *et coll*, 1999). Ce domaine comprend 12 hélices α et 4 feuillets β, formant une poche hydrophobe lâche où vient se fixer le ligand (Hamilton, 2004). La stabilisation de l'hélice 12 en particulier lors de la fixation du ligand est un élément déterminant dans l'activité des PPAR (Kallenberger *et coll*, 2003).

3. Mode d'action

a. Activité ligand-dépendante

Hétérodimérisation

Les PPAR modifient le statut transcriptionnel de leurs gènes cibles sous forme d'hétérodimères avec les récepteurs à l'acide 9*cis*-rétinoïque (RXR) (figure 2, page 9 bis) (Gearing *et coll*, 1993; Keller *et coll*, 1993). Les 3 isotypes de RXR peuvent dimériser avec les PPAR mais il existe des associations spécifiques qui pourraient influencer la reconnaissance des promoteurs des gènes cibles (Juge-Aubry *et coll*, 1997). L'hétérodimère PPAR-RXR peut se former indépendamment de la liaison du ligand ou de la liaison à l'ADN (Feige *et coll*, 2005). Les hétérodimères reconnaissent des éléments de réponse ou PPRE (pour *Peroxisome Proliferator Responsive Element*). Les PPRE sont des séquences spécifiques situées au niveau des promoteurs des gènes cibles, et sont constitués de deux demi-sites $^{5'}$AGGTCA$^{3'}$ séparés par un nucléotide quelconque, soit la séquence $^{5'}$AGGTCAnAGGTCA$^{3'}$ appelée également DR-1 (pour *Direct Repeat 1*). Chaque partenaire se fixe sur un demi-site, PPAR se fixant sur le demi-site situé en 5' du DR-1. La région flanquante en 5' du PPRE contribue à la sélectivité de l'isotype de PPAR qui se fixera sur le DR-1 (Juge-Aubry *et coll*, 1997).

La fixation de PPARα et γ au niveau des promoteurs peut se faire de manière ligand-dépendante (Ijpenberg *et coll*, 2004; Jia *et coll*, 2004; Mandard *et coll*, 2004; Compe *et coll*, 2005; Gizard *et coll*, 2005; Pascual *et coll*, 2005) ou ligand-indépendante (Seree *et coll*, 2004; Shimizu *et coll*, 2004; Chui *et coll*, 2005; Fu *et coll*, 2005; Guan *et coll*, 2005).

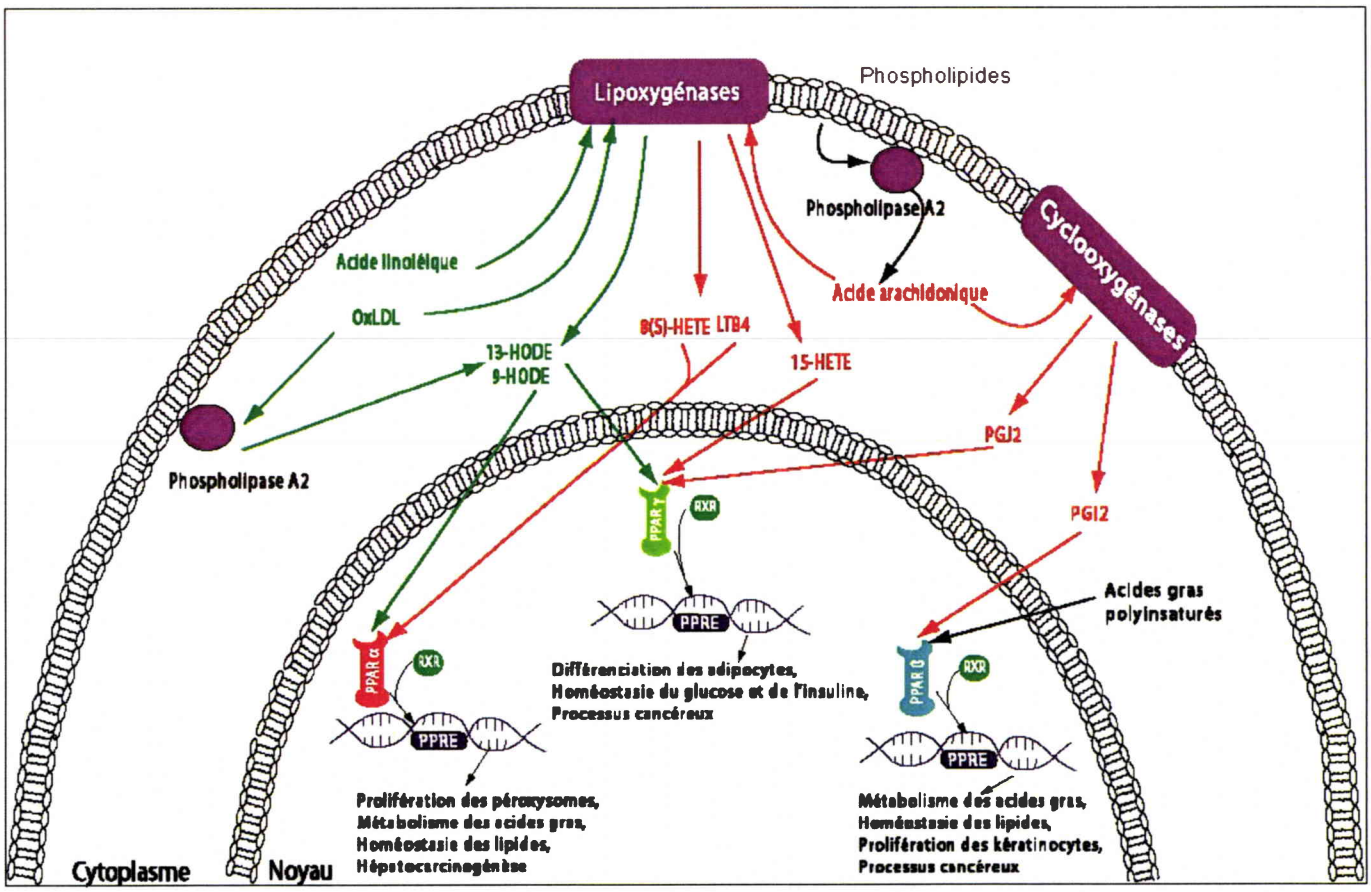


Figure 2: Mode d'action des PPAR (adaptée de Wahli *et coll.*, 1999)
Quel que soit l'isotype considéré, le mode d'action est similaire. Dans un premier temps, un signal soit exogène soit intracellulaire entraîne une modification de l'état de phosphorylation des PPARs. Il en résulte une modification des interactions protéine – protéine soit au niveau du cytoplasme (avec Hsp72), soit au niveau du noyau (corépresseurs). Parallèlement, le ligand de l'isotype est transporté vers le noyau vraisemblablement par des FABP (pour *fatty acid-binding protein*). L'apparition des ligands du récepteur au niveau intracellulaire résulte de la libération d'acide arachidonique ou linoléique de triglycérides par la phospholipase A2. Les acides gras sont ensuite transformés par les cyclooxygénases (COX1 et COX2) et les lypoxygénases (LOX1 et LOX2) ce qui conduit à la formation de ligands pour chaque isotype. L'absorption et la dégradation de LDL oxydé combinées à l'action de la phospholipase A2 conduit à l'apport de ligands de PPARγ. Les ligands intracellulaires de PPARγ, les prostaglandines de la série J2, sont synthétisés par la prostaglandine D synthase utilisant comme substrat la prostaglandine D. Cette prostaglandine est synthétisée par la COX1 à partir d'acide arachidonique. La liaison du ligand au récepteur entraîne son activation. Il est alors capable de former des hétérodimères avec RXR lui-même activé en présence de son ligand.

Le complexe ainsi formé interagit avec le PPRE ce qui aboutit à l'activation ou à la répression de la transcription de gènes cibles. L'implication de chaque isotype de PPAR dans les processus biologiques est précisée.

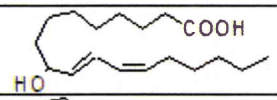
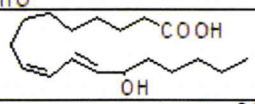
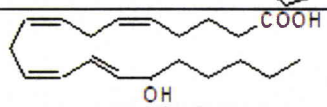
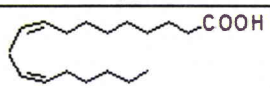
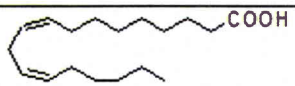
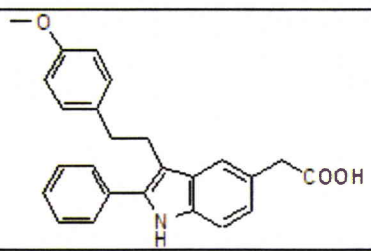
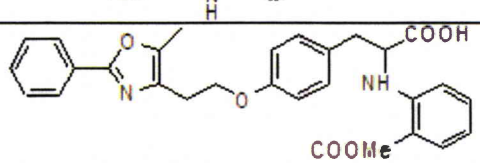
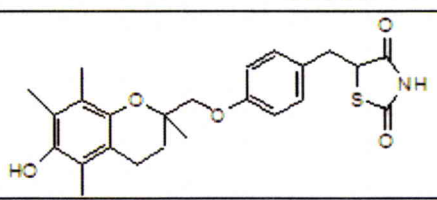
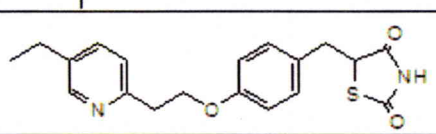
Le motif DR-1 n'est pas le site de fixation exclusif du couple PPAR-RXR ; d'autres récepteurs nucléaires comme le récepteur à l'acide rétinoïque (RAR), COUP-TF1 ou encore HNF-4 peuvent s'y fixer (Nakshatri and Bhat-Nakshatri, 1998). De plus, en présence d'agonistes de RXR, le coactivateur SRC-1 (pour *Steroid Receptor Coactivator 1*) stabilise la fixation d'homodimères RXR-RXR au niveau des PPRE (Ijpenberg *et coll*, 2004). Le choix entre la fixation de l'hétérodimère PPAR-RXR ou de l'homodimère RXR-RXR au niveau des PPRE semble lié à la disponibilité en protéines CBP (pour *cyclic-AMP responsive element binding protein)* et p300 (ou EP300 pour *adenovirus E1A-associated 300KDa protein*) comparée à celle en SRC-1, respectivement (Ijpenberg *et coll*, 2004).

Les ligands des PPAR

Le site de liaison des PPAR au ligand, représenté par une poche hydrophobe, permet la fixation de ligands très divers (pour revue, (Bishop-Bailey, 2000). Les activateurs de PPAR sont des substances naturelles comme les acides gras polyinsaturés à longues et moyennes chaînes et les eicosanoïdes, ou des ligands synthétiques comme les hypolipémiants (Reddy *et coll*, 1980), les anti inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les anti-diabétiques de type thiazolidinédiones (TZD) (Lehmann *et coll*, 1995) (tableau 1, pages 10 bis et ter). Les ligands synthétiques ont la capacité de se fixer sur les différents isotypes de PPAR avec une affinité plus grande. Cependant, l'activation d'un isotype dépend également de la quantité de ligand présent : une dose de ligand exogène trop élevée peut conduire à l'activation de l'ensemble des isotypes de PPAR (pour revue, (Bishop-Bailey, 2000)). Les ligands des PPAR sont classés en fonction de leur affinité pour le récepteur :

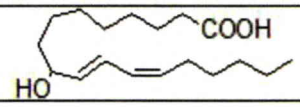
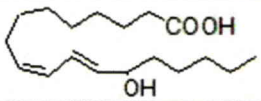
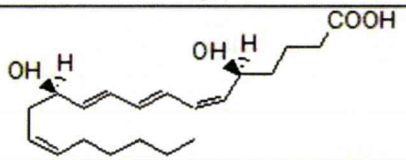
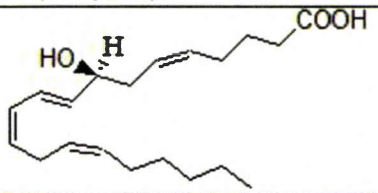
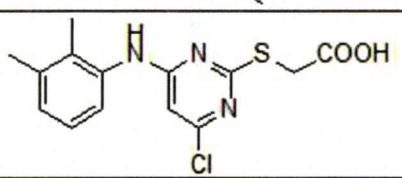
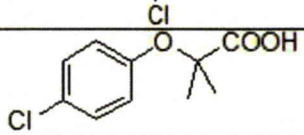
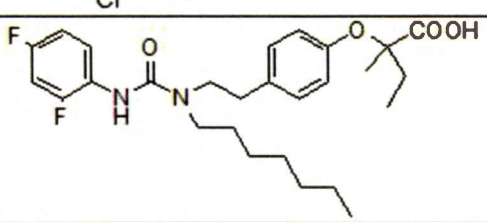
- les ligands naturels de PPARα sont les eicosanoïdes tels que le leucotriène B4, synthétisés à partir de l'acide arachidonique *via* la voie de la lipooxygénase (Devchand *et coll*, 1996). Les fibrates sont des ligands synthétiques de PPARα (Reddy *et coll*, 1980).
- PPARβ/δ est activable par des acides gras polyinsaturés et par les prostacyclines de la série I2 (Forman *et coll*, 1995; Krey *et coll*, 1995; Kliewer, 1997).
- PPARγ est activé par les métabolites de l'acide arachidonique dérivant de la voie de la cyclooxygénase et de la lipooxygénase. Les thiazolidinédiones utilisées pour le traitement du diabète de type II sont des ligands synthétiques de l'isotype PPARγ (Lehmann *et coll*, 1995).

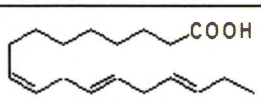
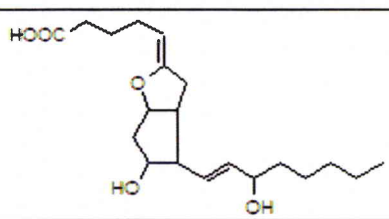
<u>Tableau 1:</u> Ligands naturels et synthétiques de l'isotype PPARγ

Type	Nom	Formule chimique
Naturel	9-HODE	
	13-HODE	
	PGJ2	
	15-HETE	
	Acide linoléïque	
	Acide linolénique	
	Acide eicosapentaénoïque	
Synthétique	GW-0207	
	GW-7845	
	Troglitazone	
	Pioglitazone	

9-HODE/13-HODE : acide 9/13-hydroxyoctadeca-10E, 12Z-diénoïque ; PGJ2 : prostaglandine J2 ; 15-HETE : acide 15-hydroxyeicosatetraénoïque

<u>Tableau 1(suite):</u> Ligands naturels et synthétiques des isotypes PPARα et β/δ

Type	Nom	Formule
PPARα	9-HODE	
	13-HODE	
Naturel	LB4	
	8(S)-HETE	
Synthétique	Wy 14,643	
	Clofibrate	
	GW2331	

Type	Nom	Formule chimique
PPARβ/δ	Acide gras polyinsaturé (exemple)	
Naturel	PGI2	

LB4 : leucotriène B4 ; PGI2 : prostaglandine I2

Des différences de structure et de séquences en acides aminés expliquent la sélectivité du ligand entre les 3 isotypes (Zoete *et coll*, 2007). L'activation de l'hétérodimère PPAR/RXR implique le plus souvent la fixation préalable du ligand de chaque partenaire. Cependant, plusieurs études ont montré que cette activation ne nécessite pas obligatoirement la présence du ligand de PPAR alors que celle de l'acide 9*cis*-rétinoïque, ligand de RXR, est indispensable (Mukherjee *et coll*, 1998). D'autre part, il est intéressant de noter que dans le cas de l'hétérodimère PPARγ/RXR, les différents ligands de PPARγ semblent être capables de recruter différents coactivateurs (SRC-1 ou TIF-2) (Kodera *et coll*, 2000; Yang *et coll*, 2000; Lim *et coll*, 2004), ce qui conférerait à PPARγ des réponses biologiques différentes selon la nature des ligands.

Les cofacteurs

Les cofacteurs sont des protéines capables d'activer (coactivateurs) ou d'inhiber (corépresseurs) l'activité transcriptionnelle de facteurs de transcription en les associant à la machinerie transcriptionnelle et en modifiant la structure de la chromatine. La compaction de la chromatine et l'hypoacétylation des histones répriment la transcription, le repositionnement des histones étant nécessaire à la liaison des facteurs de transcription et la formation du complexe de pré-initiation (Hebbar and Archer, 2003).

La liaison du ligand au PPAR conduit à la dissociation du complexe protéique répresseur et au recrutement de plusieurs coactivateurs transcriptionnels. Certains d'entre eux sont responsables de la modification de la structure de la chromatine et des histones, entraînant l'ouverture de l'ADN pour la transcription, et la fixation de la machinerie transcriptionnelle (Roeder, 2005).

Les corépresseurs

Les corépresseurs possèdent ou recrutent des histones deacétylases (HDACs) ou une activité enzymatique qui va renforcer la compaction de la chromatine, d'où une inhibition de la transcription. L'interaction de ces protéines avec la machinerie transcriptionnelle de base pourrait aussi jouer un rôle dans la répression (Muscat *et coll*, 1998). NCoR et SMRT répriment l'activité de récepteurs nucléaires en l'absence de ligand ou en présence d'antagoniste jusqu'à ce que la liaison d'un ligand provoque leur échange contre des coactivateurs (McKenna and O'Malley, 2002).

L'action des corépresseurs sur les gènes cibles de PPARγ sont promoteurs-spécifiques. Ainsi, NCoR et SMRT sont associés à PPARγ au niveau des promoteurs de la glycerol kinase (GyK) et

du récepteur au LDL oxydé 1 (OLR1) mais pas au niveau du promoteur aP2 (Chui *et coll*, 2005; Guan *et coll*, 2005).

Par ailleurs, PPARβ joue un rôle important dans la répression puisqu'il peut inhiber l'activité de PPARα et γ *via* la fixation de corépresseurs et de HDAC (Shi *et coll*, 2002).

L'action répressive des antagonistes a été étudiée au niveau structural : ils induiraient une conformation du récepteur qui empêcherait le bon positionnement de l'hélice 12 et donc, le recrutement de coactivateurs (Xu *et coll*, 2002).

Echange corépresseur/coactivateur

Des facteurs nucléaires d'échange de corépresseurs (NCoEx) sont des protéines qui s'associent aux récepteurs nucléaires afin de favoriser la transition vers un état actif en échangeant les corépresseurs avec des coactivateurs (Perissi and Rosenfeld, 2005), par dégradation des corépresseurs par le protéasome, par exemple (Perissi *et coll*, 2004).

Les coactivateurs

Les coactivateurs qui interagissent directement avec les récepteurs nucléaires contiennent un ou plusieurs motifs hélices α conservés avec une séquence LXXLL (ou boîte récepteur nucléaire, NR), qui permet l'interaction avec la région AF-2 des récepteurs nucléaires (McKenna and O'Malley, 2002). La boîte NR est suffisante pour l'activation transcriptionnelle ligand-dépendante. Une fois recrutés ou assemblés sur un récepteur nucléaire ayant fixé un ligand, les coactivateurs jouent 2 rôles distincts dans l'initiation ou l'activation de la transcription du gène cible (Roeder, 2005). La fonction la plus importante des coactivateurs est le remodelage de la chromatine par une activité intrinsèque histone acétyltransférase (HAT) ou méthyltransférase (Roeder, 2005). Le 2ème groupe de coactivateurs forment un complexe multimérique comprenant 15 à 30 protéines, et n'ayant pas d'activité enzymatique intrinsèque (Roeder, 2005). Les protéines de ce complexe lient des protéines ayant une activité de remodelage de la chromatine au complexe de pré-initiation de l'ARN polymérase II (Roeder, 2005). Le remodelage de la chromatine semble indispensable à l'activation de PPARγ induite par les TZD *in vitro* et à l'adipogenèse induite par PPARγ2 *in vivo* (Lemon *et coll*, 2001; Flanagan *et coll*, 2005).

Les coactivateurs et les protéines associées aux coactivateurs ont une combinaison d'expression différente dans chaque tissu, d'où l'expression tissu-spécifique des gènes cibles des PPAR, et la réponse spécifique des PPAR à leur ligand.

Les protéines CREB (pour *cyclic-AMP responsive element binding protein*) binding protein (CBP/CREBBP) et p300 sont des coactivateurs pour la plupart des facteurs de transcription, y

compris les PPAR (Yao *et coll*, 1998; Kung *et coll*, 2000). Les protéines CBP/p300 ont une activité HAT et recrutent les protéines de la famille p160/SRC-1 afin d'augmenter l'activité d'acétylation, provoquant un remodelage de la chromatine et l'activation de la transcription. La liaison de CBP/p300 au domaine AF-2 de PPARγ est ligand-dépendante mais sa liaison au domaine A/B est ligand-indépendante (Gelman *et coll*, 1999). p300 interagit avec PPARα *via* sa région N-terminale. Cette interaction est favorisée en présence de ligand, et augmente l'activité transcriptionnelle de PPARα (Dowell *et coll*, 1997).

Les protéines de la famille p160/SRC-1 ont également une activité HAT, mais moins importante que celle des protéines CBP/p300. SRC-1 pourrait être recrutée au niveau des gènes cibles de PPAR par des homodimères RXR/RXR en réponse à des rétinoïdes, mais pas par les hétérodimères PPAR/RXR (Ijpenberg *et coll*, 2004).

Le coactivateur PGC-1α (pour *PPARγ coactivator 1α*) appartient à un autre groupe de cofacteurs qui permet l'assemblage des complexes d'activation (Puigserver *et coll*, 1999) et de coupler la transcription à l'épissage des ARNm (Monsalve *et coll*, 2000). PGC-1α augmente l'activité transcriptionnelle de PPARγ mais aussi d'autres facteurs de transcription (Lin *et coll*, 2005). L'association PGC-1α avec PPARα et β se fait *via* le domaine AF-2 des récepteurs et le motif LXXLL de PGC-1α (Vega *et coll*, 2000; Wang *et coll*, 2003) tandis que la liaison à PPARγ peut intervenir en l'absence de ligand et met en jeu le motif LXXLL et la partie N-terminale de PGC-1α (Puigserver *et coll*, 1999; Wu *et coll*, 2003).

La protéine PRIP/RAP250 (pour *PPARγ interacting protein*) lie PPARγ *via* un motif LXXLL. Elle n'a pas d'activité enzymatique intrinsèque mais participe au recrutement de protéines ayant une activité HAT (Lee *et coll*, 2001). La protéine PIMT (pour *PRIP Interacting Protein with Methyltransferase domain*) coopère avec PRIP/RAP250 pour augmenter la transcription médiée par PPARγ et RXR (Zhu *et coll*, 2000; Zhu *et coll*, 2001).

La protéine PBP/TRAP220/DRIP205/MED1 (pour *PPAR Binding Protein*) sert d'ancrage pour le complexe multimérique de transcription et active l'ARN polymérase II (Lewis and Reinberg, 2003; Roeder, 2005).

Enfin, d'autres protéines associées aux coactivateurs peuvent activer l'activité transcriptionnelle *via* leur activité méthyltransférase.

L'activité Histone Méthyltransférase (HMT) est assurée par des protéines comme CARM-1 (pour *Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1*) ou PRMT-1 (pour *Protein Arginine Methyltransferase 1*), qui ont la capacité d'augmenter la capacité transcriptionnelle de plusieurs récepteurs nucléaires (Chen *et coll*, 1999; Koh *et coll*, 2001; Wang *et coll*, 2001).

Les modulateurs spécifiques des PPAR (SPARM)

Le principal inconvénient des agonistes de PPARγ est leurs effets secondaires dus à une activation de gènes cibles variés intervenant dans différents processus physiologiques (Berger *et coll*, 2005). Pour éviter ces effets indésirables, des agonistes ayant un potentiel d'activation restreint ont été développés. L'activité spécifique de ces SPARM (pour *Selective PPARs Receptor Modulators*) permettrait le recrutement spécifique de cofacteurs en fonction de leur taux d'expression dans les organes cibles et de leur affinité pour les PPAR (Ijpenberg *et coll*, 2004; Guan *et coll*, 2005).

La balance entre corépresseurs et coactivateurs n'est pas le seul élément régulateur de l'activité transcriptionnelle des PPAR. En effet, la phosphorylation de ces récepteurs et des coactivateurs joue un rôle primordial dans cette régulation.

b. Activité ligand indépendante

Bien que la majorité de l'activité transcriptionnelle des PPAR soit ligand-dépendante, des études récentes ont montré l'existence d'une activité basale du récepteur en l'absence de ligand. PPAR et RXR peuvent former un hétérodimère en l'absence de ligand (Feige *et coll*, 2005) et se fixer au niveau de promoteurs de quelques gènes cibles de PPAR. Une activité ligand-indépendante est liée à la région AF-1 du domaine A/B des PPAR. La fonction AF-1 de PPARγ2 est plus active que celle de PPARγ1 (Werman *et coll*, 1997), suggérant que les 30 acides aminés supplémentaires de l'isoforme PPARγ2 pourraient augmenter l'activité du récepteur. Le domaine A/B de PPARγ est capable d'interagir avec le coactivateur p300 de façon ligand-indépendante (Gelman *et coll*, 1999).

En l'absence de TZD, des coactivateurs peuvent être recrutés au niveau des PPRE de certains promoteurs, comme celui du gène aP2 (Guan *et coll*, 2005). La liaison à l'ADN induirait des modifications conformationnelles qui influenceraient l'hélice 12, d'où une conformation active de l'hétérodimère dans le cas d'une liaison à aP2. L'interaction des PPAR avec des coactivateurs en l'absence de ligands peut se faire grâce à la stabilisation de l'hélice 12. L'activité transcriptionnelle basale ligand-indépendante des PPAR pourrait donc être due à une conformation active de l'hélice 12, permettant le recrutement de cofacteurs.

Les PPAR peuvent induire également des effets répresseurs par transrépression, en inhibant l'activité de facteurs de transcription. Cette transrépression peut inhiber la liaison des facteurs de transcription à l'ADN par des interactions protéine-protéine directes (ou « *tethering* ») ou séquestrer des cofacteurs nécessaires à leur activité (ou « *squelching* ») (figure 3, page 15 bis).

c. Régulation de l'activité des PPAR par leurs modifications post-traductionnelles

Phosphorylation

PPARα

La séquence de PPARα contient des sites consensus pour les MAPK, les caséine kinase 2 (CK2), la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) et les protéines kinases A et C (PKA et PKC) (figure 4, page 15 ter).

Des activateurs de PKA peuvent augmenter l'activité transcriptionnelle de PPARα en l'absence ou en présence de ligands (Lazennec *et coll*, 2000). L'inhibition de la voie des MAPK diminue l'activité transcriptionnelle de PPARα tandis que l'inhibition de l'activité PI3K l'augmente fortement (VandenHeuvel, 1999).

Les ligands de PPARα augmentent sa phosphorylation, donc son activité. Le traitement d'hépatocytes par l'insuline augmente la phosphorylation et l'activité de PPARα *via* la voie Erk-MAPK (Shalev *et coll*, 1996). Dans ce cas, les 2 sérines du domaine A/B sont phosphorylées (Juge-Aubry *et coll*, 1999). Par contre, dans une lignée de cardiomyocytes de rat, l'activation de Erk-MAPK diminue l'activité de PPARα, démontrant l'importance du contexte cellulaire (Barger *et coll*, 2000).

La kinase GSK3 phosphoryle PPARα au niveau de son domaine A/B. La surexpression de GSK3 diminue la stabilité de PPARα *via* la voie ubiquitine-protéasome.

PPARβ/δ

Les activateurs de l'AMPc et de la PKA augmentent l'activité basale et ligand-dépendante de PPARβ (Lazennec *et coll*, 2000; Hansen *et coll*, 2001; Krogsdam *et coll*, 2002) (figure 4, page 15 ter).

PPARγ

PPARγ est phosphorylé par des activateurs de MAPK, comme l'insuline (figure 4, page 15 ter). Toutefois, sa phosphorylation diminue son activité (Hu *et coll*, 1996; Adams *et coll*, 1997).

Une mutation du principal site de phosphorylation par les MAPK (Ser112) au niveau de PPARγ2 diminue l'affinité de liaison au ligand (Shao *et coll*, 1998). La sérine 112 joue donc un rôle dans

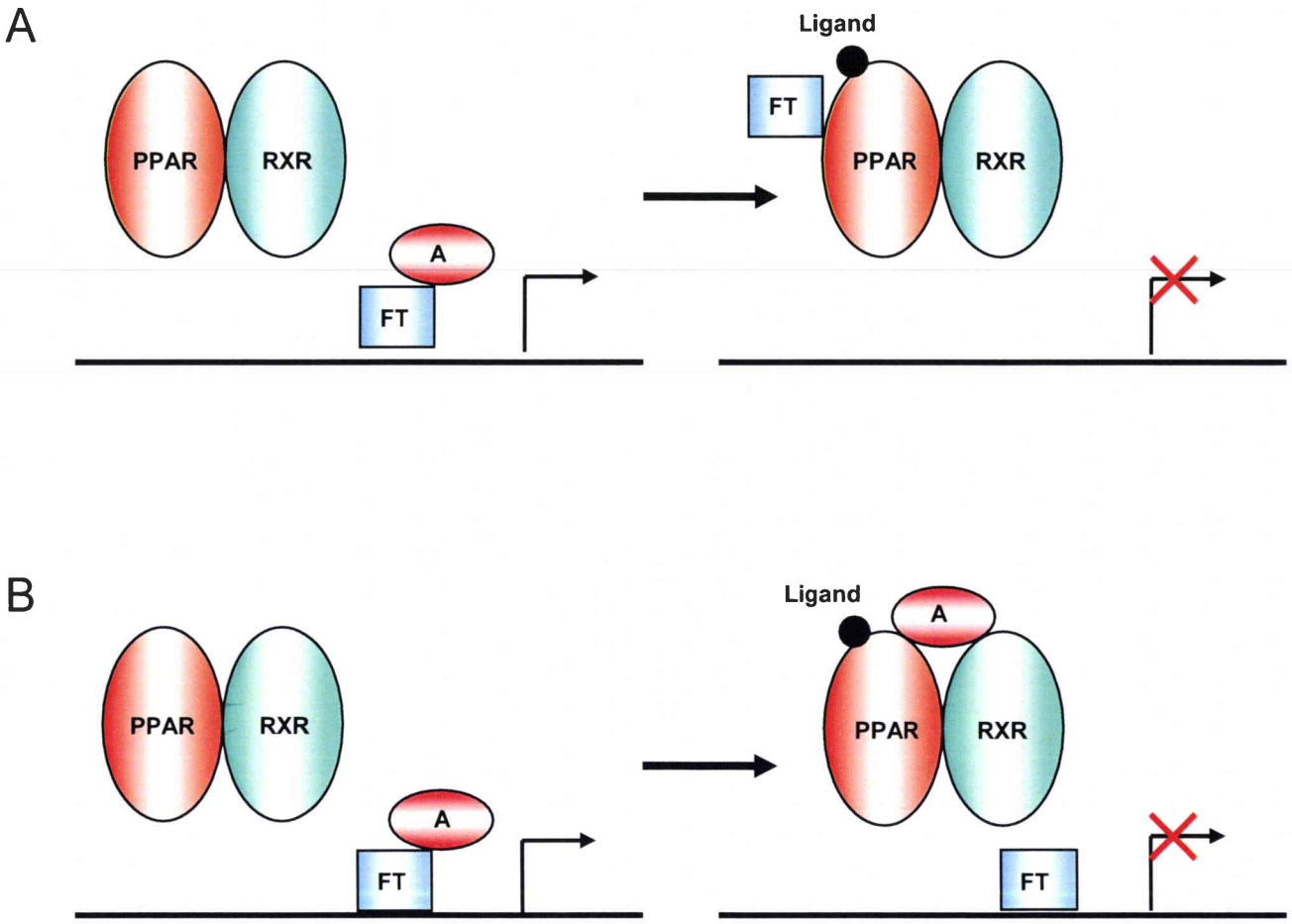
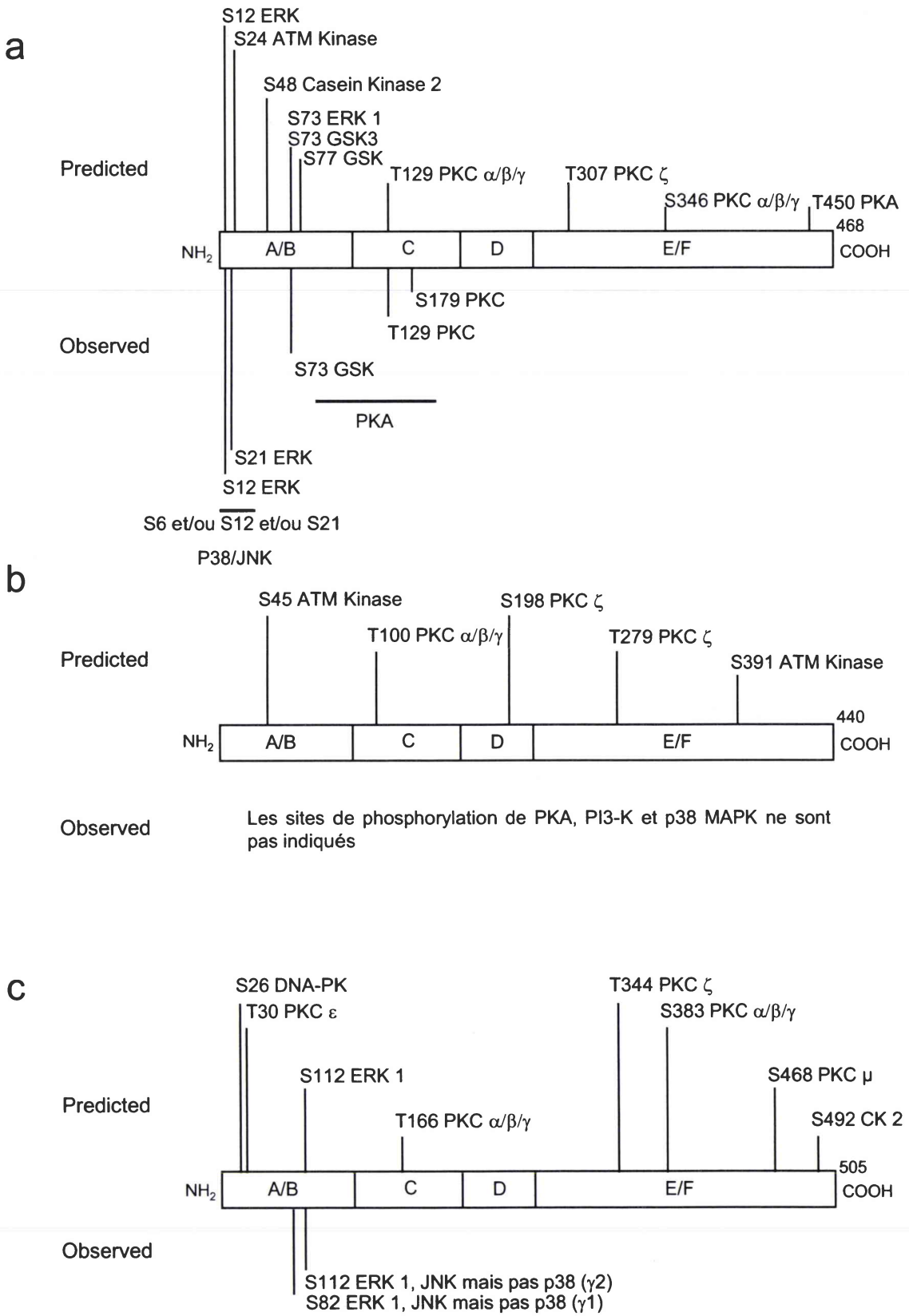


Figure 3 : Modes de transrépression des PPAR.

Les PPAR peuvent induire des effets répresseurs par transrépression, en inhibant l'activité de facteurs de transcription. A) Les PPAR peuvent inhiber la liaison des facteurs de transcription à l'ADN par des interactions protéine-protéine directes (« *tethering* ») ou B) séquestrer des cofacteurs nécessaires à leur activité (« *squelching* »).



D'après Burns et Vanden Heuvel, 2007

Figure 4: sites de phosphorylation observés et prédictifs des 3 isotypes murins de PPARs

a) PPARα; b) PPARβ/δ; c) PPARγ

la conformation du récepteur sans ligand et régule l'affinité de PPARγ pour son ligand, influençant la capacité de recrutement du coactivateur (Shao *et coll*, 1998).

Dans les préadipocytes et adipocytes, la phosphorylation de PPARγ est stimulée par l'insuline *via* Erk2 et la protéine kinase c-*Jun* (Zhang *et coll*, 1996). Par ailleurs, des protéines de stress comme les JNK/SAPK peuvent phosphoryler PPARγ1 selon une voie indépendante des MAPK (Camp *et coll*, 1999).

Les signaux extracellulaires qui activent la phosphorylation de PPARγ peuvent influencer sa dégradation (Floyd and Stephens, 2004).

La prévention de la phosphorylation de PPARγ conduit à l'augmentation de la sensibilité à l'insuline, due à l'augmentation de la dépense musculaire en glucose, ce qui est similaire à un traitement par TZD (Rangwala and Lazar, 2004). L'activation de la PKA augmente l'activité basale et ligand-dépendante de PPARγ (Lazennec *et coll*, 2000), montrant que toutes les phosphorylations ne sont pas inhibitrices. Par contre, la surexpression des kinases MEK et PI3K diminue l'activité de PPARγ (Akahoshi *et coll*, 2003).

Un des effets secondaires des agonistes de PPARγ est la rétention d'eau et l'œdème. Cet effet serait dû à une activation de la PKC au niveau du tissu adipeux et à une perméabilité vasculaire, pouvant être évitées par l'inhibition de cette PKC (Sotiropoulos *et coll*, 2006).

Un des mécanismes des TZD qui augmente la sensibilité à l'insuline est l'augmentation de l'expression et de la libération de l'adiponectine, une adipokine qui active l'AMPK. Toutefois, les TZD activent également l'AMPK dans les muscles squelettiques et d'autres tissus (LeBrasseur *et coll*, 2006). L'AMPK inhibe l'activité de PPARγ (Leff, 2003). Donc, certains effets des TZD seraient PPARγ-indépendants et feraient intervenir des processus de phosphorylation.

L'activité des PPAR peut également être régulée indirectement par la phosphorylation de RXR (Solomon *et coll*, 1999), et de différents cofacteurs comme PGC-1α (Knutti *et coll*, 2001; Puigserver *et coll*, 2001; Misra *et coll*, 2002), SRC-1/TIF-2 (Rowan *et coll*, 2000; Lopez *et coll*, 2001) ou SMRT et NCoR (Hermanson *et coll*, 2002; Jonas and Privalsky, 2004).

Ubiquitinilation

L'ubiquitine est une protéine de 8KDa qui se lie de façon covalente aux protéines afin d'en faire des cibles pour le protéasome 26S, d'où leur dégradation. L'ubiquitine se fixe au niveau de

résidus lysine et fait intervenir une enzyme activatrice E1, une enzyme de conjugaison E2 et enfin une ubiquitine ligase (E3) (pour revue, (Hershko and Ciechanover, 1998)).

Les PPARα et γ peuvent être dégradés par cette voie. La dégradation de PPARγ est activée par la fixation du ligand *via* un mécanisme nécessitant la structure de AF-2 et la conformation active du récepteur, étant donné que l'association du corépresseur RIP140 réverse l'effet du ligand sur la dégradation (Hauser *et coll*, 2000).

Par contre, les agonistes de PPARα stabilisent le récepteur (Hirotani *et coll*, 2001; Blanquart *et coll*, 2004).

Des cofacteurs, comme p300, peuvent aussi avoir une activité ubiquitine ligase (Grossman *et coll*, 2003). L'état de phosphorylation des PPAR peut influencer l'ubiquitinilation et la dégradation des PPAR (Floyd and Stephens, 2004; Tsao *et coll*, 2005).

PPARβ peut modifier l'ubiquitinilation *via* la régulation de l'expression de l'ubiquitine C (Kim *et coll*, 2004).

Sumoylation

Les « *small ubiquitin-like modifiers* » (SUMO) sont des protéines de 11 kDa. Leur liaison covalente, mais réversible, aux protéines permet la régulation de différents mécanismes cellulaires, dont la répression de la transcription (Hay, 2005). La sumoylation s'effectue au niveau de résidus lysine compris dans un motif ψKXE/D (ψ = résidu hydrophobe, X = résidu quelconque), et fait intervenir les enzymes E1, E2 et E3. PPARγ peut être sumoylé au niveau des lysines 77 et 365 (107 et 395 pour PPARγ2) (Pascual *et coll*, 2005). La sumoylation de la lysine 365 est ligand-dépendante et conduit à la transrépression de la transcription de iNOS, par l'augmentation de l'interaction du récepteur avec NCoR (Pascual *et coll*, 2005).

La répression transcriptionnelle par SUMO est en général médiée par le recrutement de corépresseurs et de histones déacétylases (HDACs) (Gill, 2004).

B. LE CANCER DU COLON

1. GÉNÉRALITÉS

Environ 36000 nouveaux cas de cancers colorectaux sont diagnostiqués chaque année, avec 16000 décès par an. Les cancers colorectaux représentent en France 15% de l'ensemble des cancers. Environ 40% de ces cancers touchent le rectum, 60% le colon, avec une localisation sigmoïdale principalement. La France se situe parmi les régions à risque élevé de cancer

colorectal, tout comme les autres pays de l'Europe Occidentale, l'Amérique du Nord et l'Australie.

Plus de 90% des cancers du colon et du rectum sont sporadiques. Leur incidence augmente régulièrement avec l'âge. Le risque devient appréciable à partir de 45 ans et double ensuite à chaque décennie. L'âge moyen du diagnostic se situe vers 70 ans. 60 à 80% des cancers colorectaux se développent à partir d'un adénome. Les polypes adénomateux naissent de l'épithélium glandulaire, les cellules se développant sans restriction et sans se différencier. Ils peuvent être sessiles ou pédiculés, de type tubulaires ou villeux. Il existe des polypes hyperplasiques, mais dont l'évolution vers le cancer n'est pas fréquente. Le risque de transformation d'un adénome en adénocarcinome varie en fonction de sa taille, de l'importance de la composante villeuse au sein de l'adénome et du degré de dysplasie. La transformation cancéreuse suit cette séquence : hyperplasie des cryptes et architecture remaniée, petits adénomes, grands adénomes avec atypies cellulaires, cancer *in situ* ou intra-épithélial, cancer invasif puis cancer métastatique (Kinzler and Volgenstein, 1996).

2. PRÉDISPOSITION HÉRÉDITAIRE

Plus de 10% des cancers colorectaux sont le fait d'une prédisposition héréditaire. La *polypose familiale* est un syndrome autosomique dominant affectant environ un individu sur 10000. Des centaines voire des milliers de polypes sont observés tout le long du colon vers l'âge de 30-40 ans. Un ou plusieurs de ces polypes dégénèrent, entraînant un cancer colique évolutif. Seule une colectomie totale préventive peut éviter cette évolution maligne.

Une forme non polypomateuse de cancer colorectal familial ou *syndrome de Lynch* se distingue par l'absence de polypose généralisée, mais l'existence d'un adénome initiant la cancérisation est démontrée. A la différence du syndrome de Lynch I (cancers coliques isolés), dans le syndrome de Lynch de type II, d'autres cancers peuvent survenir : cancers de l'endomètre, de l'estomac ou de la vessie (Kinzler and Volgenstein, 1996).

3. ANOMALIES GÉNÉTIQUES

a. Instabilité chromosomique (CIN, pour Chromosomal INstability)

Elle concerne 85% des cancers colorectaux sporadiques et 100% des carcinomes développés dans le cadre de Polypose Adénomateuse Familiale (ou PAF). En 1986, Herrera et Sandberg (Herrera *et coll*, 1986) démontrèrent la présence d'une délétion chromosomique en 5q21 chez les

malades porteurs de polypose familiale. Un gène particulier, le gène APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) fut ensuite isolé. Une mutation germinale du gène APC a été identifiée dans plus des 2/3 des malades atteints.

Le passage des adénomes au carcinome va se faire par le biais d'une instabilité chromosomique qui affecte des gènes suppresseurs de tumeur et des protooncogènes. Ces cancers sont caractérisés par des pertes alléliques (LOH, pour *Loss Of Heterozygosity*) ou des mutations. Ces anomalies sont situées sur les chromosomes 5, 18, 17 et 12. Ces régions contiennent des gènes majeurs comme le gène APC sur le chromosome 5q, le gène DCC (pour *Deleted in Colon Carcinoma*) sur le chromosome 18q, le gène p53 sur le chromosome 17p et le protooncogène Kirsten-ras (K-ras) localisé sur le bras court du chromosome 12.

Le gène suppresseur de tumeur APC qui est un régulateur négatif de la prolifération cellulaire semble le premier de cette étape multiséquentielle à être modifié, puisque les altérations de APC sont déjà observées dans les ACF (pour *Aberrant Crypt Foci*) et les adénomes avec dysplasie de bas degré.

K-ras est un protooncogène qui a un rôle majeur dans la croissance et dans la différenciation cellulaire. Ses mutations surviennent durant les stades intermédiaires du développement des adénomes mais s'observent également dans les ACF.

Le gène DCC présente des homologies avec la famille des molécules d'adhérence N-CAM qui ont un rôle dans l'adhérence et la reconnaissance cellulaire. La perte de DCC survient dans 47% des adénomes avec dysplasie haut degré et 73% des carcinomes et semble donc un événement tardif dans cette séquence. Le gène DCC est exprimé dans toutes les cellules épithéliales normales, dans lesquelles il pourrait intervenir dans l'adhérence cellule-cellule. Son rôle précis dans la carcinogenèse colique reste cependant difficile à déterminer.

La perte d'hétérozygotie la plus fréquemment retrouvée concerne le chromosome 17p. Cette région contient le gène p53, qui joue plusieurs rôles : il est impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire, dans la réparation et synthèse de l'ADN et dans l'apoptose. Les altérations de p53 sont retrouvées dans 40 à 70% des carcinomes invasifs. Les mutations de p53 seules sont insuffisantes pour initier un cancer. En effet, les mutations d'autres gènes suppresseurs de tumeur (APC, DCC) et oncogènes (K-ras) sont nécessaires à la transformation maligne.

b. Instabilité des microsatellites (MIN, pour Microsatellite INstability)

Cette instabilité concerne les syndromes de Lynch ou HNPCC (pour *Hereditary Human Non Polyposis Colorectal Cancer*) et 15% des cancers sporadiques. Elle se caractérise par une réparation déficiente de l'ADN ou MMR (ou *deficient DNA mismatch repair*).

Il n'existe pas de délétion du gène APC dans cette forme familiale. Deux gènes semblent être responsables du développement de cette maladie : le gène hMSH2, situé sur le chromosome 2p et le gène hMLH1, situé sur le chromosome 3p, codent des protéines impliquées dans la reconnaissance et la réparation des anomalies de l'ADN avant la mitose. L'inactivation de ces protéines produit un phénotype propice aux mutations, permettant la transformation rapide de l'adénome en adénocarcinome.

Il existe également une prédisposition au cancer du colon dans le cas des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comme la maladie de Crohn et la Rectocolite Hémorragique : après 20 ans, le risque de développer un cancer du colon est de l'ordre de 33%.

La présence de métastases, et notamment les métastases à distance (foie et poumon), détermine la probabilité de survie des patients.

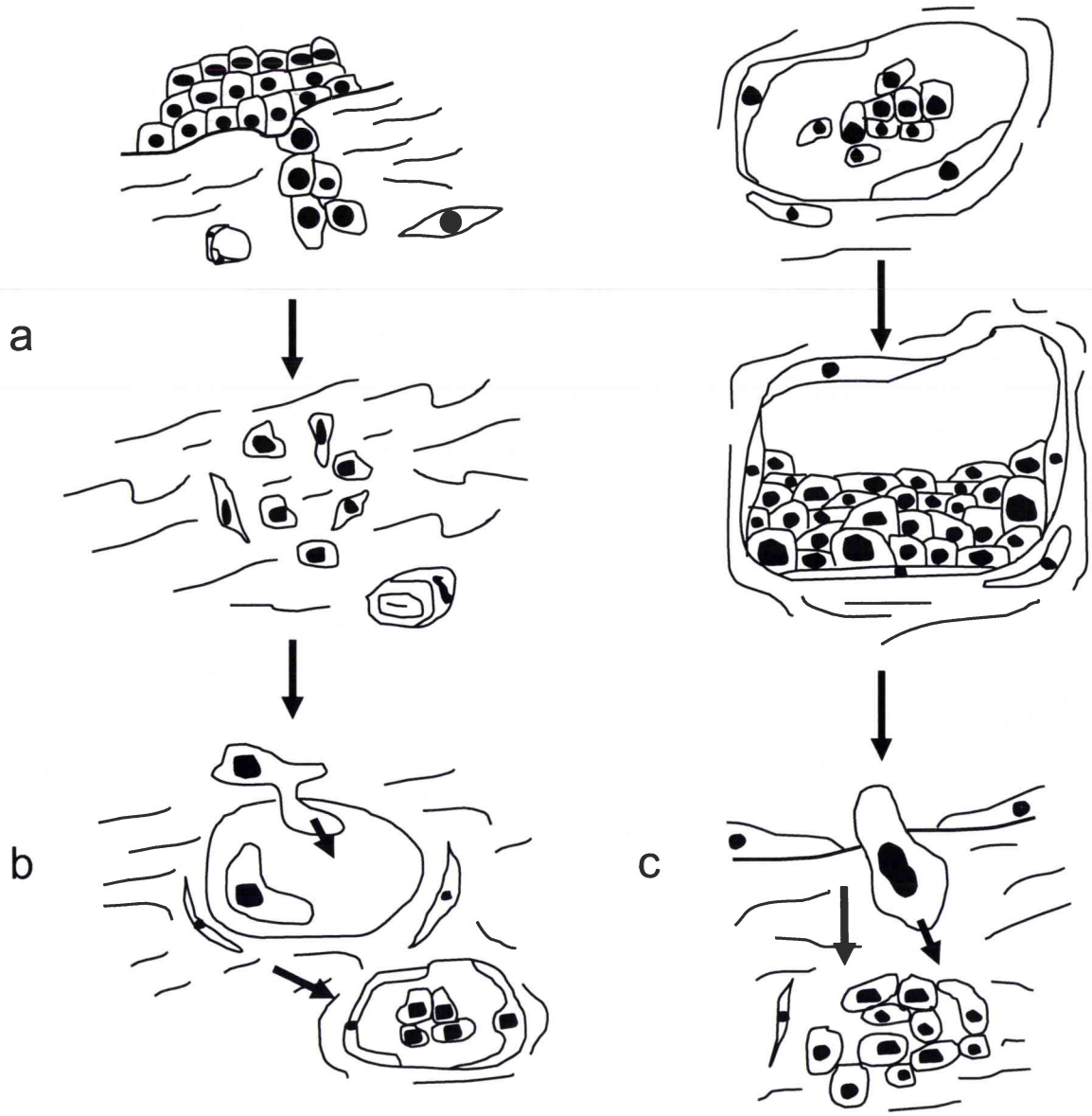
4. FORMATION DES MÉTASTASES

La formation des métastases requiert différentes étapes importantes :

- la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) : plusieurs modifications de contact interviennent tout au long du processus métastatique. Pour migrer, les cellules colorectales *réversent* leur phénotype, et passent d'un état épithélial à un état mésenchymateux, c'est la TEM (pour revue, (Vincan and Barker, 2008). Les cellules épithéliales sous-régulent l'adhérence homotypique cellule-cellule régie par la E-cadhérine, perdent l'intégrité de leur cytosquelette, leur polarité. La E-cadhérine est une glycoprotéine transmembranaire. La portion extracytoplasmique des cadhérines E interagit de façon homophilique avec celle des cellules voisines. La partie intracytoplasmique se lie à des protéines comme la β-caténine et la γ-caténine (plakoglobine) ; le complexe cadhérine-caténine est lui-même lié à l'actine du cytosquelette par l'intermédiaire de l'α-caténine. La E-cadhérine joue un rôle important dans le maintien de la cohésion cellulaire et de l'architecture tissulaire normale et

s'oppose donc à la mobilité cellulaire, à l'invasion et à la métastase. Lors de la TEM, les cellules cancéreuses perdent l'expression des marqueurs de cellules épithéliales. Le phénotype mésenchymateux ainsi acquis favorise la migration cellulaire (Bates and Mercurio, 2005). Au niveau de leur site secondaire, les cellules retrouveront leur phénotype épithélial, leur permettant une prolifération. Cette TEM est à l'origine de l'initiation de la cascade métastatique du cancer du colon.

