



HAL
open science

Expression des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) au niveau du colon sain et tumoral

Cécile Huin

► **To cite this version:**

Cécile Huin. Expression des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) au niveau du colon sain et tumoral. Biologie moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2002. Français. NNT : 2002NAN10245 . tel-01754382

HAL Id: tel-01754382

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754382v1>

Submitted on 30 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

THESE

présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université Henri Poincaré-Nancy I
en Biologie Moléculaire et Cellulaire**

par

Cécile HUIN

***Expression des récepteurs activés par les
proliférateurs de peroxysomes (PPAR)
au niveau du colon sain et tumoral***

(Travail dirigé par H. SCHOHN, Maître de Conférences, UHP-Nancy I)

Soutenance publique prévue le 15 novembre 2002

Membres du Jury :

**Rapporteurs : P. SIMON-ASSMANN, DR2, INSERM U381, Strasbourg
N. LATRUFFE, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon**

**Examineurs : M. DAUÇA, Professeur, UHP-Nancy I (Directeur de Thèse)
F. PLÉNAT, Professeur en Médecine, CHU, Nancy
L. DOMENJOUR, Maître de Conférences, UHP-Nancy I**

Je remercie chaleureusement Monsieur le Professeur Michel DAUÇA de m'avoir accueillie dans son Laboratoire pendant ces cinq années. J'ai toujours trouvé auprès de lui rigueur, gentillesse, humour et compréhension.

Je remercie très sincèrement le Docteur Hervé SCHOHN. Dès mon arrivée au Laboratoire, il m'a fait pleinement confiance. Tout au long de ces années, il a su m'orienter, me conseiller et m'encourager. J'aimerais lui exprimer à travers ce mémoire m'a plus profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur François PLÉNAT de m'avoir permis de réaliser les techniques d'immunocytochimie au sein de son équipe et de m'avoir fourni les biopsies de colons humains. Que ce mémoire soit pour moi l'occasion de lui exprimer ma gratitude.

Je remercie les Membres du Jury d'avoir accepté de juger ce travail malgré leurs nombreuses obligations.

Je remercie les Membres du Laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement, Jean-Marie, Alf, Hossam, Lionel de m'avoir soutenue dans cette épreuve. Mes remerciements vont également à Annie et Adeline en qui leur participation à ce travail était très agréable.

Mes remerciements vont également à Sylviane et à Corinne pour qui les techniques d'immunocytochimie ne sont plus un secret. Leur disponibilité, leur gentillesse et leur professionnalisme sont exemplaires. Je remercie aussi Denise.

Mes remerciements vont également au Professeur Didier DESOR qui m'a été d'excellents conseils pour les analyses statistiques ainsi qu'à Madame Renée HATIER pour sa participation dans ce travail.

Je remercie le Professeur Daniel MÉNARD d'avoir collaboré et de nous avoir fourni les pièces de colon foetal humain.

Je remercie l'Association de la Recherche sur le Cancer (ARC) de m'avoir attribué une bourse d'études.

Merci à Audrey, Julien et Cathy.

Merci également à toute ma famille.

Expression des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) au niveau du colon sain et tumoral

Liste des abréviations.....	2
Avant-propos.....	4
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
CARACTERES GENERAUX SUR LE COLON FCETAL ET LE COLON ADULTE SAIN	
I. LE TRACTUS DIGESTIF FCETAL HUMAIN	7
a. Principaux stades de développement du tractus digestif foetal humain.....	7
b. Développement morphologique et fonctionnel de l'épithélium intestinal foetal humain...	8
II. LE COLON HUMAIN.....	9
a. Anatomie du gros intestin.....	9
b. L'épithélium du colon.....	9
c. Prolifération et différenciation des cellules du colon adulte.....	11
III. REGULATION DU DEVELOPPEMENT ET DE LA DIFFERENCIATION DE L'EPITHELIUM INTESTINAL	11
a. La voie de transduction Wnt/Wingless.....	12
<i>Mécanisme de transduction.....</i>	12
<i>Gènes supprimeurs de tumeurs.....</i>	13
<i>Gènes cibles.....</i>	14
b. Facteurs transcriptionnels intervenant dans le développement et la différenciation de l'épithélium	16
LES RECEPTEURS ACTIVES PAR LES PROLIFERATEURS DE PEROXYOSOMES : LES PPAR	
I. STRUCTURE DES PPAR	18
II. LES DIFFERENTS ISOTYPES DE PPAR.....	19
III. DISTRIBUTION TISSULAIRE DES PPAR.....	20
IV. MODE D'ACTION DES PPAR.....	20
a. Formation d'hétérodimères.....	20
b. Les activateurs des PPAR.....	22
c. Phosphorylation et déphosphorylation.....	23
V. INTERVENTION DES PPAR DANS LE METABOLISME LIPIDIQUE	24
a. Métabolisme des acides gras	24
b. Différenciation adipocytaire.....	26
VI. INTERVENTION DES PPAR DANS LA DIFFERENCIATION D'AUTRES TYPES CELLULAIRES.....	26
VII. ROLES DES PPAR DANS L'INFLAMMATION TISSULAIRE.....	26

VIII. ROLES DES PPAR DANS CERTAINES PATHOLOGIES	27
a. PPAR et athérosclérose.....	27
b. PPAR et hépatocarcinogénèse.....	29
c. PPAR et autres processus néoplasiques.....	30

CANCERS DU COLON ET PPAR

I. LES CANCERS DU COLON	32
a. Données générales.....	32
b. Incidence et caractères épidémiologiques des cancers colorectaux.....	32
c. Histologie du cancer du colon.....	33
<i>Les adénomes colorectaux</i>	33
<i>Les carcinomes colorectaux</i>	34
d. Classification des cancers colorectaux.....	36
e. La séquence polype adénomateux/adénocarcinome.....	39
f. Les altérations génétiques au cours des cancers colorectaux.....	40

II. IMPLICATION DES PPAR DANS LE CANCER COLORECTAL	42
---	----

OBJECTIFS DU TRAVAIL	46
-----------------------------------	----

MATERIELS ET METHODES	48
------------------------------------	----

I. MODELES BIOLOGIQUES	49
a. Lignées cellulaires.....	49
b. Tissus humains.....	50
<i>Intestins fœtaux</i>	50
<i>Adénocarcinomes colorectaux</i>	50
c. Tissus de rats.....	50
<i>Obtention des tissus</i>	50
<i>Isolement fractionné des entérocytes le long de l'axe crypto-villositaire</i>	50

II. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES	51
a. Dosage des protéines.....	51
<i>Extraction protéique</i>	51
<i>Dosage protéique</i>	51
b. Dosages enzymatiques.....	52
<i>Préparation des homogénats cellulaires</i>	52
<i>Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline</i>	52
<i>Dosage de l'activité de la saccharase/isomaltase</i>	52
<i>Dosage de l'activité de la catalase</i>	52
<i>Dosage de l'activité de l'acyl CoA-oxydase</i>	53
c. Production des anticorps polyclonaux anti-PPAR.....	53
d. Technique d'immunoréplique (Western blotting).....	54
<i>Electrophorèse</i>	54
<i>Transfert sur membrane PVDF</i>	54
<i>Détection immunologique</i>	54

III. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES	55
a. Immunocytochimie.....	55
<i>Immunocytochimie sur coupes de tissus congelés du tractus digestif fœtal humain</i>	55
<i>Immunocytochimie des cellules Caco-2</i>	56
• Immunocytochimie sur coupes en paraffine des cellules Caco-2	

• Immunocytochimie sur coupes semi-fines des cellules Caco-2	
<i>Immunocytochimie sur coupes en paraffine des cellules HT29</i>	57
<i>Immunocytochimie sur coupes en paraffine des tissus provenant d'adénocarcinome colique adulte</i>	58
• Mise en évidence des PPAR	
• Mise en évidence de la protéine cytochrome c	
• Mise en évidence des protéines cytokératine 18 et de Ki67	
b. Microscopie électronique.....	60
IV. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	60
a. Extraction des ARN totaux.....	60
b. Extraction des ARN polyadénylés.....	61
c. Quantification du taux d'ARNm par la technique de Northern-Blotting.....	62
<i>Electrophorèse des ARN</i>	62
<i>Transfert sur Nylon</i>	62
<i>Marquage de la sonde</i>	63
<i>Préhybridation et hybridation</i>	63
d. Quantification du taux d'ARNm par la technique de Protection à la nucléase S1.....	64
<i>Production de sondes ADNc spécifiques de chaque isoforme de PPAR</i>	64
<i>Marquage au [³²P]-dCTP des sondes spécifiques de chaque hPPAR</i>	65
<i>Technique de protection à la nucléase S1</i>	66
e. Techniques de réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	67
<i>RT-PCR compétitive</i>	67
• Principe	
• Traitement à la DNase RQ1 dépourvue d'activité RNase	
• Transcription Inverse	
• Réaction de polymérisation en chaîne	
• Digestion enzymatique des produits de PCR et quantification	
• Analyses statistiques	
<i>PCR semi-quantitative</i>	71
<i>PCR semi-nichée</i>	71

RESULTATS	73
------------------------	----

EXPRESSION DES PPAR AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU TRACTUS DIGESTIF FOETAL HUMAIN

I. CARACTERISATION DES ANTICORPS ANTI-PPAR	74
II. ANALYSE DES PPAR AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU TRACTUS DIGESTIF FOETAL HUMAIN	74
a. Expression de PPAR α	74
b. Expression de PPAR β	75
c. Expression de PPAR γ	76
III. DISCUSSION	77
a. Expression des PPAR au niveau du tractus digestif humain.....	77
b. Expression spatio-temporelle des PPAR.....	78

EXPRESSION DES PPAR AU NIVEAU DE LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES CACO-2

I. ANALYSE DE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE DES CELLULES CACO-2.....	80
II. ANALYSE TRADUCTIONNELLE DES PPAR AU COURS DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES CACO-2.....	81
a. Choix des techniques.....	81
b. Résultats.....	81
<i>Expression de PPARα dans les cellules Caco-2.....</i>	81
<i>Expression de PPARγ et de PPARγ2 dans les cellules Caco-2.....</i>	82
III. EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DES PPAR AU COURS DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES CACO-2.....	82
a. Choix des techniques.....	82
<i>Etude par Northern blotting et par la technique de protection à la nucléase S1.....</i>	82
<i>Etude par RT-PCR.....</i>	83
b. Résultats obtenus.....	83
<i>Mesure du taux des ARNm de PPARα dans les cellules Caco-2.....</i>	84
<i>Mesure du taux des ARNm de PPARβ dans les cellules Caco-2.....</i>	84
<i>Mesure du taux des ARNm de PPARγ dans les cellules Caco-2.....</i>	84
• PPAR γ	
• PPAR γ 1	
• PPAR γ 2	
• PPAR γ 3	
V. DISCUSSION	86
a. La différenciation des cellules Caco-2 est accompagnée d'altérations peroxysomales..	86
b. L'expression de PPAR α augmente au cours de la différenciation des cellules Caco-2..	87
c. Variations du taux d'ARNm codant pour PPAR β et pour les autres marqueurs étudiés.	88
d. Expression différentielle de PPAR γ au cours de la différenciation cellulaire des cellules Caco-2.....	88
<i>Variations du taux transcriptionnel des PPARγ.....</i>	89
<i>Variations du taux des protéines de PPARγ.....</i>	89
<i>Rôles de PPARγ au cours de la différenciation des cellules Caco-2.....</i>	90

EXPRESSION DES PPAR AU NIVEAU D'ADENOCARCINOMES COLIQUES HUMAINS

I. EXPRESSION DES PROTEINES DES PPAR AU NIVEAU D'ADENOCARCINOMES COLIQUES HUMAINS	92
a. Difficultés rencontrées.....	92
b. Caractéristiques cliniques et anatomo-pathologiques des patients et des échantillons..	93
c. Expression de PPAR γ dans les cellules d'adénocarcinomes coliques.....	93
<i>Tissus sains.....</i>	94
<i>Tumeurs.....</i>	94
II. ANALYSE DU TAUX DES ARNm DES PPAR, DE COX-1 ET 2 ET DE β-CATENINE AU NIVEAU D'ADENOCARCINOMES COLIQUES.....	94
a. Quantification au niveau des adénocarcinomes coliques.....	94
<i>Prélèvements biopsiques.....</i>	94

<i>Caractéristiques cliniques et anatomo-pathologiques</i>	94
b. Analyses statistiques des résultats de quantification par RT-PCR compétitive.....	95
<i>Analyse générale</i>	95
<i>Analyse en fonction du stade TNM</i>	96
<i>Analyse en fonction du siège tumoral</i>	96
III. DISCUSSION	97
a. Expression de PPAR γ dans les adénocarcinomes coliques humains.....	97
b. Localisation cytoplasmique de PPAR γ dans les cellules d'adénocarcinomes coliques humains.....	98
c. Expression des ARNm des PPAR et des autres marqueurs étudiés au sein des adénocarcinomes coliques humains.....	99
DISCUSSION GENERALE.....	102
BIBLIOGRAPHIE.....	110
PUBLICATIONS.....	129

© 2011
S. J. L. & S. J. L. & S. J. L.
S. J. L. & S. J. L. & S. J. L.
S. J. L. & S. J. L. & S. J. L.

A mon père,

A mon beau-père,

Liste des abréviations

13-HODE : 13-hydroxy-octadécadiénoïque HODE
5,8,11,14-ETYA acide 5,8,11,14- eicosatétraénoïque
5'UTR : 5' *untranslated region*
9-HODE : 9-hydroxy-octadécadiénoïque
ABR : AB Reagent
ADN : acide desoxyribonucléique
AF1, AF2 *activating function 1* ou *2*
APC : *adenomatous polyposis coli*
Apo-A1 : apolipoprotéine A1
ARN : acide ribonucléique
BAEC : cellules endothéliales aortiques bovines
CARLA : *coactivator-dependent receptor ligand assay*
Cdx1,2 : *caudal-related homeobox 1,2*
COX1,2 : cyclooxygnase 1 ou 2
DAB : 3,3' diaminobenzamidine
DBD : *DNA binding domain*
DEPC : diéthylpyrocarbonate
DMEM : milieu minimum essentiel modifié par Dulbecco
DMSO : diméthylsulfoxyde
DPBS : Dulbecco's modified sodium phosphate buffer
DPBS : tampon phosphate de sodium/potassium modifié par Dulbecco
DR1 : *direct repeat 1*
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EPA : acide docosaénoïque
Et-1 : endothéline-1
FAAR : fatty acid-activated receptor
FAP : *familial adenomatous polyposis*
FITC : fluorescéine
GSK3 β : *glycogen synthase kinase 1*
HETE : acide 8(S)-hydroxy-eicosatétraénoïque
HGF *hepatocyte growth factor*
HMG : *high mobility group domain*
HNF1 : *hepatocyte nuclear factor 1*
ICAM-1 : molécules d'adhésion intercellulaire-1
IL-1 : interleukine 1
INOS : oxide nitrique synthase inductible
JAK2/STAT5b : *janus kinase 2/signal transducer and activation transcription 5*
Kd : constante de dissociation
KLH : hémocyanine de Patelle
K-ras : : Kirsten-ras, oncogène K-ras
LBD : *ligand binding domain*
ERK1 et 2 : *extracellular signal-regulated kinases*
LDL : lipoprotéine de faible densité
LEF/TCF : *lymphoid enhancer factor/Tcell factor*
LT : leucotriène
MAP Kinase : *mitogen-activated kinase*
MCP-1 : protéine chimiotactique monocyte-1
MMP : métalloprotéinase matricielle
NF- κ B : facteur nucléaire κ B

AINS : *non steroid anti inflammatory drug (NSAID)*
pb : paires de base
PBS : tampon phosphate de sodium
PG : prostaglandines
PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE : *Peroxisome Proliferator Responsive Element*
PVA : polyvinyl alcool
RT-PCR : transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne
RXR : récepteur à l'acide 9 *cis* rétinolique
SMC : cellules des muscles lisses
SR-A : protéine scavenger de classe A
SRC-1 : *steroid receptor co-activator-1*
TBE : tampon Tris/Borate/EDTA
TBS-Tween : tampon TRIS/HCl de sodium contenant du Tween
TCF : *t cell factor*
TE : tampon TRIS/EDTA
TZD : thiazolidinédione
UCP1 ou UCP2 : *uncoupling protein 1* ou *2*
VCAM-1 : molécules d'adhésion des cellules vasculaires
VSMC : cellules des muscles lisses vasculaires

AVANT-PROPOS

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones. Il existe trois sous-types de PPAR appelés PPAR α , β et γ . Ces facteurs de transcription semblent être impliqués non seulement dans de nombreux processus biologiques et physiologiques tels l'homéostasie lipidique, la différenciation adipocytaire, la thermorégulation, la régulation de l'activité des enzymes peroxyosomiques, l'activation des macrophages, mais également dans un certain nombre de processus morbides comme le développement de la plaque d'athérome ou dans la tumorigenèse au niveau de nombreux tissus. Ces facteurs de transcription jouent également un rôle important au cours du développement, en particulier dans l'implantation des embryons au niveau utérin et dans le développement du système nerveux.

Les PPAR sont également présents dans le colon sain et tumoral. Au cours du développement du tractus digestif chez le rat, les différents isotypes sont présents. Avec l'apparition de la régionalisation de l'intestin, leur niveau d'expression va être modifié. Il en résulte des gradients d'expression selon l'axe proximo-distal des intestins. Parallèlement, au niveau de l'intestin grêle, l'expression des PPAR varie également en fonction de la différenciation des cellules selon l'axe crypto-villositaire. Cependant, ces deux situations biologiques n'avaient pas été étudiées chez l'Homme. Dans les cancers coliques, deux isotypes semblent particulièrement impliqués dans la formation et dans la progression tumorale, PPAR β et PPAR γ . Les données bibliographiques concernant PPAR γ suggèrent un rôle pro-tumoral chez les rongeurs et un rôle protecteur chez l'Homme ; ce rôle protecteur ayant été essentiellement mis en évidence à partir de lignées cellulaires continues. Par contre, nous ne disposons pas de données précises sur les niveaux d'expression de PPAR γ dans les adénocarcinomes coliques tant au niveau du taux d'ARNm que de celui de la protéine.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont pour objectif d'analyser l'expression des PPAR au cours du développement du tractus digestif humain, de la différenciation des cellules absorbantes de l'intestin et dans des biopsies prélevées à partir d'adénocarcinomes colorectaux.

Ainsi, nous rappellerons dans une première partie, les différentes étapes du développement de l'intestin. Les mécanismes moléculaires du développement et de la différenciation seront précisés. Un résumé des connaissances sur la famille des PPAR sera présenté, notamment leur implication respective dans les processus de différenciation cellulaire et au cours de pathologies humaines. Le rôle des PPAR dans les cancers du colon sera développé après un rappel sur des aspects morphologiques des cancers colorectaux et des données moléculaires et génétiques de la survenue de ces maladies.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux seront présentés et discutés.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

CARACTERES GENERAUX SUR LE COLON FŒTAL ET LE COLON ADULTE SAIN

I. LE TRACTUS DIGESTIF FŒTAL HUMAIN

a. Principaux stades de développement du tractus digestif fœtal humain

Le tube intestinal résulte de l'inflexion de l'embryon au cours de la 4^{ème} semaine de vie *in utero* (figure1). Il consiste en un intestin antérieur, aveugle du côté crânial, un intestin postérieur, aveugle du côté caudal, et un intestin moyen en communication avec le sac vitellin par le canal vitellin [130].

Au cours de la 5^{ème} semaine de gestation, la portion abdominale de l'intestin antérieur est divisée en œsophage, estomac et partie proximale du duodénum. A l'origine, l'estomac est fusiforme, mais la croissance différentielle de ces parois dorsale et ventrale produit la petite et la grande courbures. Dans le même temps, les diverticules hépatique, cystique, pancréatique, dorsaux et ventraux, apparaissent au niveau de la partie proximale, s'insinuent dans le mésogastre et donnent respectivement le foie, la vésicule biliaire avec le conduit cystique et le pancréas. La rate se forme par condensation du mésenchyme dans le mésogastre dorsal.

Au cours de la 6^{ème} et de la 7^{ème} semaine, l'estomac tourne autour de deux axes, un longitudinal et l'autre dorso-ventral, de telle sorte que la grande courbure s'oriente vers la gauche légèrement en direction caudale. Cette rotation pousse le foie vers la droite de la cavité abdominale tout en ramenant en même temps le duodénum et le pancréas au contact de la paroi postérieure où ils seront fixés. L'intestin moyen se différencie en duodénum distal, jéjunum, iléon, caecum et colon ascendant et les deux premiers tiers proximaux du colon transverse. Durant la 6^{ème} semaine, l'anse intestinale primitive qui fait hernie à travers l'ombilic, tourne de 90 degrés, sur son axe longitudinal, de telle sorte que le futur iléon se trouve vers la gauche et le futur gros intestin, à droite. Pendant que se différencient le caecum et l'appendice, le jéjunum et l'iléon continuent de s'allonger.

Dès la 10^{ème} et la 12^{ème} semaine fœtale, l'anse intestinale se retire dans la cavité abdominale et elle subit une rotation supplémentaire de 180 degrés pour donner la configuration définitive de l'intestin grêle et du gros intestin.

L'intestin postérieur est à l'origine du tiers distal du colon transverse, du colon descendant, du colon sigmoïde et du rectum.

b. Développement morphologique et fonctionnel de l'épithélium intestinal foetal humain

L'épithélium intestinal tapisse le tube digestif primitif. Cet épithélium est pluristratifié et se compose de cellules endodermiques non différenciées [130]. Les cellules bordant la lumière intestinale sont reliées entre elles par des complexes jonctionnels et présentent une bordure en brosse, encore peu développée [207]. Les cellules profondes ne présentent pas de telles modifications, mais conservent un potentiel prolifératif. A partir de la 9^{ème} semaine, les cellules endodermiques forment un épithélium unistratifié [107]. Cette transition s'accompagne dès la 11^{ème} semaine *in utero* de l'apparition des premières villosités intestinales qui vont se développer sur l'ensemble de l'intestin selon son axe proximo-distal. Les villosités se forment à la suite de la prolifération et de l'infiltration des cellules mésenchymateuses au niveau de l'épithélium pluristratifié [107]. Elles sont bien formées entre la 14^{ème} et la 16^{ème} semaine. A partir de ce stade, l'évolution de la morphologie entre l'intestin grêle et le colon change. Dans le colon, les villosités vont progressivement régresser et disparaître avant la naissance [195]. La muqueuse colique devient lisse. Elle est ponctuée par l'ouverture des glandes tubulaires. Au niveau de l'intestin grêle, les villosités vont s'accroître pour aboutir à leur forme définitive avant la naissance [107].

Le développement de l'intestin grêle et du colon s'accompagne également de différences fonctionnelles selon la région de l'intestin ou du colon. Ces différences régionales se mettent en place au cours du développement du tractus digestif selon l'axe proximo distal [282, 322]. De plus, les interactions entre cellules mésenchymateuses et épithéliales vont participer à l'intégrité et à la différenciation de l'épithélium intestinal [116, 157].

D'un point de vue fonctionnel, les hydrolases digestives telles que la saccharase/isomaltase, la lactase ou l'aminopeptidase N sont présentes dès la 8^{ème} semaine de gestation, mais elles ne sont décelables qu'à partir de la 11^{ème} semaine de vie foetale dans l'intestin foetal. Ces activités augmentent jusqu'à la 24^{ème} semaine sans atteindre des valeurs observées dans le duodénum adulte. Au niveau du colon, la disparition des villosités s'accompagne de la perte d'expression d'enzymes associées à la bordure en brosse des entérocytes telles que la saccharase/isomaltase ou la lactase [178]. L'activité de la saccharase/isomaltase diminue dès la 28^{ème} semaine de gestation pour atteindre un taux négligeable semblable à celui de l'adulte. Les activités de l'aminopeptidase N et de la phosphatase alcaline restent élevées au cours du développement foetal du colon et persistent au stade adulte mais à des taux plus bas [178, 342].

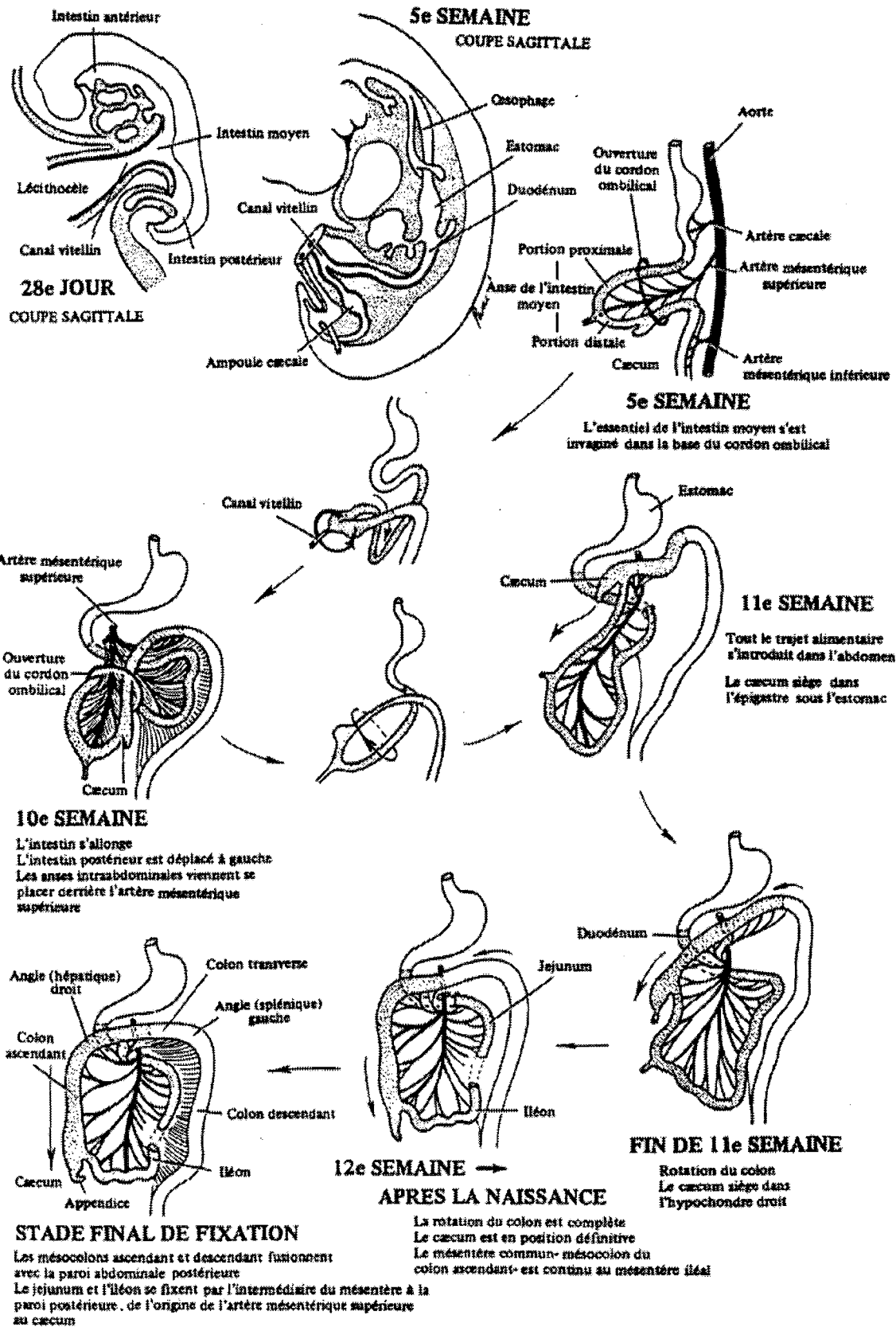


Figure 1 : Principaux stades du développement de l'intestin moyen chez humain [258]

II. LE COLON HUMAIN

a. Anatomie du gros intestin

D'un point de vue structural, le gros intestin humain mesure environ 1,5 m de longueur pour 6,5 cm de diamètre et s'étend de l'iléon à l'anus. Il se divise en quatre régions qui sont respectivement le caecum, le colon, le rectum et l'anus. Le colon se divise lui-même en quatre parties : le colon ascendant ou colon droit, le colon transverse, le colon descendant ou colon gauche et le colon sigmoïde (figure 2) [130].

D'un point de vue histologique, la paroi du gros intestin est constituée d'une muqueuse, d'une sous-muqueuse, d'une musculuse et d'une séreuse (figure 3). Ces couches concentriques formant l'ensemble du tube digestif diffèrent au niveau du colon. La muqueuse du gros intestin ne présente pas de villosités ni de valvules conniventes permanentes, mais elle est formée d'un épithélium monocouche simple. La structure de la sous-muqueuse est classique et commune à celle de l'intestin grêle. Elle contient du collagène, des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et un groupe de cellules ganglionnaires.

La musculuse est formée d'une couche externe de muscles longitudinaux, présentant un renflement formant trois bandes bien visibles appelées bandelettes longitudinales et d'une couche interne de muscles circulaires.

La séreuse du gros intestin fait partie du péritoine viscéral. Des petites poches de ce dernier remplies de graisse sont fixées aux bandelettes longitudinales et sont appelées appendices épiploïques.

b. L'épithélium du colon

L'épithélium colique est organisé en glandes tubulaires, longues et droites, qui s'étendent sur toute l'épaisseur de la muqueuse (figure 4). Il se compose principalement de deux types cellulaires, les cellules à mucus ou caliciformes et les cellules absorbantes ou cellules cylindriques (figure 5). D'autres types cellulaires sont également présents : les cellules entérochromaffines, les cellules M et les cellules de Paneth [88, 156].

Les cellules absorbantes [88, 156] ont pour rôle principal l'absorption de l'eau et des sels minéraux. Ces cellules sont localisées majoritairement à la surface de la muqueuse entre les glandes tubulaires (figure 5A). Les cellules sont reliées par des complexes jonctionnels. La bordure en brosse est moins développée que celles des entérocytes de l'intestin grêle. Elle est recouverte d'un glycocalyx. La formation et l'allongement de la bordure en brosse ont lieu au cours de la migration des cellules des cryptes vers le sommet

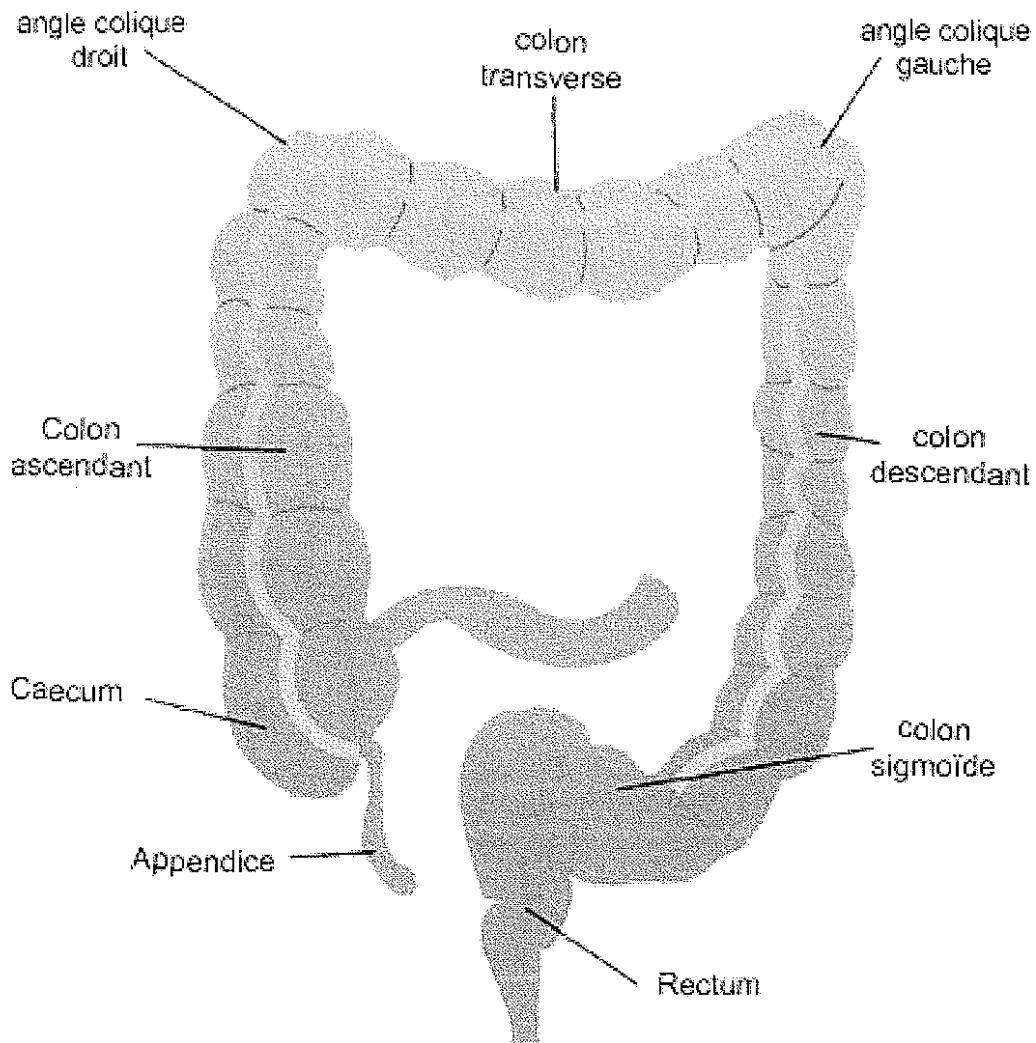


Figure 2 :Anatomie du gros intestin chez l 'Homme [92]

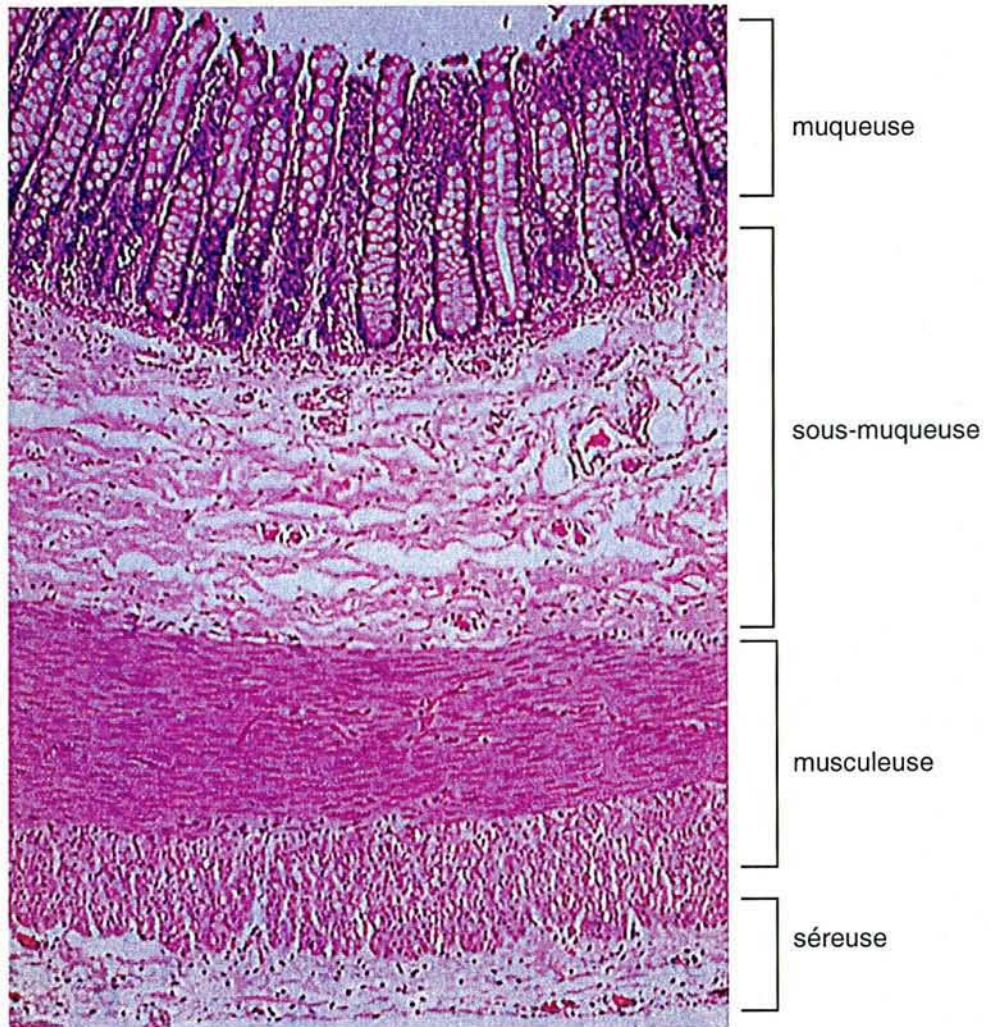


Figure 3 : Description des différentes couches formant la paroi du gros intestin [92]

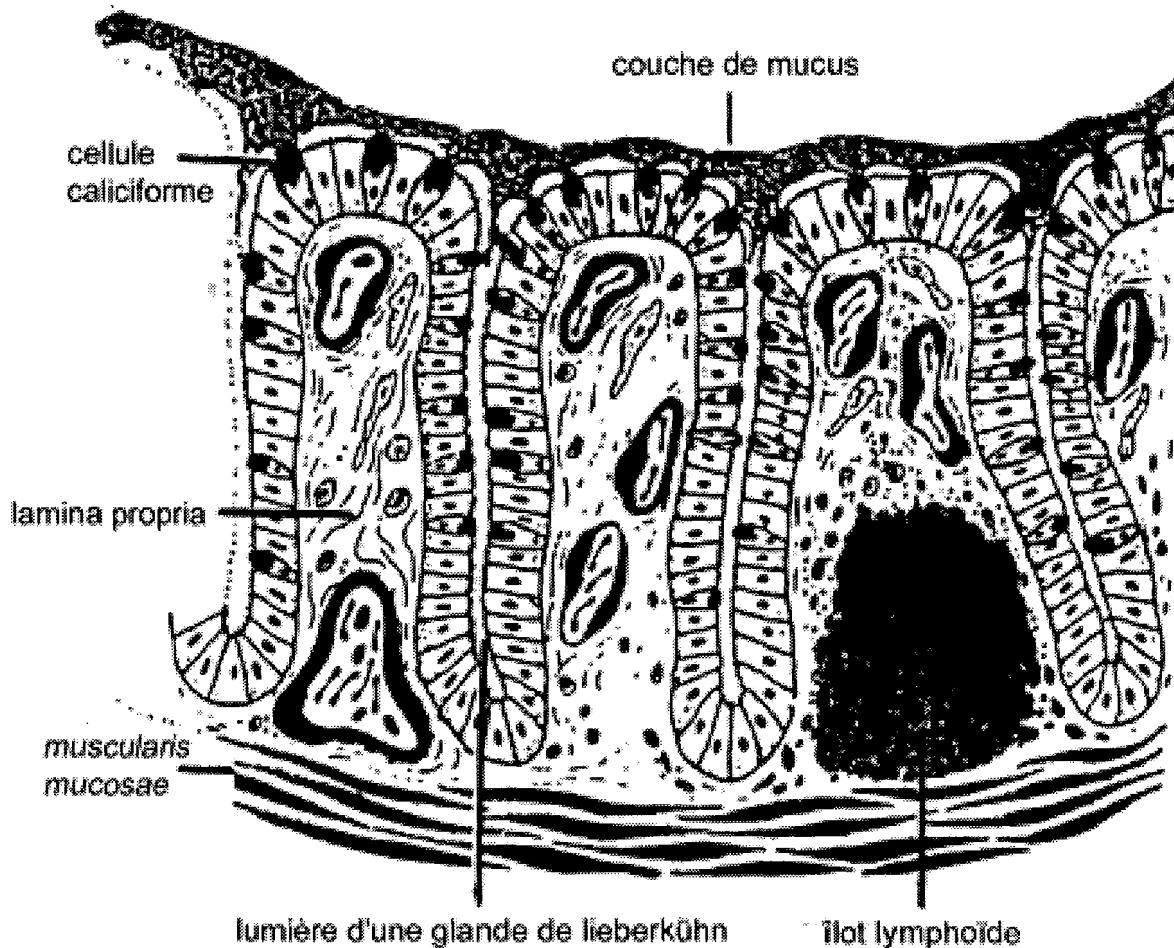


Figure 4 : Schéma de la muqueuse colique

La muqueuse colique est lisse. Elle se compose d'un épithélium unistratifié. Il se compose principalement de cellules à mucus et de cellules absorbantes. L'épithélium est organisé en glandes tubulaires ou glandes de Lieberkühn. La zone de prolifération des cellules épithéliales est située à la base de ces glandes. L'épithélium repose sur un tissu conjonctif appelé *lamina propria*. Des îlots lymphoïdes sont présents en contact étroit avec l'épithélium. Ils sont localisés à proximité des cellules M, cellules spécialisées dans le transport des particules et macromolécules vers les cellules lymphoïdes.

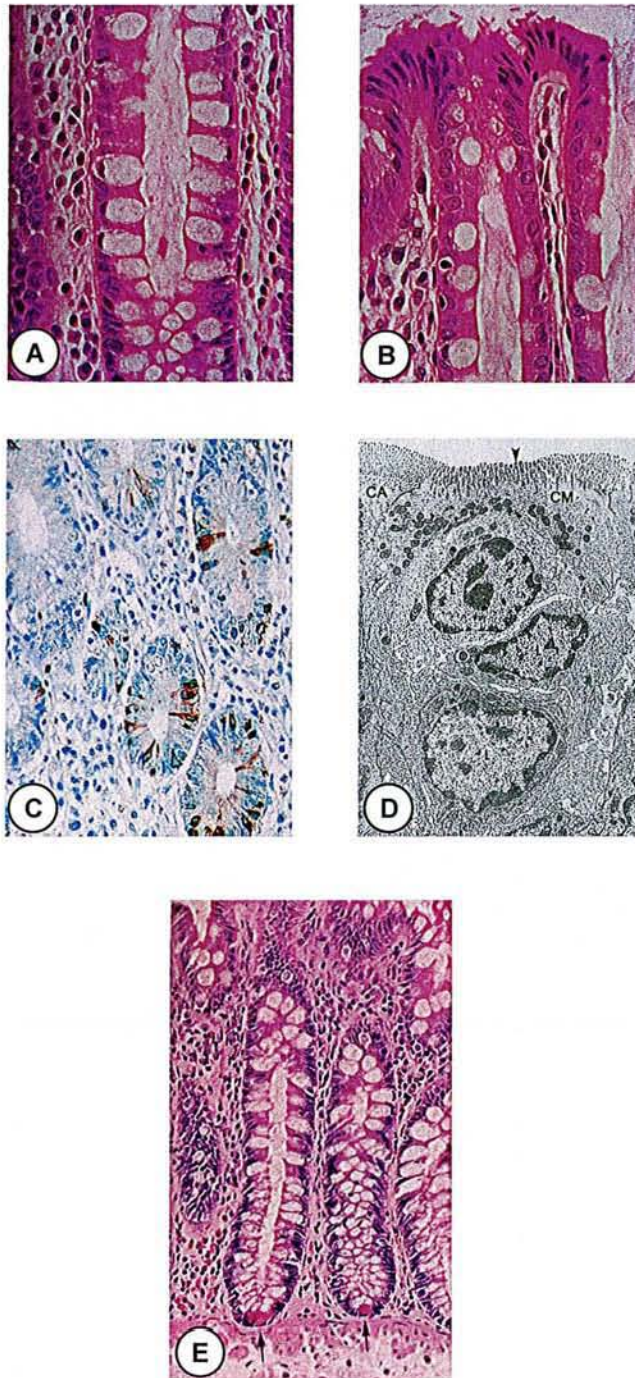


Figure 5 : les différents cellulaires de l'épithélium colique humain [92]

A : cellules caliciformes, **B** : cellules absorbantes, **C** cellules endocrines (mise en évidence par la présence des vésicules de sécrétion, couleur brunâtre), **D** : cellules M (observation en microscopie électronique. CM, cellules M ; CA, cellules absorbantes ; L, lymphocytes), **E** : cellules de Paneth (mise en évidence par immunohistochimie à la base des glandes tubulaires, flèches)

des glandes tubulaires. Les espaces intercellulaires peuvent être dilatés en fonction de l'état physiologique du colon. Le noyau arrondi est localisé vers la base des cellules.

Les cellules caliciformes [88, 156] sécrètent le mucus qui sert à lubrifier le contenu colique qui passe au fur et à mesure dans le colon. Les cellules à mucus sont abondantes au niveau du colon (figure 5B). Les cellules immatures ne présentent que peu de mucus. La différenciation de ces cellules selon l'axe crypte-sommet des glandes tubulaires s'accompagne de l'apparition de granules de mucus. Ces granules sont libérés dans la lumière du colon par exocytose. Le noyau est situé à la base de ces cellules. La sécrétion de mucus est continue et elle est observable au niveau des cryptes des glandes tubulaires. La taille des granules et la composition des mucines varient au cours de la différenciation de ces cellules. Les mucines sont de type sulfomucine au niveau des cryptes et de type carboxymucine vers le sommet des glandes et au niveau de la surface de l'épithélium [90]. De plus, il existe également une différence dans la composition des mucines en fonction de la région du colon [237].

Les cellules endocrines (figure 5C) sont peu nombreuses au niveau du colon (moins de 1% de l'ensemble des cellules). Elles sont localisées principalement au niveau du caecum et du rectum [29, 310]. Les cellules endocrines sont de petite taille, plutôt de forme arrondie ou de forme pyramidale. Elles contiennent des granules éosinophiles ou clairs ; ces granules sont libérées au niveau des membranes basale et latérale de ces cellules. Les produits de sécrétion ont une action paracrine sur les cellules voisines. Ces cellules exercent également une action endocrine lorsque les produits de sécrétion sont sécrétés, puis traversent la lame basale vers les capillaires sanguins [29, 310]. Il existe plusieurs types de cellules endocrines qui diffèrent par leur produit de sécrétion [29]. Cependant, il semblerait que ces cellules dérivent de la même population de cellules souches [198].

Les cellules M (M pour *Membranous*) sont associées à la présence de follicules lymphoïdes [343]. Ces cellules présentent au niveau de leur membrane baso-latérale soit des replis soit des prolongements membranaires (figure 5D). Cette architecture particulière est le résultat de l'invagination de lymphocytes ou de macrophages au niveau de la membrane baso-latérale. Les cellules M présentent une bordure en brosse irrégulière et courte avec peu de glycocalyx. Les microvillosités sont plus larges. Les cellules M participent à la présentation des antigènes aux macrophages et lymphocytes situés à proximité des follicules lymphoïdes [247, 249]. Ces cellules absorbent les macromolécules et les particules par endocytose. Les vésicules d'endocytose sont ensuite dirigées vers le pôle baso-latéral des cellules où elles sont absorbées par les cellules lymphoïdes situées dans l'espace intercellulaire formant une poche.

Les cellules de Paneth (figure 5E) sont également présentes au niveau du colon particulièrement au niveau du caecum et du colon ascendant [88, 156]. Elles sont localisées

à la base des glandes tubulaires. Les cellules de Paneth du colon ne diffèrent pas de celles de l'intestin. Elles participent à la défense de l'épithélium grâce à l'exocytose de lysozyme.

c. Prolifération et différenciation des cellules du colon adulte

Les cellules coliques différenciées sont produites par des cellules souches communes à l'ensemble de l'épithélium intestinal [44]. Au niveau du colon, ces cellules sont situées à la base des cryptes tubulaires. La zone de prolifération se situe au niveau des deux tiers inférieurs des cryptes [216]. La différenciation entraîne d'importants changements morphologiques et biochimiques notamment dans la composition des mucines [90]. Pendant leur migration le long de l'axe crypte-sommet des glandes tubulaires, les cellules acquièrent des fonctions d'absorption et de sécrétion. Les cellules du colon sénescents sont éliminées à la sortie des cryptes et remplacées par des cellules provenant de la zone de prolifération [78, 235]. Le renouvellement de ces cellules est assuré tous les trois à huit jours.

III. REGULATION DU DEVELOPPEMENT ET DE LA DIFFERENCIATION DE L'EPITHELIUM INTESTINAL

De nombreux travaux ont révélé que le développement proximo-distal de l'épithélium intestinal et que la différenciation dans l'axe crypto-villositaire au niveau de l'intestin grêle ou dans l'axe crypte-sommet des glandes tubulaires sont régulés par l'expression de nombreux gènes [54, 342]. De plus, l'interaction épithélium-mésenchyme joue également un rôle important dans ces processus [309].

Nous limiterons volontairement cette revue bibliographique à la description de la voie de signalisation Wnt/Wingless : D'une part, l'activation ou l'inactivation de cette voie conduit à la transcription ou à la répression de gènes-cibles, eux-mêmes impliqués dans les processus de développement de l'embryon et de la différenciation cellulaire. Cette voie de transduction a été étudiée chez *C. Elegans*, la Drosophile et le Xénope, où elle participe respectivement à l'induction du mésoderme, au développement de la polarité segmentaire et à la mise en place du patron dorso-ventral de l'embryon [362]. D'autre part, l'activation de cette voie de transduction est en partie responsable de la genèse des cancers colorectaux chez l'Homme [165].

a. la voie de transduction Wnt/Wingless

Mécanisme de transduction

La voie de transduction Wnt/Wingless est illustrée figure 6. [259, 362]. Le signal d'activation est une glycoprotéine riche en cystéines appartenant à la famille Wnt [240]. Chez les Vertébrés, cette famille est représentée par au moins 16 membres. Chez la drosophile, Wingless est l'homologue de la protéine Wnt [33, 272]. Parmi ces glycoprotéines, certaines sont impliquées dans les processus de transformation des cellules ; elles sont considérées comme des oncogènes cellulaires [367]. Par exemple, chez la souris, l'introduction dans les glandes mammaires de vecteurs rétroviraux contenant l'ADNc codant Wnt-1, 3 ou 10b entraîne l'apparition de nodules cancéreux [182, 277]. L'immortalisation cellulaire a été également obtenue à partir de fibroblastes de souris lorsque les protéines Wnt-1, 2 et 3b sont exprimées [23].

L'activation de la voie de transduction est réalisée par la fixation de la glycoprotéine Wnt au niveau d'un récepteur à sept domaines transmembranaires. Ce récepteur appartient à la famille *Frizzled* composée de 11 membres chez les vertébrés [18, 375]. La liaison au récepteur conduit à la phosphorylation de la protéine *Dishevelled* par la casein kinase I ou II [285, 363]. Par la suite, *Dishevelled* s'associe à la protéine axine et inhibe l'action d'une sérine/thréonine kinase, la *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK3 β) [142]. Chez les vertébrés, l'inhibition de GSK3 β nécessite la présence de la protéine *Frat-1* [331]. GSK3 β est responsable de la phosphorylation de trois protéines associées dans un complexe multimérique, la protéine *adenomatous polyposis coli* (APC), l'axine et la β -caténine [283, 373]. En absence de signaux extracellulaires, la β -caténine phosphorylée est rapidement dégradée après ubiquitylation (fixation de résidus ubiquityl par l'E3 ubiquitin ligase au niveau de résidus séryl à l'extrémité NH₂ de la protéine), et prise en charge par le protéasome [123]. La phosphorylation des deux autres partenaires semble d'une part favoriser la stabilité du complexe multimérique et assurer d'autre part la phosphorylation de la β caténine au sein de ce complexe. Par contre, en absence de phosphorylation par la GSK3 β , la β -caténine est stable [123]. Elle est adressée *via* le pore nucléaire au niveau du noyau [19]. La β -caténine s'associe alors à un des membres de la famille LEF/TCF (pour *lymphoid enhancer factor/Tcell factor*) [77]. Ce sont des facteurs de transcription dont le mode d'action dépend de la formation du complexe β -caténine–facteur de transcription. Ces facteurs de transcription se lient à l'ADN au niveau de séquences consensus ⁵CTTTA/TAT³, grâce à leur domaine structural HMG (pour *high mobility group domain*) [77]. Cependant, cette liaison n'est pas suffisante pour permettre la transcription ou la répression de gènes cibles : La fixation de la β caténine est nécessaire au recrutement de coactivateurs ou de corépresseurs [223, 325]. Chez la Drosophile, une partie de la région COOH terminale de la protéine *Armadillo*, protéine homologue de la β -caténine des mammifères fusionnée à la *Pangolin*,

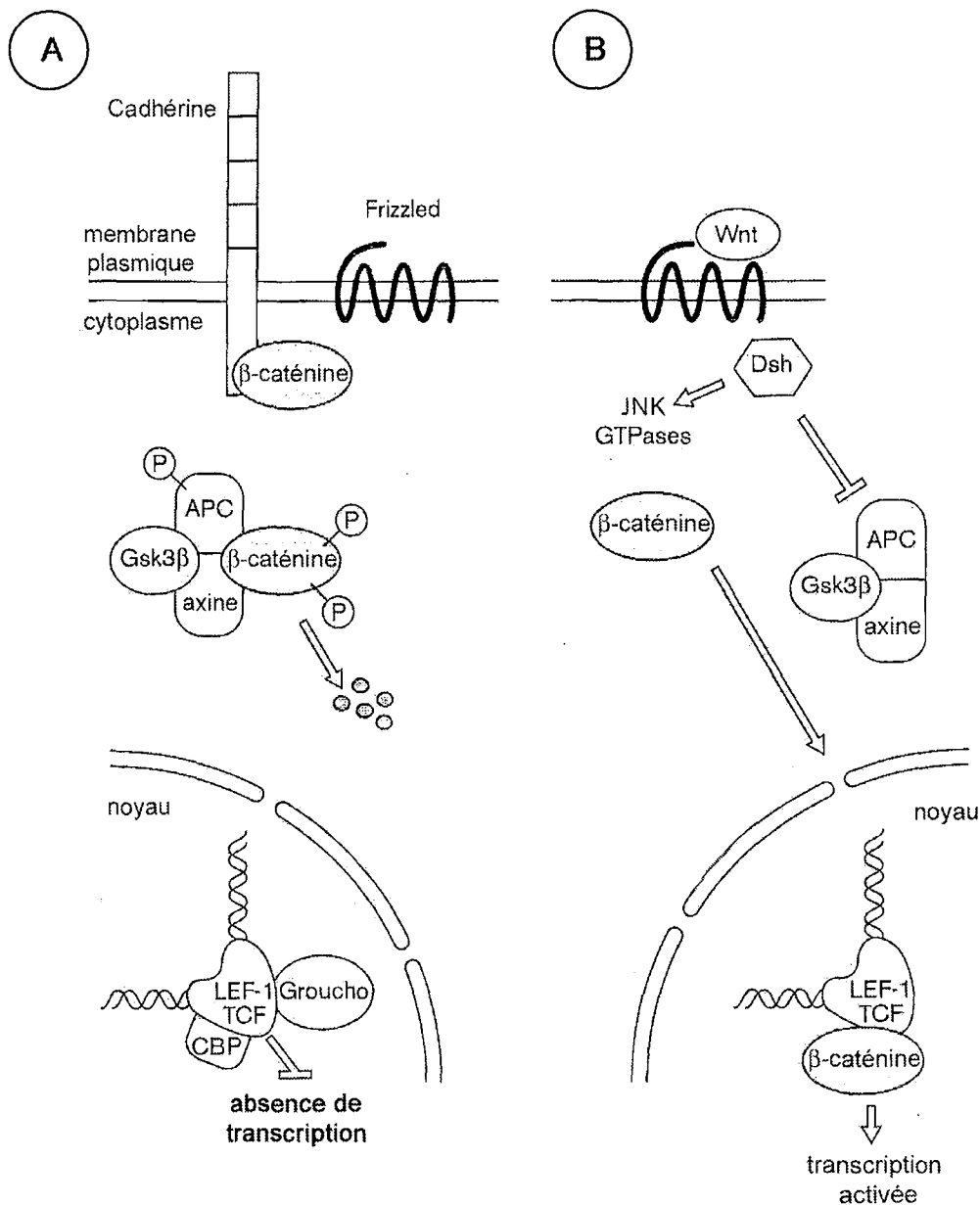


Figure 6 : Voie de signalisation Wnt/Wingless (adaptée d 'après[375])

A : En absence de signaux extracellulaires, la β -caténine est phosphorylée au niveau d'un complexe multimérique composé de APC, GSK3 β et de l'axine. Cette phosphorylation entraîne sa dégradation par le protéasome. Les facteurs de transcription LEF/TCF ne sont pas actifs.

B : La fixation de ligand Wnt sur le récepteur Frizzled provoque l'activation de la protéine *Dishevelled* (*Dsh*) qui inhibe la kinase GSK3 β . Cet événement a pour conséquence de stabiliser la β -caténine. Celle-ci est alors transloquée vers le noyau et se lie à un facteur de transcription LEF/TCF, ce qui permet la transcription de gènes cibles. La protéine *Dsh* active également la voie de signalisation MAP kinase par la kinase *Jun N-terminal kinase* (*JNK*) conduisant à la transcription d'autres gènes cibles.

l'homologue de TCF chez la *Drosophile*, conduit à la transcription de gènes cibles indépendamment de la présence de la protéine *Armadillo* [353].

Gènes suppresseurs de tumeurs

Chez l'Homme, l'inactivation de la voie de transduction Wnt/Wingless précède les processus de différenciation des cellules épithéliales [259]. Cependant, cette voie peut être activée par des mutations affectant les gènes codant les protéines impliquées dans cette voie de signalisation ; ce sont les gènes suppresseurs de tumeurs codant les protéines APC, β -caténine et axine [224].

L'identification de la protéine APC résulte du clonage positionnel réalisé à partir d'ADN provenant de patients atteints de polypose adénomateuse familiale ou FAP [20, 112, 193, 236]. Le gène codant APC est localisé sur le chromosome 5 au niveau de la région 5q21-22. Les patients atteints par la FAP ont un allèle inactif du gène codant pour la protéine APC. L'altération de l'allèle restant mise en évidence par la technique de perte d'hétérozygotie (ou LOH) conduit à la formation d'adénocarcinomes au niveau du colon [31]. Le gène APC est composé de 15 exons codant une protéine de 2843 acides aminés. Au niveau protéique, plusieurs domaines ont été identifiés (figure 7A):

- L'extrémité NH₂ terminale comporte un domaine d'homodimérisation de la protéine,
- 7 motifs Armadillo composés de 42 acides aminés chacun ; la répétition Armadillo a été identifiée au niveau de la β -caténine de *Drosophile*,
- une région comportant trois répétitions de 15 acides aminés ; cette région permet la fixation libre ou non dépendante de la β -caténine,
- une région comportant 7 répétitions de 20 acides aminés. Cette région permet également la fixation de la β -caténine. Cependant, la liaison dépend l'état de phosphorylation des deux protéines. D'autre part, cette région comprend également les sites de fixation de l'axine. Les sites de liaison sont situés entre les répétitions de 20 acides aminés,
- deux domaines assurent la liaison de APC avec les microtubules du cytosquelette. Cette liaison est soit directe au niveau d'un domaine basique soit indirecte et passe par la protéine EB1.
- la région appelée MCR (pour *mutation cluster region*). C'est dans cette région que sont localisés 45% des délétions affectant la protéine APC [165]. Cette région est localisée au niveau de l'exon 15. Cependant les mutations peuvent affecter la totalité du gène APC. La position des mutations au niveau du gène APC est corrélée aux manifestations cliniques de la FAP. A titre d'exemple, les mutations affectant les codons entre les positions 1403 et 1578

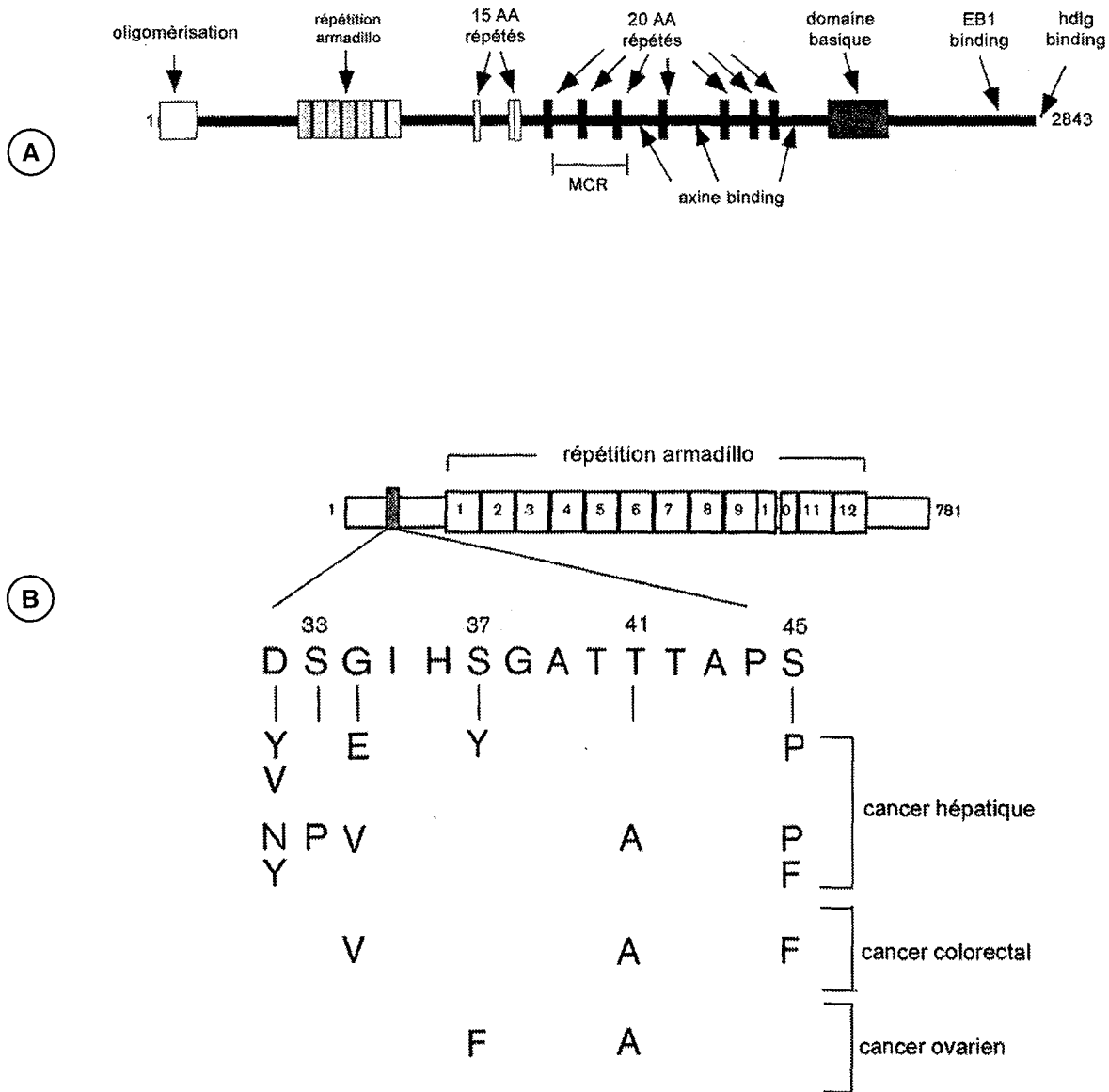


Figure 7 : Organisation structurale des protéines APC et β -caténine
(adaptée d'après [375])

A : La protéine APC est constituée de 15 exons. L'exon 15 commence au niveau de la région MCR. Les délétions affectant le gène codant APC au niveau de l'exons 15 modifient la liaison de la protéine à la β -caténine et à l'axine. Ces délétions entraînent l'activation de la voie Wnt/wingless

B : La protéine β -caténine est composée de 12 répétitions Armadillo. Le gène codant la protéine est également muté au niveau d'une région correspondant à l'extrémité NH₂ de la protéine. Ces mutations ne sont pas recouvertes exclusivement dans les cancers coliques

conduisent à des tumeurs desmoïdes [165]. Celles affectant l'extrémité 3' de l'exon 15 et produisant une protéine de grande taille ont une forme sévère de FAP associée à de nombreux polypes. Paradoxalement, les délétions affectant les exons 3 ou 4, avant le codon 157, et produisant par conséquent une protéine de taille faible sont associées à des formes atténuées de la maladie avec une polypose réduite [204, 314].

La protéine β -caténine (figure 7B) est une protéine de 781 acides aminés contenant 12 motifs *Armadillo* [362]. Cette protéine participe à l'adhésion intercellulaire. Elle permet, grâce à l'interaction de l' α et de la γ -caténine, la liaison entre une molécule d'actine et l'extrémité COOH de la E-cadhérine. Les mutations qui affectent le gène de la β -caténine (*CTNNb1*) concernent essentiellement les acides aminés serine et thréonine situés dans la région comprise entre les acides aminés 29 et 49. Ces mutations en modifiant les interactions avec la protéine APC, assurent la stabilité de la protéine. Cependant, les mutations identifiées dans cette région ne sont pas retrouvées uniquement dans les cancers coliques [259].

La protéine axine a été révélée comme un inhibiteur de la voie de signalisation Wnt/Wingless chez le Xénope [259]. Cette protéine se lie aux protéines APC, β -caténine, GSK3 β et *Dishevelled*, permettant la formation du complexe multimérique régulant le temps de demi-vie de la β -caténine. Le gène codant l'axine est un gène suppresseur de tumeur. L'inactivation biallélique de ce gène a été mise en évidence au niveau de cellules de carcinomes hépatiques ne présentant pas de mutations du gène de la β -caténine [295]. La mutation génère une protéine tronquée dont les sites de fixation de la β -caténine sont perdus.

Gènes cibles

Au niveau du colon, l'activation de la voie de signalisation Wnt/Wingless module la transcription de gènes cibles par le complexe Tcf/ β -caténine, *via* un élément de réponse situé en amont de la séquence codant la protéine. Plusieurs gènes ont été identifiés chez l'Homme:

- *cycline D1*. La cycline D1 participe au cours du cycle cellulaire à la transition entre les phases G1/S [10]. Au cours de la phase G1, les cyclines D1-3 sont synthétisées et forment des complexes avec les CDkinases 4,6. La formation de ces complexes inhibe la protéine pRB par phosphorylation et libère le facteur E2F, favorisant la transcription de gènes nécessaire lors de la phase S. Parmi les promoteurs des gènes des cyclines D, seul celui du

gène codant la cycline D1 contient un élément de réponse pour TCF [329]. L'activation de la voie de transduction entraîne un accroissement de la synthèse de la cycline D1.

- *c-myc*. Cet oncogène participe également à la progression dans le cycle cellulaire au cours de la phase de transition G1/S. L'expression de *c-myc* est augmentée sous l'action de TCF/ β -caténine [126].

- *Zonula occludens 1* (ZO-1): le produit du gène code une protéine impliquée dans la formation des jonctions de type *zonula occludens* [209]. Au niveau de ces jonctions, ZO-1 est associé à la β -caténine et à la E-cadhérine. L'activation de la voie de transduction contribue à diminuer le taux en ARNm et en protéine de ZO-1. Curieusement, au niveau des cancers colorectaux, le niveau de répression varie en fonction de l'histologie de la tumeur ; pour des tumeurs différenciées, ZO-1 est présent à un niveau équivalent à celui du tissu sain adjacent. L'absence de protéine ZO-1 semble être corrélée à des tumeurs peu ou pas différenciées.

- *uPAR*. Ce gène code une protéine responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire. L'accroissement de la synthèse de cette protéine permet d'augmenter l'invasion tissulaire et d'accroître la motilité cellulaire en participant à la dégradation de la matrice extracellulaire. Cependant, l'action de TCF/ β -caténine passe par celle du complexe *cjun/fra-1* formant le complexe AP1. C'est en effet au niveau du promoteur de *fra1* qu'un élément de réponse de TCF a été identifié [209]. L'accroissement de la transcription de *fra1* entraîne dans un deuxième temps celle de *uPAR*.

- *cyclooxygénase 2* (COX-2). Il existe deux isoformes de cette enzyme [364]. COX-1 est exprimé de manière constitutive au niveau de l'épithélium intestinal. A l'opposé COX-2 est une isoforme induite fortement exprimée dans les cancers colorectaux, mais absente au niveau des cellules épithéliales coliques normales. Son expression peut atteindre 20 à 30 fois celle de COX-1 ; Les deux isoformes participent à la formation du précurseur des prostaglandines, PGH₂. PGH₂ est également le précurseur d'autres eicosanoïdes tels que les prostacyclines, les thromboxanes et les leucotriènes. L'ensemble de ces molécules sont des médiateurs cellulaires [364].