- Migration dans la matrice extracellulaire (MEC) et intravasation : la seconde étape des cellules métastatiques est le franchissement des lames basales et matrices extracellulaires jusqu'aux vaisseaux sanguins ou lymphatiques (figure 5a et b, page 21 bis). Pour cela, elles vont sécréter des enzymes protéolytiques comme les metalloprotéinases matricielles 2 et 9 (MMP2 et 9), qui vont dégrader les constituants de la MEC. Selon les cas, les cellules expriment les MMP ou induisent leur expression par les cellules stromales voisines, ou répriment les inhibiteurs tissulaires spécifiques des MMP, les TIMP (pour *Tissue Inhibitors of MMP*). Pour leur migration, les cellules cancéreuses vont interagir avec des composants de la lame basale et de la MEC (Biyi *et coll*, 2001). Ces interactions sont possibles grâce à la présence d'intégrines à la surface des cellules. Les intégrines sont une famille de protéines transmembranaires représentées par 18 sous-unités α et 8 sous-unités β qui s'hétérodimérisent et forment des récepteurs d'adhérence pour les composants de la MEC. Les différents hétérodimères ont une affinité variable pour les divers composants de la MEC tels que les collagènes, les laminines et les fibronectines. Par leurs propriétés structurales et leur rôle de connexion entre les protéines de l'environnement et le cytosquelette d'une part, et de part leur rôle de signalisation intracellulaire d'autre part, les intégrines jouent un rôle fondamental dans l'adhérence, la mobilité, la survie et la prolifération cellulaires. La transduction de signaux de survie « ancrage-dépendants » met en jeu des tyrosine-kinases associées aux intégrines, les protéines FAK (pour *Focal Adhesion Kinase*) qui protègent les cellules adhérentes de l'apoptose p53-dépendante. Les kinases de type FAK sont surexprimées dans certains types de cancers (cancers colorectaux, du sein, de l'estomac, du foie, du col de l'utérus, etc…). Les intégrines assurent l'adhérence de chaque cellule à un substrat qui lui est spécifique ; l'absence d'interactions correctes et adaptées avec la MEC, ou l'absence de tout ancrage comme dans le courant sanguin, empêche la cellule de survivre dans un site inapproprié. Les cellules cancéreuses ont un profil d'expression dynamique des intégrines, leur permettant de franchir la membrane basale et de s'adapter à de nouveaux environnements hétérotopiques. Les cellules cancéreuses peuvent réguler elles-mêmes



<u>Figure 5:</u> Schéma des différentes étapes de la formation des métastases (document personnel).

La formation des métastases requiert différentes étapes: après la transition épithélio-mésenchymateuse, les cellules cancéreuses vont franchir la lame basale et migrer à travers la matrice extra-cellulaire (a) jusqu'à leur intravasation dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques (b). Les cellules qui auront survécu dans la circulation générale vont s'arrêter au niveau de leur organe cible et sortir des vaisseaux (extravasation, c). La dernière étape de la formation d'une métastase est la prolifération des cellules cancéreuses au sein du site secondaire, donnant lieu à des métastases synchrones ou métachrones.

leur adhérence aux protéines matricielles ou aux cellules endothéliales grâce à des signaux intracellulaires régulant l'affinité des intégrines β1 pour leurs ligands. Une des voies concernées implique la FAK, Src, et la paxilline. Cette voie est active dans des lignées cellulaires de cancer colique, ainsi que dans des cultures primaires de cellules cancéreuses coliques humaines issues de biopsies (pour revue, (vanderVoortvanZijp *et coll*, 2008)). L'intravasation dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques fait appel aux mêmes propriétés que pour la migration cellulaire dans la MEC. L'entrée des cellules dans les vaisseaux cause la mort de la plupart des cellules cancéreuses, en raison des contraintes de cisaillement dues au flux sanguin ou lymphatique, à la perte d'adhérence avec leur environnement (Weiss *et coll*, 1985) et aux cellules immunitaires (cellules NK) (Yang *et coll*, 2003). Pour se protéger de ces cellules NK, les cellules cancéreuses adhèrent aux plaquettes sur toute leur surface, ce qui leur facilite de plus l'adhérence à l'endothélium vasculaire, et donc, leur extravasation (Gasic *et coll*, 1973). *In vitro*, il existe une corrélation entre les capacités tumorales à s'agréger aux plaquettes et les capacités à métastaser. L'autre condition de survie des cellules dans la circulation générale est une activation des voies de survie « ancrage-indépendantes », comme celle de la FAK, qui protège les cellules non adhérentes de l'anoïkis (Frisch and Screaton, 2001). La présence de cellules tumorales circulantes n'est pas synonyme de potentiel métastatique ; la formation de métastases nécessite la reconnaissance de l'endothélium par les cellules cancéreuses au niveau des organes cibles et la capacité de survie et de prolifération dans un environnement étranger.

- Extravasation (figure 5c, page 21 bis): elle s'effectue au niveau des organes cibles, alors site tumoral secondaire. Deux hypothèses existent : soit la cellule cancéreuse circulante s'arrête au niveau de l'organe hôte en fonction des conditions anatomiques, par hasard, ou cet organe serait ciblé suivant la théorie « seed and soil » de Paget (Schluter *et coll*, 2006). Cette théorie repose sur des interactions spécifiques entre les cellules tumorales (*seed*) et le microenvironnement de l'organe cible (*soil*).
- Prolifération : la prolifération des cellules métastatiques peut s'effectuer d'emblée au niveau du site secondaire, créant des métastases synchrones, ou avoir lieu des mois voire des années plus tard (métastases métachrones).

C. PPAR ET CANCER DU COLON

1. PPAR ET CANCERS

Le développement d'un cancer est associé à une dérégulation du contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose et/ou de la différenciation. Les ligands de PPARα comme les fibrates, induisent la différenciation et inhibent la prolifération de cellules épidermiques normales ou hyperprolifératives de souris, et régulent leur apoptose (Komuves *et coll*, 1998; Komuves *et coll*, 2000). Dans les kératinocytes humains, les ligands des PPARα et γ ont un effet négligeable sur l'expression des marqueurs de différenciation (Westergaard *et coll*, 2001). PPARγ intervient dans la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose. Il favorise la différenciation des hépatocytes, des fibroblastes, des myocytes, de l'épithélium colique et des adipocytes (Mangelsdorf *et coll*, 1995). L'activation de PPARγ inhibe la prolifération cellulaire, par arrêt des cellules en phase G0/G1, par exemple (Kitamura *et coll*, 1999) et induit l'apoptose dans divers tissus tumoraux ou non (Law *et coll*, 1996; Morikang *et coll*, 1997; Tontonoz *et coll*, 1997; Elstner *et coll*, 1998; Kubota *et coll*, 1998; Mueller *et coll*, 1998; Sarraf *et coll*, 1998; Matsuura *et coll*, 1999; Rumi *et coll*, 2001; Mossner *et coll*, 2002; Ohta *et coll*, 2002; Heaney, 2003). Ainsi, les ligands de PPARγ ont un effet anti-prolifératif sur les cellules cancéreuses coliques humaines (Sarraf *et coll*, 1998), de cancer mammaire (Elstner *et coll*, 1998), d'adénomes pituitaires (Heaney, 2003), de cancer gastrique (Takahashi *et coll*, 1999), et de cancer de la vessie (Guan *et coll*, 1999). Concernant PPARβ/δ, des études récentes suggèrent qu'il serait impliqué dans la carcinogenèse colique. Ainsi, PPARβ est souvent surexprimé dans les tumeurs coliques et favoriserait la formation de polypes (He *et coll*, 1999; Gupta *et coll*, 2000; Park *et coll*, 2001). Toutefois, des résultats contradictoires indiquent que PPARβ pourrait atténuer la carcinogenèse de la peau et du colon (Harman *et coll*, 2004; Kim *et coll*, 2004). Au niveau des cellules épithéliales, PPARβ aurait un rôle anti-apoptotique, maintiendrait la survie et la différenciation cellulaires (Di-Poi *et coll*, 2003). Par ailleurs, il a été récemment montré que l'acide valproïque, un activateur de PPARβ/δ, tératogène *in vivo* chez l'Homme et la souris, est capable de moduler l'expression de la NCAM (pour *Neural Cell Adhesion Molecule*) (Lampen *et coll*, 2005). PPARβ est normalement exprimé dans les cellules F9 de carcinome embryonnaire et son activation par l'acide valproïque induit la différenciation de ces cellules. Sa surexpression dans les cellules F9 traitées par l'acide valproïque induit une forte expression du gène codant NCAM, favorisant ainsi l'adhérence et la différenciation des cellules F9. Réciproquement, la répression de l'activité de PPARβ/δ inhibe ces effets (Lampen *et coll*, 2005). Par contre,

l'activation de PPARα et γ n'a pas d'effet sur l'expression de NCAM. Il est possible que la modulation de l'expression du gène NCAM par PPARβ/δ soit indirecte car aucun élément de réponse aux PPAR n'a actuellement été identifié dans le promoteur de ce gène.

2. IMPLICATION DE PPARγ

Les résultats impliquant la participation de PPARγ dans les cancers coliques sont nombreux et contradictoires. Suivant le modèle utilisé (animal ou lignée cellulaire d'origine humaine), PPARγ peut être considéré comme un facteur de prolifération cellulaire ou un inducteur de la différenciation cellulaire et/ou de la mort cellulaire par apoptose (pour revue, (Koeffler, 2003)).

Chez l'animal : les TZD inhibent la formation des ACF chez des rats Fisher F344 traités avec l'azoxyméthane (AOM) ou le dextran-sulfate afin d'induire un cancer colorectal (Kohno *et coll*, 2001; Tanaka *et coll*, 2001). Osawa et *coll* ont montré les mêmes effets des TZD sur des souris Balb/c (Osawa *et coll*, 2003). De plus, la pioglitazone inhibe la multiplicité et diminue la taille des tumeurs coliques dans ce modèle. Une autre TZD, RS5444, a été testée sur des souris C57BL/6J traitées à l'AOM. Cette TZD a également la capacité d'inhiber la formation d'ACF au niveau du colon proximal et distal (Su *et coll*, 2007). Girnun et *coll* a par ailleurs montré l'effet protecteur de PPARγ puisqu'un KO hémizygote de PPARγ augmente l'incidence de tumeurs chez des souris traitées par AOM (Girnun *et coll*, 2003). Par contre, d'autres études associent PPARγ à un rôle pro-tumoral chez l'animal. Les souris *Min* ont une mutation monoallélique au niveau du gène MOM qui les prédispose à former des cancers du tractus digestif (Moser, 1995). Un traitement prolongé de ces souris par des TZD entraîne un accroissement du nombre de polypes au niveau du colon (Lefebvre *et coll*, 1998; Saez *et coll*, 1998). Toutefois, le traitement de ces souris par la pioglitazone inhibe la croissance tumorale (Niho *et coll*, 2003). De plus, une étude récente a montré que la délétion intestin-spécifique de PPARγ chez les souris *Min* conduit à une augmentation du nombre de tumeurs au niveau de l'intestin et surtout au niveau du colon (McAlpine *et coll*, 2006). Ces résultats soulignent la difficulté de discerner les actions PPARγ-dépendantes de la présence des TZD de celles qui ne le sont pas.

Chez l'Homme : l'activation de PPARγ par ses ligands dans des lignées cellulaires dérivant d'adénocarcinomes coliques humains conduit à une diminution de la croissance cellulaire, notamment par blocage des cellules en phase G1, *in vitro* et *in vivo* (Brockman *et coll*, 1998; Lefebvre *et coll*, 1998; Sarraf *et coll*, 1998; Kitamura *et coll*, 1999; Chen *et coll*, 2002; Shimada *et coll*, 2002; Gupta *et coll*, 2003; Kato *et coll*, 2004; Yoshizumi *et coll*, 2004). Seuls de rares cas

de mutations perte de fonction de PPARγ ont été identifiées dans des biopsies tumorales (Sarraf *et coll*, 1998; Gupta *et coll*, 2003). Une étude clinique de phase II a montré que la troglitazone n'apportait pas de changement chez les patients avec un cancer du colon métastatique ne répondant pas aux thérapies classiques (Kulke *et coll*, 2002).

L'ensemble de ces résultats indiquent que les agonistes de PPARγ peuvent bloquer les stades précoces de la carcinogenèse (études sur souris/rats traités par AOM), inhiber la prolifération des cellules cancéreuses à ces stades précoces (lignées cellulaires), mais ne montrent que peu ou pas d'effets pour les stades avancés (test clinique de phase II).

3. IMPLICATION DE PPARα

L'administration prolongée d'agonistes de PPARα de la classe des fibrates induit l'apparition de carcinomes hépatocytaires chez les rongeurs (Reddy and Rao, 1992). Pourtant, une exposition prolongée de patients à des drogues hypolipémiantes comme le gemfibrozil (Frick *et coll*, 1987) et le clofibrate n'augmente pas le risque de développer un cancer du foie ou d'autres organes (IARC, 1992). Chez l'Homme, le taux d'expression hépatique de PPARα est dix fois moindre comparé à celui des rongeurs (Palmer *et coll*, 1998; Tugwood *et coll*, 1998).

Concernant le rôle de PPARα dans le cancer du colon, des études récentes ont montré qu'il aurait plutôt un rôle protecteur. En effet, un traitement de souris *Min* avec des agonistes de PPARα entraîne la suppression de la formation de polypes (Niho *et coll*, 2003). Chez le rat F344 traité à l'AOM, un traitement par agoniste de PPARα inhibe la formation des ACF (Tanaka *et coll*, 2001). Le bezafibrate, ligand de PPARα, inhibe la carcinogenèse et augmente l'apoptose des cellules cancéreuses chez les souris CD-1 traitées à l'AOM (Kohno *et coll*, 2005). *In vitro*, PPARα induit également l'apoptose de cellules cancéreuses coliques (Martinasso *et coll*, 2007).

Ces quelques études montrent que les agonistes de PPARα pourraient également inhiber la carcinogenèse colique chez l'Homme.

4. IMPLICATION DE PPARβ

Les résultats des différentes études concernant l'implication des 3 isotypes de PPAR dans le cancer du colon montrent que les ligands de PPARα et γ semblent avoir des effets protecteurs. Le rôle de PPARβ/δ dans la carcinogenèse colique est plus controversé. Selon les études et les modèles utilisés, PPARβ/δ aurait soit un rôle promoteur de tumeur (He *et coll*, 1999; Gupta *et coll*, 2000; Gupta *et coll*, 2004; Ouyang *et coll*, 2006; Takayama *et coll*, 2006; Vanamala *et coll*,

2008), soit un rôle protecteur (Harman *et coll*, 2004; Marin *et coll*, 2006). Dans d'autres types de cancers, PPARβ/δ a plutôt un effet délétère (Glinghammar *et coll*, 2003; Stephen *et coll*, 2004; Yin *et coll*, 2005; Xu *et coll*, 2006; Abdollahi *et coll*, 2007; Daikoku *et coll*, 2007). Ces résultats montrent que le rôle de PPARβ/δ dans la biologie du cancer reste indéterminé.

D. PROCESSUS D'ADHÉRENCE ET DE MIGRATION CELLULAIRES LORS DE LA FORMATION DES MÉTASTASES DU CANCER DU COLON.

1. GÉNÉRALITÉS

De nos jours, et ce malgré les progrès médicaux, le taux de survie à 5 ans dans le cas d'un cancer du colon est en moyenne de 40%, en raison d'un diagnostic tardif et de la présence de métastases au moment de la prise en charge du patient. Même après une chirurgie, plus de 30% des patients atteints de carcinomes colorectaux développent des métastases. Les foyers secondaires les plus souvent touchés sont le foie avec 70% des patients atteints et ensuite les poumons avec 20 à 30% de patients touchés.

2. PPARγ ET ADHÉRENCE/MIGRATION CELLULAIRES

Le rôle des PPAR dans l'adhérence cellulaire est mal connu et les données sur le sujet sont très récentes, encore fragmentaires et contradictoires :

- L'activation de PPARγ par un ligand spécifique conduit à un arrêt de la prolifération et à la différenciation des cellules suivis de leur apoptose. Pour certains auteurs, cette mort cellulaire programmée semble résulter d'une perte de l'adhérence cellulaire contrôlée par les PPAR. Plusieurs données soutiennent cette hypothèse. Ainsi, la recherche par la technique des puces à ADN (*microarray*) de gènes cibles de PPARγ dans les cellules intestinales a révélé que trois gènes codant des protéines de la famille des antigènes carcino-embryonnaires (CEA, NCA et BGP) appartiennent au domaine génique d'action de PPARγ (Gupta *et coll*, 2001). Les protéines CEA ou CEACAM5 (pour *carcinoembryonic antigen*), NCA ou CEACAM6 (pour *non specific cross-reacting antigen*), et BGP (ou CD66a ou CEACAM1 ; pour *biliary glycoprotein*) sont impliquées dans les interactions homophiliques Ca^{2+} indépendantes entre cellules et participent de ce fait au processus d'adhérence cellulaire. Les protéines CEA et NCA sont surexprimées dans les adénocarcinomes du colon ; CEA est utilisé comme marqueur tumoral. Dans ces cancers

coliques, la répartition de ces deux protéines varie : leur expression passe du pôle apical à l'ensemble de la surface cellulaire, entraînant une perte de polarité des cellules cancéreuses. Les cellules endothéliales expriment la protéine CEA à leur surface et les cellules d'adénocarcinomes coliques qui l'expriment également peuvent adhérer à ces cellules endothéliales *via* des interactions CEA-CEA. Ces interactions faciliteraient l'extravasation des cellules tumorales et la formation de métastases (Haier and Nicolson, 2000). Ainsi, des cellules cancéreuses coliques peu métastatiques le deviennent après leur transfection avec un ADNc de CEACAM5 (Gangopadhyay *et coll*, 1998).

Contrairement à CEACAM5 et à CEACAM6, les protéines BGP (CEACAM1) et CEACAM7 voient leur expression diminuer fortement dans les cancers coliques, et sont considérées comme des suppresseurs de tumeurs (Schölzel *et coll*, 2000).

- L'activation de PPARγ par des agonistes entraîne dans les cellules pulmonaires tumorales NSCLC (pour *Non-Small Cell Lung Carcinoma)* une diminution significative dose- et temps-dépendante de l'expression du gène codant la sous-unité α5 de l'intégrine (Panigrahy *et coll*, 2002; Han *et coll*, 2005). Cette protéine intégrée dans la membrane plasmique, établissant une relation entre le cytosquelette et les molécules de la matrice extracellulaire, joue un rôle capital dans les processus d'adhérence et de migration cellulaires. En effet, les cellules métastatiques acquièrent un phénotype adhésif dynamique qui permet leur dissémination, par modification du patron d'expression des intégrines ou de leur activation. Ainsi, plusieurs combinaisons de sous-unités α et β ne sont retrouvées que dans les cellules transformées. L'intégrine α5β1 est exprimée dans plusieurs types cellulaires, dont les cellules tumorales et endothéliales. Une surexpression de α5β1 est associée à un phénotype plus agressif des tumeurs, par activation de l'angiogenèse, et donc de la croissance tumorale. Toutefois, Shirmer *et coll* ont montré qu'une transfection de l'intégrine α5β1 dans les cellules HT29, ensuite injectées à des souris *nude*, empêche ces cellules cancéreuses de former des métastases pulmonaires (Schirmer *et coll*, 1998). Il semblerait donc dans ce cas que l'intégrine α5β1 pourrait inhiber les étapes permettant aux cellules tumorales circulantes de coloniser leurs organes cibles. En 2003, l'équipe de Farrow et Evers a montré que l'activation de PPARγ dans des cellules cancéreuses pancréatiques inhibe leur capacité invasive (Farrow and Evers, 2003). La technique des puces à ADN (*microarray*) a montré que ce traitement provoque une diminution de l'expression des intégrines α4 et β6, et de la MMP7. Les MMP peuvent coopérer avec les intégrines ou les altérer pour induire une migration cellulaire (pour revue, (Westermarck and Kähäri, 1999). Parmi les MMP, trois sont principalement impliquées dans l'augmentation du potentiel métastatique : il s'agit des MMP2, 7

et 9. L'action de la troglitazone a été analysée sur la prolifération et l'adhérence des cellules de la lignée HT29 (dérivée d'un adénocarcinome colique humain) sur la matrice extra-cellulaire (Han *et coll*, 2005). La troglitazone déclenche non seulement un arrêt de la prolifération de ces cellules, mais provoque aussi une perte de leur adhérence avec les constituants (laminine, collagène de type IV) de la matrice extra-cellulaire ainsi qu'une diminution de la production de MMP-7 (Sunami *et coll*, 2002). L'étude de la séquence promotrice du gène codant la MMP9 a révélé la présence d'un PPRE. Ainsi, l'activation de PPARγ inhibe la transcription de MMP9 car sa fixation sur les régions promotrices du gène empêche la fixation du complexe AP-1, et donc l'activation de la transcription du gène MMP9 (Francois *et coll*, 2004). L'expression de la MMP9 est donc régulée directement par PPARγ, mais également indirectement, par la transrépression de NFκB (nécessaire à l'expression de MMP9) par PPARγ. L'activation de PPARγ dans les lignées cellulaires U937 (Lee *et coll*, 2004) et Caco-2 (Gan *et coll*, 2001) a montré également une inhibition de l'activité et de la sécrétion de cette enzyme, respectivement. Dans les cellules de la lignée humaine surrénale H295R, un traitement par un ligand synthétique de PPARγ provoque une diminution de la capacité migratoire de ces cellules, ainsi qu'une diminution dose-dépendante de la sécrétion de MMP2 (Ferruzzi *et coll*, 2005). Un traitement des cellules de cancer mammaire MDA-MB-231, très agressives, avec la pioglitazone, la rosiglitazone ou le 15Δ-PGJ2 inhibe les capacités invasives de ces cellules en Matrigel. Le mécanisme de cette inhibition semble lié à une augmentation de l'activité inhibitrice des MMP de TIMP-1, d'où une diminution de l'activité des gélatinases et une plus faible capacité migratoire des cellules cancéreuses (Liu *et coll*, 2003).

- Certaines études *in vitro* ont montré que Akt2 augmente l'adhérence et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires et ovariennes en favorisant l'expression des sous-unités β1 des intégrines. *In vivo*, ces cellules possèdent un potentiel métastatique plus élevé que les cellules normales mais ce potentiel est inhibé par l'expression de PTEN (Arboleda *et coll*, 2003). Le niveau transcriptionnel de cette dernière est augmenté lors d'un traitement par agoniste de PPARγ. De plus, l'activation de Akt provoque une transition épithélio-mésenchymateuse dans les lignées de carcinome à cellules squameuses, et une augmentation de la capacité invasive et migratoire de ces cellules, *in vitro* et *in vivo* (Grille *et coll*, 2003).

- La recherche de gènes cibles des PPAR, menée au sein du laboratoire dirigé par M. le Professeur M.Dauça, a montré que le gène codant la sémaphorine 6B appartient au domaine génique d'action de PPARγ (Collet *et coll*, 2004). Les sémaphorines sont des protéines secrétées ou transmembranaires qui participent entre autres au guidage axonal des neurones et à la

migration cellulaire. Les travaux réalisés par Murad *et coll* (2006) ont montré que l'expression de la sémaphorine 6B est diminuée dans les cellules humaines de carcinome mammaire MCF-7 lorsqu'elles sont traitées par le fénofibrate (un ligand de PPARα) ou par la troglitazone (un activateur de PPARγ). L'effet est encore plus efficace quand le traitement associe à l'un ou l'autre de ces activateurs l'acide 9-*cis* rétinoïque, le ligand spécifique du récepteur RXR (Murad *et coll*, 2006).

- Sasaki *et coll* (2006) ont montré que l'acide linoléique (ligand de PPARγ) inhibe le processus métastatique des cellules de cancer colique Colo320 injectées dans le péritoine de souris BALB *nu/nu* (Sasaki *et coll*, 2006).
- Une étude réalisée en 2006 indique que plus de la moitié des biopsies de carcinomes rénaux montrent un déficit en transcrits de PPARγ, et ces cancers en particulier ont un comportement plus agressif (Yuan *et coll*, 2006).
- Une thérapie systémique chez la souris avec la rosiglitazone prévient la formation de métastases après la résection d'un carcinome pulmonaire de Lewis primaire (Panigrahy *et coll*, 2002).
- La rosiglitazone a montré un effet inhibiteur sur l'invasion des cellules cancéreuses thyroïdiennes (Aiello *et coll*, 2006) mais également sur l'invasion trophoblastique (Fournier *et coll*, 2002).

Ces données expérimentales nous ont ouvert des perspectives intéressantes quant à la participation de PPARγ dans les domaines de la reconnaissance, de l'adhérence et de la migration cellulaires.

3. PPARα ET ADHÉRENCE /MIGRATION CELLULAIRES

Peu de données existent concernant l'implication des autres isotypes de PPAR dans l'adhérence et la migration cellulaires.

Ainsi, plusieurs études ont montré l'effet anti-migratoire de l'activation de PPARα dans les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses vasculaires (Goetze *et coll*, 2002; Kintscher *et coll*, 2002). A propos de la migration des cellules cancéreuses, seuls les travaux de Grabacka *et coll* ont montré que l'activation de PPARα par le fénofibrate peut inhiber la formation des métastases de mélanomes, par diminution de la phosphorylation de Akt (Grabacka *et coll*, 2004). Ces données, quoique fragmentaires, suggèrent que le fénofibrate, ligand de

PPARα, pourrait être associé aux chimiothérapies actuelles employées pour le traitement du mélanome, et d'autres cancers, comme le cancer du colon.

III. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

L'objectif principal de ce projet est ***de préciser l'implication des isotypes de PPAR et en particulier de l'isotype PPARγ dans les processus de développement des cancers colorectaux*** et également montrer l'implication de ce récepteur ***dans l'adhérence et la migration des cellules au cours de la phase de progression des tumeurs.***

L'approche expérimentale consistera dans une première phase à choisir les modèles cellulaires d'études. Pour cela, nous avons travaillé à partir de différentes lignées cellulaires dérivant d'adénocarcinomes coliques humains :

- les cellules Caco-2 et HT29 10^{-5}MTX Rev, qui se différencient spontanément en cellules absorbantes et mucosécrétantes respectivement, et qui présentent une faible capacité migratoire ;
- les cellules HT29 et HCT116, majoritairement indifférenciées et à fort potentiel invasif. Les cellules HCT116 sont de plus un modèle d'instabilité génétique (instabilité des microsatellites).

A partir de ces 4 lignées, nous avons recherché par RT-PCR le profil d'expression au cours de la culture (5, 11 ou 15 jours) de différents gènes impliqués dans l'adhérence et dans la migration cellulaires. Il s'agit des gènes codant la MMP2, la MMP7, les sous-unités α3, α5, αV, β1, β3, β4 et β6 des intégrines, certains gènes de la famille des antigènes carcino-embryonnaires, comme NCA, BGP, CEA et CEACAM7, la cadhérine E, la sémaphorine 6B, la chaîne γ2 de la laminine 5 et PTEN.

L'expression de ces différents gènes a également été étudiée après divers traitements : de 1 à 50 µM de pioglitazone, ou bien de 1 à 10 µM de rosiglitazone, ou encore de 10 à 50 µM de fénofibrate, seuls ou en association avec 1 µM d'acide 9-*cis* rétinoïque. Les traitements ont été soit de courte durée (24h à 5 jours), soit chroniques (jusqu'à 5 semaines). L'influence des agonistes sur l'expression de protéines impliquées dans l'adhérence et la migration cellulaire a été recherchée par immunoréplique et cytométrie en flux.

L'activité des gélatinases A et B (MMP2 et 9) a également été vérifiée par zymographie.

En parallèle, l'effet des différents ligands a été testé *in vivo*. Pour cela, des greffes orthotopiques de cellules HT29 ont été réalisées chez les souris *nude*. Ces souris ont été traitées avec la pioglitazone, la rosiglitazone (seules ou associées) ou avec le fénofibrate, aux doses

pharmacologiques. L'analyse immunohistochimique effectuée sur les prélèvements de ces souris permet de montrer les propriétés de chaque ligand et son efficacité anti-cancéreuse.

IV. MATERIEL ET METHODES

MÉTHODES DE BIOLOGIE CELLULAIRE

ENTRETIEN ET ENSEMENCEMENT

Les cellules HT29 (caractéristiques dans le tableau 2, obtenues par les Drs A. Zweibaum et M. Rousset, INSERM, Paris), HT29 MTX 10^{-5}M Rev (HT29 MTX), et HCT116 sont cultivées dans du milieu minimum essentiel modifié par Dulbecco (DMEM, Sigma, Saint Louis, MO, USA) contenant 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal décomplémenté (à 56°C pendant 30 min) (Sigma), 2mM L-Glutamine (Sigma), et 50 µg/mL de gentamycine (Invitrogen, Paisley, Ecosse). Les cellules Caco-2 sont cultivées dans du milieu DMEM contenant 20% (v/v) de sérum de veau fœtal et 1 mM d'acides aminés non essentiels (Sigma). Les cellules sont ensemencées à une densité de 10^5 cellules/mL exception faite des cellules Caco-2, qui sont ensemencées à une densité de 6.10^4 cellules /mL. Les cellules sont cultivées en atmosphère humide et à 5 % de CO_2 (incubateur Jouan, Saint Herblain, France). Le milieu des cellules est renouvelé tous les jours.
L'ensemencement des cellules est réalisé tous les 7 jours sauf pour les cellules Caco-2, tous les 6 jours. Le tapis de cellules est lavé avec 5 mL de DPBS, puis 2 mL d'une solution de trypsine – EDTA (0,1%(p/v) Trypsine, et 2 mM EDTA dans du DPBS) sont ajoutés sur le tapis de cellules. Le décollement des cellules est obtenu entre 5 à 10 min. Les cellules sont remises en suspension et la réaction trypsique est arrêtée par addition de 2 mL de milieu. Après centrifugation à 200g pendant 5 min et à 4°C, les cellules sont mises en suspension dans du DPBS et comptées à l'aide d'un hématimètre de Malassez.

Tableau 2 : Caractéristiques de la lignée HT29 concernant les mutations des gènes codant APC, p53, le phosphoinositol 3-kinase (PI3K), PTEN et la cadhérine E, et l'expression de la vimentine

	APC	P53	K-Ras	PI3K	PTEN	Cadhérine E	Vimentine
HT29	wt	mutant	wt	wt	wt	wt	-

D'après (Buck *et coll*, 2007)

TRAITEMENT DES CELLULES

Traitement court

Quelle que soit la lignée utilisée, les cellules sont cultivées pendant 1 ou 4 jours puis traitées par des concentrations variables (de 0 à 100 µM) de pioglitazone (Takeda, Puteaux, France), de rosiglitazone (Cayman, Ann Arbor, MI, USA), ou de fénofibrate (Sigma) et/ou d'acide 9-*cis* rétinoïque (1µM) (Sigma), de 24 heures à 6 semaines. Après traitement, les cellules sont i) décollées à l'aide de trypsine et comptées à l'aide d'un hématimètre de Malassez ; les cellules sont au préalable diluées dans une solution à 0,04 % (p/v) de bleu de Trypan préparée dans du tampon Phosphate de Sodium modifié par Dulbecco (DPBS). ii) Les tapis cellulaires sont lavés trois fois avec du DPBS froid, puis conservés à -80°C avant extraction des ARN totaux ou des protéines.

Traitement prolongé des cellules en présence de pioglitazone, de rosiglitazone ou de fénofibrate

Des cellules HT29 sont ensemencées à une densité de 10^5 cellules/mL. Elles sont cultivées pendant 4 jours, puis traitées avec 50 µM de pioglitazone, 10 µM de rosiglitazone ou 50 µM de fénofibrate pendant 5 jours. Le milieu de culture contenant l'agoniste est renouvelé chaque jour. Après 7 jours de culture, les cellules sont ensemencées à la densité de 10^5 cellules/mL dans du milieu contenant l'agoniste. Ces conditions de culture sont maintenues sur 5 à 7 ensemencements successifs à raison d'un ensemencement par semaine.

TEST DE PROLIFÉRATION (MTS)

L'effet cytotoxique des drogues a été recherché sur des cellules traitées avec les TZD pendant 1 ou 2 jours, grâce au kit de détection MTT (Promega, Madison, WI, USA). Les cellules sont ensemencées à une densité de 10^5 cellules/mL dans des plaques 96 puits (Dutscher, Brumath, France). 50 µL de suspension cellulaire sont déposés par puits. Les plaques sont placées à 37°C dans une atmosphère humide à 10% CO_2. Au bout de 24 heures, 50 µL de milieu contenant les agonistes des PPAR sont ajoutés par puits. Les cellules HT29 sont traitées en présence de concentrations croissantes de pioglitazone (0 à 50 µM) ou de rosiglitazone (1 et 10 µM) et/ou de

l'antagoniste de PPARγ, GW 9662 (10 µM, Cayman). Les cellules HT29 sont traitées en présence de concentrations croissantes de fénofibrate (0 à 50 µM). Les cellules sont traitées pendant 24 ou 48 heures ; dans ce cas, le milieu est renouvelé au bout de 24 heures. Après incubation, 20 µL de solution MTS (substrat de la succinate déshydrogénase prête à l'emploi) sont ajoutés par puits et les cellules sont à nouveau placées en incubateur. Après une heure d'incubation, la lecture de l'absorbance à 492 nm renseigne sur l'état prolifératif des cellules. Les résultats sont exprimés en indice de prolifération.

TEST D'ADHÉRENCE CELLULAIRE

Le substrat permettant de tester l'adhérence cellulaire est préparé dans des plaques 96 puits recouvertes pendant une nuit à 4°C par 50 µL de laminine-1 (Sigma) à différentes concentrations. Le revêtement des puits est ensuite bloqué par 1% (p/v) d'albumine sérique bovine (BSA) dans 0,1 M tampon phosphate de sodium (PBS) pendant une heure puis lavé avec du tampon PBS. Une suspension cellulaire est obtenue par traitement des tapis avec une solution de trypsine-EDTA préparée dans du PBS. Après centrifugation, les cellules sont lavées 2 fois avec du milieu de culture DMEM contenant 0,2% (p/v) de BSA (tampon d'adhérence) et suspendues à nouveau dans ce même milieu. Les cellules (50 000 cellules/50 µL) sont ajoutées à chaque puits et incubées 2 heures à 37°C. Les cellules non adhérentes sont éliminées lors de 3 lavages avec le tampon d'adhérence, et les cellules adhérant au support sont fixées par 1 % de glutaraldéhyde. Après coloration au cristal violet 0.1% (p/v), les cellules sont lysées en présence de 1% (p/v) de SDS (pH 7,4) et la densité optique obtenue est mesurée à 600nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (modèle R960 Metertech, Fisher, Illkirch, France).

TEST DE MIGRATION

La migration cellulaire est testée à l'aide de chambres de Boyden modifiées (NeuroProbe Inc., Bethesda, MD, USA) et de membranes de polycarbonate Nucléopore (Costar, Cambridge, MA, USA). La face inférieure de la membrane est recouverte de protéines matricielles purifiées en concentrations croissantes préparées dans du milieu DMEM contenant 0,1% (p/v) de BSA, pendant 1 heure à 37°C. Les cellules sont préparées de la même façon que lors des tests d'adhérence, mais traitées avec 10 nM de phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma) avant d'être placées dans la chambre supérieure à faible densité (10^5cellules/cm^2) afin d'éviter les contacts intercellulaires, puis incubées 5 heures à 37°C. Après l'incubation, les cellules n'ayant pas migré

(à la face supérieure du filtre) sont retirées. Les cellules ayant migré (à la face inférieure de la membrane) sont fixées et colorées avec du Bleu de Coomassie à 0,125% (p/v) préparé dans un mélange de méthanol : acide acétique : eau (45 :10 :45). L'haptotaxisme est déterminé par comptage des cellules dans 10 champs microscopiques par puits. Les résultats sont exprimés en nombre moyen de cellules par champ microscopique.

CYTOMETRIE EN FLUX

MESURE DU TAUX DE PROTEINE A LA SURFACE DES CELLULES

L'expression des différentes protéines de surface est évaluée en cytométrie de flux ou FACS (pour *Fluorescence Activated Cell Sorting*). Les cellules HT29 sont traitées 5 jours ou 5 semaines avec 50 µM de pioglitazone, 10 µM de rosiglitazone ou 50 µM de fénofibrate ; ou bien traitées 5 jours avec un antagoniste de PPARγ (GW9662 ; 10 µM) seul, ou associé à 50 µM de pioglitazone ou 10 µM de rosiglitazone. En résumé, 7.5 . 10^5 cellules sont incubées 30 min à 4°C avec les anticorps primaires de souris anti-intégrine α5 humaine (Immunotech, Marseille, France), α3 (Immunotech), αV*, β1 (Immunotech), β3*, β4 et β6 (Chemicon , Temacula, CA, USA), avec l'anticorps de souris anti E-cadherine humaine (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) ou avec l'anticorps de lapin anti-sémaphorine-6B humaine (Murad *et coll*, 2006), dilués dans du milieu Dulbecco modifié par Iscove (IMDM, Sigma). L'excès d'anticorps primaire est alors éliminé par lavage/centrifugation des cellules en milieu IMDM (200g, 10 min, 4°C). Le culot est repris dans 150 µL d'une solution d'anticorps secondaire de mouton anti-souris (Caltag-Invitrogen), ou anti-lapin (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Royaume-Uni) dans le cas des anticorps primaires anti-sémaphorine 6B couplé au FITC (pour *Fluorescein IsoThioCyanate*) (1/150ème final), et les cellules sont incubées pendant 30 min à 4°C à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées avec du tampon d'incubation XL (NaCl 137 mM ; KCl 5 mM, Hepes 50 mM ; Glucose 1 mg/mL, pH 7,4). Le culot cellulaire est repris dans 50 µL de tampon XL. L'exclusion des cellules mortes est réalisée *via* l'ajout de 400 µL de 7-amino-actinomycineD (7-AAD, Molecular Probes, Invitrogen) à 2,5 µL/mL. Pour chaque expérience, la fluorescence de 7500 cellules est mesurée à l'aide d'un cytomètre de flux EPICS XL (Beckman Coulter Company, Hialeah, FL, USA).

Les cellules sont ensemencées à une densité de 10^5cellules/mL dans des boîtes de 25 cm^2 puis traitées selon les protocoles décrits précédemment. Après incubation, les tapis cellulaires sont lavés au DPBS puis trypsinés. Après récolte, les cellules sont fixées dans une solution d'éthanol froid à 70% (v/v) et conservées à -20°C. Le jour de l'analyse, les cellules en suspension sont centrifugées à 200g pendant 5min et à 4°C. Les culots sont remis en suspension dans 10 mL de DPBS maintenu à température ambiante pendant 5 min. Après centrifugation à 200g pendant 5 min et à 4°C, les cellules sont reprises dans du DPBS contenant 0,1% (v/v) de Triton-X100, 100 µg/mL de RNAse DNAse free (Euromedex, Strasbourg, France) et 5 µg/mL d'iodure de propidium (Sigma). Le mélange est incubé à température ambiante pendant 30 min, puis les échantillons sont analysés au cytomètre en flux. Pour chaque expérience, 30000 cellules sont comptées. La cytométrie a été effectuée grâce à un cytomètre en flux Calibur (BD France, Le Pont de Claix, France).

Le processus apoptotique est estimé par cytométrie en flux avec le kit de détection annexine V (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) à partir de cellules traitées 1 à 5 jours puis trypsinées. Les cellules sont lavées/ centrifugées trois fois dans du tampon 10 mM Hepes (pH 7,4) contenant 0,15 M NaCl et 5 mM de $CaCl_2$. Le culot final est repris dans un même tampon contenant 2 mM $CaCl_2$. 10 µL d'annexin-V couplé au FITC (pour *Fluorescein IsoThioCyanate*) sont ajoutés au culot cellulaire et incubés pendant 15 min à température ambiante à l'obscurité. Les cellules sont ensuite analysées au cytomètre en flux.

ZYMOGRAPHIE

Précipitation des protéines

Cette technique permet de mettre en évidence les activités des gélatinases A et B (correspondant aux MMP2 et MMP9 respectivement), sécrétées par les cellules dans leur milieu de culture. Ceux-ci sont récupérés et centrifugés à 10000g pendant 10 min et à 4°C. Les protéines sont précipitées par l'ajout volume à volume d'acide trichloroacétique à 20% (p/v) et de 2 µg de BSA. Les échantillons sont ensuite vortexés et placés à 4°C pendant 2 heures, puis centrifugés à 15000g à 4°C pendant 20 min. Les culots sont ensuite lavés deux fois à l'acétone froid puis séchés et solubilisés dans 5 µL de TBS (50 mM Tris/HCl, pH 7,4 contenant 0,15M de NaCl).

Mise en évidence de l'activité des gélatinases

La gélatine est utilisée comme substrat des MMP2 et 9. Du bleu de dépôt (20 mM Tris/Base pH 6,8 contenant 30% (v/v) glycérol, 0,3% (p/v) bleu de bromophénol et 7,7% (p/v) SDS) est ajouté volume à volume à chaque échantillon, déposé dans un gel de polyacrylamide à 10%(T) contenant 0,1% (p/v) de gélatine (Sigma). La migration est réalisée à 100V pendant 100 min. Au terme de l'électrophorèse, le gel est lavé deux fois 90 min, sous agitation et à température ambiante dans du tampon Tris/HCl 50mM (pH 7,4) contenant 2,5% (v/v) de Triton et 150mM de NaCl, pour éliminer le SDS et renaturer les protéines. Le gel est ensuite incubé dans un tampon catalytique (50 mM Tris/HCl, pH 7,6 contenant 10 mM $CaCl_2$) pendant 48 heures à 37°C. La coloration du gel est réalisée dans une solution contenant du méthanol, de l'acide acétique et de l'eau selon les proportions 10 :1 :10, ainsi que 0,025% (p/v) de bleu de Coomassie, pendant 30 min. Le gel est décoloré dans une solution identique mais ne contenant pas de bleu de Coomassie, pendant 24 heures. Les bandes correspondant aux zones de lyse de la gélatine (blanches sur fond bleu) indiquent la présence et l'activité de l'enzyme. La surface de ces zones de lyse est proportionnelle à l'activité des protéases présentes dans l'échantillon déposé.

IMMUNOREPLIQUE

Cette technique est réalisée en conditions standards (Laemmli, 1970). Brièvement, les échantillons sont préparés dans du tampon d'extraction, préparé extemporanément, selon les conditions définies par Mansen et coll (Mansen *et coll*, 1996). 50 µg de protéines de chaque échantillon sont séparés par SDS-PAGE (10%T). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (pour *polyvinyl difluoride*) (Towbin *et coll*, 1979) et détectées par chimioluminescence, selon le protocole recommandé par le fournisseur (Roche, Mannheim, Allemagne). L'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre PPARγ (anticorps primaire) (Cayman) est utilisé à une dilution 1/1000, l'anticorps monoclonal de souris anti-GAPDH (Chemicon) à une dilution 1/5000, l'anticorps de lapin anti-E-cadhérine (Cell Signaling) à une dilution 1/1000, l'anticorps de souris anti- RXRα au 1/500ème (généreusement offert par C. Egly, IGBMC, Illkirch, France).

MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux a été réalisée selon la procédure décrite par Chomczynski et Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987) à partir des tapis de cellules congelées à –80°C avec 2mL de solution d'extraction (isothiocyanate de guanidium GIT= 8,8 mL de citrate de Na 0,75 M pH 7, 13,2 mL de sarcosine de sodium 10% (p/v), 146,5 mL d'eau traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC), 125 g de guanidine thiocyanate et 360 µL de β-mercaptoéthanol) pour un tapis cellulaire d'une boîte de 25 cm^2, puis les extraits sont conservés à 4°C pendant 15 min.

Des solutions d'acétate de sodium à 2M, de phénol saturé en eau et de chloroforme-alcool isoamylique (49 :1) sont ajoutées successivement selon les proportions en volume 0,1/1/0,2. Les tubes sont vortexés après addition de chaque solution. Homogénéisées, les solutions sont centrifugées 20 min à 10000g et la phase aqueuse (supérieure), contenant les ARN totaux, est prélevée. Les ARN sont précipités par ajout d'isopropanol en volume équivalent, puis placés 1 heure à –20°C.

Les tubes sont ensuite centrifugés 20 min à 10000g et les surnageants sont éliminés. Les culots d'ARN sont repris dans 300 µL de solution d'extraction, auxquels 1 mL d'éthanol 99% (v/v) est ajouté. Les ARN sont alors placés à –20°C toute la nuit. Les tubes sont ensuite centrifugés 10 min à 10000g. Les culots d'ARN sont lavés deux fois avec 1 mL d'une solution d'éthanol à 70% (v/v), puis séchés. L'ajout de 50 µL d'une solution à 1mM d'EDTA (pH 8) permet la solubilisation des culots en 15 min.

RT-PCR

Quantification des ARN

La quantité et la qualité des ARN totaux extraits sont analysées par la mesure de l'absorbance d'une aliquote de la solution d'ARN à 260 nm.

La qualité des ARN extraits est analysée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% (p/v) dans du tampon Tris/HCl 90 mM (pH 8,0) contenant 90 mM de borate de sodium, 2mM d'EDTA (TBE) et 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium. La migration est réalisée à 100 volts pendant 30 min. Après migration, les ARN sont visualisés sous lampe ultraviolette.

Transcription inverse

Les ADNc sont synthétisés dans un milieu réactif composé de tampon Tris/HCl à 50 mM (pH 8,3) contenant 75 mM de KCl, 3 mM de $MgCl_2$, 1µg d'ARN totaux, 0,5 µM de chacun des désoxynucléotides triphosphates, 0,02 g/L d'amorces aléatoires, 5 mM de DTT, 5 unités de RNAsine (Invitrogen) et 200 unités de RT-M-MLV. Le mélange est incubé à 37°C pendant 2 heures.

Réaction de polymérisation en chaîne

La RT-PCR semi-quantitative fait appel à une co-amplification des gènes d'intérêt et d'un gène de référence qui est dans notre cas celui codant la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase (GAPDH). La réaction est réalisée dans un mélange composé de tampon Tris/HCl à 20 mM (pH 8,4) contenant 50 mM de KCl, 0,2 mM de chacun des désoxynucléotides triphosphates, 0,4 µM d'amorces sens et anti-sens (tableau 3, page 38 bis et ter), 1,5 mM de $MgCl_2$ et 2,5 unités de *Taq* polymérase (Invitrogen). 2µL du mélange de transcription inverse préalablement chauffés à 94°C pendant 30 secondes sont finalement ajoutés.

La PCR est réalisée selon la programmation suivante : 3 min 30s à 94°C, 25 à 42 cycles comportant 30s à 94°C, 30s à Tm+2°C et 30s à 72°C, puis une élongation de 5 min à 72°C.

Analyse des produits de PCR

10 µl de produit de RT-PCR sont déposés dans un gel d'agarose à 2% (p/v) préparé dans du TBE. Les produits de PCR sont alors séparés par électrophorèse dans un champ électrique à 90V pendant 40 min.

Un système GelDoc 1000 (BioRad, Hercules, CA, USA) est utilisé pour visualiser les produits d'amplification par transillumination ultraviolette à 302 nm. L'analyse densitométrique est réalisée sur l'image du gel acquise par l'intermédiaire d'une caméra. Pour chaque échantillon, le ratio d'expression relatif représente l'intensité de fluorescence de la bande du gène d'intérêt sur l'intensité de fluorescence de la bande du gène de référence (ici GAPDH). Les résultats présentés sont la moyenne ± erreur standard.

Tableau 3: amorces utilisées lors des techniques de RT-PCR semi-quantitative

Noms	Amorces (5' vers 3')	Taille attendue (pb)	Tm (°C)	Nombre de cycles
α5 sens	CCAAGGCCCCAGCTCCATTA	598	51	30
α5 anti-sens	GCCATATGGGAGGGAGCGTT			
α3 sens	AAGCCAAGTCTGAGACTGTG	656	50	
α3 anti-sens	GTAGTATTGGTCCCGAGTCT			
αV sens	GCGGGATCTTGCCCTCAGTG	422	53	
αV anti-sens	CTTCTTGAGGTGGCCGGACC			
β1 sens	CGGGGTGAATGGAACAGGGG	656	55	
β1 anti-sens	CTCGCAGATGCCCCGGCCAT			
β3 sens	GAGGCCCGAGTACTAGAGGA	429	51	42
β3 anti-sens	GCGGGTCACCTGGTCAGTTA			
β4 sens	CATCACCATTGAATCCCAGGTGCA	449	54	30
β4 anti-sens	TGGTGATGCTGCTGTACTCGCTTTG			
β6 sens	CATCCCTCCTGCAGCGGAAG	311	53	
β6 anti-sens	CCTGAGGCTCCAGGGTTTGT			
CEACAM7 sens	GCCACCCAAGCCCTCCATCA	577	53	40
CEACAM7 anti-se	GTGGCCCACATCTCAGGCAT			
CEA sens	CCCAGTGAGTGCCAGGCGCA	362	55	28
CEA anti-sens	CATCCTCATCCTCCACGGGG			
BGP sens	GGATGAAGCTGTCCCAGGGC	421	53	28
BGP anti-sens	GGGGAGGCTGAAGTTGGTTG			
NCA sens	GCCAAGCCCATAACTCAGCC	512	53	28
NCA anti-sens	GCCAAGCGAAAGAGGCAGGC			

<u>Tableau 3 (suite):</u> amorces utilisées lors des techniques de RT-PCR semi-quantitative

MMP 2 sens	GGCCCTGTCACTCCTGAGAT	474	51	40
MMP 2 anti-sens	GGCATCCAGGTTATCGGGGA			
MMP 7 sens	GGACGGCAGCTATGCGACTC	617	53	
MMP 7 anti-sens	GCTACCATCCGTCCAGCGTT			
laminine γ2 sens	AATGGGAAGTCCAGGCAGTGTATC	407	53	32
laminine γ2 anti-sens	ACAGCGTTCTCCAGTAACAGCTG			
E- cadhérine sens	CCCAGGAGCCAGACACATTT	545	53	30
E -cadhérine anti-sens	GCCCCTTCACAGTCACACACG			
semaphorine 6B sens	TAACCCCAGCGACATAAACG	200	54	35
semaphorine 6B anti-sens	TTAAACTCCATCGCAATCTCC			
PTEN sens	GCCCCGCCACCAGCAGCTTCT	770	57	
PTEN anti-sens	CTTCCCGTCGTGTGGGTCCTG			
PPARγ sens	TCATGCTTGTGAAGGATGCAAGG	759	60	35
PPARγ anti-sens	TCCAGTGCATTGAACTTCACAGC			
GAPDH sens	GCTGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT	446	60	25
GAPDH anti-sens	GACCCCTTCATTGACCTCAACTACATG			

GREFFES ORTHOTOPIQUES SUR SOURIS NUDE

TRAITEMENT DES ANIMAUX

Les souris athymiques Ncr/Sed nude (*nu/nu*) non porteuses de pathogènes, âgées de 6 à 8 semaines, ont été obtenues par Charles River (St-Germain s/ l'Arbresle, France). Toutes les manipulations d'animaux sont réalisées suivant les bonnes pratiques de laboratoire.
Les greffes sont réalisées sous anesthésie générale, par injection intrapéritonéale de 150 µL/30g de poids d'un mélange de kétamine (Imalgen 500, Mérial) et de xylazine (Rompun 2% (p/v, Bayer). Ce mélange est préparé comme suit : 6,5 mL de kétamine sont ajoutés à 1,5 mL de xylazine, et le volume est ajusté à 10 mL avec de l'eau pour solution injectable.

Les cellules HT29 sont injectées dans la paroi du caecum, *id est* en localisation orthotopique. Après huit semaines, les animaux sont sacrifiés après anesthésie générale. Les tumeurs et métastases potentielles sont prélevées et conservées à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN totaux, ou fixées au formol puis incluses en paraffine en vue de leur analyse par immunohistochimie.

TECHNIQUES D'IMMUNOHISTOCHIMIE

Les différentes pièces chirurgicales prélevées sur les souris *nude* ont été fixées au formol pendant 48 heures, puis déshydratées dans des bains d'éthanol 95° et absolu et de toluène pendant 2h, successivement, avant d'être incluses en paraffine. Des coupes de 5 µm ont été déposées sur des lames polylysine. Les coupes de tissu ont été déparaffinées dans un bain de toluène (10 min) et réhydratées par des bains successifs de 5 min d'éthanol absolu, d'éthanol 95° puis d'eau distillée. Le démasquage des épitopes a été réalisé en présence d'EDTA 10 nM pH 8 en autoclave pendant 3 heures. Les lames ont ensuite été rincées à l'eau distillée, séchées rapidement. Les coupes de tissus ont été incubées avec l'anticorps primaire (tableau 4) ou du tampon PBST (Tampon phosphate salin modifié par Dulbecco-Tween, témoin), pendant une nuit à l'obscurité à 4°C. Les lames ont été rincées au PBST et incubées 1 heure à l'obscurité à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la biotine. Après un nouveau rinçage au PBST, les phosphatases alcalines endogènes ont été inactivées par incubation avec du peroxyde d'hydrogène à 6% pendant 15 min. Le système streptavidine-peroxydase (dilution 1/150ème) (DakoCytomation, Danemark) permet la reconnaissance de la biotine couplée à l'anticorps secondaire après 50 min d'incubation à température ambiante à l'obscurité. Les lames ont ensuite été rincées au PBST et

les complexes antigène-anticorps ont été révélés grâce à l'utilisation d'un substrat pour la peroxydase Novared (Vector Laboratories, Burlingame, USA) pendant 5 min. Les coupes ont été contrecolorées à l'hématoxyline diluée pour moitié avec de l'eau distillée, puis déshydratées par des bains successifs d'eau distillée, d'éthanol 95°, d'éthanol absolu puis de toluène, avant montage des lames en milieu d'inclusion eukitt (O. Kindler GmbH & Co., Freiburg, Allemagne).

Tableau 4 : liste des anticorps utilisés en immunohistochimie

Anticorps primaire			**Anticorps secondaire**		
anticorps	**fournisseur**	**dilution**	**anticorps**	**fournisseur**	**Dilution**
Ki67, monoclonal	Thermo-Fisher, Fremont, USA	1/100	Anti-lapin, polyclonal	Dakocytomation, Danemark	1/200
Caspase 3, polyclonal	BD Biosciences, USA	1/1000	Anti-lapin, polyclonal	DakoCytomation, Danemark	1/200
E-cadherin, monoclonal	Cell Signaling, USA	1/80	Anti-lapin, polyclonal	DakoCytomation, Danemark	1/200
Cytokeratin-20, monoclonal	DakoCytomation, Danemark	1/80	Anti-souris	DakoCytomation, Danemark	1/200
CEA, monoclonal	DakoCytomation, Danemark	1/400	Anti-souris IgG1	Southernbiotech	1/1000
Vimentine, monoclonal	DakoCytomation, Danemark	1/6000	Anti-souris IgG1	Southernbiotech	1/1000
Intégrine α5, polyclonal	Hypromatrix, Worcester, USA	1/800	Anti-lapin, polyclonal	DakoCytomation, Danemark	1/200

V. RESULTATS

A. MISE EN EVIDENCE DE L'IMPACT DES TZD SUR DES MODÈLES CELLULAIRES

1. EFFET DE LA PIOGLITAZONE SUR LA PROLIFÉRATION DE DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES DÉRIVANT D'ADÉNOCARCINOMES COLIQUES HUMAINS

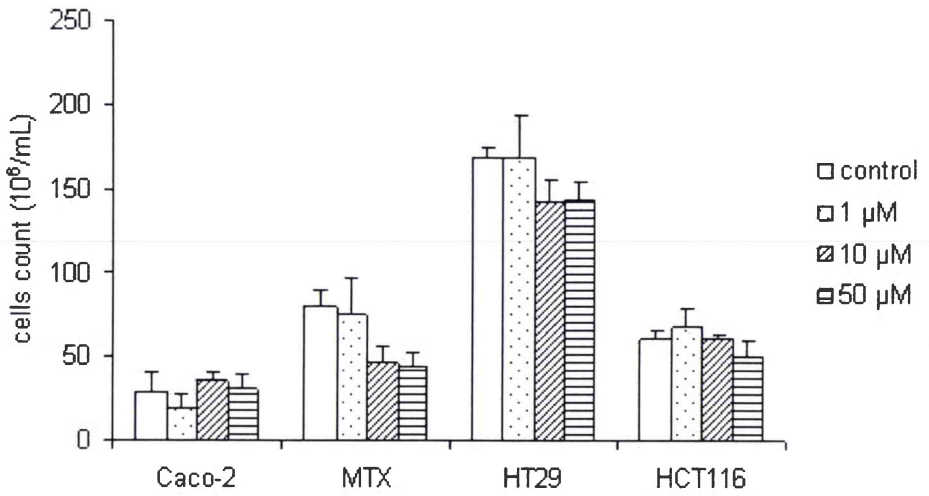
Dans un premier temps, l'effet d'un traitement à dose croissante de pioglitazone pendant 24 heures après 4 jours de culture en conditions standards a été testé sur les lignées Caco-2, HCT116, HT29 et HT29 10^{-5} MTX Rev (HT29 MTX) pour en mesurer les conséquences au niveau de la prolifération cellulaire. Les résultats de comptage après coloration des cellules au bleu de Trypan montrent que 24 heures de traitement ne modifient pas de manière significative la prolifération cellulaire (figure 6a, page 42 bis). Un traitement pendant 5 jours avec 50µM de pioglitazone (figure 6b, page 42 bis) diminue la viabilité des cellules HT29 et HT29 MTX, et augmente la viabilité des cellules HCT116 (20% d'accroissement). Aucun effet n'a été constaté sur la viabilité des cellules Caco-2 dans ces conditions. Nous avons alors testé un effet à plus long terme sur les différentes lignées cellulaires. Il existe un effet délétère sur la croissance lorsque les cellules HT29 sont traitées pendant 10 jours par 50µM de pioglitazone (figure 7a, page 42 ter). Les comptages montrent dans ce cas une diminution importante du nombre de cellules. Cet effet n'est pas observé lorsque les cellules Caco-2 sont traitées dans les mêmes conditions (résultats non présentés). La croissance est également ralentie pour les cellules HT29 MTX. L'impact observé est maintenu lorsque les cellules HT29 sont cultivées et repiquées en présence de la drogue sur des passages successifs (jusqu'à 35 jours) (figure 7b, page 42 ter), ce qui suggère vraisemblablement un effet sur la croissance cellulaire.

2. ANALYSE DES TAUX TRANSCRIPTIONNELS DES GÈNES CIBLES DE PPARγ

a. Profils d'expression en conditions standard de culture

Des RT-PCR semi-quantitatives ont été réalisées à partir des ARN totaux extraits des 4 lignées (Caco-2, HT29, HT29 MTX, HCT116) cultivées dans des conditions standards, dans le but de vérifier l'expression et les potentielles variations de cette expression des différents gènes cibles putatifs de PPARγ choisis dans cette étude (tableau 5, page 41 bis) : il s'agit des intégrines α3,

a)



b)

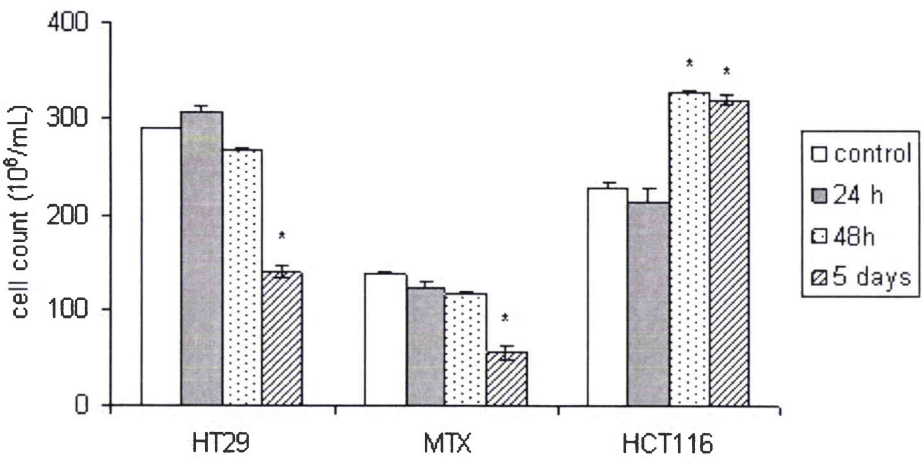
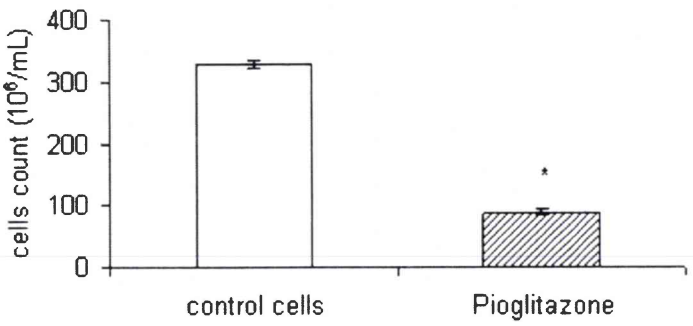


Figure 6: a) Effet dose de la pioglitazone sur la croissance des cellules Caco-2, HT29 MTX, HT-29 et HCT116 après 24 heures de traitement. b) Effet du temps de traitement des cellules HT29, HT29 10^{-5} MTX Rev et HCT116 avec 50µM de pioglitazone. Les cellules sont cultivées pendant 4 jours puis traitées en présence de concentrations croissantes de pioglitazone (0- 50 µM, diluée dans du DMSO) pendant 24 heures (a) ou traitées avec 50µM de pioglitazone pendant 24, 48 heures ou 5 jours (b). Les cellules sont ensuite trypsinées puis comptées à l'aide d'un hématimètre de Malassez. Les cellules sont au préalable diluées dans une solution de Bleu Trypan (0,04 % (p/v) préparée dans du PBS modifié par Dulbecco).

Résultats : Moyenne ± SD (nombre de cellules x10^6 /mL ± SD), n=4

a)



b)

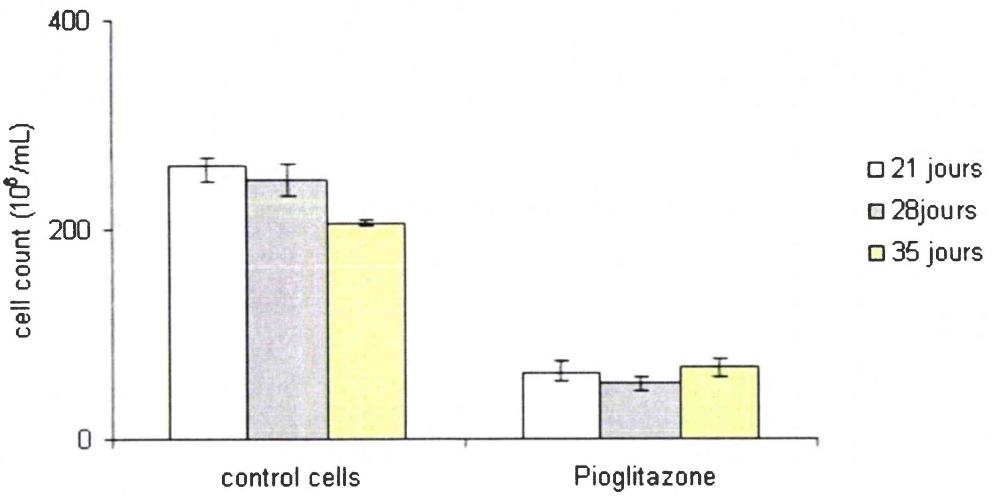


Figure 7: Impact de la pioglitazone sur la viabilité des cellules HT-29
(a). Les cellules HT29 sont cultivées pendant 4 jours puis traitées en présence de 50µM de pioglitazone (diluée dans du DMSO) pendant 10 jours. Les cellules sont ensuite trypsinées puis comptées
(b). Les cellules HT29 traitées en présence de pioglitazone en (a) ont été cultivées pendant 10 jours et repiquées dans un milieu contenant 50 µM de pioglitazone. Le traitement a été poursuivi jusqu'à 21. 28 et 35 jours.

Résultats : Moyenne ± SD (nombre de cellules x10^6 /mL ± SD), n=4

Tableau 5: Etude par RT-PCR semi-quantitative de l'expression des gènes cibles potentiels de PPARγ dans les lignées Caco-2, HT29, HT29 10^{-5} MTX Rev, et HCT116 cultivées dans des conditions standards.

+ : présence de transcrits, - : absence de transcrits

	Caco-2	HT29	HT29 MTX	HCT116
PPARγ	+	+	+	+
MMP2	+	-	-	-
MMP7	+	+	+	+
α3	+	+	+	+
α5	+	-	-	+
αV	+	+	+	+
β1	+	+	+	+
β3	+	-	-	+
β4	+	+	+	+
β6	+	+	+	-
NCA	+	+	+	-
BGP	+	+	+	-
CEA	+	+	+	-
CEACAM7	+	+	+	-
Chaîne γ2 (Ln5)	+	+	+	+
Sema6B	+	+	+	+
Cadhérine- E	+	+	+	+
PTEN	+	+	+	+

Tableau 6: Distribution des cellules HT29 dans le cycle cellulaire après un traitement de 1 à 5 jours avec les TZD

		24 heures	48 heures	5 jours
Contrôle	G0/G1	61.0 ±2.3	61.8 ± 2.9	63.5 ± 0.4
	S	6.25 ± 0.1	6.40 ± 0.1	10.7 ± 0.2
	G2/M	32.7 ± 2.2	31.9 ± 2.9	25.8 ± 0.6
Pioglitazone (50 μM)	G0/G1	48.2 ± 1.6	54.5 ± 0.1	55.3 ± 0.4
	S	18.6 ± 0.6	19.3 ± 0.2	17.7 ± 2.1
	G2/M	33.3 ± 1.1	26.3 ± 0.1	27.0 ± 2.5
Rosiglitazone (10 μM)	G0/G1	56.0 ± 0.6	57.6 ± 0.8	60.1 ± 0.6
	S	11.5 ± 0.5	11.9 ± 0.6	11.4 ± 0.6
	G2/M	32.6 ± 0.1	30.5 ± 0.2	28.4 ± 0.1

* résultats exprimés en pourcentage de cellules totales

α5, αV, β1, β3, β4 et β6 (une recherche *in silico* de PPRE a montré la présence de séquences DR-1 dans les promoteurs des gènes codant les intégrines α3, α5, αV, β1 et β4, en collaboration avec L. Domenjoud), des membres de la famille des ACE comme NCA, BGP, ACE et CEACAM7, les enzymes protéolytiques MMP2 et 7, la cadhérine E, la chaîne γ2 de la laminine 5, PTEN et la sémaphorine 6B. Les résultats ont montré des profils d'expression des différents gènes variables selon les lignées entre 5, 11 et 15 jours de culture (tableau 5, page 41 bis et figures 8 à 11, pages 43 bis à quinquies). Ainsi :

- la lignée HCT116 n'exprime pas les gènes codant les protéines NCA, BGP, CEA et CEACAM7, l'intégrine β6 ni l'enzyme MMP2 (figure 11, page 43 quinquies),
- les cellules de la lignée HT29 ne semblent pas exprimer les intégrines α5, β3, ni la MMP2 (figure 10, 43 quater),
- au cours de la culture, l'expression de l'intégrine β4 reste stable dans les lignées Caco-2, HT29 MTX et HCT116, alors qu'elle augmente dans la lignée HT29 (figures 8 à 11, pages 43 bis à quinquies),
- l'expression des CEA et CEACAM7 augmente dans les lignées HT29 et HT29 MTX (figures 9 et 10, pages 43 ter et quater), alors qu'elle reste constante dans les cellules Caco-2 (figure 8, page 43 bis),
- la lignée HT29 seulement montre une augmentation de l'expression de la chaîne γ2 de la laminine 5 au cours de la culture (figure 10, page 43 quater),
- la lignée Caco-2 exprime la sous-unité β6 des intégrines seulement à partir de 15 jours de culture (figure 8, page 43 bis).

Ces différences de profils d'expression pourraient sous-tendre des réponses différentes aux agonistes de PPARγ.

b. Effet des traitements sur les taux transcriptionnels des gènes cibles de PPARγ

Différents traitements ont été effectués sur ces lignées, pour en étudier l'influence au niveau de la transcription des gènes cibles potentiels : 0 à 50μM de pioglitazone associée ou non à 1μM d'acide 9- *cis* rétinoïque, ou 1 μM d'acide 9-*cis* rétinoïque seul, pendant 24 heures, après 4 jours de culture. Les résultats montrent un effet différent de ces traitements selon la dose, l'association pioglitazone - acide 9-*cis* rétinoïque et la lignée considérée (figures 12 à 19, pages 44 bis à novies).

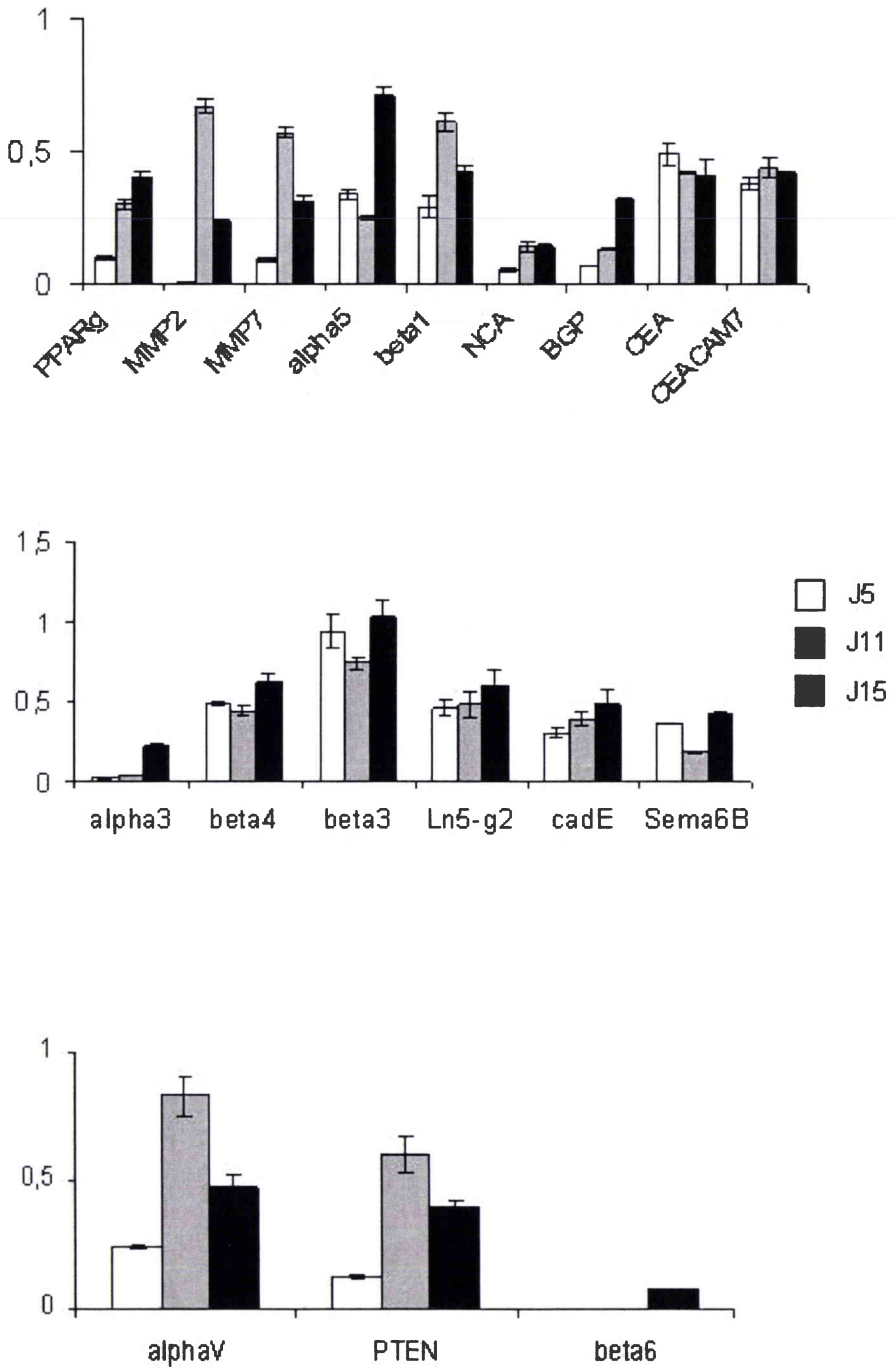


Figure 8: Quantifications des transcrits des différents gènes par RT-PCR semi-quantitative, au cours de la culture des cellules Caco-2 (J5, 5 jours; J11, 11 jours, J15, 15 jours).

Résultats: moyenne ± SD, n =3

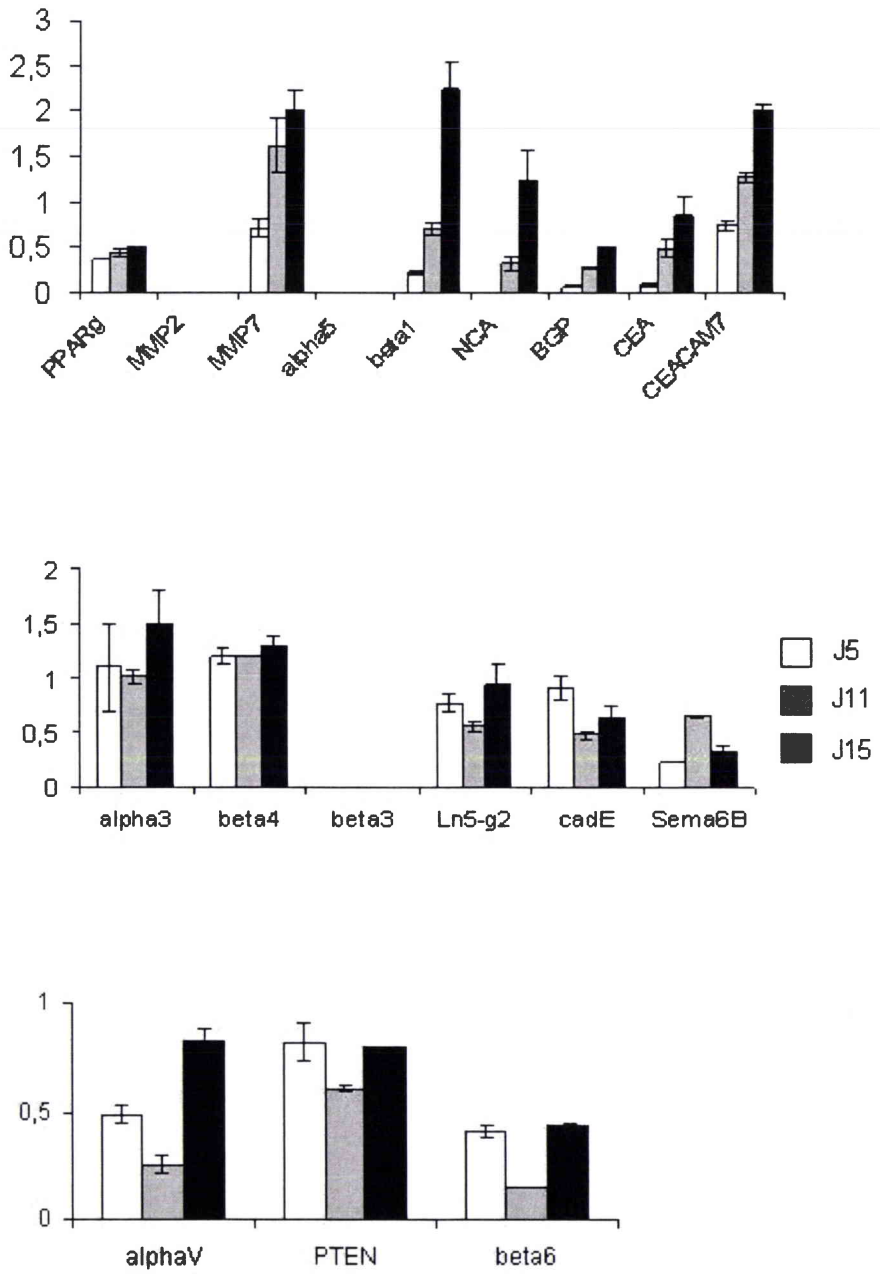


Figure 9: Quantification des transcrits des différents gènes par RT-PCR semi-quantitative, au cours de la culture des cellules HT29 MTX (J5, 5 jours; J11, 11 jours, J15, 15 jours).

Résultats: moyenne ± SD, n =3

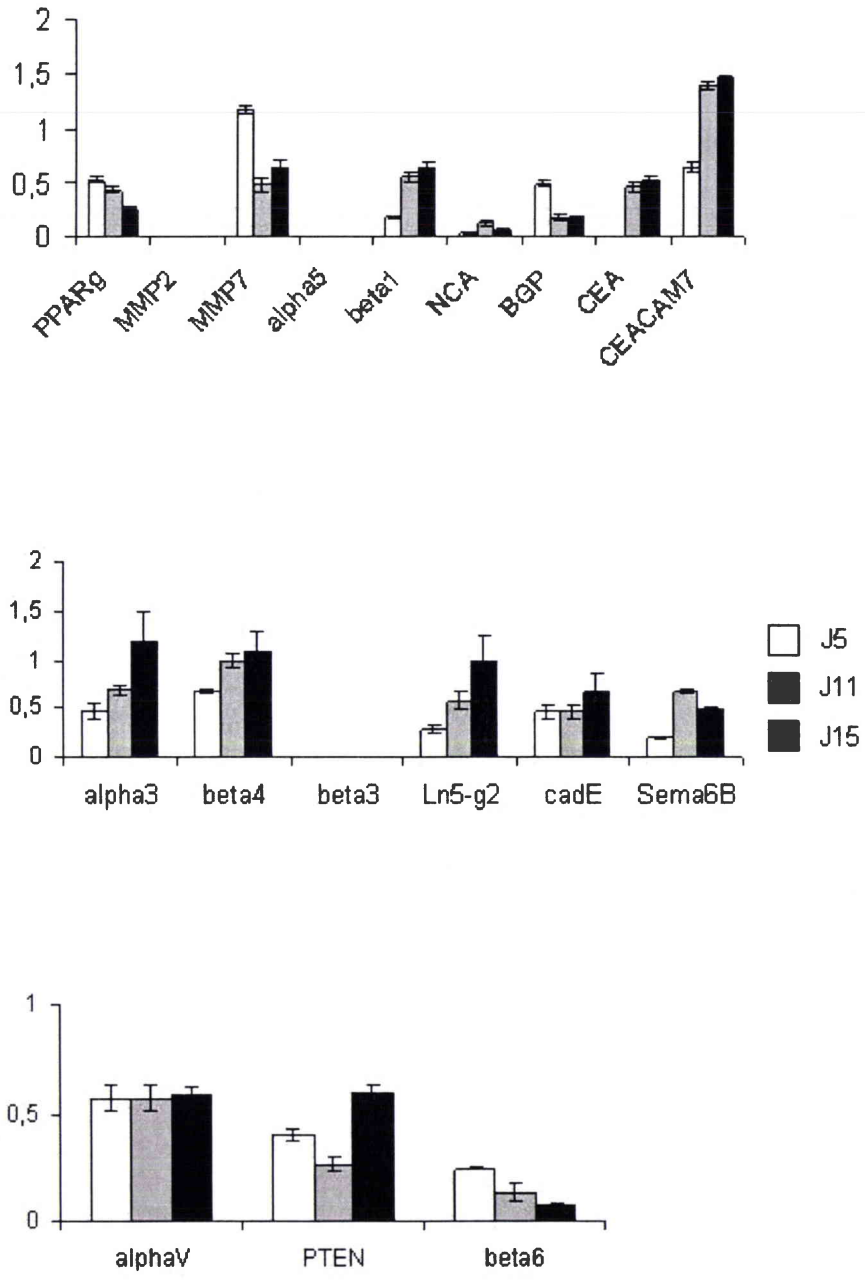


Figure 10: Quantification des transcrits des différents gènes par RT-PCR semi-quantitative, au cours de la culture des cellules HT29 (J5, 5 jours; J11, 11 jours, J15, 15 jours).

Résultats: moyenne ± SD, n =3

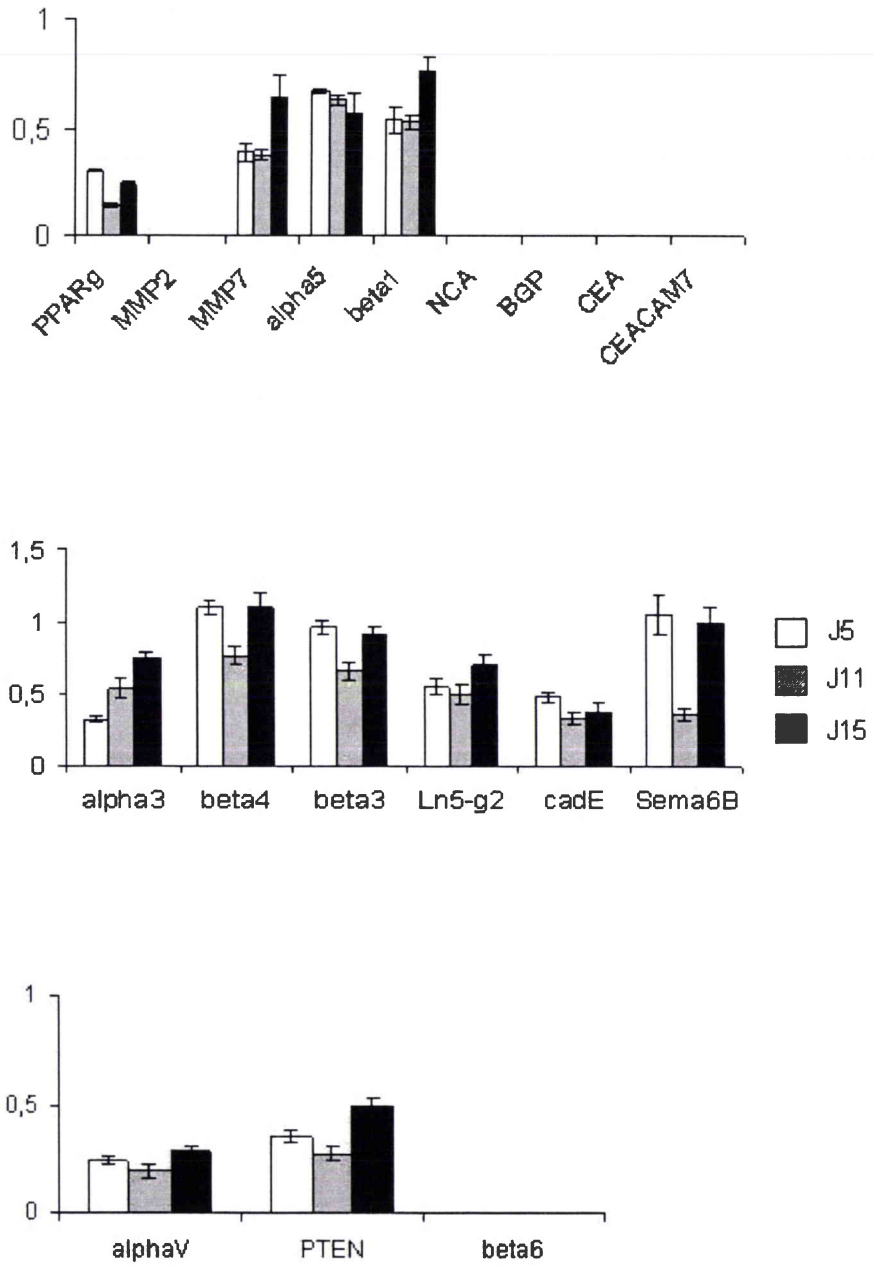


Figure 11: Quantification des transcrits des différents gènes par RT-PCR semi-quantitative, au cours de la culture des cellules HCT116 (J5, 5 jours; J11, 11 jours, J15, 15 jours).

Résultats: moyenne ± SD, n =3

Ainsi, l'expression de la MMP2 tend à augmenter dans les cellules Caco-2 traitées avec la pioglitazone seule ou associée à l'acide 9-*cis* rétinoïque et son expression est induite dans les cellules HCT116 (qui n'expriment pas la MMP2 au cours de la culture) par l'acide 9-*cis* rétinoïque (figure 16, page 44 sexies) seul ou associé à la pioglitazone (10 ou 50µM). Les lignées HT29 et HT29 MTX n'expriment pas cette enzyme, même sous l'influence de ces différents traitements. Dans les cellules HCT116, un traitement avec 1µM d'acide 9-*cis* rétinoïque associé à la pioglitazone induit une diminution du taux transcriptionnel de la MMP7 et de la sous unité β1 des intégrines (figures 17 et 12, pages 44 septies et bis, respectivement).
L'activation de PPARγ par la pioglitazone seule ou associée à l'acide 9-*cis* rétinoïque provoque une augmentation de l'expression de CEA dans les lignées HT29 et HT29 MTX (figure 13, page 44 ter), une diminution de l'expression de la sémaphorine 6B dans les 4 lignées (figure 18, page 44 octies). L'expression de PTEN, quant à elle, est augmentée dans toutes les lignées étudiées (figure 19, page 44 novies). Dans certains cas, les taux transcriptionnels varient différemment en réponse aux traitements selon les lignées. Ainsi, l'expression de CEACAM7 tend à diminuer dans les cellules Caco-2 et HT29 MTX (cellules différenciées), alors qu'elle tend à augmenter dans les cellules HT29 (figure 14, page 44 quater).
Ces résultats montrent toutefois que pour chaque gène considéré, la lignée Caco-2 répond de façon variable selon les doses de pioglitazone (exemple, NCA), ou selon le type de traitement (exemple, MMP7, NCA, CEA).

Les RT-PCR semi-quantitatives montrent donc un effet des agonistes de PPARγ et de RXR sur le taux transcriptionnel des gènes codant différentes protéines impliquées dans l'adhérence et dans la migration cellulaires. Toutefois, ***ces effets dépendent de la nature de la lignée cellulaire considérée et du traitement. Les variations des réponses entre lignées pourraient alors être dues aux caractéristiques de différenciation et de capacité migratoires différentes entre ces 5 types cellulaires.***

D'après l'ensemble de ces résultats préliminaires et la littérature, nous avons choisi de focaliser la suite des travaux sur la lignée HT29.

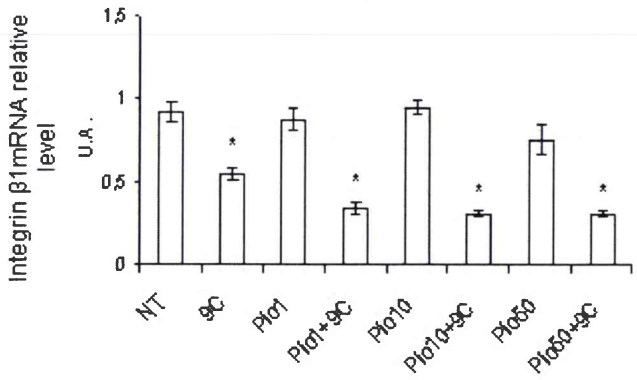


Figure 12: Quantification des transcrits de l'intégrine β1 par RT-PCR semi-quantitative dans les cellules HCT116 traitées 24 heures avec le véhicule (NT) ou avec 1µM d'acide 9-cis rétinoïque (9C) seul ou associé à 1, 10 ou 50µM de pioglitazone (Pio+9C), ou avec 1, 10 ou 50µM de pioglitazone seule (Pio). U.A: Unité Arbitraire

Résultats: moyenne ± SD, n = 3

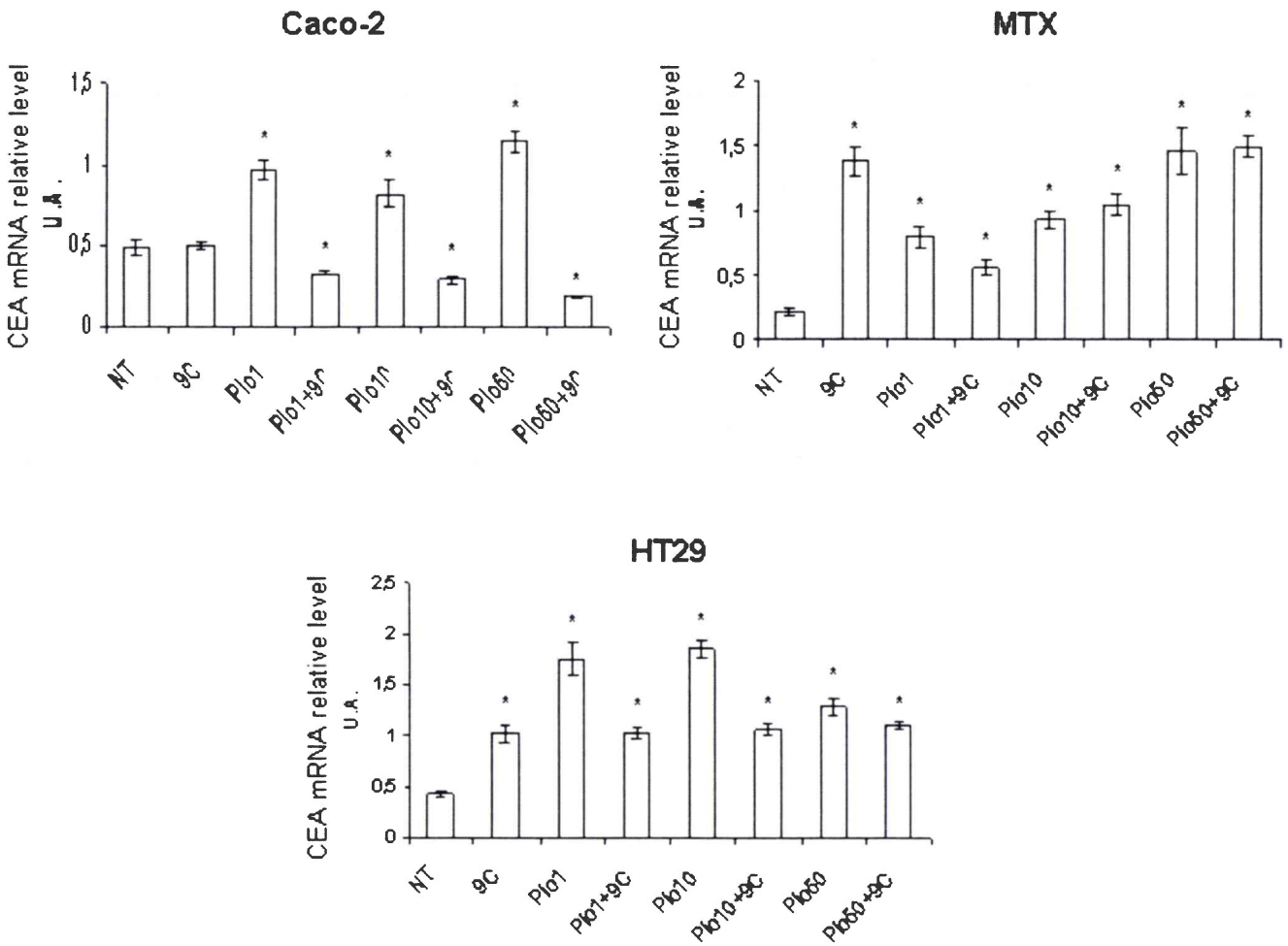


Figure 13: Quantification des transcrits de CEA par RT-PCR semi-quantitative. Les cellules ont été traitées 24 heures avec le véhicule (NT) ou avec 1 µM d'acide 9-cis rétinoïque (9C) seul ou associé à 1, 10 ou 50µM de pioglitazone (Pio+9C), ou avec 1, 10 ou 50µM de pioglitazone seule (Pio). U.A: Unité Arbitraire

Résultats: moyenne ± SD, n = 3

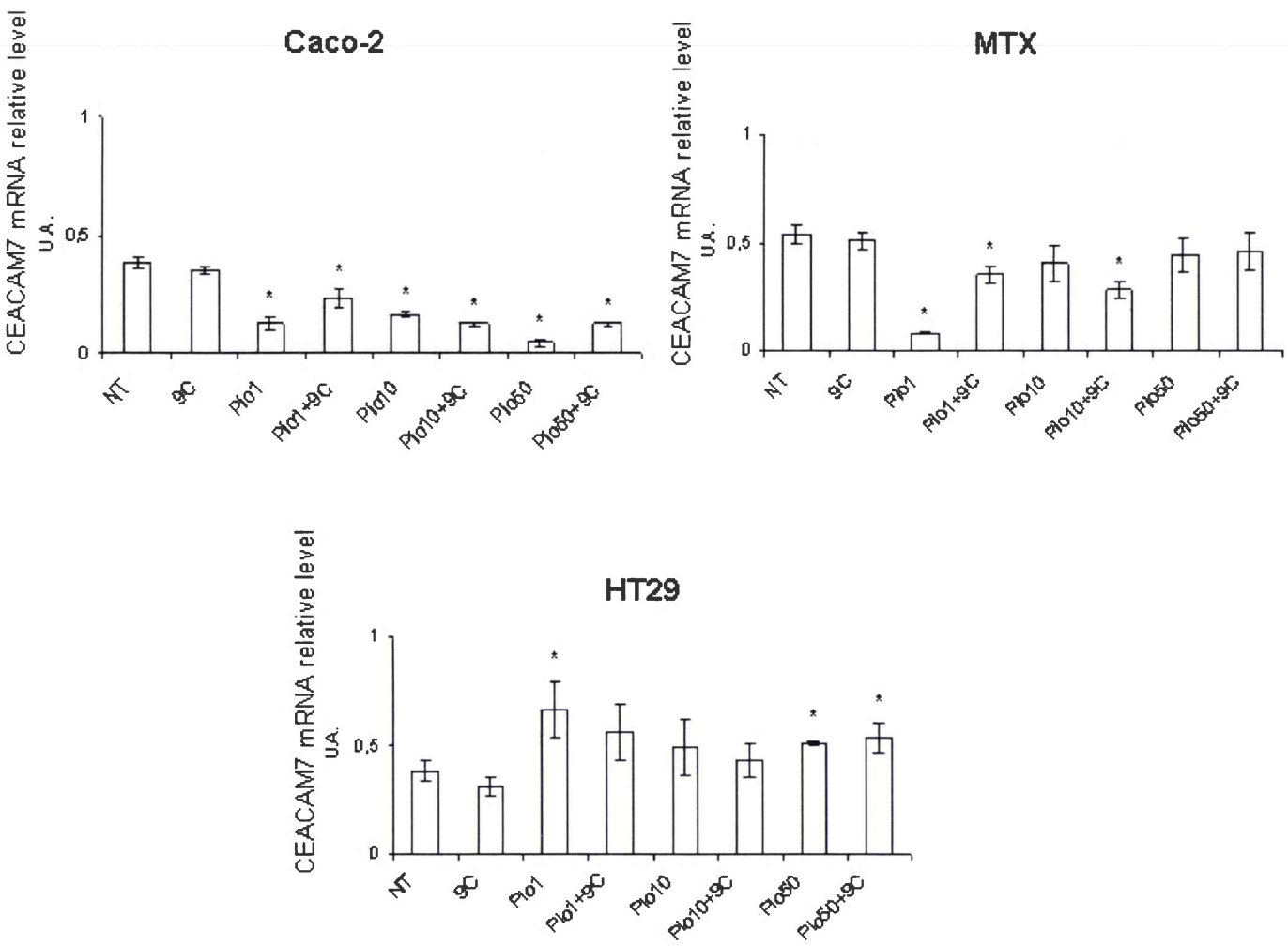


Figure 14: Quantification des transcrits de CEACAM7 par RT-PCR semi-quantitative. Les cellules ont été traitées 24 heures avec le véhicule (NT) ou avec 1µM d'acide 9-cis rétinoïque (9C) seul ou associé à 1, 10 ou 50µM de pioglitazone (Pio+9C), ou avec 1, 10 ou 50µM de pioglitazone seule (Pio). U.A: Unité Arbitraire

Résultats: moyenne ± SD, n = 3

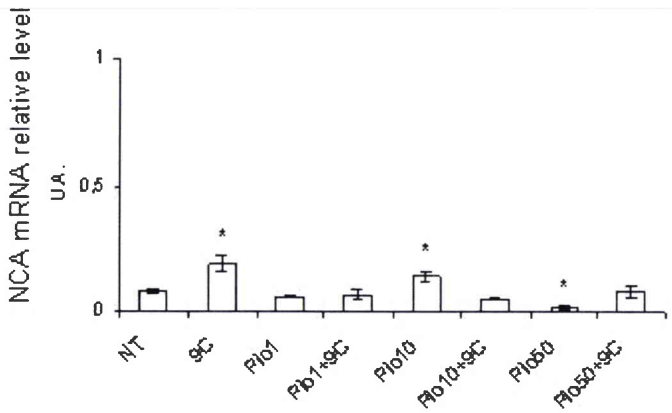


Figure 15: Quantification des transcrits de NCA par RT-PCR semi-quantitative dans les cellules Caco-2, traitées 24 heures avec le véhicule (NT) ou avec 1µM d'acide 9-cis rétinoïque (9C) seul ou associé à 1, 10 ou 50µM de pioglitazone (Pio+9C), ou avec 1, 10 ou 50µM de pioglitazone seule (Pio). U.A: Unité Arbitraire