- *Cdx1*. Il appartient à la famille des gènes *caudal* [138]. La protéine Cdx-1 est préférentiellement exprimée dans les cellules indifférenciées des cryptes [306]. Licker et *al.* [200] ont montré que Cdx-1 est un gène cible du complexe β -caténine /Tcf-4. Il est par conséquent régulé par la voie Wnt/Wingless dans les cellules de l'épithélium en prolifération. Cette régulation s'explique par l'existence au niveau du promoteur de Cdx-1 d'un élément de réponse pour TCF-4 [200]. D'autre part, Cdx-1 inhibe la prolifération des cellules des cryptes en réprimant l'expression des cyclines D [205].

b. facteurs transcriptionnels intervenant dans le développement et la différenciation de l'épithélium

Le développement de l'axe antéro-postérieur de l'intestin et la différenciation de l'épithélium intestinal sont régulés par plusieurs familles de facteurs de transcription [54] :

- *Tcf-4* est le produit du gène *Tcf712*. Il appartient à la famille des facteurs de transcription LEF/TCF. Ces facteurs sont la cible de la voie de signalisation Wnt/Wingless. L'obtention de souris homozygotes *Tcf-4^{-/-}* a montré que ces souris meurent après la naissance [173]. Au niveau de l'intestin, les zones de prolifération des cellules intestinales sont absentes. L'analyse histologique des cellules a d'autre part montré une absence totale de cellules endocrines [173].

- *Les gènes homéotiques Cdx1 et 2*. Chez la souris, ils interviennent dans le processus de développement de l'intestin et de la différenciation cellulaire [147]. Chez les mammifères, *Cdx-1* a été le premier gène homéotique dont l'expression a été révélée dans les tissus d'origine endodermique [76, 138]. Chez la souris, son expression augmente graduellement le long de l'axe proximo-distal de l'intestin [97, 147]. Le gène *Cdx2* code un facteur de transcription qui est exprimé dans les entérocytes différenciés [146]. Ce facteur se fixe sur les promoteurs des gènes cibles codant par exemple la sucrase-isomaltase [320], la lactase-phlorizyne hydrolase [344], l'apolipoprotéine B [184] et l'anhydrase carbonique I [74]. Ainsi, le gène *Cdx2* et son produit participent à la différenciation terminale de l'entérocyte.

- *Les facteurs de transcription de la famille Forkhead* sont exprimés au cours du développement et dans l'intestin adulte [153]. Cependant, ces facteurs de transcription sont présents soit dans les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses soit dans les cellules épithéliales seules. Plusieurs membres sont impliqués. *Fkh6* et *Nkx2-3* participent à la régulation de la prolifération des cryptes [153, 248]. L'obtention de souris transgéniques dont les gènes respectifs sont invalidés a montré une prolifération accrue des cellules intestinales. *HFH11* et *HNF3 β* sont exprimés au cours du développement par les cellules épithéliales et mésenchymateuses [376]. Leur expression est ensuite limitée aux cellules épithéliales des cryptes. Les membres de cette famille de facteurs de transcription peuvent d'autre part agir sur l'expression de *Cdx2*. Le promoteur de *Cdx2* contient en effet des éléments de réponses spécifiques de cette famille de facteurs de transcription, particulièrement pour les facteurs *HFH11* et *HNF3* [376].

- *La différenciation des cellules intestinales implique également des protéines de la matrice extracellulaire*. La lame basale à l'interface entre les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses intervient dans ces interactions *via* l'interaction intégrine-laminine [309]. Chez la souris, l'obtention de mutants présentant la délétion du domaine cytoplasmique de l'intégrine $\beta 4$ a montré une diminution de la prolifération cellulaire au niveau des cryptes

[232]. Le mécanisme d'inhibition implique l'inhibiteur d'une kinase dépendante d'une cycline, p27^{Kip1}, dont l'expression est accrue en absence du domaine extracytoplasmique de l'intégrine β 4 [85, 385]. Cette modification permet la sortie des cellules du cycle cellulaire et leur différenciation. La transition prolifération/différenciation dépendrait également de l'expression d'un autre inhibiteur d'une kinase dépendante de cycline, l'inhibiteur P21^{Waf1/Cip1} [333]. Cet inhibiteur modifie la progression du cycle cellulaire en modulant l'expression de *c-myc* [53]. La différenciation cellulaire est également dépendante de la présence de la laminine-1. Cette glycoprotéine est exprimée dans les cellules épithéliales et mésenchymateuses [307, 308]. La diminution de la synthèse endogène de laminine-1 entraîne une modification de la maturation d'enzymes telles que la lactase ou la sacchacrase/isomaltase [62]. Enfin, Lorentz et *al.* [203] ont montré que la surexpression de Cdx2 au niveau de cellules Caco-2 transfectées de manière stable avec le gène codant Cdx2, accroît l'expression de protéines impliquées dans l'interaction cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire, telles que l'intégrine β 4, APC, la E-cadhérine et la laminine-1. A l'opposé Cdx2 diminue l'expression de Cdx1. De plus, en utilisant une stratégie ARN antisens, les auteurs ont révélé que l'expression de Cdx2 est régulée par la présence de laminine-1.

LES RECEPTEURS ACTIVÉS PAR LES PROLIFÉRATEURS DE PEROXYSOMES : LES PPAR

I. STRUCTURE DES PPAR

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes ou PPAR (pour *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones, famille comportant une soixantaine de membres parmi lesquels figurent les récepteurs des hormones stéroïdes, ceux de l'acide rétinoïque tout-*trans* et 9-*cis*, des hormones thyroïdiennes (TR α et β) et de la vitamine D3 [56]. L'isolement suivi du séquençage de l'ADNc codant le premier récepteur nucléaire pour les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) a été réalisé par Isseman et Green [141] à partir d'une banque ADNc de foie de souris. La pluralité de ces récepteurs a rapidement été démontrée grâce aux travaux de Dreyer et al [73] révélant l'existence chez le Xénope de trois isotypes appelés respectivement PPAR α , β et γ .

Les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires présentent des homologies structurales [72]. Ils comportent habituellement les domaines suivants (figure 8):

- un domaine A/B, localisé à l'extrémité NH₂ terminale de la protéine, domaine très variable dans sa longueur et dans sa séquence en acides aminés. Ce domaine confère la spécificité aux différentes formes de PPAR. Il contient une région activatrice nommée AF1 (pour *activating function 1*) indépendante de la fixation du ligand et correspondant à un site de phosphorylation [1, 137, 302]. Ce site est absent dans la structure de PPAR β [1].

- un domaine C, domaine de liaison à l'ADN (ou DBD pour *DNA binding domain*) qui a été le plus particulièrement conservé au cours de l'évolution. Ce domaine contient deux motifs en doigts de zinc, caractéristiques de l'ensemble des membres de cette famille. Chacune de ces structures est composée de 4 résidus cystéine ainsi que de 2 séquences invariantes d'acides aminés. La première de ces séquences nommée boîte P, détermine la spécificité de contact entre le récepteur et l'ADN. La seconde séquence dénommée boîte D, est impliquée dans la dimérisation des récepteurs et dans la reconnaissance de la séquence nucléotidique appelée élément de réponse.

- un domaine D qui constitue une zone charnière.

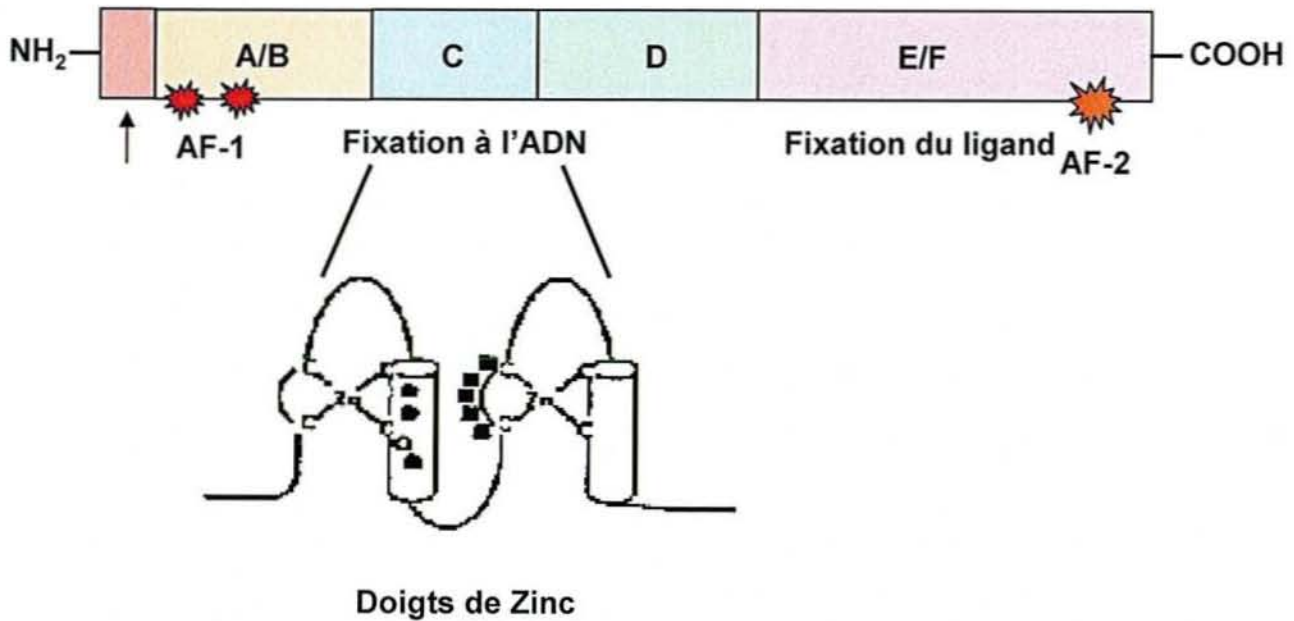


Figure 8 : Structure des PPAR

Les différents domaines du récepteur nucléaire (A/B, C, D et E/F) sont indiqués de même que les domaines de transactivation AF-1 et AF-2. La flèche correspond aux 30 acides aminés supplémentaires présents chez PPAR γ 2.

- un domaine E qui intervient dans la liaison au ligand et qui est composé de 13 hélices α et de 4 feuillets β (ou LBD pour *ligand binding domain*). Il possède également d'autres fonctions puisque ce domaine est aussi impliqué dans le processus de dimérisation. Il peut être associé à des protéines de choc thermique. Il contient une hélice α amphipatique ligand-dépendante, localisée du côté C-terminal et considérée comme étant une région activatrice nommée AF2 (pour *activating function 2*) dépendante de la fixation du ligand. Selon le promoteur, AF2 peut agir soit indépendamment soit coopérativement, avec AF1, localisée dans le domaine A/B. AF2 est responsable de la reconnaissance des cofacteurs nécessaires à l'accroissement de la transcription basale.

II. LES DIFFERENTS ISOTYPES DE PPAR

A l'heure actuelle, trois isotypes de PPAR, α (ou NR1C1 [56]), β/δ (aussi nommé FAAR, NUC1 ou NR1C2 [56]) et γ (ou NR1C3 [56]) sont identifiées [56]. Ces isotypes ont été clonés chez le Xénope [73]. Chez l'Homme et la souris, leur existence a également été établie [3, 109, 110, 297, 303, 334, 386]. Les PPAR ont été également mis en évidence dans d'autres espèces animales tels que le rat, le hamster et le porc (pour revue, [360]).

Deux isoformes de PPAR γ (γ_1 et γ_2) ont été identifiés chez l'Homme et la souris. Ces protéines résultent de l'épissage alternatif différentiel de l'ARNm [188] codé par le gène PPAR γ . La protéine PPAR γ_2 diffère de celle de PPAR γ_1 par la présence supplémentaire de 30 acides aminés localisés à l'extrémité NH₂ terminale [83, 230]. Par ailleurs deux promoteurs sont connus dans le gène PPAR γ . Leur intervention conduit à la production de la même protéine [84]. Chez l'Homme, une troisième isoforme PPAR γ_3 est générée grâce à un promoteur différentiel et produit une protéine identique à PPAR γ_1 [84]. Récemment, plusieurs autres isoformes de PPAR γ ont été identifiées chez le singe. Il s'agit des isoformes PPAR γ_1 , PPAR γ_2 , PPAR γ_4 à PPAR γ_7 [383]. La formation de ces différents isoformes est le produit de la participation combinée des exons A1, A2, B, C et D localisés du côté 5'UTR de la séquence génomique de PPAR γ avec les exons E1 à E6 communs à l'ensemble des isoformes des PPAR (figure 9). Chez le singe, les isoformes PPAR γ_4 , γ_5 , γ_6 et γ_7 sont exprimées dans les macrophages, PPAR γ_6 et γ_7 sont présentes dans le tissu adipeux, mais absentes des muscles, des reins ou des poumons. De plus, les séquences des exons C et D d'ADN de singe ont été comparés à celles d'ADN humain recueillies à partir d'une banque de données de séquences d'ADN humain. L'alignement de ces séquences a montré qu'elles étaient similaires à plus de 80%. Ce résultat suppose l'existence de ces différentes isoformes de PPAR γ chez l'homme.

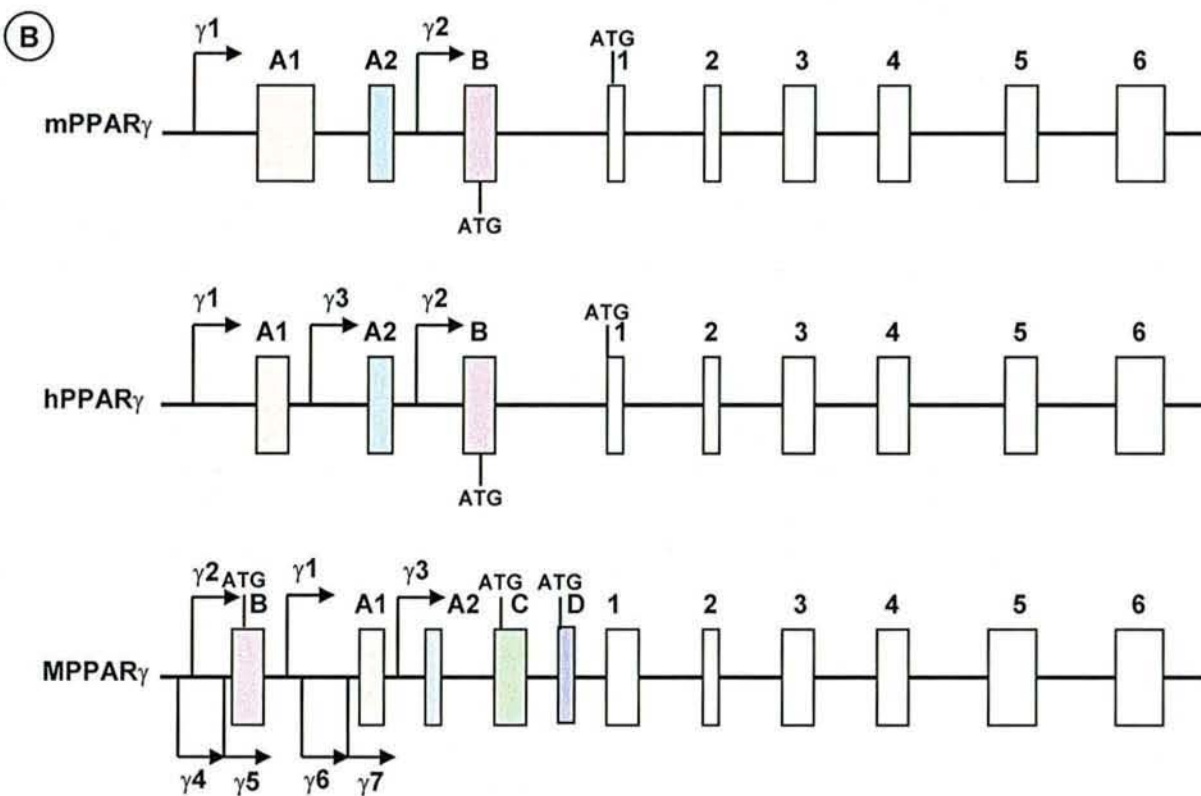
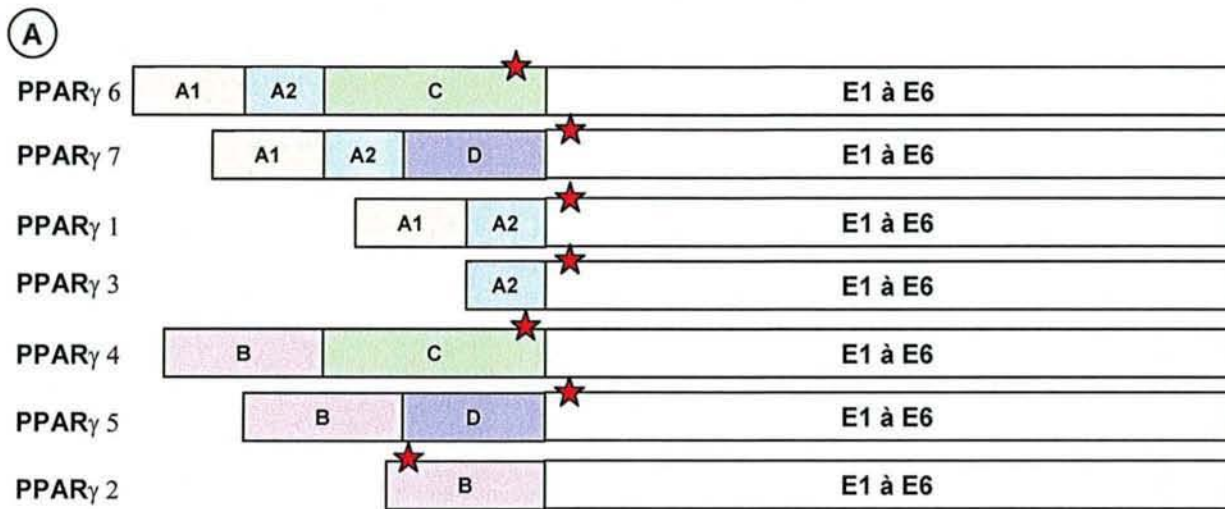


Figure 9 : Structures des ADNc de PPAR γ [398]

A : Les structures des 7 ADNc de PPAR γ identifiés dans les monocytes/macrophages des singes sont schématisées. L'étoile représente le codon ATG montrant le site d'initiation de la transcription.

B : Structures génomiques des PPAR γ de souris (mPPAR γ), de l'Homme (hPPAR γ) et des singes (MPPAR γ). Les flèches indiquent le site d'initiation de la transcription.

III. DISTRIBUTION TISSULAIRE DES PPAR

De manière générale, les distributions tissulaires des différents PPAR sont spécifiques. PPAR α est exprimé préférentiellement au niveau du foie, du cœur, du rein et du tissu adipeux brun [16, 25, 141]. Dans d'autres tissus comme l'intestin grêle, les muscles squelettiques, le thymus et les testicules, PPAR α est plus faiblement exprimé. La présence de PPAR β a été observée dans tous les tissus, mais cette protéine semblerait plus fortement exprimée dans le cerveau [25]. La distribution tissulaire de PPAR γ 1 est voisine de celle de PPAR α . Chez les rongeurs, PPAR γ 2 est un récepteur exprimé de façon prédominante dans le tissu adipeux [42, 336, 386]. Chez l'Homme, les expressions de ces deux isoformes sont inversées par rapport à celles observées au niveau du tissu adipeux murin [7, 374]. L'expression des différents PPAR évolue également au cours du développement. Chez les Rongeurs, PPAR δ est synthétisé très précocement au cours de l'embryogenèse. L'expression de PPAR δ est suivie par celle de PPAR α puis de PPAR γ [26, 170]. Enfin, PPAR δ participe à la nidation des embryons chez la souris [201].

IV. MODE D'ACTION DES PPAR

a. Formation d'hétérodimères

Les PPAR agissent en se fixant sur des séquences spécifiques situées au niveau des promoteurs de gènes cibles. Ces séquences appelées éléments de réponse des PPAR (ou PPRE pour *Peroxisome Proliferator Responsive Element*) sont constituées de deux demi-sites composés de 6 nucléotides séparés par un nucléotide indifférent [171, 350] (figure 10). Les deux demi-sites constituent une séquence répétée directe (Direct Repeat ou DR1). L'élément de réponse consensus correspond à la séquence AGGTCA(n)AGGTCA. Les PPAR se fixent à leur élément de réponse sous la forme d'hétérodimères. Le partenaire préférentiel des PPAR dans la formation des hétérodimères est le récepteur nucléaire de l'acide 9-*cis* rétinoïque (RXR). Chaque récepteur occupe un demi-site de l'élément de réponse. La région adjacente située en 5' de DR1 joue également un rôle dans la reconnaissance spécifique de l'hétérodimère pour son élément de réponse [351]. Le motif DR1 n'est pas spécifique de PPAR ; d'autres récepteurs nucléaires, RAR, COUP-TF1 ou HNF-4 se lient au motif DR1. La spécificité de liaison de ces récepteurs nucléaires au niveau du motif DR1 réside dans la position des bases à l'intérieur de la séquence consensus et de la base séparant les demi-sites de l'élément de réponse [234]. Ces conditions déterminent également la fixation des hétérodimères PPAR/RXR, RAR/RXR ou des homodimères RAR/RXR sur l'élément de réponse [234]. A côté de la fixation au motif DR1, les

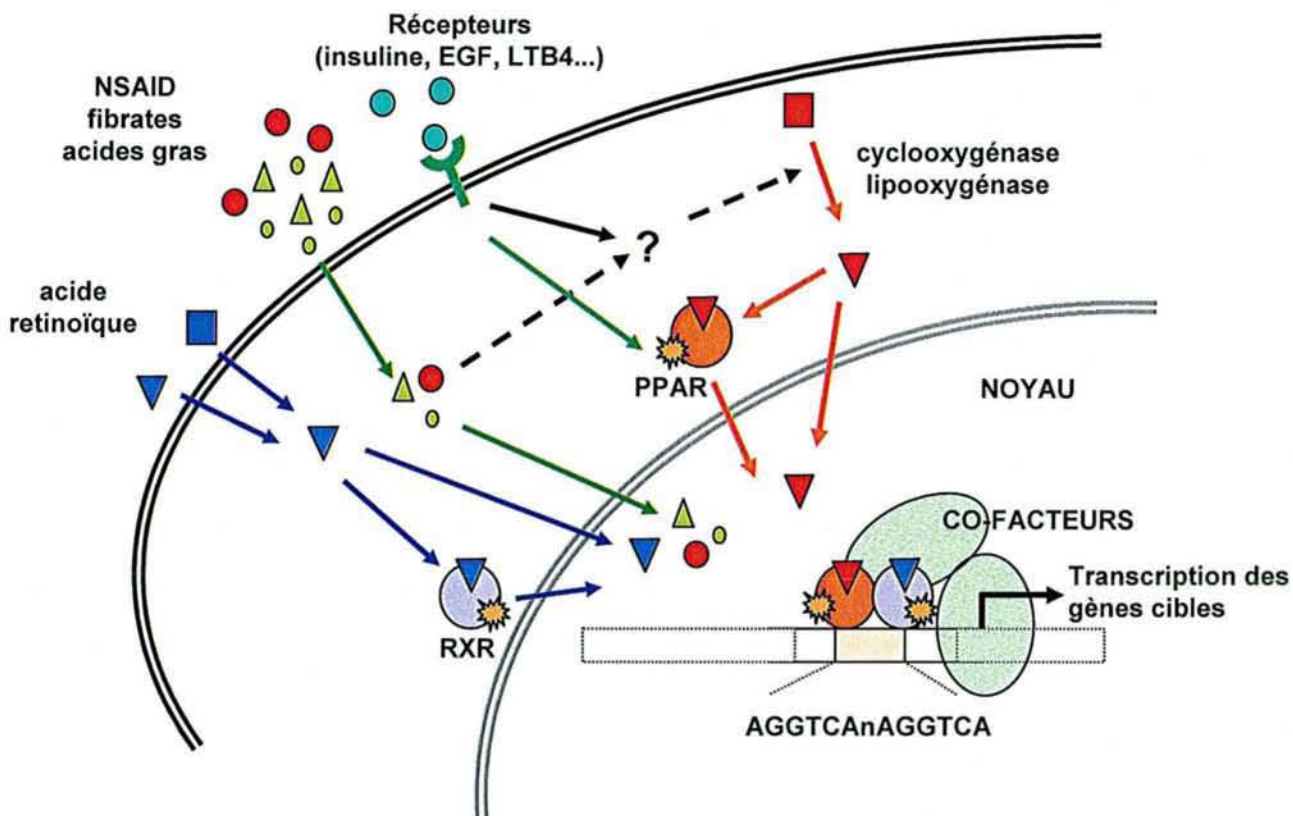


Figure 10 : Mode d'action des PPAR (adaptée de [327])

Le PPAR se fixe sous forme d'hétérodimères avec le récepteur de l'acide 9 *cis* rétinolique (RXR) sur des séquences spécifiques ou éléments de réponse. Ces éléments de réponse sont composés de la séquence AGGTCA répétée, séparée par un nucléotide indifférent.

L'activation des PPARs dépend du ligand choisi. Il peut être d'origine extracellulaire (fibrates, dérivés des acides gras par exemple) ou cellulaire provenant de la voie de la cyclooxygénase ou de la lipoxygénase. Certains ligands exogènes peuvent entraîner une modification métabolique qui aurait pour conséquence de moduler l'expression des ligands endogènes provenant de la voie de la lipoxygénase ou celle de la cyclooxygénase. L'activation du récepteur implique un processus de phosphorylation ou de déphosphorylation. Au final, il y a fixation de l'hétérodimère RXR/PPAR auquel s'ajoutent les coactivateurs.

NSAID : drogue anti-inflammatoire non stéroïdienne

hétérodimères PPAR/RXR se lient *in vitro* à l'élément de réponse du récepteur aux oestrogènes [160], et peuvent interagir avec le récepteur de l'hormone thyroïdienne [21, 26, 52].

La transcription de gènes cibles de PPAR dépend de la fixation du ligand de PPAR et de RXR et de la formation de l'hétérodimère. Au niveau du LBD de PPAR, la fixation du ligand entraîne une modification conformationnelle qui conduit au déplacement de l'hélice 12 [71, 238, 352]. Ce déplacement place l'extrémité de l'hélice 12 à l'extérieur de domaine LBD et permet l'interaction avec les coactivateurs nécessaires à la transcription [128, 340]. Les coactivateurs interagissent avec le récepteur nucléaire sur un motif conservé LXXLL, où X représente n'importe quel acide aminé [372], situé au niveau de l'extrémité COOH de l'hélice 12. Ce changement conformationnel implique d'autres résidus de l'hélice 3 du domaine LBD.

Il existe deux grands groupes de coactivateurs agissant avec les récepteurs nucléaires [96, 372]:

- le premier incluant la famille SRC-1 (pour *steroid receptor co-activator-1*) est caractérisé par une fonction acétyl transférase des histones favorisant le modelage de la chromatine. La participation de ces coactivateurs dans l'activation de la transcription dépend de la phosphorylation du site présent dans la région AF1. Elle ne nécessite ni la présence des ligands ni de ce fait la transactivation de AF2 [96].

-Le second groupe de cofacteurs comprenant par exemple DRIP205/TRAP220 ou *PPAR binding protein*/TRAP220 [387] interagit directement avec le complexe impliqué dans la transcription basale. L'interaction coactivateur-récepteur dépend du motif LXXLL localisé dans la région AF2, et de la présence de ligand.

CBP/p300 (pour *cAMP response element-binding protein*) et SRC-1 interagissent avec l'hétérodimère PPAR α ou γ /RXR [70, 100, 262]. Dans les deux cas, la présence d'un ligand est nécessaire à l'interaction coactivateur-récepteur. D'autres coactivateurs tels que PGC-1 [263], ARA 70 [129] ou RIP140 [221] interagissent également avec PPAR. Cependant le mécanisme de fixation et leur rôle respectif dans l'activation de la transcription ne sont pas définis.

Enfin, la fixation d'un ligand est aussi corrélée à la libération de corépresseurs, empêchant la transcription des gènes cibles. Le complexe PPAR α ou γ /NcoR (pour *nuclear receptor corepressor*) est dissocié lors de l'ajout d'un ligand spécifique dans le milieu [69, 241].

Ainsi, le mécanisme d'action de l'hétérodimère PPAR/RXR implique dans un premier temps la fixation de cofacteurs au niveau de AF1. La liaison du ligand libère le corépresseur et modifie la conformation du domaine LBD assurant la liaison d'autres coactivateurs formant un pont entre l'hétérodimère et le complexe d'initiation de la transcription [372]

b. Les activateurs des PPAR

Le domaine de liaison au ligand des trois isotypes de PPAR est suffisamment divergent en acides aminés pour assurer une spécificité de fixation d'un large spectre de ligands. Les activateurs des PPAR comportent des ligands synthétiques comme les hypolipémiants, les composés anti-inflammatoires et les agents anti-diabétiques ou des substances naturelles comme les acides gras à longues et moyennes chaînes et les eicosanoïdes (figure 11) [365].

Les composés hypolipémiants de la classe des fibrates, comme le clofibrate ou le Wy 14,643, ont été les premiers ligands des PPAR à avoir été identifiés. Des expériences de transfection ont montré que ces fibrates activent PPAR α à des concentrations de 10 μ M alors qu'ils activent PPAR γ à des concentrations de 100 μ M [189]. Des expériences de fixation de ligand (ou binding) ont révélé que l'analogue GW 2331 des fibrates montre une forte affinité pour PPAR α avec une constante de dissociation (Kd) de 140nM [168]. Grâce au test CARLA (pour *coactivator-dependent receptor ligand assay*) Krey et al [175] ont montré chez le xénope que le bezafibrate est un ligand pour PPAR β et que le ciprofibrate est un activateur de PPAR γ alors que ces deux composés se fixent sur PPAR α pour les mammifères. Les drogues anti-inflammatoires non stéroïdiennes comme l'ibuprofène, l'indométhacine et le fénoprofène activent PPAR α 5 à 10 fois mieux que PPAR γ [189]. Les thiazolidinédiones anti-diabétiques sensibles à l'action de l'insuline (TZD) montrent une forte affinité pour PPAR γ [190] ; ainsi le rosiglitazone (BRL 49653) est un ligand de PPAR γ dont le Kd est de 43nM.

La recherche de ligands naturels a révélé que PPAR α est activé par de nombreux acides gras à longues chaînes et, en particulierité par les acides gras polyinsaturés comme l'acide docosahexaénoïque (EPA), l'acide linoléique, l'acide linoléique et l'acide arachidonique [106, 159]. Ces trois derniers composés activent aussi bien PPAR α que PPAR γ à des concentrations identiques de l'ordre du micromolaire (Kliwer et al, 1995). Krey et al. [175] ont montré grâce au test CARLA que ces acides gras polyinsaturés sont des activateurs efficaces de PPAR α et de PPAR β . EPA a pu être co-cristallisé dans le domaine de fixation LBD du PPAR [371]. Les métabolites oxydés de l'acide linoléique, présents dans les lipoprotéines oxydés de faibles densités, comme l'acide 9-hydroxy-octadécadiénoïque (9-HODE) et le 13-HODE, sont aussi des ligands pour PPAR γ [233].

Bien que l'acide 5,8,11,14-tétraeicosanoïque (ETYA), un analogue stable de l'acide arachidonique, soit un puissant activateur de PPAR α [159], seuls quelques dérivés de l'acide arachidonique comme les eicosanoïdes sont des ligands des PPAR. Un métabolite des prostaglandines (PG) D2, le 15-deoxy- Δ 12,14 PG J2, est un ligand naturel de PPAR γ présentant une constante de dissociation variant de 325 nM à 2,5 μ M selon les études [95,

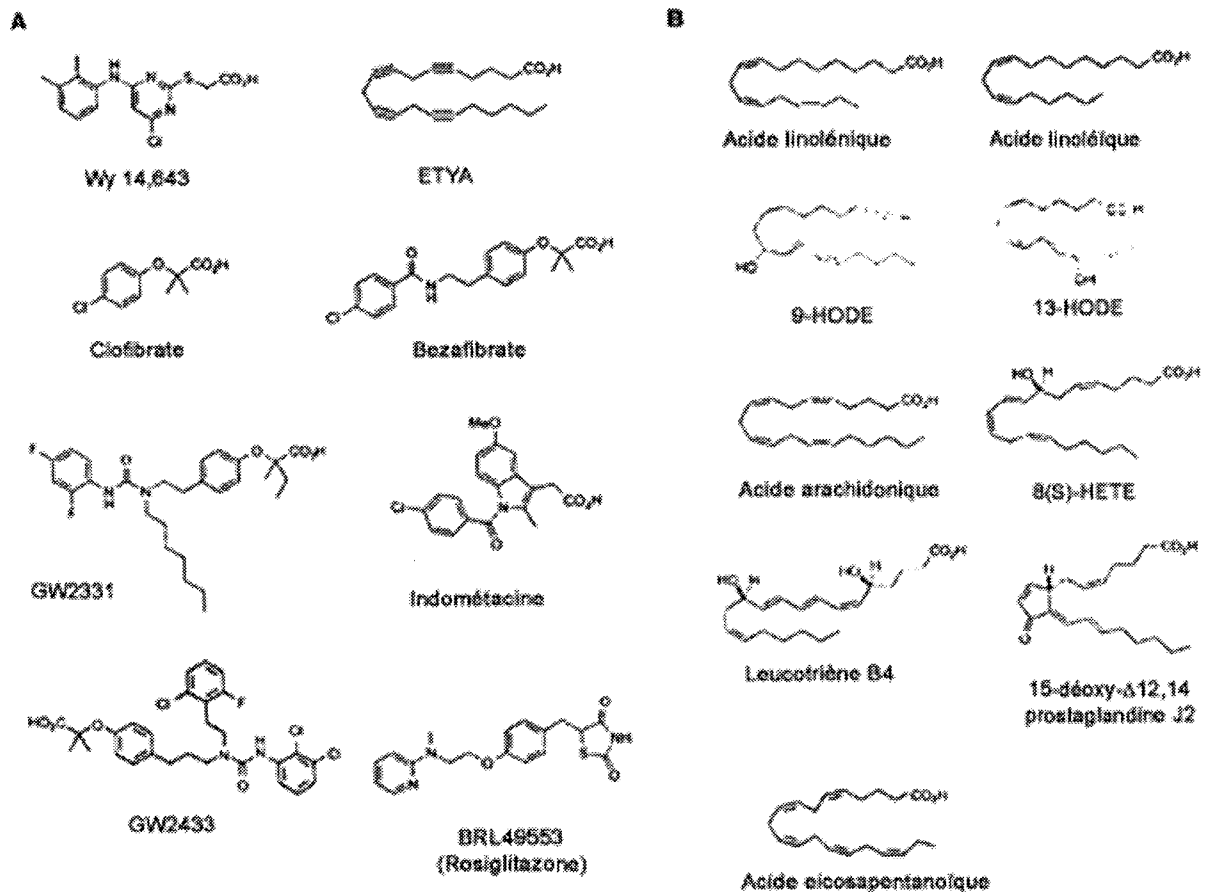


Figure 11 : Les ligands synthétiques et naturels des PPAR [84]

A : Agonistes synthétiques des PPAR comprenant les proliférateurs de peroxysomes (Wy 14,643), les analogues des acides gras (ETYA), les fibrates (clofibrate, bezafibrate, GW2331, GW2433), les drogues anti-inflammatoires non stéroïdiennes (indométhacine) et les thiazolidinédiones (rosiglitazone).

B : Agonistes naturels des PPAR comprenant les acides gras polyinsaturés et leurs métabolites.

169]. L'acide 8(S)-hydroxy-eicosatetraénoïque (HETE) et le leucotriène (LT) B₄ sont des activateurs de PPAR α dont la constante de dissociation est de l'ordre du micromolaire [66, 168, 202].

Aucun ligand spécifique de PPAR β n'a été identifié parmi les eicosanoïdes, cependant les prostacyclines PG A₁ ou un de ses dérivés et la PG I₁ activent préférentiellement cet isotype comme l'ont montré des expériences de transfection [94, 115, 379].

Il est d'autre part intéressant de noter que l'activation du couple PPAR/RXR implique le plus souvent la fixation préalable du ligand de chaque partenaire (figure 10). Cependant, plusieurs études ont montré que l'activation des hétérodimères PPAR/RXR ne nécessite pas obligatoirement la présence du ligand de PPAR alors que celle de l'acide 9-*cis* rétinolique, ligand de RXR, est indispensable [72, 171, 231].

c. Phosphorylation et déphosphorylation

Ce processus est un mécanisme important pour l'activation des PPAR. Ce mécanisme de régulation est également observé pour d'autres facteurs de transcription [96]. PPAR α est actif lorsqu'il est phosphorylé comme c'est le cas pour les récepteurs aux oestrogènes par exemple. Par contre, la transactivation de PPAR γ implique une déphosphorylation du récepteur au niveau du domaine AF-1.

PPAR α humain est phosphorylé sur les résidus sérine 12 et 21 du domaine AF-1 par la voie MAPKinase (pour *mitogen-activated kinase*) [152]. Cette phosphorylation, insuline dépendante [302], est modulée par des inhibiteurs sous contrôle de la *voie Janus Kinase 2/ Signal Transducer and Activator of Transcription 5b* (JAK2/STAT5b) elle-même régulée par des hormones de croissance [384]. Le traitement de cellules de foie de rat par le ciprofibrate induit la phosphorylation de PPAR α [254]. De plus, les proliférateurs de peroxysomes induisent une phosphorylation des résidus tyrosine par les kinases ERK1 et 2 (pour *extracellular signal-regulated kinases*) [279].

PPAR γ ₁ et PPAR γ ₂ sont phosphorylés sur les résidus sérine en position 82, 84 et 112, 114 du domaine AF-1 par la voie MAP Kinase [1, 137]. Cependant, dans les préadipocytes et dans les adipocytes, la phosphorylation de PPAR γ est stimulée par l'insuline et ne dépend pas de la voie MAP Kinase [34, 380]. Par contre, la PG F₂ inhibe la phosphorylation de PPAR γ dépendant de la voie MAP Kinase [268]. De plus, la phosphorylation de PPAR γ ₁ au niveau de la sérine 84 peut être assurée par les voies ERK2 et *c-jun N-terminal kinase* [1, 34]; et celle de la sérine 82, par stimulation du récepteur du

facteur de croissance par la voie MAPK dépendante [34]. Les protéines de stress comme *JNK/Stress activated protein kinase* phosphorylent PPAR γ 1 selon une voie indépendante des MAP Kinase [35]. La phosphorylation de PPAR γ diminue aussi bien la fixation du ligand sur son récepteur que l'activité transcriptionnelle des gènes cibles de PPAR γ , et la différenciation des préadipocytes en adipocytes [137].

Finalement, PPAR β/δ peut être phosphorylé même si aucune séquence consensus MAP Kinase n'est retrouvée au niveau du domaine A/B. Cette phosphorylation de PPAR β/δ se fait certainement par une voie n'impliquant pas les MAP Kinases [1].

V. INTERVENTION DES PPAR DANS LE METABOLISME LIPIDIQUE

a. Métabolisme des acides gras

De nombreux gènes impliqués dans le catabolisme des lipides sont sous le contrôle de PPAR α . Les acides gras proviennent des particules lipoprotéiques à travers une activité lipoprotéine lipase puis sont pris en charge par les cellules. La lipoprotéine lipase dont le gène est contrôlé par PPAR α , hydrolyse les triglycérides présents dans les lipoprotéines de faible densité (LDL) [299]. PPAR α augmente la transcription des gènes codant les apolipoprotéines AI et AII [357, 358] et inhibe la transcription du gène de l'apolipoprotéine CIII [316]. Il en résulte une modification du transport des apolipoprotéines de forte densité et une augmentation de l'activité de la lipoprotéine lipase. Le transport intracellulaire est facilité par la stimulation des gènes cibles de PPAR α comme ceux codant la protéine de transport des acides gras, la *fatty acid translocase* et la *fatty acid-binding protein* cytosolique hépatique [227, 305]. La prise en charge des acides gras à longues chaînes implique l'activation de l'acyl coA thioester par l'acyl coA synthétase [300] suivie d'une dégradation par la voie de la β -oxydation peroxysomale dont les enzymes ont une expression régulée par PPAR α [73, 185, 350, 381]. Les acides gras à longues chaînes sont importés dans la mitochondrie par la carnitine palmitoyl transférase I dont l'expression est régulée par PPAR α [27, 215, 378]. De plus, PPAR α régule l'expression de l'acyl coA déshydrogénase mitochondriale, enzyme impliquée dans la β -oxydation des acides gras à chaînes moyennes [113] et celle de la β -hydroxy-3-méthylglutaryl-coA synthétase [276].

Les résultats obtenus chez des souris pour lesquelles le gène codant PPAR α est invalidé démontrent que PPAR α régule positivement la β -oxydation constitutive mitochondriale [4]. Un régime riche en graisse induit chez ces souris une accumulation de lipides dans le foie par suite d'une diminution de l'import des acides gras à longues chaînes au niveau des mitochondries. Il faut noter que ces souris ont un métabolisme modifié,

caractérisé par un taux élevé de cholestérol, une baisse de la β -oxydation mitochondriale [68] et des modifications des taux de lipoprotéines circulantes [257].

Finalement, le taux transcriptionnel du gène PPAR α est sous le contrôle circadien du taux de glucocorticoïdes qui participent à la mobilisation énergétique de l'individu [191, 192]. L'activation de PPAR α modifie la thermogenèse en modulant l'expression des protéines UCP 1 ET 2 (pour *uncoupling protein 1 et 2*) [161, 328] au niveau du tissu adipeux. Le gène UCP1 est également régulé par PPAR γ dans les adipocytes bruns de rat [161].

b. Différenciation adipocytaire

La différenciation adipocytaire est un processus complexe impliquant de nombreux gènes [114, 267, 311]. Dans ce processus interviennent les protéines C/EBP (pour *CCAATT/enhancer binding protein*) et les PPAR. PPAR γ est impliqué dans la différenciation terminale des adipocytes. Il a été montré chez la souris que PPAR γ 2 s'hétérodimérise avec RXR α [334] et régule l'expression de la protéine aP2 porteuse d'acides gras [337], et celle de la phosphoénolpyruvate carboxykinase [335], qui sont deux marqueurs de la différenciation terminale des adipocytes. L'expression de PPAR γ et de C/EBP α augmentent durant la différenciation et la maturation des adipocytes [368, 369]. L'activation de PPAR γ par les thiazolidinédiones augmente le nombre des petits préadipocytes dans le tissu adipeux blanc [243]. Ces cellules stoppent leur croissance et se différencient en adipocytes.

L'étape initiale de la prolifération préadipocytaire peut dépendre de PPAR β/δ [122]. Le rôle central de PPAR γ a été démontré par plusieurs travaux :

- L'infection par des rétrovirus recombinants contenant la partie codante de PPAR γ entraîne chez des fibroblastes de souris leur différenciation en adipocytes [337].
- L'activation de PPAR γ avec les thiazolidinédiones stimule la trans-différenciation des myoblastes en adipoblastes [111].
- La phosphorylation induite de PPAR γ bloque la différenciation adipocytaire des cellules NIH3T3 [137].

Outre son action sur des gènes cibles impliqués dans la différenciation terminale de l'adipocyte, PPAR γ participe également à la sortie des cellules du cycle cellulaire. Cette sortie dépend de l'inhibition de la fixation à l'ADN et de l'activité transcriptionnelle des facteurs E2F/DP [2]. PPAR γ réduit l'expression de la phospholipase 2A ; la phosphorylation des facteurs E2F/DP est alors augmentée ce qui entraîne une diminution de l'activité du complexe E2F/DP.

VI. INTERVENTION DES PPAR DANS LA DIFFERENCIATION D'AUTRES TYPES CELLULAIRES

Les PPAR sont impliqués dans la différenciation de différents types cellulaires autres que les adipocytes. PPAR α induit la différenciation des cellules épidermiques [120, 273]. De plus, le farnesol stimule la différenciation des kératinocytes *via* PPAR α [121], par contre l'activation de PPAR γ inhibe la prolifération des kératinocytes [81]. PPAR α induit la différenciation des cellules tubulaires interstitielles des testicules [301]. Dans le foie, PPAR α induit la différenciation des cellules ovalaires [154] et la maturation des hépatocytes [318].

PPAR β/δ est fortement exprimé dans le cerveau [25]. Il en est de même dans le cervelet, tout particulièrement dans les cellules de Purkinje [174]. L'expression de cet isotype est corrélée à la différenciation des oligodendrocytes [108]. Chez le rat, PPAR β est impliqué dans le développement du cerveau [26]. PPAR β régule l'activité de l'acyl co-A synthétase 2 et donc peut être impliqué dans le métabolisme lipidique du cerveau [14].

L'activation de PPAR γ par un agoniste induit la différenciation d'une part des cellules mésangiales de rat [5] et d'autre part des trophoblastes humains [296]. De plus, les souris dont le gène PPAR γ est invalidé ont un développement placentaire anormal malgré une différenciation trophoblastique [12].

A notre connaissance, un exemple unique de l'activation d'un isotype de PPAR empêche la différenciation cellulaire terminale. Il concerne les cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1 de souris. Le traitement de ces cellules par le ciglitazone ou par le troglitazone inhibe la différenciation terminale de ces cellules [143].

VII. ROLES DES PPAR DANS L'INFLAMMATION TISSULAIRE

Plusieurs travaux ont permis de montrer l'implication des PPAR dans le processus de l'inflammation tissulaire. Les souris PPAR $\alpha^{-/-}$ montrent une réponse inflammatoire prolongée. Cet allongement implique PPAR α qui contrôle le catabolisme des leucotriènes B₄, ligands naturels de PPAR α [66]. Dans les cellules des muscles lisses, PPAR α inhibe l'action des interleukines 1 (IL-1) en s'opposant à l'induction de la cyclooxygénase par le facteur nucléaire κ B (NF- κ B). Cet effet est mis indirectement en évidence par la mesure de la production des IL-6 et des prostaglandines [315]. Des effets similaires où PPAR α réprime aussi NF- κ B et diminue la production de cytokines inflammatoires, sont observés au niveau de la rate [261].

Les études réalisées sur les monocytes/macrophages ont confirmé la participation de PPAR γ dans l'inflammation tissulaire. Dans ces cellules, les ligands de PPAR γ inhibent aussi

bien l'activation des macrophages que la production de cytokines inflammatoires, comme $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ et $IL-6$ [149, 271]. De plus, $PPAR\gamma$ inhibe l'expression de l'oxyde nitrique synthétase en bloquant l'activité des facteurs de transcription AP-1, STAT et $NF-\kappa B$ [270, 271].

VIII. ROLES DES PPAR DANS D'AUTRES PATHOLOGIES

a. PPAR et athérosclérose

La formation de la plaque d'athérome est un processus complexe où plusieurs facteurs interviennent. La participation des cellules endothéliales, la prolifération des cellules des muscles lisses (SMCs), la migration des monocytes/macrophages, et la régulation des facteurs de croissance et des cytokines sont importantes dans le développement de l'athérosclérose. L'inflammation chronique des vaisseaux sanguins intervient également dans cette pathologie. L'activation de $PPAR\gamma$ par ces ligands diminue la production des cytokines inflammatoires $IL-13$ et $IL-6$, l'activité de l'oxyde nitrique synthétase inducible (iNOS), et le taux de $TNF\alpha$ en inhibant l'activité des facteurs de transcription comme AP-1, STAT et $NF-\kappa B$ dans les monocytes/macrophages [149, 271]. D'autre part, l'activation inflammatoire des SMCs de l'aorte est inhibée par les ligands de $PPAR\alpha$ mais pas par ceux de $PPAR\gamma$ [315]. Les macrophages induisent la sécrétion de la métalloprotéinase matricielle (MMPs), enzyme qui est importante dans la dégradation des matrices extracellulaires ce qui entraîne la libération de la plaque d'athérome. Dans les macrophages et dans les SMCs, l'activation de $PPAR\gamma$ diminue l'expression de la MMP-9, enzyme qui est impliquée aussi bien dans la migration des cellules des muscles lisses vasculaires (VSMC) que dans la déstabilisation des plaques d'athérome [214, 270]. La migration et la prolifération des VSMCs sont des événements critiques dans le déclenchement de l'athérosclérose. Les thiazolidinédiones inhibent les mouvements des VSMCs après un accident cardio-vasculaire [103, 136, 181, 324]. De plus, les TZD induisent l'apoptose des SMCs *via* les protéines p53 et Gadd45 [244]. L'expression des molécules d'adhésion au niveau des cellules endothéliales, suivie de l'adhésion des leucocytes, est une étape précoce critique de l'athérosclérose. Les ligands de $PPAR\gamma$ inhibent l'expression des molécules d'adhésion des cellules vasculaires-1 (VCAM-1) et des molécules d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) dans les cellules endothéliales humaines [144, 253] et causent la diminution de la production des chemokines comme $IL-8$ et de la protéine chimiotactique monocyte-1 (MCP-1) dans les cellules endothéliales aortiques humaines [183]. L'activation de $PPAR\gamma$ inhibe aussi la migration des monocytes induite par la protéine MCP-1 (pour *monocyte chemotactic protein-1*) [164]. L'endothéline-1 (Et-1) est impliquée dans la régulation du tonus vasculaire et dans

les fonctions endothéliales. Et-1 est une protéine exprimée dans les lésions athérosclérotiques qui induit la prolifération des SMCs. L'activation de PPAR γ par ses ligands supprime la transcription du promoteur du gène Et-1 en interférant avec AP-1 dans les cellules endothéliales aortiques bovines (BAECs) [63]. Ces résultats suggèrent que l'activation de PPAR γ pourrait avoir un rôle bénéfique en modulant la réponse inflammatoire dans l'athérosclérose.

L'activation de PPAR γ par les ligands 9-HODE et 13-HODE, exerce également un rôle important dans l'accumulation des lipides au niveau des macrophages *via* l'induction de l'activité transcriptionnelle du gène CD36 codant un récepteur scavenger [118, 233, 338]. Plusieurs travaux ont montré que des souris déficientes en CD36 sont protégées contre l'apparition de plaques d'athérome [86]. Ces résultats suggèrent que les particules athérogéniques (oxLDL) pourraient induire leur propre prise en charge par l'activation de PPAR γ induisant à son tour l'expression de CD36. Cependant, l'activation de PPAR γ par ses ligands peut également supprimer l'induction de la protéine scavenger de classe A (SR-A) [271].

Certains ligands de PPAR γ induisent la formation des cellules spumeuses et exercent donc un rôle pro-athérogénique. Par contre, Li et *al* [199] ont montré que l'activation de PPAR γ par le rosiglitazone ou par le GW7845 inhibe significativement le développement de l'athérosclérose en dépit d'une augmentation de l'expression de CD36 dans les vaisseaux artériels chez les souris mâles déficientes pour le récepteurs LDL, mais pas chez les souris femelles. Des résultats similaires ont été obtenus avec des souris déficientes en apolipoprotéine E [43]. Il a été constaté que les TZDs inhibent significativement le développement des lésions au niveau des vaisseaux. Ainsi, les effets anti-inflammatoires des TZDs pourraient précéder l'induction de l'expression de CD36 au niveau des macrophages évoluant en cellules spumeuses.

PPAR γ induit d'autre part l'expression de ABCA1, un transporteur qui contrôle le flux de cholestérol médié par apo-A1 et celui du cholestérol produit par les macrophages à travers une cascade transcriptionnelle sous le contrôle du récepteur nucléaire LXR α [41, 48]. Très récemment, Jiang et *al* [150] ont montré que l'activation de PPAR γ induit l'expression du facteur de transcription HGF (pour *hepatocyte growth factor*) dans les fibroblastes. HGF est un polypeptide à action pléiotropique, il peut exercer un rôle mitogénique et anti-apoptotique dans les cellules endothéliales [326]. Les ligands de PPAR γ peuvent ainsi assurer un rôle bénéfique dans les maladies vasculaires *via* l'expression de HGF.

Les effets de PPAR α dans les maladies cardiovasculaires sont moins bien connus. PPAR α joue un rôle important dans l'oxydation des acides gras des mitochondries dans le cœur. Les études de Barger et *al* [13] suggèrent que l'hypertrophie cardiaque induit une

homéostasie lipidique cardiaque et une production énergétique anormales *via* l'activation de PPAR α .

b. PPAR et hépatocarcinogénèse

PPAR α est un médiateur des effets pléiotropes des proliférateurs de peroxysomes [141]. Ces composés sont les fibrates, les phtalates, les esters d'adipates, les herbicides et les acides gras perfluorés. Chez les rongeurs, spécialement chez la souris et chez le rat, ces proliférateurs de peroxysomes induisent l'augmentation du nombre des peroxysomes ainsi que l'expression des enzymes peroxysomales [105]. Des modifications des activités des enzymes non peroxysomales sont également observées dans le foie des rongeurs traités par les proliférateurs de peroxysomes [217]. Le traitement prolongé par les proliférateurs de peroxysomes entraîne progressivement une hypertrophie cellulaire suivie d'une hépatomégalie. Ces traitements aboutissent à une hépatocarcinogénèse chez les rongeurs. Ils restent cependant sans effet chez le cochon d'Inde, le singe et chez l'homme [38, 58]

Les effets pléiotropes des proliférateurs des peroxysomes dépendent de l'expression de PPAR α comme le montrent les expériences réalisées avec des souris déficientes en PPAR α [185, 256]. Le traitement par le Wy 14,643 ou par le ciprofibrate entraîne l'apparition de nodules cancéreux chez les souris témoins alors que les souris dépourvues de PPAR α ne sont pas ou peu affectées. Ces résultats sont en partie dus à une élévation du taux de peroxyde d'hydrogène généré durant le catabolisme des acides gras par la β -oxydation peroxysomale [266].

Les proliférateurs de peroxysomes induisent d'autre part la réplication de l'ADN chez le rat [212] et la souris et dans les hépatocytes de rat en culture primaire [155, 255]. Les effets mitotiques des proliférateurs de peroxysomes s'expliquent par l'induction de gènes régulateurs de la croissance comme *c-myc*, *c-HA-ras*, *c-fos-c-jun* [45] ou de gènes codant des protéines du cycle cellulaire comme les cyclines [46, 47].

Enfin, les proliférateurs de peroxysomes ralentissent voire inhibent l'apoptose dans les cellules hépatiques de rongeurs et dans les hépatocytes de rat en culture primaire [274]. La nafénopine, un puissant proliférateur de peroxysome, inhibe l'expression de *bcl-2* et de *bak*, dans les hépatocytes de souris [51]. Cette drogue stimule l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire [47].

c. PPAR et autres processus néoplasiques

Les effets de l'activation de PPAR γ par les thiazolidiédiones ou le 15-deoxy- Δ -12, 14 prostaglandine J2, ont été étudiés particulièrement dans des lignées cellulaires continues d'origine diverse. D'une manière générale, les résultats montrent que, l'activation de PPAR γ induit l'arrêt du cycle cellulaire et la différenciation terminale et/ou engage les cellules vers l'apoptose. De tels résultats ont été obtenus à partir de cellules dérivant d'astrocytomes [40], de carcinomes du chorion [158], d'adénocarcinomes mammaires [55, 82, 229, 377], d'adénocarcinomes gastriques [166, 294, 323], de carcinomes pancréatiques [228], d'adénocarcinomes coliques [75, 167, 187, 290], d'adénocarcinomes pulmonaires [39, 348], de leucémies myéloïdes [6, 132], de carcinomes de la prostate [177] et enfin de liposarcomes [339]. De plus, la différenciation terminale induite par un agoniste de PPAR γ a été observée chez des patients atteints de liposarcomes [65] ou chez des souris ayant développé un cancer de la prostate [177] ou un cancer mammaire [82, 321]. PPAR γ est également impliqué dans la cancérogenèse induite de léiomyomatome du myomètre utérin chez le cobaye [346]. Cette cancérogenèse est obtenue par un traitement combinant le troglitazone, l'oestradiol et l'acide tout *trans* rétinolique. Cependant, aucune lésion tumorale n'est observée lorsque le troglitazone est utilisé seul [346].

Ces résultats suggèrent que les agonistes de PPAR γ jouent un rôle important quant au développement des cancers même si les effets positifs de l'activation de PPAR γ dépendent du type de cancer et de la nature du traitement utilisé [186, 284, 346].

Des modifications génétiques affectent également les gènes des PPAR au cours des processus néoplasiques. Une protéine tronquée de PPAR α a été identifiée dans les cellules HepG2 dérivant d'un hépatoblastome humain. L'exon 6 est absent [102]. Le taux de l'ARNm codant la protéine tronquée correspond à 20-50% de celui de PPAR α et sa localisation est exclusivement cytoplasmique. Cette protéine tronquée de PPAR α est un inhibiteur dominant négatif de l'activité de la protéine sauvage PPAR α [102].

Chez le rat, l'ingestion de clofibrate entraîne l'apparition au niveau des cellules hépatiques d'une protéine tronquée de l'isoforme PPAR γ 2 [36]. Cette protéine tronquée est spécialement retrouvée dans la matrice mitochondriale. Sa concentration semble dépendre de l'activation de PPAR α [37]. L'importance physiologique de cette protéine n'est pas définie, ni son rôle dans de la mitochondrie.

Une protéine de fusion, PAX8-PPAR γ 1, a été mise en évidence dans les carcinomes folliculaires thyroïdiens [176]. Cette protéine est le produit du gène chimère PAX8-PPAR γ 1, résultant de la translocation chromosomique t(2 ;3) q(13 ;25). PAX8 induit le développement

de l'épithélium thyroïdien [211]. Cette protéine de fusion est un inhibiteur dominant négatif de l'activité de PPAR γ 1 [176].

CANCERS DU COLON ET PPAR

I. LES CANCERS DU COLON

a. Données générales

L'incidence des cancers colorectaux augmente avec l'âge, 90 % de ces derniers étant détectés après 50 ans. Le cancer colorectal représente la troisième cause de décès par tumeur maligne chez l'homme. Une personne sur trois atteintes d'un cancer colorectal meurt de sa tumeur.

La plupart des cancers colorectaux sont sporadiques (70, 75 % des cas). Les autres se développent dans un contexte de prédisposition familiale génétique ou dans des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

b. Incidence et caractères épidémiologiques des cancers colorectaux.

Le cancer du colon est un des cancers les plus fréquents [370]. Il représente en France près de 15% de l'ensemble des cancers et sa fréquence pourrait continuer d'augmenter. Le cancer colique représente à lui seul les deux tiers des cas des cancers colorectaux, soit plus de 20 000 cas par an par rapport aux 875 000 cas répertoriés dans le monde par an. Même si des progrès ont été faits dans sa détection et dans sa prise en charge, son pronostic reste sombre avec une survie observée à 5 ans de 41% dans les registres français. La France est une région à risque de cancer colique avec un taux voisin de celui des autres pays de l'Europe Occidentale, un peu plus faible que celui de l'Australie, de la côte Ouest des Etats-Unis et surtout inférieur à celui de la côte Est des Etats-Unis. Les régions de l'Europe de l'Est et du Nord sont des régions à risque intermédiaire et ce cancer est rare en Amérique du Sud, en Asie et surtout en Afrique.

Le cancer du colon est caractérisé par une prédominance masculine, avec un sex-ratio voisin de 1,5. Il existe des cas rares de cancer colorectal dès l'âge de 15 ans, mais ce n'est qu'à partir de 45 ans que le risque devient important et augmente avec l'âge. L'âge moyen se situe entre 68 et 70 ans. Il existe une homogénéité des caractéristiques épidémiologiques du cancer colorectal en fonction de sa sous-localisation. Il faut ainsi distinguer trois cancers : le cancer du colon proximal (du caecum à l'angle splénique), le cancer du colon distal (colon descendant et sigmoïde) et le cancer du rectum. Les cancers

du colon distal se caractérisent par une prédominance masculine au-delà de 65 ans. L'incidence de ces cancers au cours du temps est aussi différente.

c. Histologie du cancer du colon.

Les adénomes colorectaux

L'adénome se définit comme un foyer circonscrit de dysplasie épithéliale. Sous le nom de polype, on désigne l'ensemble des surélévations de la muqueuse qu'elle qu'en soit le substratum anatomique qui n'est pas toujours épithélial ou adénomateux. Les autres polypes comprennent les polypes hyperplasiques, les polypes hamartomateux, les polypes juvéniles et les polypes inflammatoires. Les termes d'adénome et de polype ne sont donc pas équivalents. Sur le plan architectural, les adénomes sont le plus souvent sessiles ou pédiculés. Ils sont plus rarement plans ou déprimés. Lorsque l'adénome est pédiculé, seul l'épithélium de la tête de l'adénome est dysplasique, le pied ou pédicule de ce dernier est bordé par une muqueuse et une sous-muqueuse de structure normale.

L'adénome naît de l'épithélium colorectal. Au tout début de l'évolution, la dysplasie ne touche qu'un petit nombre de cryptes glandulaires souvent groupées en petits foyers (foyers cryptiques aberrants dysplasiques), pouvant être détectés au cours des fibroscopies après coloration de la muqueuse au bleu de méthylène ou observés à la loupe binoculaire sur les pièces opératoires. L'adénome naît, au niveau d'une glande, d'un déséquilibre entre la production et la mort cellulaire par apoptose. L'adénome sporadique, au moins au début de son évolution, tout comme la crypte normale, serait clonal. Il n'en serait pas de même des adénomes de la polypose rectocolique familiale. Dans l'adénome, la zone de prolifération n'est pas limitée au fond des glandes mais est étendue sur toute leur longueur. Outre les anomalies de son renouvellement, l'épithélium dysplasique présente une différenciation anormale avec une mucosécrétion réduite, une basophilie cytoplasmique et une pseudo stratification nucléaire. L'évaluation du degré de dysplasie est entachée d'une certaine subjectivité. Plusieurs systèmes de classification ont été proposés. Les pathologistes tendent aujourd'hui à utiliser une classification en deux catégories (dysplasie de bas grade et de haut grade).

Sur le plan histologique, les adénomes sessiles ou pédiculés sont divisés en adénomes tubuleux, tubulo-villeux et villeux. Ces différences structurales seraient liées à la capacité plus ou moins importante du stroma à proliférer pour accompagner la prolifération épithéliale.

Le terme de tubuleux est employé lorsque plus de 80 % de la tumeur est composée de tubes ramifiés (les glandes normales du gros intestin ne sont pas ramifiées), étroitement tassés les uns contre les autres, séparés par des quantités variables de chorion. La configuration générale des cryptes est maintenue mais l'épithélium normal est remplacé par un épithélium dysplasique intestinal.

Le terme de vilieux (figure 12A) est réservé aux tumeurs constituées à plus de 80 % par des digitations, centrées par un axe de chorion recouvert de cellules épithéliales dysplasiques, dont la base est proche de la musculaire muqueuse.

Le terme de tubulo-vilieux concerne les lésions faites d'un mélange de structures vilieuses et tubuleuses, chaque constituant formant plus de 20 % de la masse tumorale. La présence de végétations épaisses, contenant des structures tubuleuses, est autorisée.

D'après les données du registre des cancers de la Côte d'Or, 80 % des adénomes sont de type tubuleux, 15 % de type tubulo-vilieux et 5 % de type vilieux. 5 % environ des adénomes évoluent vers l'adénocarcinome. La probabilité d'évolution vers le cancer est d'autant plus importante que les dimensions de l'adénome sont plus importantes et que le degré de dysplasie est plus élevé. La cancérisation des adénomes vilieux (40 %) est plus fréquente que celle des adénomes tubulo-vilieux (22 %) ou vilieux (5 %).

Les adénomes tubuleux (figures 12 B et C) ne sont pas tous polypoïdes. Il existe une catégorie d'adénomes appelés adénomes plans caractérisés par une surélévation de la muqueuse, à surface plane (80 %) ou déprimée (14 %), dont l'épaisseur n'est pas supérieure au double de celle de la muqueuse normale. L'architecture des adénomes plans est tubuleuse dans pratiquement 100 % des cas. Le caractère adénomateux des glandes intéresse soit toute l'épaisseur de la muqueuse soit seulement sa partie superficielle, en épargnant les culs de sac glandulaires qui restent normalement espacés, tapissés de cellules normales. Tout comme les adénomes polypoïdes, les adénomes plans peuvent constituer une étape de l'évolution vers l'adénocarcinome colorectal.

Les carcinomes colorectaux

Caractéristiques macroscopiques

Comme dans tous les cancers de surface, l'aspect macroscopique réalisé par les cancers colorectaux est une combinaison de végétation, d'ulcération et d'infiltration. La forme ulcérée et infiltrante est la plus fréquente, surtout dans le colon gauche. La tumeur mesure plusieurs centimètres, est arrondie, s'étend en largeur et peut atteindre toute la circonférence, en "virole", sténosant la lumière. Elle est constituée par une ulcération dure à la palpation, bordée par un bourrelet tumoral. A la coupe, la prolifération néoplasique est blanchâtre, envahissant la paroi intestinale, plus ou moins profondément, et en particulier la

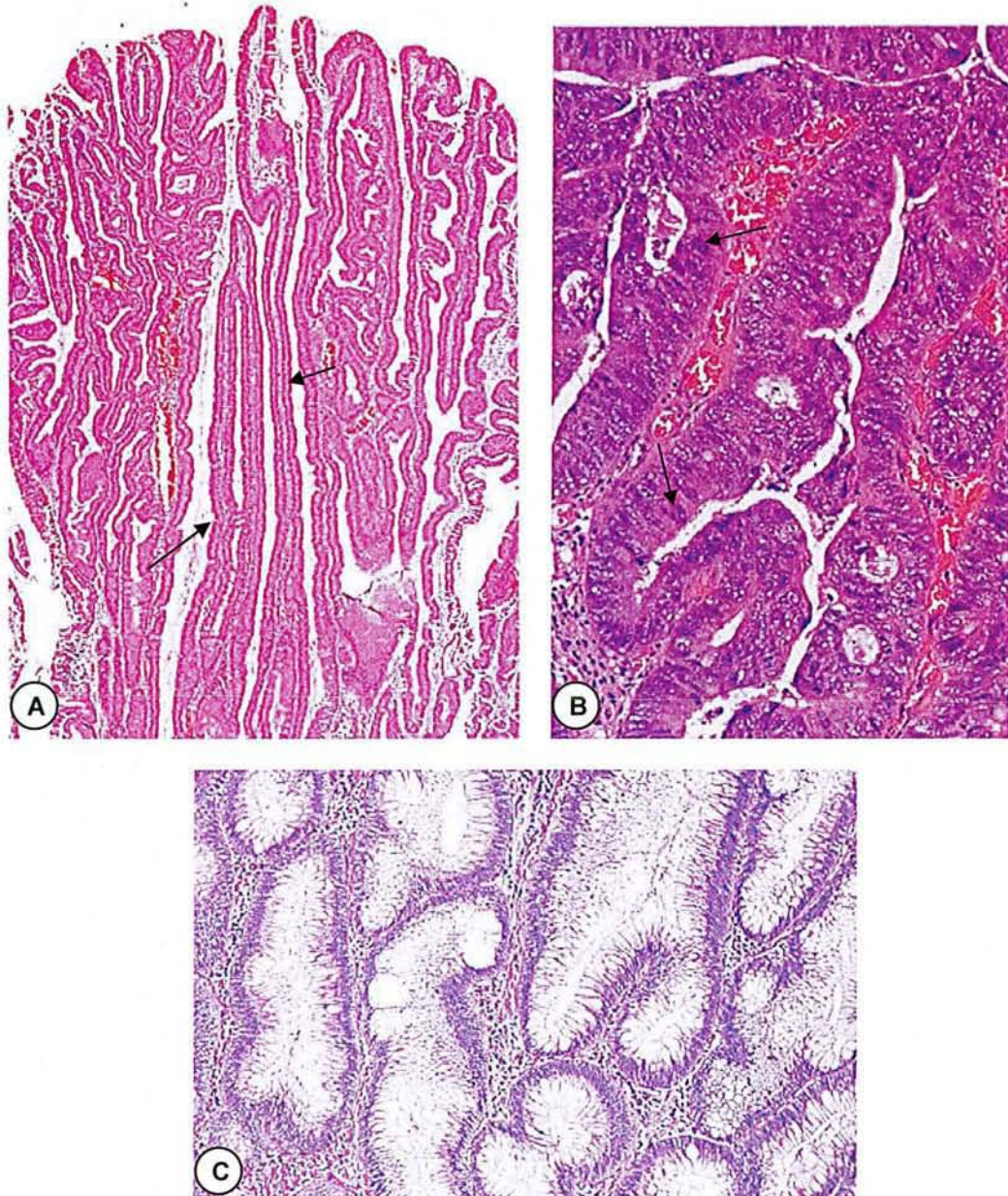


Figure 12 : Les différents types d'adénomes [154]

A : Adénome villosus du colon : 80% de la tumeur est constitué de villosités dans le stroma. Les flèches indiquent la position de ces villosités.

B : Adénome tubulaire fortement dysplasique : les noyaux sont larges, de formes rondes ou ovales et contiennent un nucléole proéminent.

C : Adénome tubulaire moyennement dysplasique : le rapport noyau/cytoplasme est faible ; le noyau est souvent allongé, serré et stratifié.

muscleuse qui peut être dépassée. La forme végétante est plus fréquente au niveau du colon droit. Elle réalise un bourgeon peu ulcéré pouvant atteindre 10 cm de diamètre. Elle est cependant rarement obstructive et se manifeste surtout par des saignements. La forme purement infiltrante est exceptionnelle. Elle épaisse et rigidifie le colon, comme une limite plastique de l'estomac. Il n'existe pas de corrélation statistique entre les dimensions de la tumeur et le pronostic.