Résultats: moyenne ± SD, n = 3

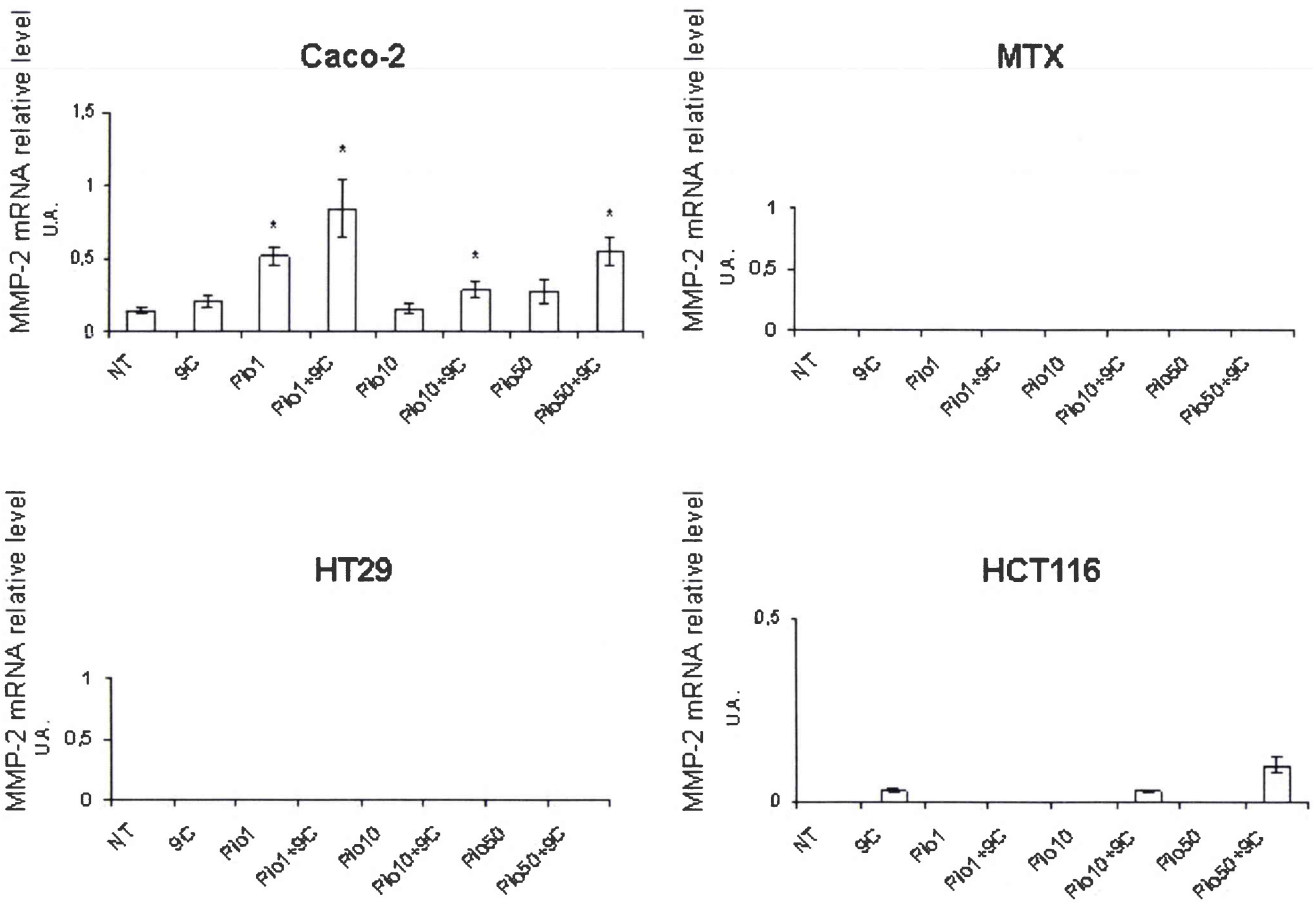


Figure 16: Quantification des transcrits de la MMP2 par RT-PCR semi-quantitative. Les cellules ont été traitées avec le véhicule (NT) ou avec 1µM d'acide 9-cis rétinoïque (9C) seul ou associé à 1, 10 ou 50µM de pioglitazone (Pio+9C), ou avec 1, 10 ou 50µM de pioglitazone seule (Pio). U.A: Unité Arbitraire

Résultats: moyenne ± SD, n = 3

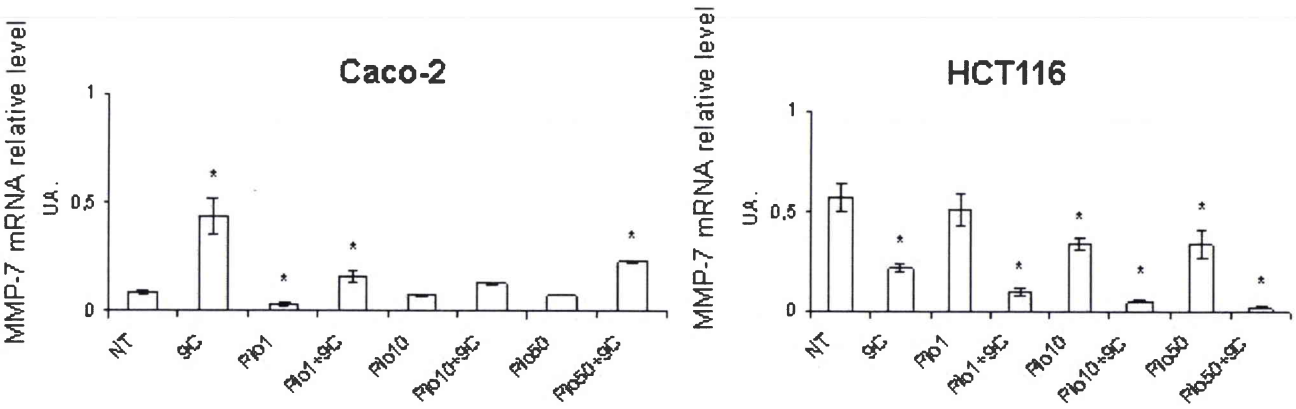


Figure 17: Quantification des transcrits de la MMP7 par RT-PCR semi-quantitative dans les cellules Caco-2 et HCT116 traitées 24 heures avec le véhicule (NT) ou avec 1µM d'acide 9-cis rétinoïque (9C) seul ou associé à 1, 10 ou 50µM de pioglitazone (Pio+9C), ou avec 1, 10 ou 50µM de pioglitazone seule (Pio). U.A: Unité Arbitraire

Résultats: moyenne ± SD, n = 3

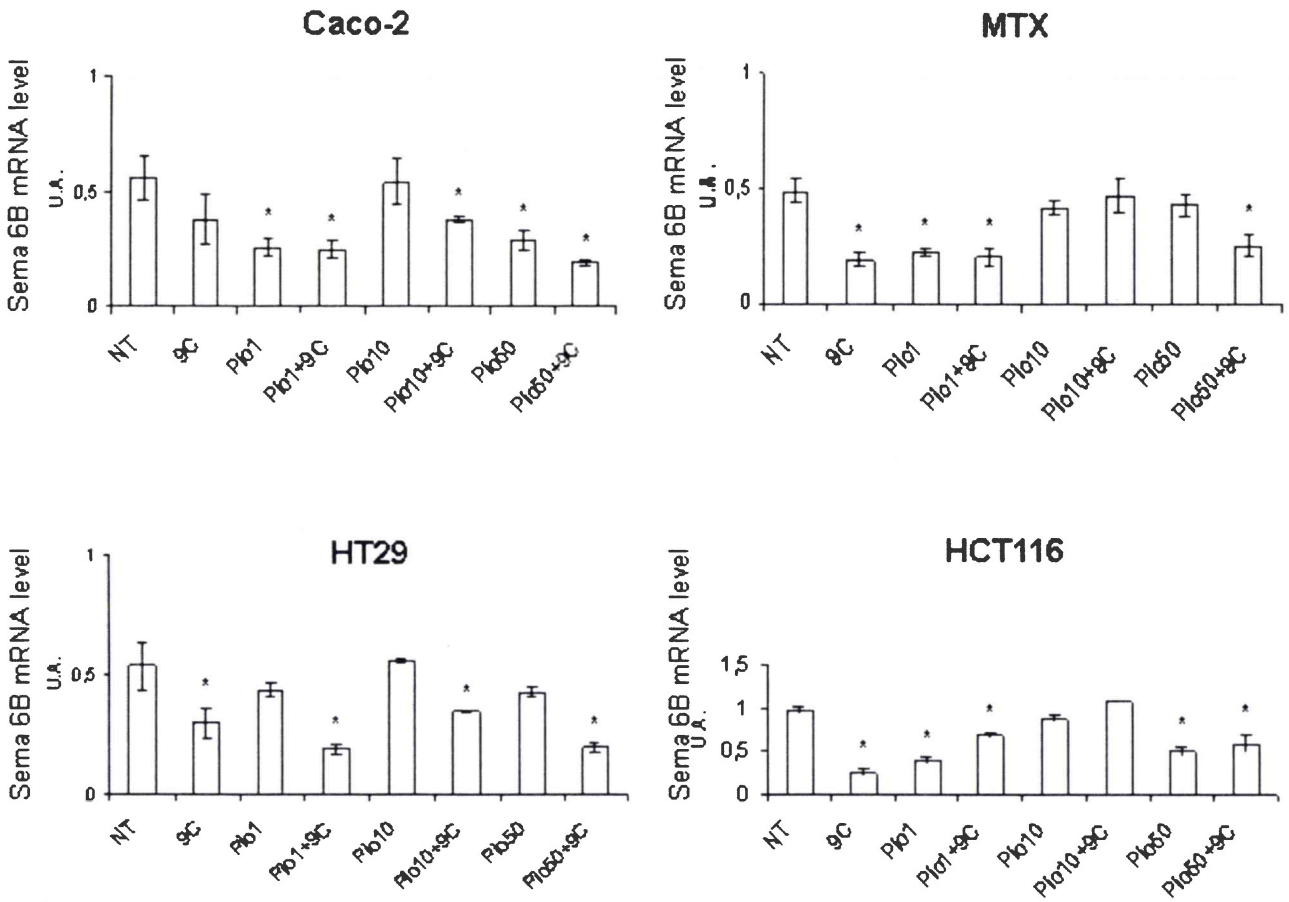


Figure 18: Quantification des transcrits de la sémaphorine 6B par RT-PCR semi-quantitative. Les cellules ont été traitées avec le véhicule (NT) ou avec 1µM d'acide 9-cis rétinoïque (9C) seul ou associé à 1, 10 ou 50µM de pioglitazone (Pio+9C), ou avec 1, 10 ou 50µM de pioglitazone seule (Pio). U.A: Unité Arbitraire

Résultats: moyenne ± SD, n = 3

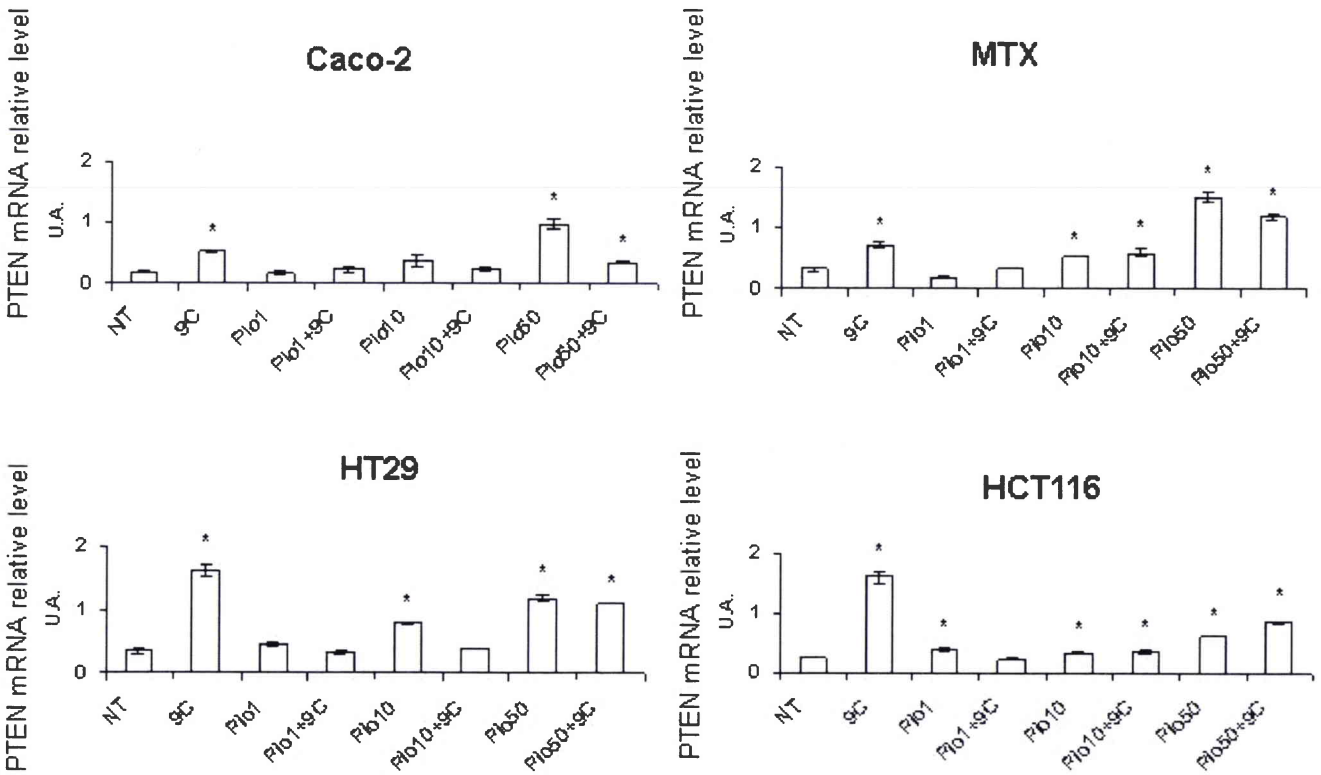


Figure 19: Quantification des transcrits de PTEN par RT-PCR semi-quantitative. Les cellules ont été traitées avec le véhicule (NT) ou avec 1µM d'acide 9-cis rétinoïque (9C) seul ou associé à 1, 10 ou 50µM de pioglitazone (Pio+9C), ou avec 1, 10 ou 50µM de pioglitazone seule (Pio). U.A: Unité Arbitraire

Résultats: moyenne ± SD, n = 3

3. IMPACT D'UN TRAITEMENT À COURT TERME PAR LES TZD SUR LES CELLULES HT29

a. Croissance des cellules

Les cellules HT29 ont été cultivées en conditions standard en présence de concentrations croissantes de pioglitazone ou de rosiglitazone pendant 1 à 5 jours (figure 20a, page 45 bis). Aucune inhibition de croissance n'a été observée après une exposition aux drogues de 24 heures. Aucune cytotoxicité n'a été démontrée dans les cellules traitées 24 ou 48 heures, quelle que soit la TZD utilisée (test MTT, résultats non présentés).

Après un traitement de 5 jours avec 50 µM de pioglitazone ou 10 µM de rosiglitazone, la croissance des cellules HT29 a été diminuée de l'ordre de 50% (figure20a, page 45 bis). Nous avons alors vérifié si les TZD affectent le processus apoptotique ou le déroulement du cycle cellulaire. Seulement 4% des cellules HT29 traitées se sont révélées positives pour l'annexine V, par comparaison avec les cellules non traitées (diluant DMSO). Concernant le cycle cellulaire, une augmentation de la proportion de cellules en phase S a été constatée (jusqu'à un facteur 3) en présence de 50 µM de pioglitazone ou de 10 µM de rosiglitazone, pendant 1 ou 2 jours (tableau 6, page 41 bis).

b. Impact d'un traitement à court terme par les TZD sur l'expression protéique dans les cellules HT29

De précédents travaux ont montré qu'une exposition de cellules aux TZD module l'expression de protéines liées aux interactions cellule-cellule et à la migration cellulaire, de façon PPARγ-dépendante ou indépendante (Sarraf *et coll*, 1998; Gupta *et coll*, 2001; Tan *et coll*, 2005).

Dans un premier temps, le niveau d'expression d'intégrines (α2β1, α3-, α5-, αV-, β1-, β3, β4 et β6-) à la surface des cellules HT29 a été mesuré par cytométrie de flux. Dans les cellules cultivées en conditions standards, des RT-PCR semi-quantitatives ont montré l'absence de transcrits correspondants aux intégrines α5- et β3-, quel que soit le temps de culture. L'exposition des cellules aux TZD pendant 1 à 5 jours n'a pas modifié l'expression des intégrines à la surface cellulaire (figures 21a et b, page 45 ter). Par contre, les expériences de RT-PCR semi-quantitatives ont montré qu'un traitement de 5 jours avec chaque TZD induit une augmentation du taux de transcrits des intégrines, avec un effet spécifique à chaque TZD. Ainsi, le taux de transcrits de l'intégrine α3 augmente peu, contrairement à l'intégrine β1, dont l'expression varie jusqu'à un facteur 4, quelle que soit la TZD utilisée (figures 21c et 22b, pages 45 ter et quater). Par contre, les intégrines αV, β4 et β6 ont un taux de transcrits plus élevé uniquement en présence de rosiglitazone (figure 21c, page 45 ter).

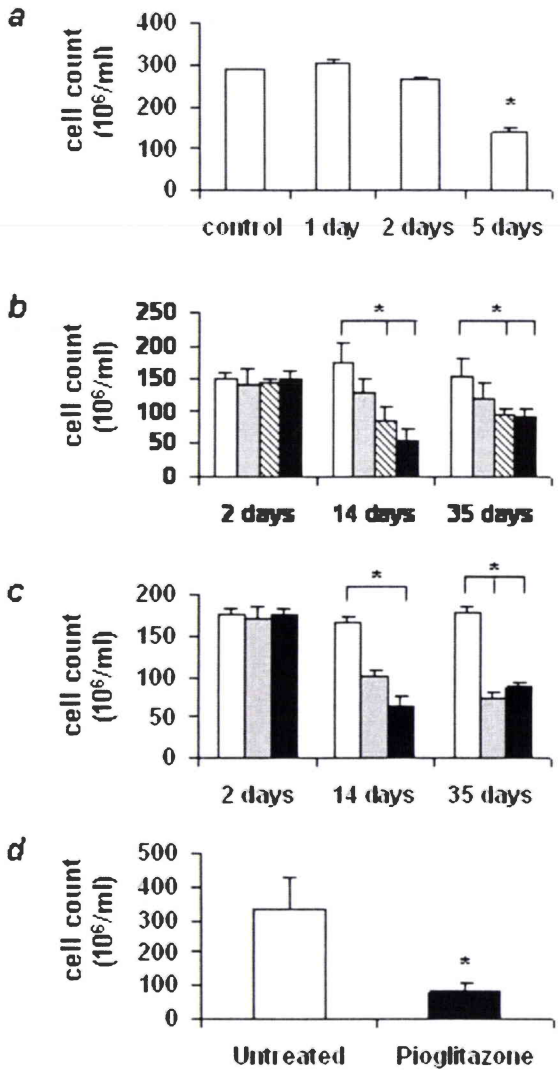


Figure 20: Impact des TZD sur la croissance des cellules HT29. *a.* Les cellules HT29 ont été traitées pendant 1 à 5 jours avec 50 µM de pioglitazone. Les cellules ont ensuite été comptées en présence de bleu de Trypan. *b.* Les cellules HT29 ont été exposées à des concentrations croissantes de pioglitazone (contrôle (barres blanches), 10 µM (barres grises), 25 µM (barres rayées) et 50 µM (barres noires) de pioglitazone) pendant 2, 14 et 35 jours. La viabilité cellulaire a été estimée comme en *a*. *c.* Les cellules HT29 ont été traitées avec des concentrations croissantes de rosiglitazone pendant 2, 14 et 35 jours (contrôle (barres blanches), 1 µM (barres grises) et 10 µM (barres noires) de rosiglitazone). La viabilité cellulaire a été estimée comme en *a*. *d.* Après 21 jours de traitement avec la pioglitazone, les cellules HT29 ont été cultivées en absence (*"untreated"*) ou en présence de pioglitazone pendant 7 jours puis comptées. (* $P<0.05$ par comparaison avec les cellules contrôle (DMSO), n = 3)

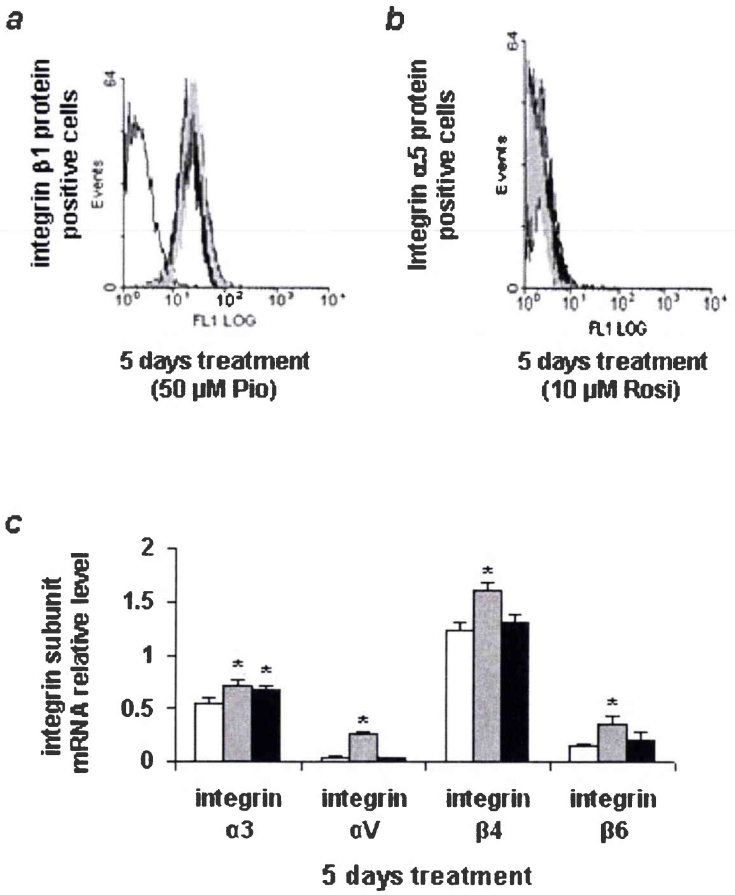


Figure 21: Expression des intégrines β1- (*a*) et α5 (*b*) analysée par FACS après 5 jours de traitement par les TZD (50 µM pioglitazone pour l'intégrine β1; 10 µM rosiglitazone pour l'intégrine α5.Résultats typiques de 3 expériences. *c*. Quantifications des transcrits des intégrines α3, αV, β4 et β6 par RT-PCR dans les cellules HT29 exposées au véhicule (DMSO, barres blanches), à 10 µM (barres grises) de rosiglitazone ou à 50µM (barres noires) de pioglitazone pendant 5 jours. La quantification est décrite dans la section *Matériel et méthodes*. (* $P<0.05$ par comparaison avec les cellules traitées avec le véhicule; n=3).

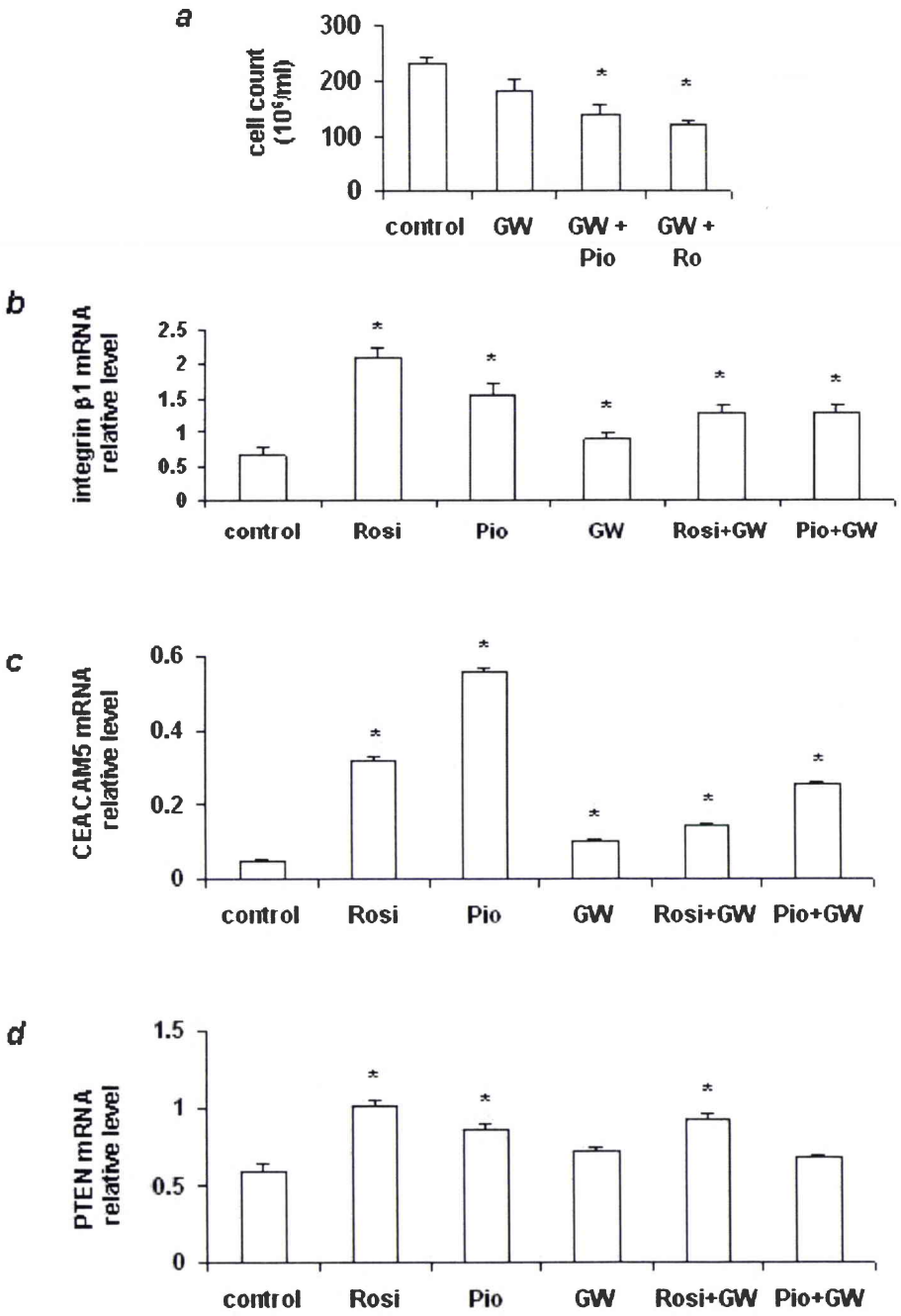


Figure 22: *a.* Impact du GW 9662 (10 µM, GW) et/ou des TZD (Rosi, 10 µM rosiglitazone; Pio, 50 µM pioglitazone) sur la croissance des cellules HT29. Les cellules ont été traitées pendant 5 jours puis comptées en présence de bleu de Trypan. *b – d:* Quantification par RT-PCR des transcrits de l'intégrine $\beta 1$ (*b*), de CEACAM5 (*c*) et de PTEN (*d*) dans les cellules HT29 exposées aux TZD (10 µM rosiglitazone (Rosi) ou 50 µM pioglitazone (Pio) et/ou GW9662 (10 µM, GW) pendant 5 jours. La quantification est décrite dans la section *Matériel et méthodes* . (* $P<0.05$ par comparaison aux cellules traitées avec le véhicule, $n = 3$)

L'activité des gélatinases A et B joue un rôle important dans les processus migratoires. Ces activités ont été évaluées par zymographie, après un traitement de 24 heures par les TZD (tableau 7, page 46 quinquies). Les cellules HT29 ont été traitées avec chaque TZD seule ou associée à 1 µM d'acide 9-cis rétinoïque. Les résultats montrent que seule la rosiglitazone modifie l'activité de la MMP2, associée ou non à l'acide 9-cis rétinoïque. Ce dernier traitement seul induit le même effet que la rosiglitazone. Au contraire, l'activité de la MMP9 est modifiée principalement par la pioglitazone, la rosiglitazone ayant peu d'effet. Dans tous les cas, les précurseurs des MMP étaient faiblement détectables.

Enfin, le taux protéique de PPARγ a été étudié par immunoréplique à partir d'homogénats cellulaires obtenus après traitement par les TZD pendant 2 ou 5 jours. Aucune modification majeure n'a été observée durant ces temps de traitement (figure 23a et b, page 46 bis).

c. Les effets dus à l'activation de PPARγ sont abolis par le GW9662

Le GW9662 est un antagoniste de PPARγ et son utilisation permet de vérifier si les effets des TZD observés sont dépendants de PPARγ. Des travaux ont déjà montré que l'expression de la cadhérine E (Bocca *et coll*, 2007), CEACAM5 (Gupta *et coll*, 2001), sémaphorine 6B (Collet *et coll*, 2004) et PTEN (Teresi *et coll*, 2006) sont modifiés lors du traitement de cellules tumorales par des agonistes ou des antagonistes de PPARγ. Ces marqueurs ont donc été utilisés afin de vérifier une action des TZD PPARγ-dépendante. Pour cela, les cellules HT29 ont été cultivées avec les TZD et/ou le GW9662 pendant 5 jours (figure 22, page 45 quater). Le GW9662 seul n'a pas d'effet sur la croissance des cellules HT29 (figure 22a, page 45 quater). A la concentration employée, le GW9662 annule en partie l'impact des TZD puisqu'une diminution de l'ordre de 30% de la croissance cellulaire est constatée lorsque les TZD sont associées au GW9662, au lieu des 50% obtenus précédemment (TZD seules). Dans ces conditions aucune modification de l'expression des intégrines à la surface cellulaire n'a été remarquée (résultats non présentés). Toutefois, le taux de transcrits de l'intégrine β1 augmenté jusqu'à 4 fois avec la rosiglitazone, est modifié en présence de l'antagoniste (figure 22b, page 45 quater).

L'effet du GW9662 au niveau transcriptionnel a été recherché, notamment concernant CEACAM5, PTEN, la cadhérine E et la sémaphorine 6B, sachant que CEACAM5 est décrit comme étant un gène cible de PPARγ (Gupta *et coll*, 2001). La figure 22c (page 45 quater) montre que le taux de transcrits de CEACAM5 est augmenté en présence des TZD, tandis que l'addition de l'antagoniste dans le milieu de culture réduit ce taux. Le taux transcriptionnel de PTEN est plus élevé en présence des 2 TZD pendant 5 jours (figure 22d, page 45 ter),

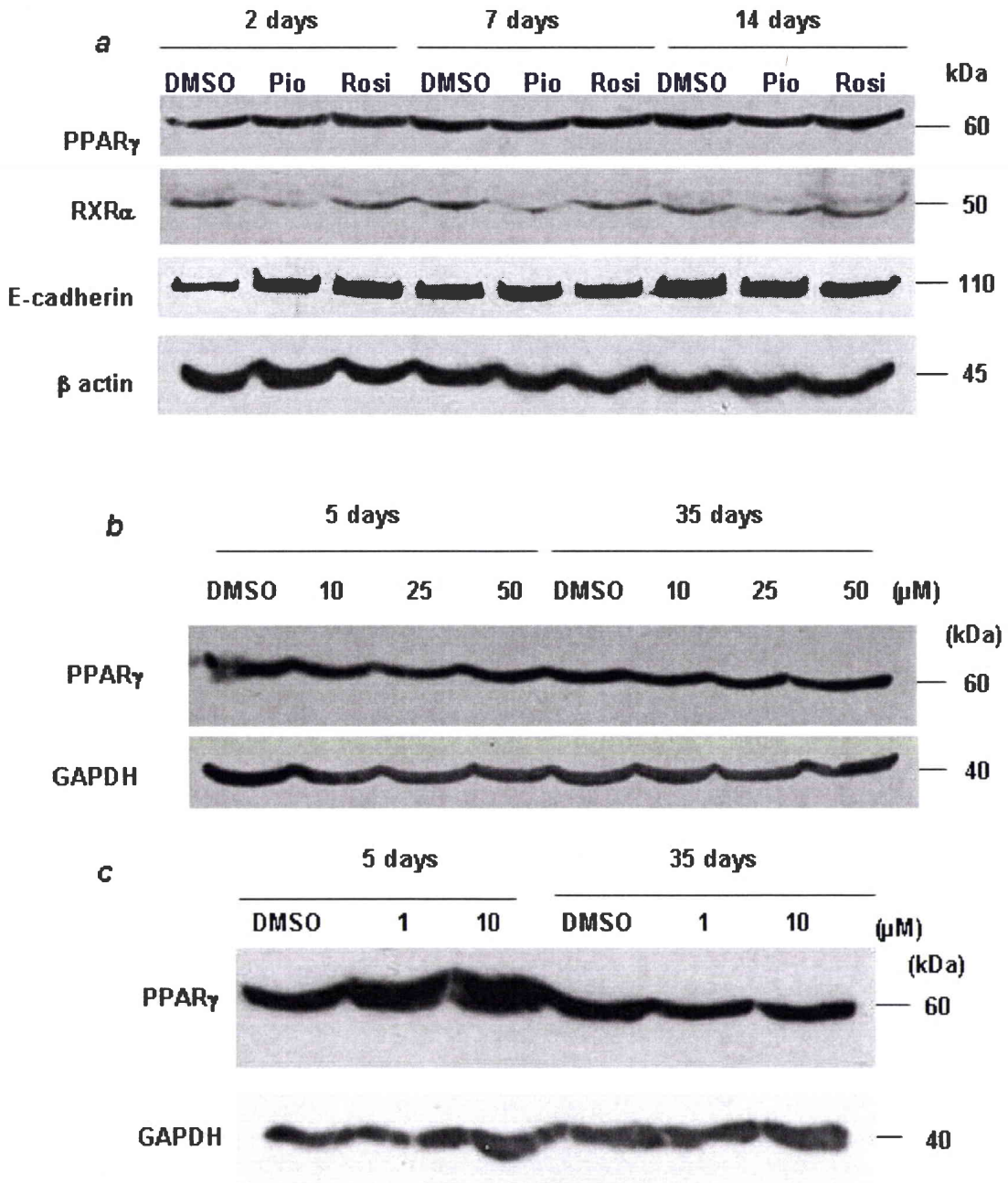


Figure 23: Immunorépliques réalisées à partir de protéines de cellules HT29 traitées par les TZD. *a.* Les cellules ont été traitées pendant des temps croissants avec une concentration constante d'agoniste (Pio, 50 μM pioglitazone; Rosi, 10 μM Rosiglitazone). *b et c.* Les cellules HT29 ont été cultivées en présence de concentrations croissantes de pioglitazone (*b*) ou de rosiglitazone (*c*) pendant 5 et 35 jours. Dans chaque expérience, 50 μg de protéines cellulaires totales ont été utilisés.

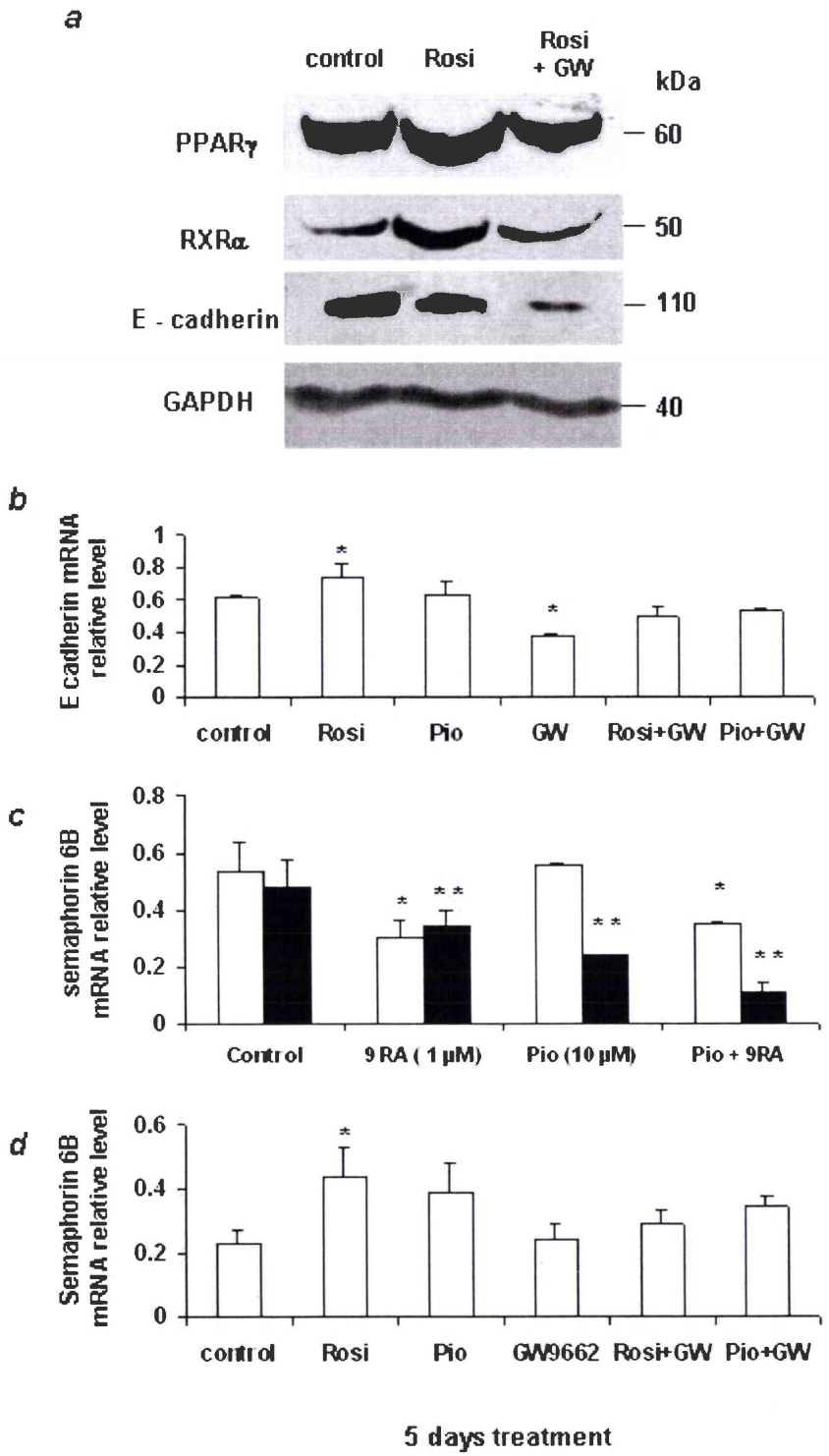


Figure 24: *a.* Immunorépliques réalisées à partir de protéines totales de cellules HT29 traitées avec 10 µM de rosiglitazone (Rosi) et 10 µM de GW9662 (GW) pendant 5 jours (résultats typiques). *b.* Quantification des transcrits de la cadhérine E par RT-PCR dans les cellules HT29 cells exposées aux TZD (Rosi, 10 µM rosiglitazone; Pio, 50µM pioglitazone) et/ou au GW9662 (GW, 10 µM) pendant 5 jours. *c.* Quantification des transcrits de la sémaphorine 6B par RT-PCR dans les cellules HT29 exposées à 10 µM de pioglitazone (Pio) et/ou 1 µM d'acide 9-cis rétinoïque (9RA) pendant un (barres blanches) ou 5 jours (barres noires) et (*d.*) exposées aux TZD (Rosi, 10 µM rosiglitazone; Pio, 50µM pioglitazone) et/ou GW9662 (GW, 10 µM) pendant 5 jours. (en *b-d*, * et ** P<0.05 par comparaison avec les cellules cultivées avec le véhicule, n = 3).

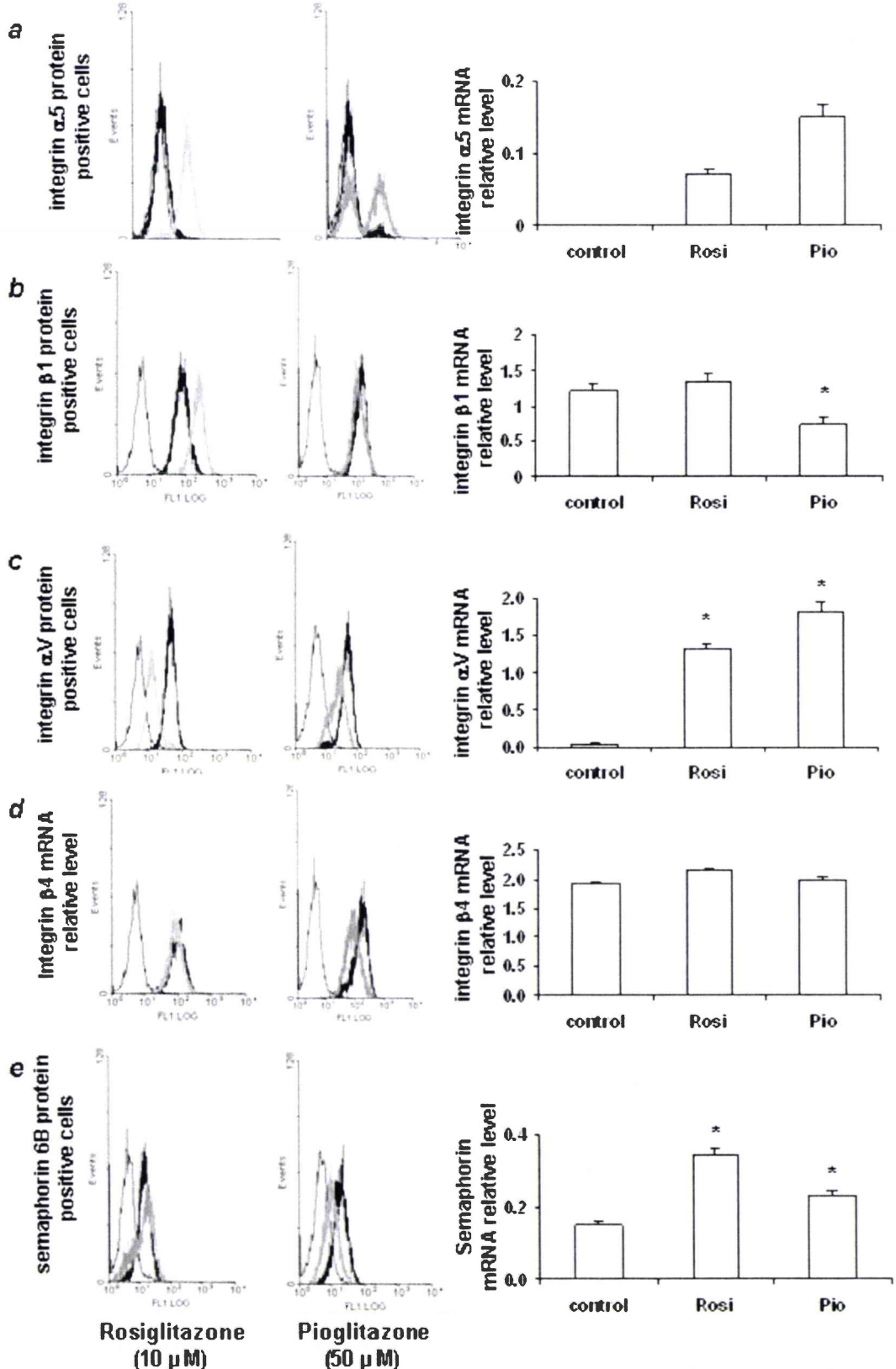


Figure 25: Expression des intégrines α5 (*a.*), β1 (*b.*), αV (*c.*), β4 (*d.*) et de la sémaphorine 6B (*e.*) analysée par FACS après 35 jours d'exposition à 10 µM de rosiglitazone (gauche) ou 50 µM de pioglitazone (milieu);résultats typiques de 3 expériences. Quantification des transcrits de chaque marqueur par RT-PCR (droite) (* P<0.05 par comparaison avec les cellules traitées avec le véhicule, n = 3).

Tableau 7 : Activité gélatinase des MMP2 et -9 dans le supernageant de cellules HT29 traitées avec les TZD

	contrôle	9-cisRA (1 µM)	Pioglitazone (50 µM)	Pioglitazone + 9cisRA (1µM)	Rosiglitazone (10 µM)	Rosiglitazone + 9cisRA (1 µM)
MMP2	+	++	+	+	++	++
MMP9	+	+	+++	+++	++	++

Résultats: visualisation de la zone de lyse (+) faible, (++) modérée or (+++) élevée

Tableau 8: Expression des protéines à la surface cellulaire par FACS (exprimée en pourcentage de cellules marquées*) après un traitement des cellules HT29 avec les TZD associées ou non au GW9662, pendant 5 jours

	Contrôle	GW9662 (10 µM)	Pioglitazone (50 µM)	Rosiglitazone (10 µM)	Pioglitazone + GW9662	Rosiglitazone + GW9662
Sémaphorine-6B	61.3	91.9	21.0	35.0	77.3	80.0
Intégrine β1	100	99.4	99.0	100	99.8	99.8

*Résultats typiques

Tableau 9: Expression des protéines à la surface cellulaire par FACS (exprimée en pourcentage de cellules marquées*) après un traitement chronique des cellules HT29 avec des TZD (35 jours)

	Contrôle	Pioglitazone (50 µM)	Rosiglitazone (10 µM)
Intégrine α5	2.1	55.0	37.0
Intégrine αV	96.2	71.7	81.6
intégrine β1	100	99.8	100
Sémaphorine-6B	56.0	18.5	58.0
Cadhérine - E	99.2	85.2	94.0

*Résultats de la figure 6, excepté pour la cadhérine-E

conformément à d'autres travaux (Teresi *et coll*, 2006). Dans ce cas, l'ajout de l'antagoniste n'a que peu d'effet sur la transcription de PTEN. Tout comme une autre équipe (Bocca *et coll*, 2007), nous avons également démontré que le taux protéique de la cadhérine E est diminué de 5 fois environ en présence de rosiglitazone et de GW9662 (figure 24a, page 46 ter). Le traitement avec antagoniste seul a cependant un effet répresseur plus prononcé sur la transcription de la cadhérine E (figure 24b, page 46 ter).

L'immunoréplique a également permis de montrer une augmentation du taux protéique de RXRα lorsque les cellules sont cultivées en présence de rosiglitazone (figure 24a, page 46 ter). Cet effet activateur est aboli par l'antagoniste GW9662. Récemment, des travaux menés au laboratoire dirigé par le Pr M.Dauça avaient montré que l'expression de la sémaphorine 6B est réduite dans la lignée de carcinome mammaire MCF-7 *via* l'activation de PPARγ par la troglitazone et l'acide 9-cis rétinoïque (Murad *et coll*, 2006). Le même effet est obtenu dans les cellules HT29 traitées 5 jours avec 10 µM de pioglitazone associé à l'acide 9-cis rétinoïque (figure 24c, page 46 ter). Toutefois, lorsque les cellules HT29 sont cultivées en présence de concentrations plus importantes de TZD (50 µM de pioglitazone ou 10 µM de rosiglitazone), le taux de transcrits de sémaphorine 6B augmente (figure 24d, page 46 ter), alors que son expression protéique à la surface des cellules est fortement diminuée (tableau 8, page 46 quinquies). Au contraire, le GW9662 seul ou combiné aux TZD réduit le taux de transcrits de la sémaphorine 6B tandis que l'expression protéique de surface est accrue (tableau 8, page 46 quinquies). Ces travaux complètent les résultats obtenus dans la lignée de carcinome mammaire MCF-7 (Murad *et coll*, 2006) démontrant que l'activation de PPARγ décroît la transcription de la sémaphorine 6B.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats indique qu'***une exposition aux TZD module l'expression de différentes protéines impliquées dans l'adhérence et la migration cellulaires***. Ces effets semblent être dus en partie à un mécanisme PPARγ-dépendant, comme pour la cadhérine E, la sémaphorine 6B et plusieurs intégrines, même si l'impact du traitement par les TZD n'a été observé qu'au niveau transcriptionnel. Par ailleurs, la rosiglitazone et la pioglitazone n'influencent pas de la même manière la transcription des marqueurs étudiés. A titre d'exemple, la pioglitazone augmente de 10 fois le taux de transcrits de CEACAM5 (figure 22c, page 45 quater), tandis que la rosiglitazone a un impact moindre sur ces mêmes transcrits.

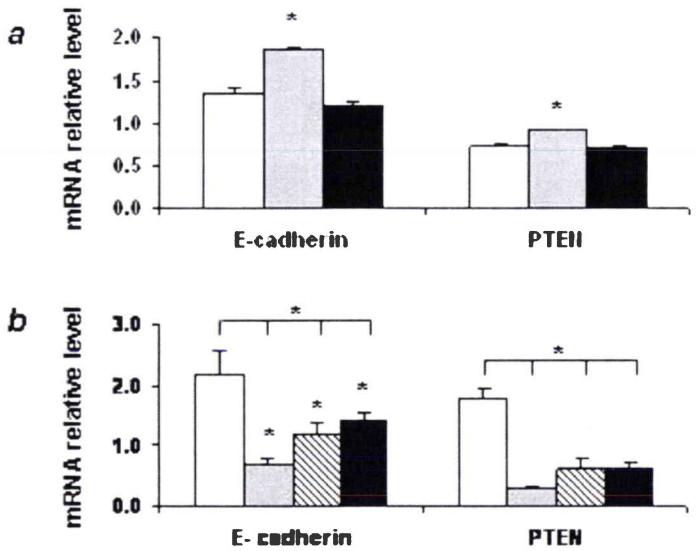


Figure 26: *a.* Quantification des transcrits de la cadhérine E et de PTEN par RT-PCR dans les cellules HT29 exposées au véhicule (barres blanches), à 1 µM (barres grises) ou à 10 µM (barres noires) de rosiglitazone pendant 5 semaines. *b.* Quantification des transcrits de ces mêmes marqueurs par RT-PCR dans les cellules HT29 exposées au véhicule (barres blanches), à 10 µM (barres grises), à 25 µM (barres rayées) ou à 50 µM (barres noires) de pioglitazone pendant 5 semaines. (* $P<0.05$ par comparaison avec les cellules cultivées en présence du véhicule; n=3)

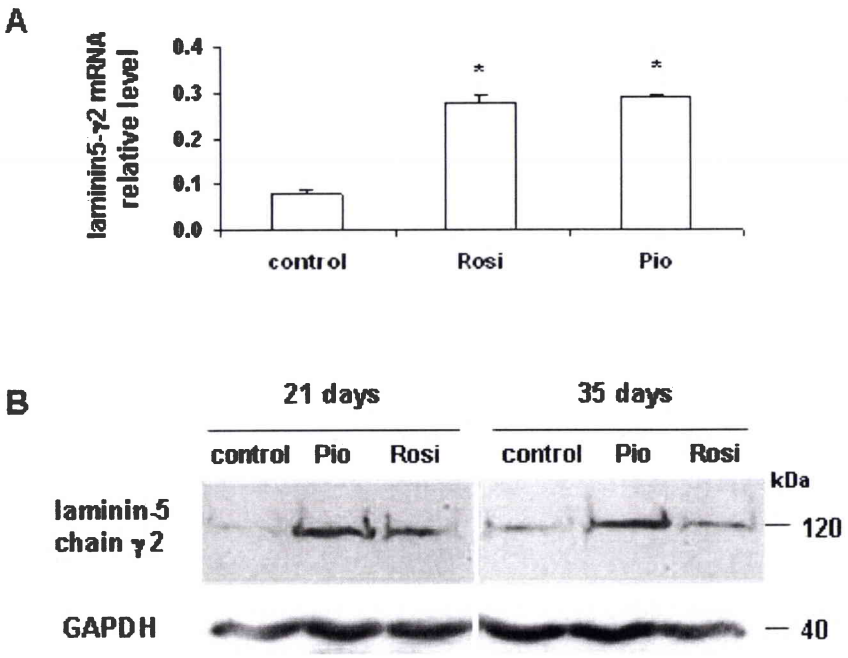
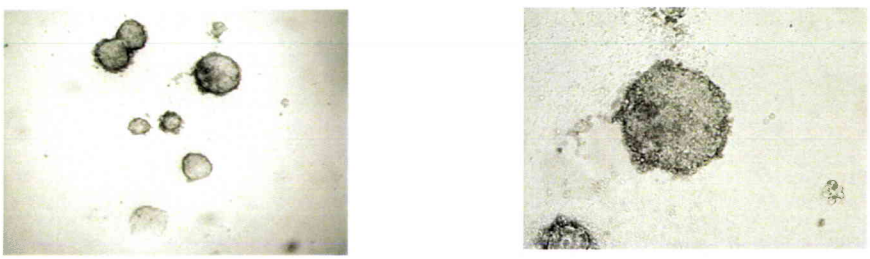
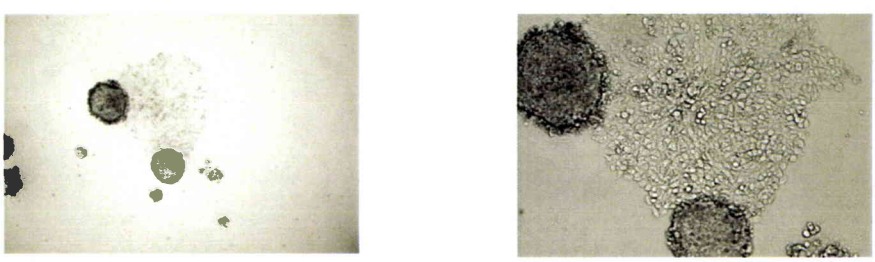


Figure 27: A. Quantification des transcrits de la chaîne γ2 de la laminine 5 par RT-PCR dans les cellules HT29 traitées avec 10 µM de rosiglitazone ou 50µM de pioglitazone. B. Immunoréplique réalisée à partir de protéines totales de cellules HT29 traitées avec les TZD (10 µM rosiglitazone ou 50 µM pioglitazone) pendant 21 et 35 jours. 50 µg de protéines totales ont été utilisées. (résultats typiques). (* $P<0.05$ par comparaison avec les cellules cultivées en présence du véhicule, $n = 3$)

a



b



Rosiglitazone 10 µM **Pioglitazone 50 µM**

Figure 28: Morphologie des cellules HT29 traitées avec 10 µM de rosiglitazone ou 50 µM de pioglitazone, pendant 4 semaines (a) ou 5 à 10 semaines (b) (images obtenues en microscopie optique à phase inversée- à gauche, G : x10; à droite, G : x40.