Caractéristiques histologiques

Les carcinomes colorectaux sont essentiellement des adénocarcinomes. La classification histologique des adénocarcinomes colorectaux la plus universellement adoptée est celle de l'OMS dans sa version publiée en l'an 2000. Depuis cette publication, une nouvelle entité, le carcinome médullaire, a été isolée. Il s'agit le plus souvent d'adénocarcinome "ordinaire" plus ou moins différencié et dont le caractère mucosécrétant est variable. La classification en grade de ces formes ordinaires est relativement subjective. De multiples systèmes ont été proposés. Une classification ne distinguant que deux groupes : les tumeurs bien ou mal différenciées est de plus en plus utilisée. Dans un tel système, une tumeur est dite bien différenciée (figure 13 A) lorsque au moins 50 % de cette dernière se présente sous la forme de tubes glandulaires et indifférenciée dans le cas contraire. Plusieurs études multi variées ont montré que les tumeurs de grade élevé auraient un pronostic plus péjoratif que celui des tumeurs de bas grade. Ce facteur pronostic serait indépendant du stade tumoral. Un adénocarcinome est dit mucineux lorsque plus de 50 % de la surface tumorale est constituée par de la mucine. L'aspect macroscopique de telle tumeur est gélatineux, colloïde (figure 13 B). Histologiquement, les cellules forment soit des tubes plus ou moins fragmentés dans le mucus, soit des amas ou des travées. Il peut y avoir des cellules en bague à chaton, c'est à dire des cellules indépendantes porteuses d'une gouttelette de mucus intra cytoplasmique. Lorsque ces dernières constituent plus de 50 % de la prolifération tumorale, on parle d'adénocarcinome à cellules à bague à chaton. La forme médullaire est une variété particulière de carcinome, ne formant pas de glandes, composée par des plages de cellules polygonales, de taille assez régulière, infiltrées par une population dense de lymphocytes intra tumoraux. L'importance de cette forme tient à sa liaison forte avec l'instabilité micro satellitaire, les anomalies de la réparation de l'ADN et le syndrome de Lynch. Dans la plupart des cas, le type histologique n'est pas un facteur indépendant du stade de l'invasion. Les carcinomes à cellules à bague à chaton constituent, cependant, des exceptions dont le pronostic est défavorable et le carcinome médullaire une autre exception dont le pronostic, au contraire, est plus favorable que celui de la forme habituelle.

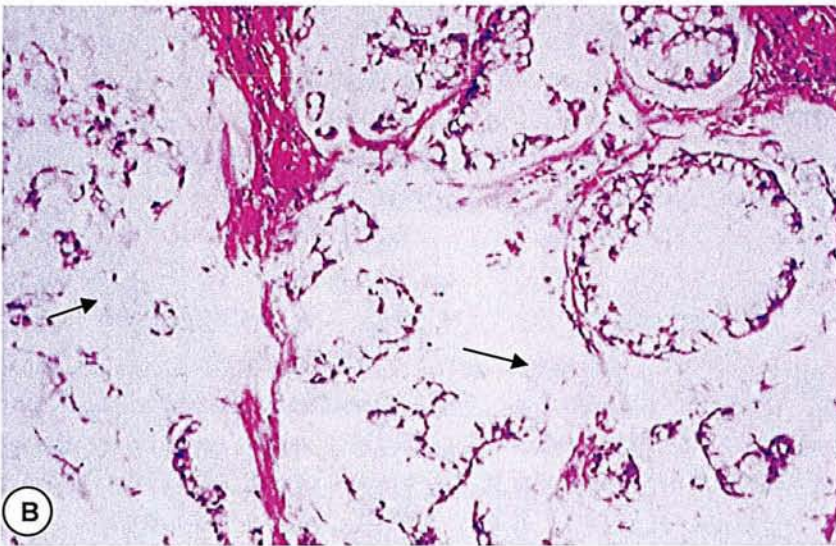
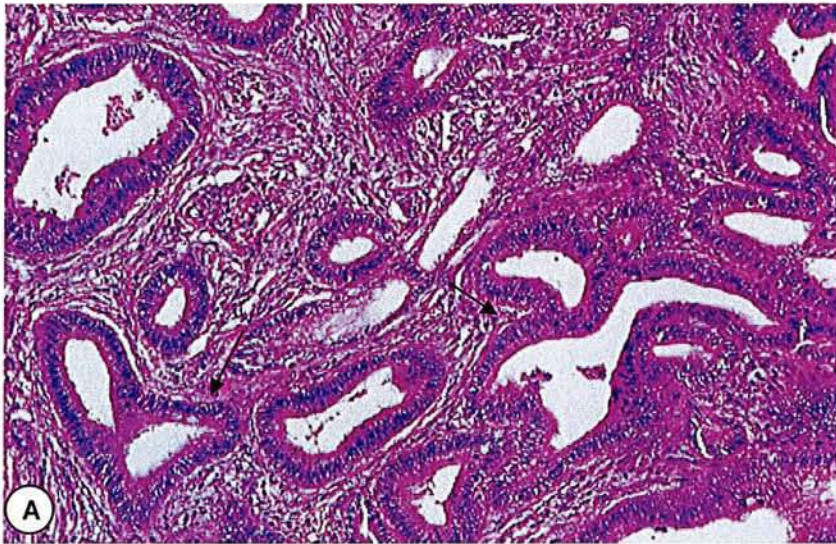


Figure 13 : Exemples de différents types d'adénocarcinomes [154]

A : Adénocarcinome bien différencié du colon : les glandes sont bien formées et ressemblent à un épithélium adénomateux. Les flèches indiquent la position d'une glande.

B : Adénocarcinome de type colloïde muqueux moyennement différencié du colon : les cellules sécrétant du mucus sont arrangées en chaînes et sont entourées d'un abondant mucus extracellulaire. Les flèches indiquent le mucus extracellulaire.

La stadification tumoraux

Le degré d'infiltration pariétale, l'envahissement ganglionnaire et l'existence éventuelle d'une maladie résiduelle locale ou à distance sont les facteurs essentiels du pronostic.

d. classification des cancers colorectaux

Envahissement pariétal :

La classification des tumeurs répond à trois objectifs principaux : définir un pronostic pour un patient, et indirectement le degré de risques à prendre pour le traiter ; permettre une évaluation des résultats et des comparaisons entre les différentes méthodes de traitement ; déterminer le protocole à mettre en route pour un patient.

Pour d'écrire l'extension anatomique de la maladie, la classification TNM [131] est la plus utilisée. Il s'agit d'une classification soit purement clinique (cTNM), soit après traitement chirurgical et examen anatomo-pathologique (pTNM). S'il s'agit d'une récurrence, on peut utiliser le préfixe 'r' (rTNM). En général, le critère T décrit la tumeur primitive, le critère N concerne les ganglions régionaux et enfin, le critère M indique la présence ou non de métastases. Par convention, dans cette classification, la limite de la paroi intestinale est constituée par la limite externe de la couche musculaire externe. L'extension en profondeur permet de classer les tumeurs en : (figure 14):

- tumeur intra muqueuse ne dépassant pas la musculaire muqueuse (Tis)
- tumeur atteignant sans la dépasser la sous muqueuse (T1)
- tumeur dépassant sans la dépasser la musculaire (T2)
- tumeur dépassant la musculaire et atteignant la sous séreuse sans atteinte du revêtement mésothélial ou le tissu péri colique ou le tissu péri rectal non péritonéalisé (T3)
- tumeur envahissant directement un autre organe ou un autre segment du tube digestif ou perforant le péritoine viscéral*

La définition du stade Tis dans le cas des tumeurs colorectales est unique parmi les tumeurs des muqueuses. Elles comportent, en effet, à la fois les cancers limités à l'épithélium n'ayant pas franchi la membrane basale épithéliale et les formes intra muqueuses. En muqueuse colorectale, en effet, l'effraction de la membrane basale n'est pas associée à un risque accru de métastase. Pour bien marquer cette bénignité beaucoup d'auteurs préfèrent parler de néoplasies intra épithéliales ou intra muqueuses plutôt que de carcinomes intra épithéliaux ou intra muqueux.

Extension ganglionnaire :

Le critère pronostique le plus important est l'état des ganglions lymphatiques. Le compte rendu histologique doit préciser le nombre de ganglions examinés, le nombre de

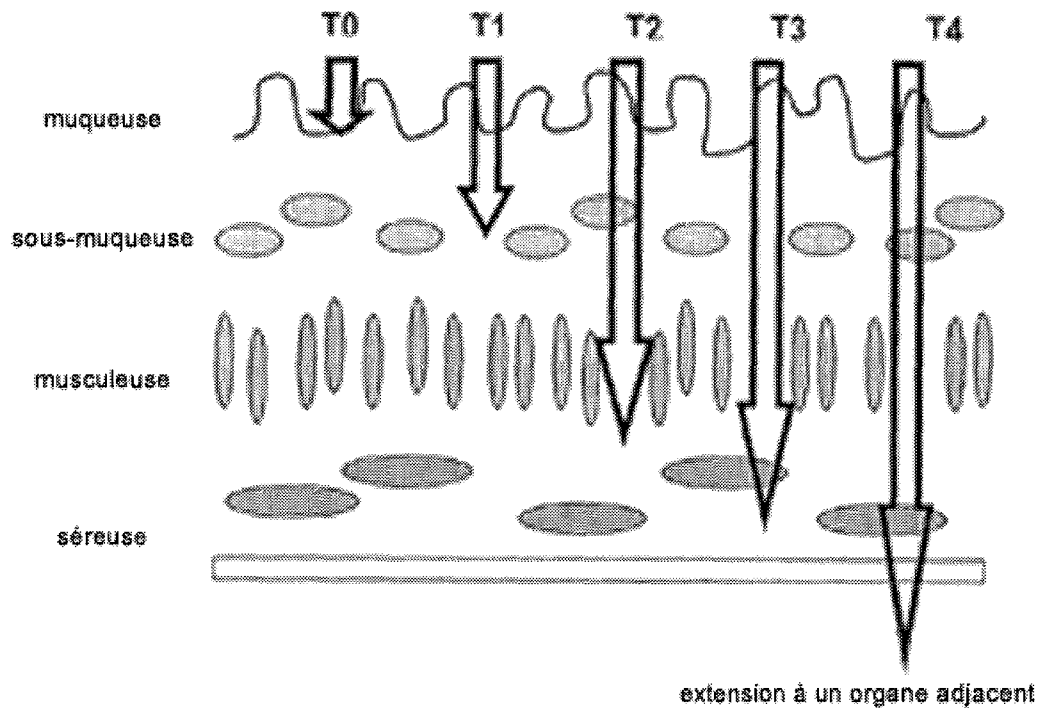


Figure 14 : Le critère T (atteinte des différentes couches de la muqueuse colique par la tumeur) d'après la classification TNM [287]

Les flèches indiquent pour chaque stade l'invasion par les cellules cancéreuses des différentes composantes du colon.

ganglions régionaux envahis. Leur situation : péri colique, pédiculaire (le long d'un pédicule vasculaire identifié) ou apicale n'est plus mentionnée dans la dernière classification pTNM où la notion de N3 a disparu.

NX : Statut ganglionnaire non évaluable

N0 : Pas de ganglion envahi

N1 : Métastase dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux

N2 : Métastase dans 4 ou + des ganglions lymphatiques régionaux.

Les stades III (N1 ou N3) ont peu de chance d'être sous estimés si 12 ganglions ou plus sont analysés. Il n'en va pas de même si 6 ganglions ou moins sont échantillonnés et dans ces cas les 80 % de survie à 5 ans ne sont pas observés. Les nodules mésentériques mesurant 3 mm de diamètre ou plus sont considérés comme des ganglions métastatiques même si des structures ganglionnaires résiduelles ne sont pas observées. L'utilisation de méthodes spéciales comme l'immunohistochimie pour détecter des micro métastases ganglionnaires n'est pas aujourd'hui justifiée. Dans l'étude de Jeffers (jeffers et al.,), 25 % des patients porteurs de tumeurs au stade II avaient des micro métastases ganglionnaires. Leur survie ne s'est pas révélée différente de celle des malades porteurs de tumeurs au stade T II sans micro métastases.

Les résidus tumoraux :

Seule l'absence de résidus tumoraux microscopiques sur l'ensemble des limites permet de classer la tumeur dans la catégorie sans résidu tumoral et considérer la résection chirurgicale comme a priori curative.

Les limites pertinentes sont tout d'abord les limites proximales et distales. Quand ces dernières sont éloignées de plus de 5 cm (de plus de deux centimètres pour le Collège Royal des Pathologistes de Grande Bretagne) de la tumeur, les récives sont exceptionnelles. Il n'est donc pas justifié, dans ces cas, d'étudier histologiquement les tranches de section. Pour les tumeurs de l'ampoule rectale, il est souvent difficile chirurgicalement de passer à 5 cm du bord inférieur de la tumeur. Une collerette de 2 cm est le plus souvent considérée comme suffisante pour éviter les récives.

Pour les cancers du rectum, la fréquence des récives locorégionales est directement fonction de la qualité de l'exérèse locale et de la présence ou non de résidus tumoraux après exérèse du méso rectum. Le rectum est un organe essentiellement sous péritonéal. L'ampoule rectale est en contact direct avec la graisse péri rectale pour ses faces latérales et postérieures, ce tissu est appelé méso rectum par les auteurs anglo-saxons. Le méso rectum contient les vaisseaux, les nerfs et les lymphatiques péri rectaux. Heald

(Heald) a proposé de réaliser l'exérèse complète de ce méso rectum au cours de toutes les interventions pour cancer du rectum. Avec cette méthode, il a rapporté un taux de récurrence locorégionale de 4 à 5 ans chez des malades qui de plus n'ont pas reçu de radiothérapie pré- ou post-opératoire. Ce taux de récurrence est à ce jour le plus bas rapporté dans la littérature (d'après les données du Registre de la Côte d'or, le taux de récurrence à 5 ans varie de 24 pour les tumeurs classées muqueux B à 53,5 pour celles classées muqueux C). Le travail de Heald (Heald) est une étude prospective non contrôlée dont les résultats ont soulevé beaucoup d'interrogations parmi les chirurgiens mais qui a été confirmée par d'autres auteurs.

La marge circonférencielle ou latérale, ou radiaire (clearance pour les anglo-saxons), se définit comme la mesure en millimètres de la distance existant entre la zone d'extension maximum de la tumeur et la section chirurgicale. Si cette distance est < 1 mm, on considère qu'il y a envahissement tumoral de la marge circonférencielle et donc résidu tumoral microscopique

Pour les cancers du colon, le problème est plus complexe. Shepherd et al. (Shepherd et al.) ont démontré que pour les adénocarcinomes coliques le risque de récurrence intra péritonéale était directement lié à l'extension tumorale par rapport à la surface péritonéale. Ils distinguent 4 groupes : 1) les tumeurs à distance du revêtement péritonéal, 2) les tumeurs proches, 3) les tumeurs atteignant ce revêtement, 4) les tumeurs le dépassant. Dans cette série, Shepherd (Shepherd et al.) a lui-même disséqué toutes les pièces et reconnaît que l'échantillonnage des prélèvements est délicat. La notion de tumeur proche du revêtement péritonéal paraît difficilement reproductible. Ceci a conduit certains auteurs à proposer, comme pour le rectum, une mesure en millimètre de la marge circonférencielle. La marge circonférencielle se définit alors comme la mesure en millimètres de la distance existant entre la zone d'extension maximum de la tumeur et la surface péritonéale. Par ailleurs le groupe 4 peut être individualisé par analyse cytologique du liquide de lavage de la cavité péritonéale.

Autres facteurs pronostiques :

Un certain nombre d'autres facteurs anatomiques pronostiques indépendants du stade ont été décrits. Il s'agit notamment 1) de l'invasion veineuse (seul l'envahissement des veines extra murales ayant une couche musculaire continue doit être considéré), 2) l'aspect de la zone périphérique d'invasion (expansive ou infiltrante), 3) la présence d'un infiltrat lymphoïde dense. Il est actuellement admis que ces infiltrats denses ne sont observés que dans les cas des tumeurs associées à une instabilité micro satellitaire. Il est clair, par ailleurs, que le statut métastatique est fondamental pour la survie. Pour le statut métastatique, seules les métastases synchrones,

réséquées dans le même temps opératoire sont prises en compte, aussi propose-t-on de mentionner seulement deux classes : M1 présence de métastase, M0 statut métastatique inconnu.

Une deuxième classification proposée par l'« *American Joint Committee for Cancer Classification* » permet de regrouper les tumeurs en « stades » selon les critères suivants :

Stades	Regroupements
Stade 0	T0 Tis, N0, M0
Stade 1	T1, N0, M0 T2, N0, M0
Stade 2	T3, N0, M0
Stade 3	T4, N0, M0 T1-T4, N1-N3, M0
Stade 4	T1-T4, N1-N3, M1

e. La séquence polype adénomateux/adénocarcinome

La majorité des études cliniques, histologiques et génétiques considèrent les adénomes coliques comme les précurseurs de la plupart des carcinomes. Les principaux arguments qui sous-tendent ce concept sont les suivants [89]:

- Taux de prévalence couplé des carcinomes et des adénomes dans les régions à haut risque de cancer du colon.
- Augmentation de la fréquence des carcinomes chez les patients porteurs d'adénomes et inversement.
- Corrélation nette entre l'augmentation de l'âge des patients, l'élévation du degré de dysplasie et la présence de foyers de carcinomes invasifs.
- Excès significatif d'adénomes avec dysplasie sévère chez les patients développant des carcinomes métachromes (comparaison effectuée avec les patients pour lesquels un second cancer ne s'est pas développé).
- Réduction de l'incidence attendue des carcinomes dans un segment colique où l'ablation systématique des adénomes a été réalisée.
- Apparition dans 100% des cas d'un cancer colorectal chez les patients porteurs d'une polypose adénomateuse familiale si une colostomie préventive n'est pas réalisée.

- Développement d'un carcinome invasif au même site chez les patients porteurs d'adénomes et refusant un traitement thérapeutique.
- Absence de lésions de carcinome *in situ* en dehors de la zone d'adénome.
- Mise en évidence de foyers de transformation maligne dans les adénomes et à l'inverse présence de résidus adénomateux sur les pièces d'exérèse de cancers colorectaux à un stade peu avancé.
- Induction conjointe, à l'aide de produits cancérigènes, d'adénomes et de carcinomes chez les animaux de laboratoire.
- Constitution chromosomique similaire des tissus adénomateux et carcinomateux.
- Contenu enzymatique tissulaire dans les adénomes et dans les carcinomes différent de celui de la muqueuse normale et des polypes hyperplasiques
- Profil histochimique de l'adénome intermédiaire entre celui du tissu normal et celui du tissu cancéreux
- Augmentation de l'expression des oncogènes *K-Ras* et *Myc* dans certains adénomes et carcinomes.
- Expression d'un taux d'antigène carcino-embryonnaire comparable à celui de la muqueuse normale pour les adénomes avec dysplasie légère
- Augmentation très marquée de l'expression des antigènes oncofœtaux (HGC pour *hepatocyte growth factor*, isofoerritine, α -foetoprotéine) dans les adénomes et les carcinomes
- Contenu en ADN des adénomes intermédiaire entre celui des carcinomes et celui de la muqueuse normale. Les diverses séries réalisées font état d'un taux d'aneuploïdie d'environ 35 % pour les adénomes et de 62 à 75% pour les carcinomes avec un pourcentage de cellules en phase S croissant de la muqueuse normale à l'adénome et au carcinome

Cependant, l'absence de preuves de l'existence de précurseurs adénomateux dans certaines observations suggère que certains adénocarcinomes puissent se développer sans passer par le stade d'adénome.

f. Les altérations génétiques au cours des cancers colorectaux

Des altérations génétiques sont observées dans virtuellement tous les cancers colorectaux [165]. Ces altérations sont sans doute les mieux caractérisées de toutes les tumeurs solides humaines. Depuis le développement de l'endoscopie, l'examen de l'épithélium colorectal est relativement facile. Dans un certain nombre de cas, la détection du cancer est faite à un stade précoce, avant le développement des signes cliniques. Il est ainsi possible de suivre, les événements moléculaires survenants au cours de la progression

tumorale. Si les cancers colorectaux forment un groupe de tumeurs d'une remarquable homogénéité sur le plan histologique, puisque 95 % sont des adénocarcinomes, la caractérisation des altérations génétiques somatiques des cellules tumorales coliques a permis de reconnaître au moins deux types de cancers du colon, les tumeurs qui présentent une instabilité chromosomique et celles qui présentent une instabilité génétique.

Dans un premier temps, les études cytogénétiques puis moléculaires ont permis de mettre en évidence la perte de certains segments chromosomiques. Ces pertes intéressent principalement le bras court du chromosome 17 et le bras long du chromosome 18 dans plus de deux tiers des tumeurs, le bras long d'un chromosome 5 dans plus de la moitié des cas, le bras court du chromosome 8 et le bras long du chromosome 22 dans plus d'un tiers des cas. Certaines de ces régions chromosomiques comportent des gènes dont l'implication dans le processus tumoral est fortement suspectée. Il s'agit des gènes *APC* [260, 345] et *MCC* (pour *modified in colorectal cancer*) sur le chromosome 5 [165], du gène *p53* sur le chromosome 17 [134, 196], du gène *DCC* (pour *deleted in colorectal cancer*) sur le chromosome 18 [49]. Des mutations somatiques sont retrouvées au sein de ces gènes, avec une fréquence faible pour les gènes *DCC* et *MCC*, plus importante pour les gènes *APC* et *p53* (plus de 60 %). Ces mutations conduisent à l'inactivation biallélique de ces gènes suppresseurs de tumeur. Ces altérations spécifiques s'accompagnent d'une hyperploïdie qui est observée dans environ 60 % des tumeurs [49, 60, 162, 355, 356]. Le phénomène d'endomitose (réplication de l'ADN cellulaire sans division de la cellule conduisant à une multiplication par deux du contenu en ADN de la cellule tumorale), qui en est responsable, semble lié à la progression tumorale.

Plus récemment un mécanisme de cancérogenèse différent a été rapporté dans certaines tumeurs coliques [219]. L'ADN des cellules tumorales de ces cancers présente une instabilité aux loci de type microsatellite, ce qui se traduit par l'apparition d'allèles n'existant pas à l'état constitutionnel. Cette instabilité est due à un déficit dans le système de réparation des erreurs de réplication de l'ADN (*DNA mismatch repair*) [91, 319], qui leur confère le caractère MIN (pour *microsatellite instability*) ou dit RER+ (pour *DNA replication error phenotype*). L'existence d'un phénotype instable semble liée à l'altération somatique de ou des gènes *hMSH2*, *hMHL1*, *hMLSH6*, *hMSH3*, *hPMS1* [251, 252]. Ces gènes codent des protéines impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Ils présentent des homologies de séquence avec les gènes *MutS* et *MutL* dont les rôles respectifs dans les processus de réparation des mésappariements ont été bien caractérisés chez *E. coli* [222, 319]. Il en résulte l'apparition de séquences microsatellites entraînant l'apparition de mutations non sens, de translation, ou un décalage du cadre de lecture. Dans tous les cas, la protéine est modifiée. Le phénotype instable est une des caractéristiques principales des tumeurs se développant chez les malades génétiquement prédisposés appartenant à des

familles avec des carcinomes colorectaux héréditaires sans polypose (ou HNPCC pour *hereditary non polyposis colorectal cancer*) [251, 252].

Les altérations génétiques présentes dans ces deux groupes de cancers sont assez différentes [165]. Dans le premier groupe, les tumeurs perdent des segments chromosomiques et présentent des mutations inactivant des gènes suppresseurs de tumeurs localisés sur ces segments. Dans l'autre cas, les tumeurs ne présentent pas ces pertes alléliques. En revanche, de nombreux gènes peuvent être altérés en particulier ceux présentant des séquences répétées mononucléotidiques codantes du type de celles rencontrées dans les gènes *Bax*, *E2F*, *TGF3 RII* et *IGF RII*. En effet des erreurs de réplication non réparées vont conduire à l'altération des séquences de ces gènes par insertion ou délétion d'une paire de bases. En revanche, dans ces tumeurs, la fréquence de mutation *p53* ou *APC* est beaucoup plus rare ainsi que les pertes alléliques sur les chromosomes 17p, 18q, 5q. De même l'endoduplication est exceptionnelle dans ce type de tumeur.

Cette classification en deux groupes des cancers colorectaux recouvre partiellement celle distinguant sur des critères anatomiques le colon gauche du colon droit [165]. En effet dans le colon gauche, 80 % des tumeurs présentent des pertes alléliques et sont le siège d'une endoduplication ; dans le colon droit, ce mécanisme est moins fréquent (40 %). En revanche, dans cette partie du colon, un tiers des tumeurs présente un taux élevé d'erreurs de réplication aux loci des microsatellites. La reconnaissance de facteurs pronostiques des cancers du colon permet d'adapter les traitements dans le cadre d'une prise en charge pluridisciplinaire. Ces facteurs pronostiques conditionnent le risque de récurrences locales et générales.

II. IMPLICATION DES PPAR DANS LE CANCER COLORECTAL

L'observation d'une expression anormalement élevée des PPAR et notamment de PPAR γ au niveau du colon chez l'animal et l'activation de ces facteurs de transcription par des dérivés d'acides gras suggèrent la participation de ces récepteurs dans la cancérogenèse colique [210]. La production de ligands des PPAR est en effet dépendante de la voie de métabolisation des acides arachidonique et linoléique par COX-1 et COX-2 [364]. Ces enzymes sont responsables de la transformation de ces acides gras en prostaglandines de type PGH₂, précurseurs des ligands de PPAR γ .

Plusieurs études ont montré qu'il existait une corrélation étroite entre un régime riche en graisse et la survenue de cancer colorectaux [133, 264, 327, 361]. Plus particulièrement, un régime riche en acides gras ω -6 est corrélé à l'apparition de polypes adénomateux

colorectaux chez le rat ou la souris alors qu'un régime en acides gras ω -3 aurait un rôle protecteur dans la survenue des tumeurs coliques [245, 265, 266]. L'utilisation de modèles animaux tel que la souris *Min* (pour *multiple intestinal neoplasia*) [226], souris qui présente une prédisposition au cancer du colon par la perte d'un allèle fonctionnel du gène *APC*, a permis de montrer que des régimes riches en acides gras polyinsaturés ω -6 entraîne une augmentation de 2 à 3 fois du nombre de tumeurs coliques par rapport à un régime équilibré [361]. La participation des isotypes de PPAR dans les cancers coliques a été montrée chez l'animal, à partir de modèles cellulaires *in vitro* et à partir de biopsies humaines. Globalement, seules les expressions des isotypes β et γ sont accentuées par rapport à celles observées dans le tissu sain apparenté [75, 125, 290].

Les résultats impliquant la participation de PPAR γ dans les cancers coliques sont nombreux et contradictoires. Suivant le modèle utilisé (animal ou lignée cellulaire), PPAR γ peut être considéré comme un inducteur de la prolifération cellulaire favorisant la progression tumorale ou comme un inducteur de la différenciation cellulaire qui aboutit à la mort cellulaire par apoptose. Ainsi :

- L'utilisation de souris *Min* a montré que le traitement prolongé de 7 semaines par le troglitazone, ligand de PPAR γ , entraînait un accroissement du nombre de polypes au niveau du colon [284]. L'effet de la drogue peut être limité par l'administration conjointe d'un anti-inflammatoire non stéroïdien. Une étude comparable réalisée avec des mâles hétérozygotes C57Bl/6J-ApcMin/+ (mutation non-sens) a montré que le traitement de 8 semaines par la drogue antidiabétique BRL-49653 ou par le troglitazone entraîne respectivement une augmentation de 5 fois et de 3 fois du nombre des tumeurs coliques [186].
- Chez la souris, l'analyse de la distribution de PPAR γ par immunohistochimie montre que PPAR γ est localisé principalement au niveau des cryptes. On ne retrouve qu'un signal faible voire absent au niveau des cellules matures de l'épithélium [284]. Le traitement par le troglitazone ne modifie pas cette distribution. Au niveau des polypes, le marquage est diffus et homogène sur l'ensemble des cellules formant les polypes (partie glandulaire et épithélium de surface). Le niveau d'expression varie selon les polypes, mais il est en général supérieur à celui du tissu sain adjacent. L'activation de PPAR γ par le troglitazone ne modifie pas non plus le niveau d'expression du récepteur [284]. Ces résultats indiquent que PPAR γ participe à la prolifération des cellules du colon, et qu'il serait d'autre part impliqué dans la phase de prolifération du cancer du colon.
- Le traitement par un agoniste de PPAR γ ne modifie pas l'expression de COX-2 ni chez les souris C57Bl/6J-ApcMin/+ ni dans des modèles cellulaires *in vitro* [186]. A l'opposé,

l'activation de PPAR γ s'accompagne de l'accroissement de la β -caténine dans ces mêmes modèles. Ces résultats impliqueraient que l'activation de PPAR γ est indépendante de celle de COX-2, mais elle est associée à une activation de la voie de la β -caténine. En conséquence, bien que l'élévation de l'expression de PPAR γ ne puisse pas être associée à l'activité de COX-2, PPAR γ demeurerait le médiateur du processus de cancérogenèse par la voie des PG [186].

- PPAR γ est également exprimé dans les cancers coliques induits par l'azométhane chez le rat [75]. Cependant, l'analyse histologique révèle que PPAR γ n'est pas exprimé dans tous les polypes étudiés et que l'isotype PPAR γ 1 est majoritaire [75].
- Chez l'Homme [7, 290], l'analyse du taux transcriptionnel de PPAR γ au niveau de 11 tumeurs classées en tumeurs différenciées et non différenciées a montré que ce taux est comparable entre les tissus sains et les biopsies tumorales. Ce niveau d'expression reste toujours supérieur ou égal à celui du tissu adipeux du même patient [290].
- PPAR γ est également exprimé dans des lignées cellulaires dérivant d'adénocarcinomes coliques humains [75, 167, 187, 290]. L'activation de PPAR γ par ses ligands au niveau de lignées cellulaires conduit à une diminution de la croissance cellulaire [28, 75, 167]. L'activation de PPAR γ bloque les cellules en phase G1 [28]. D'autre part, les niveaux transcriptionnels de protéines associées au tissu sain ou à la forme tumorale sont modifiés : les études réalisées à partir de cellules humaines de Moser ont montré que la *laminin binding protein* [172, 208] et l'ornithine carboxylase [382], protéines présentes dans les tumeurs ont des taux transcriptionnels qui diminuent après un traitement par le troglitazone. Inversement, la syalyltransférase et les cytokératines 18 et 19 [382], protéines dont l'expression est faible au niveau tumoral comparativement au tissu sain, ont des taux accrus lors d'un même traitement de ces cellules [290].
- Plusieurs mutations de PPAR γ ont été identifiées dans des carcinomes coliques sporadiques [291]. La mutation affectant l'exon 3 correspond à un décalage du cadre de lecture et aboutit à la formation d'une protéine tronquée dont le domaine de liaison du ligand est totalement absent. Trois autres mutations sont localisées au niveau de l'exon 5 et correspondent respectivement à deux mutations de translation et à une mutation non-sens. Ces mutations altèrent la fonction de PPAR γ [291].

Les travaux réalisés sur la participation de PPAR α se résument à l'étude réalisée par Lauer et al [180]. Ces auteurs ont montré que le taux d'ARNm de PPAR α dans les tumeurs coliques humaines est diminué comparativement à celui observé dans les tissus sains. De manière globale, il apparaît que la cancérogenèse colique se traduit par une baisse de l'expression de PPAR α .

PPAR β/δ est également impliqué dans la cancérogenèse colique. He et *al.* [125] ont montré que la transfection du gène codant *APC* dans des cellules HT29 dérivant d'un adénocarcinome colique conduit à l'inhibition de l'expression de PPAR β . PPAR β est un gène cible de Tcf-4, facteur de transcription membre de la famille TCF/LCF. De plus, l'utilisation d'un anti-inflammatoire non stéroïdien qui modifie la production du ligand de PPAR permet d'inhiber l'expression de PPAR β . He et *al.* montrent par conséquent que l'expression anormalement élevée de PPAR β exerce une action pro-tumorale. Ce rôle potentiel a été étudié à partir de cellules d'origine colique génétiquement modifiées où le gène PPAR β est invalidé [250]. La greffe de cellules PPAR δ^- /PPAR δ^- à des souris *nude* conduit à la formation de tumeurs, mais n'entraîne pas un accroissement important du volume des tumeurs comparativement aux témoins (cellules non modifiées). Cependant, ces cellules sont capables de proliférer *in vitro*. En conclusion, PPAR β participe au processus de cancérogenèse en favorisant la phase d'accroissement de la tumeur [250].

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les PPAR sont présents dans le colon sain et tumoral. Dans les cancers du colon, PPAR γ et β joueraient un rôle dans la progression de la maladie. A partir des données de la littérature, nous avons choisi d'étudier l'expression des PPAR dans trois situations biologiques :

i) au niveau du tractus digestif fœtal humain; afin de rechercher des variations d'expression des PPAR dans le développement du colon humain. Cette étude a été réalisée grâce à des techniques immunohistochimiques mettant à profit les anticorps anti-PPAR produits au Laboratoire. Cette étude a été rendue possible grâce à la collaboration de Pr D. Ménard (Sherbrooke, Québec)

ii) au niveau de la lignée cellulaire Caco-2, choisie en tant que modèle de différenciation oncofœtale. L'étude a été réalisée sur des cellules à 5, 10 et 15 jours de culture, permettant la mise en place de la différenciation cellulaire. Les variations d'expression des ARNm codant les PPAR ont été étudiées grâce à des techniques de Northern blotting, de protection à la nucléase S1 et de RT-PCR tandis que les taux protéiques des PPAR ont été analysés par immunoréplique et par immunohistochimie.

iii) à partir de prélèvements biopsiques provenant d'adénocarcinomes coliques humains. Nous avons étudié les variations de l'expression des gènes codant les PPAR dans les adénocarcinomes lieberkuhniens. Ce travail a été réalisé à partir des prélèvements collectés depuis plusieurs années dans la banque de tissus tumoraux congelés du laboratoire. Cette étude a fait appel non seulement aux techniques immunohistochimiques, mais également à des méthodes d'analyse qualitative et semi-quantitative en milieu liquide de la transcription (RT-PCR compétitive) et de la traduction (immunoréplique), mises au point à partir des lignées cellulaires dérivant d'adénocarcinome colique humain (Caco-2 et HT29). Nous avons recherché des éventuelles significations pronostiques et prédictives de ces variations d'expression. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Pr F Plénat et le soutien financier du Centre Hospitalier Universitaire (Contrat d'Incitation à la Recherche Clinique)

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. MODELES BIOLOGIQUES

a. Lignées cellulaires

Les cellules Caco-2 [93] sont cultivées dans du milieu minimum essentiel modifié par Dulbecco (DMEM ; Eurobio, les Ulis, France) contenant 20 % (v/v), de sérum de veau foetal (Life Technologies, Paisley, Ecosse) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min et 1 % (v/v) d'acides aminés non essentiels (Eurobio). Les cellules HT29 [93] sont cultivées dans du milieu DMEM contenant 10 % (v/v) de sérum de veau foetal (Eurobio) décomplémenté et 2 mM de L-glutamine (Eurobio). Les flacons de culture sont placés dans un incubateur (Heraeus, Mannheim, Allemagne) à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture est changé tous les jours.

Les cellules Caco-2 et HT29 sont repiquées (cette opération est appelée Passage et est notée P_i), respectivement à 5 et 7 jours de culture. Le tapis cellulaire est lavé avec du tampon phosphate de sodium/potassium modifié par Dulbecco (DPBS : 8 mM Na₂HPO₄, 7 H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄ (pH :7,4) contenant 1,37 mM NaCl et 2,7 mM KCl) puis dissocié par un mélange de trypsine à 2 % (p/v) et d'EDTA à 0,54 mM (Eurobio) préalablement chauffé à 37°C. Après 5 min d'incubation, la suspension cellulaire obtenue est mélangée à 5 mL de milieu de culture puis elle est centrifugée à 1000 g pendant 5 min. Le culot de cellules obtenu est finalement suspendu dans du DPBS. Le nombre des cellules est apprécié à l'aide d'un hématimètre Neubauer après dilution au demi dans une solution de bleu trypan à 0,04 % (v/v). Les cellules Caco-2 et HT29 sontensemencées à raison de 6.10⁴ cellules/mL et 5.10⁵ cellules/mL de milieu de culture, respectivement. Les cellules sont placées à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Il est important de préciser qu'au cours de cette étude, nous avons utilisé des cellules Caco-2 correspondant à des passages compris entre P106 et P120. En effet, lors des repiquages successifs, l'expression des marqueurs de différenciation de ces cellules comme la saccharase/isomaltase peut diminuer ou disparaître [388]. Concernant les cellules HT29, nous avons utilisé les passages compris entre P190 et P205.

Les cellules sont recueillies après 5, 10 et 15 jours de culture. Le tapis de cellules est lavé trois fois avec du DPBS froid puis est stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

b. Tissus humains

Intestins foetaux

Les intestins provenant de foetus humains âgés de 7 à 23 semaines d'amhénorée sont obtenus à la suite d'avortements spontanés ou provoqués selon la législation en vigueur au Canada. Ils nous ont été fournis par le Professeur D. Ménard du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (Québec). Ces échantillons sont immédiatement congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C.

Adénocarcinomes colorectaux

L'étude est réalisée à partir de biopsies prélevées sur des pièces opératoires et collectées dans le laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques du Centre Hospitalier Universitaire de Nancy dirigé par le Professeur F. Plénat. Les biopsies sont soit directement congelées et conservées dans de l'azote liquide, soit fixées pendant 24 heures dans du formaldéhyde dilué dans du tampon phosphate de sodium 0,01M (7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂O₄ (pH :7,4) contenant 0,13 M NaCl) contenant 4,0 % (p/v) de formaldéhyde. Les procédures de congélation sont celles décrites dans une recommandation de l'ANAES (Agence Nationale d'Accréditation et des Evaluations en Santé) sur la constitution des banques de tissus congelés.

c. Tissus de rats

Obtention des tissus

Des rats Wistar d'un poids moyen de 300g sont anesthésiés par injection d'une solution d'équithésine à raison de 0,4 mL pour 100 g de poids corporel. L'abdomen de l'animal est ouvert longitudinalement afin de récupérer l'intestin, le foie et le tissu adipeux.

La totalité de l'intestin est lavée par injection d'une solution de NaCl 9 ‰ (p/v) à partir du duodénum jusqu'à la base du colon. L'intestin est soit plongé dans de l'azote liquide et conservé à -80°C, soit placé sur de la glace afin de réaliser l'isolement fractionné des entérocytes le long de l'axe crypto-villositaire [92]. Les autres organes (foie et tissu adipeux) sont directement congelés dans de l'azote liquide puis conservés à - 80°C.

Isolement fractionné des entérocytes le long de l'axe crypto-villositaire

Les entérocytes sont obtenus à partir de l'épithélium intestinal de rat adulte selon le protocole de Flint et *al.* [92] modifié comme suit : l'intestin nettoyé est prélevé à 2 cm du pylore

puis retourné à l'aide d'une fine baguette de verre de 2 mm de diamètre. Une extrémité de l'intestin est ligaturée tandis que l'autre est laissée libre afin de pouvoir remplir doucement

l'intestin de tampon DPBS à l'aide d'une seringue sans aiguille. L'intestin ainsi gonflé est déposé dans un erlenMeyer rempli de 100 mL d'une solution contenant 0,15 M NaCl et 1 mM d'EDTA (pH :8,0). L'ensemble mis sur de la glace pendant 10 min est agité régulièrement. Les entérocytes sont mis en suspension sous l'action de l'EDTA.

L'enrichissement et la qualité de chaque fraction cellulaire sont appréciés sous microscope à phase inversée. Les premières fractions sont riches en entérocytes provenant du haut des villosités (fractions notées F1). Les fractions suivantes (F2 à F4) sont constituées de cellules de la partie médiane, puis de la base des villosités. Les dernières fractions (F5 et F6) contiennent les cellules des cryptes. Chaque fraction est centrifugée pendant 5 min à 3000 g. Les culots cellulaires reçoivent 2 mL d'une solution d'extraction des ARN puis sont placés à -80°C .

II. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

a. Dosage des protéines

Extraction protéique

Les protéines sont extraites à partir des cellules Caco-2, des cellules HT29, des tissus humains et murins selon le protocole décrit par Mansen et *al.* [210].

100 mg de tissus sont homogénéisés au Potter dans 500 μL de la solution d'extraction protéique contenant 25 mM Hepes/KOH (pH :7,5), 0,4 M KCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT et un mélange d'anti-protéases (complexe BM, Roche, Mannheim, Allemagne). Les cellules Caco-2 ou les cellules HT29 sont récupérées à l'aide d'un rateau et sont rassemblées dans 500 μL de la solution d'extraction. L'ensemble est vortexé puis laissé à 4°C pendant 15 min. Après centrifugation à 15000 g pendant 20 min à 4°C , seul le surnageant est conservé.

Dosage protéique

Les protéines totales sont dosées par la technique de Bradford [24] grâce à une trousse commerciale (Bio Rad, Hercules, CA, USA). Nous avons utilisé l'albumine bovine sérique (BSA) comme protéine de référence.

Les protéines sont conservées à -80°C sous forme d'aliquotes de 50 μg , 25 μg ou 10 μg de protéines.

b. Dosages enzymatiques

Préparation des homogénats cellulaires

Après 5, 10 et 15 jours de culture, les tapis de cellules sont rincés 3 fois en présence de DPBS froid. Après lavage, les cellules sont grattées puis homogénéisées en présence de tampon Tris/HCl à 2 mM (pH :7,1) contenant 30 mM de mannitol. La concentration en CaCl₂ de chaque échantillon est ajusté au final à 10 mM. Les échantillons sont laissés 1 heure sur la glace, puis centrifugés à 4°C pendant 20 min à 1500 g. Après centrifugation, les surnageants sont recueillis et centrifugés à 4°C pendant 30 min à 15000g. Les culots obtenus sont repris dans la solution d'homogénéisation et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. La concentration en protéines des échantillons est mesurée par la technique de Bradford [24].

Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline

L'activité de la phosphatase alcaline (EC 3.13.1) est mesurée d'après la technique décrite par Garen et Levinthal [98] en utilisant comme substrat le paranitrophénol phosphate. L'unité enzymatique de l'activité de la phosphatase alcaline est définie par l'activité de l'enzyme nécessaire à l'hydrolyse de 1 µmole de paranitrophénol phosphate par minute à 37°C. Les résultats sont exprimés en mU/mg de protéines.

Dosage de l'activité de la saccharase/isomaltase

L'activité de la saccharase/isomaltase (EC 3.3.1.1) est mesurée d'après la technique décrite par Messer et Dahlqvist [220]. L'unité enzymatique de la saccharase/isomaltase est définie par l'activité de l'enzyme nécessaire à l'hydrolyse de 1 µmole de saccharose par minute à 37°C. Les résultats sont exprimés en mU/mg de protéines.

Dosage de l'activité de la catalase

L'activité de la catalase (EC 1.11.1.6) est mesurée d'après la technique décrite par Baudhuin et al. [15]. Les homogénats cellulaires sont dans ce cas préparés dans du tampon imidazole/HCl à 20 mM (pH :7,0) contenant 0,1% (p/v) d'albumine bovine sérique, 1 % (p/v) de Triton X100. L'unité enzymatique de la catalase (unité Baudhuin, UB) est définie par l'activité de l'enzyme nécessaire à l'hydrolyse de 1 µmole de H₂O₂ en H₂O et ½ O₂ par minute à 37°C, selon les conditions expérimentales. Les résultats sont exprimés en mUB/mg de protéine.

Dosage de l'activité de l'acyl CoA-oxydase

L'activité de l'acyl CoA-oxydase (EC.1.3.99.3) est déterminée d'après la technique décrite par Hryb et Hogg [135] en utilisant comme substrat le lauroyl-CoA. Les homogénats cellulaires sont préparés dans une solution de 50 mM Tris/HCl (pH :8,0) contenant 200 mM de NAD⁺, 100 mM de Coenzyme A, 1 mM de KCN, 12 mM de dithiothréitol, 200 mg/ml d'albumine sérique bovine, 0,025% (p/v) de Triton X-100 et 0,1 mM de lauroyl-CoA. L'activité enzymatique est mesurée par l'apparition de NADH, H⁺ à l'aide d'un spectrophotomètre dont la longueur d'onde est réglée à 340 nm. L'unité enzymatique de l'acyl CoA-oxydase est définie par l'activité de l'enzyme nécessaire à l'hydrolyse de 1 μ mole de NAD⁺ en NADH⁺, H⁺ par minute à 37°C, selon les conditions expérimentales. Les résultats sont exprimés en mU/mg de protéines.

c. Production des anticorps polyclonaux anti-PPAR

Nous avons produit des anticorps polyclonaux dirigés contre chacun des isotypes de PPAR.

Les séquences peptidiques choisies pour la production de chaque antisérum se situent à l'extrémité NH₂ terminale (tableau 1 et figure 15). Comme le montre la figure 15, la séquence peptidique 45SSGSFGFTEYQY56 est choisie d'après la séquence humaine [303] pour produire l'anticorps anti-PPAR α . La séquence peptidique humaine 24EGAPELNNGGPQHAL37 [297] est utilisée pour produire l'antisérum polyclonal anti-PPAR β ou anti-hNUC1. L'antisérum anti-PPAR γ 1/ γ 2 est produit à partir de la séquence en acides aminés EMPFWPTNFGISSVD, séquence commune à PPAR γ 1 et à PPAR γ 2 (acides aminés 5-19 d'après la séquence PPAR γ 1 de souris [386] et acides aminés 33-49 pour PPAR γ 2 [336]). Cette séquence est bien conservée pour les isoformes humaines de PPAR γ [80, 83].

En tenant compte du fait que PPAR γ 2 diffère de PPAR γ 1 par la présence de 30 acides aminés supplémentaires du côté NH₂-terminal, la séquence de l'haptène utilisé pour produire l'anticorps anti-PPAR γ 2 humain a été choisie dans cette région et correspond à 2GETLGDSPIDPESDS16 [80, 83].

Les peptides synthétiques sont couplés à l'hémocyanine de Patelle (KLH) en présence de glutaraldéhyde [9]. Les anticorps polyclonaux sont obtenus par injections sous-cutanées à des lapins selon les procédures d'immunisation décrites [9]. De plus, nous avons utilisé un anticorps polyclonal commercial anti-PPAR γ (AB Reagents, Golden, Angleterre) dirigé contre

PPAR	Séquence peptidique sélectionnée	Références
PPAR α	45 SSGSFGFTEYQY 56	[315]
PPAR β	24 EGAPELNGGPQHAL 37	[309]
PPAR γ 1	5 EMPFWPTNFGISSVD 19	[347, 401]
PPAR γ 2	2 GETLGDSPIDPESDS 16	[81, 85]

Tableau 1 : Séquences peptidiques sélectionnées pour la production des anticorps polyclonaux dirigés contre chacun des isotypes de PPAR.

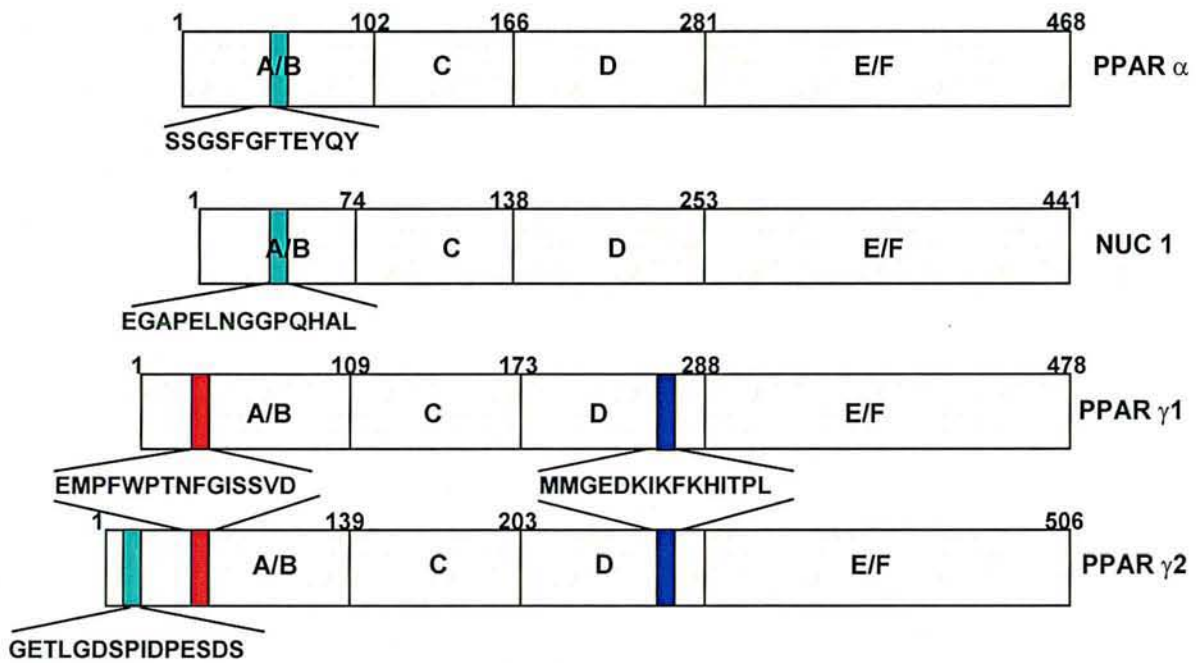


Figure 15 : Positions et natures des séquences peptidiques sélectionnées pour la production d'anticorps polyclonaux dirigés contre chacun des isotypes de PPAR

Les domaines structuraux et fonctionnels (A-D) des PPAR sont représentés

la séquence MMGEDKIKFKHITPL commune aussi bien à PPAR γ 1 qu'à PPAR γ 2 (acides aminés 256-270 de PPAR γ 1 humain, 284-298 de PPAR γ 2 humain).

Les antiséras produits ont été caractérisés par immunoprécipitation avec les différents PPAR obtenus par transcription et traduction *in vitro*. Ces opérations sont réalisées en utilisant une trousse commerciale (TNT Rabbit reticulocyte lysate, Promega, Madison, WI, USA) et en suivant les recommandations du fournisseur (Figure 16)

d. Technique d'immunoréplique (Western blotting)

Electrophorèse

Les protéines des différents échantillons sont séparées par électrophorèse dans des conditions dénaturantes selon la technique décrite par Laemmli [179]. Des gels de migration à 10% d'acrylamide (solution mère à 30/0,8(%T) acrylamide/bisacrylamide) sont préparés dans du tampon Tris/HCl 0,37 M (pH :8,8) contenant 0,1 % (p/v) SDS. Le gel de concentration est préparé dans les mêmes conditions avec du tampon Tris/HCl 0,125 M (pH :6,8) contenant 0,1 % (p/v) SDS. Avant dépôt, les échantillons sont dénaturés à 100°C pendant 5 min en présence de tampon Tris/HCl 10 mM (pH :8,0) contenant 1 mM EDTA, 5 % (v/v) de 2-mercaptoéthanol, 2,5 % (p/v) de SDS, 0,02 % (p/v) de bleu de bromophénol et 10 % (v/v) de glycérol.

Transfert sur membrane PVDF

Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinyl difluoride (NEN, Boston, MA, USA) selon la technique décrite par Towbin et *al.* [341]. La membrane est plongée dans une solution de méthanol pendant 1 min, rincée à l'eau et laissée dans du tampon de transfert froid contenant 2,0 mM Tris, 0,192 M glycine et 20 % (v/v) de méthanol pendant 20 min sous agitation douce. Le transfert est réalisé en semi-sec (Semidry Apparatus, Bio Rad) dans le même tampon pendant 15 min à 15 volts. Après transfert, la membrane est colorée en présence d'une solution de Rouge Ponceau S à 0,5 % (p/v) diluée dans une solution d'acide trichloroacétique à 0,3 % (p/v). La membrane est partiellement décolorée dans de l'eau bidistillée permettant ainsi de vérifier le transfert des protéines sur la membrane.

Détection immunologique

La détection immunologique est réalisée par chimoluminescence grâce à une trousse commerciale (Roche, Mannheim, Allemagne) selon le protocole proposé par le fournisseur. En résumé, la membrane de PVDF est plongée pendant 1 heure à température ambiante sous

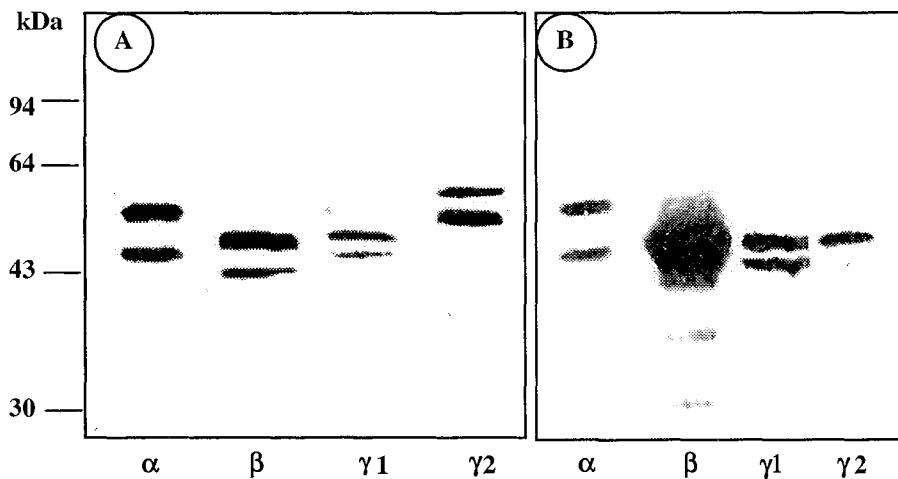


Figure 16 : Reconnaissance des différents isotypes de PPAR par leur anticorps respectif

A) Analyse en SDS-PAGE des produits PPAR α , β et γ 1 de souris et PPAR γ 2 humain obtenus par traduction *in vitro*. 2 μ L de lysat sont déposés par piste et analysés par SDS-PAGE sur un gel à 10%. Le gel est séché puis exposé à un film autoradiographique.

B) Immunoprécipitation des produits PPAR α , β et γ 1 de souris et PPAR γ 2 humain obtenus par traduction *in vitro*. Ces produits sont mis en incubation avec l'anticorps anti-PPAR correspondant (dilution au 1/250). Les complexes sont immunoprécipités en présence de la protéine A-Sepharose puis soumis à une électrophorèse dans des conditions dénaturantes. Les gels sont séchés et exposés à un film autoradiographique. L'exposition est de 7 jours pour PPAR γ 2 et de 27 jours pour les autres PPAR.

agitation dans 10 mL d'une solution de saturation préalablement diluée 10 fois dans du tampon Tris/HCl 50 mM (pH :7,5) contenant 0,15 M NaCl .

La membrane est incubée une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire ajouté à la solution de saturation diluée 20 fois avec du tampon Tris/HCl 50 mM (pH :7,5) contenant 0,15 M NaCl. Après incubation, la membrane est lavée 2 fois pendant 10 min en présence de tampon Tris/HCl 50 mM (pH :7,5) contenant 0,15 M NaCl et 0,1 % (v/v) de Tween 20 et 2 fois durant 10 min dans une solution de saturation diluée 20 fois avec du tampon Tris/HCl 50 mM (pH :7,5) contenant 0,15 M NaCl. La membrane est ensuite incubée en présence de l'anticorps secondaire dilué au 1/2000 dans une solution de saturation diluée 20 fois avec du tampon Tris/HCl 50 mM (pH :7,5) contenant 0,15 M NaCl, pendant 30 min à température ambiante sous agitation. Après incubation, la membrane est lavée 4 fois pendant 10 min avec du tampon Tris/HCl 50 mM (pH :7,5) contenant 0,4 M NaCl et 0,1 % Tween, puis séchée entre 2 feuilles de papier absorbant. Le substrat (luminol) est déposé sur la membrane. Après 1 min d'incubation, la membrane est séchée, puis placée dans une cassette au contact d'un film d'autoradiographie (Film Trimax, 3M, USA). Après révélation, l'intensité des signaux observés est quantifiée par densitométrie (GelDoc, Bio Rad).

III. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

a. Immunocytochimie

Immunocytochimie sur coupes de tissus congelés du tractus digestif foetal humain

Cette technique a été utilisée dans le but de suivre l'expression des PPAR au cours du développement du tractus digestif foetal humain. Les antiséras utilisés correspondent aux anticorps polyclonaux, préparés au laboratoire, dirigés contre chaque isotype de PPAR et contre les isoformes PPAR γ 1 et γ 2. Le protocole utilisé est schématisé dans la figure 17A.

Des coupes de 5 μ m d'épaisseur sont montées sur des lames Superfrost, puis fixées pendant 45 min à 4°C dans une solution de formaldéhyde à 2 % (p/v) dans du tampon phosphate de sodium à 10 mM (tampon PBS : 3 mM NaH₂PO₄, 7 mM Na₂HPO₄ (pH :7,4) contenant 0,13 M NaCl) puis rincées en présence de tampon PBS. Les lames sont ensuite immergées dans le même tampon PBS contenant 100 mM de glycine pendant 45 min à 4°C, puis rincées à nouveau avec du tampon PBS.

Les coupes sont préincubées dans une solution saturante contenant 0,1 % (v/v) de gélatine de poisson, 0,8% (p/v) d'albumine bovine sérique et 0,002% (v/v) de Tween 20 pendant 30 min à température ambiante.

Chaque section est encerclée par un film de silicone, afin de limiter l'écoulement des solutions d'incubation qui pourrait être responsable d'un dessèchement des tissus. Les

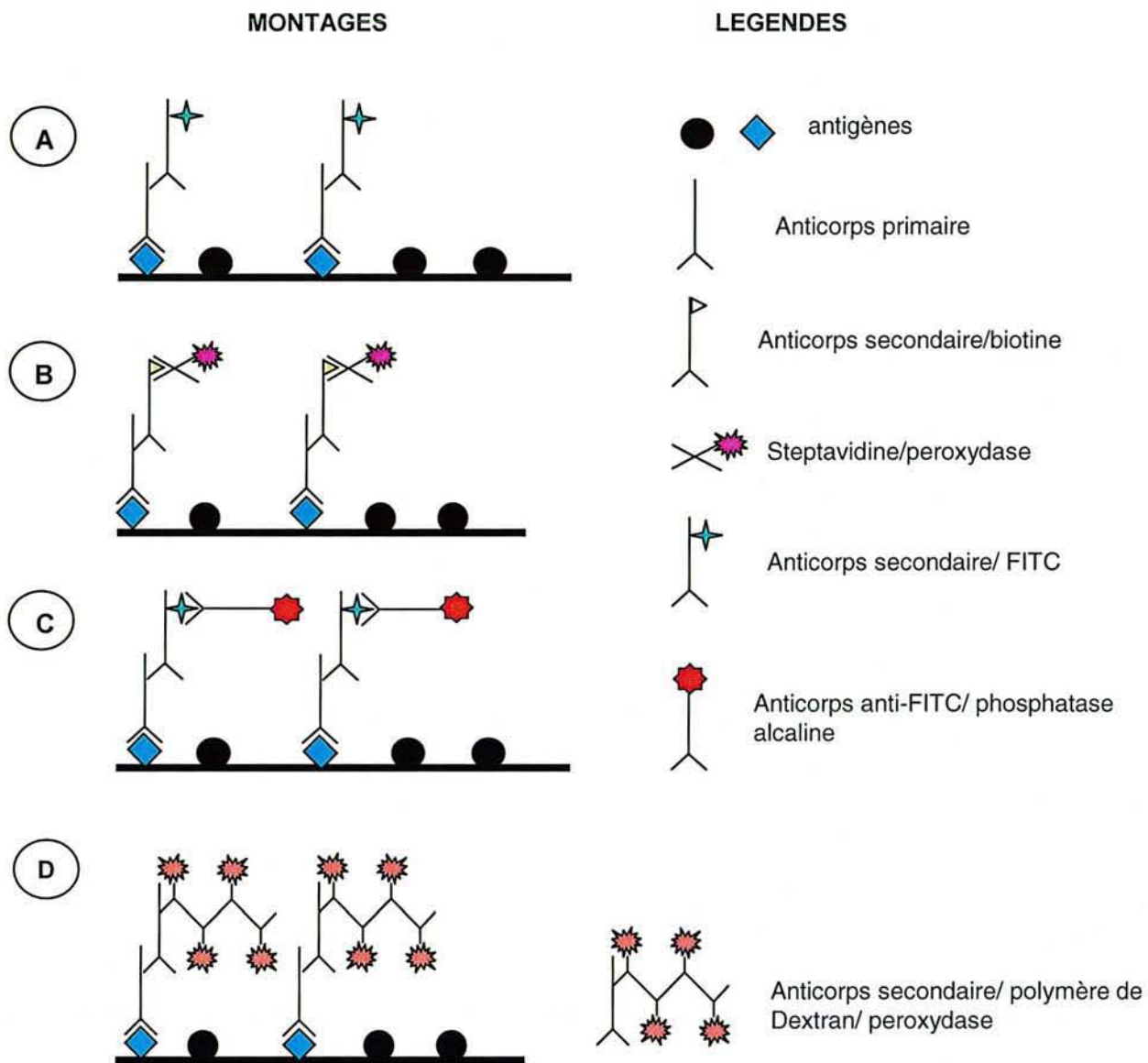


Figure 17 : Description des différentes procédures utilisées en immunocytochimie

A) le complexe antigène/anticorps primaire est mis en évidence grâce à un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine (chèvre anti- IgG de lapin/FITC).

B) le complexe antigène/anticorps primaire est mis en évidence grâce à un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine (chèvre anti- IgG de lapin/FITC) auquel est ajouté un anticorps tertiaire dirigé contre la fluorescéine couplée à la phosphatase alcaline. L'ensemble est révélé grâce à une trousse commerciale Fast Red.

C) le complexe antigène/anticorps primaire est mis en évidence grâce à un anticorps secondaire couplé à la biotine (chèvre anti- IgG de lapin/biotine) auquel est ajouté un complexe streptavidine peroxydase. L'ensemble est révélé par la DAB.

D) Le complexe antigène/anticorps est mis en évidence grâce à un anticorps secondaire couplé à un polymère de Dextrane lui-même conjugué à la peroxydase. La révélation se fait grâce à une solution commerciale NovaRed.

anticorps primaires dilués au 1/250 dans du tampon PBS contenant 5% (p/v) de lait écrémé sont appliqués pendant 1 heure à température ambiante.

Après rinçage, les coupes sont recouvertes d'une solution d'anticorps secondaire conjugué à la fluorescéine (anti-IgG de lapin produits chez la chèvre et couplés au FITC, Roche) dilué au 1/50 dans du tampon PBS contenant 2% (p/v) de BSA, pendant 1 heure en chambre humide à température ambiante.

Après rinçage avec du tampon PBS, la présence de complexes antigènes-anticorps est enfin révélée en ajoutant deux gouttes de cytifluor/glycérol (Agar Scientific, Essex, Angleterre) sur chaque coupe.

Immunocytochimie des cellules Caco-2

- Immunocytochimie sur coupes en paraffine des cellules Caco-2

Cette technique a été utilisée dans le but de suivre l'expression des PPAR au cours de la différenciation des cellules en culture. Les antiséras utilisés correspondent aux anticorps polyclonaux, préparés au laboratoire, dirigés contre chaque isotype de PPAR et contre les isoformes PPAR γ 1 et γ 2. Le montage utilisé est schématisé dans la figure 17B.

Les cellules Caco-2 sont récupérées à l'aide d'un râteau et rassemblées dans un tube Falcon. Après centrifugation de 5 min à 1000 g à 4°C, le culot cellulaire est fixé dans 50 mL de formaldéhyde à 4 % (p/v) dilué dans un tampon phosphate pendant 1 nuit à 4°C. Après fixation, les cellules sont incluses dans la paraffine. Des sections de 5 μ m d'épaisseur sont montées sur des lames Superfrost puis séchées pendant 2 heures à l'étuve à 37°C. Les coupes sont déparaffinées par trois bains successifs de toluène pur, réhydratées par passage dans des bains d'alcool de concentration décroissante puis dans de l'eau.

Chaque lot de coupe est encerclé par un film de silicone afin d'empêcher l'écoulement des solutions. Les lames sont ensuite réhydratées dans du tampon PBS contenant 0,001 % de Tween 20 (tampon PBS-Tween) pendant 5 min, avant de recevoir l'anticorps primaire dilué au 1/400 dans une solution contenant 15,6 mM d'azide de sodium, 4,8 mM de N-éthyl-méoleimide, 20 % de glycérol, 1% (p/v) d'albumine bovine sérique. L'incubation est réalisée pendant une nuit à 4°C en chambre humide.

Les lames sont rincées au PBS-Tween. L'anticorps secondaire anti-IgG de lapin produit chez le porc et conjugué à la biotine (porc anti-IgG de lapin/biotine, Dako, Glostrup, Danemark) dilué au 1/200 est déposé sur chaque lot de coupes pendant 1 heure. Les lames sont rincées au PBS-Tween. Un complexe streptavidine couplé à la peroxydase (Dako) dilué au 1/200 dans du tampon PBS-Tween est déposé pendant 1 heure. Les lames sont rincées au PBS-Tween. La révélation se fait grâce à une solution commerciale AEC (Zymed, San Francisco, CA, USA) pendant 5 min, selon les indications du fournisseur. Chaque section est

ensuite contre-colorée à l'hématoxyline puis montée entre lame et lamelle dans un milieu aqueux PVA (polyvinyl alcool, Sigma, St Louis, MI, USA).

- Immunocytochimie sur coupes semi-fines des cellules Caco-2

Les cellules Caco-2 sont récupérées à l'aide d'un râteau et rassemblées dans un tube Falcon. Les cellules sont lavées avec du PBS. Après centrifugation à 2000 g pendant 5 min à 4°C, le culot cellulaire est rincé plusieurs fois dans le PBS avant d'être fixé dans une solution formolée à 4 % pendant 1 nuit.

Les cellules sont à nouveau rincées au PBS (3 bains de PBS de 10 min). Le culot cellulaire est réhydraté par des bains successifs d'alcool (éthanol à 70 %, 90 %, 95 % et éthanol absolu, 3 fois pendant 20 min à chaque étape) avant d'être inclus dans l'unicryl (Electronic Microscopy Sciences, Euromedex). Pour ce faire, le culot cellulaire est plongé pendant 2 heures dans une solution d'unicryl à 33 % dans de l'éthanol absolu, puis dans une solution d'unicryl à 66 % (v/v) dans de l'éthanol absolu pendant 2 heures. Finalement, le culot cellulaire subit 3 bains successifs d'unicryl pur pendant 8 heures. L'inclusion en unicryl est réalisée à 4°C par polymérisation sous UV à 10 cm de hauteur pendant 3 jours. Après inclusion, des sections de 2 µm d'épaisseur sont réalisées et déposées sur des lames Superfrost.

Chaque lot de coupes est entouré d'un film de silicone afin d'éviter l'écoulement des solutions. Les lames sont plongées dans du tampon PBS-Tween avant de recevoir l'anticorps primaire (dilution 1/50) pendant 1 nuit à 4°C dans une chambre humide.

Les lames sont rincées en présence de tampon Tris/HCl 50 mM (pH :7,4) contenant 0,15 M NaCl et 0,001 % Tween 20 (tampon TBS-Tween). L'anticorps secondaire anti-IgG de lapin produit chez le porc et conjugué à la fluorescéine (porc anti-lapin /FITC, Jackson, West Grove, PA, USA) est utilisé à la dilution finale au 1/100 dans du tampon TBS-Tween et appliqué pendant 1 heure à température ambiante (figure 17C). Les lames sont rincées au TBS-Tween. L'anticorps anti-FITC (chèvre anti-FITC produit chez le porc, Roche) dilué au 1/2000 dans du tampon TBS-Tween est déposé pendant 1 heure à température ambiante sur chaque coupe. Les lames sont rincées au TBS-Tween puis plongées dans du tampon Tris/HCl 0,1 M (pH : 8,2) pendant 5 min. Les complexes formés sont révélés pendant 8 min à l'obscurité par une solution Fast Red (Sigma) selon les indications du fournisseur. Les lames sont contre-colorées à l'hématoxyline puis montées dans un milieu aqueux PVA (Sigma).

Immunocytochimie des cellules HT29

Les cellules HT29 sont récupérées à l'aide d'un râteau et rassemblées dans un tube Falcon. Après centrifugation de 5 min à 1000 g à 4°C, le culot cellulaire est fixé dans 50 mL de formaldéhyde de calcium 4 % (p/v) pendant 1 nuit à 4°C. Après fixation, les cellules sont

incluses dans la paraffine. Des sections de 5 μm d'épaisseur sont montées sur des lames Superfrost puis séchées pendant 2 heures à l'étuve à 37°C. Les coupes sont déparaffinées par trois bains successifs de toluène pur, réhydratées par passage dans des bains d'alcool de concentration décroissante puis dans de l'eau.

Chaque lot de coupes est encerclé par un film de silicone afin d'empêcher l'écoulement des solutions. Les lames sont ensuite réhydratées dans du tampon PBS-Tween pendant 5 min, avant de recevoir l'anticorps primaire (dilution 1/400) pendant 1 nuit à 4°C dans une chambre humide. La révélation des complexes antigène-anticorps formés est réalisée grâce au montage décrit précédemment (figure 17C). Nous avons utilisé un anticorps secondaire anti-IgG de lapin produit chez le porc et conjugué à la fluorescéine (dilution 1/100, porc anti-IgG de lapin/FITC, Jackson) et un anticorps tertiaire dirigé contre la fluorescéine (dilution 1/2000, chèvre anti-FITC de porc, Jackson). La révélation est réalisée à l'aide d'une solution Fast-Red (Sigma).

Immunocytochimie sur coupes en paraffine des tissus provenant d'adénocarcinome colique adulte

Cette technique a été utilisée dans le but d'analyser l'expression des PPAR ainsi que d'autres protéines au niveau d'adénocarcinomes coliques humains et des tissus sains situés à proximité des tumeurs. Nous avons utilisé les antisera d'origine commerciale suivants :

- antisérum dirigé contre les isotypes de PPAR (anti-PPAR γ , anti-PPAR α et anti-PPAR β , AB Reagent à la dilution 1/400),
- anti-cytochrome-c (dilution 1/400 ; Chemicon International, Temacula, CA, USA),
- anti-cytokératine 18 (dilution 1/200 ; Dako)
- anti-Ki67 (1/200 ; Dako)

Des prélèvements biopsiques sont fixés pendant 1 nuit à 4°C dans une solution formolée à 10% (p/v) diluée dans du tampon PBS puis inclus dans la paraffine. Des sections de 5 μm sont déposées sur lames Superfrost puis séchées pendant 2 heures à l'étuve à 37°C.

- Mise en évidence des PPAR

Les coupes sont déparaffinées dans 3 bains successifs de toluène pur, réhydratées par passage dans des bains d'alcool de concentration décroissante puis dans de l'eau. Un film de silicone est déposé autour de chaque section. Les lames sont immergées dans du tampon PBS. L'anticorps primaire dilué (dilution 1/400) est déposé sur chaque coupe, pendant une nuit dans une chambre humide et à 4°C.

La révélation des complexes antigène-anticorps formés est réalisée grâce au montage décrit précédemment (Figure 17C). Nous avons utilisé un anticorps secondaire anti-IgG de lapin produit chez le porc et conjugué à la fluorescéine (dilution 1/100 ; porc anti-IgG de lapin/FITC, Jackson) et un anticorps tertiaire dirigé contre la fluorescéine (dilution 1/2000 ; chèvre anti-FITC de porc, Jackson). La révélation est réalisée à l'aide d'une solution Fast-Red (Sigma).

- Mise en évidence de la protéine cytochrome c

Les coupes sont déparaffinées dans 3 bains successifs de toluène pur, réhydratées par passage dans des bains d'alcool de concentration décroissante puis dans de l'eau. Un pré-traitement des coupes visant à inverser la fixation formolée est effectué. Ce traitement est réalisé par chauffage. Les lames sont plongées dans une solution d'EDTA 100 mM (pH :8,0) et chauffées dans un four à micro-ondes (Micromed TT, Microm, Francheville, France) pendant 1h à 98°C, puis elles sont directement refroidies dans l'eau. Un film de silicone est déposé autour de chaque section. Les lames sont immergées dans du tampon PBS. L'anticorps primaire dilué au 1/200 est déposé sur chaque coupe, pendant une nuit dans une chambre humide et à 4°C. Les lames sont rincées au PBS-Tween. Un anticorps secondaire couplé à un polymère de Dextrane lui-même conjugué à la peroxydase (trousse commerciale PowerVision, immunoVision Technologies) est déposé pendant 1 heure (figure 17D), d'après les instructions du fournisseur. La révélation se fait grâce à une solution commerciale (NovaRed, BioValley, Burlingame, CA).

- Mise en évidence des protéines cytokératine 18 et de Ki67

Les coupes sont déparaffinées dans 3 bains successifs de toluène pur, réhydratées par passage dans des bains d'alcool de concentration décroissante puis dans de l'eau. Un pré-traitement des coupes est réalisé par chauffage. Les lames sont plongées dans une solution d'EDTA à 100 mM (pH : 8,0) et chauffées dans un four à micro-ondes de laboratoire (Micromed) pendant 1h à 98°C, puis elles sont immédiatement refroidies dans l'eau. Un film de silicone est déposé autour de chaque section. Les lames sont immergées dans du tampon PBS. L'anticorps primaire anti-cytokératine 18 dilué au 1/200 ou l'anticorps primaire anti-Ki67 dilué au 1/200 est déposé sur chaque coupe, pendant une nuit dans une chambre humide et à 4°C. Les lames sont rincées au PBS-Tween. La révélation du complexe antigène-anticorps fait appel au montage décrit précédemment (figure 17B). Nous avons utilisé un anticorps secondaire biotinylé (dilution 1/200) dirigé contre l'anticorps primaire puis un conjugué

streptavidine couplé à la peroxydase (dilution 1/200). La révélation se fait grâce à une solution commerciale (Novared, BioValley).

b. Microscopie électronique

La présence des peroxysomes dans les cellules Caco-2 a été étudiée par microscopie électronique selon le protocole de Novikoff et *al.* [239]. Cette technique permet de visualiser l'activité de la catalase peroxysomale après réduction alcaline du 3,3'diaminobenzamidine (DAB, Sigma).

En résumé, les cellules Caco-2 sont fixées à 4°C pendant 40 min dans du tampon cacodylate de sodium 0,1M (pH : 7,4) contenant 2,8 % (v/v) de glutaraldéhyde puis sont rincées 3 fois pendant 20 min dans la même solution tampon contenant 7,5% (p/v) de saccharose.

Les cellules sont ensuite traitées pendant 3 heures à 37°C dans un milieu DAB. Cette solution est remplacée après 90 min. Les échantillons sont post-fixés pendant 30 min dans du tampon phosphate de potassium 0,1 M contenant 1% (v/v) de tetroxyde d'osmium (pH : 7,4), déshydratés à l'éthanol puis enrobés dans un mélange araldite/épon (v/v) à 37°C pendant 48 heures.

Des coupes de 75 µm d'épaisseur sont déposées sur des grilles. L'ensemble est contrasté dans une solution d'acétate d'uranyle, puis dans une solution de citrate de plomb selon le protocole de Reynolds [269]. Les sections sont observées avec un microscope électronique Philips CM12 à 80 kV.

IV. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

a. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits selon la méthode de Chomczynski et Sacchi [50]. Cette méthode permet de lyser les cellules, de séparer l'ADN, les ARN et les protéines sous l'action d'un mélange phénol/chloroforme (1:1) (v/v). La solution mère d'extraction contient 250g d'isothiocyanate de guanidium, 17,6 mL de citrate de sodium à 0,75 M, 26,4 mL de N-lauryl sarcosine de sodium à 10% (p/v) et 293 mL d'eau préalablement traitée en présence de diéthylpyrocarbonate (DEPC). L'extraction des ARN est réalisée avec la solution mère contenant 0,8 % (v/v) de β-mercaptoéthanol. L'extraction des ARN nécessite l'utilisation de solutions stériles préparées avec de l'eau bidistillée préalablement traitée par 0,1 % (v/v) de diéthylpyrocarbonate de sodium (DEPC).

Les cellules Caco-2 sont lysées en présence de 2 à 5 mL de solution de travail. Puis 0,1 volume d'acétate de sodium 2 M (pH : 4,0), 1 volume de phénol saturé en eau, 0,2 volume de chloroforme/alcool isoamylique (49:1) (v/v) sont ajoutés successivement au mélange. Après agitation pendant 15 secondes à l'aide d'un vortex, le mélange est laissé pendant 15 min à 4°C, puis il est centrifugé à 4°C pendant 20 min à 10000 g. La phase aqueuse est reprise et mélangée à 2,5 volumes d'éthanol à 99% (v/v) conservé à -20°C pendant 1 heure. Après incubation, le mélange est centrifugé à 10000 g pendant 1 heure à 4°C. Le culot est repris dans 300 µL de solution de travail et précipité par 1 mL d'éthanol 99 % (v/v). Les échantillons sont placés à -20°C pendant 1 nuit. Après centrifugation à 10000 g à 4°C pendant 20 min, le culot contenant les ARN totaux est lavé en présence de 1 mL d'éthanol à 70 % (v/v) et centrifugé à 8000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot d'ARN est séché sous vide pendant 5 min puis solubilisé dans une solution d'EDTA à 1 mM (pH :8,0) préalablement traité au DEPC.

L'extraction des ARN totaux des cellules HT29 est réalisée selon le même protocole.

Les tissus humains et murins conservés à -80°C sont réduits en poudre dans un Potter en porcelaine contenant de l'azote liquide. La poudre obtenue est déposée dans un tube contenant la solution d'extraction des ARN à raison de 1 mL de solution d'extraction pour 100 mg de poudre de tissu. Le mélange est vortexé et placé sur de la glace pendant 15 min. L'extraction des ARN totaux est réalisée selon le protocole décrit précédemment.

Les ARN sont quantifiés au spectrophotomètre à 260 nm sachant qu'une unité de DO correspond à 40 µg/mL d'ARN. La qualité des ARN extraits est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (p/v) dans du tampon Tris/HCl 90 mM (pH :8,0) contenant 90 mM de borate de sodium, 2 mM d'EDTA (TBE) et 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. 1 µg d'ARN est déposé par logette. La migration est réalisée à 100 V pendant 30 min. Après migration, les ARN sont visualisés sous lampe UV. L'aspect des ARN est observé ; ne sont conservés que les échantillons dont les ARN ne sont pas dégradés. Les ARN totaux sont aliquotés en 1, 5 ou 10 µg et sont conservés à -80°C.

b. Extraction des ARN polyadénylés

Les ARN polyadénylés ou polyA⁺ sont obtenus par chromatographie d'affinité sur oligo(dT) cellulose (Sigma) à partir des ARN totaux selon la méthode décrite par Aviv et Leder [8].

1 mg/500 µl d'ARN totaux est incubé à 65 °C pendant 5 min. Parallèlement, le même volume de tampon, Tris/ HCl 40 mM (pH :7,4) contenant 1 mM EDTA, 1 M NaCl et 0,1% (v/v) de SDS est chauffé à 65°C pendant 5 min. Le tampon est mélangé à l'échantillon puis laissé à température ambiante pendant 2 min. L'ensemble est déposé deux fois sur la colonne d'affinité d'oligo (dT) cellulose préalablement équilibrée par 3 passages successifs de 3 mL

d'une solution de NaOH 0,1 M/EDTA 5 mM, avec 5 mL d'H₂O traitée au DEPC et enfin avec 5 mL de tampon Tris/HCl 40 mM (pH :7,4) contenant 1 mM EDTA, 1M NaCl et 0,1% (v/v) SDS. La colonne est lavée avec 5 mL de tampon Tris/HCl 20 mM (pH :7,4) contenant 1 mM EDTA, 0,2 M NaCl et 0,1 % (v/v) de SDS afin d'éliminer les ARNt et ARNr. Puis 3 mL de tampon Tris/HCl 10 mM (pH :7,4) contenant 1 mM EDTA et 0,05% (v/v) de SDS sont déposés sur la colonne afin de récupérer les ARN poly A⁺. Les ARNm contenus dans 300 µL/tube sont précipités par addition de 1/10 du volume d'acétate de sodium 3 M (pH :4,5) et de 2,5 volumes d'éthanol 99 % (v/v). Les échantillons sont placés à -20°C pendant une nuit. Après centrifugation à 10000g pendant 20 min à 4°C , les culots contenant les ARN poly A⁺ sont lavés deux fois en présence d'éthanol à 70 % (v/v) puis redissous dans une solution d'EDTA à 1 mM. Les ARN polyA⁺ sont quantifiés au spectrophotomètre à 260 nm.

c. Quantification du taux d'ARNm par la technique de Northern-blotting

Electrophorèse des ARN

L'électrophorèse est réalisée selon la méthode décrite par Thomas [332] : 10 µg d'ARN totaux dissous dans 4µL d'EDTA 1 mM (pH :8,0) sont incubés pendant une heure à 50°C en présence de 16 µL d'une solution de dénaturation comprenant 2 µL de tampon phosphate de sodium à 0,1 M (pH : 6,5), 4 µL de glyoxal désionisé à 1M et 10 µL de DMSO. Après incubation, 1µL de tampon de dépôt (phosphate de sodium à 10 mM (pH 6,5) contenant 2,5 mg/mL de xylène cyanol et 2,5 mg/mL de bleu de bromophénol) est ajouté à chaque échantillon. Les marqueurs de taille Lambda DNA *Bst E II* digest (Biolabs, Beverly, MA, USA) et RNA Molecular Weight marker I (Roche) subissent le même traitement.

Les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose à 1 % (p/v) préparé dans du tampon phosphate de sodium 10 mM (pH : 6,5). La migration s'effectue dans le même tampon pendant 4 heures sous un courant continu de 100 volts. Une pompe à recirculation est branchée 15 min après le début de la migration pour permettre une bonne distribution du tampon.

Transfert sur Nylon

Après migration, les ARN sont transférés par capillarité sur une membrane de Nylon en présence de tampon 20X SSC (0,3 M NaCl et 0,03 M citrate trisodique) pendant 18 heures. Après transfert, la membrane est chauffée à 80°C pendant deux heures. La qualité du transfert est vérifiée par coloration des standards au bleu de méthylène à 0,04% (p/v) dilué dans une

solution d'acétate de sodium 0,5 M (pH : 6,0). A ce stade, la membrane peut être conservée à -20°C jusqu'à son utilisation.

Marquage de la sonde

Le marquage de la sonde est réalisé selon la technique de marquage aléatoire en utilisant [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP comme traceur. Le marquage est réalisé selon la technique décrite par

Feinberg et Vogelstein [87] grâce à une trousse de marquage (Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, Angleterre) : 20 ng de sonde purifiée sont incubés en présence de 5 μL d'amorces. Le mélange est dénaturé à 100°C pendant 5 min puis refroidi brutalement dans la glace. 10 μL de tampon de marquage (contenant dATP, dTTP, dGTP), 5 μL de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (correspondant à 50 μCi) et 2 μL d'enzyme de Klenow (1U/ μL) sont ajoutés successivement. Le volume du mélange est ramené à 50 μL par de l'eau stérile. Après incubation pendant une heure à 37°C, la sonde marquée est séparée des nucléotides libres par filtration sur gel à l'aide d'une colonne contenant du Sephadex G50 (Biosciences) préalablement équilibré dans du tampon Tris/HCl 10 mM (pH :7,4) contenant 1 mM d'EDTA.

Préhybridation et hybridation

La préhybridation s'effectue pendant 18 heures à 42°C à l'aide d'une solution contenant du tampon phosphate de sodium à 50 mM (pH :6,5), du formamide désionisé à 50% (v/v), une solution de Denhardt's 10X (Ficoll à 0,2% (p/v), du polyvinyl pyrrolidone à 0,2% (p/v), de la sérum albumine bovine à 0,2% (p/v)) et 2,5 mg d'ADN de sperme de saumon soniqué (Eurobio) dénaturé à 100°C pendant 5 min.

L'hybridation est réalisée pendant 18 heures à 42°C avec la solution de préhybridation contenant la sonde marquée, préalablement dénaturée à 100°C pendant 5 min en présence de 2,5 mg d'ADN de sperme de saumon soniqué et 2 volumes d'une solution de sulfate de dextrane à 50% (p/v). Après incubation, la membrane est lavée 4 fois à température ambiante pendant 5 min avec une solution contenant 2X SSC et 0,1% (v/v) de SDS, puis pendant 15 min à 50°C avec une solution contenant 0,5X SSC et 0,1% SDS (v/v). Cette étape permet d'éliminer l'excès de sonde non hybridée. La membrane est finalement exposée à un film radiographique (film Trimax, 3M, USA) et placée à -80°C pendant 5 jours. L'intensité des bandes a été quantifiée au PhosphorImager (Molecular Dynamics, USA). Les membranes sont deshybridées, puis hybridées à nouveau en présence d'une sonde ADNc correspondant à un fragment de l'ADNc de la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (G3PDH, BD

Biosciences Clontech, NJ, USA) selon le protocole décrit précédemment. La G3PDH est utilisée comme témoin interne dans nos expériences. Le taux transcriptionnel de PPAR est rapporté à celui de la G3PDH.

d. Quantification du taux d'ARNm par la technique de protection à la nucléase S1

La technique de protection à la nucléase S1 [287] permet de quantifier le taux d'ARNm d'un gène particulier. Nous avons utilisé cette technique pour quantifier les taux d'ARNm de PPAR α , γ 2 et γ 3. Des sondes ADN spécifiques de chaque isoforme de PPAR sont marquées radioactivement et mises en présence d'extraits d'ARN totaux (Figure 18). Les complexes ARN/ADN marqués se forment. La nucléase S1 élimine les brins d'ARN non hybridé à la sonde ainsi que la sonde en excès. Les hybrides formés sont déposés sur un gel d'acrylamide/bis acrylamide dans des conditions dénaturantes. Après migration, le gel est exposé contre un film radiographique. Les signaux obtenus sont quantifiés.

Production de sondes ADNc spécifiques de chaque isoforme de PPAR

Le taux d'ARNm codant les PPAR a nécessité la production de sondes ADNc spécifiques de chaque isotype de PPAR.

Ces sondes sont obtenues selon un protocole classique de RT-PCR. 5 μ g d'ARN totaux extraits des cellules Caco-2 ou de tissu adipeux humain sont transcrits en ADNc par l'enzyme M-MLV (Invitrogen, Paisley, Ecosse). Les ADNc sont synthétisés dans un volume de 20 μ l contenant 1 μ g d'ARN, 0,5 mM de chacun des désoxynucléotides triphosphates (Invitrogen), 0,02 g/L d'hexaprimers (amorces aléatoires, Invitrogen), 5 mM de DTT, 5 unités de RNAsine (Invitrogen) et 200 unités de transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen) dans du tampon Tris/HCl à 50 mM (pH :8,3) contenant 75 mM KCl et 3 mM MgCl₂. Le mélange est incubé à 37°C pendant 2 heures.

2 μ L du produit de RT préalablement chauffé à 94°C pendant 30 secondes, sont ajoutés au mélange PCR composé de tampon Tris/HCl 20 mM (pH=8,3) contenant 50 mM KCl, 0,2 μ M de chacun des desoxynucléotides triphosphates (Invitrogen), 0,4 μ M d'amorce sens et antisens du gène étudié, 1,5 mM de MgCl₂ et 2,5 unités de Taq Polymerase (Invitrogen). Le volume final de la réaction est de 50 μ L.

L'amplification par PCR est réalisée en 30 cycles (95°C, 30s ; 60°C, 30s ; 72°C, 30s) suivis d'une élongation terminale de 5 min à 72°C. Les amorces sens et antisens utilisées

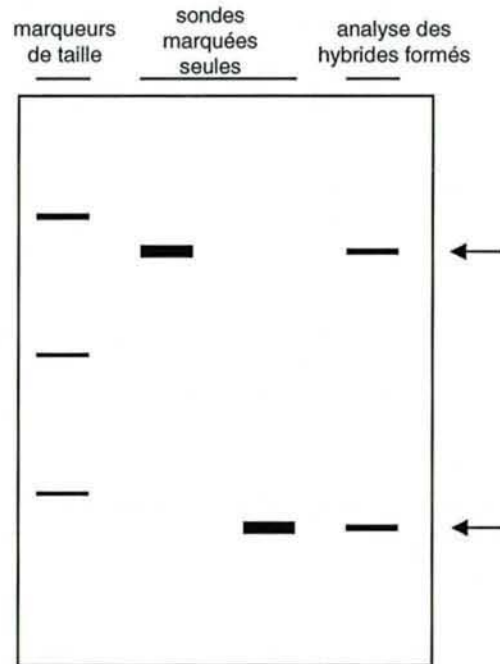
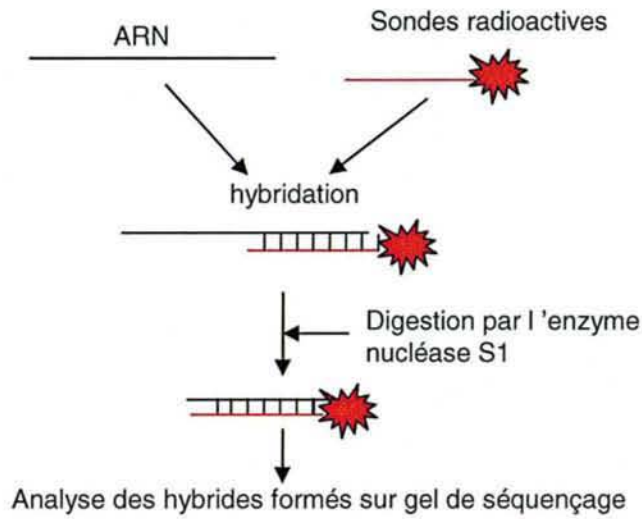


Figure 18 : Représentation schématique de la technique de la protection à la nucléase S1

Dans cette technique, une sonde ADNc marquée au $[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTP s'hybride avec un ARN selon la complémentarité des bases. L'enzyme nucléase S1 digère les ARN non hybridés ainsi que la sonde marquée en excès. Les complexes formés sont analysés sur gel en conditions dénaturantes puis quantifiés.

dans cette technique ont été sélectionnées de sorte que le fragment généré soit spécifique de chaque isotype de PPAR et de chaque isoforme de PPAR γ (PPAR γ 1, γ 2 et γ 3) (Tableau 2).

Les amorces PPAR α -sens (5'-gCC CAg gCT gAA gCT CAg gg-3') et PPAR α -antisens (5'-gAC ACg gAA AgC CAC TCT gC- 3') sont choisies afin d'obtenir une séquence ADNc spécifique de hPPAR α correspondant à la partie 5'UTR de la séquence décrite par Sher et *al.* [303]. Le fragment amplifié (244 pb) est purifié grâce à une trousse commerciale de purification d'ADN (Bio Rad) selon les instructions du fournisseur. Ce fragment ADNc est cloné dans un vecteur de clonage pBluescript KS⁺ (pBSKS⁺) (Stratagène, La Jolla, CA, USA) rendu préalablement linéaire après digestion pendant 2 heures à 25°C par l'enzyme de restriction *Sma* I (Invitrogen). L'efficacité du clonage est vérifiée par séquençage selon la méthode décrite par Sanger et *al.* [288].

Les plasmides pBSKS⁺/hPPAR γ 1, pBSKS⁺/hPPAR γ 2, pBSKS⁺/hPPAR γ 3 et pBSKS⁺/G3PDH sont obtenus selon la même méthode: l'amorce PPAR γ 1-sens située dans l'exon A1 (5'-TCg gAC CCC gAg CCC gAg-3'), l'amorce PPAR γ 2 sens située dans l'exon B (5'-CCC ATC TCT CCC AAA TAT TT-3') et l'amorce PPAR γ 1/ γ 2 antisens située dans l'exon E1 (5'-CAC AgA gAT CgC ATT Cgg CCC- 3) ont été sélectionnées à partir de la séquence ADNc décrite par Fajas et *al.* [83] (figure 19). Les couples d'amorces PPAR(γ 1 - γ 1/ γ 2) et PPAR(γ 2 - γ 1/ γ 2) produisent respectivement un fragment de 131 pb spécifique de hPPAR γ 1 et de 277 pb spécifique de hPPAR γ 2. L'amorce PPAR γ 3-sens située dans l'exon A2 (5'-gAA AgA AgC CgA CAC TAA ACC AC- 3') et l'amorce PPAR γ 3-antisens située dans l'exon E1 (5' -ACA CCT CAT CTT TAC gAC CTC TTC- 3') ont été choisies d'après la séquence de Fajas et *al.* [84] et elles génèrent un fragment de 218 pb. L'amorce glyceraldéhyde-3 phosphate déshydrogénase (G3PDH) sens (5'-CCC ATC ACC ATC TTC CgA- 3') et G3PDH anti-sens (5'-ggA AAC TgT ggC CTg TAG- 3') issues de la séquence ADNc décrite par Tso et *al.* [347] produisent un fragment de 382 pb.

Chaque fragment obtenu est cloné dans le vecteur de clonage pBSKS⁺ afin d'obtenir les plasmides pBSKS⁺/hPPAR γ 1, pBSKS⁺/hPPAR γ 2, pBSKS⁺/hPPAR γ 3 et pBSKS⁺/G3PDH. pBSKS⁺/G3PDH est utilisé en tant que témoin interne de nos expériences.

Marquage au [³²P]-dCTP des sondes spécifiques de chaque hPPAR

Chaque plasmide est linéarisé par une enzyme de restriction, *Eco*RI ou *Bam*HI (Promega, Madison, WI, USA) (3 à 5 unités d'enzyme/ μ g d'ADN) agissent pendant 2 heures à 37°C. Le choix de l'enzyme dépend de l'orientation du fragment ADNc cloné dans le vecteur

	Amorces sens (5' vers 3')	Amorces antisens (5' vers 3')	Références
PPAR α	GCCCAGGCTGAAGCTCAGGG	GACACGGAAAGCCACTCTGC	[315]
PPAR γ 1	TCGGACCCCGAGCCCGAG	CACAGAGATCGCATTTCGGCCC	[85]
PPAR γ 2	CCCATCTCTCCCAAATATTT	CACAGAGATCGCATTTCGGCCC	[85]
PPAR γ 3	GAAAGAAGCCGACACTAAACCAC	CCTCATCTTTACGACCTCTTC	[86]
G3PDH	CCCATCACCATCTTCCGA	GGAAACTGTGGCCTGTAG	[360]

Tableau 2 : Couples d'amorces retenus pour la mise en œuvre de la technique de protection à la nucléase S1

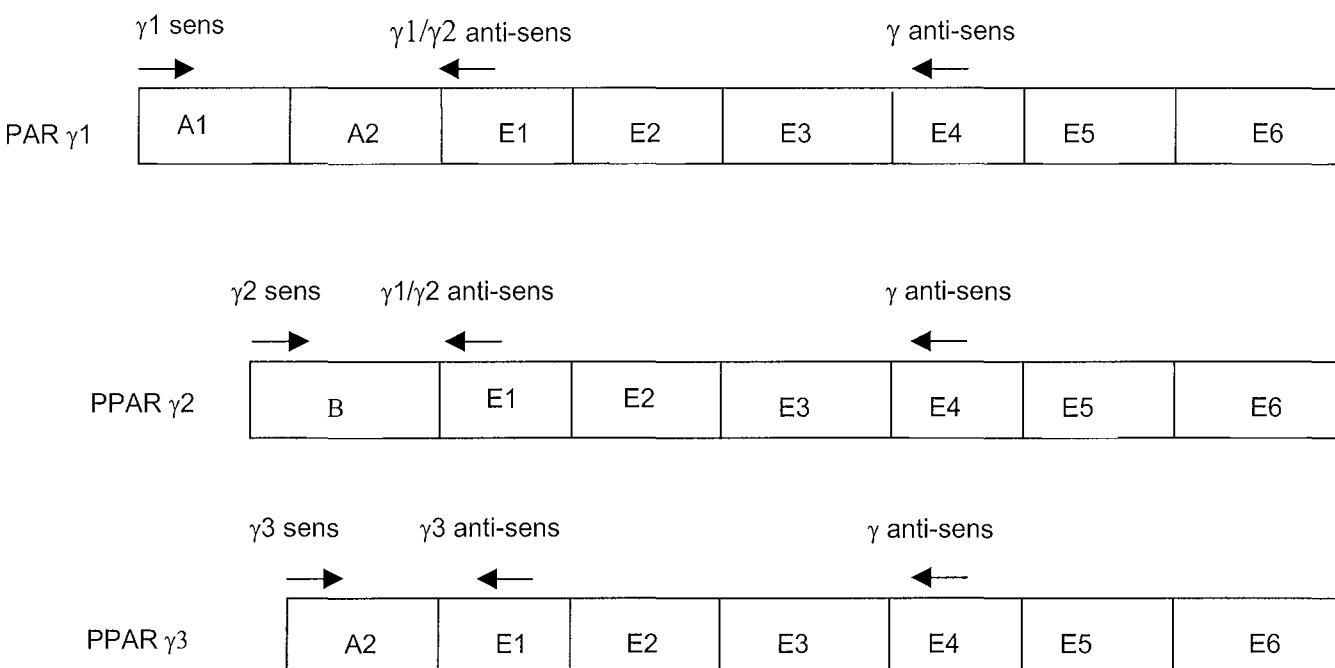


Figure 19 : Positions des couples d'amorces localisées au niveau de l'extrémité 5 ' des ARNm codant les différents isoformes de PPAR γ

Le produit amplifié PPAR γ_1 contient les exons A1 et A2 Le produit amplifié PPAR γ_2 contient l'exon B. Le produit amplifié PPAR γ_1 contient l'exon A2. Les exons E1 à E6 sont communs aux transcrits des 3 isoformes de PPAR γ .

pBSKS⁺. pBSK⁺/hPPAR α , pBSK⁺/hPPAR γ 2 et pBSK⁺/hPPAR γ 3 sont linéarisés par *Bam*H1 alors que pBSK⁺/hPPAR γ 1 et pBSK⁺/G3PDH sont linéarisés par *Eco*RI.

Après extraction par un mélange phénol/chloroforme (1:1) (v/v) puis extraction par un mélange chloroforme/alcool isoamylique (49 :1) (v/v), les plasmides sont précipités en ajoutant 1/20 du volume d'acétate d'ammonium à 5 M (pH :7,5) et 3 à 5 volumes d'éthanol à 99 % (v/v) froid. Les échantillons sont placés à -20°C pendant une heure, puis centrifugés à 4°C pendant 20 min à 10000 g. Le culot est lavé 2 fois en ajoutant 1 mL d'éthanol à 70 % (v/v), séché sous vide (Speed Vac Concentrator, Savant), puis redissous dans 20 μ L de tampon Tris/HCl à 10 mM (pH :7,5) contenant 1 mM EDTA (TE). La qualité et la quantité de plasmide linéaire sont vérifiées par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8 % (p/v) préparé dans du TBE. Les plasmides linéaires sont conservés à -20°C.

Le marquage des différentes sondes est réalisé par une technique classique d'extension d'amorce [287]. A partir de 1 μ g de plasmide linéaire, une sonde ADNc marquée radioactivement avec du [α ³²P]-dCTP (Biosciences) est synthétisée dans un mélange composé de tampon Tris/HCl à 20 mM (pH :8,4) contenant 50 mM de KCl, 0,4 mM de MgCl₂, 0,2 mM de chaque dNTP (Invitrogen) et 5 unités de Taq polymérase (Invitrogen), puis 45 μ Ci de [α ³²P]-dCTP (Biosciences) sont ajoutés au mélange. Seule l'amorce antisens (1 mM) est ajoutée au mélange final afin d'obtenir le brin ADNc marqué au [α ³²P]-dCTP. Après amplification de 30 cycles (94°C, 30 s ; 60°C, 30 s ; 72°C, 30 s), puis une étape d'extension finale à 72°C pendant 5 min, la phase aqueuse est incubée pendant 10 min à température ambiante avec 1 mL de l'enzyme klenow (Promega). Après incubation, le mélange est chauffé 5 min à 95°C puis immédiatement refroidi sur de la glace pendant 3 min. La sonde marquée est déposée sur une colonne Sephadex G50 (Sigma) pré-équilibrée dans du TE. La quantité de sonde ADNc marquée est appréciée à l'aide d'un compteur à scintillation (Biosciences). La sonde marquée est conservée à -20°C jusqu'à son utilisation.

Technique de protection à la nucléase S1

5 μ g d'ARN totaux sont séchés sous vide puis dissous dans 30 μ L de tampon d'hybridation contenant du tampon Pipes/NaOH 40 mM (pH :6,4) contenant 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA et 80 % (v/v) de Formamide désionisé. 10⁵ cpm de sonde hPPAR marquée au [α ³²P]-dCTP et 10⁵ cpm de sonde G3PDH marquée au [α ³²P]-dCTP sont ajoutés à chaque échantillon. L'ensemble est dénaturé 5 min à 90°C, placé à 4°C pendant 3 min, et incubé à 60°C pendant une nuit.

Après incubation, les échantillons reçoivent 300 μ L d'un mélange froid contenant 0,28 M de NaCl, 50 mM d'acétate de sodium (pH :4,5), 4,5 mM de ZnSO₄, 20 μ g/mL d'ARNt et 50

U de nucléase S1 (Roche). Les échantillons sont placés à 37°C pendant 1 heure. Les hybrides ARN/ADNc-[$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP sont extraits une première fois par addition du mélange phénol/chloroforme (1/1) (v/v) ; une seconde fois par addition de mélange chloroforme/alcool isoamylique (49/1) (v/v). Les hybrides ARN/ADN-[$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP sont précipités en ajoutant successivement 80 μL d'une solution contenant 4 M d'acétate d'ammonium (pH :7,5), 50 mM EDTA, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ARNt, et 1 mL d'éthanol 99 % (v/v) froid. Les échantillons sont placés à -20°C pendant 1 heure, puis centrifugés à 10000 g pendant 20 min à 4 °C. Les culots sont séchés et dissous dans 5 μL de tampon TE et 5 μL d'une solution de bleu de dépôt contenant 80% (v/v) de formamide, 10mM EDTA, 1mg/mL de xylène cyanol FF et 1mg/mL de bleu de bromophénol. L'ensemble est dénaturé par chauffage (5min à 95°C, puis 3 min à 4°C) avant d'être déposé sur un gel de polacrylamide/bisacrylamide à 5 % (p/v) contenant 7 M d'urée et préparé dans du TBE. La migration est réalisée à une puissance constante de 60 W. Le gel est fixé dans une solution d'acide acétique à 10% (v/v) pendant 10 min. Le gel est séché sous vide à 80°C pendant 1 heure, puis placé dans une cassette au contact d'un film autoradiographique (Kodak, Rochester, NY, USA). Le tout est placé à -80°C pendant 24 à 96 heures. Après révélation du film autoradiographique, l'intensité des signaux est quantifiée par densitométrie (Scan Sharp GX330, modules de densitométrie, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède).

e. Techniques de réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les taux transcriptionnels des PPAR α , β et γ dans les lignées cellulaires Caco-2 et HT29 et dans les adénocarcinomes coliques humains ont été étudiés par des techniques de RT-PCR compétitive et semi-quantitative. La mise en évidence de transcrits de PPAR γ 2 a été réalisée par une technique de RT-PCR semi-nichée.

RT-PCR compétitive

- Principe

La RT-PCR compétitive est une amplification d'ARNm en présence d'un compétiteur. En général, le compétiteur est un ARN obtenu après synthèse *in vitro*. Dans ce type de RT-PCR, les amorces entre le compétiteur et l'ARNm à amplifier sont parfaitement identiques. Le compétiteur est souvent de taille réduite et de concentration connue. Ainsi, il est possible de savoir quelle quantité d'ARNm du gène étudié est présente dans n'importe quelle cellule.

La technique que nous avons utilisée a été décrite par Kihri et *al.* [163]. Dans notre cas, le compétiteur est obtenu par RT-PCR à partir d'un tissu d'une autre espèce que celle

étudiée (figure 20). Nous avons retenu l'espèce rat pour étudier l'expression des PPAR α , β et de la COX-1 humaine, et l'espèce souris pour PPAR γ , COX-2 et β -caténine. Les amorces sens et anti-sens utilisées au cours de la PCR sont identiques entre les couples d'espèces (rat/homme) ou (souris/homme) et génèrent après amplification des fragments de même taille. Cependant, la carte de restriction de chacun de ces fragments est différente. L'utilisation d'une enzyme de restriction spécifique d'un des fragments permet de distinguer l'amplification rat/homme (ou souris/homme) et donc de connaître les quantités relatives d'ARNm pour chaque protéine étudiée. Cette valeur n'est cependant valable que si elle est rapportée à celle d'un marqueur constitutif. Dans notre cas, ce sera le produit d'amplification des ARNm du gène de la G3PDH. Le rapport des mesures rPPAR/rG3PDH (r pour rat) donne une première estimation correspondant à l'expression relative de PPAR au niveau de l'intestin de rat. Une mesure identique est réalisée pour les échantillons dont nous voulions connaître le taux des ARNm de PPAR. Nous obtenons un rapport hPPAR/hG3PDH (h pour humain) qui représente l'expression relative de PPAR au niveau de l'échantillon testé.

La comparaison entre les rapports rPPAR/rG3PDH et hPPAR/hG3PDH permet de quantifier l'expression de hPPAR par rapport au compétiteur. Ainsi, l'expression relative de hPPAR en valeur arbitraire serait : $(hPPAR/hG3PDH) \cdot (rPPAR/rG3PDH)$.

Cette équation devient $(hPPAR/rPPAR) \cdot (hG3PDH/rG3PDH)$ où la valeur hPPAR est rapportée à celle de rPPAR, cette mesure étant elle-même modulée par l'expression relative du marqueur constitutif présent dans le système humain et de rat (ou de souris). De cette manière, il n'est pas nécessaire de connaître la quantité de molécule de départ du compétiteur. Par contre, son expression relative, rapportée à celle d'un standard interne du tissu considéré, doit être mesurée.

Les différents couples d'amorces sélectionnées, les enzymes de restriction choisies, la taille des fragments amplifiés (digérés ou non par l'enzyme de restriction) sont présentés dans les tableaux 3 et 4.

Ainsi le gène PPAR α est étudié par RT-PCR compétitive avec les ARNm compétiteurs d'intestin de rat. 28 cycles sont nécessaires pour amplifier par PCR les ADNc obtenus après transcription inverse. La taille du fragment obtenu est de 385 paires de base (pb). L'enzyme de restriction *Eco* RI coupe uniquement le fragment de rat digéré pendant 1 heure à 37°C et produit deux fragments de 309 et de 76 pb.

Le gène PPAR β est étudié par RT-PCR compétitive avec les ARNm compétiteurs d'intestin de rat. 28 cycles sont nécessaires pour amplifier par PCR les ADNc obtenus après transcription inverse. La taille du fragment engendré est de 560 pb. L'enzyme de restriction

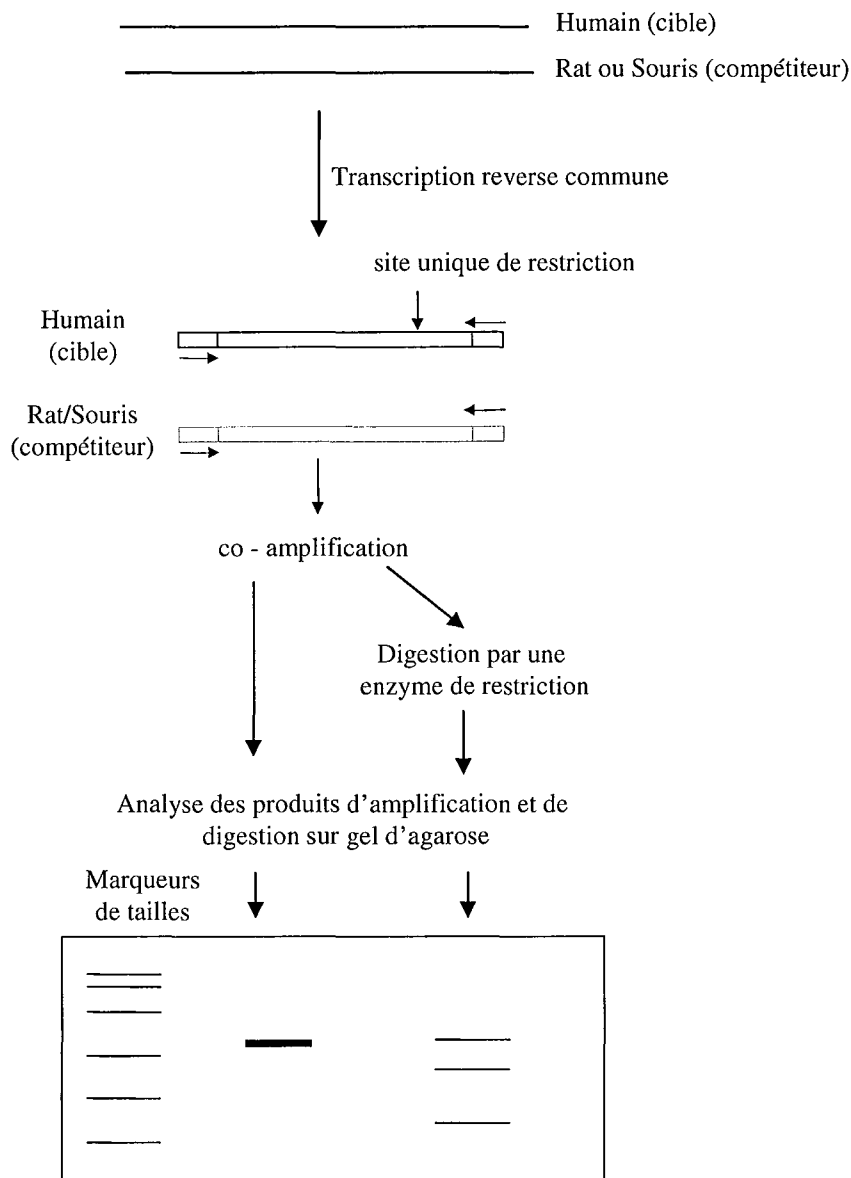


Figure 20 : Principe de la technique de la RT-PCR de type compétitif [169]

Dans cette technique, le compétiteur est représenté par des ARN provenant d'une espèce différente de celle étudiée (dans notre cas des tissus de rat ou de souris). L'amplification des ADNc est obtenue en utilisant des amorces communes aux 2 espèces. Le produit d'amplification est ensuite digéré par une enzyme de restriction propre à chaque espèce. Le produit de digestion est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose puis quantifié.

	Amorces sens (5' vers 3')	Amorces antisens (5' vers 3')	Références
PPAR α	ATGGTGGACACGGAAAGCCCCTC TGCCCCTCTCCCCACT	TTCGCCGAAAGAAGCCCTTGCAGCCTTC ACA	[109, 315]
PPAR β	TGTGAGGGGTGCAAGGGCTTCTTC CG	GGTGGTTGAGGAAGAGGGTGCTGAA	[309, 384]
PPAR γ	TCAGGTTGTGAAGGATGCAAGG'	TCCAGTGCATTGAACTTCACAGC	[85, 176]
COX-1	CCCTGTTGTTACTATCCGTGCCA	AAGAACTGGTGGGTGAAGTGTG	[90, 392]
COX-2	GCAGGCTAATACTGATAGGAGAGA	TTGGAGCACCATTCTCCTTGAAAG	[136, 184]
β -caténine	CATCCCACTGGCCTCTGATAAA	CCTTGGATATCGCCAGGATGAT	[32, 246]
G3PDH	GACCCCTTCATTGACCTCAACTACA TG	GCTGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT	[360]

Tableau 3 : Couples d'amorces retenus pour la mise en œuvre de la RT-PCR de type compétitif

Gènes étudiés	ARN compétiteurs	Nombres de cycles	Enzymes de restriction	Durée et température de digestion	Fragments générés
PPAR α	intestin de rat	28 cycles	Eco RI/Rat	1 heure 37 °C	ND=385 pb D=309+76 pb
PPAR β	intestin de rat	28 cycles	Taq I / Humain	1 heure 65 °C	ND=560 pb D=377+183 pb
PPAR γ	tissu adipeux	28 cycles	Apa I / Humain	1 heure 30 °C	ND=759 pb D = 498+261pb
COX-1	intestin de rat	32 cycles	Eco RI / Humain	1 heure 37 °C	ND= 527pb D= 392+135 pb
COX-2	tissu adipeux	30 cycles	Eco RI / Souris	1 heure 37 °C	ND= 603 pb D= 473+130 pb
β -caténine	Tissu adipeux	26 cycles	Sac I / Souris	1 heure 30 °C	ND= 638 pb D= 411+227 pb
G3PDH	intestin de rat tissu adipeux	28 cycles	Nsi I / Rat ou souris	1 heure 37 °C	ND= 446 pb D= 344+102 pb

Tableau 4 : Récapitulatif des ARNm compétiteurs, du nombre de cycles, des enzymes de restriction, du temps et de la température de digestion par l'enzyme de restriction, et des fragments générés pour chaque gène étudié lors de la RT-PCR de type compétitif.

A titre d'exemple, le gène PPAR α est étudié par RT-PCR compétitive avec les ARNm compétiteurs d'intestin de rat. 28 cycles sont nécessaires pour amplifier par PCR les ADNc obtenus après transcription inverse. La taille du fragment résultant est de 385 paires de base (pb). L'enzyme de restriction Eco RI coupe uniquement le fragment de rat. La digestion est réalisée pendant 1 heure à 37°C et produit deux fragments de 309 et de 76 pb. D : digestion ; ND : pas de digestion

Taq I coupe uniquement le fragment humain La digestion est réalisée pendant 1 heure à 65°C et produit deux fragments de 377 et de 183 pb.

Le gène PPAR γ est étudié par RT-PCR compétitive avec les ARNm compétiteurs d'adipocytes de souris. 28 cycles sont également nécessaires pour amplifier par PCR les ADNc obtenus après transcription inverse. La taille du fragment obtenu est de 759 pb. L'enzyme de restriction *Apa* I coupe uniquement le fragment humain après une digestion d'une heure à 30°C et produit deux fragments de 498 et de 261 pb.

D'autres marqueurs comme la COX-1, COX-2 et la β -caténine ont été mesurée par RT-PCR compétitive. Les couples d'amorces sont sélectionnés dans la partie codante à partir des séquences ADNc décrites dans la littérature.

Le gène COX-1 est étudié par RT-PCR compétitive avec les ARNm compétiteurs d'intestin de rat. 32 cycles sont nécessaires pour amplifier par PCR les ADNc obtenus après transcription inverse. La taille du fragment obtenu est de 527 pb. L'enzyme de restriction *Eco* RI coupe uniquement le fragment humain. La digestion est réalisé pendant 1 heure à 37°C et produit deux fragments de 392 et de 135 pb.

Le gène COX-2 est étudié par RT-PCR compétitive avec les ARNm compétiteurs d'adipocytes de souris. 30 cycles sont nécessaires pour amplifier par PCR les ADNc obtenus après transcription inverse. La taille du fragment obtenu est de 603 pb. L'enzyme de restriction *Eco* RI coupe uniquement le fragment de souris après une digestion d'une heure à 37°C et produit deux fragments de 473 et de 130 pb.

Le gène β -caténine est étudié par RT-PCR compétitive avec les ARNm compétiteur d'adipocytes de souris. 26 cycles sont nécessaires pour amplifier par PCR les ADNc obtenus après transcription inverse. La taille du fragment obtenu est de 638 pb. L'enzyme de restriction *Sac* I coupe uniquement le fragment de souris. La digestion est réalisée pendant 1 heure à 30°C et produit deux fragments de 411 et de 227 pb.

- Traitement à la DNase RQ1 dépourvue d'activité RNase

Avant de réaliser la technique de RT-PCR, tous les échantillons sont traités à la DNase RQ1 dépourvue d'activité RNase (Promega). Le traitement à la DNase est réalisé pour éliminer les traces d'ADN susceptibles de contaminer les ARN totaux. La digestion est réalisée dans du tampon Tris/HCl à 40 mM (pH :8,0) contenant 10 mM de MgSO₄, 10 mM de CaCl₂, 50 μ g d'ARN totaux, 8 unités de RNAsine (Invitrogen), 1 mM de DTT et 50 unités d'enzyme DNase RQ1 dépourvue d'activité RNAsique. Le mélange est incubé 30 min à 37°C et finalement à 65°C pendant 10 min. Après traitement, les ARN totaux sont extraits selon la technique décrite précédemment [50] et quantifiés.

- Transcription Inverse

La transcription inverse est réalisée avec l'enzyme M-MLV (Invitrogen). Les ADNc sont synthétisés dans un mélange composé de tampon Tris/HCl à 50 mM (pH :8,3) contenant 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 2 µg d'ARN totaux (correspondant à 1 µg ARN à quantifier et à 1 µg d'ARN compétiteur), 0,5 mM de chacun des désoxynucléotides triphosphates (Invitrogen), 0,02 g/L d'amorces aléatoires (Invitrogen), 5 mM de DTT , 5 unités de RNAsine (Invitrogen) et 200 unités de M-MLV (Invitrogen). Le mélange est incubé à 37°C pendant 2 heures.

- Réaction de polymérisation en chaîne

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 µM de chacun des désoxynucléotides triphosphates (Invitrogen), 0,4 µM d'amorces sens et antisens, 1,5 mM de MgCl₂ et 2,5 d'unités de *Taq* Polymerase (Invitrogen).

2 µL du mélange de transcription inverse préalablement chauffés à 94°C pendant 30 secondes sont finalement ajoutés. La PCR est réalisée en 26, 30 ou 32 cycles selon le gène étudié (tableau 4). Chaque cycle comprend la séquence suivante : 30s à 94°C, 30s 60°C, 30s à 72°C, suivie d'une élongation terminale de 5 min à 72°C.

- Digestion enzymatique des produits de PCR et quantification

D'une manière générale, 10 µL de produit d'amplification sont digérés par une enzyme de restriction (tableau 4). Après digestion, le mélange est déposé sur un gel d'agarose à 2% (p/v) préparé dans du TBE contenant 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium et soumis à une électrophorèse. Les produits d'amplification et de digestion sont visualisés sous lampe UV et leurs intensités respectives sont quantifiées (Geldoc, BioRad).

- Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été soumis à l'analyse de rang de Wilcoxon pour des valeurs appariées (sain *versus* tumeur) [366]. La dispersion des valeurs obtenues ne suit pas une distribution gaussienne ; elle exclut par conséquent le test t de Student.

PCR semi-quantitative

Une technique de RT-PCR semi-quantitative a été développée au cours de la mise au point de la RT-PCR compétitive. Les résultats obtenus par les deux techniques ont été comparés et analysés.

Tous les échantillons sont traités par la DNase RQ1 dépourvue d'activité RNase (Promega) selon le protocole décrit précédemment.

1 µg d'ARN extrait (de tissus ou de cellules en culture) sont transcrits en ADNc par l'enzyme M-MLV (Invitrogen). Les ADNc sont synthétisés dans un volume de 20 µL contenant 1 µg d'ARN, 0,5 mM de chacun des désoxynucléotides triphosphates, 0,02 g/L des hexaprimers (amorces aléatoires, Invitrogen), 5 mM de DTT, 5 unités de RNAsine (Invitrogen) et 200 unités de M-MLV(Invitrogen) dans du tampon Tris/HCl à 50 mM (pH :8,3) contenant 75 mM de KCl et 3 mM de MgCl₂). Le mélange est incubé à 37°C pendant 2 heures.

2µl de ce produit sont utilisés pour l'amplification par PCR en utilisant deux couples d'amorces (Tableau 4) : le couple d'amorces PPAR α (par exemple) et le couple d'amorces G3PDH, utilisé comme témoin interne. Expérimentalement, 2µL du produit de RT préalablement chauffés à 94°C pendant 30 secondes, sont ajoutés au mélange PCR composé de tampon Tris/HCl à 20 mM (pH :8,3) contenant 50 mM de KCl, 0,2 µM de chacun des désoxynucléotides triphosphates, 0,4 µM des amorces sens et anti-sens du gène étudié, 0,4 µM des amorces G3PDH sens et antisens, 1,5 mM de MgCl₂ et 2,5 d'unités de Taq Polymerase (Invitrogen). La PCR est réalisée en 30 cycles (30s à 94°C, 30s à 60°C, 30s à 72°C) suivis d'une élongation terminale de 5 min à 72°C.

Le produit d'amplification est déposé sur gel d'agarose à 2% (p/v) préparé dans du TBE contenant 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium et soumis à une électrophorèse.

Les produits d'amplification sont visualisés sous lampe UV et leurs intensités respectives sont quantifiées (GelDoc, BioRad). Le rapport hPPAR/hG3PDH permet de déterminer l'expression relative du PPAR étudié au sein de nos échantillons.

PCR semi-nichée

La détermination du taux des transcrits de certaines isoformes de PPAR γ ne peut pas être obtenue par la technique classique de RT-PCR réalisées à partir d'ARN totaux. Le taux des ARNm des différents PPAR γ , et en particulier de PPAR γ 2 a été étudié par la technique de RT-PCR semi-nichée. Cette technique consiste à réaliser deux PCR successives en utilisant une amorce commune aux deux amplifications.

1 µg d'ARN extrait (de tissus ou de cellules en culture) sont transcrits en ADNc par l'enzyme M-MLV (Invitrogen). Les ADNc sont synthétisés dans un mélange composé de tampon Tris/HCl à 50 mM (pH :8,3) contenant 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 1 µg d'ARN, 0,5 mM de chacun des désoxynucléotides triphosphates, 0,02 µg/L des hexaprimers (amorces aléatoires, Invitrogen), 5 mM de DTT, 5 unités de RNAsine (Invitrogen) et 200 U de M-MLV (Invitrogen). Le mélange est incubé à 37°C pendant 2 heures.

2µL de ce produit sont utilisés pour l'amplification par PCR selon le protocole décrit précédemment (30 cycles chacun comportant : 30s à 94°C, 30s à 60°C, 30s à 72°C, suivis d'une élongation terminale de 5 min à 72°C) en utilisant le couple de l'amorce PPAR γ 2 sens sélectionnée à partir de l'exon B et de l'amorce PPAR γ antisens sélectionnée à partir de l'exon 4 [84] (figure 19 et tableau 5). 1/10 du volume final est utilisé pour réaliser la deuxième PCR dans les mêmes conditions. Les amorces utilisées sont PPAR γ 2 sens (amorce sélectionnée à partir de l'exon B) et PPAR γ 2 anti-sens (amorce sélectionnée à partir de l'exon1) (figure 19 et tableau 5).

Le produit d'amplification est déposé sur un gel d'agarose à 2% (p/v), soumis à une électrophorèse et visualisé sous lampe UV puis quantifié (GelDoc, BioRad). L'intensité du signal est rapportée à celle de la G3PDH, marqueur utilisé en tant que témoin interne. Parallèlement, le produit d'amplification est digéré par l'enzyme *Hind* II pendant une heure à 37°C. Les produits de digestion sont déposés sur un gel d'agarose à 2% (p/v), soumis à une électrophorèse et visualisés sous lampe UV puis quantifiés (GelDoc, Biorad).

	Amorces sens (5' vers 3')	Amorces anti-sens (5' vers 3')	Références
PPAR γ 1	TCGGACCCCGAGCCCGAG	CACAGAGATCGCATTTCGGCCC	[85]
PPAR γ 2	CCCATCTCTCCCAAATATT	CACAGAGATCGCATTTCGGCCC	[85]
PPAR γ	amorce antisens retenue pour la technique de PCR semi nichée	CCGCCAACAGCTTCTCCTTCT	[85]

**Tableau 5 : Couples d'amorces localisées au niveau de l'extrémité 5' des ARNm
des différents isotopes de PPAR**

RESULTATS

EXPRESSION DES PPAR AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU TRACTUS DIGESTIF FOETAL HUMAIN

I. CARACTERISATION DES ANTICORPS ANTI-PPAR

Les PPAR (α , β et γ_1 de souris et γ_2 humain) obtenus par transcription/traduction *in vitro* ont été utilisés dans des expériences d'immunoprécipitation pour caractériser les antiséras produits. Les séquences peptidiques choisies pour l'immunisation correspondent à celles des PPAR humains et sont relativement bien conservées entre les espèces humaine et murine.

Chaque anticorps reconnaît un sous-type de PPAR contre lequel il est dirigé. Quand le sérum préimmun est utilisé, aucun signal n'est obtenu. Les réactions croisées pour chaque anticorps anti-PPAR contre les autres sous-types de PPAR sont très faibles voire absentes. Les anticorps produits ont été également caractérisés par des expériences de Western blotting en utilisant des extraits protéiques obtenus à partir de colons adulte et foetal humain. La présence des différents sous-types de PPAR est détectée dans chaque échantillon examiné. Il est intéressant de noter que nos résultats indiquent une forte expression de PPAR γ_2 dans le colon foetal humain comparativement au colon adulte.

II. ANALYSE DES PPAR AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU TRACTUS DIGESTIF FOETAL HUMAIN

Les valeurs moyennes des intensités des signaux observés en immunocytochimie ont été estimées à partir de 2 séries indépendantes de coupes de tissus de quatre fœtus. Ces valeurs sont résumées dans le tableau 6. Aucune immunoréactivité n'a été trouvée dans les coupes témoins lorsque l'anticorps primaire est absent ou remplacé par le sérum pré-immun.

a. Expression de PPAR α

La figure 21A montre que le sous type PPAR α est exprimé dès la 7^{ème} semaine du développement foetal au niveau de l'épithélium pluristratifié de l'œsophage. A ce stade, le marquage est soit nucléaire, soit cytoplasmique.

A 14 semaines, l'intensité du signal est plus faible dans ce tissu (figure 21B). La diminution de cette intensité est plus prononcée à 20 semaines, le signal ne s'observe que

ŒSOPHAGE	7 SEMAINES	/	14 SEMAINES	20 SEMAINES
PPAR α	+++	/	++	+
PPAR β	+++	/	++	-
PPAR γ	++	/	+++	++
ESTOMAC	/	12 SEMAINES	15 SEMAINES	19 SEMAINES
PPAR α	/	++	++	-/+
PPAR β	/	+	+++	++
PPAR γ	/	+	++	+
JEJUNUM	7 SEMAINES	12 SEMAINES	16 SEMAINES	/
PPAR α	-/+	-/+	-	/
PPAR β	++	++	++	/
PPAR γ	+++	++	++	/
ILEON	/	12 SEMAINES	16 SEMAINES	22 SEMAINES
PPAR α	/	++	++	+++
PPAR β	/	+++	+++	+++
PPAR γ	/	+++	+++	+++
COLON	8 SEMAINES	/	14 SEMAINES	20 SEMAINES
PPAR α	++	/	+	-/+
PPAR β	+++	/	-/+	++
PPAR γ	++	/	++	+++

Tableau 6 : Expression de PPAR α , PPAR β et PPAR γ 2 durant le développement du tractus digestif fœtal humain

Les valeurs moyennes des intensités des signaux observés en immunocytochimie ont été estimées à partir de 2 séries indépendantes de coupes de tissus de quatre fœtus.

- : absent ; -/+ : peu détectable ; + : expression faible ; ++ : expression modérée; +++ : expression forte

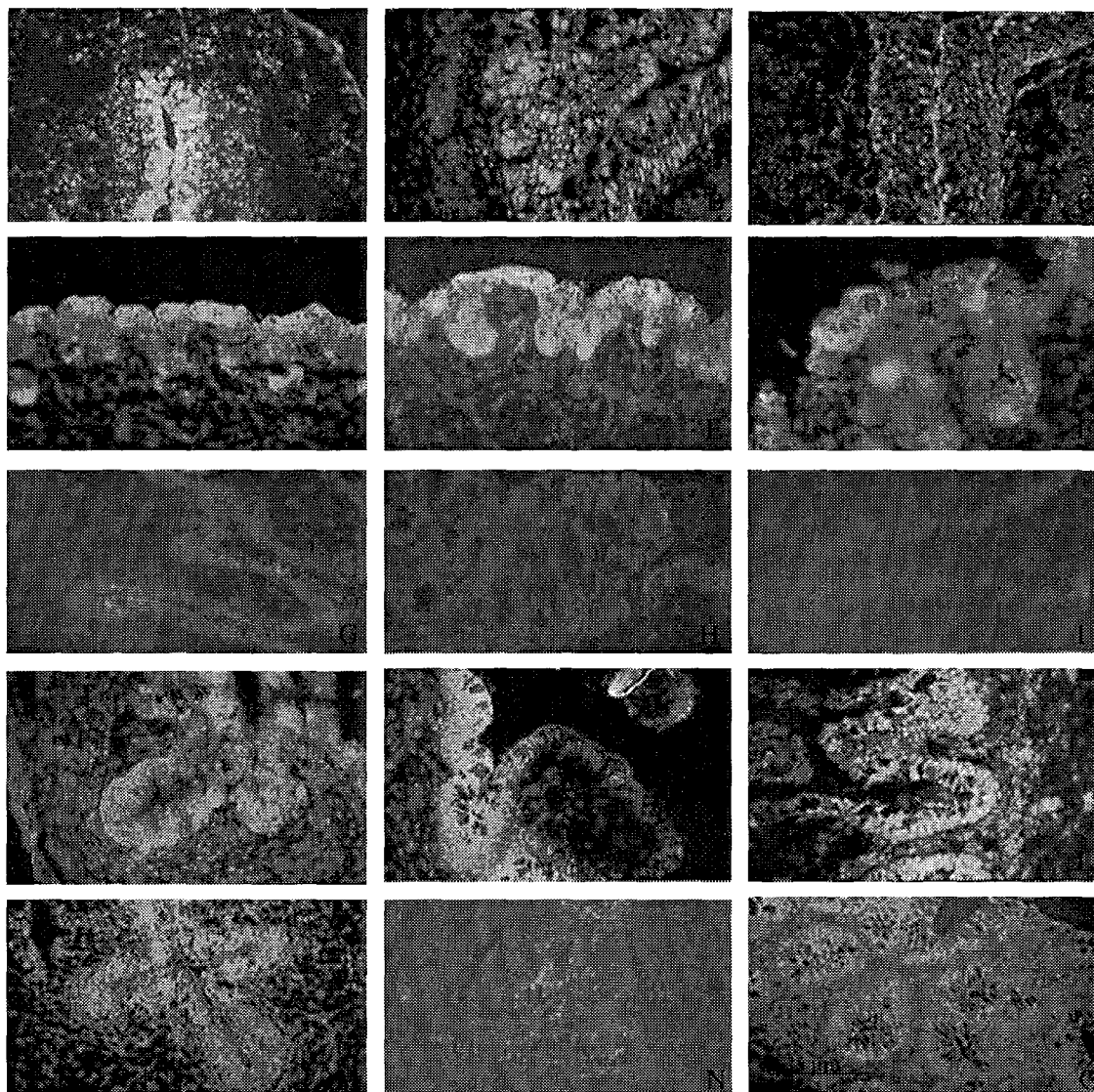


Figure 21 : Etude par immunocytochimie de l'expression de PPAR α au cours du développement foetal du tractus digestif humain.

A-C : Sections de l'œsophage prélevé à 7 semaines (**A**), 14 semaines (**B**) et 20 semaines de développement foetal (**C**). L'expression de PPAR α est principalement localisée au niveau des cellules épithéliales. **D-F** : Sections gastriques à 12 semaines (**D**), 15 semaines (**E**) et 19 semaines de développement foetal (**F**). L'expression de PPAR α est principalement observé au niveau du cytoplasme des cellules épithéliales gastriques . **G-L** : Section de l'intestin grêle. L' expression de PPAR α est faible dans le jéjunum (**G**, 7 semaines ; **H**, 12 semaines et **I**, 16 semaines de développement foetal) et fort dans l'iléon (**J**, 12 semaines ; **K**, 16 semaines ; **L**, 22 semaines de développement foetal). La présence de PPAR α est aussi détectée dans les cellules épithéliales du colon (**M-O**) à 8 semaines (**M**), 14 semaines (**N**) et 20 semaines du développement (**O**).

Barre : 75 μ m

dans les noyaux des cellules épithéliales. Il est absent dans le cytoplasme. De très faibles signaux sont observés dans les noyaux des cellules du mésenchyme et de la musculature durant le développement de l'œsophage fœtal.

A 12 semaines de vie fœtale, l'épithélium gastrique présente un signal plus intense avec l'anticorps anti-PPAR α (figure 21D) tout particulièrement dans les couches extra-épithéliales. La protéine PPAR α est détectée aussi bien dans les cellules épithéliales arrivées au sommet des glandes en cours de formation que dans les cellules situées dans leur profondeur.

A 15 semaines, aucun changement significatif n'est observé en ce qui concerne l'expression de PPAR α (figure 21E). Quatre semaines plus tard, le signal n'est quasiment plus observable dans les cellules épithéliales gastriques (figure 21F).

PPAR α est faiblement détecté à 7 semaines au niveau de l'épithélium pluristratifié du jéjunum (figure 21G). A 12 semaines de gestation, l'expression de PPAR α reste très faible dans les cellules des villosités du jéjunum (figure 21H) mais elle est par contre plus forte dans l'iléon (figure 21J).

Aucun signal n'est observé dans l'épithélium jéjunal à 16 semaines (figures 21J). Par contre, PPAR α est fortement exprimé dans les noyaux des cellules iléales (figure 21K). A 22 semaines (figure 21L), l'expression de PPAR α est encore forte notamment dans les noyaux de ces cellules.

A 8 semaines de gestation (figure 21M), le colon fœtal se présente comme un simple tube dont la lumière ressemble à une fissure. Il est composé d'un épithélium pluristratifié entouré d'un mésenchyme. A ce stade, l'expression de PPAR α est très modérée dans les cellules épithéliales (figure 21M). Les noyaux des cellules du mésenchyme sont aussi marqués par l'anticorps. A 14 semaines (figure 21N) le colon présente des cryptes dans lesquelles un marquage est présent mais qui diminue progressivement. Les cellules à mucus déjà actives à ce stade n'expriment pas l'isotype PPAR α . Les villosités sont présentes dans différents segments du colon à 20 semaines (figure 21O). Les cellules à mucus faisant face à la lumière du colon sont immunoréactives. Par contre, l'intensité du marquage fluorescent est plus faible et diffus.

b. Expression de PPAR β

Entre 7 (figure 22A) et 14 semaines (figure 22B), le sous-type PPAR β est exprimé aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau des cellules épithéliales de l'œsophage. A 20 semaines, une forte diminution de ce signal est observée (figure 22C). Au cours des différents stades du développement embryonnaire, PPAR β est exprimé dans la totalité de

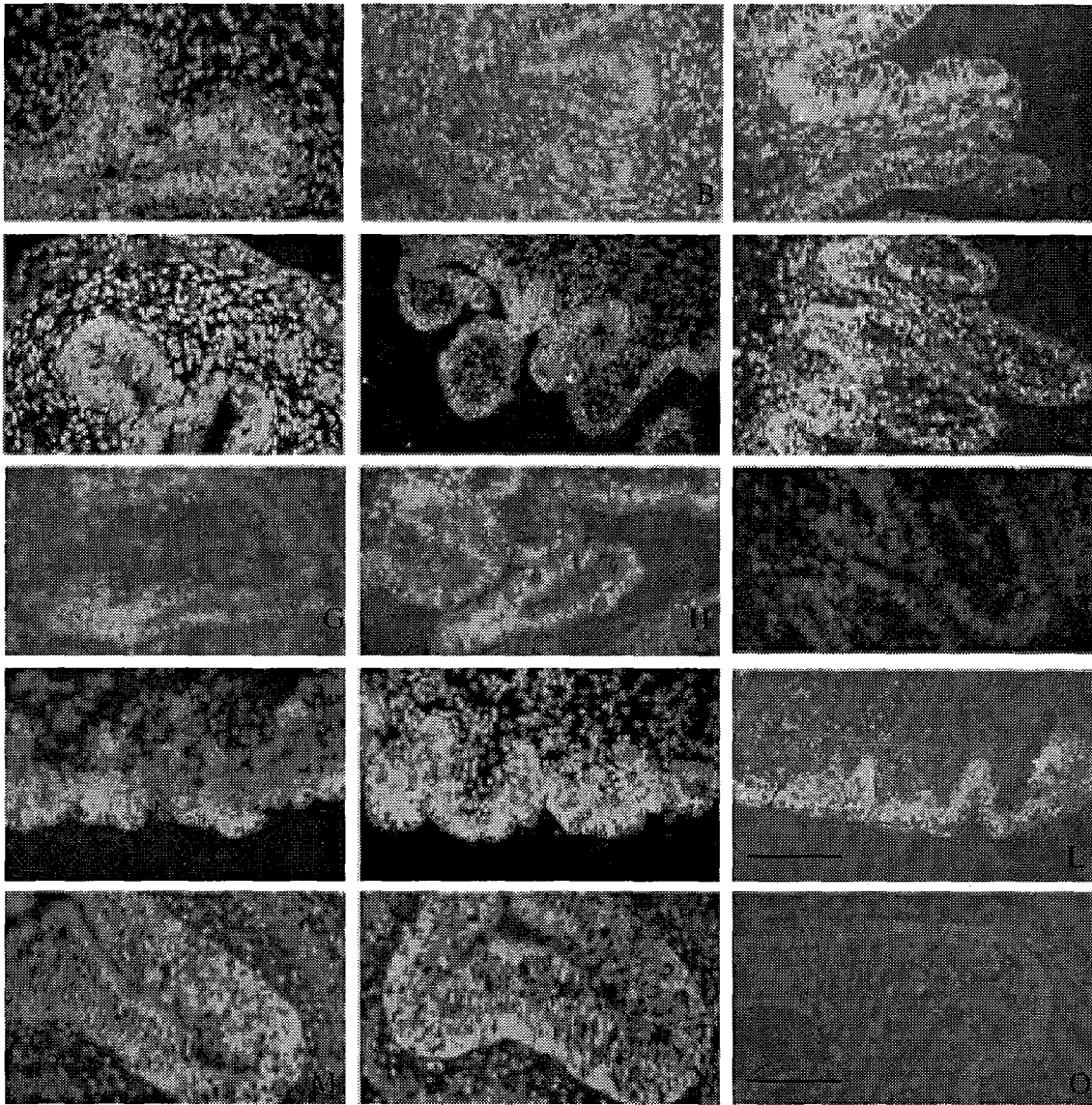


Figure 22 : Etude par immunocytochimie de l'expression de PPAR β au cours du développement foetal du tractus digestif humain.