4. IMPACT D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE DE TZD SUR LES CELLULES HT29

a. Croissance des cellules

Les cellules HT29 ont dans ce cas été traitées quotidiennement avec la pioglitazone ou la rosiglitazone, jusqu'à 5 semaines. Des comptages cellulaires réalisés chaque semaine ont montré que les TZD inhibent la croissance des cellules HT29 mais ne l'abolissent pas (figure 20b et c, page 45 bis). 40 à 50% d'inhibition sont constatées quelles que soient la drogue et la durée du traitement. Cet impact est dose-dépendant et est plus prononcé pour la pioglitazone que pour la rosiglitazone. Cet effet inhibiteur des TZD sur la croissance cellulaire est réversible (figure 20d, page 45 bis).

b. Impact d'un traitement chronique sur l'expression protéique

L'exposition chronique aux TZD induit une modification de l'expression des intégrines. Ainsi, l'expression de l'intégrine α5 est induite lorsque les cellules HT29 sont traitées avec 50 μM de pioglitazone ou 10 μM de rosiglitazone (figure 25a, page 46 quater). Le taux protéique à la surface cellulaire et le taux de transcrits de l'intégrine α5 sont plus élevés en présence de pioglitazone, par rapport à la rosiglitazone (figure 25a, page 46 quater et tableau 9, page 46 quinquies). D'autres effets spécifiques à chaque TZD ont été observés, comme une augmentation de l'expression de l'intégrine β1 à la surface cellulaire suite à une exposition à la rosiglitazone, alors que la pioglitazone ne modifie pas le statut protéique de cette intégrine (figure 25b, page 46 quater). De plus, aucune variation du taux de transcrit de cette intégrine n'est observée en présence de rosiglitazone alors que la pioglitazone réduit ce taux. L'expression protéique de l'intégrine αV est diminuée lorsque les cellules HT29 sont traitées avec la rosiglitazone, mais pas avec la pioglitazone (figure 25c, page 46 quater). Les taux de transcrits de cette intégrine sont fortement augmentés quelle que soit la TZD utilisée. Concernant les intégrines β4, α2β1 et β6, les TZD ne semblent influencer que modérément leur taux de transcrits (figure 25d, page 46 quater).

Un traitement chronique avec la pioglitazone réduit également le taux protéique de la sémaphorine 6B et le niveau transcriptionnel de PTEN et de la cadhérine E (figures 25e, page 46 quater et 26, page 47 bis). Aucune modification majeure de l'expression protéique de PPARγ n'a été constatée (figure 23b et c, page 46 bis). Parallèlement, nous avons étudié l'expression de la chaîne γ2 de la laminine 5, associée à une capacité invasive élevée des cellules de carcinome colique (Lenander *et coll*, 2003). La figure 27 (page 47 ter) montre que l'expression de cette molécule est augmentée dans les cellules traitées avec les TZD.

L'ensemble de ces résultats indique qu'une exposition des cellules HT29 aux TZD conduit à une modification de l'expression de leurs protéines d'adhérence. Cette modification du patron d'expression des molécules de surface est également reflétée par une modification de la morphologie des cellules. En effet, les cellules HT29 traitées 4 semaines avec les TZD ne s'organisent plus en tapis mais en structures sphériques ou clusters (figure 28a, page 47 quater). Ensuite, si le traitement est encore prolongé (6 à 10 semaines), les cellules s'étalent à nouveau mais acquièrent une morphologie fibroblastique (figure 28b, page 47 quater).

c. Tests d'adhérence et de migration

Etant donné que les cellules traitées de façon chronique ont subi des modifications de l'expression de molécules d'adhérence, leurs capacités d'adhérence et de migration ont été testées (figure 29a-c, page 49 bis). Des travaux ont précédemment montré que les cellules HT29 non traitées ont une faible capacité migratoire *in vitro*, mais que cette migration est induite sur laminine-1 après un traitement par des esters de phorbol (Rigot *et coll*, 1998). Cette migration implique les intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 3\beta 1$. Les résultats obtenus montrent que les cellules HT29 traitées avec les TZD ont des propriétés d'adhérence différentes : ainsi, les cellules traitées sont moins adhérentes sur fibronectine que les cellules non traitées (figure 29b, page 49 bis). Les cellules cultivées en présence de pioglitazone adhèrent plus à la laminine-1 que les cellules traitées avec la rosiglitazone (figure 29a, page 49 bis). Les cellules traitées avec la pioglitazone ont une capacité migratoire supérieure à celle des cellules traitées avec la rosiglitazone (figure 29c, page 49 bis). ***Ces résultats suggèrent que la pioglitazone et la rosiglitazone ont un effet opposé sur l'adhérence et la migration des cellules HT29.***

5. Effet du fénofibrate sur les cellules HT29

L'activation de PPARγ modifie la transcription de gènes codant des protéines impliquées dans l'adhérence et la migration cellulaires. Les données concernant l'effet de l'activation des autres isotypes de PPAR sont encore rares. De ce fait, nous avons recherché l'effet de l'activation de PPARα sur l'expression des différentes molécules étudiées, impliquées dans l'adhérence et la migration cellulaires.

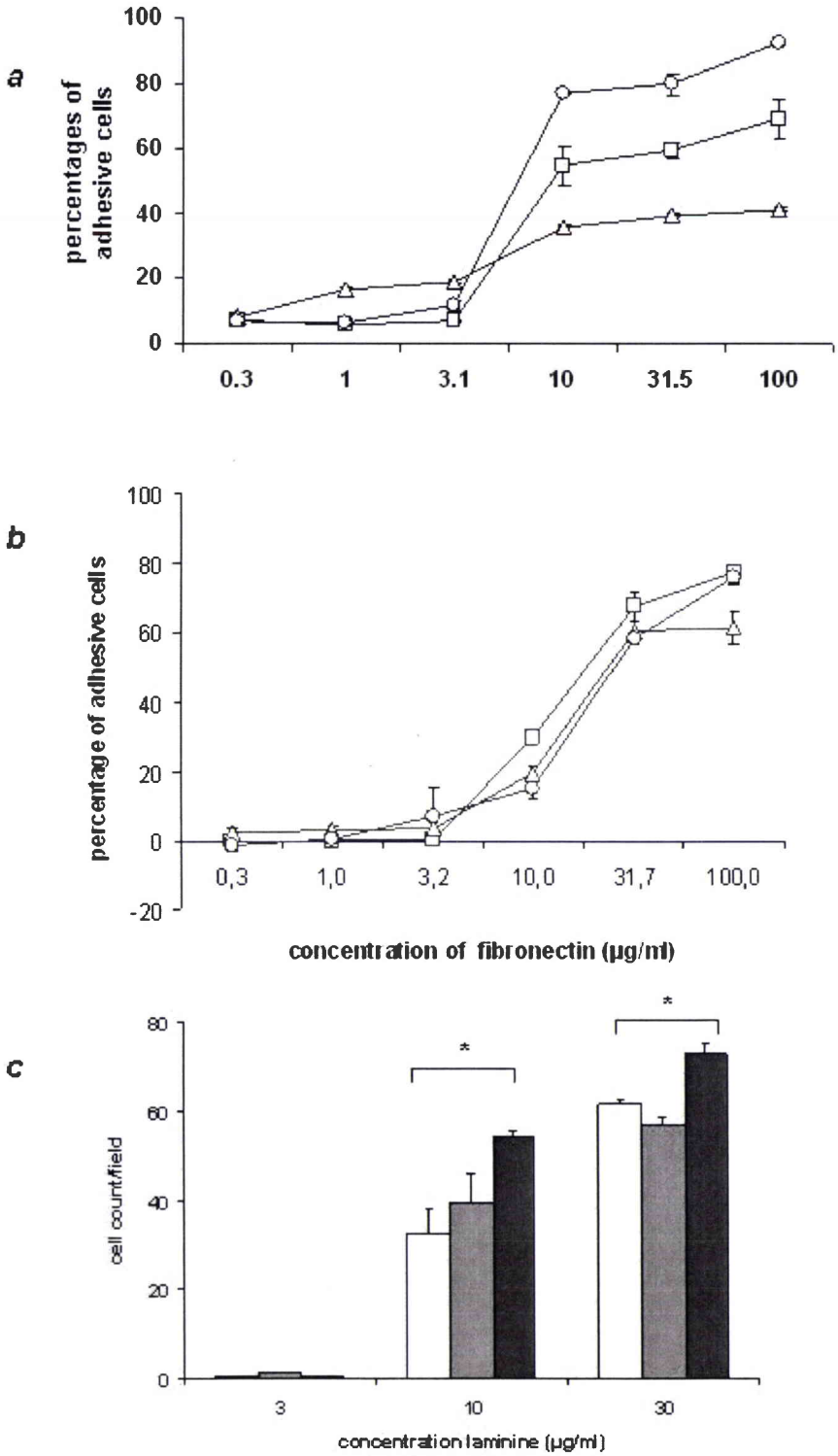


Figure 29: Tests d'adhérence cellulaire sur différentes concentrations de laminine-1 (*a.*) ou de fibronectine (*b.*) avec les cellules HT29 traitées avec le véhicule (carré), 10 µM de rosiglitazone (triangle) ou 50 µM de pioglitazone (cercle) pendant 5 semaines. *c.*. Test de migration (haptotaxisme) réalisé avec les cellules HT29 traitées avec le véhicule (barres blanches), 10 µM de rosiglitazone (barres grises) et 50 µM de pioglitazone (barres noires) pendant 5 semaines. (* P<0.05 par comparaison avec les cellules contrôles cultivées en présence du véhicule, n = 4)

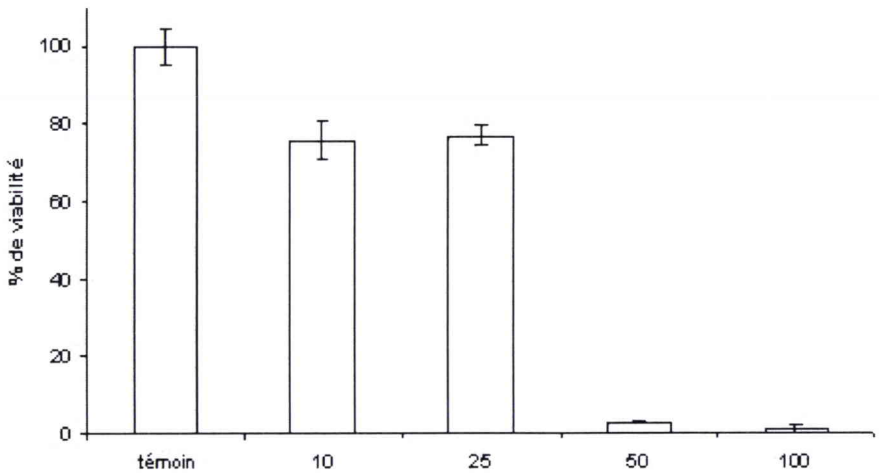


Figure 30 : Impact du fénofibrate sur la croissance des cellules HT29. Les cellules HT29 ont été traitées pendant 5 jours avec des concentrations croissantes de fénofibrate (10 à 100 µM). Les cellules ont ensuite été comptées en présence de bleu de Trypan.

Tableau 10 : Distribution des cellules HT29 dans le cycle cellulaire après 24 h ou 5 jours de traitement

Les cellules HT29 sont traitées pendant 24 heures ou 5 jours par le DMSO ou le fénofibrate, puis préparées à l'analyse par cytométrie en flux selon le protocole décrit dans la section *Matériel et Méthodes*. Les résultats sont présentés en pourcentage de cellules dans chaque phase, rapporté au nombre total de cellules analysées (N = 3, différence significative, * : $p < 0,05$, par rapport au témoin, test de Student). La concentration en DMSO est de 0,1 % dans tous les cas.
Féno 50 : Fénofibrate 50 µM.

Durée du traitement	Traitement	G0/G1	S/G2/M
24 h	DMSO	54,91 ± 3,69	45,09 ± 1,33
	Féno 50	63,64 ± 0,62*	36,36 ± 2,61
5 jours	DMSO	53,22 ± 0,32	46,78 ± 0,49
	Féno 50	47,67 ± 1,33 *	52,33 ± 1,75 *

Tableau 11: Activité gélatinase des MMP2 et -9 dans le supernageant des cellules HT29 traitées 24 heures avec le fénofibrate

			- 9-cisRA (1 µM)			+ 9-cisRA (1 µM)		
	contrôle	9-cisRA	Fénofibrate			Fénofibrate		
			(10 µM)	(25 µM)	(50 µM)	(10 µM)	(25 µM)	(50 µM)
MMP2	+	+	+	-	+	++	+	+
MMP9	+	+	+	+	+	+++	++	++

Résultats: visualisation de la zone de lyse (+) faible, (++) modérée or (+++) élevée

a. Croissance des cellules

Les cellules HT29 ont été cultivées en conditions standard en présence de concentrations croissantes de fénofibrate, pendant 5 jours (figure 30, page 49 ter). Une diminution de la croissance cellulaire de l'ordre de 20% a été observée lors d'un traitement de 5 jours avec 10 ou 25 µM de fénofibrate. Par contre, la croissance cellulaire est réduite de 99% en présence de 50 µM de fénofibrate.

Par ailleurs, les cellules HT29, non synchronisées, ont été traitées 24 ou 48 heures (tableau 10, page 49 quater) avec différentes concentrations de fénofibrate (0 à 50 µM) associé ou non à 1 µM d'acide 9-cis rétinoïque. L'étude du cycle cellulaire montre une accumulation dose-dépendante des cellules traitées en phase G0/G1 après 24 heures de traitement, et une accumulation des cellules en phase G2/M après 5 jours d'exposition au fénofibrate. Le taux de cellules apoptotiques (après 16 heures de traitement) mesuré par la fixation de l'annexine V couplée au FITC par FACS montre que seulement 5% des cellules sont apoptotiques, taux équivalent à celui obtenu lorsque les cellules sont traitées par chaque TZD. Ces résultats devront être confirmés.

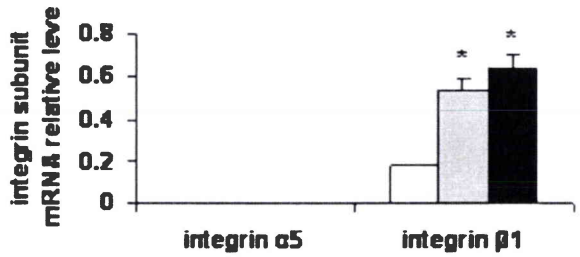
b. Impact d'un traitement à court terme des cellules HT29 par le fénofibrate sur l'expression de protéines

L'effet du fénofibrate sur l'expression de protéines impliquées dans l'adhérence et la migration cellulaires, comme les intégrines α5 et β1, a été recherché. La cytométrie de flux a montré que le fénofibrate ne modifie pas l'expression des intégrines à la surface des cellules traitées 24 heures ou 5 jours (figures 32a et b, page 50 ter). Les expériences de RT-PCR semi-quantitatives ont montré qu'un traitement de 24 heures diminue le taux de transcrits de l'intégrine β1 (figure 31b, page 50 bis), tandis qu'il augmente d'un facteur 2,8 après un traitement de 5 jours avec le fénofibrate (figure 32c, page 50 ter). Aucune induction de l'expression de l'intégrine α5 n'a été constatée (figures 31, page 49 bis et 32c, page 50 ter).

Enfin, le taux de transcrits de PPARα est accru après une exposition de 5 jours au fénofibrate (figure 32c, page 50 ter).

L'activité des gélatinases A et B a été étudiée par zymographie, après 24 heures de traitment (tableau 11, page 49 quater). Les cellules HT29 ont été traitées avec des concentrations croissantes de fénofibrate, jusqu'à 50 µM, seul ou associé à 1 µM d'acide 9-cis rétinoïque. Les résultats ont montré que le fénofibrate associé à l'acide 9-cis rétinoïque augmente l'activité de la MMP9, alors qu'aucun traitement n'a modifié de façon significative l'activité de la MMP2.

a



b

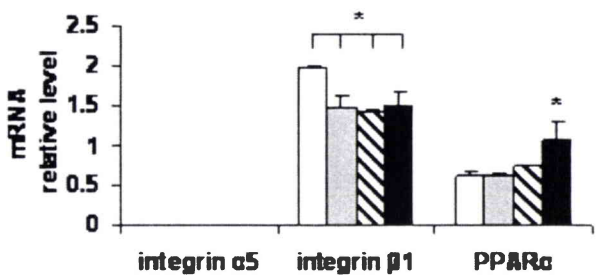


Figure 31: Quantification des transcrits des intégrines α5 et β1 et de PPARα dans les cellules HT29 exposées *a.* 5 jours au véhicule (barres blanches), à 10 µM (barres grises), et à 50 µM (barres noires) de fénofibrate ou *b.* 24 heures au véhicule (barres blanches), à 10 µM (barres grises), 25 µM (barres rayées) ou 50 µM (barres noires) de fénofibrate. (* $P<0.05$ par comparaison avec les cellules cultivées en présence du véhicule; n=3

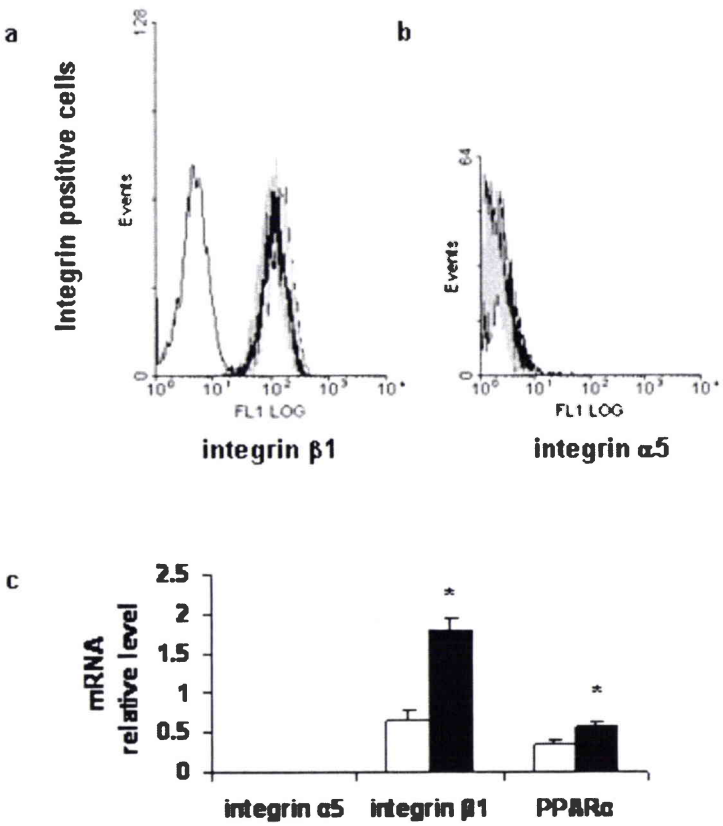


Figure 32: Expression des intégrines $\beta 1$ (*a*), $\alpha 5$ (*b*) analysée par FACS après 5 jours d'exposition à 50 µM de fénofibrate. Résultats typiques de 3 expériences. (c) Quantification des transcrits des intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ et de PPARα par RT-PCR dans les cellules HT29 exposées au fénofibrate (50 µM) pendant 5 jours. (* $P<0.05$ par comparaison avec les cellules cultivées en présence du véhicule, n = 3)

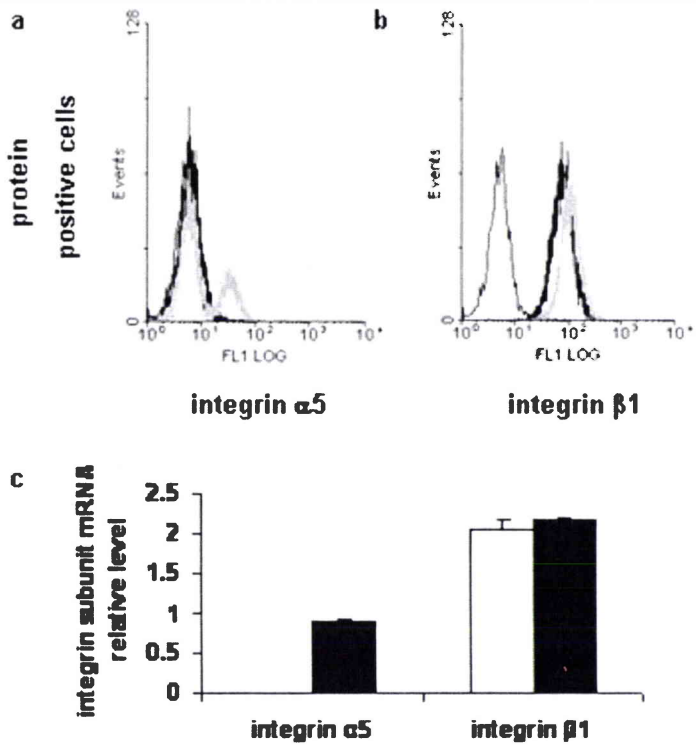


Figure 33: Expression des intégrines α5 (*a*) et β1 (*b*) analysée par FACS après 35 jours d'exposition à 50 µM de fénofibrate. Résultats typiques de 3 expériences. (c) Quantification des transcrits des intégrines α5 et β1 par RT-PCR dans les cellules HT29 traitées avec 50 µM de fénofibrate pendant 35 jours. (* P<0.05 par comparaison avec les cellules cultivées en présence du véhicule, n = 3)

Tableau 12 : résultats des greffes orthotopiques de cellules HT29

	Traitement	Volume tumoral moyen (mm^3)	métastases	Nombre de cas présentant les métastases
Rosiglitazone	Contrôle	2525 ± 321	Poumon Ganglion	2/5 2/5
	30 jours post-greffe	1392 ± 198	Ganglion	1/5
	Un jour post-greffe	556 ± 82	Ganglion	1/5
	15 jours avant greffe	142 ± 91	Ganglion	1/5
Pioglitazone	Contrôle	3095 ± 472	Poumon Ganglion	1/5 2/5
	30 jours post-greffe	1072 ± 220	Ganglion	2/5
	Un jour post-greffe	332 ± 118	Ganglion	3/5
	15 jours avant greffe	-	-	0/5
Ro + Pio	Contrôle	2810 ± 446	Poumon Ganglion	2/10 4/10
	30 jours post-greffe	425 ± 115	Ganglion	1/5
	Un jour post-greffe	319 ± 131	Ganglion	2/5
	15 jours avant greffe	182 ± 124	Ganglion	1/5
Fénofibrate	Contrôle	Idem que Ro + Pio	Poumon Ganglion	idem
	30 jours post-greffe	1170 ± 520	Ganglion	3/5
	Un jour post-greffe	3 ± 1	Ganglion	1/5
	15 jours avant greffe	300 ± 68	Poumon Ganglion	2/5 1/5

c. Modification du profil d'expression des protéines lors d'un traitement chronique

Une exposition chronique au fénofibrate conduit à la modification de l'expression d'intégrines. Ainsi, une induction de l'expression de l'intégrine α5 et une légère augmentation de l'expression de l'intégrine β1 ont été observées par cytométrie en flux (figure 33a et b, page 50 quater). Au niveau transcriptionnel, le taux d'intégrine α5 est induit mais aucune modification de l'expression de l'intégrine β1 n'est constatée (figure 33c, page 50 quater).

B. INFLUENCE DES TZD OU DU FÉNOFIBRATE SUR LA CROISSANCE TUMORALE IN VIVO

1. CROISSANCE TUMORALE

Les cellules HT29 ont été greffées en orthotopique, *id est* dans la paroi du caecum de souris *nude*. Les souris ont été réparties en 4 lots différents : i) non traitées (n=5), ii) traitées à partir de 4 semaines après la greffe (n=5), iii) traitées dès le lendemain de la greffe (n=5), iv) traitées en prévention, c'est-à-dire 2 semaines avant la greffe (n=5). Les souris traitées ont reçu par voie orale, pendant 8 semaines, une dose quotidienne de 0,43 mg/kg/j de pioglitazone ou 0,11 mg/kg/j de rosiglitazone, les deux, ou bien 5 mg/kg/j de fénofibrate. Les résultats présentés dans le tableau 12 (page 50 quinquies) indiquent qu'un traitement des souris par les TZD non associées semble avoir un effet protecteur ; en effet, une diminution du volume tumoral est observé chez les souris traitées, et ce, en corrélation avec la précocité du traitement. De plus, l'apparition de métastases à distance est inhibée. Par ailleurs, un traitement par la pioglitazone en prévention semble empêcher non seulement la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme mais également la croissance tumorale elle-même (tableau 12, page 50 quinquies). Cette condition de traitement a donc été reproduite, mais les souris ont été sacrifiées 24 heures, 48 heures ou 5 jours après la greffe. Cette cinétique a montré une réaction inflammatoire importante au niveau de la zone d'injection à 24 et 48 heures (résultats non présentés). A 5 jours, nous avons remarqué l'absence de cellules cancéreuses. L'effet préventif de la pioglitazone semble donc agir dès les premières heures ou premiers jours sur la survie des cellules cancéreuses.

Deux autres cohortes de souris ont été utilisées afin d'étudier l'effet combiné de la pioglitazone associée à la rosiglitazone (0,43 mg/kg/j et 0,11 mg/kg/j, respectivement) et du fénofibrate (5 mg/kg/j) sur la croissance tumorale et surtout la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme. Le tableau 12 (page 50 quinquies) montre les résultats obtenus : l'utilisation

Tableau 13 : Volumes tumoraux moyens, indices mitotiques et apoptotiques des cellules HT29 greffées *in vivo*.

	Contrôle			30 jours post greffe			Un jour post greffe			15 jours avant greffe		
Traitement	*Volume (mm^3)*	*IM %*	*IA %*	*Volume (mm^3)*	*IM %*	*IA %*	*Volume (mm^3)*	*IM %*	*IA %*	*Volume (mm^3)*	*IM %*	*IA %*
Pioglitazone	3095 ± 472	43,4%	2.8%	1072 ± 220	42%	3.4%	332 ± 118	33%	2%	-	-	-
Rosiglitazone	2525 ± 321	64.3%	4.2%	1392 ± 198	57%	3.5%	556 ± 82	45%	2.5%	142 ± 91	44%	2%
Ro + Pio	2810 ± 446	42%	3.6%	425 ± 115	33%	3.4%	319 ± 131	31.6%	3.9%	182 ± 124	39%	2.7%
Fénofibrate	2810 ± 446	40.6%	0.7%	1170 ± 520	35.7%	0.6%	3 ± 1	37.2%	1.3%	300 ± 68	35.1%	0.9%

1000 cellules ont été comptées (4 champs)
Abréviations : Ro + Pio, rosiglitazone et pioglitazone associées ; IM, Indice Mitotique ; IA, Indice Apoptotique

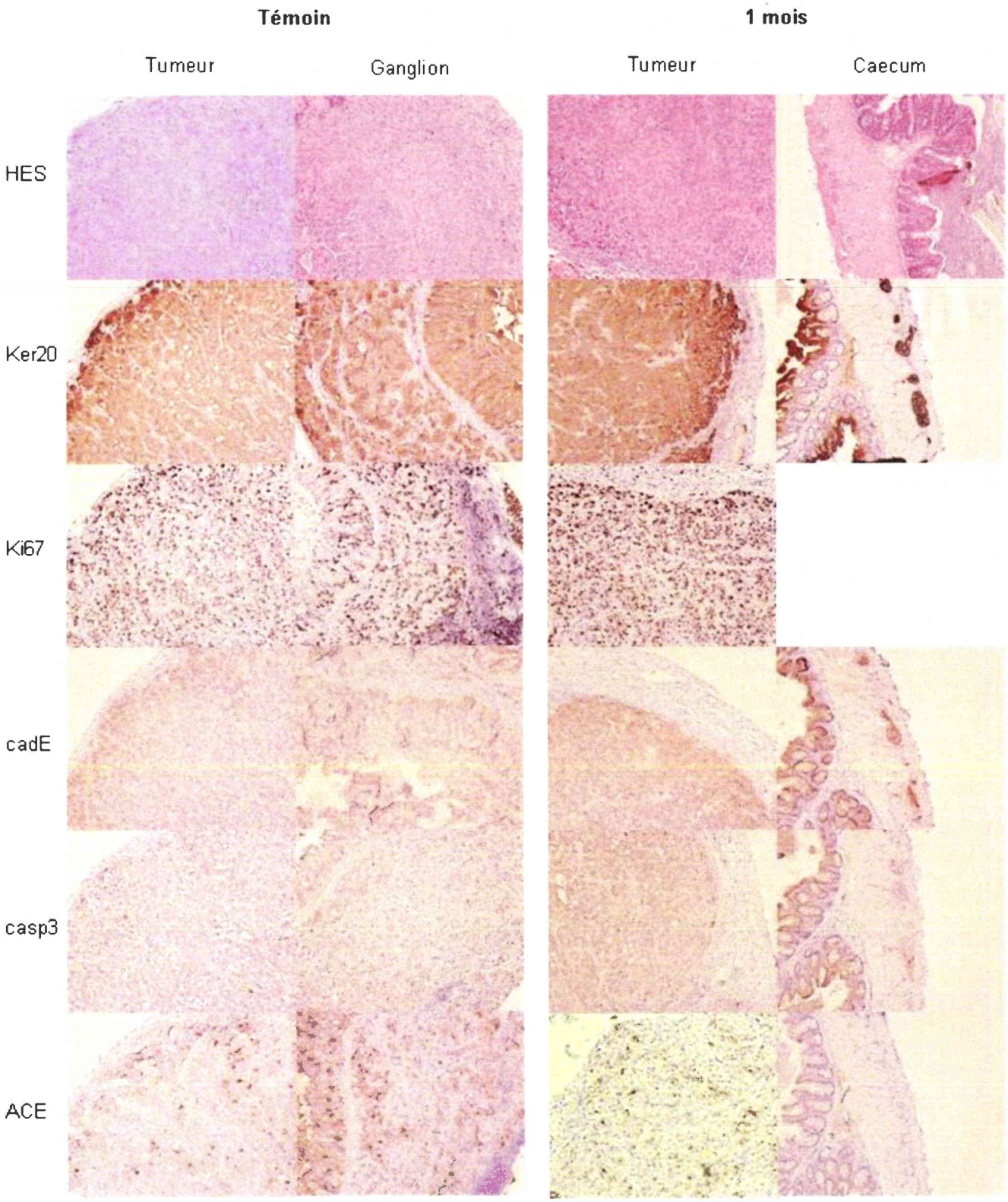


Figure 34: Caractéristiques des prélèvements de tumeurs au niveau du caecum ou des ganglions mésentériques de la cohorte de souris témoins et traitées par voie orale par la rosiglitazone un mois après la greffe de cellules HT29. Après fixation, des coupes histologiques de 5µm ont été préparées pour l'analyse par coloration à l'hématoxyline:eosine (HES) ou par des techniques d'immunohistochimie avec des solutions d'anticorps dirigés respectivement contre la kératine 20 (ker 20), Ki67, la E-cadhérine (cadE), la caspase 3 (casp3) et l'antigène carcinoembryonnaire (ACE). Les coupes ont été finalement colorées par une solution d'hématoxyline/eosine. G : 100x

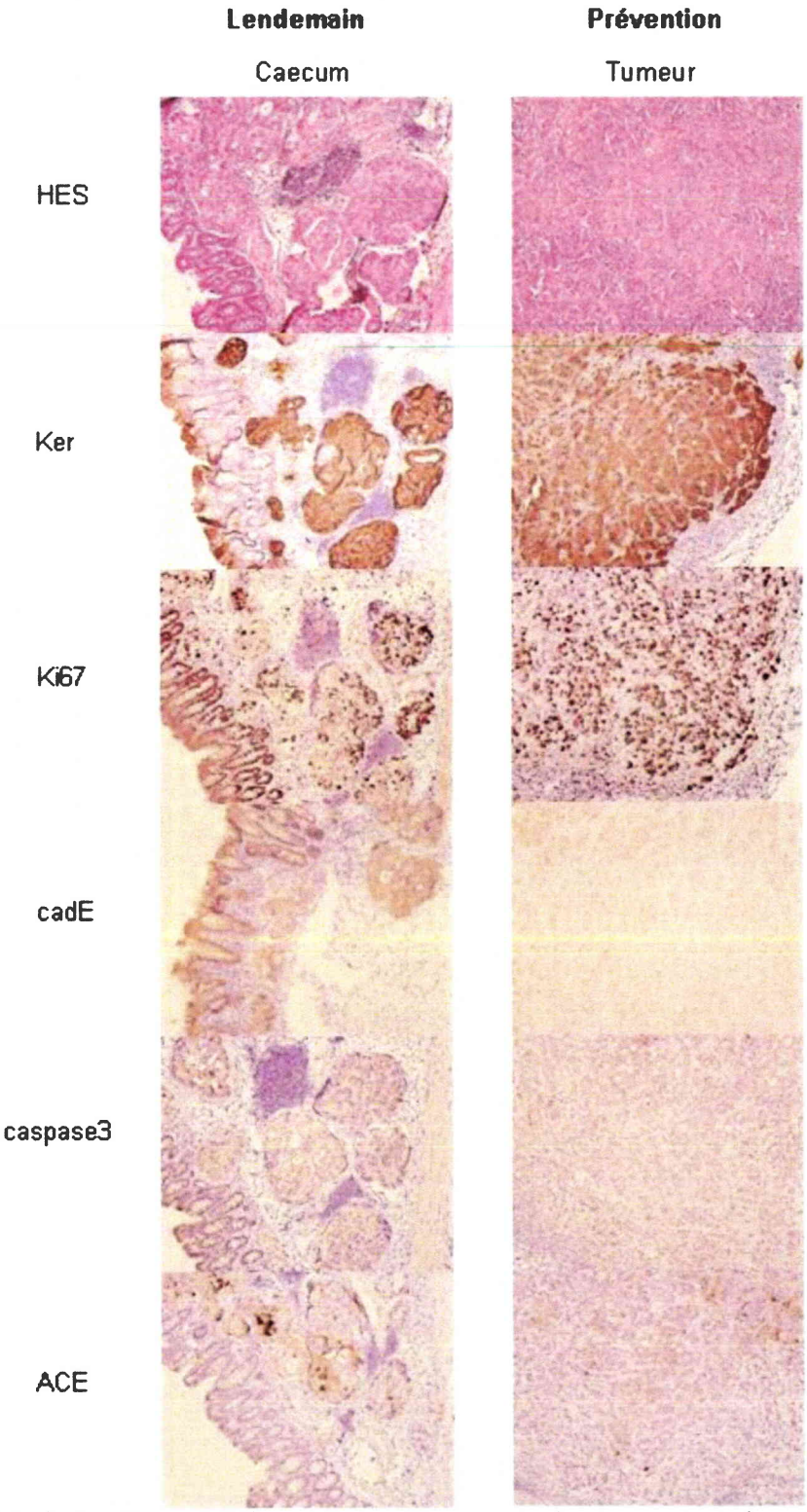


Figure 34 (suite) : Caractéristiques des prélèvements de tumeurs au niveau du caecum de la cohorte de souris traitées par voie orale avec la rosiglitazone dès le lendemain ou 15 jours avant la greffe (prévention) de cellules HT29 au niveau du caecum. Après fixation, des coupes histologiques de 5µm de caecum sain et des tumeurs ont été préparées pour l'analyse par coloration à l'hématoxyline:eosine (HES) ou par des techniques d'immunohistochimie avec des solutions d'anticorps dirigés respectivement contre la kératine 20 (ker 20), Ki67, la E-cadhérine (cadE), la caspase 3 (casp3) et l'antigène carcinoembryonnaire (ACE). Les coupes ont été finalement colorées par une solution d'hématoxyline/eosine. G : 100x

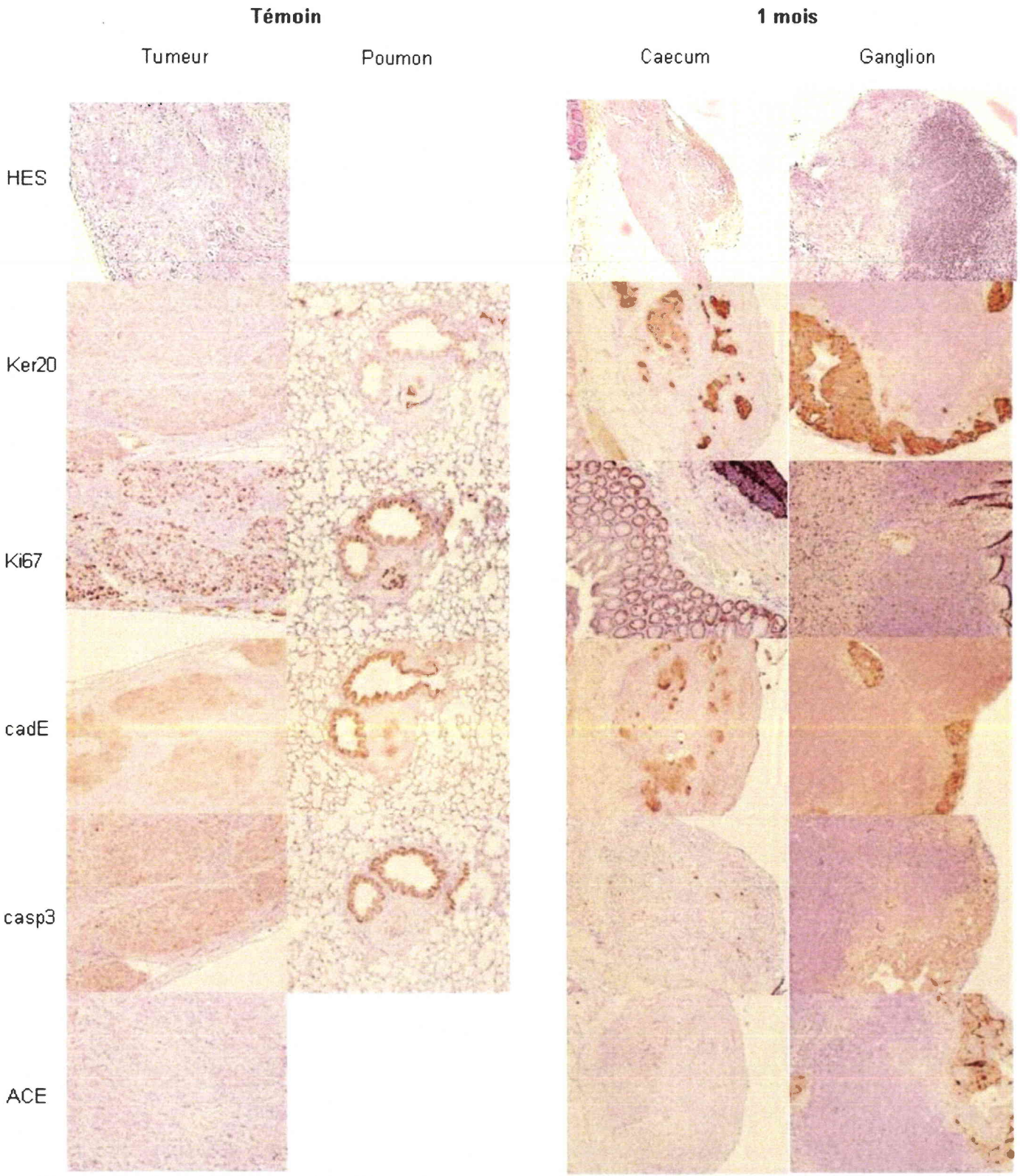


Figure 35: Caractéristiques des prélèvements de tumeurs au niveau du caecum et du poumon de la cohorte de souris témoins, de tumeurs au niveau du caecum et des ganglions mésentériques de la cohorte de souris traitées par voie orale par la piosiglitazone un mois après greffe de cellules HT29. Après fixation, des coupes histologiques de 5µm ont été préparées pour l'analyse par coloration à l'hématoxyline:eosine (HES) ou par des techniques d'immunohistochimie avec des solutions d'anticorps dirigés respectivement contre la kératine 20 (ker 20), Ki67, la E-cadhérine (cadE), la caspase 3 (casp3) et l'antigène carcinoembryonnaire (ACE). Les coupes ont été finalement colorées par une solution d'hématoxyline/eosine. G : 100x

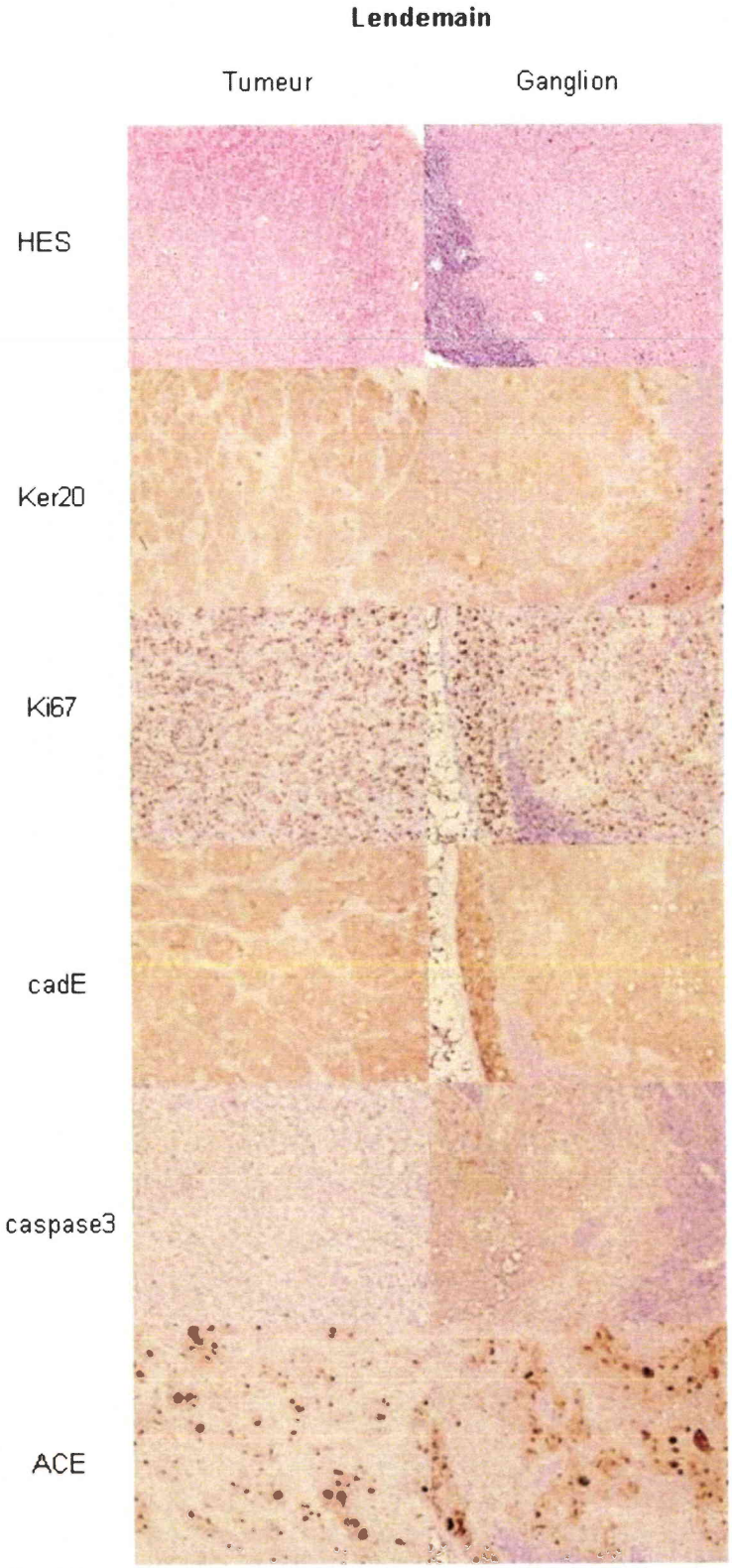


Figure 35 (suite) : Caractéristiques des prélèvements de tumeurs au niveau du caecum et de ganglion de la cohorte de souris traitées par voie orale par la pioglitazone le lendemain de la greffe de cellules HT29. Après fixation, des coupes histologiques de 5µm ont été préparées pour l'analyse par coloration à l'hématoxyline:eosine (HES) ou par des techniques d'immunohistochimie avec des solutions d'anticorps dirigés respectivement contre la kératine 20 (ker 20), Ki67, la E-cadhérine (cadE), la caspase 3 (casp3) et l'antigène carcinoembryonnaire (ACE). Les coupes ont été finalement colorées par une solution d'hématoxyline/eosine. G : 100x

combinée des 2 TZD semble avoir les mêmes effets que les 2 TZD prises isolément. Cependant, l'effet anti-tumoral de la pioglitazone seule en prévention n'est pas retrouvé.

Concernant la cohorte de souris traitées au fénofibrate, une diminution du volume tumoral moyen est également observée mais sans corrélation avec la précocité du traitement, contrairement aux TZD. De plus, le fénofibrate ne semble pas avoir d'effet protecteur contre la dissémination des métastases à distance puisque des métastases pulmonaires ont été observées dans le lot de souris traitées en prévention.

Ces résultats indiquent donc que ***les ligands de PPAR ont un effet cytostatique sur les cellules cancéreuses (se reporter à volumes tumoraux moyens) et que les TZD ont de surcroît un rôle anti-métastatique (en particulier la pioglitazone).***

2. IMMUNOHISTOCHIMIE

Le travail effectué *in vivo* a été suivi d'une étude immunohistochimique des tumeurs et métastases prélevées, afin de préciser le rôle et les conséquences d'un traitement par les thiazolidinédiones seules ou associées et du fénofibrate. Différents marqueurs ont été recherchés : prolifération cellulaire (Ki67) et apoptose (caspase 3 activée), la cytokératine 20 et la cadhérine E (marqueurs de cellules épithéliales), l'antigène carcino-embryonnaire, et l'intégrine α5 (dont l'expression est induite dans les cellules HT29 traitées de façon chronique, *in vitro*).

Les marqueurs de prolifération et d'apoptose ont permis de calculer les indices mitotiques et apoptotiques des cellules cancéreuses (tableau 13, page 51 bis). Pour cela, 1000 cellules ont été comptées (4 champs), le pourcentage de cellules marquées correspondant au pourcentage de cellules en prolifération ou apoptotiques. Les TZD ne semblent pas affecter le taux apoptotique des cellules tumorales de manière significative, confirmant les résultats obtenus *in vitro*. Une diminution du taux mitotique est observée dans le cadre des 2 traitements, avec une inhibition maximale de la prolifération de l'ordre de 20%. La combinaison des deux TZD réduit également le taux mitotique, de l'ordre de 10%. *In vivo*, l'effet inhibiteur des TZD sur le volume tumoral moyen observé serait donc dû à un effet cytostatique et non pro-apoptotique de ces drogues. Concernant le fénofibrate, les taux de prolifération et d'apoptose ne sont pas modifiés, quelles que soient les conditions de traitement.