A-C : œsophage à 7 semaines (**A**), 14 semaines (**B**) et 20 semaines de développement foetal (**C**). Une diminution de l'expression de PPAR β est observée à 20 semaines de développement foetal. **D-F** : Sections gastriques à 12 semaines (**D**), 15 semaines (**E**) et 19 semaines de développement foetal (**F**). **G-I** Jéjunum. A travers la morphologie du jéjunum (**G**, 7 semaines ; **H**, 12 semaines et **I**, 16 semaines du développement), l' expression de PPAR β est détectée dans les noyaux des cellules du mésenchyme et des cellules épithéliales. Par contre, l'intensité de la fluorescence est plus faible durant le développement iléal (**J**, 12 semaines ; **K**, 16 semaines ; **L**, 22 semaines du développement) (**M-O**) colon à 8 semaines (**M**), 14 semaines (**N**) et 20 semaines du développement (**O**). L'immunoréactivité est principalement détectée dans les noyaux des cellules épithéliales et mésenchymateuses. Aucun signal n'est observé dans les cellules à mucus.

Barres K et L : 120 μ m ; barres A-J et M-O : 75 μ m.

l'épithélium gastrique (figures 22D-22F). Un pic d'intensité est observé à 15 semaines (figure 22E). Pour des stades ultérieurs, le marquage est essentiellement nucléaire (figure 22F).

Dans l'intestin foetal, l'anticorps anti-PPAR β donne une plus forte immunoréactivité dans l'iléon (figures 22J-22L) que dans le jéjunum (figures 22G-22I) aux différents stades étudiés. Au cours du développement foetal, l'intensité des signaux dans les cellules de l'épithélium jéjunal reste modérée, mais est plus forte dans les cellules iléales.

A 22 semaines de vie *in utero*, l'intensité du signal est plus forte dans les cellules de l'épithélium des cryptes de l'iléon que dans les cellules différenciées des villosités (figure 22L).

L'expression de PPAR β est aussi détectée dans les différentes assises du colon foetal humain de la 8^{ème} (figure 22N) à la 20^{ème} semaine de développement foetal (figure 22O). PPAR β est essentiellement localisé dans les noyaux des cellules épithéliales et mésenchymateuses. Comme pour l'iléon, un fort marquage est observé dans les régions des cryptes. Par contre, il n'est pas détectable à 14 semaines (figure 22N).

c. Expression de PPAR γ

Les différents anticorps utilisés (anti-PPAR γ 1/ γ 2 et anti-PPAR γ 2) en immunocytochimie donnent des résultats similaires tout au long du développement du tractus digestif foetal humain. Par contre, l'immunoréactivité est toujours plus forte avec l'antisérum anti-PPAR γ 2 comparativement à celle obtenue avec l'antisérum anti-PPAR γ 1/ γ 2. C'est pourquoi, seuls les résultats réalisés avec cet antisérum sont présentés ici.

La présence de la protéine PPAR γ 2 est détectée à 7 (figure 23A), 14 (figure 23B) et 20 semaines (figure 23C) dans l'œsophage foetal humain. Au cours du développement embryonnaire de cet organe, l'intensité du signal reste constante. Il est essentiellement présent dans les noyaux des cellules épithéliales et extra-épithéliales.

L'expression de la protéine PPAR γ 2 est plus faible dans l'épithélium gastrique (figures 23D-23F) que dans celui œsophagien. Une légère augmentation du signal est observée à 15 semaines du développement foetal (figure 23E).

Le marquage avec l'antisérum anti-PPAR γ 2 est particulièrement fort dans les noyaux des cellules épithéliales du jéjunum (figures 23G-23I) et de l'iléon (figures 23J-23L). Comme les noyaux sont localisés dans la partie basale des cellules épithéliales, l'immunoréactivité pour PPAR γ 2 montre une distribution le long de la lame basale. L'intensité de la fluorescence apparaît plus forte dans les régions des cryptes comparativement à celle observée au niveau des régions des villosités (figures 23I, 23K et 23L).

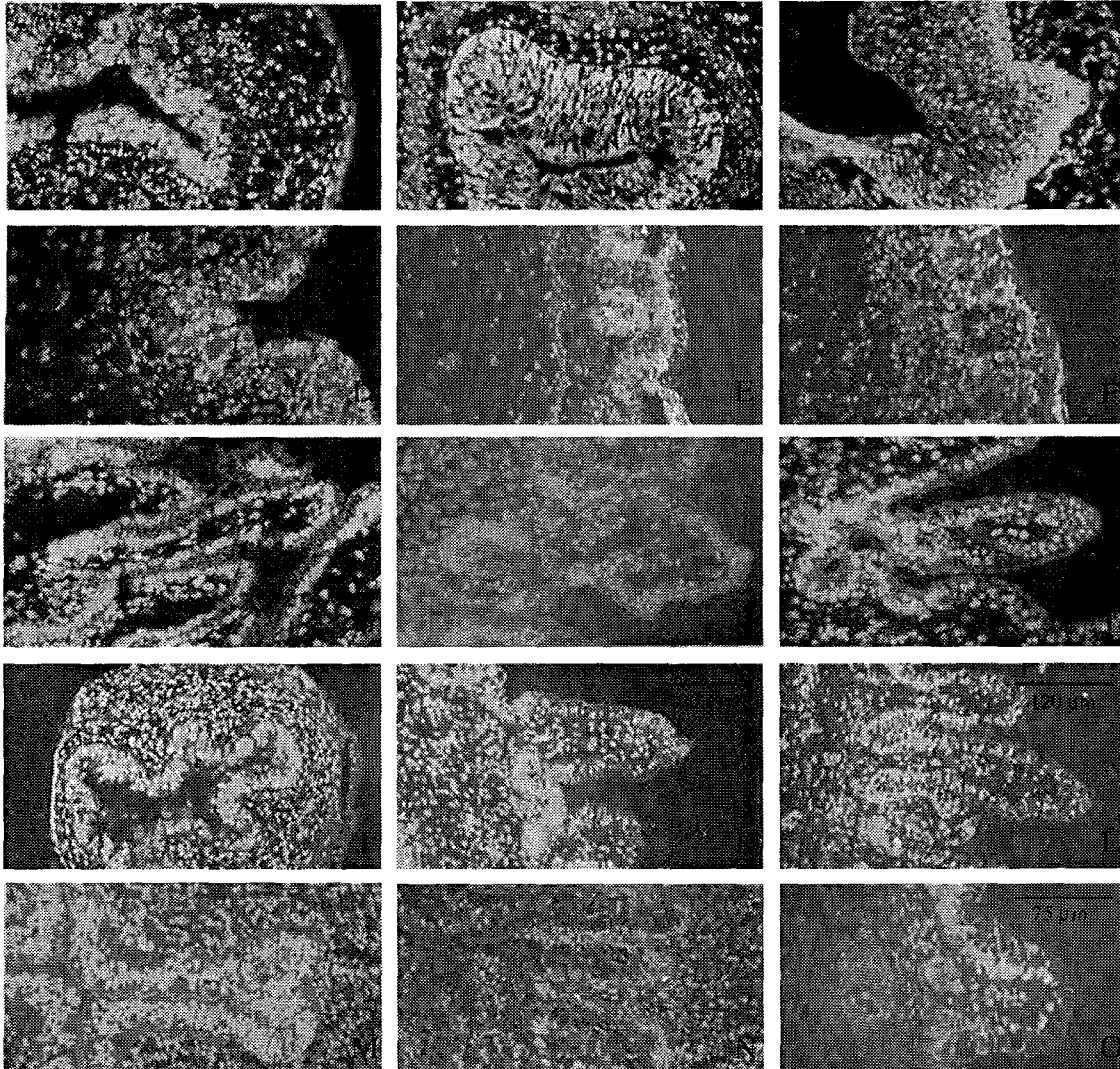


Figure 23 : Etude par immunocytochimie de l'expression de PPAR γ au cours du développement foetal du tractus digestif humain.

A-C : Section de l'oesophage à 7 (**A**), 14 (**B**) et 20 semaines de développement foetal humain (**C**). L'expression de PPAR γ est observée aux divers stades du développement foetal oesophagien. **D-F** : Sections gastriques à 12 (**D**), 15 (**E**) et 19 semaines de développement foetal (**F**) montrant une immunoréactivité dans les noyaux des cellules des glandes de l'estomac en cours de formation. **G-I** : jéjunum (**G**, 7 semaines ; **H**, 12 semaines et **I**, 16 semaines du développement) ; **J-L** iléon (**J**, 12 semaines ; **K**, 16 semaines ; **L**, 22 semaines du développement). **M-O** colon (**M**, 8 semaines ; **N**, 14 semaines ; **O**, 20 semaines de développement foetal). Dans l'intestin grêle et le colon, PPAR γ montre une localisation nucléaire aussi bien dans les cellules mésenchymateuses que dans les cellules épithéliales. Dans l'épithélium, PPAR γ est exprimé dans les différentes régions de l'axe crypto-villositaire. Barres K et L : 120 μ m ; barres A-J et M-O : 75 μ m.

A 8 (figure 23M) et 14 semaines (figure 23U) de vie fœtale, les noyaux des cellules épithéliales du colon et du mésenchyme sont marqués en grande majorité par l'anticorps anti-PPAR γ 2. A 20 semaines, l'immunoréactivité est plus forte au niveau des cellules qui font face à la lumière du colon. Le marquage est essentiellement nucléaire (figure 23O).

Parallèlement nous avons recherché la présence d'ARNm codant la protéine PPAR γ 2 par une technique de protection à la nucléase S1. Ce travail a été réalisé à partir d'extraits d'intestins fœtaux de différents stades du développement embryonnaire (figure 24). Nous avons observé que les transcrits sont présents et que leur taux relatif diminue progressivement de 2 fois entre la 14^e et la 20^e semaine du développement (figure 24).

III. DISCUSSION

Ces résultats montrent pour la première fois l'existence d'expression et d'une distribution spatio-temporelle des différents sous-types de PPAR au cours du développement tractus digestif fœtal humain.

a. Expression des PPAR au niveau du tractus digestif humain

A l'aide des anticorps polyclonaux dirigés contre chaque isotype de PPAR [PPAR α , PPAR β , PPAR γ (γ 1/ γ 2 et γ 2)], les résultats immunocytochimiques obtenus montrent que les différents sous-types de PPAR sont exprimés dès la 7^{ème} semaine du développement du tractus digestif fœtal humain, dans des cellules d'origine endodermique ou mésodermique. La présence des ARNm de PPAR α , de PPAR β et de PPAR γ a déjà été détectée au niveau de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle et du colon chez le rat par une technique d'hybridation *in situ* [25]. Dans une autre étude, la quantification des ARNm réalisée par une technique de protection à la RNase a révélé une forte expression des ARNm de PPAR γ et de PPAR β dans le colon adulte comparativement à l'intestin grêle. Au contraire, l'expression de PPAR α est plus forte dans la muqueuse intestinale [210].

Bien que PPAR γ 1 et PPAR γ 2 soient exprimés dans le tissu adipeux, il a été montré que PPAR γ 2 est préférentiellement exprimé dans les adipocytes, alors que PPAR γ 1 est présent plus spécifiquement dans les tissus extra-adipocytaires.

Cependant, dans deux publications récentes, la présence des deux isoformes de PPAR γ a été retrouvée dans les cellules du colon humain [75] et murin, grâce à la technique de Western blotting utilisant un anticorps dirigé contre PPAR γ 1 et PPAR γ 2 [186]. Nos résultats en immunocytochimie, en Western blotting et en protection à la Nucléase S1 sont en accord avec ces résultats. Une contradiction persiste cependant par rapport aux données présentées par Braissant et Wahli [26], qui détectent la présence d'ARNm de PPAR α , de

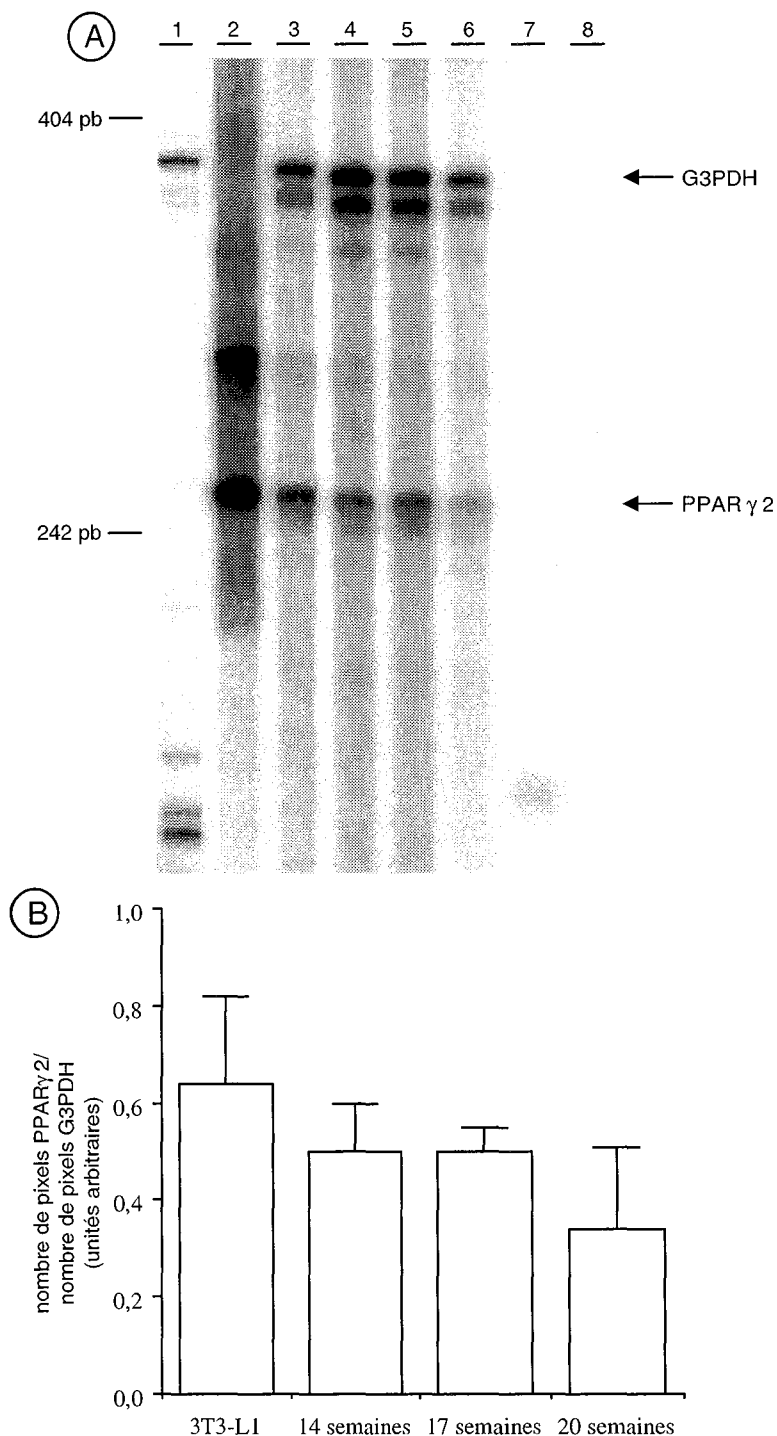


Figure 24 : Analyse par la technique de protection à la nucléase S1 de l'expression de PPAR γ 2 au niveau d'intestins fœtaux humains.

A : Détection de PPAR γ 2 par la technique de protection à la nucléase S1. La sonde G3PDH et celle de PPAR γ 2 sont marquées radioactivement par [α - 32 P] dCTP selon le protocole décrit dans Matériels et Méthodes. 1 μ g d'ARN totaux issus de la lignée cellulaire 3T3-L1 (piste 3), 1 μ g d'ARN totaux issus d'intestins fœtaux humains à 14 semaines (piste 4), 17 semaines (piste 5) et 20 semaines (piste 6) sont hybridés avec les deux sondes radiomarquées. 0,2 μ g d'ARNt sont hybridés avec la sonde G3PDH radiomarquée (piste 7) et 0,2 μ g d'ARNt sont hybridés avec la sonde PPAR γ 2 radiomarquée (piste 8). Après digestion par la nucléase S1, les complexes formés sont analysés par électrophorèse en conditions dénaturantes puis quantifiés. La présence de G3PDH et celle de PPAR γ 2 sont indiquées par les flèches.

B : Quantification du taux des ARNm de PPAR γ 2 dans les intestins fœtaux humains à 14, 17 et 20 semaines. Le rapport (nombre de pixels PPAR γ 2/ nombre de pixels G3PDH) est exprimé en unité arbitraire.

PPAR β mais pas de PPAR γ dans l'intestin foetal humain. Ces discordances sont probablement dues aux différents modèles animaux utilisés ou aux techniques utilisées ou encore l'âge des foetus.

b. Expression spatio-temporelle des PPAR

Les PPAR sont exprimés à différents stades dans les cellules d'origine mésodermique et endodermique au cours du développement foetal du tractus digestif humain.

A des stades précoces (7 à 15 semaines de vie *in utero*) du développement de l'œsophage et de l'estomac, PPAR α et PPAR β sont plutôt localisés dans le cytoplasme que dans le noyau, par contre à des stades tardifs du développement foetal, leur expression devient essentiellement nucléaire.

Ce profil d'expression coïncide avec les transformations de l'œsophage marquées par le remplacement d'un épithélium cilié par un épithélium adulte squameux montrant des cellules aplaties dont la membrane apicale présente des microvillosités [151].

Pour l'estomac, la distribution des PPAR coïncide avec l'acquisition d'une morphologie adulte caractérisée par la différenciation des cellules gastriques apparaissant à la base des puits [286], suivie par la différenciation des cellules entérochromaffines et des cellules à mucus [64].

PPAR α est impliqué dans le métabolisme et dans l'homéostasie lipidiques [299]. Cependant, l'absence d'expression de PPAR α chez les souris knockout PPAR α -/- prévient l'inductibilité par les proliférateurs de peroxyosomes des gènes codant les enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique au sein des peroxyosomes et des microsomes [185]. L'expression précoce de PPAR α au niveau de l'œsophage et de l'estomac suggère l'implication de ce sous-type dans la mise en place du métabolisme lipidique de l'épithélium.

La diminution d'expression de PPAR β dans l'épithélium de l'œsophage est certainement due à un changement physiologique du tissu. Par contre, PPAR β pourrait avoir un rôle potentiel dans la différenciation des cellules gastriques, puisque chez le rat Braissant et Wahli [26] ont montré l'existence d'une corrélation entre le pic d'expression de PPAR β et l'état de différenciation des cellules.

Nos résultats indiquent que PPAR γ présente une localisation nucléaire tout au long du développement œsophagien et gastrique. Ce sous-type est fortement exprimé durant la morphogenèse de l'œsophage, suggérant un rôle de PPAR γ dans ce processus. D'autre part, PPAR γ est plus faiblement exprimé durant la formation de l'estomac.

Au niveau de l'intestin, quel que soit le stade foetal étudié, les différents sous-types de PPAR sont plus exprimés dans l'iléon que dans le colon ou dans le duodénum. Cette expression spatio-temporelle des PPAR (PPAR α , β et γ) au cours du développement intestinal foetal humain et la spécificité de leurs ligands [313] suggèrent que ces récepteurs seraient impliqués dans différentes fonctions intestinales. Les ligands de PPAR α induisent l'expression des gènes impliqués dans le transport et l'absorption des lipides au niveau de l'intestin grêle du rat [213, 227]. Le rôle physiologique de PPAR β dans l'intestin grêle et dans le colon reste inconnu. Les ligands de PPAR γ inhibent la prolifération cellulaire et induisent la différenciation des cellules coliques tumorales chez l'homme [22, 290]. Par contre, les mêmes ligands de PPAR γ assurent le développement des polypes dans le colon et la formation des tumeurs chez la souris^{Min/+} [186, 284]. D'après nos résultats, PPAR γ est exprimé le long de l'axe crypto-villositaire, aussi bien dans les cellules en cours de différenciation que dans celles en prolifération. Enfin, nous confirmons que l'isoforme PPAR γ 2 est exprimée tout au long du développement du tractus digestif humain.

En résumé, la distribution spatio-temporelle des différents sous-types de PPAR a été décrite durant le développement foetal du tractus digestif humain. Les différents PPAR sont exprimés de façon prépondérante dans les cellules épithéliales, bien que leur présence soit aussi détectée dans les noyaux des cellules d'origine mésodermique. Les trois sous-types de PPAR montrent un patron d'expression différent en relation avec la morphogenèse du tractus digestif. Ils sont exprimés très tôt, ce qui suggère que ces récepteurs jouent un rôle dans le développement et/ou dans la physiologie du tractus digestif. De plus, le fait que PPAR γ soit exprimé à des taux élevés quelle que soit la région étudiée (excepté l'estomac) et quel que soit le stade étudié, indique que ce récepteur exerce un rôle essentiel dans le tractus digestif humain.

EXPRESSION DES PPAR AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES Caco-2

I. ANALYSE DE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE DES CELLULES Caco-2

Nous avons étudié les taux traductionnels et transcriptionnels des PPAR dans la lignée cellulaire Caco-2 à 5, 10 et 15 jours de culture. L'état de différenciation des cellules Caco-2 est analysé grâce à des marqueurs moléculaires de différenciation comme la saccharase/isomaltase et la phosphatase alcaline (2 enzymes de la bordure en brosse), l'acyl-CoA oxydase (AOX) et la catalase (2 enzymes peroxysomales).

Les activités spécifiques de la saccharase/isomaltase et de la phosphatase alcaline augmentent durant la culture cellulaire (tableau 7). L'augmentation est de 2,3 et de 5,7 fois pour l'une et l'autre enzymes, respectivement, à 15 jours de culture comparativement aux valeurs de départ obtenues à 5 jours de culture.

Les activités spécifiques de l'acyl-CoA oxydase et de la catalase augmentent de 1,7 et de 3 fois respectivement, entre 5 et 10 jours de culture. Les activités spécifiques de ces deux enzymes peroxysomales restent par la suite constantes entre 10 et 15 jours de culture. Les taux protéiques de la villine (marqueur moléculaire du développement de la bordure en brosse), de l'acyl-CoA oxydase (AOX), de l'enzyme peroxysomale bifonctionnelle (PBE), de la catalase et de la protéine membranaire peroxysomale de 70 kDa (PMP 70) ont été déterminés par la technique de Western blotting avec des anticorps polyclonaux spécifiques (figures 25 et 26). Une bande unique de 90 kDa correspondant à la villine a été détectée avec les homogénats cellulaires. Son intensité augmente de 2,3 fois entre 5 et 15 jours de culture (figure 25). Trois bandes de 65,6, de 56 et de 42 kDa sont mises en évidence par l'anticorps anti-AOX. L'intensité de la bande correspondant à la sous-unité de 56 kDa augmente progressivement jusqu'à 3,3 fois au cours des 15 jours de culture (figure 26A). L'anticorps anti-PBE révèle la présence d'une bande unique de 70 kDa (figure 26B). Son intensité augmente de 2 fois au cours de la culture. Une bande de 60 kDa est détectée par l'anticorps anti-catalase ; elle correspond à un monomère de l'enzyme. Au cours de la culture, l'intensité de cette bande augmente de 3 fois (figure 26C). Une augmentation plus faible est observée à 10 jours pour le taux protéique de PMP70 (figure 26D). Cependant, cette augmentation n'est pas significative.

Enzymes	Activités spécifiques		
	5 jours	10 jours	15 jours
Saccharase/isomaltase	65,1 ± 3,9	80,7 ± 5,5	155,2 ± 10,1
Phosphatase alcaline	0,95 ± 0,1	35,2 ± 4,1	55 ± 4,5
Acyl coA oxydase	0,74 ± 0,04	1,10 ± 0,1	1,11 ± 0,05
Catalase	12,3 ± 0,2	34,6 ± 0,5	35,6 ± 0,6

Tableau 7 : Mesure des activités spécifiques des enzymes saccharase /isomaltase, phosphatase alcaline, acyl coA oxydase et catalase des cellules Caco-2.

Les activités spécifiques de chaque enzyme sont exprimées en mU/mg de protéines. Les valeurs correspondent à une moyenne ± écart-type à partir de trois expériences indépendantes. ANOVA et plusieurs tests comparatifs révèlent l'existence d'une différence significative pour les activités spécifiques de chaque enzyme mesurées entre 5 et 15 jours de culture

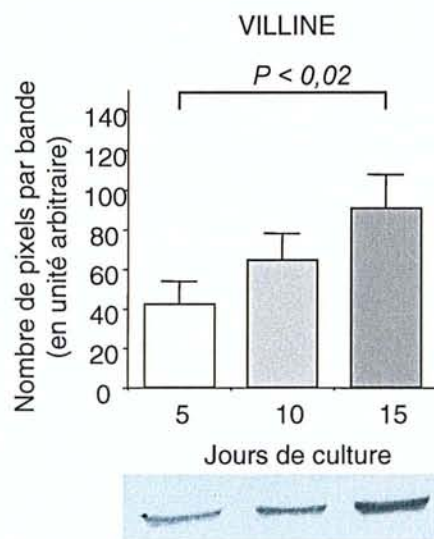


Figure 25 : Immunoréplique de la villine durant la différenciation des cellules Caco-2.

La préparation des homogénats est décrite dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les homogénats sont analysés par immunoréplique en utilisant un antiserum dirigé contre la villine. Les histogrammes correspondent à trois expériences indépendantes. Les résultats analysés par densitométrie sont exprimés en nombre de pixels par bande \pm écart-type. Le test ANOVA et plusieurs tests comparatifs révèlent l'existence d'une différence significative du taux protéique de la villine ($P < 0,02$) entre 5 et 15 jours de culture.

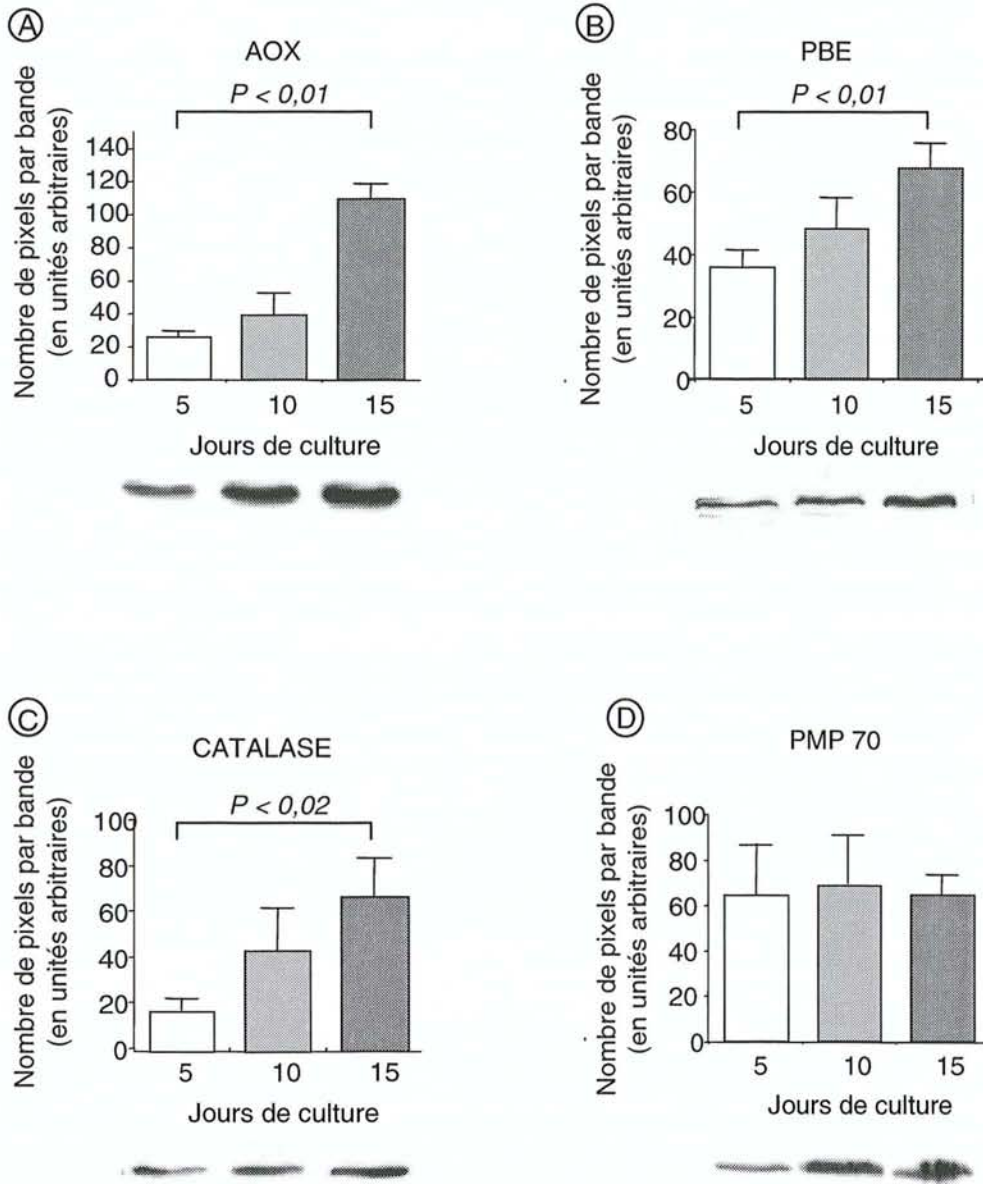


Figure 26 : Etude par immunoréplique de l'expression des protéines peroxysomales durant la différenciation des cellules Caco-2.

La préparation des homogénats est décrite dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les homogénats sont analysés par immunoréplique en utilisant un antiserum dirigé contre AOX (A), PBE(B), catalase (C) et PMP70 (D). Les histogrammes correspondent à trois expériences indépendantes. Les résultats analysés par densitométrie sont exprimés en nombre de pixels par bande \pm écart-type. Le test ANOVA et plusieurs tests comparatifs montrent l'existence d'une différence significative du taux protéique pour AOX, PBE ($P < 0,01$), et catalase ($P < 0,02$) entre 5 et 15 jours de culture.

Dans le but d'expliquer comment ces modifications biochimiques sont en relation avec des altérations structurales des cellules Caco-2 en culture, nous avons étudié la présence de la catalase dans les peroxysomes par immunocytochimie ultrastructurale (figure 27). Aucune réaction positive n'est détectée dans les cellules Caco-2 à 5 jours de culture. Un marquage apparaît faiblement au sein de peroxysomes peu nombreux à 10 jours de culture. La fréquence de ces organites augmente entre 10 et 15 jours de culture. Les peroxysomes présentent différents profils : ronds, ovales ou allongés.

II. ANALYSE TRADUCTIONNELLE DES PPAR AU COURS DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES Caco-2

a. Choix des techniques

Nous avons étudié les taux protéiques des PPAR dans les cellules Caco-2 à 5, 10 et 15 jours de culture par immunoréplique grâce aux anticorps polyclonaux préparés au Laboratoire et dirigés spécifiquement contre les différentes isoformes PPAR α , PPAR γ et PPAR γ 2. La localisation des PPAR au cours de la différenciation spontanée des cellules Caco-2 cultivées pendant 5, 10 et 15 jours est également étudiée par immunocytochimie grâce à ces anticorps polyclonaux anti-PPAR α et anti-PPAR γ préparés au Laboratoire et anti-PPAR γ provenant du commerce (AB Reagent). Le montage utilisé pour mettre en évidence *in situ* les PPAR fait appel au complexe streptavidine-biotine (figure 17C). Nous avons utilisé un anticorps secondaire biotinylé dirigé contre l'anticorps primaire puis un complexe streptavidine couplé à la peroxydase. La révélation se fait grâce à une solution commerciale (Novared, BioValley).

b. Résultats

Expression de PPAR α dans les cellules Caco-2

Par immunoréplique, une bande majoritaire de 52 kDa correspondant à PPAR α est révélée à partir des homogénats cellulaires. Son intensité augmente de 1,9 fois entre 5 et 15 jours de culture (figure 28A).

Par immunocytochimie, quelques noyaux des cellules Caco-2 sont marqués lorsque l'anticorps anti-PPAR α préparé au Laboratoire est utilisé (figure 29A-C et tableau 8). Une immunoréactivité est aussi observée dans le cytoplasme. L'intensité du signal augmente à 10 jours, mais elle est plus prononcée à 15 jours de culture. A ce stade, le signal devient majoritairement nucléaire, même si quelques signaux persistent dans le cytoplasme. Aucun signal n'est observé lorsque l'anticorps primaire est remplacé par le sérum préimmun. De

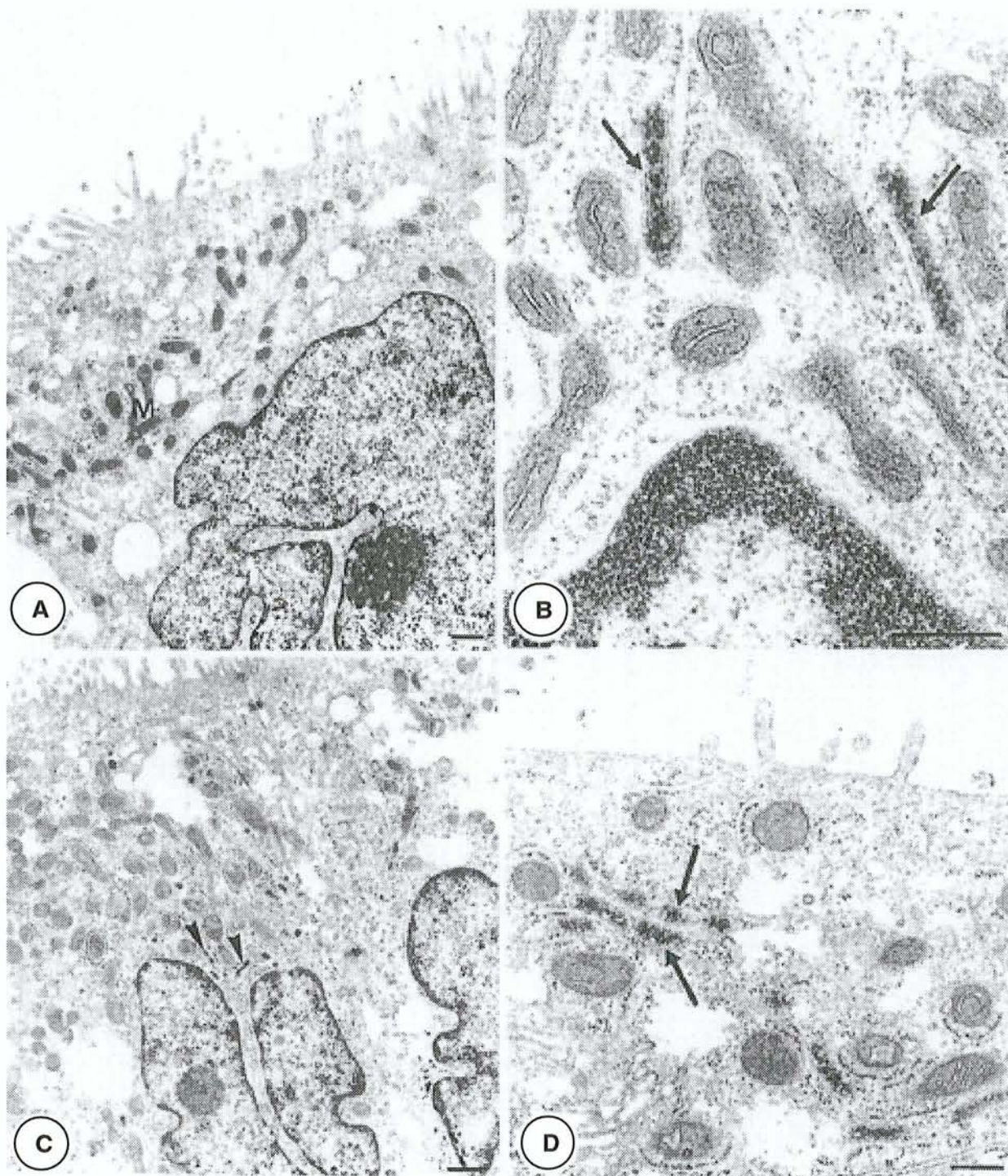


Figure 27 : Mise en évidence de l'activité catalasique peroxysomale dans les cellules Caco-2.

A : Monocouche de cellules Caco-2 à 10 jours de culture. Les noyaux sont plurilobulaires et les microvillosités sont présentes à l'apex des cellules.

B : Mise en évidence des structures DAB-positives dans les cellules Caco-2 à 10 jours de culture. Les peroxysomes sont localisés près des mitochondries.

C et D : Présence plus abondante de structures DAB-positives dans les cellules Caco-2 à 15 jours de culture.

Les flèches indiquent la présence des peroxysomes.

M : mitochondrie ; barre 1 μm (a et c) et 0,5 μm (b et d).

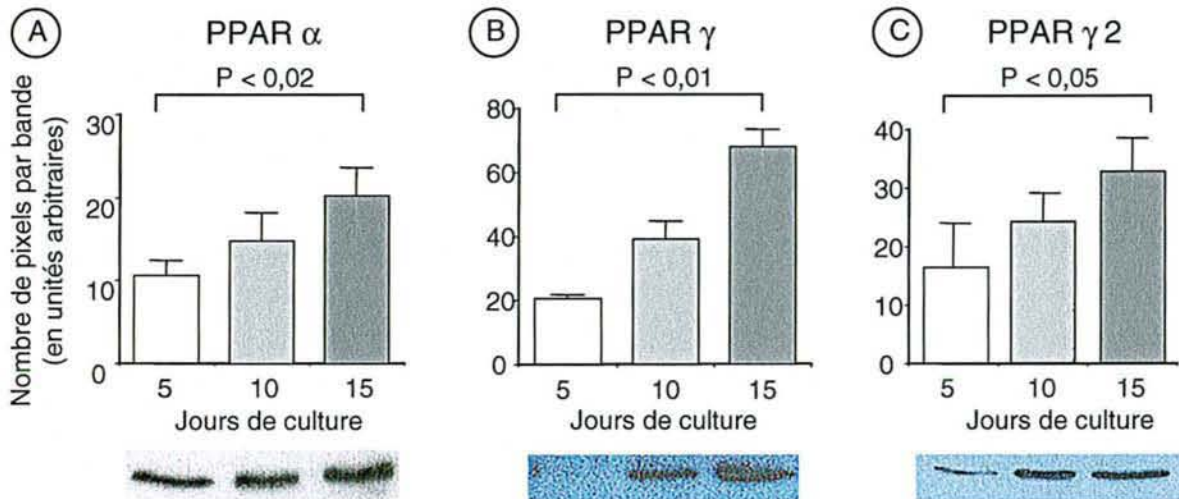


Figure 28 : Etude par immunoréplique de l'expression des PPAR α et γ durant la différenciation des cellules Caco-2.

La préparation des homogénats est décrite dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les homogénats sont analysés par immunoréplique en utilisant des antisera dirigés contre PPAR α (A), PPAR γ (B) et PPAR $\gamma 2$ (C). Les histogrammes correspondent à trois expériences indépendantes. Les résultats analysés par densitométrie sont exprimés en nombre de pixels par bande \pm écart-type. Le test ANOVA et plusieurs tests comparatifs montrent une différence significative du taux protéique pour PPAR α ($P < 0,02$), γ ($P < 0,01$) et $\gamma 2$ ($P < 0,05$) entre 5 et 15 jours de culture.

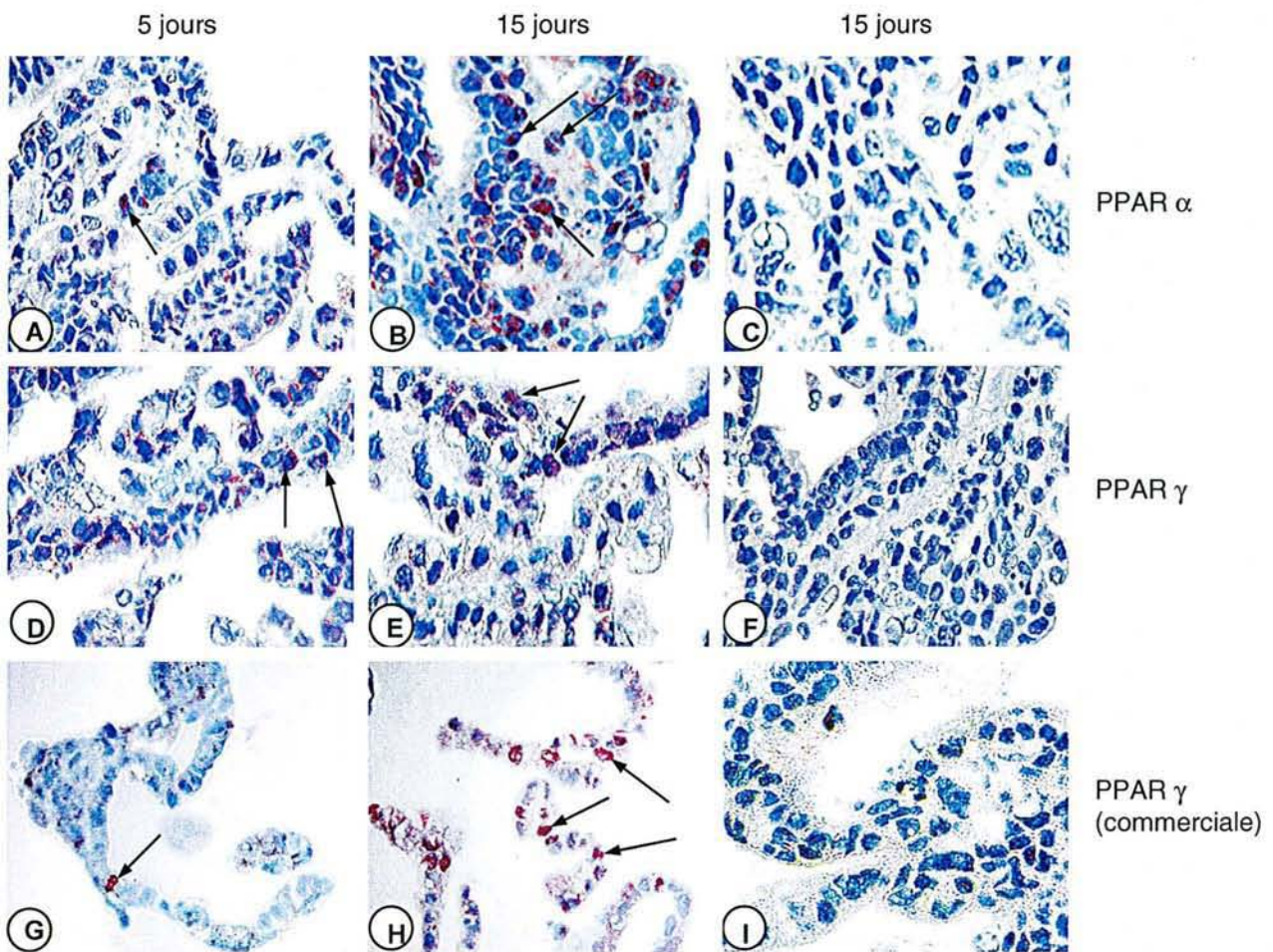


Figure 29 : Etude immunocytochimique de l'expression des PPAR α et γ durant la différenciation des cellules Caco-2.

La technique d'immunocytochimie est décrite dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les coupes sont analysées par immunocytochimie en utilisant des antisera dirigés contre PPAR α (A-C), PPAR γ (D-F) produits au laboratoire et un antiserum commercial dirigé contre PPAR γ (G-I). Aucun signal n'est obtenu sur les coupes témoins correspondant aux cellules Caco-2 à 15 jours de culture (C,F,I). Un signal nucléaire est observé à 5 jours de culture (A,D,G) quel que soit l'antiserum utilisé. Ce signal s'intensifie à 15 jours de culture. L'immunoréactivité est plus prononcée pour PPAR α que pour PPAR γ (comparaison de « B » par rapport à « E » et « H »).

Grandissement : x20

	cellules Caco-2			
	5 jours de culture		15 jours de culture	
	noyau	cytoplasme	noyau	cytoplasme
PPAR α (KLH)	\pm	+	++	-
PPAR γ (KLH)	\pm	+	++	-
PPAR γ2 (KLH)	\pm	+	++	\pm

	cellules HT29			
	5 jours de culture		15 jours de culture	
	noyau	cytoplasme	noyau	cytoplasme
PPAR α (ABR)	-	+	++	-
PPAR β (ABR)	-	+	++	-
PPAR γ (ABR)	-	+	++	-

Tableau 8 : Localisation et intensité de l'expression des PPAR en immunohistochimie sur les cellules Caco-2 et HT29.

L'immunohistochimie sur les cellules Caco-2 à 5 et 15 jours de culture est réalisée à l'aide des anticorps anti-PPAR α , anti-PPAR γ et anti-PPAR γ 2 (KLH) préparés au Laboratoire. La localisation du signal est cytoplasmique à 5 jours de culture et devient majoritairement nucléaire à 15 jours de culture quel que soit l'anticorps utilisé.

L'immunohistochimie sur les cellules HT29 à 5 et 15 jours de culture est réalisée à l'aide des anticorps anti-PPAR α , anti-PPAR β et anti-PPAR γ issus de source commerciale (ABR). La localisation du signal est cytoplasmique à 5 jours de culture et devient majoritairement nucléaire à 15 jours de culture quel que soit l'anticorps utilisé. L'intensité du signal augmente au cours de la culture.

- : signal absent ; \pm : signal faible ; + : signal modéré ; ++ : signal fort

même, lorsque l'anticorps primaire est remplacé par le complexe peptide-KLH ayant servi à l'immunisation, l'intensité du signal est diminuée de 50%. L'utilisation de l'anticorps anti-PPAR α du commerce confirme ces résultats puisqu'une immunoréactivité est observée dans les noyaux des cellules Caco-2. Avec cet anticorps, l'intensité du signal augmente aussi entre 5 et 15 jours de culture.

Expression de PPAR γ et de PPAR γ 2 dans les cellules Caco-2

L'anticorps polyclonal anti-PPAR γ dirigé contre la séquence peptidique commune à PPAR γ 1 et à PPAR γ 2 et utilisé en immunoréplique révèle une large bande de 50 kDa correspondant aux deux isotopes de PPAR γ (figure 28B). L'augmentation de l'intensité de cette bande est de 3,3 fois entre 5 et 15 jours de culture. De plus, nous avons utilisé un anticorps polyclonal dirigé contre la séquence peptidique localisée dans la région NH2 terminale de PPAR γ 2 spécifique à cette isoforme (figure 28C). Une bande est détectée à 50 kDa et son intensité augmente de 2 fois entre le début et la fin de la culture.

En immunocytochimie, des résultats similaires à ceux observés pour PPAR α sont obtenus en utilisant non seulement l'antisérum PPAR γ préparé au Laboratoire (reconnaissant à la fois PPAR γ 1 et γ 2) mais aussi l'antisérum PPAR γ commercial (AB Reagent). A 5 jours de culture, les signaux sont faibles et majoritairement cytoplasmiques (figures 29D, G et tableau 8). L'immunoréactivité augmente à 10 jours. A 15 jours de culture, les signaux sont plus prononcés et deviennent nucléaires (figures 29 E-H et tableau 8). Enfin, aucun signal n'est observé avec les lames témoins pour lesquelles l'anticorps primaire est absent (figures 29C, F, I et tableau 8)

III. ANALYSE DES ARNm DES PPAR AU COURS DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES CACO-2

a. Choix des techniques

Etude par Northern blotting et par la technique de protection à la nucléase S1

L'expression des ARNm des PPAR dans les cellules Caco-2 à 5, 10 et 15 jours de culture a été étudiée par Northern blotting et par la technique de protection à la nucléase S1 selon le protocole décrit par Sambrook et *al.* [287]. Pour ces deux techniques, nous avons utilisé des sondes différentes marquées au [α -³²P]dCTP. Ces deux techniques ont l'avantage de permettre la quantification de façon directe du taux des ARNm.

Etude par RT-PCR

Le taux des ARNm des PPAR des cellules Caco-2 à 5, 10 et 15 jours de culture a également été quantifié par une technique de RT-PCR de type compétitif, semi-quantitatif et semi-niché. La technique de RT PCR compétitive que nous avons utilisée a été décrite par Kihri et *al.* [163].

La technique de RT-PCR nécessite une excellente extraction des ARN qui peut-être vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose (figure 30). Cette technique a également été optimisée en terme de concentration de $MgCl_2$ pour chaque couple d'amorces, mais aussi en ce qui concerne le nombre de cycles. La figure 31 montre la cinétique d'amplification pour chaque PPAR des cellules Caco-2 à 5 et 15 jours de culture ainsi que la cinétique d'amplification des compétiteurs de chaque gène étudié (ARN totaux extraits d'intestin de rat et d'adipocytes de souris). Le nombre de cycles est défini lorsque le signal d'amplification est exponentiel.

Les fragments amplifiés sont digérés par plusieurs enzymes de restriction dans le but de vérifier l'absence de concatémères au cours de l'amplification par RT-PCR (figure 32). C'est la raison pour laquelle le produit d'amplification est digéré par une enzyme de restriction possédant un site unique pour chaque espèce. Par exemple, le produit d'amplification de COX-1 est coupé par *EcoRI* uniquement chez l'humain et *Apal* coupe uniquement le fragment de rat. La double digestion par *EcoRI* et *Apal* d'un produit de co-amplification montre une digestion totale. Ce résultat prouve l'absence de concatémères formés au cours de l'utilisation de la technique de RT-PCR.

Un résultat typique d'une expérience de RT-PCR compétitive à partir des ARNm extraits des cellules Caco-2 à 5 jours de culture est présenté dans la figure 33. La figure 34 montre le résultat d'amplification pour la β -caténine et le témoin G3PDH pour les cellules Caco-2 à 5, 10 et 15 jours de culture ainsi que les produits de digestion obtenus avec les enzymes de restriction de chaque amplification. Chaque produit d'amplification est déposé sur gel d'agarose en triple exemplaires. Dans cet exemple, les ARNm de la β -caténine augmente de 3 fois au cours de la culture.

b. Résultats obtenus

Mesure du taux des ARNm de PPAR α dans les cellules Caco-2

Les ARN totaux et les ARN polyA⁺ extraits et purifiés respectivement à partir des cellules Caco-2 récupérées à 5, 10 et 15 jours de culture ont permis d'étudier les taux des

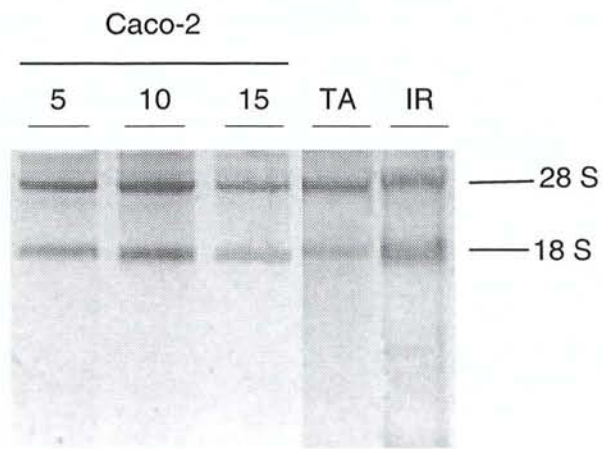


Figure 30 : Vérification sur gel d'agarose de la qualité des ARN totaux extraits.

1 μ g d'ARN totaux extraits à partir des cellules Caco-2 à 5, 10 et 15 jours de culture est déposé sur un gel d'agarose à 2%. La présence des bandes 28S et 18S correspondants aux ARN ribosomiques indique que l'extraction est de bonne qualité.

TA : tissu adipeux de souris ; IR : intestin de rat

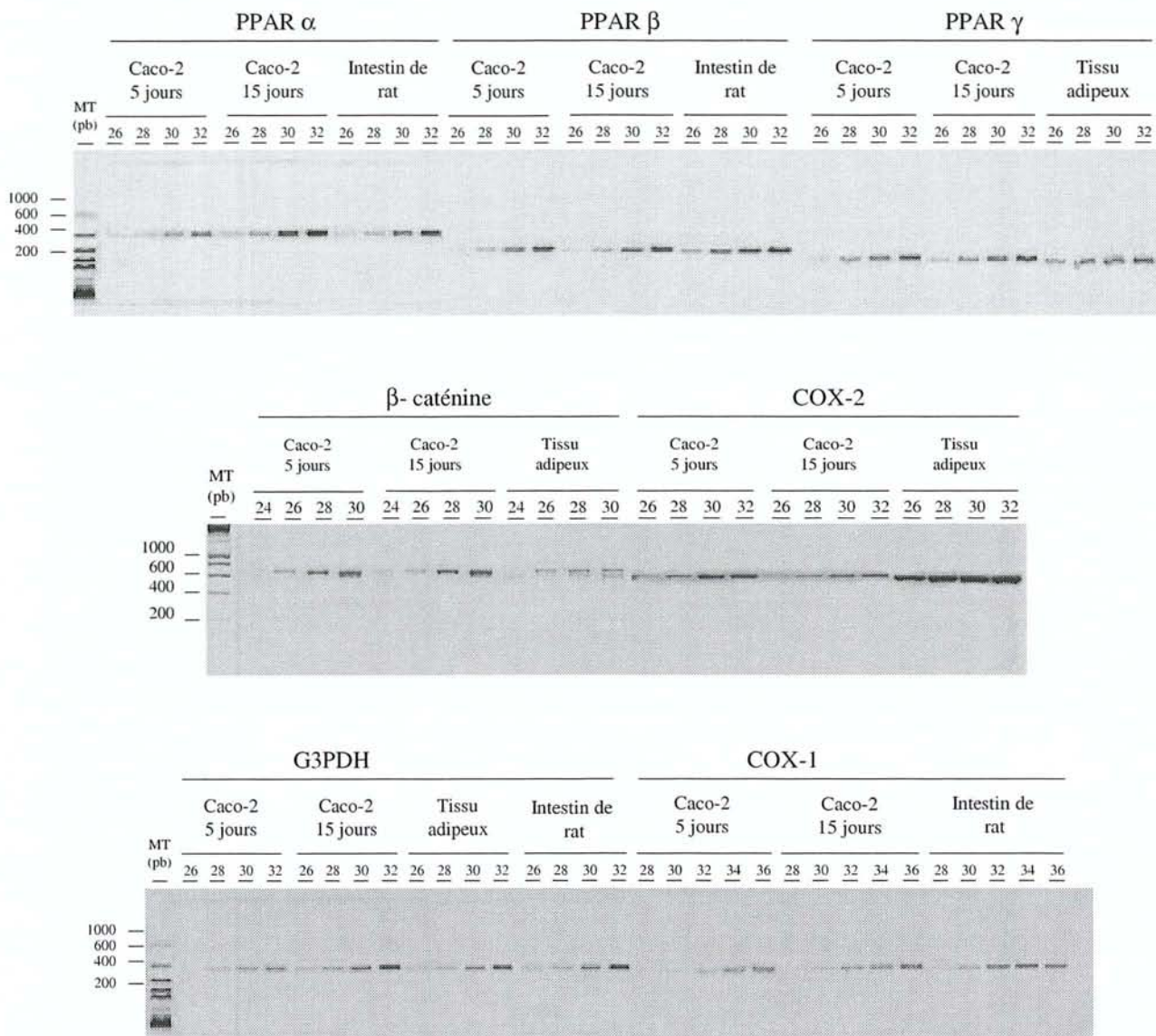


Figure 31 : Cinétique d'amplification de PPAR α , PPAR β , PPAR γ et des marqueurs COX-1, COX-2, β -caténine et G3PDH à partir des ARN extraits des cellules Caco-2 à 5 et 15 jours de culture ou de tissu adipeux de souris ou d'intestin de rat.

10 μ l du produit d'amplification sont prélevés au terme de l'amplification par PCR (de 26 à 36 cycles selon le gène étudié) et sont déposés sur gel d'agarose pour électrophorèse. L'augmentation de l'intensité du signal est vérifiée par mesure au Gel Doc.

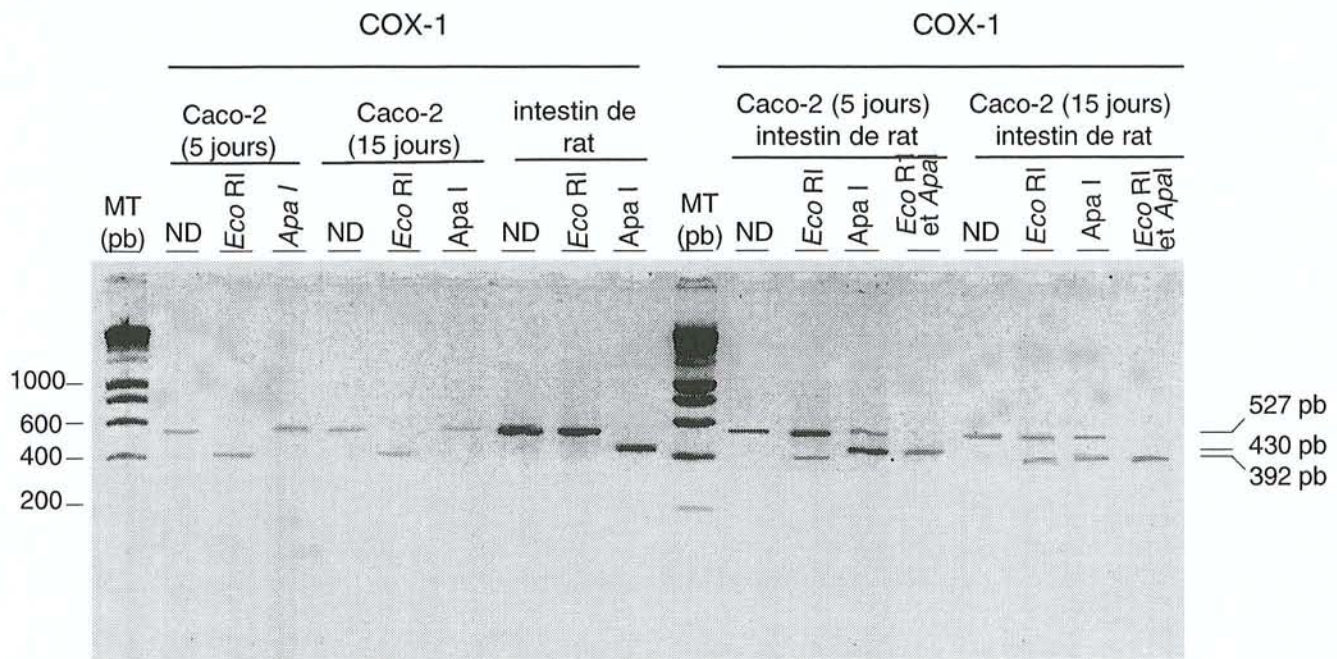


Figure 32 : Vérification de la non formation de concatémères après amplification par RT-PCR.

L 'amplification de COX-1 produit un fragment de 527 pb. Ce produit est digéré par l 'enzyme de restriction *EcoRI* uniquement chez l'humain, et par *ApaI* uniquement chez le rat. La taille de chaque bande d 'amplification ou de digestion est indiquée.

ND : fragment non digéré ; MT : marqueurs de taille en paires de bases (pb)

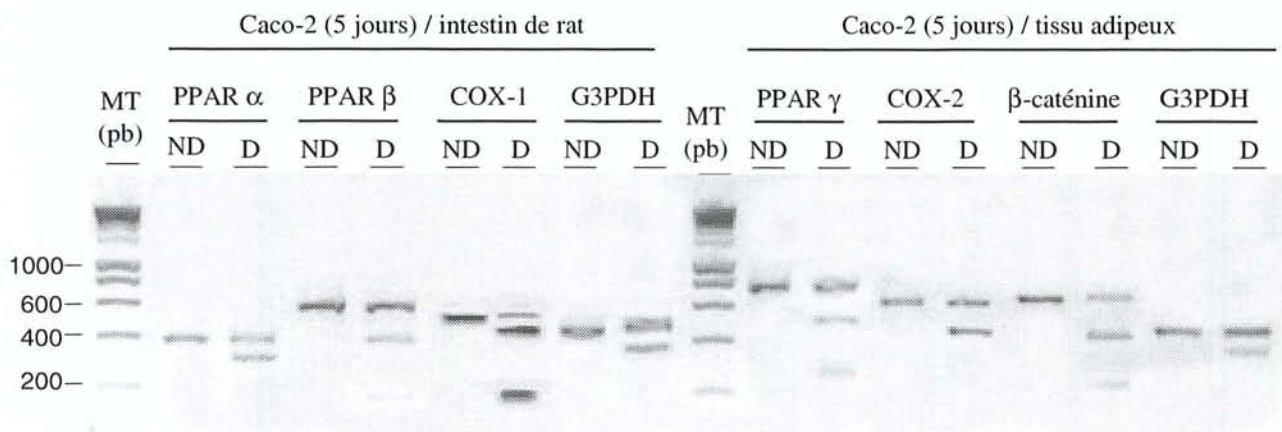


Figure 33 : Quantification des ARNm des différents PPAR, de COX-1, de COX-2, β -caténine et de G3PDH par RT-PCR compétitive

Cette analyse a été réalisée sur des ARN extraits de cellules Caco-2 cultivées pendant 5 jours. Les ARN compétiteurs ont été extraits à partir de muqueuses intestinales de rat et de tissus adipeux de souris. Après amplification et digestion par une enzyme de restriction spécifique, les fragments d'ADN sont déposés sur un gel d'agarose. Les bandes obtenues sont quantifiées à l'aide d'un appareil Gel-Doc.

ND : fragment non digéré ; D fragment digéré ; MT : marqueurs de taille en paires de bases (pb)

Les enzymes de restriction choisies sont résumés dans le tableau 4.

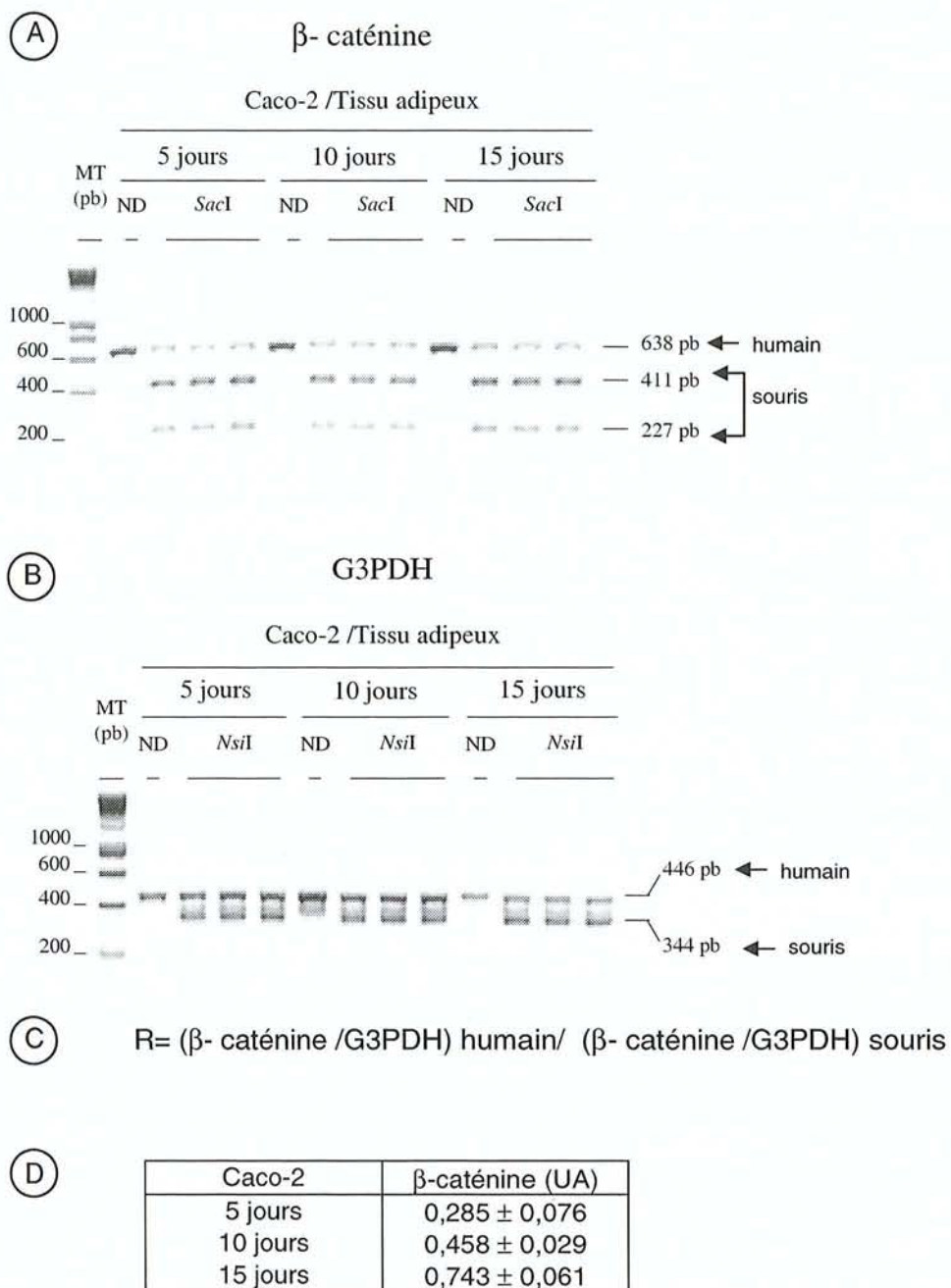


Figure 34 : Quantification des ARNm de β -caténine et de G3PDH par RT-PCR compétitive réalisée sur des ARN extraits de cellules Caco-2 cultivées pendant 5, 10 et 15 jours.

Les ARN compétiteurs ont été extraits à partir du tissu adipeux de souris. Les produits d'amplification et de digestion (A et B) sont déposés sur gel d'agarose en triple exemplaires. La nature des enzymes de restriction et la taille de chaque fragment sont précisées dans la partie « Matériels et Méthodes ». Le tableau (D) montre une augmentation significative du taux des ARNm de la β -caténine au cours de la culture. Le rapport utilisé est défini en (C).

ND : fragment non digéré ; D : fragment digéré ; MT : marqueurs de taille (en paires de bases : pb)

ARNm des PPAR α par Northern blotting (figure 35). Les sondes ADNc utilisées dans cette technique sont issues des séquences décrites dans la littérature [303]. Trois transcrits de 1,8, 5,8 et 10 kb ont été mis en évidence pour PPAR α , en accord avec les résultats déjà publiés [99, 317].

L'analyse par densitométrie du signal à 1,8 kb révèle une élévation de 1,5 fois du taux des ARNm de PPAR α après 10 jours de culture comparativement à la valeur témoin obtenue à 5 jours de culture. Une légère diminution du taux des ARNm est observée après 15 jours de culture lorsque la quantification est appréciée à partir des ARN polyadénylés. Par protection à la nucléase S1, la séquence ADNc sélectionnée pour produire la sonde PPAR α protège un seul transcrit de 255 paires de bases (pb) (figures 36A et 37). La quantification d'ARNm réalisée par cette technique confirme les résultats obtenus par Northern blotting : le taux des ARNm de PPAR α reste globalement constant.

Par RT-PCR compétitive, le taux des ARNm correspondant à PPAR α augmente progressivement au cours de la culture (figure 38B et tableau 9). Entre 5 et 15 jours de culture, le signal obtenu augmente de 2,3 fois par rapport à la valeur témoin obtenue à 5 jours de culture. Par RT-PCR semi-quantitative, les résultats obtenus sont différents de ceux observés par les techniques précédentes (tableau 9). Le taux des ARNm de PPAR α décroît faiblement entre 5 et 10 jours de culture puis est constant entre 10 et 15 jours de culture.

Mesure du taux des ARNm de PPAR β dans les cellules Caco-2

L'expression transcriptionnelle de PPAR β a été étudiée par RT-PCR compétitive et semi-quantitative à partir des ARN totaux extraits des cellules Caco-2 à 5, 10 et 15 jours de culture. Les résultats obtenus sont contradictoires (tableau 9).

Par RT-PCR compétitive, le taux des ARNm de PPAR β augmente de 4 fois jusqu'à 6 fois entre 5 et 10 jours de culture. Par RT-PCR semi-quantitative, le taux des ARNm de PPAR β présente un pic d'expression à 10 jours puis devient faible lorsque les cellules sont différenciées (tableau 9).

Mesure du taux des ARNm de PPAR γ dans les cellules Caco-2

● PPAR γ

Par Northern blotting les ARN totaux et les ARN polyadénylés issus des cellules Caco-2 à 5, 10 et 15 jours de culture ont permis d'étudier le taux des ARNm codant PPAR γ . La sonde ADNc utilisée dans cette technique est issue des séquences de Fajas et *al.* [83] et de Elbrecht et *al.* [80]. Cette sonde ADNc est sélectionnée dans la partie A/B du récepteur

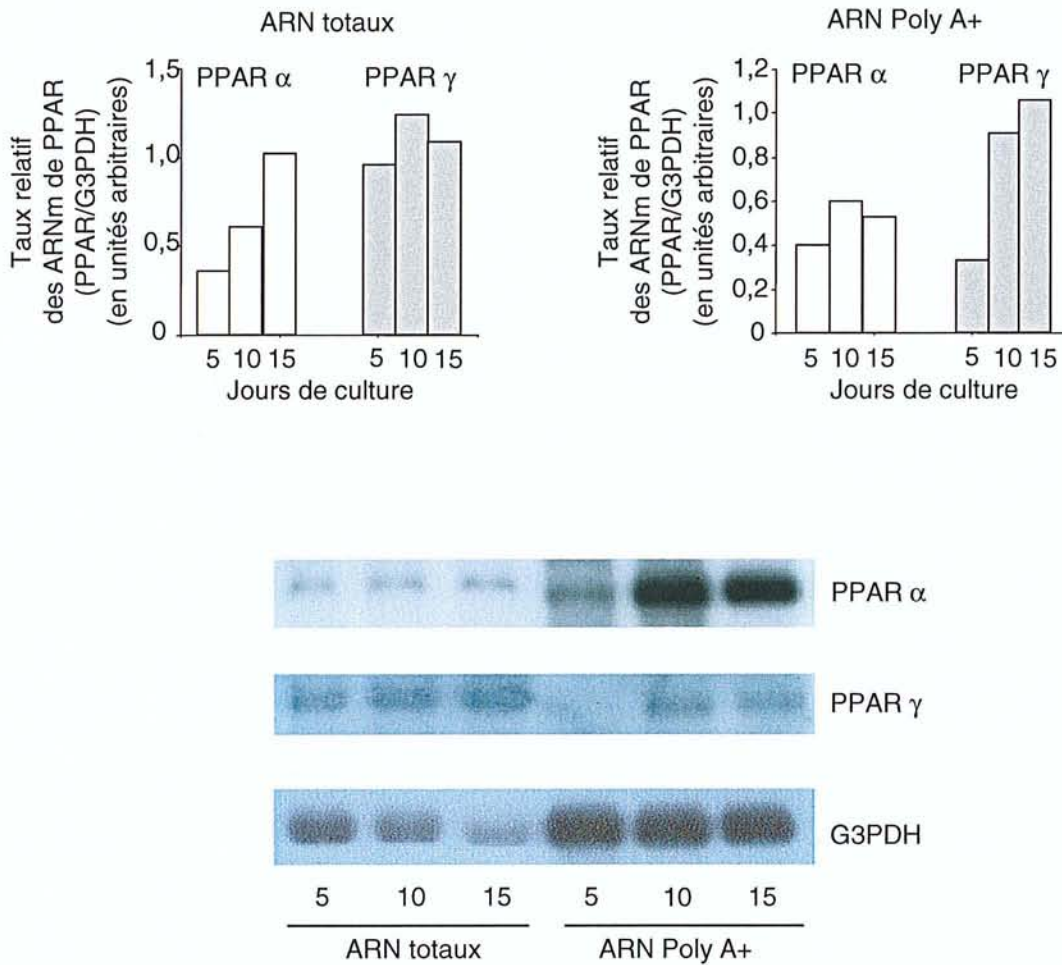


Figure 35 : Analyse par Northern blotting du taux des ARNm de PPAR α et de PPAR γ .

Des extraits d'ARN totaux et d'ARN polyadénylés (poly A⁺) issus des cellules Caco-2 à 5, 10 et 15 jours de culture sont analysés par Northern blotting. Les membranes sont hybridées avec une sonde ADNc de PPAR α , déshybridées et à nouveau hybridées avec successivement une sonde ADNc de PPAR γ et de G3PDH. Les bandes PPAR α et PPAR γ sont scannées et les valeurs des intensités de chaque bande sont analysées par rapport à l'intensité de la bande de G3PDH (témoin interne des expériences). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires.

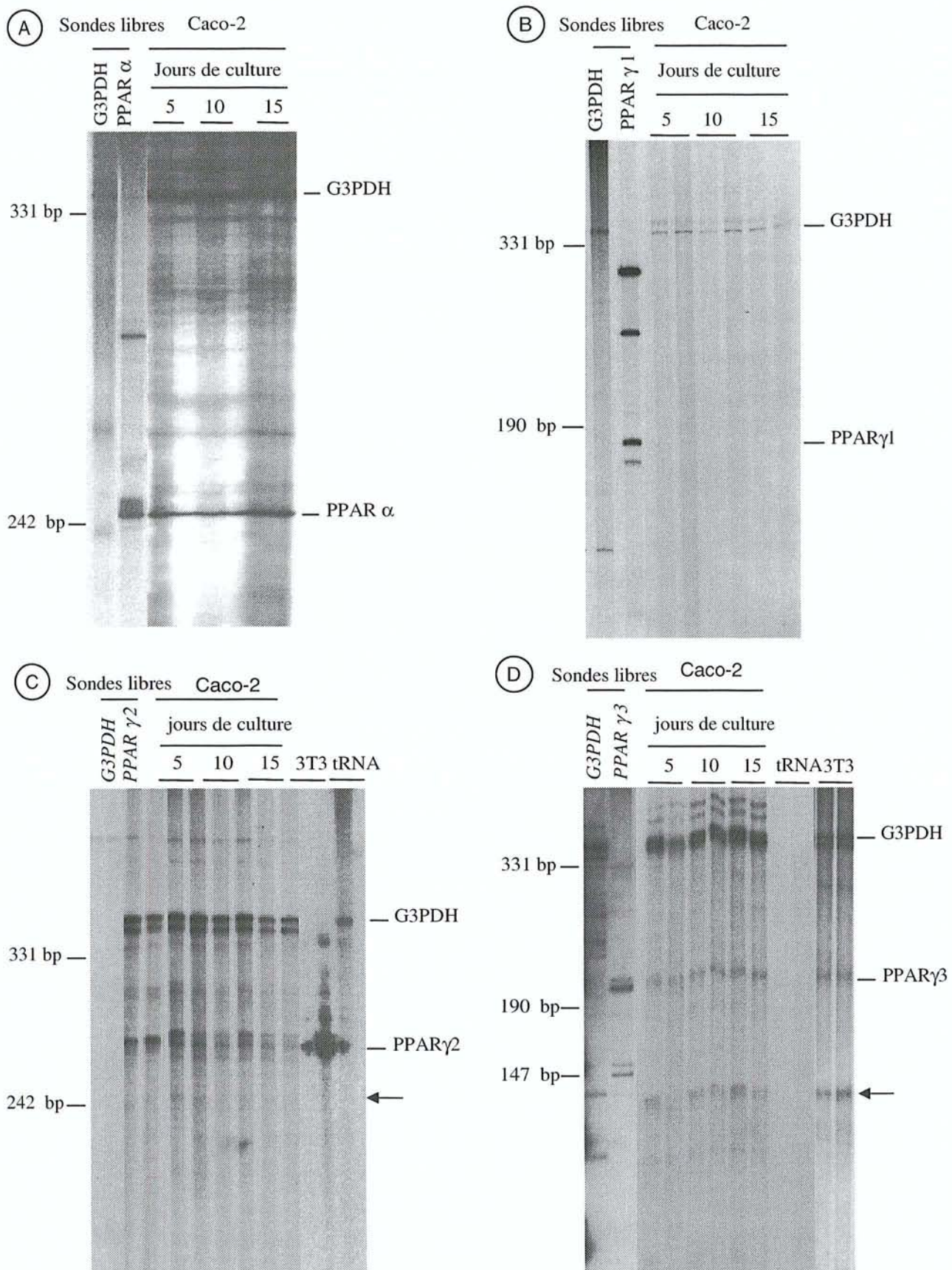


Figure 36 : Protection à la nucléase S1. Détection des ARNm de PPAR α (A), de PPAR γ 1 (B), de PPAR γ 2 (C) et de PPAR γ 3 (D) extraits des cellules Caco-2 à 5, 10 et 15 jours de culture.

Les ARN totaux des cellules Caco-2 sont hybridés avec leurs sondes respectives et avec la sonde G3PDH selon le protocole décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les fragments protégés sont indiqués. Les contrôles positifs et négatifs sont réalisés à partir des ARN extraits des cellules préadipocytaires 3T3-I1. Les flèches présentes en C et D indiquent les fragments d'ARN non épissés.

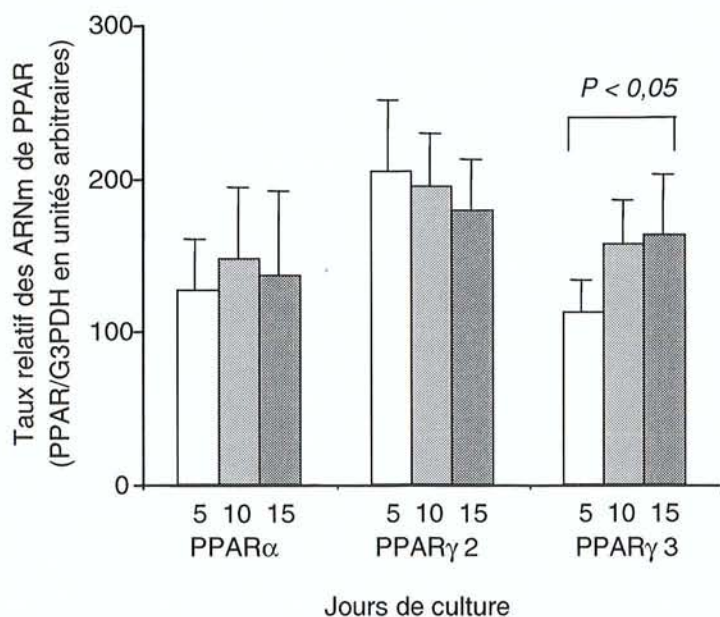


Figure 37 : Quantification par la technique de protection à la nucléase S1 des ARNm de PPAR α , de PPAR γ 2 et de PPAR γ 3 extraits des cellules Caco-2 à 5, 10 et 15 jours de culture. Le taux relatif des ARNm de chaque PPAR correspond à la moyenne \pm écart-type du rapport des valeurs du PPAR sur les valeurs de G3PDH à partir de trois expériences indépendantes. Le test ANOVA et plusieurs tests comparatifs montrent une différence significative du taux des ARNm pour PPAR γ 3 ($P < 0,05$) entre 5 et 15 jours de culture.

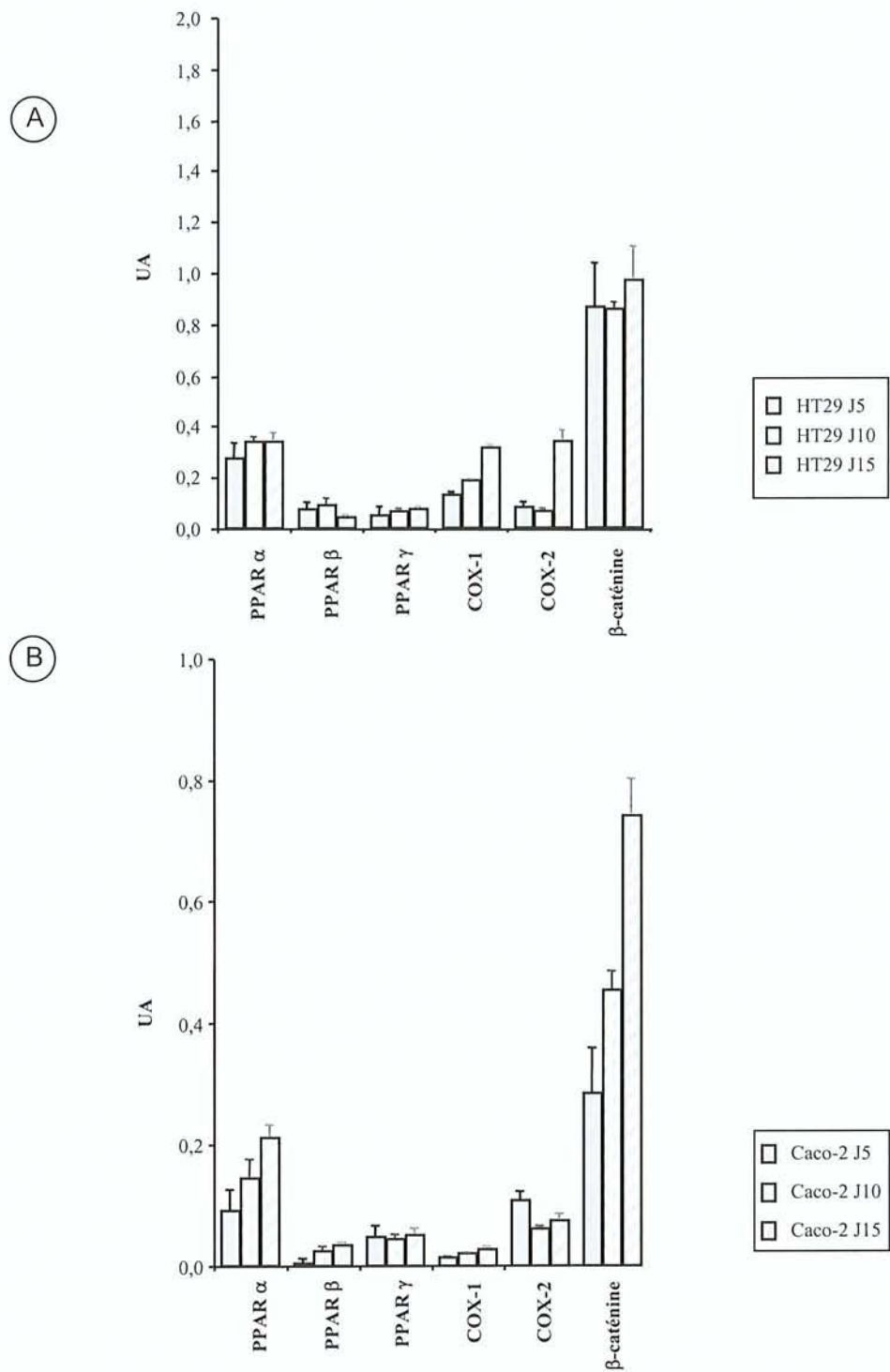


Figure 38 : Quantification des ARNm des PPAR, de COX-1, de COX-2 et de β -caténine par RT-PCR compétitive aux différents stades de la culture des cellules HT 29 (A) et Caco-2 (B).

Les cellules ont été cultivées pendant 5, 10 et 15 jours. 1 μ g des ARN de cellules humaines (HT29 ou Caco-2) et 1 μ g des ARN compétiteurs sont utilisés pour quantifier le taux des ARNm codant les différentes protéines par RT-PCR compétitive selon le protocole décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ».

RT-PCR Compétitive	Caco-2 (jours de culture)		
	5 jours	10 jours	15 jours
PPAR α	0,093 \pm 0,035	0,145 \pm 0,032	0,214 \pm 0,019
PPAR β	0,006 \pm 0,007	0,027 \pm 0,005	0,038 \pm 0,003
PPAR γ	0,049 \pm 0,019	0,048 \pm 0,005	0,052 \pm 0,011
COX-1	0,017 \pm 0,001	0,023 \pm 0,001	0,031 \pm 0,004
COX-2	0,111 \pm 0,012	0,064 \pm 0,002	0,076 \pm 0,012
β -caténine	0,285 \pm 0,076	0,458 \pm 0,029	0,673 \pm 0,061

RT-PCR Semi-quantitative	Caco-2 (jours de culture)		
	5 jours	10 jours	15 jours
PPAR α	0,210 \pm 0,070	0,150 \pm 0,020	0,140 \pm 0,010
PPAR β	0,100 \pm 0,040	0,130 \pm 0,040	0,006 \pm 0,020
PPAR γ	0,370 \pm 0,080	0,360 \pm 0,070	0,310 \pm 0,040
COX-1	0,583 \pm 0,028	0,719 \pm 0,045	0,412 \pm 0,020
COX-2	0,198 \pm 0,023	0,280 \pm 0,014	0,610 \pm 0,175
β -caténine	0,551 \pm 0,074	0,244 \pm 0,028	0,983 \pm 0,229

Tableau 9 : Quantification des ARNm des PPAR α , PPAR β et PPAR γ , de COX-1, de COX-2 et de β -caténine par RT-PCR compétitive et RT-PCR semi-quantitative au niveau des cellules Caco-2 à 5, 10 et 15 jours de culture.

de PPAR γ et reconnaît les différents isotopes de PPAR γ . Un signal unique de 2,1 kb est trouvé avec les ARN polyadénylés (figure 35). A 10 jours de culture, le taux des ARN augmente de 2,8 fois par rapport au taux observé à 5 jours de culture. Cependant, cette augmentation n'est pas significative (figure 35).

Les amorces sélectionnées pour les techniques de RT-PCR compétitive et semi-quantitative se situent au niveau des exons E3 et E5, d'après la séquence décrite par Elbrecht et *al.* [80]. Le fragment obtenu après amplification présente une taille de 759 pb. Il est commun aux différentes isoformes de PPAR γ . L'expression des ARNm de PPAR γ mesurée par RT-PCR compétitive et semi-quantitative reste constante durant toute la durée de la culture (tableau 9).

- PPAR γ 1

La sonde ADNc spécifique de PPAR γ 1 est utilisée pour la technique de protection à la nucléase S1. Trois transcrits de PPAR γ 1 dont les tailles sont respectivement de 131, 92 et 39 pb, s'hybrident avec les sondes ADNc spécifiques de PPAR γ 1 (figure 36B). Le fragment de 131 pb correspond à l'ARNm mature de PPAR γ 1 alors que les fragments de 92 et 39 pb correspondent à l'ARNm non mature de PPAR γ 1. Le taux des ARNm de PPAR γ 1 est trop faible ou inexistant puisque aucun signal n'est observé par cette méthode. L'expression de PPAR γ 1 est étudiée par RT-PCR semi-nichée en utilisant le couple d'amorces sélectionnées d'après la séquence ADNc décrite par Fajas et *al.* [83]. L'étude du taux d'ARNm réalisée par cette technique confirme les résultats obtenus par protection à la nucléase S1 car aucune amplification n'est observée pour PPAR γ 1. Ces résultats tendent à conclure que l'isotype PPAR γ 1 n'est pas exprimé dans les cellules Caco-2.

- PPAR γ 2

Les taux des ARNm de PPAR γ 2 ont été analysés par la technique de protection à la nucléase S1 et par RT-PCR semi-nichée, à partir des ARN totaux extraits des cellules Caco-2 à 5, 10 et 15 jours de culture.

Par la technique de protection à la nucléase S1, trois transcrits de PPAR γ 2 dont les tailles sont de 282, 243 et 39 pb s'hybrident avec les sondes ADNc spécifiques de PPAR γ 2 (figure 36C). Le fragment de 282 pb correspond à l'ARNm mature de PPAR γ 2 alors que les fragments de 243 et de 39 pb correspondent à l'ARNm non mature de PPAR γ 2. Seul le fragment de 243 pb est observable puisque le fragment de 39 pb est élué du gel lors de la

migration électrophorétique. La quantification du taux des ARNm de PPAR γ 2 a été effectuée sur le fragment de 282 pb. La diminution observée entre 5 et 15 jours de culture n'est pas significative (figure 37).

Par RT-PCR semi-nichée, l'amplification de PPAR γ 2 produit un fragment unique de 282 pb. Nous observons un pic d'expression à 10 jours (tableau 10). Cependant, le taux des transcrits diminue, mais reste élevé à 15 jours. L'intensité du signal pour PPAR γ 2 augmente de 2 fois entre 5 et 15 jours de culture.

- PPAR γ 3

Les taux des ARNm de PPAR γ 3 sont analysés par la technique de protection à la nucléase S1 et par RT-PCR semi-nichée à partir des ARN totaux extraits des cellules Caco-2 à 5, 10 et 15 jours de culture.

Par la technique de protection à la nucléase S1, la sonde ADNc spécifique de PPAR γ 3 reconnaît 3 transcrits de 222, 146 et 76 pb (figure 36C). Le transcrit mature a une taille de 222 pb et correspond à l'exon A2 et à une partie de l'exon E1. Les transcrits de 146 et 76 pb correspondent aux transcrits non matures de PPAR γ 3. Seul le fragment de 146 pb est observable, le fragment de 76 pb étant élué du gel durant la migration électrophorétique. Le taux des ARNm de PPAR γ 3 augmente significativement de 2 fois entre 5 et 15 jours de culture (figure 37). La mesure est réalisée sur le fragment mature de 222 pb.

Par RT-PCR semi-nichée, l'amplification de PPAR γ 3 produit un fragment unique de 222 pb. L'augmentation du signal ne semble pas être significative (tableau 10).

V. DISCUSSION

a. La différenciation des cellules Caco-2 est accompagnée d'altérations peroxysomiques.

Comme nous l'avons dit précédemment, la lignée cellulaire Caco-2 se différencie spontanément en entérocytes au cours de la culture [258]. Les cellules sont indifférenciées au début de la culture, puis entrent dans une phase exponentielle de croissance et après confluence, elles se différencient en entérocytes. Cette différenciation est complète après 20 jours de culture [258, 281]. Dans la phase tardive de la culture, les cellules forment une monocouche et présentent une bordure en brosse typique. Les protéines impliquées dans le développement de la bordure en brosse lors de la différenciation des cellules Caco-2 ont été identifiées [275, 281, 389], mais aucune étude n'a été consacrée aux relations entre cette différenciation cellulaire et le comportement des peroxysomes. Les résultats montrent que

RT-PCR semi-nichée	Caco-2 (jours de culture)		
	5 jours	10 jours	15 jours
PPAR γ 2	0,159 \pm 0,048	0,638 \pm 0,157	0,321 \pm 0,077
PPAR γ 3	0,371 \pm 0,099	0,055 \pm 0,031	0,470 \pm 0,086

RT-PCR semi-nichée	HT29 (jours de culture)		
	5 jours	10 jours	15 jours
PPAR γ 2	0,346 \pm 0,183	0,390 \pm 0,021	0,160 \pm 0,032
PPAR γ 3	1,213 \pm 0,035	0,613 \pm 0,044	0,470 \pm 0,042

Tableau 10 : Quantification des ARNm de PPAR γ 2 et de PPAR γ 3 par RT-PCR semi-nichée au niveau des cellules Caco-2 et HT 29 à 5, 10 et 15 jours de culture.

l'activité enzymatique de AOX et celle de la catalase sont présentes dès 5 jours de culture même si les structures DAB-positives ne sont pas détectables à ce stade de culture. Ces résultats sont en accord avec les travaux précédents montrant que les peroxysomes sont absents dans les cellules issues de carcinomes coliques en dépit de la présence de AOX et de la catalase [32, 180]. La différenciation des cellules Caco-2 est accompagnée par une augmentation du nombre des peroxysomes et de l'activité de leurs enzymes. Ces modifications métaboliques ressemblent aux changements observés le long de l'axe cryptovillositaire de l'intestin grêle [32]. De plus, la différenciation des peroxysomes dans les cellules Caco-2 est similaire à celle rencontrée dans les entérocytes humains entre 16 semaines de gestation [61] et l'âge adulte [278].

b. L'expression de PPAR α augmente au cours de la différenciation des cellules Caco-2

Dans cette étude, le taux des ARNm de PPAR α est étudié par Northern blotting, par protection à la nucléase S1 et par RT-PCR compétitive. Nous avons utilisé plusieurs techniques de quantification des ARNm dans le but de confirmer les résultats obtenus par une seule des techniques citées précédemment. Les études par Northern blotting et par protection à la nucléase S1 sont des techniques dites directes. Les sondes radioactives piègent les ARNm à étudier. Seulement, ces deux techniques nécessitent l'utilisation de radioéléments avec les risques que cela représente pour le manipulateur. Les techniques de RT-PCR sont des techniques de quantification non directes. Cependant, la RT-PCR de type compétitive permet de quantifier le taux des ARNm par rapport à deux témoins internes : le compétiteur et la G3PDH (enzyme étant exprimée d'une façon constitutive).

Le taux des ARNm de PPAR α et celui de la protéine correspondante augmentent entre 5 et 10 jours de culture, stade précoce de la différenciation cellulaire. La quantité de la protéine PPAR α augmente régulièrement bien que le taux des ARNm codant cet isotype reste constant à 15 jours de culture. Les résultats obtenus par immunocytochimie indiquent au début de la culture la présence de PPAR α au niveau nucléaire mais également cytoplasmique, de type granulaire et en très faible quantité. L'intensité des signaux augmente avec le processus de différenciation de ces cellules et devient majoritairement cytoplasmique.

Parallèlement, nous avons étudié le taux des ARNm et celui de la protéine de PPAR α dans les cellules HT29 entre 5 et 15 jours de culture. Ces cellules restent indifférenciées. Les résultats obtenus au niveau des cellules HT29 sont similaires à ceux obtenus pour les cellules Caco-2. Au cours de la culture, le taux des ARNm codant PPAR α et celui de la

protéine correspondante augmentent faiblement entre 5 et 15 jours (figure 38 et tableau 11). Par immunohistochimie, PPAR α présente une localisation plutôt cytoplasmique à 5 jours et devient essentiellement nucléaire à 15 jours (résultats non présentés).

Nos résultats sont concordants avec ceux montrant que la différenciation des cellules HepG2 provenant d'un hépatoblastome humain implique une augmentation de l'expression de PPAR α [318]. Le développement des peroxyosomes durant la différenciation des cellules Caco-2 suggère une participation de PPAR α . Il est fortement exprimé dans les carcinomes coliques humains caractérisés par leur pauvreté en peroxyosomes [180]. De plus, les tissus issus de souris pour lesquelles le gène PPAR α est invalidé présentent quelques peroxyosomes, suggérant que PPAR α n'est pas le seul acteur de la formation et de la biogenèse de ces organites [104, 185]. Nous avons constaté que le taux protéique et que l'activité de certaines enzymes peroxyosomales augmentent durant la différenciation des cellules Caco-2. Puisque les gènes codant les enzymes peroxyosomales sont pour la plupart contrôlés par PPAR α [354, 381], il est possible que ce facteur de transcription participe activement au processus de maturation des peroxyosomes dans les cellules Caco-2.

c. Variations du taux d'ARNm codant PPAR β et les autres marqueurs étudiés

De manière globale, nous observons au cours de la culture des cellules HT29 et Caco-2 des variations du taux d'ARNm codant PPAR β et les autres marqueurs étudiés. A titre d'exemples, nous avons observé un accroissement de l'expression de β -caténine au cours de processus de différenciation des cellules Caco-2 alors que le taux d'ARNm reste constant au cours de la culture des cellules HT29 ; des résultats similaires ont été obtenus précédemment [187]. Nous avons également observé que le taux d'ARNm codant pour COX-1 croît au cours de la culture des cellules HT29 et Caco-2. Cependant, les niveaux transcriptionnels mesurés au niveau des cellules HT29 sont plus élevés qu'au niveau des cellules Caco-2.

d. Expression différentielle de PPAR γ au cours de la différenciation cellulaire des cellules Caco-2

La transcription du gène humain PPAR γ donne trois transcrits différents ; PPAR γ 1 et γ 2 issus d'un épissage alternatif à partir d'un même promoteur, et PPAR γ 3 issu d'un autre promoteur [84].

RT-PCR compétitive	HT29 (jours de culture)		
	5 jours	10 jours	15 jours
PPAR α	0,280 \pm 0,058	0,345 \pm 0,016	0,350 \pm 0,032
PPAR β	0,078 \pm 0,023	0,095 \pm 0,022	0,047 \pm 0,013
PPAR γ	0,056 \pm 0,029	0,069 \pm 0,010	0,084 \pm 0,003
COX-1	0,138 \pm 0,005	0,191 \pm 0,005	0,325 \pm 0,005
COX-2	0,091 \pm 0,015	0,075 \pm 0,005	0,346 \pm 0,045
β -caténine	0,872 \pm 0,168	0,861 \pm 0,029	0,976 \pm 0,126

RT-PCR semi-quantitative	HT29 (jours de culture)		
	5 jours	10 jours	15 jours
PPAR α	0,123 \pm 0,053	0,207 \pm 0,006	0,170 \pm 0,036
PPAR β	0,044 \pm 0,027	0,061 \pm 0,024	0,058 \pm 0,029
PPAR γ	0,454 \pm 0,236	0,064 \pm 0,001	0,066 \pm 0,014
COX-1	0,769 \pm 0,040	0,502 \pm 0,031	0,637 \pm 0,085
COX-2	0,303 \pm 0,057	0,410 \pm 0,013	0,713 \pm 0,223
β -caténine	0,185 \pm 0,073	0,473 \pm 0,040	0,514 \pm 0,250

Tableau 11 : Quantification des ARNm de PPAR α , de PPAR β , de PPAR γ , de COX-1, de COX-2 et de β -caténine par RT-PCR compétitive et RT-PCR semi-quantitative dans les cellules HT 29 à 5, 10 et 15 jours de culture.

Variations du taux transcriptionnel des PPAR γ

Durant la différenciation des cellules Caco-2 et selon les techniques utilisées (RT-PCR compétitive, RT-PCR semi-quantitative et Northern blotting) aucun changement significatif est n'observé concernant le taux transcriptionnel de PPAR γ . Les variations du taux transcriptionnel de PPAR γ s'observent lorsque les isoformes sont étudiées séparément.

Par protection à la nucléase S1, et grâce à une sonde spécifique de chaque isoforme de PPAR γ , nous avons détecté uniquement la présence de PPAR γ 2 et de PPAR γ 3 dans les cellules Caco-2. Ces résultats sont également confirmés par RT-PCR semi-nichée où seuls les ARNm PPAR γ 2 et γ 3 sont détectés dans les cellules Caco-2. Dans ces cellules, l'expression de l'ARNm PPAR γ 1 est absente. L'expression de PPAR γ étudiée dans les cellules HT29 entre 5 et 15 jours de culture donne des résultats identiques par rapport aux cellules Caco-2. La présence d'ARNm de PPAR γ 1 n'est pas détecté, seuls les ARNm de PPAR γ 2 et de PPAR γ 3 sont détectables entre 5 et 15 jours de culture (tableau 10). Ce résultat concernant PPAR γ 1 est en désaccord avec les travaux antérieurs de Fajas et *al.* [84]. Cette différence peut-être due à la nature et à la spécificité de la sonde utilisée.

Nous avons montré d'autre part que les cellules Caco-2 exprimaient les ARNm PPAR γ 2 et γ 3 et que seul l'ARNm PPAR γ 3 présentait un accroissement de son taux au cours de la culture des cellules Caco-2. Des résultats similaires concernant l'ARNm PPAR γ 3 avaient été obtenus par d'autres équipes [84, 187]. Au contraire, l'expression globale de PPAR γ diminue faiblement dans les cellules HT29 (tableau 10). Cette diminution est également observée pour les ARNm PPAR γ 2 et PPAR γ 3 étudiés par RT-PCR semi-nichée (tableau 10). Cependant, cette diminution ne semble pas significative.

Variations du taux des protéines de PPAR γ

Pendant la différenciation des cellules Caco-2, aucune modification significative s'observe dans le taux d'ARNm PPAR γ 2. Par contre, les tests réalisés en immunocytochimie et en immunoréplique montrent que le taux de la protéine augmente significativement au cours de la différenciation lorsque l'anticorps polyclonal dirigé spécifiquement contre la protéine humaine de PPAR γ 2 est utilisé. D'autre part, une augmentation significative du taux des ARNm PPAR γ 3 a été observée entre 5 et 15 jours de culture des cellules Caco-2. Or, il a été démontré que la protéine PPAR γ 1 est traduite par les ARNm de PPAR γ 1 et PPAR γ 3 [83, 84]. En utilisant un anticorps polyclonal reconnaissant aussi bien les protéines PPAR γ 1 et PPAR γ 2, nos résultats en immunohistochimie et en immunoréplique ont révélé une augmentation progressive de PPAR γ durant la différenciation des cellules Caco-2.

La protéine PPAR γ 1, contribuent en partie à cette augmentation pour les raisons suivantes :

- l'intensité des bandes observées après Western blotting avec un anticorps anti-PPAR γ augmente progressivement durant toute la culture cellulaire alors que le taux de la protéine PPAR γ 2 reste constant après 10 jours de culture.
- le taux des ARNm PPAR γ 3 qui produisent la protéine PPAR γ 1, augmente d'une façon croissante durant la culture cellulaire.

D'après les résultats obtenus en immunohistochimie, nous observons un marquage cytoplasmique pour PPAR γ lorsque les cellules sont à 5 jours de culture que ce soit pour les cellules Caco-2 comme pour les cellules HT29 (figures 29 et 39). En effet, pour les cellules HT29, pour lesquelles les tests immunohistochimiques sont réalisés selon le même principe, PPAR γ est essentiellement cytoplasmique à 5 jours (figure 39C) et devient exclusivement nucléaire lorsque les cellules sont étudiées à 15 jours de culture (figure 39D)

Le marquage cytoplasmique des cellules Caco-2 est d'autre part granulaire et pourrait correspondre à un marquage de type mitochondrial. La présence de PPAR γ a déjà été démontrée dans les mitochondries de cellules hépatiques de rats traités par les fibrates [36]. Le rôle de PPAR γ dans les mitochondries n'est actuellement pas connu. Pour savoir si la localisation de PPAR γ est mitochondriale, nous avons réalisé des tests sur des coupes semi-fines de cellules Caco-2. Deux types d'anticorps ont été testés sur ces coupes : l'anticorps anti-PPAR γ et l'anticorps anti-cytochrome c. Le signal obtenu pour la protéine cytochrome c est de type granulaire sur l'ensemble des cellules (figure 40C). Ce signal montre la présence de nombreuses mitochondries. A l'opposé, nous n'obtenons pas un marquage sur l'ensemble des cellules pour PPAR γ (figure 40B). Il en résulte que les résultats obtenus avec les deux anticorps ne peuvent pas être corrélés. Ces discordances sont probablement dues aux techniques utilisées.

Rôles de PPAR γ au cours de la différenciation des cellules Caco-2

PPAR γ est exprimé chez l'homme [28, 75, 290] et chez le rongeur [186, 284] au niveau des cellules coliques tumorales. Quand ce travail de thèse a commencé, il était classiquement admis que la protéine PPAR γ 2 était exprimée spécifiquement au niveau des adipocytes alors que l'expression de PPAR γ 1 était considérée extra-adipocytaire.

Nous avons démontré la présence par immunohistochimie, par western blotting et par protection à la Nucléase S1 [139] que la protéine PPAR γ 2 et que son ARNm sont présents dans l'intestin foetal humain. Le rôle physiologique de PPAR γ dans le colon reste imprécis.

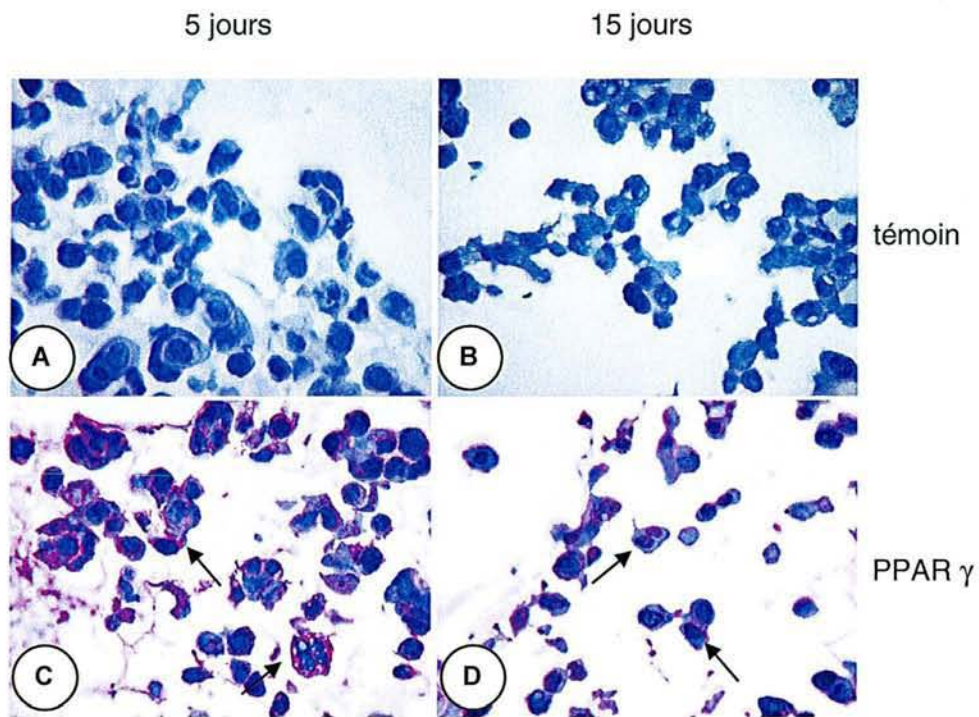


Figure 39 : Etude immunocytochimique de l'expression de PPAR γ dans les cellules HT29 au cours de leur culture.

La technique d'immunocytochimie est décrite dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les coupes sont analysées par immunocytochimie en utilisant un antiserum dirigé contre PPAR γ (C et D) d'origine commerciale. Un signal cytoplasmique est observé à 5 jours de culture (C). Ce signal devient nucléaire à 15 jours de culture (D). Aucun signal n'est observé sur les coupes témoins des cellules HT29 à 5 (A) et 15 jours de culture (B).

Grandissement : x40

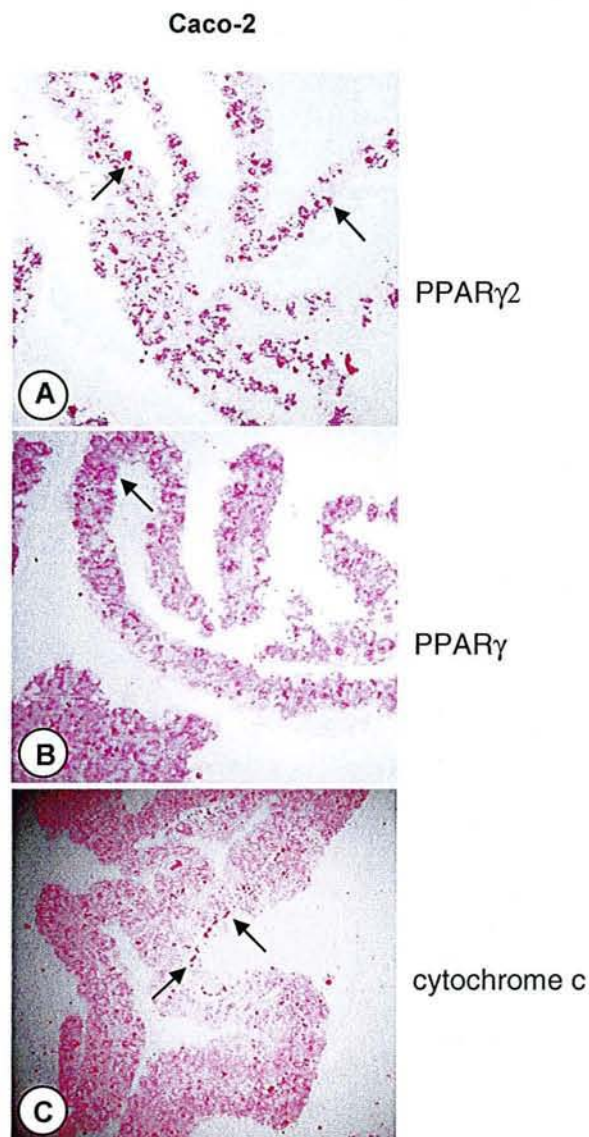


Figure 40 : Comparaison d'expression entre les protéines PPAR γ et cytochrome c au niveau des cellules Caco-2

La technique d'immunocytochimie est décrite dans la partie « Matériels et Méthodes ». Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et mises en incubation en présence de l'anticorps anti-PPAR γ 2 produit au laboratoire (A), des anticorps anti-PPAR γ (B) et anti-cytochrome c (C) d'origine commerciale. Les flèches indiquent la localisation du marquage.

Grandissement : x20

Les ligands de PPAR γ inhibent la prolifération et induisent la différenciation des cellules cancéreuses coliques chez l'homme [22, 290].

Ces mêmes ligands induisent la formation de polypes et de tumeurs coliques chez les souris ^{min/+} [186, 284]. D'après nos résultats, la différenciation des cellules Caco-2 s'accompagne d'une augmentation de l'expression de PPAR γ . Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Wachtershauer et *al.* [359] qui montrent que le taux d'ARNm et des protéines PPAR γ augmente significativement durant la différenciation cellulaire Caco-2 induite par le butyrate. PPAR γ joue un rôle dans la différenciation cellulaire d'autres types cellulaires comme les adipocytes [336, 368], les monocytes/macrophages [338], les cellules épidermiques [273], coliques [167, 187, 290], prostatiques [177] et mammaires [229]. De plus, l'activation de PPAR γ aboutit à la différenciation des cellules de liposarcome [65].

PPAR γ ne joue pas seulement un rôle dans le contrôle des gènes responsables de la différenciation cellulaire, mais aussi participe à la régulation du cycle cellulaire [2]. En fait, il est difficile de spéculer quant aux rôles précis exercés par PPAR γ dans les cellules coliques.

En résumé, les cellules Caco-2 se différencient au cours de la culture. Cette différenciation cellulaire s'accompagne par le développement des peroxysomes marqué par une augmentation de leurs activités enzymatiques. Au cours de cette différenciation cellulaire, l'expression de PPAR α , γ 1 et γ 2 est augmentée. PPAR α peut être impliqué dans un processus de maturation des peroxysomes puisque ce facteur de transcription contrôle les gènes qui codent certaines protéines peroxysomales. Par contre, les conséquences de l'augmentation de l'expression de PPAR γ dans ces cellules restent imprécises.

EXPRESSION DES PPAR AU NIVEAU D'ADENOCARCINOMES COLIQUES HUMAINS

I. EXPRESSION DES PROTEINES DES PPAR AU NIVEAU D'ADENOCARCINOMES COLIQUES HUMAINS

a. Difficultés rencontrées

L'analyse de l'expression des protéines PPAR au niveau des adénocarcinomes coliques a été essentiellement abordée par immunohistochimie ainsi que celle d'autres marqueurs moléculaires comme COX-2, COX-1 (exprimés dans les cellules tumorales coliques), la cytokératine 18 (marqueur de la différenciation cellulaire) et la protéine Ki 67 (marqueur de la prolifération cellulaire).

Initialement, notre travail devait reposer exclusivement sur l'utilisation des antiséras produits au laboratoire dirigés contre les différents PPAR. Ces anticorps ont été caractérisés et utilisés avec succès pour étudier l'expression des PPAR dans le tractus digestif du fœtus humain et dans les cellules Caco-2 et HT29 cultivées jusqu'à 15 jours de culture [139, 140].

Les conditions des techniques immunohistochimiques appliquées aux cellules Caco-2 (figure 29) n'ont pas pu être utilisées avec succès pour les coupes d'adénocarcinomes coliques humains. Les différents antiséras n'ont donné aucun marquage satisfaisant en immunocytochimie avec les coupes de tissus ; le bruit de fond était trop important et un accrochage non spécifique persistait au niveau du mucus.

Nous avons par conséquent testé différentes préparations commerciales d'anticorps, dirigés contre les PPAR :

- L'antisérum anti-PPAR γ provenant de la société SantaCruz (USA) ne donne aucun résultat satisfaisant en immunocytochimie quel que soit le test effectué avec des coupes déparaffinées de cellules Caco-2 et d'adénocarcinomes coliques.

- Les antiséras anti-PPAR α , β et γ provenant de la société AB Reagent ont été utilisés avec succès sur des préparations de cellules HT29 et Caco-2 ainsi que sur des coupes de tissus. Cependant, avec les coupes histologiques, le marquage obtenu avec les anticorps anti-PPAR α et β est faible et diffus et l'interprétation des résultats est délicate. A l'opposé, pour les cellules cultivées *in vitro* et des coupes de biopsies, le marquage avec l'anticorps anti-PPAR γ est suffisant pour permettre une bonne interprétation des résultats.

- Les antiséras anti-COX-2 provenant des sociétés SantaCruz (USA) et Chemicon (USA) ne donnent aucun résultat satisfaisant en immunocytochimie quel que soit le montage effectué avec des coupes congelées ou paraffinées de cellules Caco-2 et d'adénocarcinomes coliques.

En conclusion, les résultats présentés seront limités à ceux obtenus pour PPAR γ et pour les protéines cytokératine 18 et Ki 67.

b. Caractéristiques cliniques et anatomo-pathologiques des patients et des échantillons prélevés

L'étude réalisée à partir de prélèvements biopsiques porte actuellement sur 22 patients dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau 12. Les prélèvements proviennent de 12 hommes et de 10 femmes. L'âge moyen des patients est de 73,8 ans (51-85 ans) au moment de la biopsie. La répartition des tumeurs est homogène : 10 tumeurs ont été localisées au niveau du colon droit et 10 tumeurs ont été localisées au niveau du colon gauche. Deux prélèvements biopsiques ont été effectués au niveau du rectum. Les prélèvements sont regroupés selon le facteur T d'après la classification TNM [131]. Les biopsies classées en T2, dont l'envahissement tissulaire de la tumeur reste superficiel, sont peu nombreuses. La plupart des prélèvements correspondent à des tumeurs moyennement différenciées (59%). Les tumeurs bien et peu différenciées représentent 31,8% et 9,0% respectivement. Enfin, les tumeurs sont préférentiellement de stade II (40,9%) selon la classification TNM, 27,2% des tumeurs sont classées au stade IV, 22,9% et 4,5% représentent les tumeurs de stade III et I respectivement.

c. Expression de PPAR γ dans les cellules d'adénocarcinomes coliques

Tissus sains

Sur les 22 cas étudiés, le marquage est cytoplasmique de type granulaire (tableau 13 et figure 41). Il se situe toujours au niveau des cellules cylindriques localisées à l'apex des glandes tubulaires. Un marquage cytoplasmique de type granulaire est observé à l'apex de ces glandes. Le marquage devient faible voire absent vers la partie profonde de ces glandes. Il apparaît ainsi que l'expression de PPAR γ augmente de la base vers l'apex des glandes tubulaires où son expression est forte. Enfin, nous n'observons aucun signal dans le stroma interglandulaire et dans les couches profondes de la muqueuse.

		Nombre de cas (%)
SEXE		
Homme		12 (54,5%)
Femme		10 (45,4%)
âge moyen au moment du prélèvement		73,8
Siège tumoral		
Colon droit		10 (45,4%)
Colon gauche		10 (45,4%)
Rectum		2 (9,0%)
Caractères histologiques		
DIFFERENCIATION	Bien différencié	7 (31,8%)
	Moyennement différencié	13 (59,0%)
	Peu différencié	2 (9,0%)
MUCOSECRETION	Absence de mucus	12 (54,5%)
	Contingence mucus faible	2 (9,0%)
	Colloïde muqueux (> 30%)	7 (31,8%)
	Différenciation	1 (4,5%)
STADES	Stade 0	0 (0%)
	Stade I	1 (4,5%)
	Stade II	9 (40,9%)
	Stade III	5 (22,7%)
	Stade IV	6 (27,2%)

Tableau 12 : Caractéristiques cliniques et anatomo-pathologiques des patients et des échantillons

Centre de Diagnostic et de Recherche
 en Cancérologie de l'Université de Caen
 Faculté de Médecine - 14032 Caen Cedex 05
 64601 VILLEPES-LES-ROANDES Cedex

Tissu sain (n = 22)		Tumeur (n=22)	
Marquage			
intense	9/22 (40,9%)	intense	8/22 (36,3%)
faible	13/22 (36,3%)	faible	14/22 (63,6%)
absent	-	absent	-
Site du marquage			
diffus	11/22 (50,0%)	diffus	12/22 (54,5%)
granulaire	11/22 (50,0%)	granulaire	10/22 (45,5%)
Siège du marquage			
nucléaire	0/22 (0%)	nucléaire	0/22 (0%)
cytoplasmique	22/22 (100%)	cytoplasmique	22/22 (100%)
nucléaire/cytoplasmique	0/22 (0%)	nucléaire/cytoplasmique	0/22 (0%)
Localisation			
cellules cylindriques	15/22 (68,1%)	glandulaire	19/22 (86,3%)
apex des glandes	19/22 (86,3%)	interglandulaire	3/22 (13,6%)
bases des glandes	3/22 (13,6%)		
cellules interglandulaires	0/22 (0%)		
couches profondes	0/22 (0%)		

**Tableau 13 : Expression de PPAR γ en fonction du caractère superficiel
 ou profond du prélèvement**

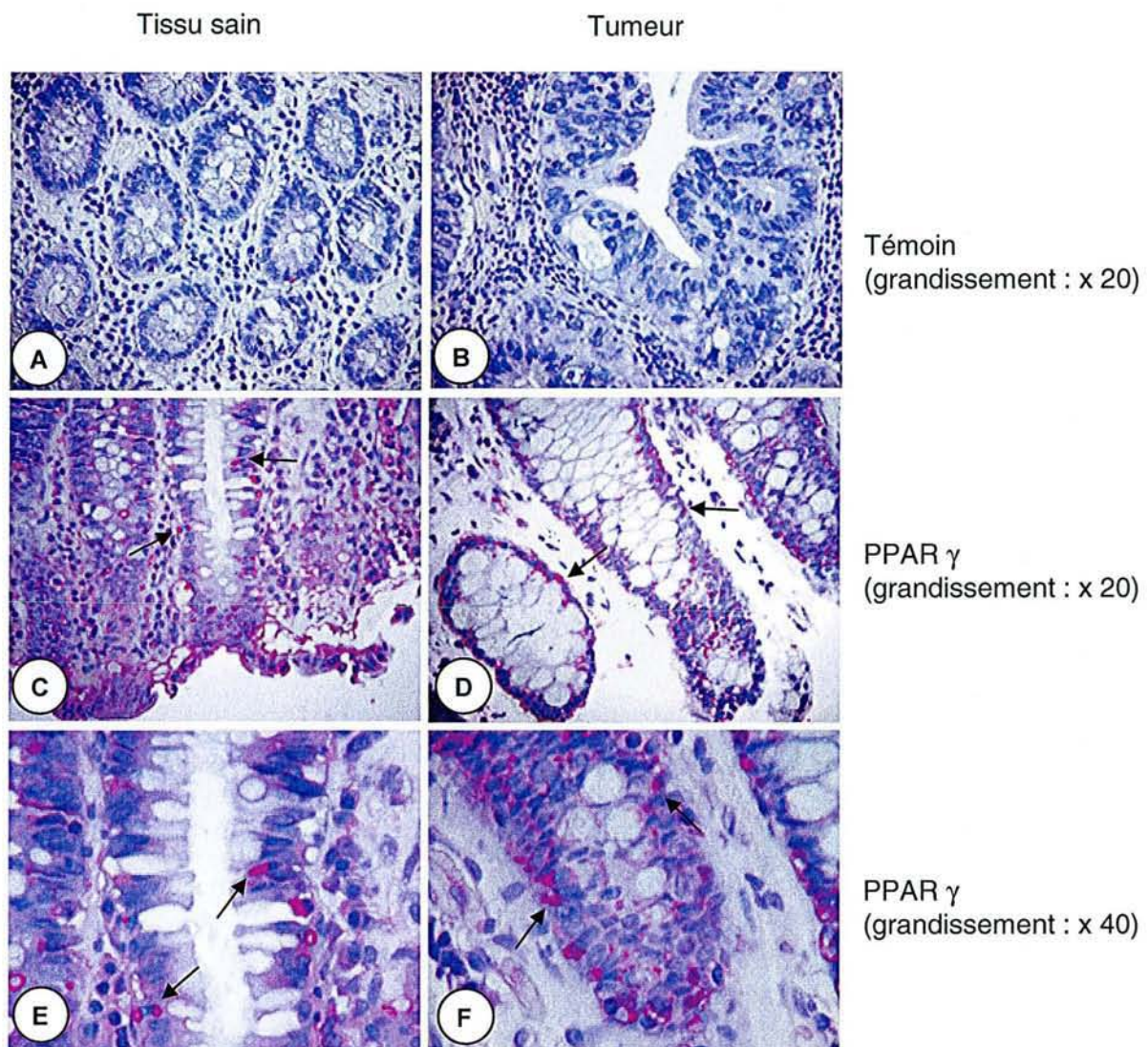


Figure 41 : Mise en évidence de PPAR γ au niveau d'adénocarcinome colique.

Des sections de 5 μ m sont réalisées à partir d'adénocarcinomes coliques inclus en paraffine et préalablement fixés dans une solution formolée. L'anticorps anti-PPAR γ d'origine commerciale (C-F) est testé à une dilution finale de 1/400. Les coupes A, C et E correspondent au tissu sain et les coupes B, D et F aux tumeurs. Le montage immunohistochimique est décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les témoins négatifs (A, B) correspondent à l'absence de l'anticorps primaire. Les flèches indiquent la localisation du marquage.

Tumeurs

Quelle que soit la tumeur (tableau 13 et figure 41), le marquage observé est toujours cytoplasmique de type supranucléaire. L'expression de PPAR γ est plus importante dans les tumeurs comparativement à ce qui est observé au niveau du tissu sain prélevé à distance de la tumeur. De manière générale, le marquage cytoplasmique se situe exclusivement au niveau des glandes tumorales. Il est absent dans le stroma interglandulaire.

Il existe également une différence d'expression de PPAR γ au sein des tumeurs. Cette expression est forte pour les cellules tumorales sécrétant du mucus. Le marquage est toujours cytoplasmique et de type granulaire. Il est retrouvé dans la presque totalité des cellules des glandes tumorales sécrétant du mucus.

Cependant, sur les 22 cas étudiés nous n'observons pas de différence d'expression en fonction du degré de dysplasie c'est-à-dire en fonction du grade de la tumeur (figure 42).

II. ANALYSE DU TAUX DES ARNm DES PPAR, DE COX-1 ET 2 ET DE β -CATENINE AU NIVEAU D'ADENOCARCINOMES COLIQUES.

a. Quantification au niveau des adénocarcinomes coliques

Prélèvements biopsiques

L'étude a été réalisée à partir de 29 prélèvements biopsiques de pièces opératoires. Parmi les 29 biopsies étudiées, 2 biopsies font parties du groupe T2, 13 biopsies du groupe T3 et 14 du groupe T4 (tableau 14). 48,3 % sont du stade II et 44,8 % du stade III selon la classification TNM. Deux patients présentent une tumeur classée au stade I (6,9 %). Aucune biopsie n'est de stade IV.

La qualité des ARN totaux extraits à partir des biopsies est vérifiée sur gel d'agarose à 2% dans du TBE (figure 43). De manière générale, les ARN totaux extraits sont de bonne qualité. Nous avons, cependant dû écarter plusieurs couples de prélèvements (tissu sain et tumeur). Dans les conditions d'extraction choisie [50] et après électrophorèse, trois bandes principales correspondant respectivement aux ARN ribosomiques de taille 28,18 et 5S doivent être observées. La dégradation des ARN affecte rapidement les ARN ribosomiques et particulièrement les ARN dont la taille est de taille 28S.

Caractéristiques cliniques et anatomo-pathologiques

Les caractéristiques cliniques des patients et les caractéristiques anatomo-pathologiques des prélèvements sont résumées dans le tableau 14. Nous avons réalisé l'analyse du taux des ARNm codant les PPAR à partir du tissu sain et tumoral de 29 patients (22 hommes et 7 femmes). L'âge moyen au moment du diagnostic est de 66,3 ans (50-85).

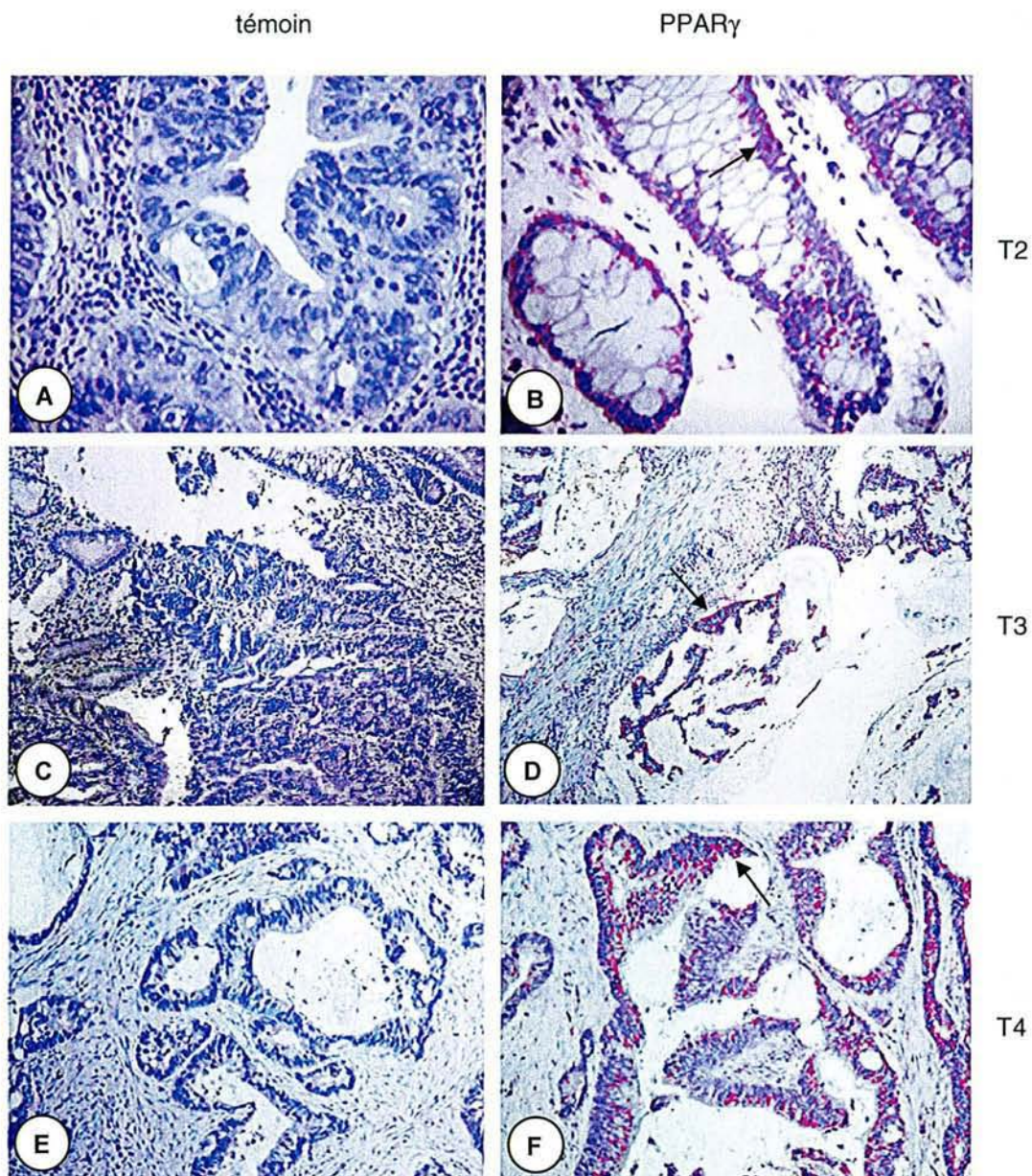


Figure 42 : Mise en évidence de PPAR γ au niveau d'adénocarcinomes coliques selon le facteur T de la classification TNM

Des sections de 5 μ m sont réalisées à partir d'adénocarcinomes coliques classés selon le facteur T de la classification TNM (A et B : facteur T2 ; C et D : facteur T3 ; E et F : facteur T4). L'anticorps anti-PPAR γ d'origine commerciale (B, D et F) est testé à une dilution finale de 1/400. Le montage immunohistochimique est décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les témoins négatifs (A, C et E) correspondent à l'absence de l'anticorps primaire. Les flèches indiquent la localisation du marquage. Aucune différence d'expression n'existe en fonction du grade de la tumeur.

Grandissement : x 20

		Nombre de cas (%)
Patients		
SEXE	Hommes	22 (75.9%)
	Femmes	7 (24.1%)
Age moyen au moment du diagnostic		69 ± 9.1
SIEGE TUMORAL		
	Colon droit	14 (48.3%)
	Colon gauche	9 (37.9%)
	Rectum	4 (13.8 %)
Caractères histologiques		
DIFFERENCIATION	Bien différencié	14 (48.3 %)
	Moyennement différencié	13 (44.8 %)
	Peu différencié	2 (6.9 %)
MUCOSECRETION	Absence de mucus	25 (86.2%)
	Contingence mucus faible	2 (6.9 %)
	Colloïde muqueux (> 30%)	2 (6.9 %)
STADES	Stade 0	0
	Stade I	2 (6.9 %)
	Stade II	14 (48.3 %)
	Stade III	13 (44.8 %)
	Stade IV	0

Tableau 14 : Caractéristiques des prélèvements utilisés pour la quantification des ARNm codant les PPAR, COX-1, COX-2 et β -caténine.

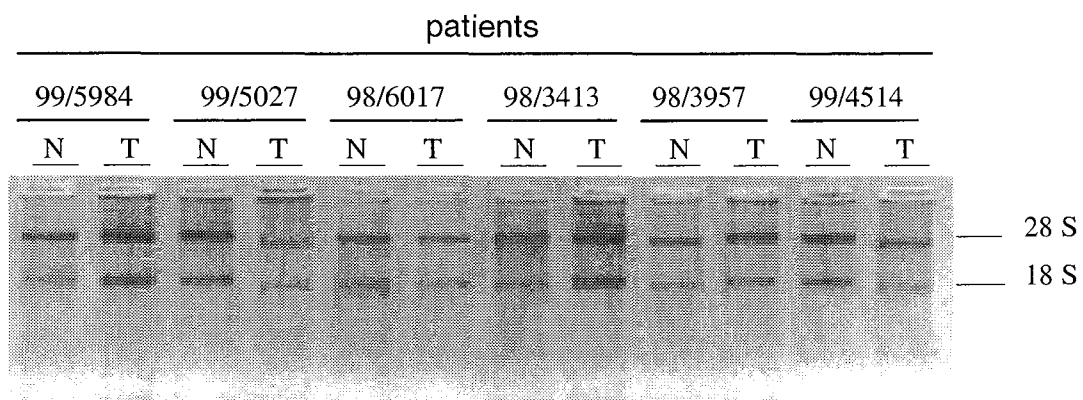


Figure 43 : Vérification de la qualité des extractions des ARN totaux sur gel d'agarose à partir des prélèvements biopsiques.

1µg d'ARN totaux extrait à partir des prélèvements biopsiques est déposé sur un gel d'agarose à 2%. La présence des bandes 28S et 18S correspondant aux ARN ribosomiques indique que l'extraction est de bonne qualité.

N : tissu sain ; T : tumeur

Les stades II et III selon la classification TNM sont majoritaires ; ils représentent 48,3 et 44,8% respectivement. La majorité des tumeurs sont bien (48,3%) à moyennement différenciées (44,8%) sans sécrétion de mucus. Seules quelques tumeurs présentent un contingent mucus faible (n=2, 6,5%) et colloïde muqueux supérieur à 30% (n=2, 6,5%). Les prélèvements correspondent pour environ 50% à une localisation de la tumeur au niveau du colon droit (48,3%) et du colon gauche (51,7%) ; les tumeurs localisées au niveau du rectum sont incluses dans le groupe colon gauche, celles localisées au niveau du colon transverse sont incluses dans le groupe colon droit.

b. Analyses statistiques des résultats de quantification par RT-PCR compétitive

L'analyse statistique de la population a montré que la distribution pour les paramètres étudiés ne suit pas une répartition gaussienne ; par conséquent l'analyse retenue est une analyse de rang de Wilcoxon pour des valeurs appariées (sain *versus* tumeur). Le seuil de signification retenu est de $P < 0,05$. A partir des données cliniques des patients et des résultats quantitatifs, nous avons réalisé trois types d'analyses statistiques : analyse générale réalisée sur l'ensemble des patients, analyse en fonction du stade établi à partir de la classification TNM et analyse en fonction de la localisation (colon droit ou gauche) de la tumeur. Les résultats de l'analyse statistique sont les suivants :

Analyse générale

Lorsque l'analyse porte sur l'ensemble des patients (tableau 15 et figure 44), nous observons une diminution significative du taux d'ARNm codant l'ensemble des PPAR entre les tissus sains et tumoraux. La comparaison du taux des ARNm pour PPAR α ($0,814 \pm 0,290$), PPAR β ($0,346 \pm 0,161$) et PPAR γ ($0,534 \pm 0,278$) dans le tissu sain avec le taux des ARNm de PPAR α ($0,651 \pm 0,353$); PPAR β ($0,244 \pm 0,160$); et de PPAR γ ($0,428 \pm 0,420$) dans les tissus tumoraux révèle une diminution (tableau 16) . Elle est significative pour PPAR α ($P < 0,005$); PPAR β ($P < 0,005$) et PPAR γ ($P < 0,05$) (tableau 15). Des résultats similaires sont obtenus pour COX-1 et COX-2 : Le taux des ARNm baisse pour COX-1 (tissus sains : $1,396 \pm 0,852$; tumeurs : $0,633 \pm 0,361$) et pour COX-2 (tissus sains : $2,823 \pm 2,456$; tumeurs : $1,871 \pm 1,545$). Ces diminutions sont significatives (tableau 15). Par contre, nous observons un accroissement significatif ($P < 0,01$) entre les tissus sains ($1,735 \pm 0,722$) et les tumeurs ($2,223 \pm 1,032$) (tableau 15) du taux des ARNm codant la β -caténine.

ANALYSE GENERALE

<i>Paramètres étudiés</i>	<i>Z</i>	<i>P</i>	
PPAR α	2,82	0,005	S
PPAR β	2,93	0,0034	S
PPAR γ	1,98	0,05	S
Cyclooxygénase 1	3,80	0,0001	S
Cyclooxygénase 2	2,27	0,023	S
β caténine	- 2,70	0,007	S

Tableau 15 :Analyse de rang de Wilcoxon réalisée sur l'ensemble des prélèvements.