Dans le cadre d'un traitement par la rosiglitazone, aucune modification de l'expression de la cytokératine 20 n'a été observée, tandis qu'une augmentation de l'expression de la cadhérine E et une diminution de l'expression de l'antigène carcino-embryonnaire sont constatées. Le

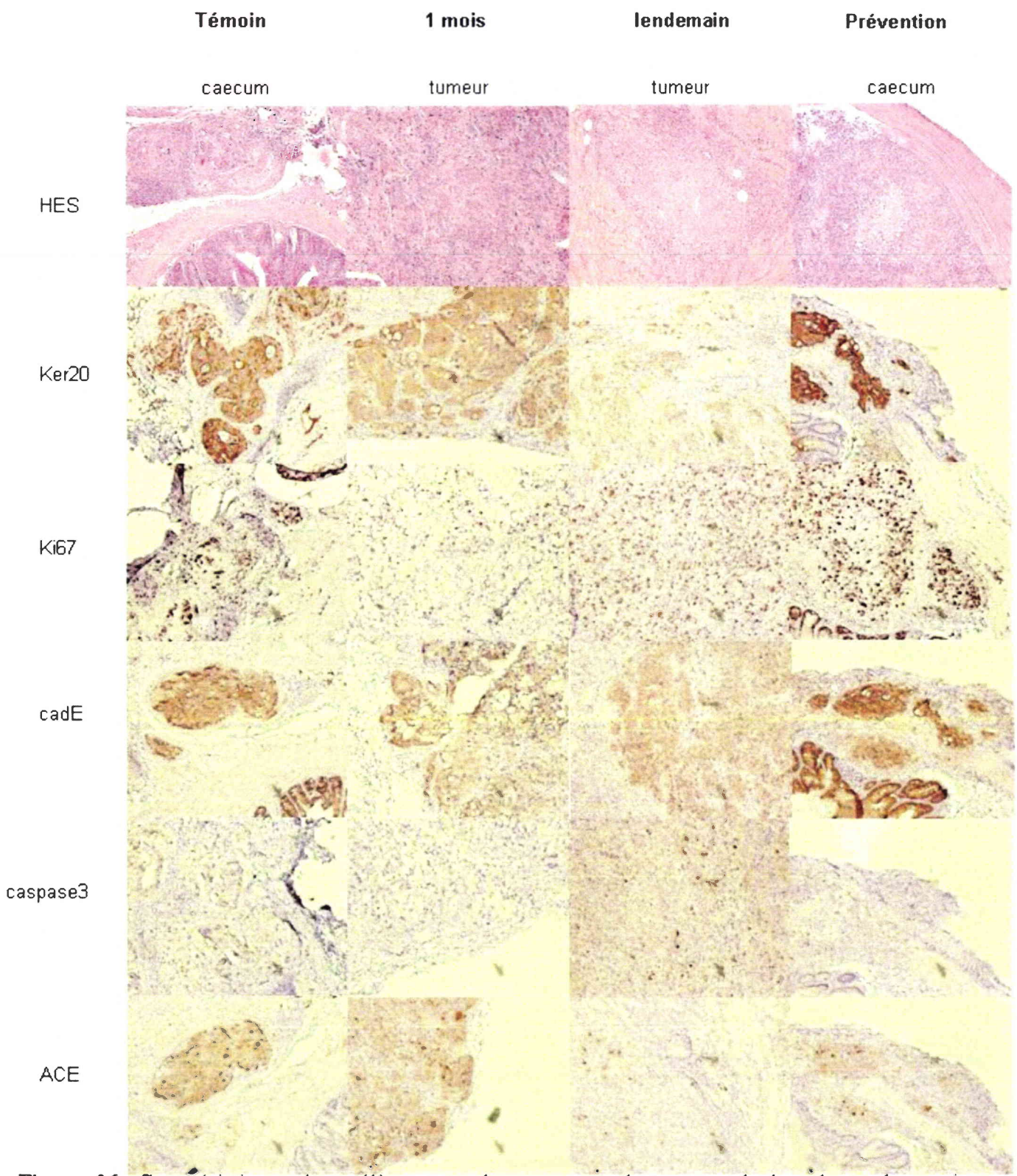


Figure 36: Caractéristiques des prélèvements de caecum et de tumeurs de la cohorte de souris témoins et traitées par voie orale par le mélange pioglitazone et rosiglitazone, un mois après la greffe, le lendemain de la greffe et 15 jours avant la greffe (prévention). Après fixation, des coupes histologiques de 5µm ont été préparées pour l'analyse par coloration à l'hématoxyline:eosine (HES) ou par des techniques d'immunohistochimie avec des solutions d'anticorps dirigés respectivement contre la kératine 20 (ker 20), Ki67, la E-cadhérine (cadE), la caspase 3 (casp3) et l'antigène carcinoembryonnaire (ACE). Les coupes ont été finalement colorées par une solution d'hématoxyline/eosine. G : 100x

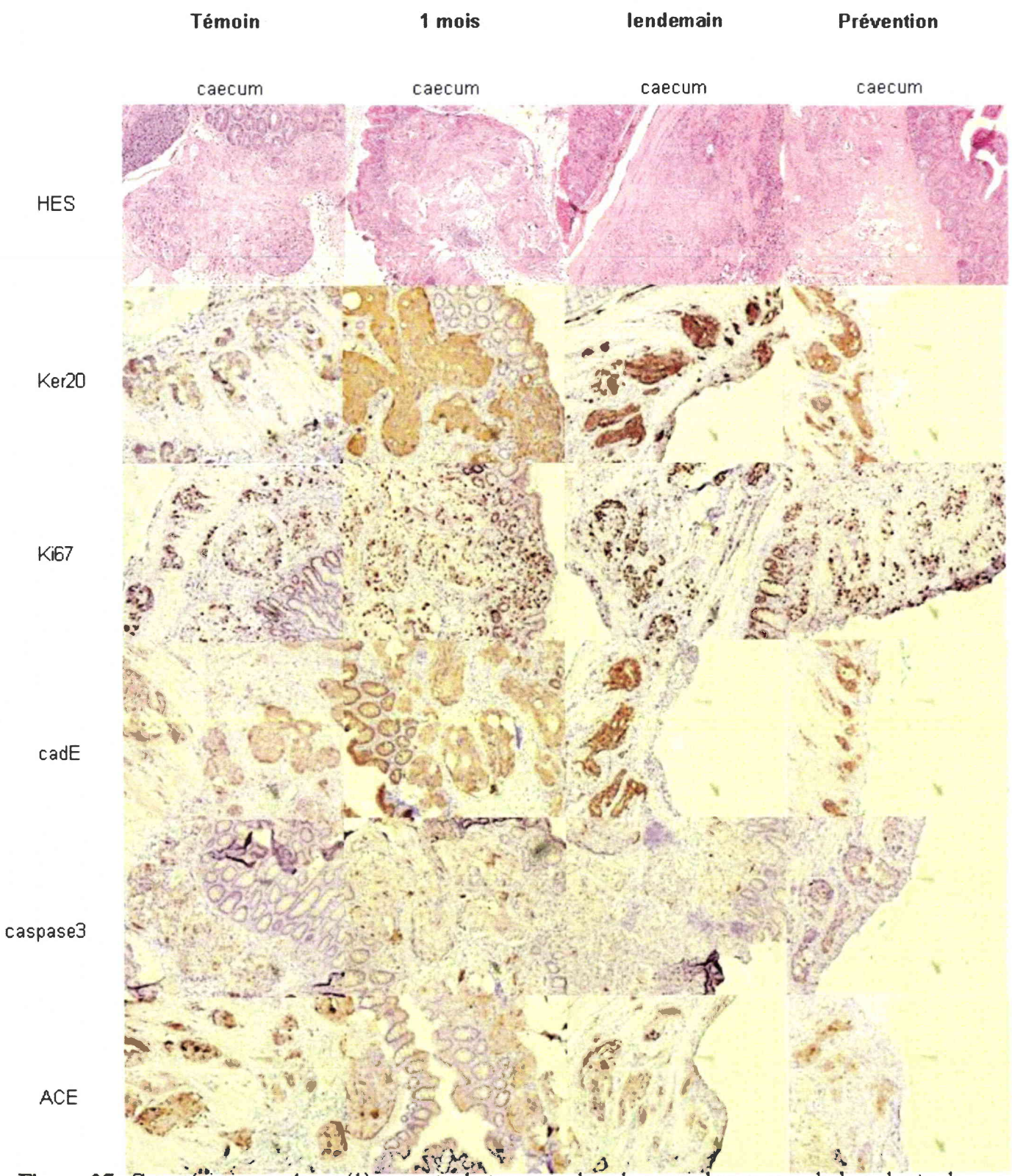


Figure 37: Caractéristiques des prélèvements de tumeurs dans la paroi du caecum de la cohorte de souris traitées par voie orale par le fénofibrate, un mois après la greffe, le lendemain de la greffe et 15 jours avant la greffe (prévention) de cellules HT29. Après fixation, des coupes histologiques de 5µm ont été préparées pour l'analyse par coloration à l'hématoxyline:eosine (HES) ou par des techniques d'immunohistochimie avec des solutions d'anticorps dirigés respectivement contre la kératine 20 (ker 20), Ki67, la E-cadhérine (cadE), la caspase 3 (casp3) et l'antigène carcinoembryonnaire (ACE). Les coupes ont été finalement colorées par une solution d'hématoxyline/eosine. G : 100x

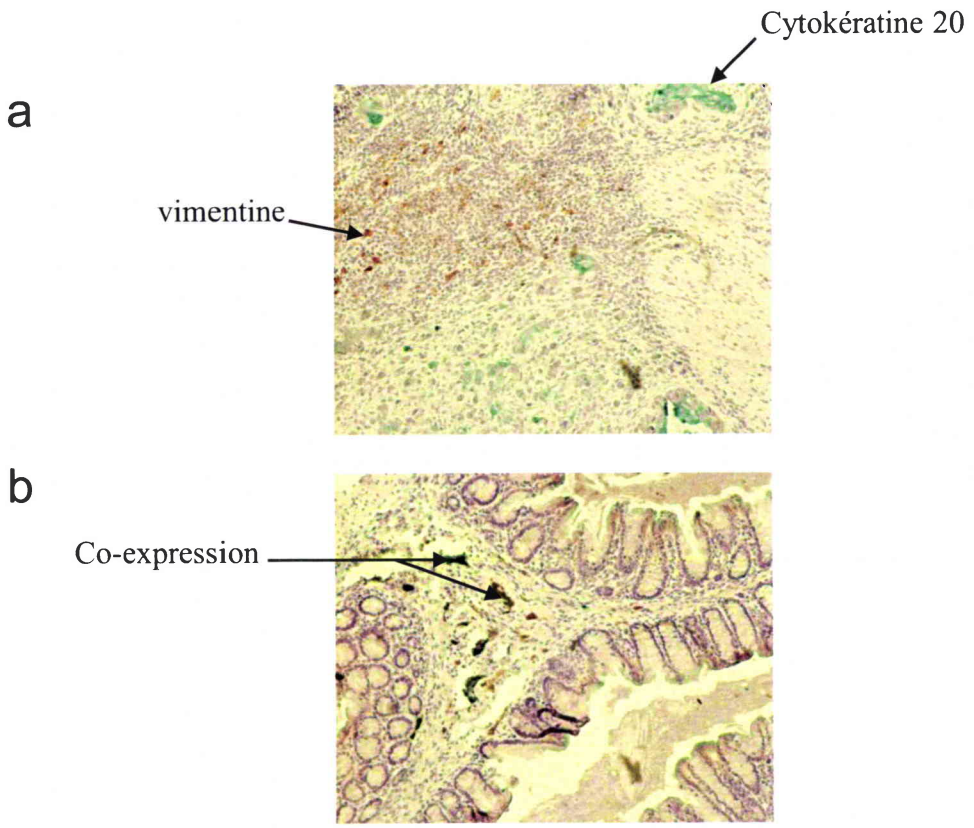


Figure 38: Mise en évidence de la présence de vimentine et de cytokératine 20 au niveau de tumeurs obtenues *in vivo* chez la souris *nude*. Après fixation, des coupes histologiques de 5µm ont été préparées pour l'analyse avec des solutions d'anticorps dirigés respectivement contre la kératine 20 (ker 20) et ou la vimentine. (a) présence de protéines isolées, (b) mise en évidence de double marquage. Les coupes ont été finalement colorées par une solution d'hématoxyline/eosine. G: 100x

marquage correspondant à la cytokératine 20 et à l'antigène carcino-embryonnaire est relativement fort. Dans le cas d'un traitement par la pioglitazone, les marqueurs de différenciation ont une expression accrue, tout comme celle de l'antigène carcino-embryonnaire (figures 34 et 35, pages 51 ter à sexies). Si les 2 ligands sont associés, une diminution de l'expression de la cytokératine 20 et de la cadhérine E est observée, excepté dans le cas d'un traitement en prévention, avant la greffe (figure 36, page 52 bis). L'expression de l'antigène carcino-embryonnaire est également décrue, en particulier lors d'un traitement dès le lendemain de la greffe. L'association des 2 TZD semble avoir un impact propre sur l'expression des marqueurs de différenciation, qui varie de manière distincte par rapport aux traitements avec chaque agoniste seul. Quant au fénofibrate, il ne modifie pas l'expression de l'antigène carcino-embryonnaire mais augmente celle de la cadhérine E et de la cytokératine 20 (figure 37, page 52 ter).

Des tests préliminaires n'ont pas permis de prouver l'induction de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les tumeurs résultant des greffes orthotopiques, contrairement aux résultats obtenus *in vitro*. Récemment, il a été démontré que la transition épithélio-mésenchymateuse joue un rôle crucial dans la progression tumorale (Thiery, 2002; Grunert *et coll*, 2003). Pour visualiser cette transition dans nos cellules, nous avons recherché l'expression de la vimentine, un marqueur des cellules mésenchymateuses, au niveau des tumeurs obtenues *in vivo*. Les résultats obtenus montrent que quelques cellules isolées expriment cette vimentine, quel que soit le traitement administré (figure 38, page 52 quater). La colocalisation de ce marqueur avec celui des cellules épithéliales (cytokératine 20) a été observée dans quelques cellules, vraisemblablement en transition avec un phénotype mésenchymateux (figure 38, page 52 quater).

VI. DISCUSSION

Les molécules de la famille des TZD ont un effet anti-prolifératif sur les lignées colorectales (DuBois *et coll*, 1998; Sarraf *et coll*, 1998; Kitamura *et coll*, 1999). Toutefois, cet effet dépend du modèle cellulaire, des conditions de culture cellulaire, de la nature et de la dose d'agoniste utilisées ainsi que du temps de traitement. Il a été décrit que les TZD peuvent moduler l'expression de protéines impliquées dans les interactions cellule-cellule et dans l'adhérence cellulaire, suggérant qu'une exposition aux TZD peut modifier le profil d'expression des protéines à la surface cellulaire. Nous avons étudié l'expression de molécules impliquées dans l'adhérence et la migration cellulaires, en particulier certaines intégrines. Les expériences de RT-PCR ont montré que les TZD affectent différemment les taux de transcrits selon la lignée cellulaire, la dose et la durée du traitement. De plus, nous avons montré que la pioglitazone et la rosiglitazone induisent des effets différents au niveau transcriptionnel, notamment lorsque les cellules HT29 sont traitées 5 semaines. Cela pourrait être dû au moins en partie à la capacité de chaque ligand à recruter des coactivateurs spécifiques, induisant ainsi des réponses biologiques spécifiques (Kodera *et coll*, 2000; Yang *et coll*, 2000).

L'invasion des cellules est associée à la dégradation de la MEC et l'activation de la migration cellulaire *via* la dégradation des intégrines par les MMP (Westermarck and Kähäri, 1999). Nous avons montré qu'un traitement court de 24 heures avec les TZD augmente l'activité des gélatinases A et B, contrairement à d'autres travaux (Galli *et coll*, 2004). Une diminution de l'activité ou de la sécrétion des MMP7 et 9 a été observée dans des cellules colorectales (Gan *et coll*, 2001; Sunami *et coll*, 2002) et des gliomes (Grommes *et coll*, 2006). Par ailleurs, l'utilisation d'acide 9-cis rétinoïque seul augmente l'activité de la MMP2 mais ne modifie pas celle de la MMP9. Pourtant, lorsque les cellules sont exposées aux TZD, l'addition d'acide 9-cis rétinoïque n'affecte pas les activités gélatinolytiques (tableau 5, page 41 bis). Ces résultats pourraient être dus aux homodimères RXR/RXR, capables de se fixer au niveau des éléments de réponse des promoteurs des gènes cibles des PPAR (Ijpenberg *et coll*, 2004). Des travaux complémentaires sont nécessaires afin de déterminer la part respective des récepteurs nucléaires dans cette régulation.

Afin de préciser si les effets des TZD font appel à un mécanisme PPAR-dépendant ou -indépendant, nous avons utilisé un antagoniste de PPARγ, le GW9662. L'exposition des cellules HT29 à cet antagoniste a permis de montrer que la diminution d'expression de la cadhérine E et de la sémaphorine 6B s'effectue *via* un mécanisme PPARγ-dépendant. Des résultats similaires ont déjà été obtenus avec la lignée de carcinome mammaire MCF-7 ou de glioblastome T98G

(Murad *et coll*, 2006). Ces effets ont été observés lorsque les cellules ont été cultivées en présence de troglitazone ou de fénofibrate, agonistes de PPARγ et de PPARα, respectivement. Ces résultats suggèrent que la sémaphorine 6B, comme d'autres gènes, pourrait être sous le contrôle de chaque isotype de PPAR, conduisant à un effet cumulatif sur sa transcription. L'impact des TZD ne serait donc pas spécifique à un isotype particulier de PPAR. Les protéines de type sémaphorines sont impliquées dans la migration cellulaire et le guidage des axones (Chedotal *et coll*, 2005), et la sémaphorine 6B contribuerait au développement et à la progression tumorale (pour revue, (Neufeld and Kessler, 2008)). Les TZD pourraient ainsi réduire la migration des cellules colorectales par inhibition de l'expression de la sémaphorine 6B. Nous avons de plus montré que l'expression de la sémaphorine 6B à la surface des cellules HT29 diffère selon la nature de la TZD utilisée. D'autre part, une augmentation du taux de transcrits de PTEN réduit la migration de cellules mammaires en présence de TZD (Teresi *et coll*, 2006), de façon PPARγ-dépendante. La protéine PTEN inhibe la phosphorylation de Akt et diminue le taux de protéines MAPK, d'où un arrêt de la croissance cellulaire et une mort par apoptose. Nos travaux ont montré une augmentation du taux de transcrits de PTEN lors d'un traitement des cellules HT29 par les TZD, confirmant la possibilité d'un lien entre l'activation de PPARγ et la régulation transcriptionnelle de PTEN. Toutefois, cette augmentation de transcription de PTEN n'a pas été reproduite lorsque les cellules ont été traitées de façon chronique avec les TZD, suggérant que l'effet de ces drogues sur PTEN est une réponse immédiate à leur exposition. Nous avons également montré qu'un traitement avec le GW9662 influence le taux de transcrits de plusieurs intégrines sans modification de leur expression à la surface cellulaire, suggérant que ces intégrines peuvent néanmoins faire partie du domaine génique d'action des PPAR. Par une approche bioinformatique (en collaboration avec L. Domenjoud), l'analyse des promoteurs des intégrines étudiées dans ces travaux a montré l'existence de PPRE putatifs pour les sous unités α3, α5, αV, β1 et β4 des intégrines, PPRE situés à moins de 1 kb du site d'initiation de la transcription.

Un traitement chronique avec les TZD affecte l'expression des intégrines à la surface des cellules HT29, avec une induction de l'expression de l'intégrine α5. Les cellules métastatiques ont un phénotype adhésif dynamique qui permet leur dissémination *via* la modification du profil d'expression des intégrines. L'intégrine α5β1 est exprimée dans les cellules tumorales et endothéliales, et favorise le processus métastatique et l'extravasation des cellules (Kim *et coll*, 2000). L'expression de l'intégrine α5 n'est pas détectée dans les cellules normales coliques mais dans les cellules tumorales invasives (Koretz *et coll*, 1994). Une surexpression de l'intégrine α5β1 dans les tumeurs est associée à un phénotype plus agressif et à une activation de

l'angiogenèse (Kim *et coll*, 2000; Han *et coll*, 2005). Toutefois, Schirner *et coll* ont montré que la transfection de l'intégrine α5β1 dans les cellules HT29 ne permet pas à ces cellules, une fois injectées à des souris *nude*, de coloniser les poumons (Schirmer *et coll*, 1998). Ainsi, l'intégrine α5β1 pourrait inhiber les dernières étapes du processus métastatique des cellules tumorales circulantes. De plus, l'intégrine α5β1 modifie l'activation de l'intégrine αVβ3, et sa fonction dans l'adhérence (Ly *et coll*, 2003). Cet effet est dépendant de l'intégrine α5. La réduction de l'expression de l'intégrine αV à la surface cellulaire par les TZD pourrait expliquer l'effet protecteur de l'activation de PPARγ contre l'invasion des cellules tumorales. La présence de l'intégrine α5 pourrait ainsi perturber la relation entre l'intégrine αVβ3 et sa fonction dans l'adhérence, comme cela a déjà été décrit (Ly *et coll*, 2003), bien qu'aucune expression de l'intégrine β3 n'ait été détectée dans les cellules HT29. Des résultats opposés ont été obtenus avec les cellules NSCLC qui montrent une diminution du taux de transcrits de l'intégrine α5 en présence de ligands de PPARγ (Han *et coll*, 2005). De même, l'expression de l'intégrine β1 est différemment influencée lorsque les cellules tumorales sont exposées aux TZD. En effet, son expression est diminuée dans une lignée de carcinome thyroïdien (Chen *et coll*, 2006) tandis que la migration de cellules mammaires ou ovariennes est amplifiée après augmentation de l'expression de l'intégrine β1 (Arboleda *et coll*, 2003). *In vivo*, ces cellules ovariennes greffées sont plus invasives. D'autre part, lorsque la cyclooxygenase-2 (responsable de la formation des précurseurs des ligands de PPARγ) est inhibée de manière spécifique, l'expression de l'intégrine β1 est diminuée dans les cellules cancéreuses coliques, l'adhérence cellulaire est amoindrie et la migration accrue (Yazawa *et coll*, 2005). Nos travaux ont montré que l'expression de l'intégrine β1 est augmentée lorsque les cellules HT29 sont traitées avec la rosiglitazone mais pas avec la pioglitazone. Les TZD ont également diminué l'expression en surface de l'intégrine αV, mais n'ont pas modifié de façon majeure l'expression des autres intégrines étudiées. Pourtant, une diminution des taux d'intégrines β4 et β6 a été observée dans des cellules de carcinome pancréatique (Farrow and Evers, 2003). L'intégrine β6 associée à la sous-unité αV a été proposée comme marqueur pronostique pour les cellules colorectales métastatiques (Bates *et coll*, 2005), puisque l'intégrine β6 est exprimée dans ces cellules localisées dans les ganglions lymphatiques ou dans le foie. Dans les cellules colorectales, certaines intégrines sont des récepteurs à la laminine 5, principal support de migration des cellules colorectales à la périphérie des carcinomes coliques (Orian-Rousseau *et coll*, 1998; Sordat *et coll*, 1998; Lohi *et coll*, 2000). Lorsque les cellules HT29 sont traitées avec la rosiglitazone ou la pioglitazone, l'expression de

la chaîne γ2 de la laminine 5 est augmentée, suggérant que les TZD favoriseraient la migration des cellules colorectales.

L'exposition des cellules à chaque TZD a un impact différent sur l'adhérence et la migration cellulaires. Des résultats similaires ont été décrits dans des cellules pancréatiques humaines. L'activation de PPARγ par la troglitazone inhibe la mobilité des cellules et modifie leur morphologie par réorganisation du cytosquelette (Motomura *et coll*, 2004). Dans les cellules HT29, des modifications morphologiques ont été obtenues lorsque l'expression de l'intégrine α5β1 a été restaurée (Schmidt *et coll*, 1998). Des travaux précédents ont également montré que la rosiglitazone limite la migration des cellules cancéreuses anaplasiques thyroïdiennes (Aiello *et coll*, 2006) ou inhibe l'invasion des cellules trophoblastiques (Pavan *et coll*, 2003). L'utilisation d'antagoniste de RXRα supprime l'invasion des cellules trophoblastiques après une exposition à des agonistes de PPARγ (Tarrade *et coll*, 2001). De plus, l'expression de RXRα est accrue dans ces cellules, ce que nous avons également constaté dans les cellules HT29 traitées avec la rosiglitazone. Une thérapie systémique avec des ligands de PPARγ prévient la formation de métastases après la résection d'un carcinome pulmonaire de Lewis primaire (Panigrahy *et coll*, 2002). Freed *et coll* ont montré que l'administration de fortes doses de rosiglitazone est moins efficace contre la formation des métastases pulmonaires que les doses comparables au taux sérique de rosiglitazone de patients, démontrant une réponse biphasique au niveau systémique (Freed *et coll*, 1999).

Nous avons également étudié l'effet du fénofibrate en traitement court ou long sur l'expression de protéines de surface des cellules HT29. Nous avons étudié l'expression des intégrines α5 et β1, formant un récepteur à la fibronectine, impliqué dans l'adhérence et la migration cellulaires. Les expériences de RT-PCR et de cytométrie en flux ont montré que le fénofibrate affecte différemment le taux d'intégrines selon la dose de fénofibrate et la durée du traitement. Nos résultats suggèrent que l'activation de PPARα pourrait également participer à l'adhérence et la migration des cellules.

Bien que l'implication de PPARα dans le cancer du colon ne soit pas clairement établie, plusieurs études ont montré que l'activation de PPARα pourrait moduler l'expression de protéines impliquées dans l'adhérence et la migration cellulaires. Des travaux ont démontré qu'un traitement au fénofibrate diminue la migration de cellules de mélanomes (Grabacka *et coll*, 2004; Grabacka *et coll*, 2006). La migration des cellules endothéliales est également réduite en présence de fénofibrate (Varet *et coll*, 2003). Les activateurs de PPARα comme le fénofibrate ou le Wy14,643 inhibent de manière significative la migration induite par le VEGF de cellules

endothéliales humaines de la veine ombilicale, de façon dose-dépendante. Dans ce modèle, la phosphorylation de Akt, induite par VEGF, est inhibée à la fois par les agonistes de PPARα and γ (Goetze *et coll*, 2002).

Nous avons démontré qu'un traitement court avec le fénofibrate, associé à l'acide 9-cis rétinoïque, augmente l'activité de la MMP9 après 24 heures, contrairement à de précédents travaux. En effet, une diminution de la sécrétion de la MMP9 a été observée dans les cellules musculaires lisses traitées avec le Wy14,643, induisant une plus faible capacité migratoire de ces cellules (Zahradka *et coll*, 2006). Des résultats identiques ont été obtenus avec les cellules monocytiques humaines THP-1, qui sécrètent moins de MMP9 après activation de PPARα par le fénofibrate (Shu *et coll*, 2000; Rival *et coll*, 2004). Lin *et coll* (2006) ont démontré que le fénofibrate peut réduire l'activité des MMP2 et 9 induite par le TNFα, dans les cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (Lin *et coll*, 2006).

Nos travaux indiquent qu'une exposition prolongée des cellules HT29 au fénofibrate induit l'expression de l'intégrine α5, comme dans le cadre d'un traitement chronique avec les TZD, ainsi qu'une légère augmentation de l'expression de l'intégrine β1. Une expression ou une fonction altérée de l'intégrine β1 permet aux cellules PC9-f9, dérivant d'un adénocarcinome pulmonaire et hautement invasives, d'être davantage adhésives et invasives, conduisant à un potentiel métastatique accru (Takenaka *et coll*, 2000). En l'absence de la fonction de l'intégrine β1 dans le modèle transgénique murin de carcinogenèse pancréatique Rip1Tag2, la dissémination des cellules tumorales est augmentée (Kren *et coll*, 2007).

Les différents agonistes de PPARα et γ ont ensuite été testés *in vivo*. Les TZD (pioglitazone et rosiglitazone) diminuent le volume tumoral, *via* un effet cytostatique, puisque les taux apoptotiques restent inchangés et que le taux de prolifération est diminué jusqu'à 20% dans certains cas. La formation des métastases à distance (poumons, foie) est inhibée. Nos résultats soulignent les différences à prendre en compte entre les observations faites *in vitro* et les résultats obtenus *in vivo* avec des cellules colorectales greffées à des souris *nude* (Sarraf *et coll*, 1998). Plusieurs études ont démontré le rôle protecteur d'un traitement oral de ces animaux avec des TZD ; la croissance de la tumeur primaire étant toujours réduite. Récemment, il a été montré que les métastases de cellules colorectales dans les ganglions lymphatiques et les poumons sont limitées si l'alimentation des souris contient un agoniste (Yoshizumi *et coll*, 2004) ou un antagoniste (Bocca *et coll*, 2007) de PPARγ. Ces effets impliquent différents mécanismes possibles comme la modification de la formation de la matrice extracellulaire. Pour exemple, la fibronectine augmente la croissance des cellules de carcinome pulmonaire *via* la production de

prostaglandine E2 par la cyclooxygenase-2 (Han *et coll*, 2004). L'expression et le dépôt de fibronectine sont inhibés lorsque les cellules sont traitées avec des ligands de PPARγ (Han *et coll*, 2005). Des résultats similaires ont été obtenus dans les cellules mésengiales (Guo *et coll*, 2004) et les cellules étoilées (Galli *et coll*, 2002) chez la souris et le rat, respectivement. Dans l'étude de Galli *et coll*, la synthèse et le dépôt de collagène sont également inhibés. D'autres mécanismes impliquent une altération de l'angiogenèse après activation des récepteurs PPARα et γ (Panigrahy *et coll*, 2002; Varet *et coll*, 2003). Par contre, Choi *et coll* montrent que les ligands de PPARγ comme la pioglitazone ou le 15Δ-PGJ2 ont un effet prolifératif *in vitro*. *In vivo*, la pioglitazone augmente la croissance tumorale des cellules HT29 greffées en hétérotopique (Choi *et coll*, 2008). Le fénofibrate a également un effet cytostatique sur les cellules tumorales, mais moins marqué que les TZD et reste moins efficace dans la prévention de la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme. Des résultats contraires ont été obtenus dans le cas de greffes orthotopiques de mélanomes chez des hamsters Bomirski, traités oralement avec du fénofibrate. En effet, une plus faible incidence des métastases pulmonaires a été observée, mais sans modification du volume de la tumeur primaire (Grabacka *et coll*, 2004). *In vivo*, les 2 TZD n'influencent pas de la même manière l'expression des marqueurs de différenciation. En effet, une augmentation de l'expression de la cytokératine 20, de la cadhérine E est obtenue en présence de pioglitazone, alors que seule l'expression de la cadhérine E est accrue avec la rosiglitazone. Une augmentation de l'expression de la cadhérine E dans le cadre de ces 2 traitements pourrait expliquer l'absence de métastases à distance dans ces conditions. Ainsi, les travaux de Yoshizumi *et coll* ont montré que le traitement de souris *nude*, greffées avec des cellules HT29 au niveau rectal, avec des TZD, augmente l'expression de la cadhérine E, inhibe la formation des métastases et la croissance tumorale (Yoshizumi *et coll*, 2004). Un élément de réponse à PPARγ, ou PPRE, a été identifié au niveau du promoteur du gène codant cette cadhérine, et la fixation du récepteur nucléaire sur ces séquences a été confirmée par EMSA (Annicotte *et coll*, 2006). L'effet le plus remarquable de cette étude *in vivo* reste l'abolition de la formation tumorale dans le groupe des souris traitées en prévention avec la pioglitazone. Une chémoprévention PPARγ-dépendante du cancer gastrique par la troglitazone a également été démontrée chez la souris (Lu *et coll*, 2005). Par contre, d'autres travaux indiquent que ce sont les antagonistes de PPARγ qui inhibent la migration et l'invasion des cellules HT29 chez les souris SCID (Schaefer *et coll*, 2007). Toutefois, ces effets pourraient être PPARγ-indépendants puisque l'utilisation de siRNA dirigés contre PPARγ ne reproduit pas ces résultats.

L'inhibition de la migration et de l'invasion de cellules de gliomes fait d'ailleurs appel à un mécanisme PPARγ-indépendant (Coras *et coll*, 2007).

L'expression d'un marqueur de cellules mésenchymateuses, la vimentine, dans certaines tumeurs obtenues *in vivo*, indépendamment du traitement administré, pourrait indiquer que les agonistes des PPAR limitent des phases plus tardives de la migration des cellules cancéreuses, et non la transition épithélio-mésenchymateuse.

L'absence d'expression de l'intégrine α5 au sein des tumeurs devra être confirmée. Le cas échéant, cela pourrait souligner l'influence considérable du microenvironnement sur la réponse des cellules cancéreuses aux traitements.

Les modifications que nous avons observées à la surface des cellules HT29 pourraient refléter une adaptation à une variation du dépôt de la MEC ou être associées au processus métastatique lui-même. En outre, des modifications de l'expression protéique à la surface des cellules peuvent être la conséquence de l'activation de l'isotype PPARα et/ou γ (Murad *et coll*, 2006). Ces changements dépendent de la nature de la drogue, et pourraient modifier le processus de migration cellulaire.

En conclusion, nous avons démontré qu'une exposition aux agonistes des PPAR modifie l'expression de protéines impliquées dans l'adhérence et la migration des cellules HT29, en particulier lorsque les cellules sont traitées de façon chronique avec chaque agoniste. Ce traitement a la particularité d'induire l'expression de l'intégrine α5, normalement absente dans les cellules HT29. De plus, un effet protecteur de ces agonistes a été observé *in vivo* dans des modèles de greffes orthotopiques de cellules HT29 chez la souris *nude*. L'effet le plus remarquable de cette étude reste l'abolition de la croissance et de la dissémination des cellules HT29 dans le cadre d'un traitement préventif avec la pioglitazone. Ces résultats confirment le fait que les agonistes des PPAR, et notamment la pioglitazone, pourraient s'avérer intéressants dans le traitement du cancer du colon, en association avec les thérapies actuelles.

VII. PERSPECTIVES

De nombreuses perspectives sont envisageables pour ce projet.

- Dans un premier temps, il conviendrait de compléter l'étude de l'activation de PPARγ : un génotypage des cellules HT29 traitées de façon chronique permettrait de vérifier l'existence potentielle de modifications chromosomiques expliquant les différences phénotypiques de ces cellules *versus* les cellules non traitées ou exposées

à court terme aux thiazolidinediones. Les cellules cultivées à long terme avec les agonistes de PPARγ, dont l'expression de certaines molécules impliquées dans l'adhérence et la migration est modifiée, seront greffées à des souris *nude* en orthotopique, dans le but d'observer leur capacité migratoire, notamment.

- Des ARN interférents dirigés contre PPARγ en général ou chacune de ses isoformes en particulier devront être utilisés afin de rechercher le rôle spécifique de PPARγ1 et γ2 dans l'adhérence et la migration des cellules HT29. Une surexpression de chaque isoforme sera également testée.
- L'étude du rôle de PPARγ et α sera complétée par les tests de migration et d'adhérence sur fibronectine (ligand de l'intégrine α5β1) et sur laminine (dans le cas du traitement par le fénofibrate).
- Des travaux récemment effectués au laboratoire ont montré que les thiazolidinediones et le fénofibrate peuvent influencer le statut oxydant des cellules HT29. Ces résultats préliminaires devront être confirmés et approfondis, notamment par l'étude des marqueurs de stress oxydant sur les tumeurs prélevées à la suite des greffes orthotopiques.
- Enfin, peu d'études montrent le rôle de PPARβ dans la migration cellulaire. Certaines ont montré qu'il est impliqué dans la migration des kératinocytes (Tan *et coll*, 2007). Nos résultats ont montré que certains effets ne semblent pas spécifiques d'un isotype de PPAR ; la participation de PPARβ pourrait donc être vérifiée.

VIII. BIBLIOGRAPHIE

ABDOLLAHI A., SCHWAGER C., KLEEFF J., ESPOSITO I., DOMHAN S., PESCHKE P., HAUSER K., HAHNFELDT P., HLATKY L., DEBUS J., PETERS J. M., FRIESS H., FOLKMAN J. and HUBER P. E.
Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer
Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, ***104****: 12890-5.*

ADAMS M., REGINATO M., SHAO D., LAZAR M. and CHATTERJEE V.
Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor γ is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site
J Biol Chem, 1997, ***272****: 5128-32.*

AIELLO A., PANDINI G., FRASCA F., CONTE E., MURABITO A., SACCO A., GENUA M., VIGNERI R. and BELFIORE A.
Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma agonists induce partial reversion of epithelial-mesenchymal transition in anaplastic thyroid cancer cells
Endocrinology, 2006, ***147****: 4463-75.*

AKAHOSHI T., NAMAI R., MURAKAMI Y., WATANABE M., MATSUI T., NISHIMURA A., KITASATO H., KAMEYA T. and KONDO H.
Rapid induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human monocytes by monosodium urate monohydrate crystals
Arthritis Rheum, 2003, ***48****: 231-9.*

AMRI E. Z., BONINO F., AILHAUD G., ABUMRAD N. A. and GRIMALDI P. A.
Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors
J Biol Chem, 1995, ***270****: 2367-71.*

ANNICOTTE J. S., IANKOVA I., MIARD S., FRITZ V., SARRUF D., ABELLA A., BERTHE M. L., NOEL D., PILLON A., IBORRA F., DUBUS P., MAUDELONDE T., CULINE S. and FAJAS L.
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates E-cadherin expression and inhibits growth and invasion of prostate cancer
Mol Cell Biol, 2006, ***26****: 7561-74.*

ARBOLEDA M., LYONS J., KABBINAVAR F., BRAY M., SNOW B., AYALA R., DANINO M., KARLAN B. and SLAMON D.
Overexpression of Akt2/ protein kinase Bb leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells
Cancer Res, 2003, ***63****: 196-206.*

AUBOEUF D., RIEUSSET J., FAJAS L., VALLIER P., FREING V., RIOU J., LAVILLE M., AUWERX J. and VIDAL H.
Tissue distribution and quantification of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-α in humans: no alterations in adipose tissue and NIDDM patients
Diabetes, 1997, ***46****: 1319-27.*

BARGER P., BRANDT J., LEONE T., WEINHEIMER C. and KELLY D.
Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-α during cardiac hypertrophic growth
J Clin Invest, 2000, ***105****: 1723-30.*

BATES R., BELLOVIN D., BROWN C., MAYNARD E., WU B., KAWAKATSU H., SHEPPARD D., OETTGEN P. and MERCURIO A.
Transcriptional activation of integrin β6 during the epithelia-mesencymal transition defined a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma

J Clin Invest, 2005, 115: 339-47.

BATES R. C. and MERCURIO A. M.
The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression
Cancer Biol Ther, 2005, 4: 365-70.

BERGER J., AKIYAMA T. and MEINKE P.
PPARs: therapeutic targets for metabolic desease
Trends Pharmacol Sci, 2005, 26: 244-51.

BISHOP-BAILEY D.
Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system
Br J Pharmacol, 2000, 129: 823-34.

BIYI A., DOUHOU A., ZEKRI A., CAOUI M. and BENRAIS N.
Le processus métastatique
Medecine du Maghreb, 2001, 90: 5-15.

BLANQUART C., MANSOURI R., FRUCHART J. C., STAELS B. and GLINEUR C.
Different ways to regulate the PPARalpha stability
Biochem Biophys Res Commun, 2004, 319: 663-70.

BOCCA C., BOZZO F., FRANCICA S., COLOMBATTO S. and MIGLIETTA A.
Involvement of PPARgamma and E-cadherin/bcatenin pathway in the antiproliferative effect of conjugated linoleic acid in MCF-7 cells
Int J Cancer, 2007, 121: 248-56.

BRAISSANT O., FOUFELLE F., SCOTTO C., DAUCA M. and WAHLI W.
Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat
Endocrinology, 1996, 137: 354-66.

BROCKMAN J. A., GUPTA R. A. and DUBOIS R. N.
Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells
Gastroenterology, 1998, 115: 1049-55.

BUCK E., EYZAGUIRRE A., BARR S., THOMPSON S., SENNELLO R., YOUNG D., IWATA K. K., GIBSON N. W., CAGNONI P. and HALEY J. D.
Loss of homotypic cell adhesion by epithelial-mesenchymal transition or mutation limits sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition
Mol Cancer Ther, 2007, 6: 532-41.

CAMP H. S., TAFURI S. R. and LEFF T.
c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and nagtively regulates its transcriptional activity
Endocrinology, 1999, 140: 392-7.

CHAWLA A. and LAZAR M. A.
Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival
Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91: 1786 - 90.

CHEDOTAL A., KERJEAN G. and MOREAU-FAUVARQUE C.
The brain within the tumor: new roles for axon guidance molecules in cancers
Cell Death Differ, 2005, 12: 1044-56.

CHEN D., MA H., HONG H., KOH S., HUANG S., SCHURTER B. and AL E.
Regulation of transcription by a protein methyltransferase
Science, 1999, 284: 2174-7.

CHEN F., LAW S. W. and O'MALLEY B. W.

Identification of two mPPAR related receptors and evidence for the existence of five subfamily members
Biochem Biophys Res Commun, 1993, 196: 671 - 7.

CHEN G. G., LEE J. F., WANG S. H., CHAN U. P., IP P. C. and LAU W. Y.
Apoptosis induced by activation of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma is associated with Bcl-2 and NF-kappaB in human colon cancer
Life Sci, 2002, 70: 2631-46.

CHEN Y., WANG S., WU J. and HUANG S.
Effect of PPARγ agonists on cell survival and focal adhesions in a Chinese Thyroid carcinoma cell line
J Cell Biochem, 2006, 98: 1021-35.

CHOI I., KIM Y., KIM J. and SEO J.
PPAR-gamma ligand promotes the growth of APC-mutated HT29 human colon cancer cells in vitro and in vivo
Invest New drugs, 2008, 26: 283-8.

CHOMCZYNSKI P. and SACCHI N.
Single-step method of RNA isolation by acid guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction
Analytical Biochemistry, 1987, 162: 156-9.

CHUI P., GUAN H., LEHRKE M. and LAZAR M.
PPARγ regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor1
J Clin Invest, 2005, 115: 2244-56.

COLLET P., DOMENJOUD L., DEVIGNES M. D., MURAD H., SCHOHN H. and DAUCA M.
The human semaphorin 6B gene is down regulated by PPARs
Genomics, 2004, 83: 1141-50.

COMPE E., DRANE P., LAURENT C., DIDERICH K., BRAUN C., HOEIJMAKERS J. H. and EGLY J. M.
Dysregulation of the peroxisome proliferator-activated receptor target genes by XPD mutations
Mol Cell Biol, 2005, 25: 6065-76.

CORAS R., HOLSKEN A., SEUFERT S., HAUKE J., EYUPOGLU I. Y., REICHEL M., TRANKLE C., SIEBZEHNRUBL F. A., BUSLEI R., BLUMCKE I. and HAHNEN E.
The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist troglitazone inhibits transforming growth factor-beta-mediated glioma cell migration and brain invasion
Mol Cancer Ther, 2007, 6: 1745-54.

DAIKOKU T., TRANGUCH S., CHAKRABARTY A., WANG D., KHABELE D., ORSULIC S., MORROW J. D., DUBOIS R. N. and DEY S. K.
Extracellular signal-regulated kinase is a target of cyclooxygenase-1-peroxisome proliferator-activated receptor-delta signaling in epithelial ovarian cancer
Cancer Res, 2007, 67: 5285-92.

DESVERGNE B. and WAHLI W.
Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism
Endocr Rev, 1999, 20: 649-88.

DEVCHAND P. R., KELLER H., PETERS J. M., VAZQUEZ M., GONZALEZ F. J. and WAHLI W.
The PPAR alpha-leukotriene B-4 pathway to inflammation control
Nature, 1996, 384: 39-43.

DI-POI N., MICHALIK L., TAN N. S., DESVERGNE B. and WAHLI W.
The anti-apoptotic role of PPARbeta contributes to efficient skin wound healing
J Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 85: 257-65.

DIRADOURIAN C., GIRARD J. and PEGORIER J. P.
Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance
Biochimie, 2005, 87: 33-8.

DOWELL P., ISHMAEL J. E., AVRAM D., PETERSON V. J., NEVRIVY D. J. and LEID M.
p300 functions as a coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha
J Biol Chem, 1997, 272: 33435-43.

DREYER C., KREY G., KELLER H., GIVEL F., HELFTENBEIN G. and WAHLI W.
Control of the peroxisomal β-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors
Cell, 1992, 68: 879-87.

DUBOIS R. N., GUPTA R., BROCKMAN J., REDDY B. S., KRAKOW S. L. and LAZAR M. A.
The nuclear eicosanoid receptors, PPARgamma, is aberrantly expressed in colonic cancers
Carcinogenesis, 1998, 19: 49-53.

ELBRECHT A., CHEN Y., CULLINAN C., HAYES N., LEIBOWITZ M., MOLLER D. and BERGER J.
Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator-activated receptors γ1 and γ2
Biochem Biophys Res Commun, 1996, 224: 431-7.

ELSTNER E., MULLER C., KOSHIZUKA K., WILLIAMSON E. A., PARK D., ASOU H., SHINTAKU P., SAID J. W., HEBER D. and KOEFFLER H. P.
Ligands for peroxisome proliferator-activated receptory and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice
Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95: 8806-11.

ESCHER P., BRAISSANT O., BASU-MODAK S., MICHALIK L., WAHLI W. and DESVERGNE B.
Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding
Endocrinology, 2001, 142: 4195-202.

ESCHER P. and WAHLI W.
Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions
Mutation Res, 2000, 448: 121-38.

FAJAS L., AUBOEUF D., RASPE E., SCHOONJANS K., LEFEBVRE A. M., SALADIN R., NAJIB J., LAVILLE M., FRUCHART J. C., DEEB S., VIDALPUIG A., FLIER J., BRIGGS M. R., STAELS B., VIDAL H. and AUWERX J.
The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR gamma gene
J Biol Chem, 1997, 272: 18779-89.

FARROW B. and EVERS B. M.
Activation of PPARgamma increases PTEN expression in pancreatic cancer cells
Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301: 50-3.

FEIGE J. N., GELMAN L., TUDOR C., ENGELBORGHS Y., WAHLI W. and DESVERGNE B.
Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand
J Biol Chem, 2005, 280: 17880-90.

FERRUZZI P., CENI E., TAROCCHI M., GRAPPONE C., MILANI S., GALLI A., FIORELLI G., SERIO M. and MANNELLI M.
Thiazolidinediones ihnibit growth and invasiveness of the human adrenocortical cell line H295R
J Endocrinol Metab, 2005, 90: 1332-9.

FLANAGAN J., MI L., CHRUSZCZ M., CYMBROWSKI M., CLINES K., KIM Y., MINOR W., RASTINEJAD F. and KOHRASANIZADEH S.
Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail
Nature, 2005, 438: 1181-5.

FLOYD Z. E. and STEPHENS J. M.
Control of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 stability and activity by SUMOylation
Obes Res, 2004, 12: 921-8.

FORMAN B. M., TONTONOZ P., CHEN J., BRUN R. P., SPIEGELMAN B. M. and EVANS R. M.

15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin j(2) is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma
Cell, 1995, 83: 803-12.

FOURNIER T., PAVAN L., TARRADE A., SCHOONJANS K., AUWERX J., ROCHETTE-EGLY C. and EVAIN-BRION D.
The role of PPAR-gamma/RXR-alpha heterodimers in the regulation of human trophoblast invasion
Ann N Y Acad Sci, 2002, 973: 26-30.

FRANCOIS M., RICHETTE P., TSAGRIS L., RAYMONDJEAN M., FULCHIGNONI-LATAUD M. C., FOREST C., SAVOURET J. F. and CORVOL M. T.
Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma down-regulates chondrocyte matrix metalloproteinase-1 via a novel composite element
J Biol Chem, 2004, 279: 28411-8.

FREED M. I., ALLEN A., JORKASKY D. K. and DICICCO R. A.
Systemic exposure to rosiglitazone is unaltered by food
Eur J Clin Pharmacol, 1999, 55: 53-6.

FRICK M. H., ELO O., HAAPA K., HEINONEN O. P., HEINSALMI P., HELO P., HUTTUNEN J. K., KAITANIEMI P., KOSKINEN P., MANNINEN V. and ET AL.
Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease
N Engl J Med, 1987, 317: 1237-45.

FRISCH S. M. and SCREATON R. A.
Anoikis mechanisms
Curr Opin Cell Biol, 2001, 13: 555-62.

FU M., RAO M., BOURAS T., WANG C., WU K., ZHANG X., LI Z., YAO T. and PESTELL R.
Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma- mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment
J Biol Chem, 2005, 280: 16934-41.

GALLI A., CENI E., CRABB D. W., MELLO T., SALZANO R., GRAPPONE C., MILANI S., SURRENTI E., SURRENTI C. and CASINI A.
Antidiabetic thiazolidinediones inhibit invasiveness of pancreatic cancer cells via PPAR{gamma} independent mechanisms
Gut, 2004, 53: 1688-97.

GALLI A., CRABB D., CENI E., RACHEZ C., SALZANO R., MELLO T., SVEGLIATI-BARONI G., RIDOLFI F., TROZZI L., SURRENTI C. and CASINI A.
Antidiabetic thiazolidinidiones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro
Gastroenterology, 2002, 122: 1924-40.

GAN X., WONG B., WRIGHT S. and CAI T.
Production of matrix metalloproteinase-9 in Caco2 cells in response to inflammatori stimuli
J Interferon Cytokine Res, 2001, 21.

GANGOPADHYAY A., LAZURE D. and THOMAS P.
Adhesion of colorectal carcinoma cells to the endothelium is mediated by cytokines from CEA stimulated Kupffer cells
Clin Exp Metastasis, 1998, 16: 703-12.

GASIC G. J., GASIC T. B., GALANTI N., JOHNSON T. and MURPHY S.
Platelet-tumor-cell interactions in mice. The role of platelets in the spread of malignant disease
Int J Cancer, 1973, 11: 704-18.

GEARING K. L., GÖTTLICHER M., TEBOUL M., WIDMARK E. and GUSTAFSSON J.-A.
Interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor and 9-cis retinois acid (RXR) receptor
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1993, 90: 1440-4.