Le seuil de significativité est de $P < 0,05$

S : variation significative ; NS : variation non significative

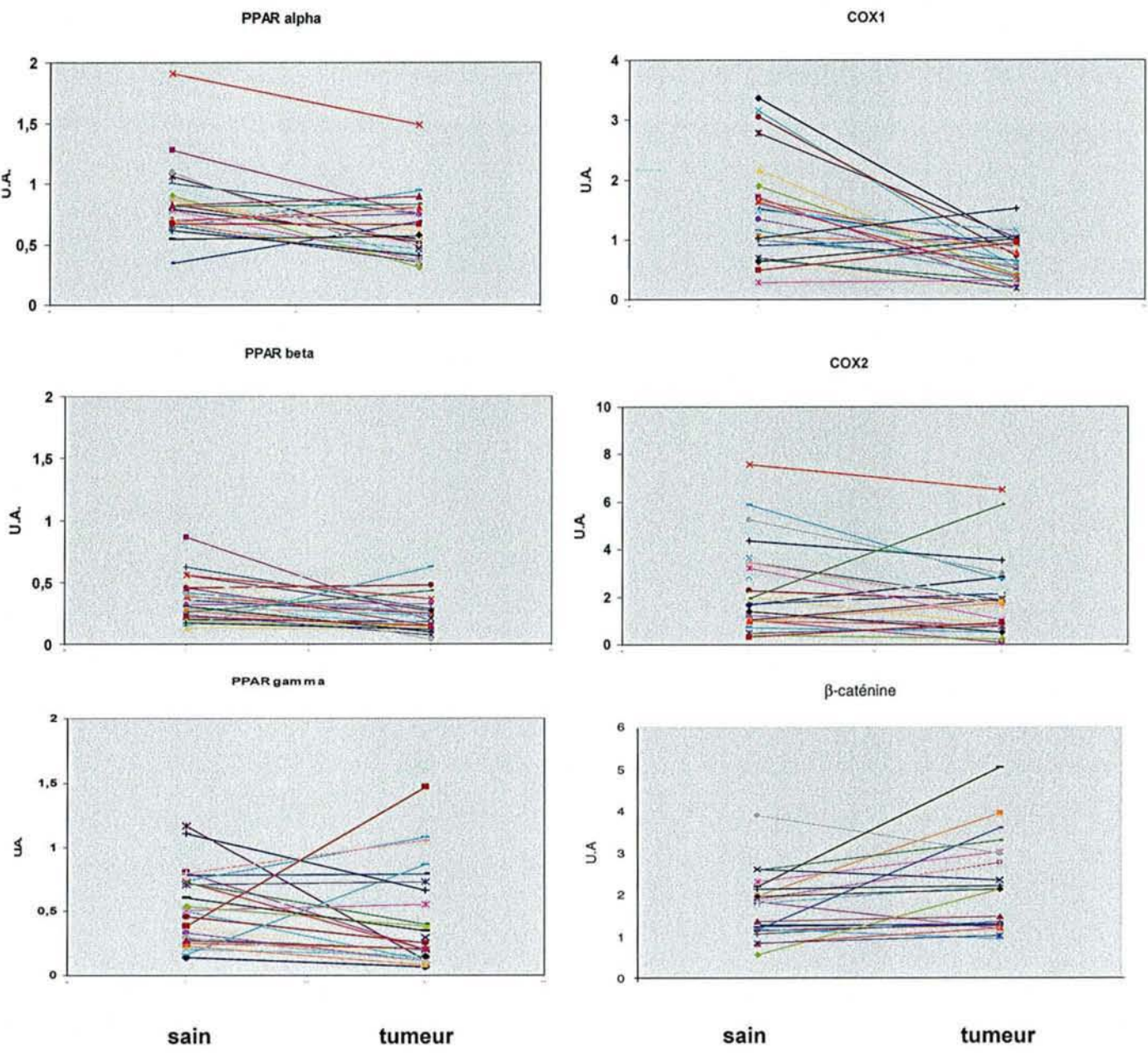


Figure 44 : Représentation des taux des différents ARNm étudiés entre tissu sain et tumeur pour l'ensemble des patients de notre étude (en ordonnée, UA : unité arbitraire)

ANALYSE GENERALE

<i>Paramètres étudiés</i>	<i>Tissu sain</i>	<i>Tumeur</i>
PPAR α	0,814 \pm 0,290	0,651 \pm 0,353
PPAR β	0,346 \pm 0,161	0,244 \pm 0,160
PPAR γ	0,534 \pm 0,278	0,428 \pm 0,420
Cyclooxygénase 1	1,396 \pm 0,852	0,633 \pm 0,361
Cyclooxygénase 2	2,823 \pm 2,456	1,871 \pm 1,545
β -caténine	1,735 \pm 0,722	2,223 \pm 1,032

STADES I ET II

<i>Paramètres étudiés</i>	<i>Tissu sain</i>	<i>Tumeur</i>
PPAR α	0,881 \pm 0,364	0,655 \pm 0,279
PPAR β	0,418 \pm 0,184	0,231 \pm 0,107
PPAR γ	0,591 \pm 0,251	0,388 \pm 0,341
Cyclooxygénase 1	1,639 \pm 1,026	0,596 \pm 0,328
Cyclooxygénase 2	2,565 \pm 1,479	1,897 \pm 1,322
β -caténine	1,540 \pm 0,451	1,907 \pm 0,834

STADE III

<i>Paramètres étudiés</i>	<i>Tissu sain</i>	<i>Tumeur</i>
PPAR α	0,764 \pm 0,190	0,817 \pm 0,605
PPAR β	0,340 \pm 0,230	0,403 \pm 0,553
PPAR γ	0,554 \pm 0,338	0,730 \pm 0,645
Cyclooxygénase 1	1,045 \pm 0,397	0,853 \pm 0,522
Cyclooxygénase 2	3,061 \pm 3,479	1,940 \pm 1,760
β -caténine	1,916 \pm 0,935	2,288 \pm 0,850

COLON GAUCHE

<i>Paramètres étudiés</i>	<i>Tissu sain</i>	<i>Tumeur</i>
PPAR α	0,871 \pm 0,121	0,538 \pm 0,206
PPAR β	0,368 \pm 0,180	0,210 \pm 0,126
PPAR γ	0,495 \pm 0,297	0,239 \pm 0,159
Cyclooxygénase 1	1,967 \pm 0,961	0,670 \pm 0,347
Cyclooxygénase 2	2,885 \pm 0,360	1,159 \pm 0,722
β -caténine	1,586 \pm 0,598	1,926 \pm 1,018

COLON DROIT

<i>Paramètres étudiés</i>	<i>Tissu sain</i>	<i>Tumeur</i>
PPAR α	0,872 \pm 0,396	0,624 \pm 0,308
PPAR β	0,377 \pm 0,182	0,236 \pm 0,200
PPAR γ	0,668 \pm 0,255	0,535 \pm 0,447
Cyclooxygénase 1	1,230 \pm 0,766	0,589 \pm 0,389
Cyclooxygénase 2	3,148 \pm 1,985	2,538 \pm 1,839
β -caténine	1,904 \pm 0,806	2,432 \pm 1,160

Tableau16 : Tableau récapitulatif indiquant les valeurs obtenues (+/- écart-type) des paramètres étudiés pour l'ensemble des patients.

(Les valeurs sont exprimées en unités arbitraires)

Analyse en fonction du stade TNM

La quantité des prélèvements appartenant aux stades I et II n'est pas suffisante pour réaliser une étude distincte entre ces deux stades. Nous avons donc regroupé les patients en deux groupes correspondant d'une part aux stades I et II et d'autre part au stade III de la classification TNM (tableau 14).

Pour le groupe stade I et stade II, le taux des ARNm pour PPAR α ($0,881 \pm 0,364$), PPAR β ($0,418 \pm 0,184$) et COX-1 ($1,639 \pm 1,026$) dans les tissus sains sont plus élevés que ceux du tissu tumoral (PPAR α : $0,655 \pm 0,279$; PPAR β : $0,231 \pm 0,107$; COX-1: $0,596 \pm 0,328$). (tableaux 16 et 17). Ces diminutions liées au processus néoplasique sont significatives pour PPAR α ($P < 0,02$); PPAR β ($P < 0,005$) et COX-1 ($P < 0,02$) (tableau 17). A l'inverse, nous observons un accroissement significatif ($P < 0,02$) du taux des ARNm codant β -caténine entre les tissus sains ($1,540 \pm 0,451$) et les tumeurs ($1,907 \pm 0,834$) (tableau 16). Il n'y a pas de variations significatives pour les autres paramètres analysés, c'est-à-dire pour PPAR γ et COX-2.

Au niveau du groupe stade III, l'analyse statistique indique que seul le taux des ARNm de COX-2 présente une diminution significative ($P < 0,05$) entre tissus sains ($3,061 \pm 3,479$) et tumeurs ($1,940 \pm 1,760$) (tableaux 16 et 17). Les variations observées pour PPAR α , PPAR β , COX-1 et β -caténine ne sont pas significatives.

Analyse en fonction du siège tumoral

Dans cette analyse, les patients présentant une tumeur au niveau du rectum ont été inclus dans le groupe colon gauche (tableau 18). Quel que soit le siège tumoral, nous observons une diminution significative de l'expression des ARNm de PPAR α , β et COX-1 entre tissus sains et tumeurs. Les taux des ARNm pour PPAR α ($0,871 \pm 0,121$), pour PPAR β ($0,368 \pm 0,180$) et pour COX-1 ($1,967 \pm 0,961$) diminuent entre les tissus sains et les tissus tumoraux (PPAR α : $0,538 \pm 0,206$; PPAR β : $0,210 \pm 0,126$; COX-1: $0,670 \pm 0,347$). (tableau 16). Ces diminutions sont significatives dans le cas du colon gauche pour PPAR α ($P < 0,05$); PPAR β ($P < 0,03$) et COX-1 ($P < 0,01$) et dans le cas du colon droit pour PPAR α ($P < 0,01$); PPAR β ($P < 0,02$) et COX-1 ($P < 0,005$) (tableau 18).

Seule une baisse significative ($P < 0,01$) du taux des ARNm codant PPAR γ est observée entre tissus sains ($0,495 \pm 0,297$) et tumeurs ($0,239 \pm 0,159$) pour le groupe colon gauche. Nous observons un accroissement significatif ($P < 0,02$) du taux des ARNm codant β -caténine entre tissus sains ($1,904 \pm 0,806$) et tumeurs ($2,432 \pm 1,160$) (tableau 16) pour le groupe colon droit. Les variations du taux d'ARNm de COX-2 entre tissus sains et tumeurs ne sont pas significatives, quel que soit le siège tumoral.

STADES I et II

Paramètres étudiés	Z	P	
PPAR α	2,23	0,02	S
PPAR β	2,93	0,0034	S
PPAR γ	1,06	0,286	NS
Cyclooxygénase 1	2,49	0,013	S
Cyclooxygénase 2	1,07	0,28	NS
β -caténine	- 2,22	0,02	S

STADE III

Paramètres étudiés	Z	P	
PPAR α	1,6	0,09	NS
PPAR β	1,07	0,28	NS
PPAR γ	0,76	0,44	NS
Cyclooxygénase 1	1,37	0,17	NS
Cyclooxygénase 2	1,88	0,04	S
β -caténine	- 1,36	0,17	NS

Tableau 17 : Analyse de rang de Wilcoxon réalisée en fonction du stade TNM défini pour chaque tumeur.

Le seuil de significativité est de $P < 0,05$

S : variation significative ; NS : variation non significative

COLON GAUCHE

Paramètres étudiés	Z	P	
PPAR α	2,04	0,04	S
PPAR β	2,23	0,03	S
PPAR γ	2,42	0,01	S
Cyclooxygénase 1	2,62	0,009	S
Cyclooxygénase 2	1,22	0,22	NS
β -caténine	1,87	0,06	NS

COLON DROIT

Paramètres étudiés	Z	P	
PPAR α	2,6	0,0096	S
PPAR β	2,4	0,014	S
PPAR γ	1,2	0,23	NS
Cyclooxygénase 1	3,1	0,002	S
Cyclooxygénase 2	1,6	0,10	NS
β -caténine	-2,42	0,16	S

Tableau 18 : Analyse de rang de Wilcoxon réalisée en fonction du siège tumoral

Le seuil de significativité est de $P < 0,05$

S : variation significative ; NS : variation non significative

III. DISCUSSION

a. Expression de PPAR γ dans les adénocarcinomes coliques humains

Nous avons recherché la présence de PPAR γ dans des cellules d'adénocarcinomes coliques non familiaux par immunohistochimie.

PPAR γ est présent aussi bien dans les tumeurs que dans les tissus sains situés à proximité. Au niveau du tissu sain, PPAR γ est plus souvent cytoplasmique que nucléaire et sa présence est détectée au niveau de l'apex des glandes. Cette localisation laisse supposer que PPAR γ pourrait avoir un rôle potentiel au moment où les cellules desquament dans la lumière intestinale. Ce rôle pourrait être lié à l'apoptose. Pour valider cette hypothèse, nous avons utilisé en immunocytochimie deux anticorps sur des coupes en paraffine d'adénocarcinomes coliques humains et sur les tissus sains : l'anticorps anti-Ki67 reconnaissant la protéine Ki67 qui est un marqueur de la prolifération cellulaire, et l'anticorps anti-cytokératine 18 reconnaissant la protéine cytokératine 18, marqueur de la différenciation cellulaire. Les résultats indiquent une expression forte et diffuse de la protéine cytokératine 18 au niveau cytoplasmique aussi bien dans les cellules tumorales que dans les cellules saines (figure 45). Le signal est réparti d'une façon homogène dans la totalité des glandes, mais il est complètement absent dans le stroma. Les résultats obtenus avec l'anticorps anti-Ki67 montrent un signal nucléaire au niveau des glandes dans les tissus sains et dans les tumeurs. Cependant, les signaux observés présentent une répartition différente par rapport à celle constatée pour la protéine cytokératine 18 ; la protéine Ki67 est présente principalement à la base des glandes dans le tissu sain. Cette répartition montre que la prolifération cellulaire se fait effectivement bien à la base des glandes dans le tissu sain. Cette répartition n'existe plus dans les tumeurs.

Les résultats obtenus dans le tissu sain pourraient à priori être liés :

- soit à un processus de différenciation que révèle la présence de la protéine Ki67
- soit à un état de maturation des cellules uniquement localisées à l'apex des glandes, ce qui se traduirait par l'induction de gènes-cibles de PPAR γ .

Par contre, aucune relation n'est évidente dans les tumeurs : à priori, nous n'observons pas de corrélation possible entre l'expression des protéines PPAR γ , Ki67 et cytokératine 18.

Nous avons également analysé l'expression de PPAR γ au niveau des adénocarcinomes coliques non familiaux en fonction du grade de la tumeur. Sur les 22 cas étudiés, nous n'observons pas de différence dans l'expression en fonction du degré de dysplasie c'est-à-dire en fonction du grade de la tumeur. Ces résultats sont similaires à ceux observés par Théocharis et *al.* [330]. Ces auteurs ont constaté qu'il n'existe pas de

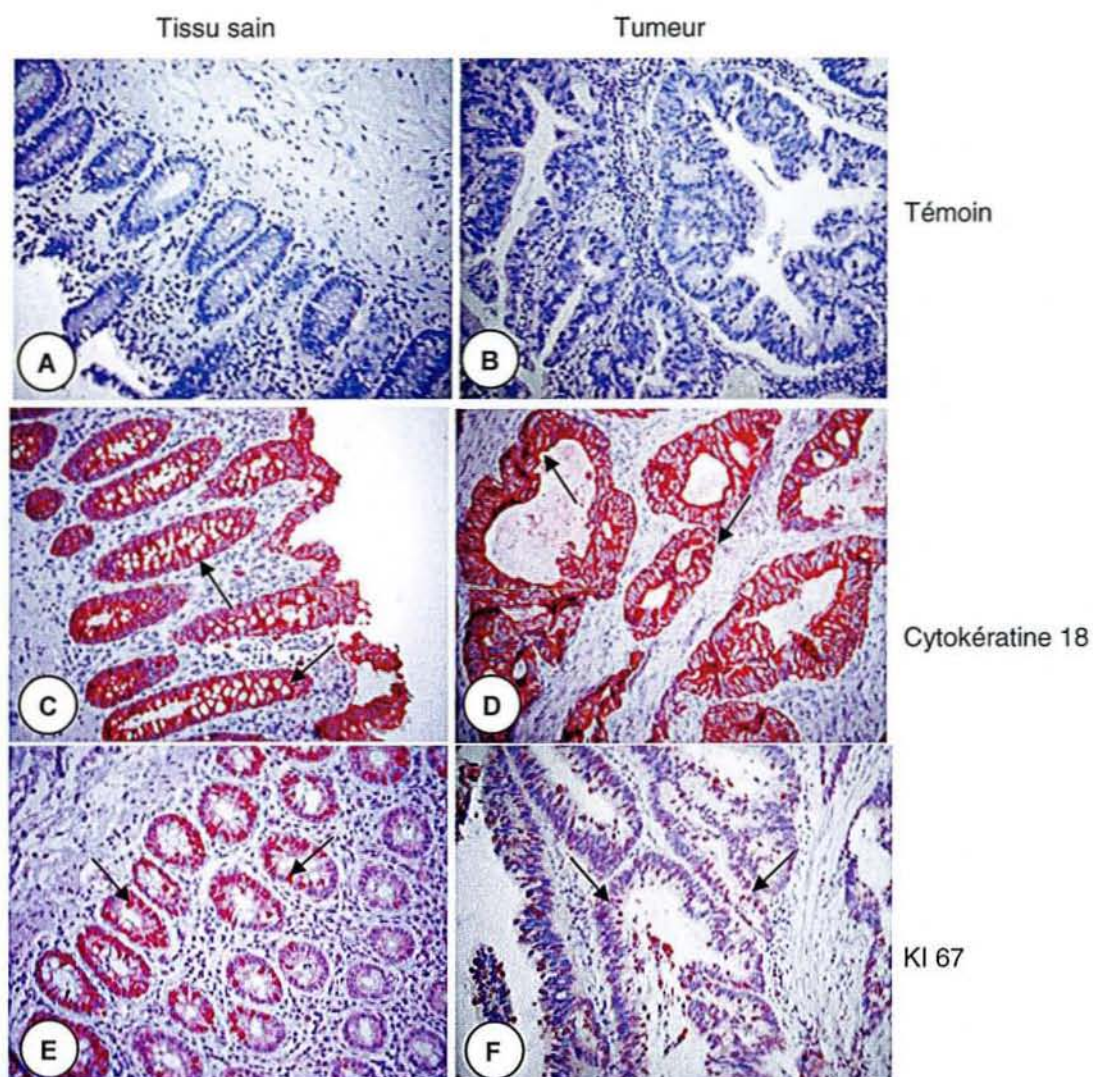


Figure 45 : Mise en évidence de l'expression de la cytokératine 18 et de Ki67 au niveau d'adénocarcinomes coliques.

Les tissus ont été fixés dans une solution formolée et inclus dans la paraffine. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées et mises en incubation en présence d'anticorps primaires anti-cytokératine 18 (C et D) et anti-Ki67 (E et F) d'origine commerciale. Les complexes formés ont été mis en évidence par le montage décrit dans « Matériels et Méthodes ». Les témoins négatifs (A, B) correspondent à l'absence de l'anticorps primaire. (Les flèches indiquent la localisation du marquage)

Grandissement : x10

différence significative d'expression de la protéine PPAR γ au niveau de tumeurs du poumon non à petites cellules (NSCLC, pour *non-small cell lung carcinoma*) en fonction du grade, mais aussi en fonction de l'âge et du sexe des patients. Cependant, il existe une relation significative de l'expression de PPAR γ en fonction du type histologique dans les tumeurs NSCLC. Les adénocarcinomes bien différenciés présentent une augmentation significative de l'expression de PPAR γ comparativement aux adénocarcinomes moyennement et peu différenciés [330]. Nos résultats indiquent également un modèle d'expression différent de PPAR γ au niveau de cellules tumorales mucosécrétantes. Dans ce type de tumeur, PPAR γ est exprimé beaucoup plus fortement que dans les tumeurs dont la sécrétion de mucus est faible ou dans les tumeurs pour lesquelles le mucus est absent.

Ainsi, nos résultats suggèrent que la présence de PPAR γ peut-être corrélée au type histologique des cellules, notamment mucosécrétantes.

b. Localisation cytoplasmique de PPAR γ dans les cellules d'adénocarcinomes coliques humains

Le marquage observé au niveau des cellules tumorales coliques est exclusivement cytoplasmique. Une localisation nucléaire du marquage est obtenue *in vitro* avec les cellules Caco-2, cellules qui dérivent d'un adénocarcinome colique (figure 29). Bien qu'extrêmement spécifique, nous ne pouvons cependant exclure que le marquage concerne une protéine reconnue par l'anticorps et présentant des épitopes communs à PPAR γ . Des résultats similaires ont été obtenus concernant la localisation cytoplasmique de PPAR γ au niveau de tumeurs du poumon [330]. Avec l'anticorps monoclonal provenant de la société Santa Cruz (USA), les résultats obtenus en immunohistochimie indiquent un signal positif pour PPAR γ au niveau nucléaire et cytoplasmique dans 11% des tumeurs NSCLC examinées, mais 82% des tumeurs étudiés indiquent un signal uniquement cytoplasmique et enfin seulement 7% des tumeurs présentent une localisation exclusivement nucléaire de PPAR γ . Chang et Szabo [39] ont également étudié l'expression de PPAR γ dans ce type de tumeur. Leurs résultats indiquent que PPAR γ est exprimé dans 48,7% des cas étudiés (39 cas), considérant le signal positif comme étant uniquement nucléaire. La localisation cytoplasmique de PPAR γ est considérée comme un signal non spécifique. Enfin, Han et *al.* [119] ont montré que PPAR γ est aussi retrouvé au niveau nucléaire et cytoplasmique dans les cellules de neuroblastomes.

Le marquage cytoplasmique est d'autre part granulaire et pourrait correspondre à un marquage de type mitochondrial. Cette hypothèse a déjà été évoquée pour expliquer le

marquage cytoplasmique obtenu au niveau des cellules Caco-2. Pour montrer une éventuelle corrélation concernant la présence de PPAR γ dans les mitochondries, nous avons réalisé des coupes sériées d'adénocarcinomes coliques à partir de tissus inclus en paraffine. Deux types d'anticorps ont été testés sur ces coupes : l'anticorps anti-PPAR γ et l'anticorps anti-cytochrome c (figure 46). Le signal obtenu pour la protéine cytochrome c est de type granulaire et homogène dans la majorité des cellules des tumeurs ou des tissus sains prélevés à distance. Ce signal correspond à la présence de nombreuses mitochondries dans ces tissus. Par contre, nous n'obtenons pas un marquage sur l'ensemble des cellules pour PPAR γ . Il en résulte que les résultats obtenus avec les deux anticorps ne peuvent pas être corrélés. Ces discordances sont probablement dues aux techniques utilisées.

c. Expression des ARNm des PPAR et des autres marqueurs étudiés au sein des adénocarcinomes coliques humains

La quantification par RT-PCR compétitive montre pour l'ensemble des biopsies tumorales une diminution significative du taux des ARNm codant les PPAR comparativement aux tissus sains. Des résultats similaires ont été obtenus pour PPAR α [145, 180]. Par contre, nos résultats sont différents de ceux précédemment publiés pour PPAR β et γ [75, 115, 290]. Dans ces études, il apparaît que le taux des ARNm de PPAR β ou de PPAR γ mesuré par Northern blotting est plus élevé dans les tumeurs que dans les tissus sains ou demeure à des niveaux équivalents d'expression [75]. Cependant, les résultats présentés pour PPAR γ sont contradictoires. Sasaki et *al.* [292] ont étudié l'expression des ARNm de PPAR γ par RT-PCR en temps réel sur 77 biopsies de cancers de poumon. Leur étude indique une diminution significative ($P < 0,0001$) de l'expression de PPAR γ dans les tumeurs ($0,57 \pm 1,255$) comparativement aux tissus sains ($4,191 \pm 2,868$). Ces observations sont en accord avec nos résultats concernant PPAR γ pour lequel la diminution de son expression au niveau des tumeurs est significative.

D'autre part, la quantification de PPAR γ par RT PCR compétitive ne fait pas de distinction entre les différents ARNm PPAR γ_1 , γ_2 ou γ_3 . Par RT-PCR semi-nichée, nous avons détecté la présence de PPAR γ_2 dans 56% des tumeurs ainsi que dans 60% des prélèvements de tissus sains (tableau 19 et figures 47 et 48). Le produit d'amplification obtenu a été digéré par *Hind* II. Nous avons retenu les couples tissu sain/tumeur où l'amplification de PPAR γ_2 a été obtenue dans les deux cas. La digestion par *Hind* II génère deux fragments de 224 et 58 pb. Le produit de digestion est vérifié sur gel d'agarose à 2%

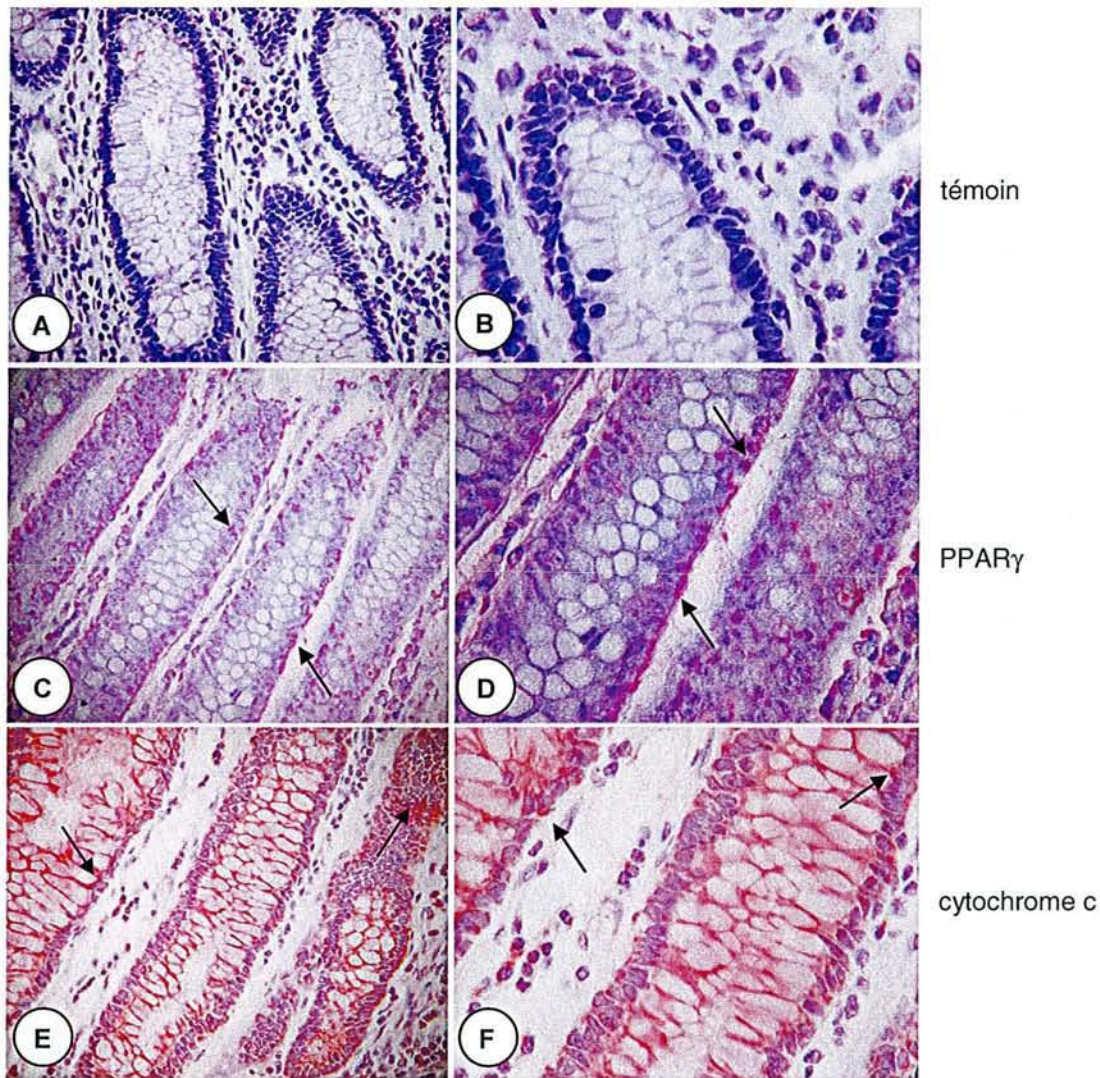


Figure 46 : Comparaison d'expression entre les protéines $PPAR\gamma$ et cytochrome c au niveau d'adénocarcinomes coliques humains.

Les tissus ont été fixés dans une solution formolée et inclus dans la paraffine. Des coupes de 5 μm ont été réalisées et mises en incubation en présence de l'anticorps anti- $PPAR\gamma$ (C et D) et anti-cytochrome c (E et F) d'origine commerciale. Les complexes formés ont été mis en évidence par le montage décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les témoins négatifs (A, B) correspondent à l'absence de l'anticorps primaire. (Les flèches indiquent la localisation du marquage).

A, C et E grandissement : x 20 ; B, D et F grandissement : x 40.

ANALYSE GENERALE		
PPARγ2	Tissu sain	Tumeur
présent	15/25 (60%)	14/25 (56%)
absent	10/25 (40%)	11/25 (44%)

COLON GAUCHE		
PPARγ2	Tissu sain	Tumeur
présent	4/12 (33,3%)	4/12 (33,3%)
absent	8/12 (66,6%)	8/12 (66,6%)

COLON DROIT		
PPARγ2	Tissu sain	Tumeur
présent	9/10 (90%)	7/10 (70%)
absent	1/10 (10%)	3/10 (30%)

STADES I ET II		
PPARγ2	Tissu sain	Tumeur
présent	7/12 (58,3%)	7/12 (58,3%)
absent	5/12 (41,6%)	5/12 (41,6%)

STADE III		
PPARγ2	Tissu sain	Tumeur
présent	6/9 (66,6%)	4/9 (44,4%)
absent	3/9 (33,3%)	5/9 (55,6%)

Tableau 19 : Récapitulatif de l'expression des ARNm de PPAR γ 2 pour l'ensemble des prélèvements étudiés par la technique de RT-PCR semi-nichée.

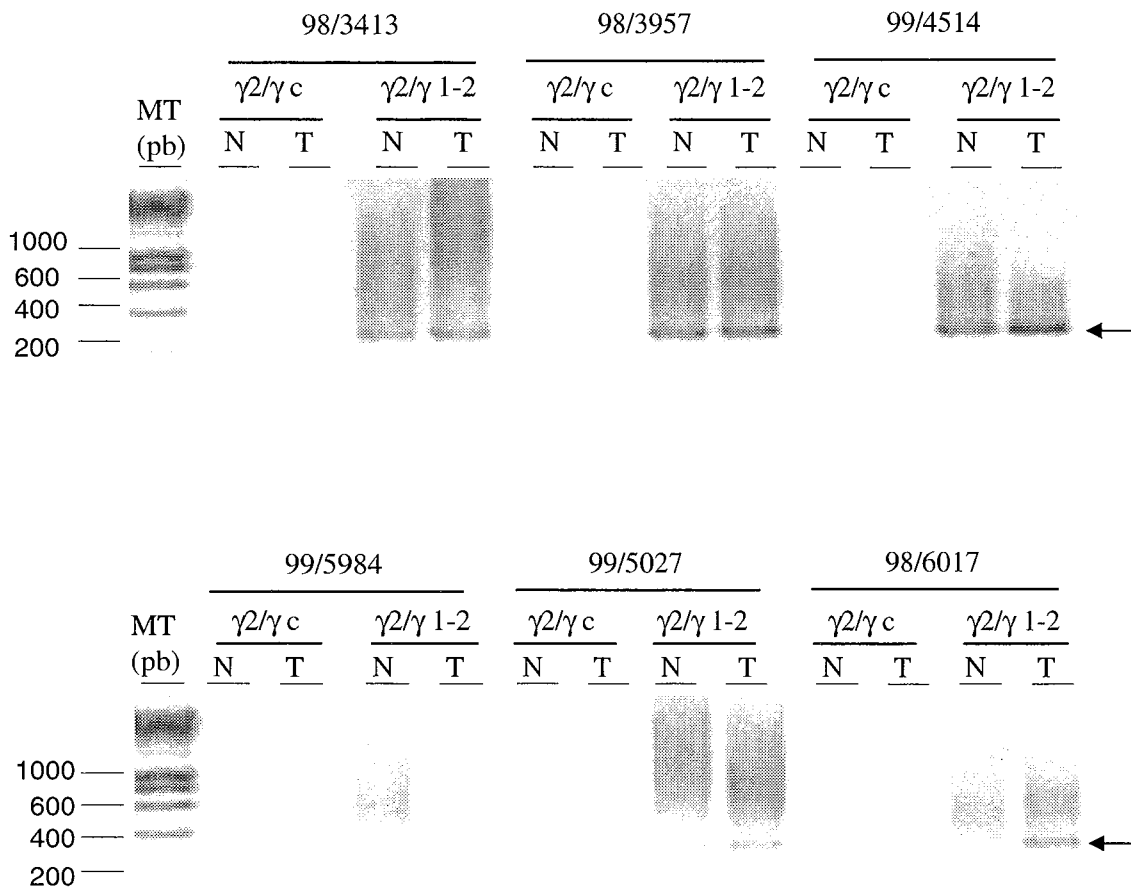


Figure 47 : Exemple d'expression des ARNm de PPAR γ 2 étudiés par la technique de RT-PCR semi-nichée.

Les produits d'amplification obtenus par RT-PCR semi-nichée à partir des prélèvements biopsiques sont déposés sur un gel d'agarose à 2%. La présence de PPAR γ 2 (251 pb) est indiquée par une flèche. La technique est décrite dans la partie « Matériels et Méthodes ».

N : tissu sain ; T : tumeur ; MT : marqueurs de taille.

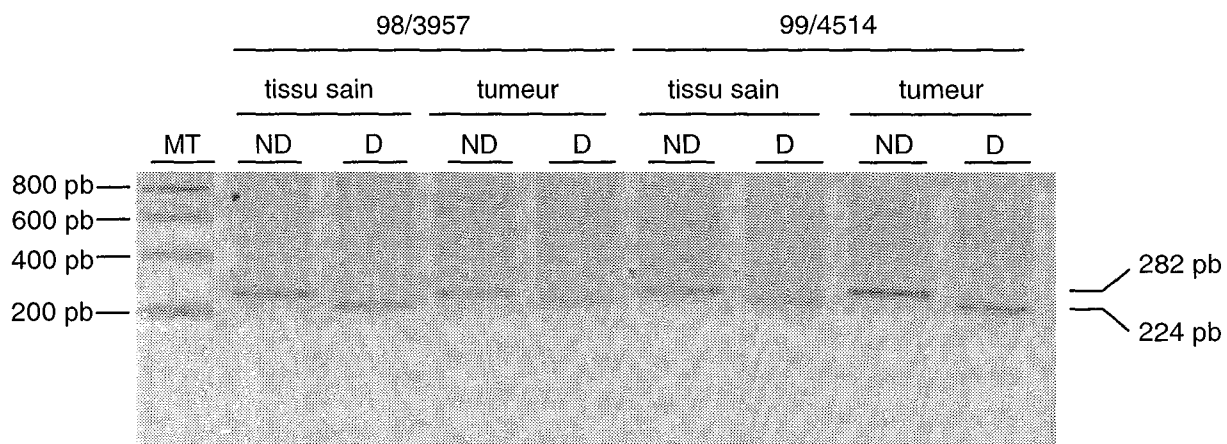


Figure 48 : Digestion du produit d 'amplification des ARNm de PPAR γ 2 obtenu après RT-PCR semi-nichée.

L 'amplification des ARNm de PPAR γ 2 produit un fragment de 282 pb. Ce produit est digéré par l 'enzyme de restriction *Hind*II. La taille de chaque bande d 'amplification ou de digestion est indiquée.

ND : fragment non digéré ; D : fragment digéré par *Hind*II; MT : marqueurs de taille en paires de bases (pb)

dans du TBE (figure 48). Le produit d'amplification est digéré confirmant la présence d'ARNm de PPAR γ 2 au niveau des tissus sains et tumoraux.

En fonction du siège tumoral, la présence d'ARNm de PPAR γ 2 est différente entre le colon droit et le colon gauche. Au niveau du colon gauche, les ARNm de PPAR γ 2 sont présents à 33,3% dans la tumeur ou dans le tissu sain adjacent à la tumeur (tableau 19). Par contre, au niveau colon droit, ils sont présents à 90% dans le tissu sain et à 70% dans la tumeur. La présence des ARNm de PPAR γ 2 ne diffère pas en fonction du stade considéré (tableau 19).

Cependant, la présence de transcrits de PPAR γ 2 dans les tumeurs n'est pas forcément corrélée à la présence de ces mêmes transcrits dans le tissu sain et *vice versa*. Par exemple, chez le patient 99/5984, les ARNm de PPAR γ 2 sont détectés dans le tissu sain et ils sont absents dans la tumeur. Réciproquement, chez le patient 98/6017, les ARNm de PPAR γ 2 sont uniquement présents dans la tumeur.

Parallèlement, nous avons étudié l'expression des ARNm de COX-1 et COX-2 et de la β -caténine. Plusieurs études ont montré un accroissement de l'expression de la β -caténine et une baisse de celle de COX-1 et l'induction de celle de COX-2 [79, 289]. Nous observons des résultats similaires confirmant l'élévation du taux des ARNm de la β -caténine et la baisse du taux des ARNm de COX-1. Par contre, nous avons constaté la présence de transcrits de COX-2 au niveau des tissus sains et une baisse significative de ce taux au niveau tumoral.

Les analyses par groupe de patients *id est* en fonction du stade TNM ou du siège tumoral conduisent à des conclusions similaires. Cet affinement dans l'exploitation statistique des résultats conduit à une diminution du nombre de patients inclus par groupe (14 ou 15 au lieu des 29). Plusieurs marqueurs, notamment COX-1 et β -caténine, présentent respectivement une diminution et un accroissement significatif du taux de transcrits entre tissus sains et tumeurs. Il en est de même pour les ARN des PPAR. Des résultats similaires ont été retrouvés pour l'expression de PPAR γ au niveau de tumeurs du poumon [292]. Aucune différence significative n'est observée dans l'expression de PPAR γ en fonction de l'âge et du sous-type pathologique. Cependant, l'expression de PPAR γ est augmentée de façon significative au niveau des tumeurs bien différenciées par rapport aux tumeurs moyennement ou peu différenciées [292].

Enfin, nous tenons à remarquer que :

- La détermination du taux des ARNm des marqueurs étudiés est effectuée par rapport à l'expression des ARNm de la G3PDH choisie comme étalon dans la technique de RT-PCR compétitive. Ce même étalon a été retenu par Sasaki et *al.* [292]. Il est par

conséquent possible que les niveaux d'expression des ARNm codant cette enzyme varie entre cellules normales et tumorales et entraîne un biais dans notre analyse statistique.

- La quantification est réalisée à partir de prélèvements composés de cellules du stroma et de cellules cancéreuses ou normales. Nous ne pouvons négliger le facteur de dilution des cellules cancéreuses dans la masse de cellules du stroma ce qui pourrait fausser la mesure du taux des transcrits.
- Pour certains patients, nous avons observé une élévation du niveau des ARNm des PPAR, notamment pour PPAR β et γ (figure 44). Il n'a pas été possible cependant de regrouper ces différents patients en terme de malignité (grade tumoral), de siège tumoral ou en fonction du stade TNM.

DISCUSSION GENERALE

Les principaux résultats obtenus au cours de ces travaux sont les suivants :

- les PPAR sont présents au cours du développement embryonnaire du tractus digestif humain. Il existe une expression spatio-temporelle propre à chacun des trois isotypes de PPAR. De plus, nous avons montré la présence des isotypes PPAR γ 1 et PPAR γ 2 au cours du développement de l'intestin [139].

- Nous avons choisi d'autre part d'étudier les niveaux d'expression des PPAR à partir d'un modèle cellulaire considéré comme un modèle de différenciation oncofoetale, la lignée cellulaire Caco-2 [140]. Nous constatons que les niveaux protéiques des isotypes α et γ augmentent et semblent corrélés aux processus de différenciation des cellules Caco-2.

- Les taux des ARNm des trois isotypes de PPAR diminuent dans les adénocarcinomes coliques. Au niveau protéique, nous n'avons étudié que l'isotype PPAR γ et nous montrons que PPAR γ est plus fortement exprimée dans les adénocarcinomes coliques. Cependant, nous avons également constaté que la protéine n'est présente que dans le cytoplasme des cellules saines ou tumorales.

Ces résultats nous permettent les commentaires suivants :

Les PPAR jouent un rôle lors de la formation du tractus digestif et du développement de l'épithélium intestinal et colique. Il est probable que chaque isotype a un rôle précis au cours des processus de développement et de différenciation de l'épithélium intestinal :

PPAR α participe chez l'adulte à l'expression de gènes cibles tels ceux associés à la β oxydation peroxysomale, au transport des acides gras par les *fatty acid binding proteins* (ou FABP) [298, 360]. Ces quelques gènes sont régulés par l'activation de PPAR α . L'existence de souris viables malgré l'inactivation du gène PPAR α laisse cependant supposer que le développement du tractus digestif et que la différenciation de l'épithélium intestinal ne sont pas influencés par l'absence de PPAR α [105, 257]. Les résultats obtenus à partir de ces souris concernent essentiellement les activités hépatiques et l'homéostasie lipidique qui sont perturbés. Nous ne disposons pas de données concernant les modifications d'expression des gènes cibles de PPAR α au niveau de l'épithélium intestinal; il en va de même pour l'intégrité de l'épithélium intestinal adulte chez de telles souris.

PPAR β et PPAR γ sont fortement exprimés au cours du développement du tractus digestif chez l'Homme [139]. Les travaux réalisés chez la souris et le xénope indiquent que

l'expression de PPAR β précède celle de l'isotype γ [26, 73]. Le développement de l'épithélium intestinal implique la voie de signalisation Wnt/Wingless et des gènes homéotiques qui se révèlent être pour certains d'entre eux sous le contrôle de facteurs de transcription de la famille LEF/TCF comme le gène Cdx-1. Cette voie de signalisation est également impliquée dans la cancérogenèse colique (figure 6) [259, 362]. Les mutations affectant les gènes suppresseurs de tumeurs codant les protéines APC et β -caténine sont les mieux caractérisées et sont à l'origine de cellules cancéreuses [165]. Le génome de ces cellules ou une partie de ces cellules subira par la suite d'autres événements mutationnels conduisant à la progression tumorale (figure 49) : ce sont les mutations affectant successivement les gènes codant *K-ras*, *DCC* et P53. Les mutations de *K-ras* touchent le codon 12 [260] et sont détectées dès les adénomes intermédiaires [218, 304]. Les mutations de *K-ras* sont fréquemment observées après celles affectant le gène codant APC [293]. De plus, les mutations du gène *K-ras* sont plus fréquentes dans des cellules cancéreuses aneuploïdes que les cellules diploïdes ce qui suggère que les mutations affectant le gène *K-ras* apparaissent avec l'aneuploïdie [30]. Le gène codant la protéine DCC est absent dans 29 à 80% des cancers colorectaux [49] par perte du chromosome 18 [355, 356]. DCC est une protéine homologue des protéines de la famille des N-CAM (pour *Neural Cell Adhesion Molecules*) [127]. La perte de DCC est observée lors du passage de carcinomes intramuqueux à des carcinomes invasifs [355, 356]. Enfin, les mutations du gène codant p53 sont associées à moins de 10% des adénomes, mais concernent 31 à 80% des carcinomes. Elles surviennent après celles affectant le gène *K-ras* [60, 162]. La perte de fonction de p53 est associée avec des cancers plus agressifs caractérisés par la perte totale du chromosome 17 et la présence de métastases [11]. Ce modèle de la cancérogenèse colorectale n'est cependant qu'un outil de compréhension des mécanismes de développement des adénocarcinomes et la séquence des événements mutationnels décrits sont fréquemment associés dans des stades particuliers de la progression tumorale [165]. De plus, il apparaît actuellement que la genèse d'un cancer colorectal peut faire intervenir d'autres voies de signalisation en absence de mutations affectant les gènes décrits précédemment. Ainsi, Smith et al. [312] ont recherché la présence de mutations des gènes codant pour APC, *K-ras* et P53 dans des biopsies d'adénocarcinomes coliques provenant de 106 patients (64 hommes et 42 femmes). Seulement 6,6% des carcinomes présentent des mutations pour les trois marqueurs. 38,7 % des tumeurs contiennent des mutations pour l'un des gènes considérés. 27,1% des biopsies présentent des mutations affectant APC associées à celles de p53. Janssen et al. [148] ont obtenu des souris transgéniques exprimant le gène humain *K-ras* muté (k-Ras^{V12G}). 80% des souris développent des tumeurs intestinales et coliques en absence de mutation affectant le gène codant APC.

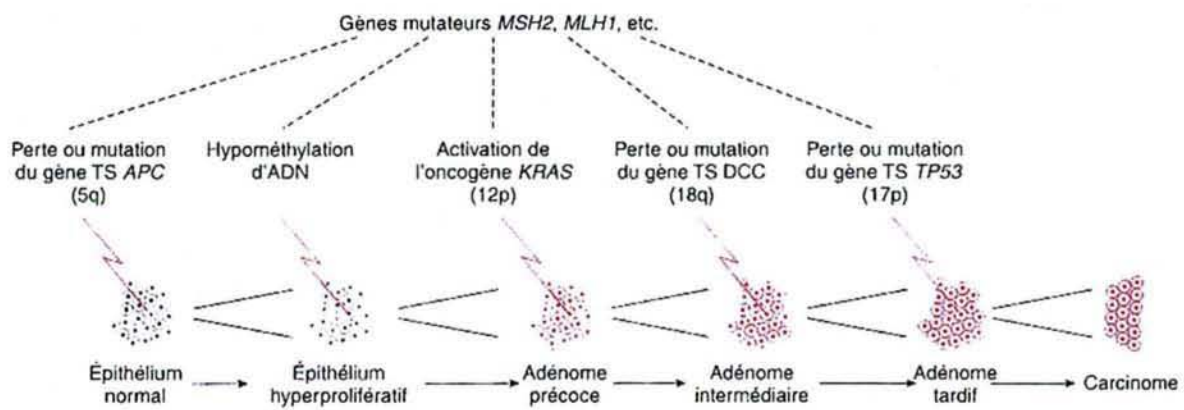


Figure 49 : Modèle séquentiel pour le développement du cancer colorectal (d'après [171]).

Il est possible d'envisager un rôle complémentaire des isotypes PPAR β et γ dans le développement et dans la différenciation de l'épithélium intestinal et dans les processus de cancérogénèse : En premier lieu, les travaux réalisés à partir de lignées cellulaires d'adénocarcinome colique ont montré que la transfection du gène codant la protéine APC réprime l'expression de PPAR β [125]. La voie Wnt/Wingless étant recouverte, les cellules ne se divisent plus et les processus apoptotiques peuvent être augmentés [225]. Il est par conséquent possible que PPAR β participe au statut prolifératif des cellules au niveau des cryptes ou en maintenant ou en participant à la dérégulation du cycle cellulaire dans les cellules tumorales. D'autre part, et à partir des résultats obtenus *in vitro* grâce à des lignées cellulaires continues, nous savons que l'activation de PPAR γ permet la sortie des cellules du cycle cellulaire [2], la synthèse de marqueurs de différenciation [229, 290] et finalement l'apoptose des cellules [167, 187]. L'expression par conséquent de PPAR γ peut être associée au processus final de la différenciation qui conduit à l'apoptose des cellules intestinales. Le rôle de PPAR γ dans ce schéma serait de favoriser les processus apoptotiques des cellules intestinales. L'activation de PPAR γ pourrait ainsi être obtenue par la présence de ligands, et notamment d'acides gras, absorbés provenant de la lumière intestinale [59, 361]. Il est possible également que PPAR γ participe aux processus apoptotiques induits par d'autres molécules tels que l'acide butyrique résultant de la dégradation bactérienne de fibres alimentaires par la flore intestinale. Cet acide gras exercerait un rôle protecteur de l'épithélium en favorisant l'apoptose de cellules intestinales [117]. Wachtershauser et *al.* [359] ont en effet montré que l'apoptose induite par le butyrate de sodium accroît sélectivement l'expression de PPAR γ au niveau des cellules Caco-2. Il en résulte que plusieurs gènes impliqués dans les processus apoptotiques devraient être contrôlés par PPAR γ . Il est important de noter qu'à notre connaissance, aucun gène cible de l'isotype PPAR γ n'a été clairement identifié dans cette voie de mort cellulaire.

Il est clair actuellement que la voie Wnt/Wingless joue un rôle important dans le processus de cancérogénèse colique. Cette voie de signalisation participe également à la différenciation des préadipocytes en adipocytes [17, 101], et à la *transdifférenciation* de myoblastes en adipocytes *in vitro* [280]. Parmi les protéines impliquées dans cette voie, la β -caténine participe à l'activation ou à la répression de gènes cibles en se liant aux facteurs de transcription de la famille LEF/TCF. Récemment plusieurs travaux ont révélé que l'expression de β -caténine pouvait être régulée par la présence de ligands de PPAR γ . Dans des cellules pancréatiques en culture, le traitement par une thiazolinédione modifie la localisation de la protéine qui de cytoplasmique devient membranaire et est associée à la E-cadhérine [242]. L'indométhacine, un anti inflammatoire non stéroïdien et ligand de PPAR γ , entraîne également une diminution de l'expression de β -caténine dans deux lignées de

cellules dérivant d'adénocarcinomes coliques [124]. L'ensemble de ces résultats suggère que la β -caténine est un gène cible de PPAR γ .

Un des gènes cibles de la voie de signalisation Wnt/Wingless est celui codant la protéine COX-2. COX-2 est responsable de la synthèse de PG H2 [364], précurseur de ligand de PPAR γ . L'expression de COX-2 est augmentée dans 85% des cancers colorectaux [165]. Cet accroissement implique un rôle de COX-2 dans l'altération du cycle cellulaire, la prolifération des cellules, un accroissement du potentiel métastatique et une inhibition de l'apoptose [197, 246, 349]. L'obtention de souris dont le gène codant COX-2 est invalidé a révélé que l'absence de COX-2 limite le développement de polypes intestinaux [246]. Tsuji et Dubois [349] ont montré chez le rat que les cellules intestinales traitées en présence de butyrate de sodium se différencient puis s'engagent dans les processus apoptotiques. La surexpression de COX-2 dans ces mêmes cellules confère une résistance à l'apoptose induite par le butyrate de sodium, mais les processus apoptotiques ne sont pas inversés ni par l'apport de PG exogène ni par l'addition de NSAID dans le milieu [349]. Lefebvre et *al.* [186] ont étudié l'impact de ligand de PPAR γ sur l'expression de COX-2 chez des souris C57Bl/6J-ApcMin⁺. L'activation de PPAR γ n'affecte pas l'expression de COX-2 ni chez les souris C57Bl/6J-ApcMin⁺ ni dans les cellules HT29 dérivant d'un adénocarcinome colique humain utilisée dans cette étude comme modèle humain [186]. Il n'est donc pas certain que la surexpression de COX-2 reflète un accroissement de la concentration intracellulaire de ligands de PPAR.

La localisation de PPAR γ n'est pas la même dans les trois situations biologiques étudiées ([139, 140] et parties II et III de ce mémoire). Techniquement, nous n'avons pas utilisé les mêmes sources d'anticorps ni les mêmes procédures de révélation des complexes antigène-anticorps (révélation FITC, révélation peroxydase et phosphatase).

Cependant, nous pouvons comparer les résultats obtenus *in vitro* avec les cellules Caco-2 et HT29 à ceux obtenus *in vivo* avec les biopsies de tissus sains et tumoraux. Dans ces deux situations, les signaux immunologiques sont différents. Quelle que soit la lignée cellulaire, PPAR γ est localisé dans le noyau des cellules différenciées ([140] et partie II de ce mémoire). Avec la même technique et le même anticorps, PPAR γ est exclusivement localisé au niveau du cytoplasme des cellules normales ou tumorales. Il est certain que les conditions de culture ne reproduisent pas les conditions des cellules *in situ*. De plus, il apparaît que l'expression de PPAR γ et que sa localisation ne dépendent pas de processus de différenciation des cellules mis en place au cours de la culture des cellules : les cellules HT29 contrairement aux cellules Caco-2 ne se différencient pas spontanément [388]. Il est

par conséquent difficile de relier l'expression de PPAR γ aux processus de différenciation/maturation des cellules.

Par contre, nos travaux sur les biopsies ont révélé que la localisation de PPAR γ est cytoplasmique. Une explication possible de ces résultats serait l'existence d'un mécanisme de rétention de la protéine sous une forme inactive éventuellement phosphorylée [1], empêchant la translocation de la protéine vers le noyau. L'importance de la phosphorylation de PPAR γ a été démontrée chez la souris lors de la différenciation des préadipocytes en adipocytes [137]. Des résultats similaires concernant la localisation cytoplasmique de PPAR γ ont été obtenus pour des biopsies de cancer du poumon et de neuroblastome en utilisant d'autres sources d'anticorps [39, 119, 330]. Enfin, cette localisation particulière de PPAR γ pourrait vraisemblablement dépendre *in situ* de l'environnement cellulaire.

Il est clair également que les données recueillies à partir de biopsies humaines tumorales diffèrent des résultats obtenus à partir des modèles de souris transgéniques [186, 284]. Chez la souris *Min* [226], l'influence de PPAR γ dans la progression tumorale est importante [284]. L'activation de cette protéine tend à accroître le nombre d'adénomes et favorise la progression tumorale. Ces souris présentent une mutation du gène codant la phospholipase A2 intestinale [67, 206], Ce gène est un gène suppresseur de tumeur qui confère une résistance à la cancérogenèse intestinale [57]. Dans ce contexte, la présence de ligands de PPAR γ favoriserait la formation tumorale au lieu d'avoir un rôle protecteur.

Nous avons également révélé la présence d'ARNm codant les deux isoformes de PPAR γ dans les cellules Caco-2 [140]. De plus, nous avons montré que PPAR γ 1 ne présentait pas d'exon A2 ; ce qui accroît les possibilités de transcrits de PPAR γ précédemment décrit chez le singe et chez l'homme [83, 84, 383]. Nous avons également révélé la présence des transcrits de PPAR γ 1 et γ 2 dans notre groupe de patients ; Un résultat similaire avait été obtenu précédemment [75]. Nous resterons cependant prudents quant à l'interprétation des résultats obtenus pour l'isoforme PPAR γ 2 dans les tissus sains et tumoraux. En effet, la mise en évidence de transcrits de PPAR γ 2 repose sur une technique de RT-PCR semi-nichée réalisée à partir d'ARN totaux extraits des biopsies de tissus normaux et tumoraux. Il apparaît que l'expression de PPAR γ 2 est plus importante au niveau du colon ascendant qu'au niveau du colon descendant. Il existerait d'autre part un certain polymorphisme dans notre groupe de patients ; PPAR γ 2 n'étant pas exprimé dans tous les cas. Cependant, le taux d'ARNm de cette isoforme est très faible. En conséquence, le taux d'ARNm de PPAR γ mesuré par RT-PCR compétitive ne correspond vraisemblablement qu'à celui de PPAR γ 1/3. De plus, nous ne pouvons affirmer que les

ARNm de PPAR γ 2 mis en évidence par la technique utilisée présente une organisation normale. Plusieurs travaux suggèrent en effet chez l'Homme et chez le rat, la présence d'isoformes de PPAR γ : Chez l'Homme, Sarraf et *al.* [291] ont montré l'existence de la protéine PPAR γ de taille réduite. Chez le rat traité par le fénofibrate, Casas et *al.* [36] ont montré l'existence d'une protéine tronquée immunologiquement apparentée à PPAR γ 2 dont la taille a été estimée à 45 kDa. Cette protéine a une localisation mitochondriale. La recherche d'un transcrit de PPAR γ 2 codant une protéine de taille réduite a été effectuée au laboratoire, sans succès actuellement. Nous avons également, à partir de la même source d'anticorps utilisés par Casas et *al.* [36], recherché la présence de PPAR γ 2 au niveau de lignées cellulaires continues et notamment les cellules Caco-2 (résultats personnels H. Schohn). Les résultats obtenus tendent à montrer qu'il existe une protéine PPAR γ 2 de taille réduite localisée également dans les mitochondries des cellules Caco-2. Cette protéine tronquée pourrait être le produit de la traduction d'un ARNm différent de celui codant la forme habituelle de PPAR γ 2 ou elle serait le résultat d'un clivage protéolytique de la protéine entière [36].

Les travaux sur les niveaux d'expression des PPAR dans les adénocarcinomes coliques pourraient être complétés par plusieurs recherches :

- Tout d'abord, il serait souhaitable d'augmenter le nombre de patients atteints d'adénocarcinomes de grade T2. Ce grade est sous-représenté dans notre cohorte de patients.
- Nous avons mesuré les taux des ARNm dans des biopsies entières et non dans des cellules cancéreuses isolées. L'utilisation de la microdissection sur coupes pourraient éventuellement nous permettre d'isoler les cellules cancéreuses et d'envisager une quantification plus affinée des taux des ARNm des PPAR dans les adénocarcinomes coliques
- Au niveau protéique, nous n'avons pu analyser par immunocytochimie que la présence de PPAR γ ; nous ne disposons pas actuellement de résultats probants et interprétables pour les isotypes PPAR α et β . D'autres travaux sont nécessaires pour rechercher une éventuelle corrélation entre les niveaux d'expression de PPAR γ et ceux de PPAR α et β . Ce travail doit être envisagé en fonction de la topographie et en fonction du degré de dysplasie. Pour cela, il nous paraît important de tester des solutions d'anticorps anti-PPAR α et anti-PPAR β produits par d'autres sociétés. Les éventuelles relations existant entre l'expression de chaque PPAR et le renouvellement cellulaire (cinétique de prolifération et mort cellulaire par apoptose) devront être abordées en pratiquant des techniques immunocytochimiques multiples sur la

même coupe. Les résultats obtenus en immunohistochimie sur des coupes adjacentes (partie III de ce mémoire) ne permettent pas de conclure quant au rôle de PPAR γ dans le renouvellement cellulaire. S'il apparaît que ces variations ont une valeur pronostique, l'indépendance de ce facteur par rapport aux facteurs pronostiques et prédictifs classiques devra être étudiée. Enfin nous avons constaté que PPAR γ est fortement exprimé dans les cellules tumorales mucosécrétantes. Ces observations suggèrent que la présence de PPAR γ peut-être corrélée au type histologique des cellules. Pour valider cette hypothèse, il faudra d'une part augmenter le nombre de tumeurs notamment mucosécrétantes à analyser et réaliser une étude statistique afin de connaître l'incidence de PPAR γ au niveau de ce type histologique. Parallèlement, nous envisageons de rechercher la présence de PPAR γ dans les lignées cellulaires mucosécrétantes. Plusieurs lignées ont en effet été établies et caractérisées comme les sous-populations sélectionnées à partir de la lignée cellulaire HT29 [194]

- Les isotypes PPAR γ et β sont impliqués dans les processus de cancérogenèse et de croissance de la tumeur. Ces rôles passent obligatoirement par l'activation ou la répression de gènes cibles peu ou pas identifiés actuellement. La recherche de ces gènes, et notamment ceux impliqués dans le renouvellement cellulaire et dans le processus d'apoptose, permettra d'attribuer un rôle précis aux différents isotypes de PPAR dans la cancérogenèse.

B.C.U. - VILLERS LÉZ-NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique - BP 11
54601 VILLERS-LES-NANCY Cédex

Centre de Recherche en Économie Industrielle
Université de Bourgogne - UMR 5013
Fédération de Recherche Économie Industrielle - BP 11
64001 VILLENIS-LES-NANCY Cédex

BIBLIOGRAPHIE

1. Adams, M., M. Reginato, D. Shao, M. Lazar, and V. Chatterjee. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor γ is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* 272: 5128-5132, 1997.
2. Altiok, S., M. Xu, and B. M. Spiegelman. PPAR gamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Gene Develop* 11: 1987-1998, 1997.
3. Amri, E.-Z., F. Bonino, G. Ailhaud, N. A. Abumrad, and P. A. Grimaldi. Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 2367-2371, 1995.
4. Aoyama, T., J. M. Peters, N. Iritani, T. Nakajima, K. Furihata, T. Hashimoto, and F. J. Gonzalez. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem* 273: 5678-5684, 1998.
5. Asano, T., M. Wakisaka, M. Yoshinari, K. Iino, K. Sonoki, M. Iwase, and M. Fujishima. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPAR γ 1) expresses in rat mesangial cells and PPAR γ agonists modulate its differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1497: 148-154, 2000.
6. Asou, H., W. Verbeek, E. Williamson, E. Elstner, T. Kubota, N. Kamada, and H. P. Koeffler. Growth inhibition of myeloid leukemia cells by troglitazone, a ligand for peroxisome proliferator activated receptor gamma, and retinoids. *Int J Oncol* 15: 1027-1031, 1999.
7. Auboeuf, D., J. Rieusset, L. Fajas, P. Vallier, V. Freing, J. Riou, M. Lavielle, J. Auwerx, and H. Vidal. 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.
8. Aviv, H., and P. Leder. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligo thymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1408-1412, 1972.
9. Avrameas, S. Coupling of enzymes to protein with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 6: 43-52, 1969.
10. Baeg, G., A. Matsumine, T. Kuroda, R. Bhattacharjee, I. Miyashiro, K. Toyoshima, and T. Akiyama. The tumor suppressor gene product APC blocks cell cycle progression from G0/G1 to S phase. *EMBO J* 14: 5618-5625, 1995.
11. Baker, S., E. Fearon, J. Nigro, and e. al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217-223, 1989.
12. Barak, Y., M. C. Nelson, E. S. Ong, Y. Z. Jones, P. Ruiz-Lozano, K. R. Chien, A. Koder, and R. M. Evans. PPARgamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4: 585-595, 1999.
13. Barger, P., J. Brandt, T. Leone, C. Weinheimer, and D. Kelly. Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor- α during cardiac hypertrophic growth. *J Clin Invest* 105: 1723-1730, 2000.
14. Basu-Modak, S., O. Braissant, P. Escher, B. Desvergne, P. Honegger, and W. Wahli. Peroxisome proliferator-activated receptor β regulates acyl-coA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures. *J Biol Chem* 274: 35881-35888, 1999.
15. Baudhuin, S. B., H. Beaufay, Y. Rahman-Li, O. Z. Sellinger, R. Wattiaux, P. Jacques, and C. deDève. Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-aminoacid oxidase and catalase in rat liver tissue. *Biochem. J.* 92: 179-184, 1964.
16. Beck, F., S. Plummer, P. V. Senior, S. Byrne, S. Green, and W. J. Brammar. The ontogeny of peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in the mouse and the rat. *Proc. R. Soc. Lond. B* 247: 83-87, 1992.
17. Bennett, C., S. Ross, K. Longo, L. Bajnok, N. Hemati, K. Johnson, S. Harrison, and O. MacDouglas. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem* 277: 30998-31004, 2002.
18. Bhanot, P., M. Brink, C. Samos, J. Hsieh, W. Wang, J. Macke, D. Andew, J. Nathans, and R. Nusse. A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a wingless receptor. *Nature* 282: 225-230, 1996.
19. Biens, M., and H. Clevers. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103: 311-320, 2000.
20. Bodmer, W., C. Bailey, J. Bodmer, H. Bussey, A. Ellis, P. Gorman, F. Lucibello, V. Murday, S. Rider, and P. Scambler. Localization of the gene for familial polyposis on chromosome 5. *Nature* 238: 614-616, 1987.
21. Bogazzi, F., L. D. Hudson, and V. M. Nikodem. A novel heterodimerization partner for thyroid hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 169: 11683 - 11686, 1994.
22. Borckman, J. A., R. A. Gupta, and R. N. Dubois. Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 115: 1049-1055, 1998.

23. Bradbury, J., C. Niemeyer, T. Dale, and P. Edwards. Alterations of the growth characteristics of the fibroblast cell line C3H 10T1/2 by members of the Wnt gene family. *Oncogene* 9: 2597-2603, 1994.
24. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
25. Braissant, O., F. Fufelle, C. Scotto, M. Dauca, and W. Wahli. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137: 354-366, 1996.
26. Braissant, O., and W. Wahli. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology* 139: 2748-2754, 1998.
27. Brandt, J. M., F. Djouadi, and D. P. Kelly. Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 273: 23786-23792, 1998.
28. Brockman, J. A., R. A. Gupta, and R. N. Dubois. Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 115: 1049-1055, 1998.
29. Buffa, R., C. Capella, P. Fontana, L. Usellini, and E. Solcia. Type of endocrine cells in the human colon and rectum. *Cell Tissue Res* 192: 227-240, 1978.
30. Burner, G., and L. Loeb. Mutations of the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2403-, 1989.
31. Bussey, H. Familial polyposis coli. Johns Hopkins University Press, 1975.
32. Cablé, S., M. Kedinger, and M. Dauça. Peroxisomes and peroxisomal enzymes along crypt villus rat intestine. *Differentiation* 54: 99-108, 1993.
33. Cabrera, C., M. Alonso, P. Johnston, R. Phillips, and P. Lawrence. Phenocopies induces with antisense RNA identify the wingless gene. *Cell* 50: 659-663, 1987.
34. Camp, H. S., and S. R. Tafuri. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272: 10811-10816, 1997.
35. Camp, H. S., A. L. Whitton, and S. R. Tafuri. PPARgamma activators down-regulate the expression of PPARgamma in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Letters* 447: 186-190, 1999.
36. Casas, F., L. Domenjoud, P. Rochard, R. Hatier, A. Rodier, L. Daury, P. Kremarik-Bouillaud, P. Becuwe, J. Keller, H. Schohn, C. Wrutniak-Cabello, G. Cabello, and M. Dauça. A 43 kDa protein related to PPAR γ 2, induces by peroxisome proliferators, is located in the mitochondrial matrix. *FEBS Letters* 478: 4-8, 2000.
37. Casas, F., T. Pineau, P. Rochard, A. Rodier, L. Daury, M. Dauça, G. Cabello, and C. Wrutniak-Cabello. New molecular aspects of regulation of mitochondrial activity by fenofibrate and fasting. *FEBS Letters* 482: 71-74, 2000.
38. Cattley, R. C., J. DeLuca, C. Elcombe, P. Fenner-Crisp, B. G. Lake, D. S. Marsman, T. A. Pastoor, J. A. Popp, D. E. Robinson, B. Schwetz, J. Tugwood, and W. Wahli. Do peroxisome proliferating compounds pose a hepatocarcinogenic hazards to humans ? *Regul.Toxicol. Pharmacol.* 27: 47-60, 1998.
39. Chang, T., and E. Szabo. Induction of differentiation and apoptosis by ligands of peroxisome proliferator-activated receptor γ in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 60: 1129-1138, 2000.
40. Chattopadhyay, N., D. P. Singh, O. Heese, M. M. Godbole, T. Sinohara, P. M. Black, and E. M. Brown. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human astrocytic cells : PPAR γ agonists as inducers of apoptosis. *J. Neurosci Res* 61: 67-74, 2000.
41. Chawla, A., Y. Barak, L. Nagy, D. Liao, P. Tontonoz, and R. M. Evans. PPAR- γ dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nature Med* 7: 48-52, 2001.
42. Chawla, A., E. J. Schwartz, D. D. Dimaculangan, and M. A. Lazar. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ : adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135: 798-800, 1994.
43. Chen, Z., S. Ishibashi, S. Perrey, and e. al. Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 21: 372-377, 2001.
44. Cheng, H., and C. Leblond. Origin and differentiation of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* 141: 537-562, 1974.
45. Cherkaoui-Malki, M., Y. C. Lone, M. Corral-Debrinski, and N. Latruffe. Differential proto-oncogene mRNA induction from rats treated with peroxisome proliferators. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 855-861, 1990.

46. Chevalier, S., and R. A. Roberts. G1-arrested FaO cells re-enter the cell cycle upon stimulation with the rodent non-genotoxic hepatocarcinogen nafenopin. *Carcinogenesis* 20: 1209-1213, 1999.
47. Chevalier, S., and R. A. Roberts. Perturbation of rodent hepatocyte growth control by nongenotoxic hepatocarcinogens: mechanisms and lack of relevance for human health (review). *Oncol Rep* 5: 1319-1327, 1998.
48. Chinetti, G., S. Lestavel, V. Bocher, A. T. Remaley, B. Neve, I. P. Torra, E. Teissier, A. Minnich, M. Jaye, N. Duverger, H. B. Brewer, J. Fruchart, V. Clavey, and B. Staels. PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nature Med* 7: 53-58, 2001.
49. Cho, K., J. Oliner, J. Simons, L. Hedrick, E. Fearon, A. Preisinger, P. Hedge, G. Silverman, and B. Vogelstein. The DCC gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. *Genomics* 19: 525-531, 1994.
50. Chomczynski, P., and N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987.
51. Christensen, J. G., A. J. Gonzales, R. C. Cattley, and T. L. Goldsworthy. Regulation of apoptosis in mouse hepatocytes and alteration of apoptosis by nongenotoxic carcinogens. *Cell Growth Differ* 9: 815-825, 1998.
52. Chu, R., D. Madison, Y. Lin, P. Kopp, M. S. Rao, J. L. Jameson, and J. K. Reddy. Thyroid hormone (T3) inhibits ciprofibrate-induced transcription of genes encoding beta-oxidation enzymes : cross talk between peroxisome proliferator and T3 signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11593-11597, 1995.
53. Claassen, G., and S. Hann. A role for transcriptional repression of p21^{CIPI} by c-myc in overcoming transforming growth factor β - induced cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9498-9503, 2000.
54. Clatworthy, J., and V. Subramanian. Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. *Mechanisms Dev* 101: 3-9, 2001.
55. Clay, C. E., A. M. Namen, G. I. Atsumi, M. C. Willingham, K. P. High, T. E. Kute, A. J. Trimboli, A. N. Fonteh, P. A. Dawson, and F. H. Chilton. Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis* 20: 1905-1911, 1999.
56. Committee, N. R. N. A unified nomenclature system for the nuclear receptor family. *Cell* 97: 161-163, 1999.
57. Cormier, R. T., K. Hong, R. Halberg, T. Hawkins, P. Richardson, R. Mulherkar, W. Dove, and E. Lander. Secretory phospholipase PLA2 confers resistance to intestinal tumorigenesis. *Nat Genet* 17: 88-91, 1997.
58. Corton, J. C., P. J. Lapinskas, and F. J. Gonzalez. Central role of PPAR α in the mechanism of action of hepatocarcinogenic peroxisome proliferators. *Mutation Res.* 448: 139-151, 2000.
59. Cummings, J. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 22: 763-779, 1981.
60. Cunningham, J., J. Lust, D. Schaid, G. Bren, H. Carpenter, E. Rizza, J. Kovach, and S. Thibodeau. Expression of p53 and 17p allelic loss in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1992: 1974-1980, 1994.
61. Dauça, M., S. Cable, R. Calvert, S. Colin, J. Schilt, B. Leheup, J. Keller, and D. Menard. Peroxisomes and peroxisomal enzymes in the human fetal small intestine. *Biol Neonate* 69: 21-21, 1996.
62. DeArcangelis, A., P. Neuville, R. Boukamel, O. Lefebvre, M. Kedingler, and P. Simon-Assmann. Inhibition of laminin α -1 chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J Cell Biol* 133: 417-430, 1996.
63. Delerive, P., F. Martin-Nizard, G. Chinetti, F. Trottein, J. C. Fruchart, J. Najib, P. Duriez, and B. Staels. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 85: 394-402, 1999.
64. DeLomos, C. The ultrastructures of endocrin cells in the corpus of the stomach of human fetuses. *Am J Anat* 148: 359-384, 1977.
65. Demetri, G., C. Fletcher, E. Mueller, P. Sarraf, R. Naujoks, N. Campbell, B. Spiegelman, and S. Singer. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3951-3956, 1999.
66. Devchand, P. R., H. Keller, J. M. Peters, M. Vazquez, F. J. Gonzalez, and W. Wahli. The PPAR alpha-leukotriene B-4 pathway to inflammation control. *Nature* 384: 39-43, 1996.