GELMAN L., ZHOU G., FAJAS L., RASPE E., FRUCHART J. C. and AUWERX J.
p300 interacts with the N- and C-terminal part of PPARgamma2 in a ligand-independent and -dependent manner, respectively
*J Biol Chem, 1999, **274**: 7681-8.*

GILL G.
SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?
*Genes Dev, 2004, **18**: 2046-59.*

GIRNUN G., SMITH W., DRORI S., SARRAF P., MUELLER E., ENG C., NAMBIAR P., ROSENBERG D., BRONSON R., EDELMANN W., KUCHERLAPATI R., GONZALEZ F. and SPIEGELMAN B.
APC-dependent supression of colon carcinogenesis by PPARγ
*Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, **99**: 13771-6.*

GIZARD F., AMANT C., BARBIER O., BELLOSTA S., ROBILLARD R., PERCEVAULT F., SEVESTRE H., KRIMPENFORT P., CORSINI A., ROCHETTE J., GLINEUR C., FRUCHART J. C., TORPIER G. and STAELS B.
PPAR alpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation underlying intimal hyperplasia by inducing the tumor suppressor p16INK4a
*J Clin Invest, 2005, **115**: 3228-38.*

GLINGHAMMAR B., SKOGSBERG J., HAMSTEN A. and EHRENBORG E.
PPARdelta activation induces COX-2 gene expression and cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells
*Biochem Biophys Res Commun, 2003, **308**: 361-8.*

GOETZE S., EILERS F., BUNGENSTOCK A., KINTSCHER U., STAWOWY P., BLASCHKE F., GRAF K., LAW R. E., FLECK E. and GRAFE M.
PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt
*Biochem Biophys Res Commun, 2002, **293**: 1431-7.*

GONZALEZ F.
The role of peroxisome proliferator activated receptor α in the peroxisome proliferation, physiological homeostasis, and chemical carcinogenesis
*Adv Exp Med Biol, 1997, **422**: 109-25.*

GÖTTLICHER M., WIDMARK E., LI Q. and GUSTAFSSON J. A.
Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor
*Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, **89**: 4653-7.*

GRABACKA M., PLACHA W., PLONKA P. M., PAJAK S., URBANSKA K., LAIDLER P. and SLOMINKI A.
Inhibition of melanoma metastases by fenofibrate
*Arch Dermatol Res, 2004, **296**: 54-8.*

GRABACKA M., PLONKA P. M., URBANSKA K. and REISS K.
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation decreases metastatic potential of melanoma cells in vitro via down-regulation of Akt
*Clin Cancer Res, 2006, **12**: 3028-36.*

GREENE M. E., BLUMBERG B., KWAN K., GREENE G. L. and NIMER S. D.
Isolation and cloning of human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA
*Adv Exp Med Biol, 1997, **400A**: 253-60.*

GRILLE S., BELLACOSA A., UPSON J., KLEIN-SZANTO A., VANROY F., LEE-KWON W., DONOWITZ M., TSICHLIS P. and LARUE L.
The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes
enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines
*Cancer Res, 2003, **63**: 2172-8.*

GROMMES C., LANDRETH G. E. and HENEKA M. T.
Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists
*Lancet Oncol, 2004, **5**: 419-29.*

GROSSMAN S. R., DEATO M. E., BRIGNONE C., CHAN H. M., KUNG A. L., TAGAMI H., NAKATANI Y. and LIVINGSTON D. M.
Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300
*Science, 2003, **300**: 342-4.*

GRUNERT S., JECHLINGER M. and BEUG H.
Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis
*Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, **4**: 657-65.*

GUAN H. P., ISHIZUKA T., CHUI P. C., LEHRKE M. and LAZAR M. A.
Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes
*Genes Dev, 2005, **19**: 453-61.*

GUAN Y. F., ZHANG Y. H., BREYER R. M., DAVIS L. and BREYER M. D.
Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human transitional bladder cancer and its role in inducing cell death
*Neoplasia, 1999, **1**: 330-9.*

GUO B., KOYA D., ISONO M., SUGIMOTO T., KASHIWAGI A. and HANEDA M.
Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit TGF-beta 1-induced fibronectin expression in glomerular mesangial cells
*Diabetes, 2004, **53**: 200-8.*

GUPTA R., BROCKMAN J., SARRAF P., WILLSON T. and DUBOIS R.
Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor γ in colorectal cancer cells
*J Biol Chem, 2001, **276**: 29681-7.*

GUPTA R., SARRAF P., MUELLER E., BROCKMAN K., PRUSKIEWICZ J., ENG C., WILLSON T. and DUBOIS R.
PPARγ mediated differentiation: a mutation in colon cancer cells reveals divergent and cell-type specific mechanisms
*J Biol Chem, 2003, **279**: feb.*

GUPTA R. A., TAN J., KRAUSE W. F., GERACI M. W., WILLSON T. M., DEY S. K. and DUBOIS R. N.
Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer
*Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, **97**: 13275-80.*

GUPTA R. A., WANG D., KATKURI S., WANG H., DEY S. K. and DUBOIS R. N.
Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-delta accelerates intestinal adenoma growth
*Nat Med, 2004, **10**: 245-7.*

HAIER J. and NICOLSON G.
Tumor cell adhesion of human colon carcinoma cells with different metastatic properties to extracellular matrix under dynamic conditions of laminar flow
*J Cancer Res Clin Oncol, 2000, **126**: 699-706.*

HAMILTON J. A.
Fatty acid interactions with proteins: what X-ray crystal and NMR solution structures tell us
*Prog Lipid Res, 2004, **43**: 177-99.*

HAN S., RITZENTHALER J., RIVERA H. and ROMAN J.
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress fibronectin gene expression in human lung carcinoma cells: involment of both CRE and Sp1
*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, **289**: L419-L28.*

HAN S., RIVERA H. N. and ROMAN J.
Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit α5 integrin gene transcription in non-small cell lung carcinoma cells
Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 32: 350-9.

HAN S., SIDELL N., ROSER-PAGE S. and ROMAN J.
Fibronectin stimulates human lung carcinoma cell growth by inducing cyclooxygenase-2 (COX-2) expression
Int J Cancer, 2004, 111: 322-31.

HANSEN J. B., ZHANG H., RASMUSSEN T. H., PETERSEN R. K., FLINDT E. N. and KRISTIANSEN K.
Peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPARδ) mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling
J Biol Chem, 2001, 276: 3175-82.

HARMAN F. S., NICOL C. J., MARIN H. E., WARD J. M., GONZALEZ F. J. and PETERS J. M.
Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis
Nat Med, 2004, 10: 481-3.

HAUSER S., ADELMANT G., SARRAF P., WRIGHT H. M., MUELLER E. and SPIEGELMAN B. M.
Degradation of the the peroxisome proliferator-activated receptor γ is linked to ligand-dependent activation
J Biol Chem, 2000, 275: 18527-33.

HAWKINS J. M., JONES W. E., BONNER F. W. and GIBSON G. G.
The effect of peroxisome proliferators on microsomal, peroxisomal, and mitochondrial enzyme activities in the liver and the kidney
Drug Metabol Rev, 1987, 18: 441-515.

HAY R. T.
SUMO: a history of modification
Mol Cell, 2005, 18: 1-12.

HE T., CHAN T., VOGELSTEIN B. and KINZLER K.
PPARδ is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs
Cell, 1999, 99: 335-45.

HEANEY A. P.
Novel pituitary ligands: peroxisome proliferator activating receptor-gamma
Pituitary, 2003, 6: 153-9.

HEBBAR P. B. and ARCHER T. K.
Chromatin remodeling by nuclear receptors
Chromosoma, 2003, 111: 495-504.

HERMANSON O., JEPSEN K. and ROSENFELD M.
N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes
Nature, 2002, 419: 934-49.

HERRERA L., KAKATI S., GIBAS L., PIETRZAK E. and SANDBERG A. A.
Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q
Am J Med Genet, 1986, 25: 473-6.

HERSHKO A. and CIECHANOVER A.
The ubiquitin system
Annu Rev Biochem, 1998, 67: 425-79.

HIROTANI M., TSUKAMOTO T., BOURDEAUX J., SADANO H. and OSUMI T.
Stabilization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by the ligand
Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288: 106-10.

HU E. D., KIM J. B., SARRAF P. and SPIEGELMAN B. M.

Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR gamma
Science, 1996, 274: 2100-3.

IJPENBERG A., TAN N. S., GELMAN L., KERSTEN S., SEYDOUX J., XU J., METZGER D., CANAPLE L., CHAMBON P., WAHLI W. and DESVERGNE B.
In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers
Embo J, 2004, 23: 2083-91.

ISSEMAN I. and GREEN S.
Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators
Nature, 1990, 347: 645 - 50.

JIA Y., QI C., KASHIREDDI P., SURAPUREDDI S., ZHU Y. J., RAO M. S., LE ROITH D., CHAMBON P., GONZALEZ F. J. and REDDY J. K.
Transcription coactivator PBP, the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein, is required for PPARalpha-regulated gene expression in liver
J Biol Chem, 2004, 279: 24427-34.

JONAS B. A. and PRIVALSKY M. L.
SMRT and N-CoR corepressors are regulated by distinct kinase signaling pathways
J Biol Chem, 2004, 279: 54676-86.

JUGE-AUBRY C., PERNIN A., FAVEZ T., BURGER A. G., WAHLI W., MEIER C. A. and DESVERGNE B.
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, 1997, 272: 25252-9.

JUGE-AUBRY C. E., HAMMER E., SIEGRIST-KAISER C., PERNIN A., TAKESHITA A., CHIN W. W., BURGER A. G. and MEIER C. A.
Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain
J Biol Chem, 1999, 274: 10505-10.

KALLENBERGER B. C., LOVE J. D., CHATTERJEE V. K. and SCHWABE J. W.
A dynamic mechanism of nuclear receptor activation and its perturbation in a human disease
Nat Struct Biol, 2003, 10: 136-40.

KATO M., KUSUMI T., TSUCHIDA S., TANAKA M., SASAKI M. and KUDO H.
Induction of differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in colon cancer cell lines by troglitazone
J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130: 73-9.

KELLER H., DREYER C., MEDIN J., MAHFOUDI A., OZATO K. and WAHLI W.
Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid-X receptor heterodimers
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1993, 90: 2160-4.

KIM D. J., AKIYAMA T. E., HARMAN F. S., BURNS A. M., SHAN W., WARD J. M., KENNETT M. J., GONZALEZ F. J. and PETERS J. M.
Peroxisome proliferator-activated receptor beta (delta)-dependent regulation of ubiquitin C expression contributes to attenuation of skin carcinogenesis
J Biol Chem, 2004, 279: 23719-27.

KIM S., BELL K., MOUSA S. A. and VARNER J. A.
Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin
Am J Pathol, 2000, 156: 1345-62.

KINTSCHER U., LYON C., WAKINO S., BRUEMMER D., FENG X., GOETZE S., GRAF K., MOUSTAKAS A., STAELS B., FLECK E., HSUEH W. A. and LAW R. E.

PPARalpha inhibits TGF-beta-induced beta5 integrin transcription in vascular smooth muscle cells by interacting with Smad4
*Circ Res, 2002, **91**: e35-44.*

KINZLER K. W. and VOLGENSTEIN B.
Lessons from hereditary colorectal cancer
*Cell, 1996, **87**: 159-70.*

KITAMURA S., MIYAZAKI Y., SHINOMURA Y., KONDO S., KANAYAMA S. and MATSUZAWA Y.
Peroxisome proliferator-activated receptor γ induces growth arrest and differenciation of human colon cancer cells
*Jornal of cancer Research, Japan, 1999, **90**: 75-80.*

KLIEWER S. A.
Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma
*Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, **94**: 4318-23.*

KLIEWER S. A., FORMAN B. M., BLUMBERG B., ONG E. S., BORGMEYER U., MANGELSDORF D. J., UMESONO K. and EVANS R. M.
Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptor
*Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1994, **91**: 7355-9.*

KNUTTI D., KRESSLER D. and KRALLI A.
Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor
*Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, **98**: 9713-8.*

KODERA Y., TAKEYAMA K., MURAYAMA A., SUZAWA M., MASUHIRO Y. and KATO S.
Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators
*J Biol Chem, 2000, **275**: 33201-4.*

KOEFFLER H. P.
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers
*Clin Cancer Res, 2003, **9**: 1-9.*

KOH S., CHEN D., LEE Y. and STALLCUP M.
Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities
*J Biol Chem, 2001, **276**: 1089-98.*

KOHNO H., SUZUKI R., SUGIE S. and TANAKA T.
Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands
*BMC Cancer, 2005, **5**: 46.*

KOHNO H., YOSHITANI S., TAKASHIMA S., OKUMURA A., HOSOKAWA M., YAMAGUCHI N. and TANAKA T.
Troglitazone, a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, inhibits chemically-induced aberrant crypt foci in rats
*Jornal of cancer Research, Japan, 2001, **92**: 396-403.*

KOMUVES L. G., HANLEY K., JIANG Y., ELIAS P. M., WILLIAMS M. L. and FEINGOLD K. R.
Ligands and activators of nuclear hormone receptors regulate epidermal differentiation during fetal rat skin development
*J Invest Dermatol, 1998, **111**: 429-33.*

KOMUVES L. G., HANLEY K., MAN M. Q., ELIAS P. M., WILLIAMS M. L. and FEINGOLD K. R.
Keratinocyte differentiation in hyperproliferative epidermis: topical application of PPARalpha activators restores tissue homeostasis
*J Invest Dermatol, 2000, **115**: 361-7.*

KORETZ K., BRÜDERLEIN S., HENNE C., FIETZ T., LAQUÉ M. and MÖLLER P.
Comparative evaluation of integrin alpha- and beta-chain expression in colorectal carcinoma cell lines and their tumours origin
Virchows Arch, 1994, 425: 229-36.

KREN A., BAERISWYL V., LEHEMBRE F., WUNDERLIN C., STRITTMATTER K., ANTONIADIS H., FASSLER R., CAVALLARO U. and CHRISTOFORI G.
Increased tumor cell dissemination and cellular senescence in the absence of beta1-integrin function
Embo J, 2007, 26: 2832-42.

KREY G., MAHFOUDI A. and WAHLI W.
Functionnal interactions of peroxisome proliferator-activated receptor, retinoid-X receptor, and SP1 in the transcriptional regulation of the acyl-coenzyme-A oxidase promoter
Mol. Endocrinology, 1995, 9: 219-31.

KROGSDAM A. M., NIELSEN C. A., S. N., HOLST D., HELLEDIE T., THOMSEN B., BENDIXEN C., MANDRUP S. and KRISTIANSEN K.
Nuclear receptor corepressor-dependent repression of peroxisome-proliferator-activated receptor delta-mediated transactivatioon
Biochem J, 2002, 363: 157-65.

KUBOTA T., KOSHIZUKA K., WILLIAMSON E. A., ASOU H., SAID J. W., HOLDEN S., MIYOSHI I. and KOEFFLEZ H. P.
Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo
Cancer Res, 1998, 58: 3344-52.

KUENZLI S. and SAURAT J. H.
Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous biology
Br J Dermatol, 2003, 149: 229-36.

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.
A phase II study of troglitazone, an activator of the PPARgamma receptor, in patients with chemotherapy-resistant metastatic colorectal cancer
Cancer J, 2002, 8: 395-9.

KUNG A. L., REBEL V. I., BRONSON R. T., CH'NG L. E., SIEFF C. A., LIVINGSTON D. M. and YAO T. P.
Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP
Genes Dev, 2000, 14: 272-7.

LAEMMLI E. K.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature, 1970, 227: 680-5.

LAMPEN A., LEIFHEIT M., VOSS J. and NAU H.
Molecular and cellular effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in enterocytes: effects on proliferation, differentiation, and gene expression
Biochim Biophys Acta, 2005, 1735: 30-40.

LAW R., MEEHAN W., XI X., GRAF K., WUTHRICH D., COATS W., FAXON D. and HSUEH W.
Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia
J Clin Invest, 1996, 98: 1897-905.

LAZENNEC G., CANAPLE L., SAUGY D. and WAHLI W.
Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators
Mol Endocrinol, 2000, 14: 1962-75.

LEBRASSEUR N. K., KELLY M., TSAO T. S., FARMER S. R., SAHA A. K., RUDERMAN N. B. and TOMAS E.

Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues
Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006, 291: E175-81.

LEE K., KIM H., KIM P., LEE H., MA K., PARK J., KIM D. and HAHN J.
Ox-LDL suppresses PMA-induced MMP-9 expression and activity through CD36-mediated activation of PPAR-γ
Exp Mol Med, 2004, 36: 534-44.

LEE S., JUNG S., KIM Y., NA S. and LEE J.
Two distinct nuclear receptor-interaction domains ans CREB-binding protein-dependent transactivation function of activating signal cointegrator-2
Mol Endocrinol, 2001, 15: 241-54.

LEFEBVRE A. M., CHEN I., DESREUMAUX P., NAJIB J., FRUCHART J. C., GEBOES K., BRIGGS M., HEYMAN R. and AUWERX J.
Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+mice
Nat Med, 1998, 4: 1053-7.

LEFF T.
AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins
Biochem Soc Trans, 2003, 31: 224-7.

LEHMANN J. M., MOORE L. B., SMITH-OLIVER T. A., WILKISON W. O., WILLSON T. M. and KLIEWER S. A.
An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)
J Biol Chem, 1995, 270: 12953-6.

LEMON B., INOUYE C., KING D. and TJIAN R.
Selectivity of chromatin-remodelling cofactors for ligand-activated transcription
Nature, 2001, 414: 924-8.

LENANDER C., ROBLICK U., HABERMANN J., OST A., TRYGGVASON K. and AUER G.
Laminin5 γ2-chain expression: a marker of early invasiveness in colorectal adenomas
2003, 2003, 56: 342-6.

LEWIS B. and REINBERG D.
The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation
J Cell Sci, 2003, 116: 3667-75.

LIM H. J., MOON I. and HAN K.
Transcriptional cofactors exhibit differential preference toward peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta in uterine cells
Endocrinology, 2004, 145: 2886-95.

LIN J., HANDSCHIN C. and SPIEGELMAN B.
Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators
Cell Metab, 2005, 1: 361-70.

LIN R., LIU J., GAN W., WANG W., HAN C., LIU Y. and FANG Z.
Fenofibrate inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced expression of CD40 and matrix metalloproteinase in human vascular endothelial cells.
Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2006, 26: 1383-7.

LIU H., ZANG C., FENNER M. H., POSSINGER K. and ELSTNER E.
PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro
Breast Cancer Res Treat, 2003, 79: 63-74.

LOCK E. A., MITCHELL A. M. and ELCOMBE C. R.

Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation
Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1989, 29: 145-63.

LOHI J., OIVULA J., KIVILAAKSO E., KIVILUOTO T., FRÖDMAN K., YAMADA Y., BURGESON R., LEIVO I. and VIRTANEN I.
Basement membrane laminin-5 is deposited in colorectal adenomas and carcinomas and serves as a ligand for α3β1 integrin
APMIS, 2000, 108: 161-72.

LOPEZ G. N., TURCK C. W., SCHAUFELE F., STALLCUP M. R. and KUSHNER P. J.
Growth factors signal to steroid receptors through mitogen-activated protein kinase regulation of p160 coactivator activity
J Biol Chem, 2001, 276: 22177-82.

LU J., IMAMURA K., NOMURA S., MAFUNE K., NAKAJIMA A., KADOWAKI T., KUBOTA N., TERAUCHI Y., ISHII G., OCHIAI A., ESUMI H. and KAMINISHI M.
Chemopreventive effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on gastric carcinogenesis in mice
Cancer Res, 2005, 65: 4769-74.

LY D., ZAZZALI K. and CORBETT S.
De novo expression of the integrin α5β1 regulates αVβ3- mediated adhesion and migration on fibronectin
J Biol Chem, 2003, 278: 21878-85.

MANDARD S., MULLER M. and KERSTEN S.
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes
Cell Mol Life Sci, 2004, 61: 393-416.

MANGELSDORF D., THUMMEL C., BEATO M., HERRLICH P., SCHUTZ G., UMESOMO K., BLUMBERG B., KASTNER P., MARK M., CHAMBON P. and EVANS R.
The nuclear receptor superfamily: the second decade
Cell, 1995, 83: 835-9.

MANSEN A., GUARDIOLA-DIAZ H., RAFTER J., BRANTING C. and GUSTAFSSON J. A.
Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in the mouse colonic mucosa
Biochem Biophys Res Commun, 1996, 222: 844-51.

MARIN H. E., PERAZA M. A., BILLIN A. N., WILLSON T. M., WARD J. M., KENNETT M. J., GONZALEZ F. J. and PETERS J. M.
Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta inhibits colon carcinogenesis
Cancer Res, 2006, 66: 4394-401.

MARTINASSO G., ORALDI M., TROMBETTA A., MAGGIORA M., BERTETTO O., CANUTO R. A. and MUZIO G.
Involvement of PPARs in Cell Proliferation and Apoptosis in Human Colon Cancer Specimens and in Normal and Cancer Cell Lines
PPAR Res., 2007, 2007: 93416.

MATSUURA H., ADACHI H., SMART R. C., XU X., ARATA J. and JETTEN A. M.
Correlation between expression of peroxisome proliferator-activated receptor beta and squamous differentiation in epidermal and tracheobronchial epithelial cells
Mol cell Endocrinol, 1999, 147: 85-92.

MCALPINE C. A., BARAK Y., MATISE I. and CORMIER R. T.
Intestinal-specific PPARgamma deficiency enhances tumorigenesis in ApcMin/+ mice
Int J Cancer, 2006, 119: 2339-46.

MCKENNA N. and O'MALLEY B.
Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators
Cell, 2002, 108.

MICHALIK L., DESVERGNE B., BASU-MODAK S., TAN N. S. and WAHLI W.
Nuclear hormone receptors and mouse skin homeostasis: implication of PPARbeta
Horm Res, 2000, 54: 263-8.

MICHALIK L., DESVERGNE B. and WAHLI W.
Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories
Nat Rev Cancer, 2004, 4: 61-70.

MISRA P., OWUOR E. D., LI W., YU S., QI C., MEYER K., ZHU Y. J., RAO M. S., KONG A. N. and REDDY J. K.
Phosphorylation of transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein (PBP). Stimulation of transcriptional regulation by mitogen-activated protein kinase
J Biol Chem, 2002, 277: 48745-54.

MONSALVE M., WU Z., ADELMANT G., PUIGSERVER P., FAN M. and SPIEGELMAN B.
Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1
Mol Cell, 2000, 6: 307-16.

MORIKANG E., BENSON S., KURTZ T. and PERSHADSINGH H.
Effects of thiazolidinediones on growth and differentiation of human aorta and coronary myocytes
Am J Hypertens, 1997, 10: 440-6.

MOSER A. R.
ApcMin: a mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis
Eur J Cancer, 1995, 31A: 1061-4.

MOSSNER R., SCHULZ U., KRUGER U., MIDDEL P., SCHINNER S., FUZESI L., NEUMANN C. and REICH K.
Agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit cell growth in malignant melanoma
J Invest Dermatol, 2002, 119: 576-82.

MOTOMURA W., NAGAMINE M., TANNO S., SAWAMUKAI M., TAKAHASHI N., KOHGO Y. and OKUMURA T.
Inhibition of cell invasion and morphological change by troglitazone in human pancreatic cancer cells
J Gastroenterol, 2004, 39: 461-8.

MUELLER E., SARRAF P., TONTONOZ P., EVANS R. M., MARTIN K. J., FLETCHER M., SINGER S. and SPIEGELMAN B. M.
Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR γ
Mol Cell, 1998, 1: 465-70.

MUKHERJEE R., STRASSER J., JOW L., HOENER P., PATERNITI J. R. and HEYMAN R. A.
RXR agonists activate PPARalpha-inducible genes, lower triglycerides, and raise HDL levels in vivo
Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998, 18: 272-6.

MURAD H., COLLET P., HUIN-SCHOHN C., AL-MAKDISSY N., KERJAN G., CHEDOTAL A., DONNER M., DEVIGNES M. D., BECUWE P., SCHOHN H., DOMENJOUD L. and DAUCA M.
Effects of PPAR and RXR ligands in semaphorin 6B gene expression of human MCF-7 breast cancer cells
Int J Oncol, 2006, 28: 977-84.

MUSCAT G., BURKE L. and DOWES M.
The co repressor N-CoR and its variat RIP13α and RIP13δ1 directly interact with the basal transcription factors TFIIB, TAFII32 and TAFII70
Nucleic Acids Res, 1998, 26.

NAKSHATRI H. and BHAT-NAKSHATRI P.
Multiple parameters determine the specificity of transcriptional response by nuclear receptors HNF-4, ARP-1, PPAR, RAR and RXR through common response elements
Nucleic Acids Res, 1998, 26: 2491-9.

NEUFELD G. and KESSLER O.
The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis
*Nat Rev Cancer, 2008, **x**: xx-yy.*

NIHO N., TAKAHASHI M., KITAMURA T., SHOJI Y., ITOH M., NODA T., SUGIMURA T. and WAKABAYASHI K.
Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Apc-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands
*Cancer Res, 2003, **63**: 6090-5.*

OHTA T., ELNEMR A., YAMAMOTO M., NINOMIYA I., FUSHIDA S., NISHIMURA G., FUJIMURA T., KITAGAWA H., KAYAHARA M., SHIMIZU K., YI S. and MIWA K.
Thiazolidinedione, apeorxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, modulates the E-cacherin/beta-catenin system in a human pancreatic cancer cell line, BxPC-3
*Int J Oncol, 2002, **21**: 37-42.*

ORIAN-ROUSSEAU V., ABERDAM D., ROUSSELLE P., MESSENT A., GAVRILOVIC J., MENEGUZZI G., KEDINGER M. and SIMON-ASSMANN P.
Human colonic cancer cells synthesize and adhere to laminin-5. Their adhesion to laminin-5 involves multiple receptors among which is integrin $\alpha 2\beta 1$
*J cell Sci, 1998, **111**: 1993-2004.*

OSAWA E., NAKAJIMA A., WADA K., ISHIMINE S., FUJISAWA N., KAWAMORI T., MATSUHASHI N., KADOWAKI T., OCHIAI M., SEKIHARA H. and NAKAGAMA H.
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice
*Gastroenterology, 2003, **124**: 361-7.*

OUYANG N., WILLIAMS J. L. and RIGAS B.
NO-donating aspirin isomers downregulate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)delta expression in APC(min/+) mice proportionally to their tumor inhibitory effect: Implications for the role of PPARdelta in carcinogenesis
*Carcinogenesis, 2006, **27**: 232-9.*

PALMER C. N., HSU M. H., GRIFFIN K. J., RAUCY J. L. and JOHNSON E. F.
Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver
*Mol Pharmacol, 1998, **53**: 14-22.*

PANIGRAHY D., SINGER S., SHEN L., BUTTERFIELD C., FREEDMAN D., CHEN E., MOSES M., KILROY S., DUENSING S., FLETCHER C., FLETCHER J., HLATKY L., HAHNFELDT P., FOLKMAN J. and KAIPAINEN A.
PPARγ ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis.
*J Clin Invest, 2002, **110**: 923-32.*

PARK B., VOGELSTEIN B. and KINZLER K.
Genetic disruption of PPARδ decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells
*Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, **98**: 2598-603.*

PASCUAL G., FONG A. L., OGAWA S., GAMLIEL A., LI A. C., PERISSI V., ROSE D. W., WILLSON T. M., ROSENFELD M. G. and GLASS C. K.
A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma
*Nature, 2005, **437**: 759-63.*

PAVAN L., TARRADE A., HERMOUET A., DELOUIS C., TITEUX M., VIDAUD M., THEROND P., EVAIN-BRION D. and FOURNIER T.
Human invasive trophoblasts transformed with simian virus 40 provide a new tool to study the role of PPARgamma in cell invasion process
*Carcinogenesis, 2003, **24**: 1325-36.*

PERISSI V., AGGARWAL A., GLASS C. K., ROSE D. W. and ROSENFELD M. G.
A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors
*Cell, 2004, **116**: 511-26.*

PERISSI V. and ROSENFELD M. G.
Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles
*Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, **6**: 542-54.*

PUIGSERVER P., ADELMANT G., WU Z., FAN M., XU J., O'MALLEY B. and SPIEGELMAN B. M.
Activation of PPARgamma Coactivator-1 through transcription factor docking
*Science, 1999, **286**: 1368-71.*

PUIGSERVER P., RHEE J., LIN J., WU Z., YOON J. C., ZHANG C. Y., KRAUSS S., MOOTHA V. K., LOWELL B. B. and SPIEGELMAN B. M.
Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1
*Mol Cell, 2001, **8**: 971-82.*

RANGWALA S. M. and LAZAR M. A.
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism
*Trends Pharmacol Sci, 2004, **25**: 331-6.*

REDDY J., AZARNOFF D. and HIGNITE C.
Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens
*Nature, 1980, **283**: 397-8.*

REDDY J. and RAO M.
Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis
*IARC, 1992, **116**: 225-35.*

RIGOT V., LEHMANN M., ANDRÉ F., DAEMI N., MARVALDI J. and LUIS J.
Integrin ligation and PKC activation are required for migration of colon carcinoma cells
*J Cell Sci, 1998, **111**: 3119-27.*

RIVAL Y., BENETEAU N., CHAPUIS V., TAILLANDIER T., LESTIENNE F., DUPONT-PASSELAIGUE E., PATOISEAU J. F., COLPAERT F. C. and JUNQUERO D.
Cardiovascular drugs inhibit MMP-9 activity from human THP-1 macrophages
*DNA Cell Biol, 2004, **23**: 283-92.*

ROEDER R.
Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells
*FEBS Lett, 2005, **579**.*

ROWAN B. G., WEIGEL N. L. and O'MALLEY B. W.
Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway
*J Biol Chem, 2000, **275**: 4475-83.*

RUMI M., SATO H., ISHIHARA S., KAWASHIMA K., HAMAMOTO S., KAZUMORI H., OKUYAMA T., FUKUDA R., NAGASUE N. and KINOSHITA Y.
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma
*Br J Cancer, 2001, **84**: 1640-7.*

SAEZ E., TONTONOZ P., NELSON M. C., ALVAREZ J. G., MING U. T., BAIRD S. M., THOMAZY V. A. and EVANS R. M.
Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation
*Nat Med, 1998, **4**: 1058-61.*

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., B.M. and SPIEGELMAN
Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma
*Nat Med, 1998, **4**: 1046-52.*

SASAKI T., FUJII K., YOSHIDA K., SHIMURA H., SASAHIRA T., OHMORI H. and KUNIYASU H.
Peritoneal metastasis inhibition by linoleic acid with activation of PPARgamma in human gastrointestinal cancer cells
*Virchows Arch, 2006, **448**: 422-7.*

SCHAEFER K. L., TAKAHASHI H., MORALES V. M., HARRIS G., BARTON S., OSAWA E., NAKAJIMA A. and SAUBERMANN L. J.
PPARgamma inhibitors reduce tubulin protein levels by a PPARgamma, PPARdelta and proteasome-independent mechanism, resulting in cell cycle arrest, apoptosis and reduced metastasis of colorectal carcinoma cells
*Int J Cancer, 2007, **120**: 702-13.*

SCHIRMER M., HERZBERG F., SCHMIDT R., STREIT M., SCHÖNING M., HUMMEL M., KAUFMANN C., THIEL E. and KREUSER E.
Integrin α5β1: a potent inhibitor of experimental lung metastasis
*Clin Exp Metastasis, 1998, **16**: 427-35.*

SCHLUTER K., GASSMANN P., ENNS A., KORB T., HEMPING-BOVENKERK A., HOLZEN J. and HAIER J.
Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential
*Am J Pathol, 2006, **169**: 1064-73.*

SCHMIDT A., ENDO N., RUTLEDGE S. J., VOGEL R., SHINAR D. and RODAN G. A.
Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acid
*Molecular Endocrinology, 1992, **6**: 1634-41.*

SCHMIDT R., STREIT M., KAISER R., HERZBERG F., SCHIRNER M., SCHRAMM K., KAUFMANN C., HENNEKEN M., SCHÄFER-KORTING M., THIEL E. and KREUSER E.
De novo Expression of the α5β1-fibronectin receptor in HT29 colon-cancer cells reduces activity of c-src. Increase of c-src activity by attachment on fibronectin
*Int J Cancer, 1998, **30**: 91-8.*

SCHOHN H., HUIN C., PASSILY P., COLLET P., LATRUFFE N., DOMENJOUD L. and DAUÇA M.
Peroxisome proliferator-activated receptors are key regulators in cell differentiation
*Recent Res Devel Lipids, 2001, **5**: 147-65.*

SCHÖLZEL S., ZIMMERMANN W., SCHWARZKOPF G., GRUNERT F., ROGACZEWSKI B. and THOMPSON J.
Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppsitely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas
*Am J Pathol, 2000, **156**: 595-605.*

SEREE E., VILLARD P. H., PASCUSSI J. M., PINEAU T., MAUREL P., NGUYEN Q. B., FALLONE F., MARTIN P. M., CHAMPION S., LACARELLE B., SAVOURET J. F. and BARRA Y.
Evidence for a new human CYP1A1 regulation pathway involving PPAR-alpha and 2 PPRE sites
*Gastroenterology, 2004, **127**: 1436-45.*

SHALEV A., SIEGRISTKAISER C. A., YEN P. M., WAHLI W., BURGER A. G., CHIN W. W. and MEIER C. A.
The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin.
*Endocrinology, 1996, **137**: 4499-502.*

SHAO D., RANGWALA S. M., BAILEY S. T., KRAKOW S. L., REGINATO M. J. and LAZAR M. A.
Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma
*Nature, 1998, **396**: 377-80.*

SHER T., YI H. F., MCBRIDE O. W. and GONZALEZ F. J.
cDNA cloning, chromosomal mapping, and functionnal characterization of the human peroxisome proliferator-activated receptor
Biochemistry, 1993, 32: 5598-604.

SHI Y., HON M. and EVANS R.
The peroxisome proliferator-activated receptor δ, an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling
Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99: 2613-8.

SHIMADA T., KOJIMA K., YOSHIURA K., HIRAISHI H. and TERANO A.
Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells
Gut, 2002, 50: 658-64.

SHIMIZU K., SHIRATORI K., KOBAYASHI M. and KAWAMATA H.
Troglitazone inhibits the progression of chronic pancreatitis and the profibrogenic activity of pancreatic stellate cells via a PPARgamma independent mechanism
Pancreas, 2004, 29: 67-74.

SHU H., WONG B., ZHOU G., LI Y., BERGER J., WOODS J. W., WRIGHT S. D. and CAI T. Q.
Activation of PPARalpha or gamma reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocytic THP-1 cells
Biochem Biophys Res Commun, 2000, 267: 345-9.

SOLOMON C., WHITE J. H. and KREMER R.
Mitogen-activated protein kinase inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D3-dependent signal transduction by phosphorylating human retinoid X receptor alpha
J Clin Invest, 1999, 103: 1729-35.

SORDAT I., BOSMAN F., DORTA G., ROUSSELLE P., ABERDAM D., BLUM A. and SORDAT B.
Differential expression of laminin-5 subunits and integrin receptors in human colorectal neoplasia
J Pathol, 1998, 185: 44-52.

SOTIROPOULOS K. B., CLERMONT A., YASUDA Y., RASK-MADSEN C., MASTUMOTO M., TAKAHASHI J., DELLA VECCHIA K., KONDO T., AIELLO L. P. and KING G. L.
Adipose-specific effect of rosiglitazone on vascular permeability and protein kinase C activation: novel mechanism for PPARgamma agonist's effects on edema and weight gain
Faseb J, 2006, 20: 1203-5.

STEPHEN R. L., GUSTAFSSON M. C., JARVIS M., TATOUD R., MARSHALL B. R., KNIGHT D., EHRENBORG E., HARRIS A. L., WOLF C. R. and PALMER C. N.
Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines
Cancer Res, 2004, 64: 3162-70.

SU W., BUSH C., NECELA B., CALCAGNO S., MURRAY N., FIELDS A. and THOMPSON E.
Differential expression, distribution, and function of PPAR-gamma in the proximal and distal colon
Physiol Genomics, 2007, 30: 342-53.

SUNAMI E., TSUNO N. H., KITAYAMA J., SAITO S., OSADA T., YAMAGUCHI H., TOMOZAWA S., TSURUO T., SHIBATA Y. and NAGAWA H.
Decreased synthesis of matrix metalloproteinase-7 and adhesion to the extracellular matrix proteins of human colon cancer cells treated with troglitazone
Surg Today, 2002, 32: 343-50.

TAKAHASHI N., OKUMURA T., MOTOMURA W., FUJIMOTO Y., KAWABATA I. and KOHGO Y.
Activation of PPARgamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells
FEBS Lett, 1999, 455: 135-9.

TAKAYAMA O., YAMAMOTO H., DAMDINSUREN B., SUGITA Y., NGAN C. Y., XU X., TSUJINO T., TAKEMASA I., IKEDA M., SEKIMOTO M., MATSUURA N. and MONDEN M.
Expression of PPARdelta in multistage carcinogenesis of the colorectum: implications of malignant cancer morphology
Br J Cancer, 2006, 95: 889-95.

TAKENAKA K., SHIBUYA M., TAKEDA Y., HIBINO S., GEMMA A., ONO Y. and KUDOH S.
Altered expression and function of beta1 integrins in a highly metastatic human lung adenocarcinoma cell line
Int J Oncol, 2000, 17: 1187-94.

TAN N., ICRE G., MONTAGNER A., BORDIER-TEN-HEGGELER B., WAHLI W. and MICHALIK L.
The nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta potentiates cell chemotactism, polarization, and migration
Mol Cell Biol, 2007, 27: 7161-75.

TAN N. S., MICHALIK L., DESVERGNE B. and WAHLI W.
Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes
J Steroid Biochem Mol Biol, 2005, 93: 99-105.

TANAKA T., KOHNO H., YOSHITANI S., TAKASHIMA S., OKUMURA A., MURAKAMI A. and HOSOKAWA M.
Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats
Cancer Res, 2001, 61: 2424-8.

TARRADE A., SCHOONJANS K., PAVAN L., AUWERX J., ROCHETTE-EGLY C., EVAIN-BRION D. and FOURNIER T.
PPARγ/RXRα heterodimers control human trophoblast invasion
J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86: 5017-24.

TERESI R., SHAIU C., CHEN C., CHATTERJEE V., WAITE K. and ENG C.
Increased PTEN expression due to transcriptional activation of PPARγ by lovastatin and rosiglitazone
Int J Cancer, 2006, 118: 2390-8.

THIERY J.
Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.

Nat Rev Cancer, 2002, 2: 442-54.

TONTONOZ P., GRAVES R. A., BUDAVARI A. I., ERDJUMENT-BROMAGE H., LUI M., HU E., TEMPST P. and SPIEGELMAN B. M.
Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimer complex of two nuclear hormone receptors PPARγ and RXRα
Nucleic Acids Research, 1994, 22: 5628-34.

TONTONOZ P., HU E. and SPIEGELMAN B. M.
Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPARγ2, a lipid-activated transcription factor
Cell, 1994, 79: 1147-56.

TONTONOZ P., SINGER S., FORMAN B. M., SARRAF P., FLETCHER J. A., FLETCHER C. D. M., BRUN R. P., MUELLER E., ALTIOK S., OPPENHEIM H., EVANS R. M. and SPIEGELMAN B. M.
Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor
Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94: 237-41.

TOWBIN H., STAEHELIN T. and GORDON J.
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1979, 76: 4350-4.

TSAO W. C., WU H. M., CHI K. H., CHANG Y. H. and LIN W. W.
Proteasome inhibitors induce peroxisome proliferator-activated receptor transactivation through RXR accumulation and a protein kinase C-dependent pathway
Exp Cell Res, 2005, 304: 234-43.

TUGWOOD J., ALDRIDGE T., LAMBE K., MACDONALD N. and WOODYATT N.
Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and the pleiotropic responses to peroxisome proliferators
Arch Toxicol Suppl, 1998, 20: 377-86.

VANAMALA J., GLAGOLENKO A., YANG P., CARROLL R. J., MURPHY M. E., NEWMAN R. A., FORD J. R., BRABY L. A., CHAPKIN R. S., TURNER N. D. and LUPTON J. R.
Dietary fish oil and pectin enhance colonocyte apoptosis in part through suppression of PPARdelta/PGE2 and elevation of PGE3
Carcinogenesis, 2008, 29: 790-6.

VANDENHEUVEL J. P.
Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical link among fatty acids, gene expression and carcinogenesis
J Nutr, 1999, 129: 575-80.

VANDERVOORTVANZIJP J., HOEKSTRA H. and BASSON M.
Evolving management of colorectal cancer
World J Gastroenterol, 2008, 14: 3956-67.

VARET J., VINCENT L., MIRSHAHI P., PILLE J. V., LEGRAND E., OPOLON P., MISHAL Z., SORIA J., LI H. and SORIA C.
Fenofibrate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo
Cell Mol Life Sci, 2003, 60: 810-9.

VEGA R., HUSS J. and KELLY D.
The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferators-activated receptor α in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes
Mol Cell Biol, 2000, 20: 1868-76.

VINCAN E. and BARKER N.
The upstream components of the Wnt signalling pathway in the dynamic EMT and MET associated with colorectal cancer progression
Clin Exp Metastasis, 2008.

WAHLI W., DEVCHAND P. R., IJPENBERG A. and DESVERGNE B.
Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents regulate gene expression through direct binding to peroxisome proliferator-activated receptors
Adv Exp Med Biol, 1999, 447: 199-209.

WANG H., HUANG Z., XIA L., FENG Q., ERDJUMENT-BROMAGE H., STRAHL B. and AL E.
Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor
Science, 2001, 293: 853-7.

WANG Y., LEE C., TIEP S., YU R., HAM J., KANG H. and AL E.
Peroxisome proliferator-activated receptor δ activates fat metabolism to prevent obesity
Cell, 2003, 113: 159-70.

WEISS L., DIMITROV D. S. and ANGELOVA M.
The hemodynamic destruction of intravascular cancer cells in relation to myocardial metastasis
Proc Natl Acad Sci U S A, 1985, 82: 5737-41.

WERMAN A., HOLLENBERG A., SOLANES G., BJORBAEK C., VIDAL-PUIG A. J. and FLIER J. S.
Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin
J Biol Chem, 1997, 272: 20230-5.

WESTERGAARD M., HENNINGSEN J., SVENDSEN M. L., JOHANSEN C., JENSEN U. B., SCHRODER H. D., KRATCHMAROVA I., BERGE R. K., IVERSEN L., BOLUND L., KRAGBALLE K. and KRISTIANSEN K.
Modulation of keratinocyte gene expression and differentiation by PPAR-selective ligands and tetradecylthioacetic acid
*J Invest Dermatol, 2001, **116**: 702-12.*

WESTERMARCK J. and KÄHÄRI V.
Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion
*FASEB J, 1999, **13**.*

WU T., CHIN W., WANG Y. and BURRIS T.
Ligand and coactivator identity determines the requirement of the charge clamp for coactivation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ
*J Biol Chem, 2003, **278**: 8637-44.*

XU H., STANLEY T., MONTANA V., LAMBERT M., SHEARER B. and COBB J.
Structural basis for antagonist- mediated recruitment of nuclear co-repressor by PPARα
*Nature, 2002, **415**: 813-7.*

XU L., HAN C., LIM K. and WU T.
Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and cytosolic phospholipase A(2)alpha/cyclooxygenase-2/prostaglandin E(2) signaling pathways in human hepatocellular carcinoma cells
*Cancer Res, 2006, **66**: 11859-68.*

YANG Q., HOKLAND M. E., BRYANT J. L., ZHANG Y., NANNMARK U., WATKINS S. C., GOLDFARB R. H., HERBERMAN R. B. and BASSE P. H.
Tumor-localization by adoptively transferred, interleukin-2-activated NK cells leads to destruction of well-established lung metastases
*Int J Cancer, 2003, **105**: 512-9.*

YANG W., RACHEZ C. and FREEDMAN L. P.
Discrete roles for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators
*Mol Cell Biol, 2000, **20**: 8008-17.*

YAO T. P., OH S. P., FUCHS M., ZHOU N. D., CH'NG L. E., NEWSOME D., BRONSON R. T., LI E., LIVINGSTON D. M. and ECKNER R.
Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300
*Cell, 1998, **93**: 361-72.*

YAZAWA K., TSUNO N., KITAYAMA J., KAWAI K., OKAJI Y., ASAKAGE M., SUNAMI E., KAISAKI S., HORI N., WATANABE T., TAKAHASHI K. and NAGAWA H.
Selective inhibition of cyclooxygenase-2 inhibits colon cancer cell adhesion to extracellular matrix by decreased expression of β1 integrin
*Cancer Sci, 2005, **96**: 93-9.*

YIN Y., RUSSELL R. G., DETTIN L. E., BAI R., WEI Z. L., KOZIKOWSKI A. P., KOPELOVICH L. and GLAZER R. I.
Peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma agonists differentially alter tumor differentiation and progression during mammary carcinogenesis
*Cancer Res, 2005, **65**: 3950-7.*

YOSHIZUMI T., OHTA T., NINOMIYA I., TERADA I., FUSHIDA S., FUJIMURA T., NISHIMURA G., SHIMIZU K., YI S. and MIWA K.
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, 2004, **25**: 631-9.*

YUAN J., TAKAHASHI A., MASUMORI N., ITOH N. and TSUKAMOTO T.
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is frequently underexpressed in renal cell carcinoma.
*Int J Urol, 2006, **13**: 265-70.*

ZAHRADKA P., WRIGHT B., FUERST M., YURKOVA N., MOLNAR K. and TAYLOR C. G.
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands differentially affect smooth muscle cell proliferation and migration
*J Pharmacol Exp Ther, 2006, **317**: 651-9.*

ZHANG B., BERGER J., ZHOU G., ELBRECHT A., BISWAS S., WHITE-CARRINGTON S., SZALKOWSKI D. and MOLLER D. E.
Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma
*J Biol Chem, 1996, **271**: 31771-4.*

ZHOU J., WILSON K. and MEDH J.
Genetic analysis of four novel peroxisome proliferator activated receptor-γ splice variants in monkey macrophages
*Biochem Biophys Res Commun, 2002, **293**: 274-83.*

ZHU Y., ALVARES K., HUANG Q., RAO M. S. and REDDY J. K.
Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver
*Journal of Biological Chemistry, 1993, **268**: 26817-20.*

ZHU Y., KAN L., QI C., KANWAR Y. S., YELDANDI A. V., RAO M. S. and REDDY J. K.
Isolation and characterization of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) interacting protein (PRIP) as a coactivator for PPAR
*J Biol Chem, 2000, **275**: 13510-6.*

ZHU Y., QI C., CAO W. Q., YELDANDI A. V., RAO M. S. and REDDY J. K.
Cloning and characterization of PIMT, a protein with a methyltransferase domain, which interacts with and enhances nuclear receptor coactivator PRIP function
*Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, **98**: 10380-5.*

ZOETE V., GROSDIDIER A. and MICHIELIN O.
Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators
*Biochim Biophys Acta, 2007, **1771**: 915-25.*

Genetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor γ1 splice variants in human colorectal cell lines

CATHY FIATTE[1], CÉCILE HUIN[1], ISABELLE BERTIN[1], THÉCLA LESUFFLEUR[2], ARNAUD PLUVINET[1], NADèGE TOUCHE[1], FRANÇOIS PLÉNAT[3], MICHEL DAUÇA[1], LIONEL DOMENJOUD[1] and HERVÉ SCHOHN[1]

[1]EA 3446 Prolifératéurs de Peroxysomes, IFR 111, Laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement, Faculté des Sciences et Techniques, BP239, 54506 Vandoeuvre les Nancy Cedex; [2]INSERM U763,Université Paris VII, UFR Médical Denis Diderot, Hôpital Robert Debré, 48 Boulevard Sérurier, 75019 Paris; [3]EA 4001, Laboratoire de Radiopentialisation de la Préclinique à la Clinique, Faculté de Médecine, BP189, 54505 Vandoeuvre les Nancy Cedex, France

Received June 19, 2006; Accepted August 7, 2006

Abstract. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) is a member of the nuclear hormone receptor family. In colon, this transcription factor is involved in differentiation of absorptive cells. PPARγ participates also in colon carcinogenesis and cancer progression. Two isoforms, namely PPARγ1 and PPARγ2, have been described. Recently, new PPARγ1 transcripts whose translation raises PPARγ1 protein have been characterised. They differ from each other by combination of untranslated exons localised in the 5' UTR of the *PPARG* gene. Here, we studied whether such a diversity of PPARγ transcripts occurs in human colon cell models. Based on bioinformatic analysis, putative untranslated exons were identified in the human *PPARG* gene. By RT-PCR analysis, we have demonstrated that several of these untranslated exons are included in PPARγ transcripts from colon-derived cell lines or in those derived from other tissue. Using HT-29 cells, changes in PPARγ1 mRNA levels were observed after treatment with PPARγ agonists such as pioglitazone and troglitazone. These modifications correlated with particular PPARγ transcripts excluding the untranslated exon A2. HT-29 cells treatment with actinomycin D or cycloheximide showed that the presence of PPARγ mRNA including exon A2 was dependent on *de novo* protein synthesis. We concluded that diverse PPARγ1 mRNA exist in colorectal cells. Levels of PPARγ1 transcript varied according to the phenotype of colon cell model used. We suggest that regulation of PPARγ1 mRNA levels could be dependent in part on the composition of untranslated exon(s) in the 5' UTR of PPARγ1 mRNA.

Correspondence to: Dr Hervé Schohn, EA3446, Laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement, Faculté des Sciences et Techniques, BP239, 54506 Vandoeuvre les Nancy Cedex, France
E-mail: herve.schohn@scbiol.uhp-nancy.fr

Abbreviations: PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; *EST*, expressed sequence tagged; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Key words: peroxisome proliferator-activated receptor γ, human colorectal cancer, colon differentiation, splicing

Introduction

Peroxisome proliferator activated receptors (PPAR) belong to the nuclear hormone receptor superfamily (1). There are three isotypes named PPARα, PPARß/δ and PPARγ (2). These nuclear receptors act as heterodimers with the 9-*cis* retinoic acid receptor and bind to a specific DNA sequence, the peroxisome proliferator response element, a direct repeat of the 5'-AGGTCA-3' sequence spaced by one base (3,4). After ligand activation, the heterodimer complex regulates the transcription of specific genes involved in several physiological functions (2). In colon, PPARγ is implicated in differentiation of absorptive cells (5), in carcinogenesis or tumour progression even though contradictory results have been obtained in murine and human models (6).

The PPARγ gene is localised to chromosome 3, band 3p25 (7). The open reading frame consists of exons E1-E6 which encode the different domains of the protein. In human, two PPARγ isoforms have been identified and referred to as PPARγ1 and PPARγ2 (7,8). PPARγ2 differs from PPARγ1 by an additional 28 amino acid NH2-terminal sequence (8). The 5' UTR region of PPARγ transcripts, raising PPARγ1 and -2 proteins, is highly variable and three exons termed A1, A2 and B have been described (9,10). Due to different promoter usage and alternative splicing, two other PPARγ transcripts have been identified and they have been referred to as PPARγ3 and -γ4 (10,11). PPARγ1 mRNA consists of A1-A2-E1-6 exons, whereas PPARγ3 mRNA is composed only of A2-E1-6 exons. Both the exons A1 and A2 are not translated. The PPARγ4 mRNA has a transcription initiation site at the boundary of exon E1 (at position -29 upstream of the start point of exon E1) (11). All these PPARγ transcripts generate the same protein PPARγ1. Other untranslated exons

have also been identified in the 5' UTR of PPARγ mRNA in mouse (12), in monkey (13) and recently in normal human mammary epithelial and breast cancer cells (14). Wang *et al* demonstrated the presence of multiple transcription start sites leading to different PPARγ1 transcripts observed in mammary epithelial cells and breast cancers cells (14). The different promoters are thought to mediate specific PPARγ1 transcript expression in normal and tumoral tissues. In monkey macrophage and human macrophage-derived cell lines, Zhou *et al* (13) and Chen *et al* (15) respectively showed the presence of the so-called untranslated exon C and exon D in addition to the previously identified exons A1, A2 and B. Promoter usage and alternative splicing have raised seven PPARγ transcripts referred to as PPARγ1-7.

Due to the complexity of the PPARγ gene, we postulated that in colon cell models the regulation of *PPARG* gene expression could be the result of multiple promoter usage which in turn generates other transcripts encoding the protein PPARγ1 than the already described PPARγ1, 3 or 4 mRNA. Many studies over the last 20 years have reported cancer-specific alternative splicing in the absence of genomic mutations (16). As well as being associated with cancer, the nature of the alternative gene products is usually consistent with an active role in cancer. Therefore, the alternative splicing process itself is a potential target for gene therapy. Using RT-PCR semi-quantification carried out with polyA$^+$ RNA from human colon cells and 5' extension primer experiments, we have demonstrated the presence of different PPARγ1 transcripts. Treatment of HT-29 cell line, a colon tumour cell model, with PPARγ agonists, actinomycin D or cycloheximide suggested that the variation in PPARγ mRNA levels could depend on the nature of PPARγ mRNA in colon cell model.

Materials and methods

Reagents. Dulbecco's modified Eagle's minimum medium (DMEM), trypsin/EDTA solution, fetal calf serum (FCS), non-essential amino acids solution, and Dulbecco's sodium phosphate buffer (DPBS) were purchased from Eurobio (Les Ulis, France). *Taq* polymerase, RNAsin, reverse transcriptase (M-MLV) and primers were obtained from Invitrogen Corporation (Paisley, Scotland). Restriction enzymes and protease inhibitor ready-made solution were from Sigma Corporation (St. Louis, MO, USA). BM Chemiluminescence revelation kit was from Roche (Mannheim, Germany). Commercial polyclonal rabbit antibodies against PPARγ were from Cayman (Tallin, Estonia). Polyclonal rabbit antibodies against ß-actin were purchased from Sigma. Polyclonal rabbit antibodies against catalase were prepared and characterized as described before (17). Troglitazone was purchased from Cayman; pioglitazone was a gift from Tadeka Chemicals Industries Ltd. (Osaka, Japan). Other reagents were of analytical grade.

Cell culture. HT-29, Caco-2 cell lines were obtained from M. Rousset (INSERM U505, Paris, France). The HCT116 cell line was a gift of J.N. Freund (INSERM U682, Strasbourg, France). SW620 and MRC5 cell lines were obtained from N. Martinet (INSERM 555, Nancy, France). Vero and L293 cell lines were a gift of J.L. Goergen (INPL, Nancy, France). A549 cells were obtained from N. Frossard (EA 3771, Strasbourg, France). HepG2, THLE, MCF-7, HeLa cells are part of the laboratory cell-line collection. Cells, except Caco-2 cells, were cultured in DMEM-25 mM glucose containing 10% (v/v) heat-inactivated (30 min at 56°C) FCS and 2 mM L-glutamine, and they were seeded at a concentration of 10^5 cells/ml. Caco-2 cells were cultured in the same medium containing 20% (v/v) heat-inactivated FCS and 1% (v/v) non-essential amino acids. Seeding was $6x10^4$ cells/ml. All cells were grown in a 5% CO_2 humidified atmosphere. Medium was changed daily, 48 h after seeding. After 5 and 15 days of culture, cell layers were washed twice with cold-DPBS for 5 min. Cell layers were frozen at -80°C until RNA extraction or cell homogenate preparation.

Cell treatments. Agonist treatment was carried out 48 h after HT-29 cell seeding for five days. Medium containing 1 or 10 μM troglitazone or pioglitazone and 1 μM 9-*cis* retinoic acid was changed daily. Cell layers were then washed three times with cold DPBS and stored at -80°C. HT-29 cells were assessed after two and five days for each treatment by using Trypan blue staining at least four times. Results are expressed at mean ± SD. Five and 15-day-old HT-29 cells were treated in the presence of 1 or 10 μg/ml cycloheximide or 1 and 10 μM actinomycin D for 24 h. Thereafter, cell layers were washed twice with cold-DPBS, and stored at -80°C until total RNA extraction.

RT-PCR analysis and semi-quantification of PPARγ transcripts. Total RNA was phenol/chloroform extracted (18). PolyA$^+$ RNAs were purified on oligo dT cellulose according to standard protocol (19). cDNAs were obtained by reverse transcription reaction according to standard protocol with M-MLV reverse transcriptase (200 U) and 1 μg of total or polyA$^+$ RNA. cDNA amplification was carried out in 20 mM Tris-HCl (pH 8.4) buffer containing 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 5 U of RNAsin, 0.2 mM dXTP, 0.4 μM each selected sense and antisense primers, 2 μl of reverse transcription sample and 2.5 U of *Taq* polymerase for 35 cycles (95°C, 30 sec; annealing temperature at Tm of the primers, 30 sec; 72°C, 30 sec) followed by an extension step at 72°C for 5 min. Primers used in this study are listed in Table I. GAPDH was used as an internal control. Amplicons were analysed on a 2% (p/v) TBE-agarose gel. The bands obtained were quantified (Gel Doc, Bio-Rad, Hercules, USA). Results are expressed as the ratio ($PPAR\gamma\ isoform_{human}/GAPDH_{human}$) in arbitrary units. H*inf*I restriction enzyme which specific site is present only in exon A2 was used to verify the presence of exon A2 in amplicons obtained with primer sense A0, A1 or A5 and antisense primer E1. All PCR-products described here were cloned in pBlueScript plasmid and sequenced (INRA, Champenoux, France). We did not find any difference in sequence with those described on the UCSC Genome site. Total RNA from SW480, HCT EB and LS174T cells were prepared by T.L. as decribed above.

5'-Primer extension. The primer extension was carried out according to Domenjoud *et al* (20) starting with 4 μg of polyA$^+$ RNAs purified from HT-29 cells. Primers used are listed in Table I. 5' end primer labeling was carried out with

Table I. Sequences of primers used in this study.

Exon	Sequence primer (5'-3')	Genomic localisation on *PPARG* gene	Length (bp)	Tm (°C)
Primers used in RT-PCR experiments				
A	ACATCTTGGGAAGACGGCCT	12303981-12304000	20	50
A0	TTGGGTCGGCCTCGAGGACA	12304467-12304486	20	54
A1	GTTAGGCTCCCAGGAGGAGTGGTCA	12305390- 12305416	25	54
A4	CTCTACCTTTAGACCATTCTGCAG	12322341-12322364	24	50
A5	GCAAGAAGGAGATGACATATACTTAAG	12325334-12325360	27	50
A3	CTTCGTGAGGGGTGTGCTG	12328321-12328338	19	50
A2	GAAAGAAGCCAACACTAAACCAC	12328883-12328905	23	48
C	TTCAGGATGATTCTTGTCTCTGGA	12388353-12388376	24	49
E1a[a]	GGGCCAGAATGGCATCTCTGTG	12396219-12396240	22	53
E1b[b]	TGTGGAGTAGAAATGCTGGAGAAG	12396327-12396350	24	51
E4	TCATGCTTGTGAAGGATGCAAGG	12397969-12397991	23	60
E6	TCCAGTGCATTGAACTTCACAGC	12433578-12433600	23	60
GAPDH antisense	GCTGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT	6517010-6517033	26	60
GAPDH sense	GACCCCTTCATTGACCTCAACTACATG	6515994-6516020	27	60
Primers used in 5' primer extension procedure				
A1	GTTAGGCTCCCAGGAGGAGTGGTCA	12305366-12305390	25	58
A2	GAGAAAATGGCCTTGTTGTATATTTG	12328905-12328930	26	48
A5	CTTAAGTATATGTCATCTCCTTCTTGC	12325334-12325360	27	50
E1	GGGCCAGAATGGCATCTCTGTG	12396219-12396240	22	53

[a]The E1a antisense primer is localised at the 5' end of exon E1. It was used to amplify the untranslated PPARγ1 exonic regions composed with combined exons A1-A2, A5-A2 and A2 or A1 alone. [b]The E1b antisense primer is localised at the 3' end of exon E1. It was used to amplify the untranslated PPARγ1 exonic regions composed with combined exons A0-A2 or A0 alone.

^{32}P[γ]-ATP using a labelling kit purchased from Amersham-Biosciences (Orsay, France). Lengths of extension products were estimated in 5% acrylamide/7 M urea gel prepared in TBE buffer.

Western blotting. Cell homogenates were prepared in freshly made extraction buffer according to Mansen *et al* (21). Protein (50 μg) was resolved in 10% SDS-PAGE (22). Proteins were transferred onto PVDF membranes (23) and they were further proceeded for chemiluminescence detection according to the manufacturer's protocol. Dilution of the first antibody solution was 1:1,000 for polyclonal rabbit antibodies directed against PPARγ, 1:20,000 for polyclonal rabbit antibodies against ß-actin, and 1:1,000 for polyclonal rabbit antibodies against catalase.

Statistics. All the statistics were computed using SPSS v11.5 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). For the comparison of the variation of PPARγ transcript contents along cell culture duration, one way ANOVA was performed with Bonferroni *post-hoc* test for the multiple comparisons. Differences were considered significant at $P<0.05$.

Results

Untranslated exons mapping on the PPARG gene. We first compiled the representative sequences of all spliced *EST* present in the data bank resources (Table II). In order to map putative and known untranslated exons of the *PPARG* gene, we looked for: a) cryptic splice sites as 5'-aggu-3' and 5'-agg-3'; b) intronic polypyrimidine sequences between a putative acceptor splice site and an A-branch site were localised in order to define the boundaries of internal exon; c) the presence of a putative *Inr* element was investigated in the genomic region upstream of each known or putative first exon. In addition to the known exons namely A, A0, A1, A2 and B, we found two additional exons A4 and A5 (Fig. 1b). No amplification product was obtained when RT-PCR was carried out with primers designed in exon A or A4 and E1, neither in colon normal-matched and tumour sample, nor in colon adenocarcinoma-derived cell lines (data not shown). Zhou *et al* (13) have suggested that exon C and D identified in monkey macrophages may exist in the human *PPARG* gene. Sequence alignments demonstrated that <50% similarity exists between the sequence of exon D from monkey

Table II. Selected human *EST* used to map the untranslated exons on the *PPARG* gene.

EST	cDNA bank	Untranslated exon recovered[a]	Site or authors
AB107271	Adipocyte	A1 (296), E1	NCBI
AB097931	Adipocyte	A1 (296), E1	NCBI
AL523434	Neuroblastoma	A0 (160), A2, E1-E6	NCBI
AA298089	Ovary	A1 (196), A2, E1	
BM924484	Mix of stomach, colon and kidney	A (287), E1-E2	NIH
BX363320	Uterine	A0, A2, E1-E5	NBCI
CB133173	Liver	A5, A2, E1-E2	NCBI
BM744007	Ascite	A2 (42), E1-E3	NBCI
CN289139	Stem cell	A5, A2, E1-E2	(39)
AL543579	Placenta	A0 (119), E1-E6	NBCI

[a]Numbers represent the sequence length in nucleotides of untranslated exon.

and that of the corresponding human genomic sequence. We decided therefore to exclude exon D from the present study. Likewise, the sequence of exon C is present in the human *PPARG* gene. However, using RT-PCR experiments, we did not observe the presence of any transcript including exon C joined to E1 neither in human colorectal-derived

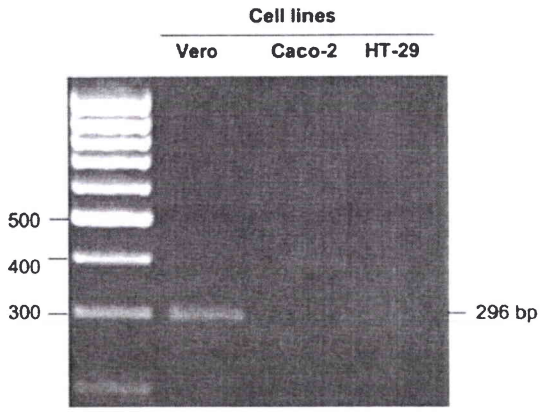


Figure 2. Absence of mRNA containing exon C in colon-derived cell lines. Total RNA was extracted from 5-day-old Vero, Caco-2 or HT-29 cells. RT-PCR experiments were performed with specific primers designed from exon C and exon E1 of the *PPARG* gene.

cells (Fig. 2) nor in human colorectal samples (data not shown). In contrast, we amplified the exonic region between exons C and E1 when RT-PCR was performed with total RNA extracted from Vero cells in a control experiment (Fig. 2).

Presence of PPARγ protein in colon derived cell lines. PPARγ protein content was quantified in four colon adenocarcinoma cell lines namely Caco-2, HT-29, HCT116 and HT-29 MTX 10^{-5} M Rev. Upon cell culture, Caco-2 and HT-29 MTX 10^{-5} M Rev cells differentiated spontaneously as

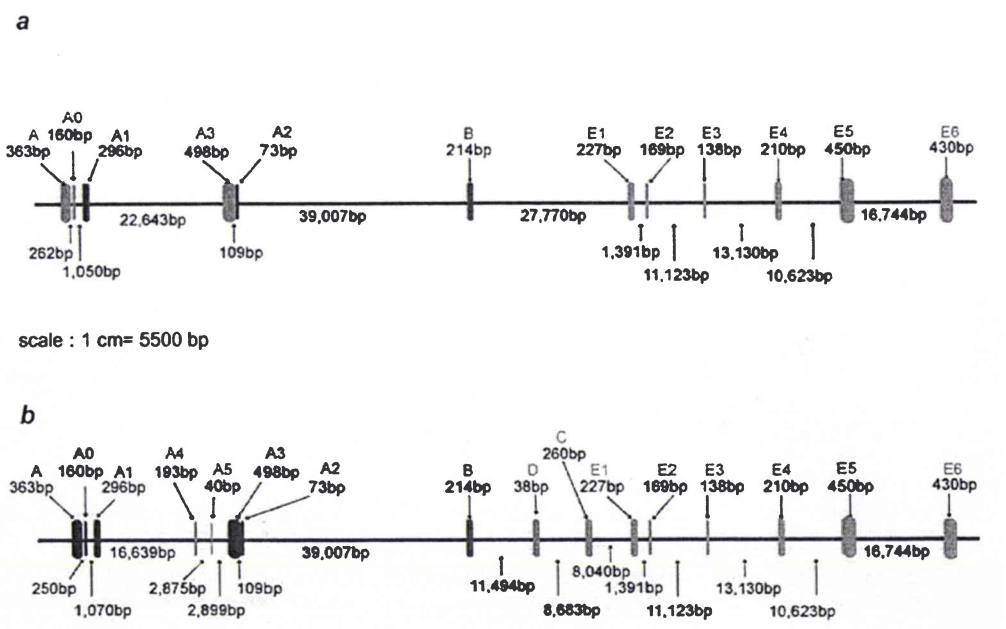


Figure 1. Map of the PPARG gene. (a) Untranslated exons nomenclature is based on published work (9,10,13-15). This scheme (adapted herein) shows *PPARG* gene organization presented by Wang *et al* (14). (b) Predicted organization of the *PPARG* gene from bioinformatic analysis and completed with reference (14). Lengths of known or putative untranslated exons and introns are given.

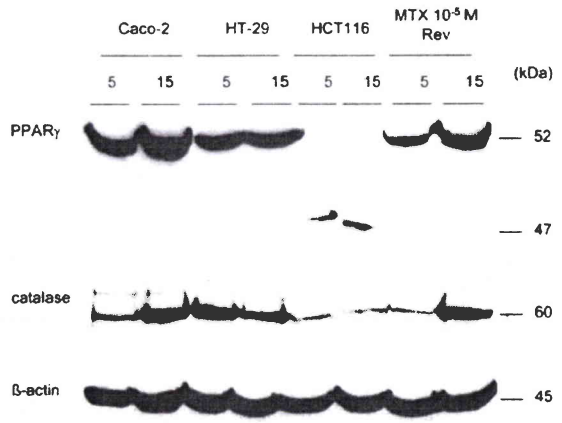


Figure 3. PPARγ protein content in colon-derived cells. Cell homogenates were prepared from 5- and 15-day-old cells. Protein extracts were submitted to Western blotting as described in Materials and methods. Blots were probed with a commercial rabbit polyclonal antibody raised against PPARγ. Control experiments for protein loading were performed with a monoclonal antibody raised against ß-actin and with Coomassie blue coloration of the PVDF membrane (data not shown). A polyclonal antibody against catalase (17) was used to demonstrate spontaneous differentiation occurring in Caco-2 and HT-29 MTX 10^{-5} M Rev cells. Typical results are from at least three independent experiments.

absorptive (24) and mucus-secreting cells (25), respectively. HT-29 and HCT116 cells remained undifferentiated in the same culture delay. As previously shown (26), catalase content used as a marker of differentiation was increased during spontaneous differentiation process occurring in Caco-2 cells, but also in HT-29 MTX 10^{-5} M Rev cells. We demonstrated that PPARγ protein was present in these cells with an estimated M_r at 50 kDa (Fig. 3). In Caco-2 or HT-29 MTX 10^{-5} M Rev homogenates, PPARγ protein content was increased from 5-15 days in culture whereas it decreased in HT-29 during the same culture duration. In HCT116 cells, PPARγ protein corresponded to a band estimated at 47 kDa. The reason for such a difference is not clear. We suggest that PPARγ protein is degraded in this cell line and that the observed band is the result of receptor degradation as previously reported (7,27).

Presence of different PPARγ1 transcripts in colon derived cell lines or from other tissue origins. PPARγ1 mRNA content was quantified by RT-PCR analysis in the selected colon cell lines. As shown in Fig. 4, PPARγ mRNA levels (estimated with primers designed in exon 4 and 6) increased significantly upon culture duration in Caco-2 and HT-29 MTX 10^{-5} M

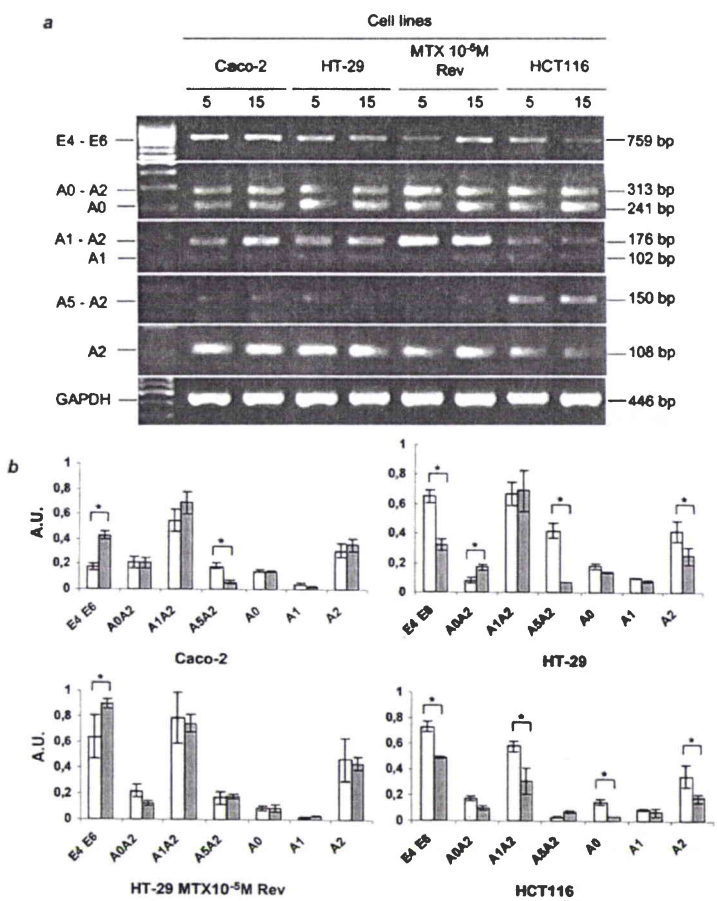


Figure 4. mRNA untranslated exonic region expression in colon cell lines. PolyA+ mRNAs were prepared from 5- or 15-day-old cells and untranslated exonic regions of PPARγ1 transcripts were quantified by semi-quantitative RT-PCR with specific primers from each exon Ai and exon E1 (Table I) or exon E4 and E6 (a). The amplified regions are named according to the composition of untranslated exon fused to exon E1. The intensities of the bands were quantified and the ratio between intensities of PPARγ1 exonic regions and GAPDH were determined at 5 (white bar) and 15 days (grey bar) (b). The bar graphs represent the mean ± SD from 3 independent experiments. Significant difference (*) at P-value <0.05 (ANOVA) are shown in (b).

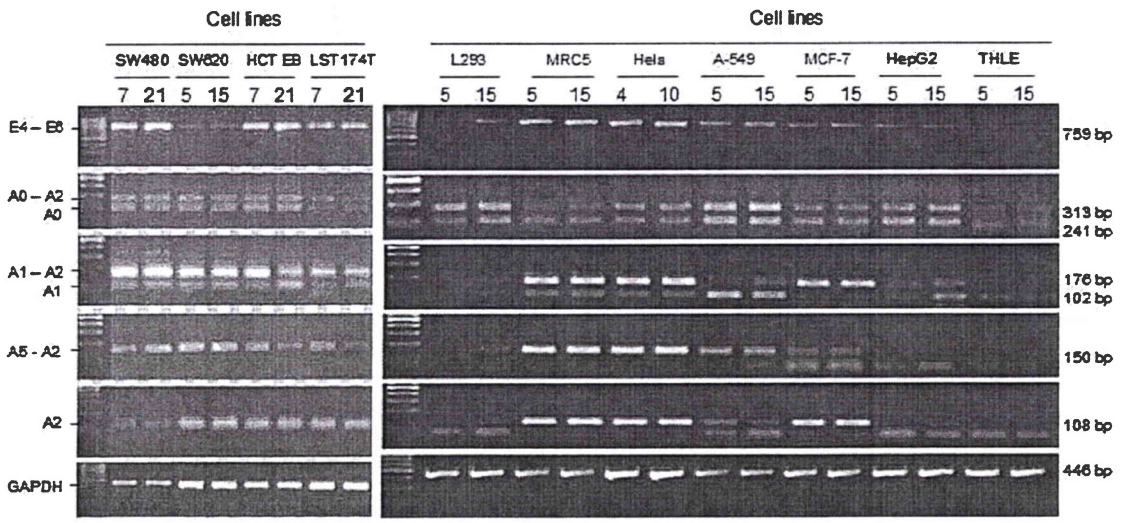


Figure 5. mRNA untranslated exonic region expression in various cell models. Total RNA was prepared from cells harvested during proliferation or stationary culture stage and submitted to RT-PCR with specific primers from each exon Ai and exon E1 or exon E4 and E6. The amplified regions are named according to the composition of untranslated exon linked to exon E1. SW480, SW620, HCT EB and LS 174T are colon adenocarcinoma-derived cell lines. L293 originated from a kidney cell transformed with adenovirus 5 DNA, MRC5 cell line is a fibroblastic-derived cell line, HeLa cells derived from an epidermoid carcinoma, A549 from a lung carcinoma, MCF-7 cells from a breast adenocarcinoma, HepG2 from a hepatocellular carcinoma. THLE cell line was obtained after SV40 large antigen-T immortalization of human hepatocytes (40).

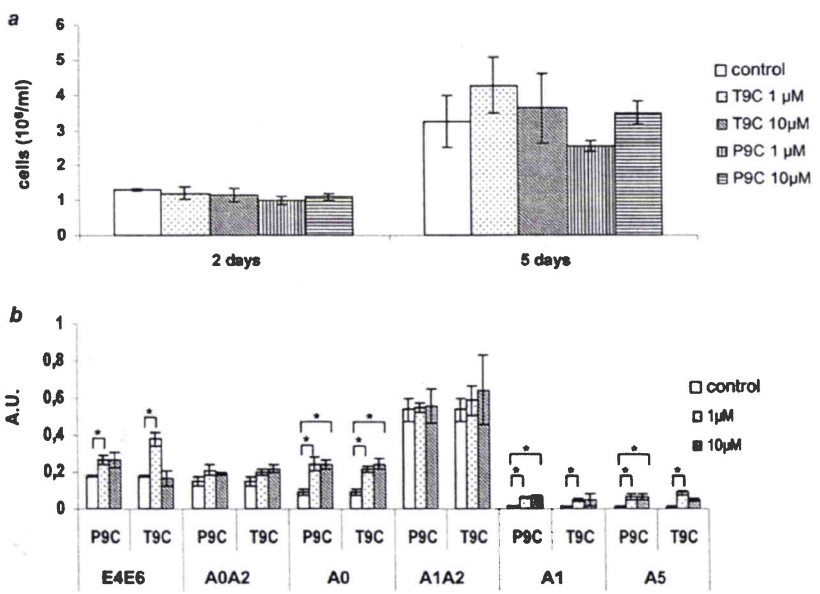


Figure 6. Quantification of PPARγ1 transcripts in HT-29 cells treated with PPARγ agonists. HT-29 cells were treated during 5 days with troglitazone or pioglitazone as indicated. (a) Cell count was carried out with Trypan blue. Cells were numbered at least 4 times for each treatment. (b) Total RNA was extracted from cell layers and submitted to RT-PCR analysis using primers designed in untranslated exon Ai and E1 or in exon E4 and E6. The intensities of the bands were quantified and the ratio between intensities of each PPARγ1 exonic region and GAPDH was calculated. The bar graphs represent the mean ± SD from 3 independent experiments. Significant differences (*) at P-value <0.05 are shown (ANOVA). P9C, T9C: combined treatment respectively with pioglitazone or troglitazone and 9-*cis* retinoic acid (see Materials and methods).

Rev differentiating cells, whereas they decreased in HT-29 and HCT116 cells. We investigated which transcripts may account for the total level of PPARγ1 mRNA. Several exonic regions were amplified with sense primer designed for each untranslated exon and antisense primer designed for exon E1. Since PPARγ was present in the four cell lines tested, semi-quantification of PPARγ1 transcripts were planed using polyA⁺ RNA prepared from cells cultured for 5 and 15 days (Fig. 4b).

Using exon A0 or A1 sense primer and exon E1 antisense primer (Fig. 4a), two PCR products were obtained with an estimated length of 313 and 241 bp or 176 and 102 bp, respectively. The longest PCR products included exon A2 as demonstrated by digestion of the PCR product with *Hinf*I

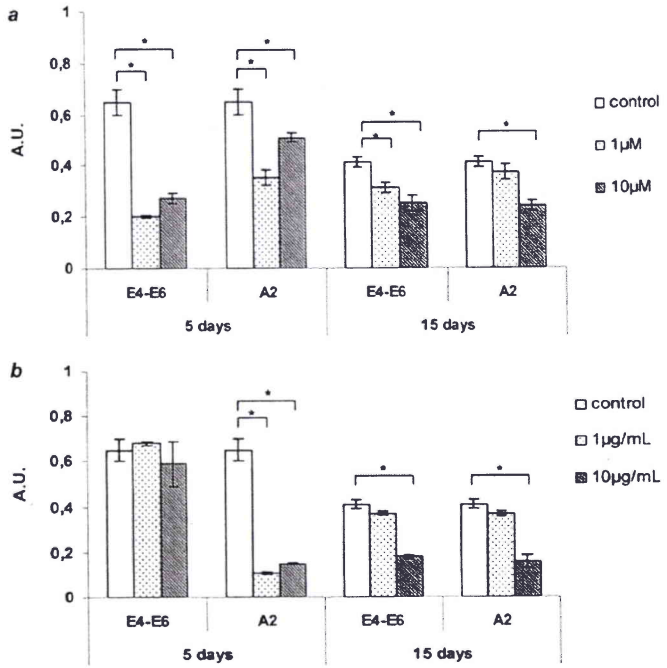


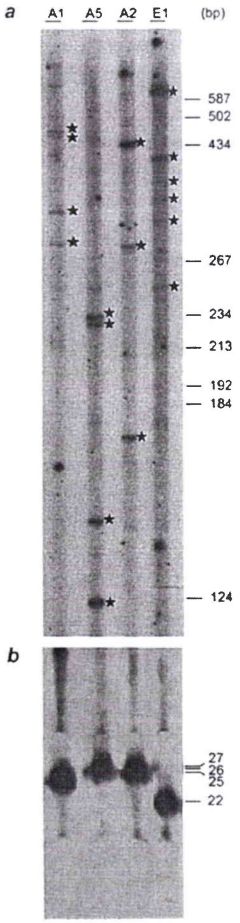
Figure 7. PPARγ1 mRNA levels after drug treatment. Caco-2 and HT-29 cells were cultured during 5 and 15 days and treated with actinomycin D (a) or cycloheximide (b) for 24 h. Total RNA was extracted and submitted to RT-PCR using primers designed in exon E4-E6 and exon A2 and E1, respectively. The intensities of the bands were quantified and the ratios between intensities of each PPARγ1 exonic region and GAPDH were calculated. The bar graphs represent the mean ± SD from 3 independent experiments. Significant difference (*) at P-value <0.05 are shown (ANOVA).

which restriction site is present only in exon A2 (data not shown). Likewise, amplification with sense primer in exon A5 and antisense primer in exon E1 gave a single band estimated at 150 pb which contained exon A2 (Fig. 4a). Amplification was also carried out with sense primer designed in exon A2 (Fig. 4a). The obtained PCR products estimated at 108 bp account for all the mRNA including exon A2 or for the mRNA containing exclusively exon A2 in its 5' UTR, namely PPARγ3 mRNA (10).

Semi-quantification of each exonic region suggested that the transcripts for the so-called PPARγ1 isoform were mainly represented by combination of exons A1-A2-E1-6 as observed previously (9). The other mRNAs containing the untranslated region A0-A2, A5-A2, A0 alone or A1 alone, were less abundant in all colon cell lines tested. However, the relative levels of each mRNA depended on cell line and culture duration. The transcripts containing the A5-A2 region decreased in Caco-2 and HT-29 cells whereas they increased in HCT116 cells (Fig. 4b). Transcripts containing the A0-A2 region decreased in HT-29 MTX 10^{-5} M Rev cells. Furthermore, each PPARγ1 transcript studied here was recovered in the other cell lines tested but with strong differences in the mRNA levels (Fig. 5). For example, transcripts containing A5 were detected in MRC5 and HeLa cells, but we failed to detect them in HepG2 and THLE cells. PPARγ1 transcripts containing the A1-A2 exonic region (band estimated at 176 bp) were more abundant in MRC5, HeLa or MCF-7 than in A-549 cells. At least in HepG2, PPARγ1 level was represented mainly by transcripts that contained untranslated exonic region A0-A2 or A0 alone. In other colorectal cell lines used, higher expression of exonic region A5-A2-E1 was observed in SW480, SW620, HCT EB and LS174T cells (Fig. 5).

Effect of agonist treatment on PPARγ1 mRNA level in HT-29 cells. HT-29 cells were treated with troglitazone or pioglitazone in the presence of 9-*cis* retinoic acid during the proliferation stage of the cells, in order to investigate possible changes in PPARγ1 transcripts levels (Fig. 6b). Since PPARγ agonists have been shown to block cell growth and to increase cell anoikis, we first counted cell populations during dose- (1 or 10 μM agonist and 1 μM 9-*cis* retinoic acid) and time course-treatment (5 days). There were no significant variations in cell counts at whatever the treatment used (Fig. 6a). A significant increase was observed only in PPARγ mRNA content including untranslated exon A1 (3 times), A0 (2 times) or exonic region A5-A2 (5 times). No significant alteration was observed in the mRNA levels of the other transcripts, which included untranslated exon A2 in exonic region A1-A2 and A0-A2 (Fig. 6b).

Effect of actinomycin D and cycloheximide on PPARγ1 mRNA level in HT-29 cells. Since increased PPARγ mRNA levels were observed for transcripts excluding A2 exon (except for the A5-A2 untranslated region), we hypothesised that the presence of A2 untranslated exon may contribute to PPARγ mRNA stability. Therefore, HT-29 cells were cultured for 5 or 15 days, then treated with actinomycin D (1 or 10 μM) or cycloheximide (1 or 10 μg/ml) for 24 h (Fig. 7a and b, respectively). RT-PCR analysis was limited to amplification of E4-E6 and A2-E1 exonic regions. Cells treated with actinomycin D at 5 days of culture exhibited a 70% decrease



c

	Extension product (Length, bp)	Expected length (bp)
A1	478 457 295 275	88
A5	233 228 147* 123	154
A2	436 271 177	A0A2 :236 A1A2 :384 A5A2 :220 A2 :52
E1	602 398 346* 301* 275* 245	A0A2: 296 A0E1: 222 A1A2E1: 444 A1E1: 370 A2E1: 114 A5A2E1: 280

Figure 8. 5' Primer extension products revealed by urea-sequencing gel. 5' Primer extension was carried out as described in Materials and methods with polyA+ RNA prepared from human HT29 adenocarcinoma-derived cells. (a) The extension products are indicated by black stars. (b) Results of free labelled primers are presented. (c) The table summarizes the length of each primer extension product. The known exonic regions recovered by the procedure are indicated by asterisk.

in PPARγ1 initial level estimated with primers designed in exon E4 and E6 (Fig. 7a). Amplification product of the exonic region containing exon A2 was reduced to 50%. HT-29 cells were less drug-sensitive after 15 days in culture, since mRNA levels were only reduced with high drug concentration (a 40% decrease). We next treated cells with cycloheximide for 24 h in order to verify if PPARγ mRNA levels could be altered by inhibition of protein synthesis (Fig. 7b). In 5-day-treated HT-29 cells, no change was found when PPARγ levels were quantified with primers designed in exon E4 and E6. An 85%-decrease was observed in PPARγ1 mRNA level estimated with primers designed in exon A2 and E1. In contrast, alteration in PPARγ mRNA levels in 15-day-old HT-29 cells was only obtained with high concentrations of cycloheximide (a 60% decrease). Our results suggested that during the proliferation stage of HT-29 cells, two mechanisms regulate changes in PPARγ transcript levels; firstly, whatever the mechanism, one part of PPARγ transcript seems to be dependent on the presence of *de novo* protein synthesis. Secondly, part of the PPARγ transcripts turnover is high as demonstrated by actinomycin D treatment and quantification with primers designed in exon E4 and E6.

5'-Primer extension. We performed 5' primer extension with polyA+ prepared from 15-day-old adenocarcinoma cells (Fig. 8). As shown in Fig. 8a, we failed to detect extension product corresponding to exon A2 alone (estimated length at 52 bp). These results contrasted with previous work demonstrating that exon A2 alone constitutes a specific transcript *id est* PPARγ3 in human cell models (10). Experiments were also extended with antisense primer designed in exon A1, A5 and E1. Surprisingly, several unexpected extension products were obtained starting with A1, A2, A5 and E1 primers. Our results suggested that either unknown exon may exist and participate in the diversity of PPARγ1 transcripts or the lengths of known exons are greater than previously described.

Discussion

PPARγ has been implicated in colorectal cancer and is thought to exhibit a protective action when the receptor is activated with a specific agonist (28). This protective role has been studied in colorectal cancer-derived cells and results suggest that PPARγ agonist treatments lead to inhibition of cell growth, enhancement of protein markers for differentiation and/or induction of cell apoptotic processes. The agonist effect depends largely on the cell line tested and is dose-dependent (29).

In colon and colorectal cell lines, PPARγ1 is the main protein isoform (30,31). Recently, several transcripts resulting from alternative promoter usage and splicing of untranslated exons of the *PPARG* gene have been identified (14). Bioinformatic analysis based on previous data (9,10,13,14) and representative *EST* alignment (Table II) lead us to complete a previous map of known and putative untranslated exons named exon A, A0-A5 (Fig. 1). However, using RT-PCR experiments, we failed to detect A, A3 and A4 and therefore it is likely that these exons are not included in human colon PPARγ1 mRNA. Wang *et al* demonstrated that exons A and A3 are used in normal and tumoral mammary tissues (14). Exon A3 expression is restricted to normal mammary tissue suggesting a tissue specific expression. In the present study, similar results have been obtained with exon A5, whose expression is higher in fibroblast or HeLa cells than in colorectal cancer-derived cells (Figs. 5 and 4, respectively). Our results demonstrated that mRNA composed of the exonic region A5-A2 is higher in proliferating cells in three out of four cell-lines tested (Fig. 4b).

In colorectal cancer-derived cells, we showed that several transcripts encoding PPARγ1 protein are present as demonstrated by RT-PCR and by 5' primer extension experiments (Figs. 4, 5 and 8). Our results support evidence that PPARγ1 transcription depends on multiple promoter usage and alternative splicing leading to fine transcription regulation within the cells as described within macrophages and breast cancer cells (13-15). Likewise, in pre-adipocytes and in mature adipocytes, PPARγ1 mRNA levels remain constant whereas PPARγ2 mRNA levels increase upon adipocyte differentiation (32-34). When colon cancer-derived

cells were treated with PPARγ agonists (Fig. 6b), the PPARγ mRNA level was modified only for the combined A0-, A1-, and A5-A2-PPARγ1 transcripts, the levels of the other transcripts remained constant. It must be noted that we used PPARγ agonist concentrations that did not induce cell apoptosis as it has been demonstrated by others (29,35,36). Additional treatments either with actinomycin D (Fig. 7a) or with cycloheximide (Fig. 7b) suggest that PPARγ transcript content depends on RNA flux controlled in two ways, high mRNA turnover and protein synthesis-dependent stability of mRNA. Moreover, we show here that increases in the PPARγ1 mRNA levels in response to receptor agonist treatment were associated with increases in particular transcripts levels (Fig. 6b). Similar results were obtained recently with human THP-1 macrophages (15). Treatment with agonist increased PPARγ transcript isoform composed of particular exon C and D (and named PPARγ5 isoform), whereas agonist treatment leads to decrease PPARγ1 and γ2 mRNA levels. We suggested that A2 could participate to structural stability of PPARγ mRNA. Taken together, our results did not confirm previous work demonstrating that PPARγ3 is the main isoform in colon cells models (26,37). Using 5' extension experiment, we failed to demonstrate any extension product at the expected length (at 52 bp) when experiments were carried out with antisense primer designed in exon A2 (Fig. 8). Likewise, when HT-29 cells were treated with PPARγ agonist at low concentration, no change was observed in the mRNA isoform levels corresponding to the so-called PPARγ1 or PPARγ3 transcripts, as demonstrated by others using oxidized metabolites of linoleic acids as endogenous ligands for PPARγ (37). Others studies are needed to clarify the impact of specific treatment to the expression of each particular PPARγ1 transcript isoform. The role of each PPARγ1 transcript has to be established in colon cell model, even though the implication of the receptor in intestinal cell regulation begins to emerge (5).

Alternative splicing is a crucial mechanism to explain the diversity of gene expression. This mechanism has been shown to be altered in cancer (16). The involvement of PPARγ mRNA diversity had to be stated during development, proliferation or differentiation in the case of colon cells. As demonstrated recently, alternative splicing could explain the diverse modifications observed in signalling pathway from embryonic stem cells to tissue stem cells (38). In the present work, we suggested that alternative splicing could modify the diversity and the levels of PPARγ transcripts. This process could change the transcription rate in response to a specific signalling pathway or by ligand coactivator-dependent recruitment, as suggested by Chen *et al* (15). Finally, using 5' primer extension (Fig. 8) we detected unexpected 5' mRNA regions, which could not be assigned to association of some known exon A1. It is possible that other exonic combinations may exist as demonstrated recently in human THP-1 macrophages (15). It will be of interest to investigate if other untranslated exons may exist or not. In conclusion, we reported that in colon cancer-derived cells, diverse transcripts encoding PPARγ1 protein exist due to specific promoter usage and alternative splicing. The respective levels of the transcripts depend on the colon cell model used.

Acknowledgements

We thank Professor D. Desor for statistical analysis, E. Brunner for technical assistance, Professor S. Thornton for reading the manuscript. This work was supported by grants from 'Ligue contre le Cancer', 'Association pour la Recherche contre le Cancer' and from 'CIRC-CHRU Nancy'.

References

1. Isseman I and Green S: Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature 347: 645-650, 1990.
2. Wahli W, Devchand PR, Ijpenberg A, *et al*: Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents regulate gene expression through direct binding to peroxisome proliferator-activated receptors. Adv Exp Med Biol 447: 199-209, 1999.
3. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, *et al*: Convergence of 9-*cis* retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. Nature 358: 771-774, 1992.
4. Isseman I, Prince RA, Tugwood JD, *et al*: The peroxisome proliferator-activated receptor: retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs. J Mol Endocrinol 11: 37-47, 1993.
5. Drori S, Girnun G, Tou L, *et al*: Hic-5 regulates an epithelial program mediated by PPARγ. Genes Dev 19: 362-375, 2005.
6. Michalik L, Desvergnes B and Whali W: Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: complex stories. Nat Rev Cancer 4: 61-70, 2004.
7. Beamer BA, Negri C, Yen CJ, *et al*: Chromosomal localization and partial genomic structure of the human peroxisome proliferator activated receptor-gamma (hPPAR gamma) gene. Biochem Biophys Res Commun 233: 756-759, 1997.
8. Elbrecht A, Chen Y, Cullinan C, *et al*: Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator-activated receptors γ1 and γ2. Biochem Biophys Res Commun 224: 431-437, 1996.
9. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, *et al*: The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR gamma gene. J Biol Chem 272: 18779-18789, 1997.
10. Fajas L, Fruchart JC and Auwerx J: PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. FEBS Lett 438: 55-60, 1998.
11. Sundvold H and Lien S: Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)γ promoter in man and transactivation by the nuclear receptor RORα1. Biochem Biophys Res Commun 287: 383-390, 2001.
12. Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, *et al*: Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor-γ (mPPARγ) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPARγ isoforms. Proc Natl Acad Sci USA 92: 7921-7925, 1995.
13. Zhou J, Wilson K and Medh J: Genetic analysis of four novel peroxisome proliferator activated receptor-γ splice variants in monkey macrophages. Biochem Biophys Res Commun 293: 274-283, 2002.
14. Wang X, Southard C and Kilgore M: The increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor-γ1 in human breast cancer is mediated by selective promoter usage. Cancer Res 64: 5592-5596, 2004.
15. Chen Y, Jimenez A and Medh J: Identification and regulation of novel PPARγ-splice variants in human THP-1 macrophages. Biochem Biophys Acta 1759: 32-43, 2006.
16. Kalnina Z, Zahakin P, Silina K, *et al*: Alteration of pre-mRNA splicing in cancer. Genes Chromosomes Cancer 42: 342-357, 2005.
17. El-Bouhtoury F, Keller JM, Colin S, *et al*: Peroxisomal enzymes in normal and tumoral human breast. J Pathol 166: 27-35, 1992.
18. Chomczynski P and Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-159, 1987.
19. Aviv H and Leder P: Purification of biologically active globin messager RNA by chromatography on oligo thymidylic acid-cellulose. Proc Natl Acad Sci USA 69: 1408-1412, 1972.
20. Domenjoud L, Nussbaum G, Adham I, *et al*: Genomic sequences of human protamines whoses gene, PRM1 and PRM2, are clustered. Genomics 8: 127-133, 1990.

21. Mansen A, Guardioladiaz H, Rafter J, *et al*: Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in the mouse colonic mucosa. Biochem Biophys Res Commun 222: 844-851, 1996.
22. Laemmli EK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970.
23. Towbin H, Staehelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350-4354, 1979.
24. Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, *et al*: Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. Biol Cell 47: 323-330, 1983.
25. Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, *et al*: Growth adaptation to methotrexate of HT29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. Cancer Res 50: 6334-6343, 1990.
26. Huin C, Schohn H, Hatier R, *et al*: Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in differentiating human colon adenocarcinoma Caco-2. Biol Cell 94: 15-27, 2002.
27. Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, *et al*: Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor-γ is linked to ligand-dependent activation. J Biol Chem 275: 18527-18533, 2000.
28. Sarraf P, Mueller E, Jones D, *et al*: Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. Nat Med 4: 1046-1052, 1998.
29. Kato M, Kusumi T, Tsuchida S, *et al*: Induction of differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in colon cancer cell lines by troglitazone. J Cancer Res Clin Oncol 130: 73-79, 2004.
30. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, *et al*: Tissue distribution and quantification of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-α in humans: no alterations in adipose tissue and NIDDM patients. Diabetes 46: 1319-1327, 1997.
31. Dubois RN, Gupta R, Brockman J, *et al*: The nuclear eicosanoid receptor, PPARgamma, is aberrantly expressed in colonic cancers. Carcinogenesis 19: 49-53, 1998.
32. Chawla A, Schwartz EJ, Dimaculangan DD, *et al*: Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. Endocrinology 135: 798-800, 1994.
33. Tontonoz P, Hu E and Spiegelman BM: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPARγ2, a lipid-activated transcription factor. Cell 79: 1147-1156, 1994.
34. Thuillier P, Baillie R, Sha X, *et al*: Cytosolic and nuclear distribution of PPARgamma2 in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. J Lipid Res 39: 2329-2338, 1999.
35. Sunami E, Tsuno NH, Kitayama J, *et al*: Decreased synthesis of matrix metalloproteinase-7 and adhesion to extracellular matrix proteins of human colon cancer cells treated with troglitazone. Surg Today 32: 343-350, 2002.
36. Kitamura S, Miyazaki Y, Shinomura Y, *et al*: Peroxisome proliferator-activated receptor γ induces growth arrest and differentiation of human colon cancer cells. Jpn J Cancer Res 90: 75-80, 1999.
37. Bull A, Steffensen K, Leers J, *et al*: Activation of PPARγ in colon tumor cell lines by oxidized metabolites of linoleic acid, endogenous ligands for PPARγ. Carcinogenesis 24: 1717-1722, 2003.
38. Pritsker M, Doniger T, Kramer L, *et al*: Diversification of stem cell molecular repertoire by alternative splicing. Proc Natl Acad Sci USA 102: 14290-14296, 2005.
39. Brandenberger R, Wei H, Zhang S, *et al*: Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. Nat Biotechnol 22: 707-716, 2004.
40. Pfeifer AM, Cole KE, Smoot DT, *et al*: Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics and metabolize chemical carcinogens. Proc Natl Acad Sci USA 90: 5123-5127, 1992.

Abstract :

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) belong to the nuclear hormone receptor family. Three isotypes, encoded by separate genes, have been identified: PPARα, PPARβ/δ and PPARγ. They are involved in lipid metabolism, glucose homeostasis, cell proliferation and differentiation, and inflammatory response. They have also been implicated in colon carcinogenesis and/or tumour progression. Regarding the fact that PPARγ and α play a role in colon cancer and in other cancer cell type, we studied the effect of PPARγ and α activation by thiazolidinediones and fibrates, respectively, on adhesion and migration of colon adenocarcinoma HT29 cell line after short (one up to five days) and long (up to 35 days) term drug exposition. Cells were treated with pioglitazone and rosiglitazone. Expression of molecules involved in cell adhesion and/or migration (integrin α3-, α5-, αV-, β1-, β3-, β4-chain, semaphorin-6B, E-cadherin and laminin5-γ2) was measured by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and flow cytometry analysis or Western blotting. Cell adhesion and migration were tested. Gelatinolytic activity of MMP2 and MMP9 was evaluated by gel zymography. Exposure to thiazolidinedione modifies expression of several genes involved in HT29 cell adhesion and migration, especially when cells are chronically treated with each drug. Of interest, long cell treatment either with pioglitazone, rosiglitazone or fenofibrate induced expression of integrin α5-chain. Our results suggest that the modulation of adhesion molecule expression by thiazolidinediones is partly through PPARγ-dependent activation and that effects are different according to the dose and nature of ligand. *In vivo*, thiazolidinediones especially inhibit distant metastasis formation and diminish tumoral growth. In prevention, pioglitazone abolish tumoral and metastasis development. Using the same experimental approach, we demonstrated that fenofibrate as a ligand of PPARα raised similar results. Collectively, we conclude that treatment with PPARγ or α agonists may be interesting in the improvement of colon cancer treatment.

Résumé :

Les récepteurs activables par les proliférateurs de peroxysomes appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones. Trois isotypes de PPAR, codés par des gènes différents, ont été identifiés : PPARα, PPARβ/δ et PPARγ. Les PPAR sont impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique, dans l'homéostasie du glucose, dans la prolifération cellulaire et dans la réponse inflammatoire. Ils interviennent également dans la carcinogenèse colique et/ou la progression tumorale. PPARγ et α pouvant avoir un rôle protecteur dans le cancer colorectal et dans d'autres cancers, nous avons étudié l'effet de leur activation par les thiazolidinediones et les fibrates, respectivement, sur l'adhérence et la migration de la lignée HT29 dérivant d'adénocarcinome colique humain. Les cellules ont été traitées avec la pioglitazone, la rosiglitazone ou le fénofibrate, pendant un temps court (24 heures ou 5 jours) ou de manière chronique (jusqu'à 35 jours). L'expression de molécules impliquées dans l'adhérence et/ou la migration cellulaires (intégrines α3, α5, αV, β1, β3, β4, sémaphorine 6B, cadhérine E et chaîne γ2 de la laminine 5) a été mesurée par RT-PCR semi-quantitative, cytométrie en flux et immunoréplique. L'adhérence et la capacité migratoire des cellules traitées ont également été vérifiées. L'activité gélatinase des MMP2 et 9 a été testée par zymographie. Nos résultats montrent que les thiazolidinediones et le fénofibrate modifient l'expression de gènes impliqués dans l'adhérence et la migration des cellules HT29, en particulier lorsque les cellules sont exposées de façon chronique. Un traitement long, quel que soit l'agoniste, induit l'expression de l'intégrine α5. Les résultats obtenus suggèrent que la modification de l'expression des molécules d'adhérence par les thiazolidinediones est au moins en partie due à un mécanisme PPARγ-dépendant, et que l'ensemble des effets observés diffèrent selon le temps de traitement, la dose et la nature du ligand. *In vivo*, les thiazolidinediones en particulier inhibent la formation de métastases à distance et diminuent le volume tumoral. Administrée en prévention, la pioglitazone abolit la formation des tumeurs et métastases. En utilisant la même approche expérimentale, des résultats comparables ont été obtenus en utilisant le fénofibrate, ligand de PPARα. En conclusion, un traitement par les agonistes de PPARγ et α pourrait être intéressant pour l'amélioration des traitements actuels du cancer du colon.