67. Dietrich, W. F., E. Lander, J. Smith, A. Moser, K. Gould, C. Luongo, N. Borenstein, and W. Dove. Genetic identification of *Mom-1*, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. *Cell* 75: 631-639, 1993.
68. Djouadi, F., C. J. Weinheimer, J. E. Saffitz, C. Pitchford, J. Bastin, F. J. Gonzalez, and D. P. Kelly. A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha- deficient mice. *J Clin Invest* 15: 1083-1091, 1998.
69. Dowell, P., J. E. Ishmael, D. Avram, V. J. Peterson, D. J. Nevriy, and M. Leid. Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein. *J Biol Chem* 274: 15901-15907, 1999.
70. Dowell, P., J. E. Ishmael, D. Avram, V. J. Peterson, D. J. Nevriy, and M. Leid. p300 functions as a coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 272: 33435-33443, 1997.
71. Dowell, P., V. J. Peterson, T. M. Zabriskie, and M. Leid. Ligand-induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha conformational change. *J Biol Chem* 272: 2013-2020, 1997.
72. Dreyer, C., H. Keller, A. Mahfoudi, V. Laudet, G. Krey, and W. Wahli. Positive regulation of the peroxisomal β -oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol. Cell* 77: 67-76, 1993.
73. Dreyer, C., G. Krey, H. Keller, F. Givel, G. Helftenbein, and W. Wahli. Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68: 879-887, 1992.
74. Drummond, F., J. Sowden, K. Morrison, and Y. Edwards. The caudal-type homeobox protein Cdx-2 binds to the colon promoter of the carbonic anhydrase 1 gene. *Eur J Biochem* 236: 670-681, 1996.
75. DuBois, R. N., R. Gupta, J. Brockman, B. S. Reddy, S. L. Krakow, and M. A. Lazar. The nuclear eicosanoid receptors, PPARgamma, is aberrantly expressed in colonic cancers. *Carcinogenesis* 19: 49-53, 1998.
76. Duprey, P., K. Chowdury, G. Dressler, R. Balling, L. Simon, J. Guenet, and P. Gruss. A mouse gene homologous to the Drosophila gene Caudal is expressed in epithelial cells in the embryonic intestine. *Genes Dev* 2: 1647-1654, 1988.
77. Eastmann, Q., and R. Grosschedl. Regulation of LEF/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol* 11: 233-240, 1999.
78. Eastwood, G. Gastrointestinal epithelial renewal. *Gastroenterology* 72: 962-, 1977.
79. Eberhart, C., R. Coffey, A. Radhika, F. Giardiello, S. Ferrenbach, and R. Dubois. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 107: 1183-1188, 1994.
80. Elbrecht, A., Y. Chen, C. Cullinan, N. Hayes, M. Leibowitz, D. Moller, and J. Berger. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator-activated receptors γ 1 and γ 2. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 431-437, 1996.
81. Ellis, C. N., J. Varani, G. J. Fisher, M. E. Zeigler, H. A. Pershadsingh, S. C. Benson, Y. Chi, and T. W. Kurtz. Troglitazone improves psoriasis and normalizes models of proliferative skin disease : ligands for peroxisome proliferator-activated receptor- γ inhibit keratinocyte proliferation. *Arch Dermatol* 136: 609-616, 2000.
82. Elstner, E., C. Muller, K. Koshizuka, E. A. Williamson, D. Park, H. Asou, P. Shintaku, J. W. Said, D. Heber, and H. P. Koeffler. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor- γ and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8806-8811, 1998.
83. Fajas, L., D. Auboeuf, E. Raspe, K. Schoonjans, A. M. Lefebvre, R. Saladin, J. Najib, M. Laville, J. C. Fruchart, S. Deeb, A. VidalPuig, J. Flier, M. R. Briggs, B. Staels, H. Vidal, and J. Auwerx. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR gamma gene. *J Biol Chem* 272: 18779-18789, 1997.
84. Fajas, L., J. C. Fruchart, and J. Auwerx. PPARgamma3 mRNA : a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Letters* 438: 55_60, 1998.
85. Fang, F., G. Orend, N. Watanabe, T. Hunter, and E. Ruoslahti. Dependence of Cyclin E-CDK 2 kinase activity in cell anchorage. *Science* 271: 499-502, 1996.
86. Febbraio, M., E. Podrez, J. Smith, D. Hajjar, S. Hazen, H. Hoff, K. Sharma, and R. Silverstein. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 105: 1049-1056, 2000.
87. Feinberg, A. P., and B. Volgelstein. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13, 1983.

88. Fenoglio, C., R. Richard, and G. Kaye. Comparative ultrastructure features of normal, hyperplastic and adenomatous human colonic epithelium. *Gastroenterology* 69: 100-109, 1975.
89. Fenoglio-Preiser, C., A. Noffsinger, G. Stemmermann, P. Lantz, M. Listrom, and F. Rilke. *Gastrointestinal Pathology : an atlas and text. 2nd ed, Lipincott-Raven Publishers, 1296p , 1999.*
90. Filipe, M. Mucins in the human gastrointestinal epithelium: a review. *Invest Cell Pathol* 2: 195-216, 1979.
91. Fishel, R., M. Lescoe, M. Rao, N. Copeland, N. Jenkins, J. Garber, M. Kane, and R. Kolodner. *Cell* 75: 1027-1038, 1993.
92. Flint, N., F. Cove, and G. Evans. A low-temperature method for the isolation os small-intestinal epithelium along the crypt-villus axis. *Biochem J* 280: 331-334, 1991.
93. Fogh, J., and G. Trempe. New human tumor cell lines. *Human tumor cells in vitro* : 115-141, 1985.
94. Forman, B. M., J. Chen, and R. M. Evans. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4318-4323, 1997.
95. Forman, B. M., P. Tontonoz, J. Chen, R. P. Brun, B. M. Spiegelman, and R. M. Evans. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin j(2) is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83: 803-812, 1995.
96. Freedman, L. P. Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* 97: 5-8, 1999.
97. Freund, J., R. Boukamel, and A. Benazzouz. Gradient expression of Cdx along rat intestine throughout postnatal development. *FEBS Letters* 314: 163-166, 1992.
98. Garen, A., and C. Levinthal. A fine structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of E. coli. I. Purification and characterisation of alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta* 38: 470-483, 1960.
99. Gebel, T., M. Arand, and F. Oesch. Induction of the peroxisome proliferator activated receptor by fenofibrtae in rat liver. *FEBS Letters* 309: 37-40, 1992.
100. Gelman, L., G. Zhou, L. Fajas, E. Raspe, J. C. Fruchart, and J. Auwerx. p300 Interacts with the N- and C-terminal part of PPARgamma2 in a ligand-independent and -dependent manner, respectively. *J Biol Chem* 274: 7681-7688, 1999.
101. Gerhold, D., F. Liu, G. Jiang, Z. Li, J. Xu, M. Lu, J. Sachs, A. Bagchi, A. Fridman, D. Holder, T. Doebber, J. Berger, A. Elbrecht, D. Moller, and B. Zhang. Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Endocrinology* 143: 2106-2118, 2002.
102. Gervois, P., I. P. Torra, G. Chinetti, T. Gröttinger, G. Dubois, J. C. Fruchart, J. Fruchart-Najib, E. Leitersdorf, and B. Staels. A truncated human peroxisome proliferator-activated receptor α splice variant with dominant negative activity. *Mol Endocrinol* 13: 1535-1549, 1999.
103. Goetze, S., X. P. Xi, H. Kawano, T. Gotlibowski, E. Fleck, W. A. Hsueh, and R. E. Law. PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 33: 798-806, 1999.
104. Gonzalez, F. The role of peroxisome proliferator activated receptor α in the peroxisome proliferation, physiological homeostasis, and chemical carcinogenesis. *adv. Exp. Med. Biol.* 422: 109-125, 1997.
105. Gonzalez, F. J., J. M. Peters, and R. C. Cattley. Mechanism of action of the nongenotoxic peroxisome proliferators : role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *J Natl Cancer Inst* 90: 1702-1209, 1998.
106. Göttlicher, M., A. Demoz, D. Svensson, P. Thollet, R. K. Berge, and J. A. Gustafsson. Structural and metabolic requirements for activators of the peroxisome proliferator-activated receptor. *Biochem. Pharmacol.* 46: 2177-2184, 1993.
107. Grand, R., J. Watkins, and F. Torti. Development of the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 70: 790-810, 1976.
108. Granneman, J., R. Skoff, and X. Xang. Member of the peroxisome proliferator-activated receptor family of transcription factors is differentially expressed by oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 51: 563-573, 1998.
109. Greene, M. E., B. Blumberg, K. Kwan, G. L. Greene, and S. D. Nimer. Isolation and cloning of human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA. *Adv Exp Med Biol* 400A: 253-260, 1997.
110. Greene, M. E., B. Blumberg, O. W. McBride, H. F. Yi, K. Kronquist, K. Kwan, L. Hsieh, G. Greene, and S. D. Nimer. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA : expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr* 4: 281-299, 1995.

111. Grimaldi, P. A., L. Teboul, H. Inadera, D. Gaillard, and E. Z. Amri. Trans-differentiation of myoblasts to adipoblasts: triggering effects of fatty acids and thiazolidinediones. *Prostaglandin Leuk Essent Fatty Acids* 57: 71-75, 1997.
112. Groden, J., A. Thliveris, W. Samowitz, M. Carlson, L. Gelbert, H. Andersen, G. Joslyn, J. Stevens, L. Spirio, and M. Robertson. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66: 589-600, 1991.
113. Gulick, T., S. Cresci, T. Caira, D. D. Moore, and D. P. Kelly. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acids oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11012-11016, 1994.
114. Guo, X., and K. Liao. Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene* 251: 45-53, 2000.
115. Gupta, R. A., J. Tan, W. F. Krause, M. W. Geraci, T. M. Willson, S. K. Dey, and R. N. DuBois. Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor- δ in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13275-13280, 2000.
116. Haffen, K., M. Kedinger, and P. Simon-Assmann. Cell contact dependent regulation of enterocyte differentiation. in : *Human Gastrointestinal Development. Leberthal E (ed). Raven Press, New York*, : 19-40, 1989.
117. Hague, A., K. Manning, L. Hanlon, D. Huschtscha, D. Hart, and C. Paraskeva. Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *Int J Cancer* 55: 498-505, 1993.
118. Han, J., D. Hajjar, J. Feng, A. Gotto, and A. Nicholson. Transforming growth factor- β 1 (TGF β 1) and TGF- β 2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *J Biol Chem* 275: 1241-1246, 2000.
119. Han, S., M. Greene, J. Pitts, R. Wada, and N. Sidell. Novel expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in human neuroblastoma cells. *Clin Cancer Res* 7: 98-104, 2001.
120. Hanley, K., Y. Jiang, S. S. He, M. Friedman, P. M. Elias, D. D. Bikle, M. L. Williams, and K. R. Feingold. Keratinocyte differentiation is stimulated by activators of the nuclear hormone receptor PPAR α . *J Invest Dermatol* 110: 368-375, 1998.
121. Hanley, K., L. G. Komuves, D. C. Ng, K. Schoonjans, S. S. He, P. Lau, D. D. Bikle, M. L. Williams, P. M. Elias, J. Auwerx, and K. R. Feingold. Farnesol stimulates differentiation in epidermal keratinocytes via PPAR α . *J Biol Chem* 275: 11484-11491, 2000.
122. Hansen, J. B., H. Zhang, T. H. Rasmussen, R. K. Petersen, E. N. Flindt, and K. Kristiansen. Peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. *J Biol Chem* 276: 3175-3182, 2001.
123. Hart, M., J. Concordet, I. Lassot, I. Albert, R. dellosSantos, H. Durand, C. Perret, B. Rubinfeld, F. Margottin, R. Benarous, and P. Polakis. The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* 9: 207-210, 1999.
124. Hawcroft, G., M. D'Amico, C. Albanese, A. Markham, R. Pestell, and M. Hull. Indomethacin induces differential expression of beta-catenin, gamma-catenin and T-cell factor genes in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 23: 107-114, 2002.
125. He, T., T. Chan, B. Vogelstein, and K. Kinzler. PPAR δ is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 99: 335-345, 1999.
126. He, T., A. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L. daCosta, P. Morin, B. Vogelstein, and K. Kinzler. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281: 1509-1512, 1998.
127. Hedrick, L., K. Cho, R. Fearon, and e. al. The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev* 8: 1174-, 1994.
128. Heery, D., E. Kalkhonen, S. Hoare, and M. Parker. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387: 733-736, 1997.
129. Heinlein, C. A., H. J. Ting, S. Yeh, and C. Chang. Identification of ARA70 as a ligand-enhanced coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 274: 16147-16152, 1999.
130. Henning, S. Functional development of the gastrointestinal tract. in : *Johnson LR (ed) Physiology of the gastrointestinal tract. Raven press, New York* : 285-300, 1987.
131. Hermanek, P. UICC TNM Classification of malignant tumours. *Sobin LH (eds), 4th edn Springer-Verlag, Berlin*, 1987.

132. Hirase, N., T. Kanase, Y. Mu, K. Muta, T. Umemura, R. Takayenagi, and H. Nawata. Thiazolidinedione Induces Apoptosis and Monocytic Differentiation in the Promyelocytic Leukemia Cell Line HL60. *Oncology* 57: 17-26, 1999.
133. Hogan, M. L., and A. M. Shamsuddin. Large intestinal carcinogenesis. I. Promotional effect of dietary fatty acid isomers in the rat model. *J Natl Cancer Inst* 73: 1293-1296, 1984.
134. Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, and C. Harris. p53 Mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53, 1991.
135. Hryb, D. J., and J. F. Hogg. Chain length specificities of peroxisomal and mitochondrial beta oxidation in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87: 1200-1206, 1979.
136. Hsueh, W., S. Jackson, and R. Law. Control of vascular cell proliferation and migration by PPAR-g: a new approach to the macrovascular complications of diabetes. *Diabetes care* 24: 392-397, 2001.
137. Hu, E. D., J. B. Kim, P. Sarraf, and B. M. Spiegelman. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR gamma. *Science* 274: 2100-2103, 1996.
138. Hu, Y., J. Kazenwadel, and R. James. Isolation and characterization of the murine homeobox gene Cdx-1. Regulation of expression in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 268: 27214-27225, 1993.
139. Huin, C., N. Coriveau, A. Bianchi, J. Keller, P. Collet, P. Kremarik-Bouillaud, L. Domenjoud, P. Becuwe, H. Schohn, D. Menard, and M. Dauça. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the developing human fetal digestive tract. *J Histochem Cytochem* 48: 603-611, 2000.
140. Huin, C., H. Schohn, R. Hatier, M. Bentejac, L. Antunes, F. Plénat, M. Bugaut, and M. Dauça. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in differentiating human colon adenocarcinoma Caco-2. *Biol Cell* 94: 15-27, 2002.
141. Isseman, I., and S. Green. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645 - 650, 1990.
142. Itoh, K., V. Krupnik, and S. Sokol. Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase-3 and β -catenin. *Curr Biol* 8: 591-594, 1998.
143. Jackson, S., and L. Demer. Peroxisome proliferator-activated receptor activators modulate the osteoblastic maturation of MC3T3-E1 Preosteoblasts. *FEBS Letters* 471, 2000.
144. Jackson, S. M., F. Parhami, X. P. Xi, J. A. Berliner, W. A. Hsueh, R. E. Law, and L. L. Demer. Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2094-2104, 1999.
145. Jakson, L., A. Bennett, S. Watson, W. Whali, and C. Hawkey. Role of PPAR α in colonic malignancy. in *PPARs : From Basic Science to Clinical Applications* , 2001.
146. James, R., T. Erler, and J. Kazenwadel. Structure of the murine homeobox gene cdx-2. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J Biol Chem* 269: 15229-15237, 1994.
147. James, R., and J. Kazenwadel. Homeobox gene expression in the intestine epithelium of adult mice. *J Biol Chem* 266: 3246-3251, 1991.
148. Janssen, K., F. ElMarjou, D. Pinto, X. Sastre, D. Pouillard, C. Fouquet, T. Soussi, D. Louvard, and S. Robine. Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* 123: 492-504, 2002.
149. Jiang, C., A. T. Ting, and B. Seed. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391: 82-86, 1998.
150. Jiang, J., C. Johnson, and R. Zarnegar. PPAR- γ mediated transcriptional upregulation of the hepatocyte growth factor gene promoter via a novel composite cis-acting element. *J Biol Chem* 276: 25049-25056, 2001.
151. Johns, B. Developmental changes in the oesophageal epithelium in man. *J Anat* 86: 431-442, 1972.
152. Juge-Aubry, C. E., E. Hammer, C. Siegrist-Kaiser, A. Pernin, A. Takeshita, W. W. Chin, A. G. Burger, and C. A. Meier. Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J Biol Chem* 274: 10505-10510, 1999.
153. Kaestner, K., D. Silberg, P. Traber, and G. Schutz. The mesenchymal winged helix transcription factor Fkh6 is required for the control of gastrointestinal proliferation and differentiation. *Genes Dev* 11: 1583-1595, 1997.
154. Kaplanski, C., C. J. Pauley, T. G. Griffiths, T. T. Kawabata, and B. J. Ledwith. Differentiation of rat oval cells after activation of peroxisome proliferator-activated receptor α 43. *Cancer Res* 60: 580-587, 2000.

155. Karam, W. G., and B. I. Ghanayem. Induction of replicative DNA synthesis and PPAR alpha-dependent gene transcription by Wy-14 643 in primary rat hepatocyte and non-parenchymal cell co-cultures. *Carcinogenesis* 18: 2077-2083, 1997.
156. Kaye, G., C. Fenoglio, R. Pascal, and N. Lane. Comparative electron microscopic features of normal, hyperplastic, and adenomatous human colonic epithelium: variations in cellular structure relative to the process of epithelium differentiation. *Gastroenterology* 64: 926-945, 1973.
157. Kedinger, M., P. Simon, J. Grenier, and K. Haffen. Role of epithelial-mesenchymal interactions in the ontogenesis of intestinal brush-border enzymes. *Dev Biol* 86: 339-347, 1981.
158. Keelan, J. A., T. A. Sato, K. W. Marvin, J. Lander, R. S. Gilmour, and M. D. Mitchell. 15-Deoxy-Delta (12,14)-prostaglandin J(2), a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, induces apoptosis in JEG3 choriocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 579-585, 1999.
159. Keller, H., C. Dreyer, J. Medin, A. Mahfoudi, K. Ozato, and W. Wahli. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid-X receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2160-2164, 1993.
160. Keller, H., F. Givel, M. Perroud, and W. Wahli. Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. *Mol Endocrinol* 9: 794-804, 1995.
161. Kelly, L. J., P. P. Vicario, G. M. Thompson, M. R. Candelore, T. W. Doebber, J. Ventre, M. S. Wu, R. Meurer, M. J. Forrest, M. W. Conner, M. A. Cascieri, and D. E. Moller. Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. *Endocrinology* 139: 4920-4927, 1998.
162. Khine, K., D. Smith, and H. Goh. High frequency of allelic deletion on chromosome 17p in advanced colorectal cancer. *Cancer* 73: 18-, 1994.
163. Khiri, H., P. Reynier, N. Peyrol, B. Lérique, J. Torresani, and R. Plenell. Quantification multistandard RT-PCR assay using interspecies polymorphism. *Mol Cell Probes* 10: 201-211, 1996.
164. Kintscher, U., S. Goetze, S. Wakino, S. Kim, S. Nagpal, R. Chandraratna, K. Graf, E. Fleck, W. Hsueh, and R. Law. Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor ligands inhibit monocyte chemotactic protein-1-directed migration of monocytes. *Eur J Pharmacol* 410: 259-270, 2000.
165. Kinzler, K. W., and B. Vogelstein. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170, 1996.
166. Kitamura, S., Y. Miyazaki, S. Hiraoka, M. Toyota, Y. Nagasawa, S. Kondo, T. Kiyohara, Y. Shinomura, and Y. Matsuzawa. PPAR γ inhibits the expression of c-MET in human gastric cancers cells through the suppression of ETs. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 453-456, 1999.
167. Kitamura, S., Y. Miyazaki, Y. Shinomura, S. Kondo, S. Kanayama, and Y. Matsuzawa. Peroxisome proliferator-activated receptor γ induces growth arrest and differentiation of human colon cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 90: 75-80, 1999.
168. Kliewer, S. A. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4318-4323, 1997.
169. Kliewer, S. A. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83: 813-819, 1995.
170. Kliewer, S. A., B. M. Forman, B. Blumberg, E. S. Ong, U. Borgmeyer, D. J. Mangelsdorf, K. Umesonu, and R. M. Evans. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7355-7359, 1994.
171. Kliewer, S. A., K. Umesonu, D. J. Noonan, R. A. Heyman, and R. M. Evans. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358: 771-774, 1992.
172. Kondoh, N., C. W. Schweinfest, K. W. Henderson, and T. S. Papas. Differential expression of S19 ribosomal protein, laminin-binding protein, and human lymphocyte antigen class I messenger RNAs associated with colon carcinoma progression and differentiation. *Cancer Res* 52: 791-796, 1992.
173. Korinek, V., N. Barder, P. Moerer, E. vanDonselaar, G. Huls, P. Peters, and H. Clevers. Depletion of epithelial stem cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 19: 379-383, 1998.
174. Kremarik-Bouillaud, P., H. Schohn, and M. Dauça. Regional distribution of PPAR β in the cerebellum of the rat. *J. Chem. Neuroanat.* 19: 225-232, 2000.
175. Krey, G., O. Braissant, F. L'Horsset, E. Kalkhoven, M. Perroud, M. G. Parker, and W. Wahli. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-

- activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 11: 779-791, 1997.
176. Kroll, T., P. Sarraf, L. Pecciarini, C. Chen, E. Mueller, B. Spiegelman, and J. Fletcher. PAX8-PPAR γ 1 fusion in oncogene human thyroid carcinoma. *Science* 289: 1357-1360, 2000.
177. Kubota, T., K. Koshizuka, E. A. Williamson, H. Asou, J. W. Said, S. Holden, I. Miyoshi, and H. P. Koeffler. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res* 58: 3344-3352, 1998.
178. Lacroix, B., M. Kedinger, P. Simon-Assmann, M. Rousset, A. Zweibaum, and K. Haffen. Developmental pattern of brush border enzymes in the human fetal colon. Correlation with some morphogenetic events. *Early Human Develop* 9: 95-103, 1984.
179. Laemmli, E. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
180. Lauer, C., A. Volkl, S. Riedl, H. D. Fahimi, and K. Beier. Impairment of peroxisomal biogenesis in human colon carcinoma. *Carcinogenesis* 20: 985-989, 1999.
181. Law, R., W. Meehan, X. Xi, K. Graf, D. Wuthrich, W. Coats, D. Faxon, and W. Hsueh. Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J Clin Invest* 98: 1897-1905, 1996.
182. Lee, F., T. Lane, A. Kuo, G. Shackelford, and P. Leder. Insertional mutagenesis identifies a member of the Wnt gene family as a candidate oncogene in the mammary epithelium of int-2/Fg-3 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2268-2272, 1995.
183. Lee, H., W. Shi, P. Tontonoz, S. Wang, G. Subbanagounder, C. Hedrick, S. Hama, C. Borromeo, R. Evans, J. Berliner, and L. Nagy. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- α in oxidized phospholipid-induced synthesis of monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 by endothelial cells. *Circulation Res* 87: 516-521, 2000.
184. Lee, S., B. Nagy, A. Brooks, D. Wang, B. Paulweber, and B. Levy-Wilson. Members of the caudal family of homeodomain proteins repress transcription from the human apolipoprotein B promoter in intestinal cells. *J Biol Chem* 271: 707-718, 1996.
185. Lee, S., T. Pineau, J. Drago, E. Lee, J. Owens, D. Kroetz, P. Fernandez-Salguero, H. Whesphal, and F. Gonzalez. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell. Biol.* 15: 3012-3022, 1995.
186. Lefebvre, A. M., I. Chen, P. Desreumaux, J. Najib, J. C. Fruchart, K. Geboes, M. Briggs, R. Heyman, and J. Auwerx. Activation of the peroxisomes proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+mice. *Nat Med* 4: 1053-1057, 1998.
187. Lefebvre, M., B. Paulweber, L. Fajas, J. Woods, C. McCrary, J. F. Colombel, J. Najib, J. C. Fruchart, C. Datz, H. Vidal, P. Desreumaux, and J. Auwerx. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J Endocrinol* 162, 1999.
188. Legrain, P., and G. Chanreau. Pre-mRNA splicing : from intron recognition to catalysis. *Bull Inst Pasteur* 92: 153-173, 1994.
189. Lehmann, J., J. Lenhard, B. Oliver, G. Ringold, and S. Kliewer. Peroxisome proliferator activated receptor alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 272: 3406-3410, 1997.
190. Lehmann, J., L. B. Moore, T. S. Oliver, W. Wilkinson, T. Willson, and S. Kliewer. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J. Biol. Chem.* 270: 12953-12956, 1995.
191. Lemberger, T., R. Saladin, M. Vazquez, F. Assimacopoulos, B. Staels, B. Desvergne, W. Wahli, and J. Auwerx. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J Biol Chem* 271: 1764-1769, 1996.
192. Lemberger, T., B. Staels, R. Saladin, B. Desvergne, J. Auwerx, and W. Wahli. Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor α gene by glucocorticoid. *J. Biol. Chem.* 269: 24527-24530, 1994.
193. Leppert, M., M. Dobbs, P. Scambler, P. O'Connell, Y. Nakamura, D. Stauffer, S. Woodward, R. Burt, J. Hughes, and E. Gardner. The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science* 238: 1411-1413, 1987.
194. Lessufleur, T., A. Barbat, E. Dussaulx, and A. Zweibaum. Growth adaptation to methotrexate of HT29 human colon carcinoma cells associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res* 50: 6334-6343, 1990.
195. Lev, R., and D. Orlie. Histochemical and radioautographic studies of normal human fetal colon. *Histochem* 39: 301-311, 1974.

196. Levine, A., J. Momand, and C. Finlay. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 315: 453-1991.
197. Levy, G. D. Prostaglandin H synthetases, non steroidal anti-inflammatory drugs and colon cancer. *FASEB Journal* 11: 234-247, 1997.
198. Lewin, K., T. Ulich, K. Yang, and L. Layfield. The endocrine cells of the gastrointestinal tract. Tumors. Part II. *Pathol Annu* 21: 181-215, 1986.
199. Li, A., K. Brown, M. Silvestre, T. Willson, W. Palinski, and C. Glass. Peroxisome proliferator-activated receptor ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 106: 523-531, 2000.
200. Lickert, H., C. Domon, G. Huls, C. Wherle, I. Duluc, H. Clevers, B. Meyer, J. Freund, and R. Kemler. Wnt/ β -catenin signalling regulates the expression of the homeobox gene *Cdx1* in embryonic intestine. *Development* 127: 3805-3813, 2000.
201. Lim, H., R. A. Gupta, W. G. Ma, B. C. Paria, D. E. Moller, J. D. Morrow, R. N. DuBois, J. M. Trzaskos, and S. K. Dey. Cyclooxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev* 13: 1561-1574, 1999.
202. Lin, Q., S. E. Ruuska, N. S. Shaw, D. Dong, and N. Noy. Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochemistry* 38: 185-190, 1999.
203. Lorentz, O., I. Duluc, A. DeArcangelis, P. Simon-Assmann, M. Kedinger, and J. Freund. Key role of the *Cdx2* homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol* 139: 1553-1565, 1997.
204. Lynch, H., T. Smyrk, T. McGinn, S. Lanspa, J. Cavalieri, J. Lynch, S. Slominski-Castor, M. Cayouette, I. Priluck, and M. Luce. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP): a phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. *Cancer* 76: 2427-2433, 1995.
205. Lynch, J., E. Suh, D. Silberg, S. Rulyak, and P. Traber. The caudal related homeodomain protein *Cdx1* inhibits proliferation of intestinal epithelial cells by down-regulation of D-type cyclins. *J Biol Chem* 275: 4499-4506, 2000.
206. MacPhee, M., K. Chepenik, R. Liddell, K. Nelson, L. Siracusa, and A. Buchberg. The secretory phospholipase A2 gene is a candidate for the *Mom1* locus, a major modifier of APCMin-induces intestinal neoplasia. *Cell* 81: 957-966, 1995.
207. Madara, J., M. Neutra, and J. Trier. Junctional complexes in fetal rat small intestine during morphogenesis. *Dev Biol* 86: 170-178, 1981.
208. Mafune, K. Expression of a Mr 32,000 laminin-binding protein messenger RNA in human colon carcinoma correlates with disease progression. *Cancer Res* 50: 3888-3891, 1990.
209. Mann, B., M. Gelos, A. Siedow, M. L. Hanski, A. Gratchev, M. Ilyas, W. F. Bodmer, M. P. Moyer, E. O. Riecken, H. J. Buhr, and C. Hanski. Target genes of β -catenin-Tcell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1603-1608, 1999.
210. Mansen, A., H. Guardiolaiaz, J. Rafter, C. Branting, and J. A. Gustafsson. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in the mouse colonic mucosa. *Biochem Biophys Res Commun* 222: 844-851, 1996.
211. Mansouri, A., K. Chowdhury, and P. Gruss. Follicular cells of the thyroid gland require Pax-8 gene function. *Nat Genet* 19: 87-90, 1998.
212. Marsman, D. S., R. C. Cattley, J. G. Conway, and J. A. Popp. Relationship of hepatic peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and [4chloro-6-(2,3-xylylidino)-2pyrimidinylthio] acetic acid (Wy-14,643) in rats. *Cancer Res* 48: 6739-6744, 1988.
213. Martin, G., K. Schoojans, A. Lefebvre, B. Staels, and J. Auwerx. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem* 272: 28210-28217, 1997.
214. Marx, N., G. Shuhova, C. Murphy, P. Libby, and J. Plutzky. Macrophages in human atheroma contain PPARgamma : differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPARGamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J. Pathol* 153, 1998.
215. Mascaró, C., E. Acosta, J. A. Ortiz, P. F. Marrero, F. G. Hegardt, and D. Haro. Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 273: 8560-8563, 1998.
216. Maskens, A., and E. Deschner. Tritiated thymidine incorporation into epithelial cells of normal-appearing colorectal mucosa of cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 58: 1221-1224, 1977.
217. Masters, C. J., and D. I. Crane. On the role of the peroxisome in ontogeny, ageing and degenerative disease. *Mesh. Ageing Dev.* 80: 69-83, 1995.

218. McLellan, E., R. Owen, J. Stepiewska, and e. al. High frequency of K-ras mutations in sporadic colorectal adenomas. *Gut* 34: 392, 1993.
219. Mecklin, J. Frequency of hereditary colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 93: 1021-1025, 1987.
220. Messer, M., and A. Dalqvist. A one-step ultramicromethod for the assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.* 14: 376-392, 1966.
221. Miyata, K., S. McCaw, L. Meertens, H. Patel, R. Rachubinski, and J. Capone. Receptor-interacting protein140 interacts with and inhibits transactivation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and liver-X-receptor alpha. *Mol Cell Endocrinol* 146: 69-76, 1998.
222. Modrich, P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Trends Genet* 25: 229-253, 1991.
223. Molenaar, M., M. vandeWetring, M. Oosterwegel, J. Peterson-Maduro, S. Godsave, V. Korinek, J. Roose, O. Destree, and H. Clevers. XTcf-3 transcription factor mediated beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86: 391-399, 1996.
224. Morin, P., A. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein, and K. Kinzler. Activation of β -catenine-TCF signalling in colon cancer by mutation in β -catenin or APC. *Science* 275: 1787-1790, 1997.
225. Morin, P., B. Vogelstein, and K. Kinzler. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7950-7954, 1996.
226. Moser, A. R. ApcMin : a mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis. *Eur J Cancer* 31A: 1061-1064, 1995.
227. Motojima, K., P. Passilly, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, and N. Latruffe. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and Inducer-specific manner. *J Biol Chem* 273: 16710-16714, 1998.
228. Motomura, W., T. Okumura, N. Takahashi, T. Obara, and Y. Kohgo. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27^{kip} in human pancreatic carcinoma cells. , 2000.
229. Mueller, E., P. Sarraf, P. Tontonoz, R. M. Evans, K. J. Martin, M. Fletcher, S. Singer, and B. M. Spiegelman. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR γ . *Mol Cell* 1: 465-470, 1998.
230. Mukherjee, R., L. Jow, G. E. Croston, and J. R. Paterniti. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem* 272: 8071-8076, 1997.
231. Mukherjee, R., J. Strasser, L. Jow, P. Hoener, J. R. Paterniti, and R. A. Heyman. RXR agonists activate PPARalpha-inducible genes, lower triglycerides, and raise HDL levels in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 272-276, 1998.
232. Murgia, C., P. Blaikie, N. Kim, M. Dans, H. Petrie, and F. Giancotti. Cell cycle and adhesion defects in mice carrying a targeted deletion of the integrin β 4 cytoplasmic domain. *EMBO J* 17: 3940-3951, 1998.
233. Nagy, L., P. Tontonoz, J. G. Alvarez, H. Chen, and R. M. Evans. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93: 229-240, 1998.
234. Nakshatri, H., and P. Bhat-Nakshatri. 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* 26: 2491-2499, 1998.
235. Neutra, M., and H. Padykula. The gastrointestinal tract. in : Weiss L (ed) *Modern concepts of Gastrointestinal Histology*. Amsterdam: Elsevier, 693p , 1983.
236. Nishisho, I., Y. Nakamura, Y. Miyoshi, Y. Miki, H. Ando, A. Horii, K. Koyama, J. Utsunomiya, S. Baba, and P. Hedge. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253: 665-669, 1991.
237. Niv, Y., H. Turani, and G. Fraser. Histochemical characterization of mucosal mucin in serial biopsies along the human colon. *Digestion* 57: 109-112, 1996.
238. Nolte, R. T., G. B. Wisely, S. Westin, J. E. Cobb, M. H. Lambert, R. Kurokawa, M. G. Rosenfeld, T. M. Willson, C. K. Glass, and M. V. Milburn. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395: 137-143, 1998.
239. Novikoff, P. M., C. Davis, and N. Quintana. Studies on microperoxisomes. II; A cytochemical method for light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 20: 1006-1023, 1972.
240. Nusse, R., and H. Varmus. Many tumors induces by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31: 99-109, 1982.

241. Oberfield, J. L., J. L. Collins, C. P. Holmes, D. M. Goreham, J. P. Cooper, J. E. Cobb, J. M. Lenhard, E. A. Hull-Ryde, C. P. Mohr, S. B. Blanchard, D. J. Parks, L. B. Moore, J. M. Lehmann, K. Plunket, A. B. Miller, M. V. Milburn, S. A. Kliewer, and T. M. Willson. A peroxisome proliferator-activated receptor γ ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6102-6106, 1999.
242. Ohta, T., A. Elnemr, M. Yamamoto, I. Ninomiya, S. Fushida, G. Nishimura, T. Fujimura, H. Kitagawa, M. Kayahara, K. Shimizu, S. Yi, and K. Miwa. Thiazolidinedione, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, modulates the E-cadherin/beta-catenin system in a human pancreatic cancer cell line, BxPC-3. *Int J Oncol* 21: 37-42, 2002.
243. Okuno, A., H. Tamemoto, K. Tobe, K. Ueki, Y. Mori, K. Iwamoto, K. Umehara, Y. Akanuma, T. Fujiwara, H. Horikoshi, Y. Yazaki, and T. Kadowaki. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101: 1354-1361, 1998.
244. Okura, T., M. Nakamura, Y. Takata, S. Watanabe, Y. Kitami, and K. Hiwada. Troglitazone induces apoptosis via the p53 and Gadd45 pathway in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 407: 227-235, 2000.
245. Oshima, M. Effect of docosahexaenoic acid (DHA) on intestinal polyp development in *Apc Δ ⁷¹⁶* knockout mice. *Carcinogenesis* 16: 2605-2607, 1995.
246. Oshima, M., J. E. Dinchuk, S. L. Kargman, H. Oshima, B. Hancock, E. Kwong, J. M. Trzaskos, J. F. Evans, and M. M. Taketo. Suppression of intestinal polyposis in APCD716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX2). *Cell* 87: 803-809, 1996.
247. Owens, R. M cells: entryways of opportunity for enteropathogens. *J Exp Med* 180: 7-9, 1994.
248. Pabst, O., R. Zweigerdt, and H. Arnold. Targeted disruption of the homeobox containing transcription factor Nkx2-3 in mice results in postnatal lethality and abnormal development of small intestine and spleen. *Development* 126: 2215-2225, 1999.
249. Pappo, J., and T. Ermak. Uptake and translocation of fluorescent latex particles by rabbit Peyer's patch follicle epithelium: a quantitative model for M cell uptake. *Cell Exp Immunol* 76: 144-, 1991.
250. Park, B., B. Vogelstein, and K. Kinzler. Genetic disruption of PPAR δ decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2598-2603, 2001.
251. Parsons, R. Molecular genetics and hereditary cancer. Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma as a model. *Cell* 80: 533, 1997.
252. Parsons, R., G. Li, M. Longley, W. Fang, N. Papadopoulos, J. Jen, A. delaChapelle, K. Kinzler, B. Vogelstein, and P. Modrich. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 75: 1227-1236, 1993.
253. Pasceri, V., H. D. Wu, J. T. Willerson, and E. T. Yet. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor γ activators. *Circulation* 101: 235-238, 2000.
254. Passilly, P., H. Schohn, B. Jannin, M. C. Malki, D. Boscoboinik, M. Dauça, and N. Latruffe. Phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in rat Fao cells and stimulation by ciprofibrate. *Biochem Pharmacol* 58: 1001-1008, 1999.
255. Peters, J. M., T. Aoyama, R. C. Cattley, U. Noumitsu, T. Hashimoto, and F. J. Gonzalez. Role of peroxisome proliferator-activated receptor α in altered cell cycle regulation in mouse liver. *Carcinogenesis* 19: 1989-1994, 1998.
256. Peters, J. M., R. C. Cattley, and F. J. Gonzalez. Role of PPARalpha in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis* 18: 2029-2033, 1997.
257. Peters, J. M., N. Hennuyer, B. Staels, J. C. Fruchart, C. Fievet, F. J. Gonzalez, and J. Auwerx. Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Biol Chem* 272: 27307-27312, 1997.
258. Pinto, M., S. Robine-Leon, M. D. Appay, M. Kedinger, N. Triadou, E. Dussaulx, B. Lacroix, P. Simon-Assmann, K. Haffen, J. Fogh, and A. Zweibaum. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* 47: 323-330, 1983.
259. Polakis, P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14: 1837-1851, 2000.
260. Powell, S., N. Zilz, T. Beazer-Barclay, T. Bryan, S. Hamilton, S. Thibodeau, B. Vogelstein, and K. Kinzler. APC Mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 104: 235-237, 1993.
261. Poynter, M. E., and R. A. Daynes. Age-associated alterations in splenic iNOS regulation : influence of constitutively expressed IFN-gamma and correction following supplementation with PPARalpha activators or vitamin E. *Cell Immunol* 195: 127-136, 1999.

262. Puigserver, P., G. Adelmant, Z. Wu, M. Fan, J. Xu, B. O'Malley, and B. M. Spiegelman. Activation of PPAR γ Coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* 286: 1368-1371, 1999.
263. Puigserver, P., Z. Wu, C. W. Park, R. Graves, M. Wright, and B. M. Spiegelman. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829-839, 1998.
264. Reddy, B. S., and Y. Maeura. Tumor promotion by dietary fat in azomethane-induced colon carcinogenesis in female F344 rats : influence of amount and source of dietary fat. *J Natl Cancer Inst* 72: 745-750, 1984.
265. Reddy, B. S., and S. Sugie. Effect of different levels of ω -3 and ω -6 fatty acids on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Res* 48: 6642-6647, 1988.
266. Reddy, J. K. Carcinogenicity of peroxisome proliferators: evaluation and mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* ? : 92-94, 1990.
267. Reed, B. C., and M. D. Lane. Insulin receptor synthesis and turnover in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 285-289, 1980.
268. Reginato, M. J., S. L. Krakow, S. T. Bailey, and M. A. Lazar. Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 273: 1855-1858, 1998.
269. Reynolds, E. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-213, 1963.
270. Ricote, M., J. Huang, L. Fajas, A. Li, J. Welch, J. Najib, J. L. Witzum, J. Auwerx, W. Palinski, and C. K. Glass. Expression of PPAR γ in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7614-7619, 1998.
271. Ricote, M., A. C. Li, T. M. Willson, C. J. Kelly, and C. K. Glass. The peroxisome proliferator activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391: 79-82, 1998.
272. Rijsewijk, F., M. Schuermann, E. Wagenaar, P. Parren, D. Weigel, and R. Nusse. The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* 50: 649-657, 1987.
273. Rivier, M., I. Safonova, P. Lebrun, C. E. Griffiths, G. Ailhaud, and E. Michel. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors subtypes during differentiation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 111: 1116-1121, 1998.
274. Roberts, R. A., N. H. James, N. J. Woodyatt, N. Maddonald, and J. D. Tugwood. Evidence for the suppression of apoptosis by the peroxisome proliferator activated receptor alpha. *Carcinogenesis* 19: 43-48, 1998.
275. Robine, S., C. Huet, R. Moll, C. Sahuquillo-Merino, E. Coudrier, A. Zweibaum, and D. Louvard. Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8488-8492, 1985.
276. Rodriguez, J. C., G. Gil-Gomez, F. G. Hegardt, and D. Haro. Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coA synthase gene by fatty acids. *J. Biol. Chem.* 269: 18767-18772, 1994.
277. Roelink, H., E. Wagenaar, S. L. d. Silva, and R. Nusse. Wnt-3, a gene activated by proviral insertion in mouse mammary tumors, is homologous to *int-1/Wnt-1* and is normally expressed in mouse embryos and adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4519-4523, 1990.
278. Roels, F., M. Espeel, M. Pauwels, D. deCraemer, H. J. A. Egberts, and N. V. d. Spek. Different types of peroxisomes in human duodenal epithelium. *Gut* 32: 858-865, 1991.
279. Rokos, C. L., and B. J. Ledwith. Peroxisomes proliferators activate extracellular signal-regulated kinases in immortalized mouse liver cells. *J Biol Chem* 272: 13452-43457, 1997.
280. Ross, S., N. Hemati, K. Longo, C. Bennett, P. Lucas, R. Erickson, and O. MacDouglas. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289: 950-953, 2000.
281. Rousset, M., M. Laburthe, M. Pinto, G. Chevalier, C. Rouyer-Fessard, E. Dussaulx, N. Boige, J. L. Brun, and A. Zweibaum. Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human tumor cell line Caco-2 : modulation by forskolin. *J. Cell. Physiol.* 123: 1269-1273, 1985.
282. Rubin, D., E. Swietlicki, K. Roth, and J. Gordon. Use of fetal intestinal isografts from normal and transgenic mice to study the programming of positional information along the duodenal-to-colonic axis. *J Biol Chem* 267: 15122, 1992.
283. Rubinfeld, B., I. Albert, E. Porfiri, C. Fiol, S. Munemitsu, and P. Polakis. Binding of GSK3 β to the APC- β -catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272: 1023-1026, 1996.
284. Saez, E., P. Tontonoz, M. C. Nelson, J. G. Alvarez, U. T. Ming, S. M. Baird, V. A. Thomazy, and R. M. Evans. Activators of the nuclear receptor PPAR γ enhance colon polyp formation. *Nat Med* 4: 1058-1061, 1998.

285. Sakanaka, C., P. Leong, L. Xu, S. Harrison, and L. Williams. Casein kinase-1 epsilon in the wnt pathway: regulation of β -catenin function. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12548-12552, 1999.
286. Salenius, P. On the ontogenesis of the human gastric epithelial cells. *Acta Anat* 46: 1-75, 1962.
287. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular cloning, a laboratory manual. 3 vol, 1989.
288. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 74: 5463-5467, 1977.
289. Sano, H., Y. Kawahito, R. Wilder, A. Hashiramoto, S. Mukai, K. Asai, S. Kimura, H. Kato, and T. Hla. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 55: 3785-3789, 1995.
290. Sarraf, P., E. Mueller, D. Jones, F. J. King, D. J. DeAngelo, J. B. Partridge, S. A. Holden, L. B. Chen, S. Singer, C. Fletcher, B.M., and Spiegelman. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR γ . *Nat Med* 4: 1046-1052, 1998.
291. Sarraf, P., E. Mueller, W. M. Smith, H. M. Wright, J. B. Kum, L. A. Aaltonen, A. delaChapelle, B. M. Spiegelman, and C. Eng. Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. *Mol Cell* 3: 799-804, 1999.
292. Sasaki, H., M. Tanahashi, H. Yukiue, S. Moiriyama, Y. Kobayashi, Y. Nakashima, M. Kaji, M. Kiriya, I. Fukai, Y. Yamakawa, and Y. Fujii. Decreased peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression was correlated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 36: 71-76, 2002.
293. Sasaki, M., K. Sugio, and T. Sasazuki. K-ras activation in colorectal tumors from patients with familial polyposis coli. *Cancer* 65: 2576-, 1990.
294. Sato, H., S. Ishihara, K. Kawashima, N. Moriyama, H. Suetsugu, H. Kazumori, T. Okuyama, M. Rumi, R. Fukuda, N. Nagasue, and Y. Kinoshita. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ in gastric cancer and inhibitory effects of PPAR γ agonists. *Br J Cancer* 83: 1394-1400, 2000.
295. Satoh, S., Y. Daigo, Y. Furukawa, T. Kato, N. Miwa, T. Nishiwaki, T. Kawasoe, H. Ishiguro, M. Fujita, T. Tokino, and e. al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 24: 245-250, 2000.
296. Schaiff, W. T., M. G. Carlson, S. D. Smith, R. Levy, D. M. Nelson, and Y. Sadovsky. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. *J. Clin. Endocrinol Metab* 85, 2000.
297. Schmidt, A., N. Endo, S. J. Rutledge, R. Vogel, D. Shinar, and G. A. Rodan. Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acid. *Mol. Endo.* 6: 1634-1641, 1992.
298. Schoonjans, K., G. Martin, B. Staels, and J. Auwerx. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol* 8: 159-166, 1997.
299. Schoonjans, K., B. Staels, and J. Auwerx. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Bba-Lipid Lipid Metab* 1302: 93-109, 1996.
300. Schoonjans, K., M. Watanabe, H. Susuki, A. Mahfoudi, G. Krey, W. Wahli, P. Grimaldi, B. Staels, T. Yamamoto, and J. Auwerx. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J. Biol. Chem.* 270: 19269-19276, 1995.
301. Schultz, R., W. Yan, J. Toppari, A. Volkl, J. A. Gustafsson, and M. Peltto-Huikko. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha messenger ribonucleic acid and protein in human and rat testis. *Endocrinology* 140: 2968-2975, 1999.
302. Shalev, A., C. A. Siegristkaiser, P. M. Yen, W. Wahli, A. G. Burger, W. W. Chin, and C. A. Meier. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology* 137: 4499-4502, 1996.
303. Sher, T., H. F. Yi, O. W. McBride, and F. J. Gonzalez. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator-activated receptor. *Biochemistry* 32: 5598-5604, 1993.
304. Shibata, D., J. Schaeffer, Z. Li, and e. al. Genetic heterogeneity of the c-K-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 85: 1058-, 1993.
305. Shoonjans, K., M. Watanabe, H. Susuki, A. Mahfoudi, G. Krey, W. Wahli, P. Grimaldi, B. Staels, T. Yamamoto, and J. Auwerx. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J. Biol. Chem.* 270: 19269-19276, 1995.

306. Silberg, D., E. Furth, J. Taylor, T. Schuck, T. Chiou, and P. Traber. CDX1 protein expression in normal, metaplastic, and neoplastic human alimentary tract epithelium. *Gastroenterology* 113: 478-486, 1997.
307. Simo, P., F. Bouziges, J. Lissitzky, L. Sorokin, M. Keding, and P. Simon-Assmann. Dual and asynchronous deposition of laminin chains at the epithelial-mesenchymal interface in the gut. *Gastroenterology* 102, 1992.
308. Simo, P., P. Smon-Assmann, F. Bouziges, C. Lerquier, M. Keding, P. Elklom, and L. Sorokin. Changes in the expression of laminin during intestinal development. *Development* 112: 477-487, 1991.
309. Simon-Assman, P., M. Keding, A. DeArchangelis, V. Rousseau, and P. Simo. Extracellular matrix components in intestinal development. *Experientia* 51: 551-522, 1995.
310. Slolund, K., G. Sanden, P. Fontana, and e. al. Endocrine cells in the human intestine : an immunocytochemical study. *Gastroenterology* 85: 1120-, 1983.
311. Smas, C. M., and H. S. Sul. Control of adipocyte differentiation. *Biochem J* 309: 697-710, 1995.
312. Smith, G., F. Carey, J. Beattie, M. Wilkie, T. Lightfoot, J. Coxhead, R. Garner, R. Steele, and C. Wolf. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53- alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9433-9438, 2002.
313. Sorensen, H. N., E. Treuter, and J. A. Gustafsson. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Vitam Horm* 54: 121-166, 1998.
314. Spirio, L., S. Loschwang, J. Groden, M. Robertson, W. Samowitz, G. Joslyn, L. Gelbert, Thliveris, M. Carlson, and B. Otterud. Alleles of the APC gene : an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 75: 951-957, 1993.
315. Staels, B., W. Koenig, A. Habib, R. Merval, M. Lebre, I. P. Torra, P. Delerive, A. Fadel, G. Chinetti, J. C. Fruchart, J. Najib, J. Maclouf, and A. Tedgui. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 393: 790-793, 1998.
316. Staels, B., N. Vu-Dac, V. A. Kosykh, R. Saladin, J. C. Fruchart, J. Dallongeville, and J. Auwerx. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. *J. Clin. Invest.* 95: 705-712, 1995.
317. Steineger, H., H. N. Sørensen, J. D. Tugwood, S. Skrede, O. Spydevold, and M. Gautvik. Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. *Eur. J. Biochem.* 225: 967-974, 1994.
318. Stier, H., H. D. Fahimi, P. P. VanVeldhoven, G. H. Mannaerts, A. Völk, and E. Baumgart. Maturation of peroxisomes in differentiating human hepatoblastoma cells (HepG2) : possible involvement of the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). *Differentiation* 64: 55-66, 1998.
319. Strand, M., T. Prolla, R. Liskay, and T. Petes. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365: 274-, 1993.
320. Suh, E., L. Chen, J. Taylor, and P. Traber. A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* 14: 7340-7351, 1994.
321. Suh, N., Y. Wang, C. R. Williams, R. Risingsong, T. Gilmer, T. M. Willson, and M. B. Sporn. A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) GW 7845, inhibits rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 59: 5671-5673, 1999.
322. Sweetser, D., S. Hauff, P. Hoppe, E. Birkenmeier, and J. Gordon. Transgenic mice containing fatty acid-binding protein-human growth hormone fusion genes exhibit correct regional and cell-specific expression of the reporter gene in their small intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9611-9615, 1988.
323. Takahashi, N., T. Okumura, W. Motomura, Y. Fujimoto, I. Kawabata, and Y. Kohgo. Activation of PPARgamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FEBS Lett* 455: 135-139, 1999.
324. Takata, Y., Y. Kitami, T. Okura, and K. Hiwada. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation inhibits interleukin-1 β -mediated platelet-derived growth factor- α receptor gene expression via CCAAT/enhancer-binding protein- δ in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 276: 12893-12897, 2001.
325. Takemura, K., and R. Moon. The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J Cell Biol* 149: 249-254, 2000.
326. Taniyama, Y., R. Morishita, M. Aoki, H. Nakagami, K. Yamamoto, K. Yamazaki, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda, and T. Ogihara. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte

growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther* 8: 181-189, 2001.

327. Temple, N. J., and S. M. El-Khatib. Effect of high fat and nutrient depleted diets on colon tumor formation in mice. *Cancer Lett* 37: 109-114, 1987.

328. Teruel, T., J. C. Clapham, and S. A. Smith. PPAR α activation by Wy 14643 induces transactivation of the rat UCP-1 promoter without increasing UCP-1 mRNA levels and attenuates PPAR γ -mediated increases in UCP-1 mRNA levels induced by rosiglitazone in fetal rat brown adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 311-315, 1999.

329. Tetsu, O., and F. McCormick. β -catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398: 422-426, 1999.

330. Theoharis, S., H. Kanelli, E. P. A. Margeli, C. Karkandaris, T. Philippides, and A. Koutselinis. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in non-small cell lung carcinoma: correlation with histological type and grade. *Lung Cancer* 36: 249-255, 2002.

331. Thomas, G., S. Frame, M. Goedert, I. Nathke, P. Polakis, and P. Chen. A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and β -catenin. *FEBS Lett* 458: 247-251, 1999.

332. Thomas, P. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5201-5205, 1980.

333. Tiam, J., and A. Quaroni. Involvement of p21(WAF1/Cip1) and p27(kip1) in intestinal epithelial cell differentiation. *Am J Phys Cell Phys* 276: C1245-C1258, 1999.

334. Tontonoz, P., R. A. Graves, A. I. Budavari, H. Erdjument-Bromage, M. Lui, E. Hu, P. Tempst, and B. M. Spiegelman. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimer complex of two nuclear hormone receptors PPAR γ and RXR α . *Nucleic Acids Res.* 22: 5628-5634, 1994.

335. Tontonoz, P., E. Hu, J. Devine, E. G. Beale, and B. M. Spiegelman. PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biology* 15: 351-357, 1995.

336. Tontonoz, P., E. Hu, R. A. Graves, A. I. Budavari, and B. M. Spiegelman. mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes and Dev.* 8: 1224-1234, 1994.

337. Tontonoz, P., E. Hu, and B. M. Spiegelman. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79: 1147-1156, 1994.

338. Tontonoz, P., L. Nagy, J. G. Alvarez, V. A. Thomazy, and R. M. Evans. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93: 241-252, 1998.

339. Tontonoz, P., S. Singer, B. M. Forman, P. Sarraf, J. A. Fletcher, C. D. M. Fletcher, R. P. Brun, E. Mueller, S. Altiock, H. Oppenheim, R. M. Evans, and B. M. Spiegelman. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 237-241, 1997.

340. Torchia, J., D. Rose, J. Inostroza, Y. Kamei, S. Westin, C. Glass, and M. Rosenfeld. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387: 677-684, 1997.

341. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354, 1979.

342. Traber, P., and D. Silberg. Intestine-specific gene transcription. *Annu Rev Physiol* 58: 275-297, 1996.

343. Trier, J. Structure and function of intestinal M cells. *Gastroenterol Clin North Am* 20: 531-, 1991.

344. Troelsen, J., C. Mitchelmore, N. Spodsberg, A. Jensen, O. Noren, and H. Sjöström. Regulation of lactase-phlorizin hydrolase gene expression by the caudal-related homeodomain protein caudal Cdx-2. *Biochem J* 322: 833-838, 1997.

345. Tsao, J., and D. Shibata. Further evidence that one of the earliest alterations in colorectal carcinogenesis involves APC. *Am J Pathol* 145: 531-534, 1994.

346. Tsibris, J. C. M., K. B. Porter, A. Jazayeri, G. Tzimas, H. Nau, H. Huang, K. Kuparadze, G. W. Porter, W. F. O'Brien, and W. N. Specially. Human uterine leiomyomata express higher levels of peroxisome proliferator-activated receptor γ , retinoid X receptor α and all-trans retinoic acid than myometrium. *Cancer Res.* 59: 5737-5744, 1999.

347. Tso, J., X. Sun, T. Kao, K. Reece, and R. Wu. Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* 13: 2485-2502, 1985.

348. Tsubouchi, Y., H. Sano, Y. Kawahito, S. Mukai, R. Yamada, M. Kohno, K. Inoue, T. Hla, and M. Kondo. Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated

receptor- γ agonists through induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 400-405, 2000.

349. Tsuji, M., and R. N. Dubois. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 83: 493-501, 1995.

350. Tugwood, J. D., I. Isseman, R. G. Anderson, K. R. Bundell, W. L. McPheat, and S. Green. The mouse peroxisome proliferator-activated receptor recognizes a response element in the 5'flanking sequence of the rat acyl coA oxidase gene. *EMBO J*. 11: 433-439, 1992.

351. Upenberg, A., E. Jeannin, W. Wahli, and B. Desvergne. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* 272: 20108-20117, 1997.

352. Upenberg, J., C. Svensson, M. Jaki, G. Bertilsson, L. Jendeberg, and A. Berkenstam. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPAR γ . *J Biol Chem* 273: 31108-31112, 1998.

353. vanderWetering, M., R. Cavallo, D. Dooijes, M. vanBeest, J. vanEs, J. Loureiro, A. Ypma, and D. Hursh. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. *Cell* 88: 789-799, 1997.

354. Varanasi, U., R. Chu, Q. Huang, R. Castellon, A. V. Yeldandi, and J. K. Reddy. Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem* 271: 2147-2155, 1996.

355. Vogelstein, B., E. Fearon, S. Hamilton, S. Kern, A. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. Smits, and J. Bos. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-532, 1988.

356. Vogelstein, B., E. Fearon, S. Kern, S. Hamilton, A. Preisinger, Y. Nakamura, and R. White. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244: 207-211, 1989.

357. Vu-Dac, N., K. Schoonjans, V. Kosykh, J. Dallongeville, J. C. Fruchart, B. Staels, and J. Auwerx. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J. Clin. Invest.* 96: 741-750, 1995.

358. Vu-Dac, N., K. Schoonjans, B. Laine, J. C. Fruchart, J. Auwerx, and B. Staels. Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *J. Biol. Chem.* 269: 31012-31018, 1994.

359. Wächtershäuser, A., S. Loitsch, and J. Stein. PPAR- γ is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 380-385, 2000.

360. Wahli, W., P. R. Devchand, A. Upenberg, and B. Desvergne. 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.

361. Wasan, H. S., M. Novelli, J. Bee, and W. F. Bodmer. Dietary fat influences on polyp phenotype in multiple intestinal neoplasia mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3308-3313, 1997.

362. Willert, K., and R. Nusse. β -catenin : a key mediator of Wnt signalling. *Curr Opin Genet Develop* 8: 95-102, 1998.

363. Willert, L., M. Brink, A. Wodarz, H. Varmus, and R. Nusse. Casein kinase-2 associates with and phosphorylates dishevelled. *EMBO J* 16: 3089-3096, 1997.

364. Williams, C., and R. DuBois. Prostaglandin endoperoxidase synthase. *Am J Physiol* 270: 2046-2050, 1996.

365. Wilson, T. M., and W. Wahli. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Curr Opin Chem Biol* 1: 235-241, 1997.

366. Winer, B. Statistical principles. in: *Experimental Design, 2nd ed, vol 1, McGraw-Hill, New York*, 1971.

367. Wodarz, A., and R. Nusse. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Ann Rev Cell Dev Biol* 14: 59-88, 1998.

368. Wu, Z., E. D. Rosen, R. Brun, S. Hauser, G. Adelmant, A. E. Troy, C. McKeon, G. J. Darlington, and B. M. Spiegelman. Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 3: 151-158, 1999.

369. Wu, Z., Y. Xie, N. Bucher, and S. R. Farmer. Conditional ectopic expression of C/EBP β in NIH-3T3 cells induces PPAR γ and stimulates adipogenesis. *Genes Dev* 9: 2350-2363, 1995.

370. Wynder, E., and B. Reddy. The epidemiology of cancer of the large bowel. *Am J Dig Dis* 19: 937-946, 1975.

371. Xu, H. E., M. H. Lambert, V. G. Montana, D. J. Parks, S. G. Blanchard, P. J. Brown, D. D. Sternbach, J. M. Lehmann, G. B. Wisely, T. M. Willson, S. A. Kliewer, and M. V. Milburn. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 3: 397-403, 1999.
372. Xu, L., C. K. Glass, and M. Rosenfeld. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 9: 140-147, 1999.
373. Yamamoto, H., S. Kishida, M. Kishida, S. Ikeda, S. Takada, and A. Kikushi. Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3 β regulates its stability. *J Biol Chem* 274: 10681-10684, 1999.
374. Yanase, T., T. Yashiro, K. Takitani, S. Kato, S. Taniguchi, R. Takayanagi, and H. Nawata. Differential expression of PPAR gamma1 and gamma2 isoforms in human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 233: 320-324, 1997.
375. Yang-Snyder, J., J. Liller, J. Brown, C. Lai, and R. Moon. A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol* 6: 1302-1306, 1996.
376. Ye, H., T. Kelly, U. Samadani, L. Lim, S. Rubino, D. Overdier, K. Roebuck, and R. Costa. Hepatocyte nuclear factor 3/forkhead Homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues. *Mol Cell Biol* 17: 1626-1641, 1997.
377. Yee, L. D., C. L. K. Sabourin, L. Liu, H. M. Li, P. J. Smith, V. Seewaldt, and D. A. Kniss. Peroxisome proliferator-activated receptor γ activation in human breast cancer. *Int J Oncol* 15: 967-973, 1999.
378. Yu, G. S., Y. C. Lu, and T. Gulick. Co-regulation of tissue-specific alternative human carnitine palmitoyltransferase I β gene promoters by fatty acid enzyme substrate. *J Biol Chem* 273: 32901-32909, 1998.
379. Yu, K., W. Bayona, C. B. Kallen, H. P. Harding, C. P. Ravera, G. MacMahon, M. Brown, and M. A. Lazar. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* 270: 23975-23983, 1995.
380. Zhang, B., J. Berger, G. Zhou, A. Elbrecht, S. Biswas, S. White-Carrington, D. Szalkowski, and D. E. Moller. Insulin and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 271: 31771-31774, 1996.
381. Zhang, B., S. L. Marcus, F. G. Sajjadi, K. Alvares, J. K. Reddy, S. Subramani, R. A. Rachubinski, and J. P. Capone. Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the gene encoding rat peroxisomal enoyl-coA hydratase/3-hydroxyacyl-coA dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7541-7545, 1992.
382. Zhang, L. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276: 1268-1272, 1997.
383. Zhou, J., K. Wilson, and J. Medh. Genetic analysis of four novel peroxisome proliferator activated receptor- γ splice variants in monkey macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 274-283, 2002.
384. Zhou, Y. C., and D. J. Waxman. Cross-talk between Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT) and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) signaling pathways. Growth hormone inhibition of PPARalpha transcriptional activity mediated by Stat5b. *J Biol Chem* 274: 2672-2681, 1999.
385. Zhu, X., M. Ohtsubo, R. Bohmer, J. Roberts, and R. Assoian. Adhesion dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol* 133: 391-403, 1996.
386. Zhu, Y., K. Alvares, Q. Huang, M. S. Rao, and J. K. Reddy. Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *J. Biol. Chem.* 268: 26817-26820, 1993.
387. Zhu, Y., C. Qi, S. Jain, M. S. Rao, and J. K. Reddy. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 272: 25500-25506, 1997.
388. Zweibaum, A., M. Laburthe, E. Grasset, and D. Louvard. Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. *Handbook of Physiology* 4: 223-255, 1991.
389. Zweibaum, A., N. Triadou, M. Kedinger, M. Augeron, S. Robine-Leon, M. Rousset, and K. Haffen. Sucrase-isomaltase, a marker of fetal and malignant epithelial cells of the colon. *Int J Cancer* 1983: 407-412, 1983.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities related to the business. This includes keeping track of income, expenses, and assets. It also emphasizes the need for regular audits and reconciliations to ensure the accuracy of the financial statements.

PUBLICATIONS

i) Les travaux présentés dans ce mémoire ont fait l'objet de 4 publications et d'un acte de Congrès parues dans des revues internationales. La partie III de ce mémoire fait l'objet d'un article en préparation. Les articles parus sont les suivants :

Huin, C., H. Schohn, F. Plénat and M. Dauça. PPARs in human colonic carcinoma. 1999
Biochimie 81 : S328, 1999 (acte de Congrès)

Huin C, Corriveau L, Bianchi A, Keller JM, Collet P, Kremarick-Bouillaud P, Domenjoud L, Schohn H, Becuwe P, Ménard D, Dauça M. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in developing human fetal digestive tract. 2000.
J. Cytochem. Histochem, 48(5) : 603-611.

Schohn H, **Huin C**, Passilly P, Collet P, Latruffe N, Domenjoud L, Dauça M. Peroxisome proliferator-activated receptors are key regulators in cell differentiation.
Recent Res. Devel. Lipids, 5 : 147-165, 2001.

Huin, C., H. Schohn, R. Hatier, M. Bentejac, L. Antunes, F. Plénat, M. Bugaut, and M. Dauça. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in differentiating human colon adenocarcinoma Caco-2.
J Cell Biol 94: 15-27, 2002.

ii) Communications dans des Congrès :

Huin, C., H. Schohn, F. Plénat, M. Dauça. Analyse transcriptionnelle et traductionnelle des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs) au niveau des cellules coliques humaines saines et tumorales
XIXe Réunion du Club des Cellules Epithéliales Digestives (CECED)
Nîmes, 25-26 janvier 2001 (Présentation orale)

Huin, C., H. Schohn, F. Plénat and M. Dauça. PPARs in human colonic carcinoma
26^e Congrès de la Fédération des Sociétés Biochimiques Européennes (FEBS)
Nice, 19-24 juin 1999

ARTICLE

Differential Expression of Peroxisome Proliferator-activated Receptors (PPARs) in the Developing Human Fetal Digestive Tract

Cécile Huin, Lina Corriveau, Arnaud Bianchi, Jean Marie Keller, Philippe Collet, Pascaline Krémarik-Bouillaud, Lionel Domenjoud, Philippe Bécuwe, Hervé Schohn, Daniel Ménard, and Michel Dauça

Laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement, EA 2402 "Proliférateurs de Peroxysomes," Faculté des Sciences, Vandoeuvre-les-Nancy, France (CH,AB,JMK,PC,PKB,LD,PB,HS,MD), and Groupe CRM de Recherche sur le Développement Fonctionnel et la Physiopathologie du Tube Digestif, Département Anatomie et Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine, Sherbrooke, Québec, Canada (LC,DM)

SUMMARY We investigated the spatiotemporal distributions of the different peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isotypes (α , β , and γ) during development (Week 7, to Week 22 of gestation) of the human fetal digestive tract by immunohistochemistry using specific polyclonal antibodies. The PPAR subtypes, including PPAR γ , are expressed as early as 7 weeks of development in cell types of endodermal and mesodermal origin. The presence of PPAR γ was also found by Western blotting and nuclease-S1 protection assay, confirming that this subtype is not adipocyte-specific. PPAR α , PPAR β , and PPAR γ exhibit different patterns of expression during morphogenesis of the digestive tract. Whatever the stage and the gut region (except the stomach) examined, PPAR γ is expressed at a high level, suggesting some fundamental role for this receptor in development and/or physiology of the human digestive tract. (*J Histochem Cytochem* 48:603–611, 2000)

KEY WORDS

PPARs
development
differentiation
fetus
digestive tract

PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS (PPARs) are transcription factors belonging to the nuclear receptor superfamily and have been initially described as molecular targets for compounds that cause peroxisome proliferation (for review see Sørensen et al. 1998). To date, three isotypes of PPAR have been described in humans: α (Sher et al. 1993); NUC1, also called β or δ (Schmidt et al. 1992); and γ (Elbrecht et al. 1996; Fajas et al. 1997). There are three subtypes of PPAR γ mRNA, transcribed from three different promoters, which give rise to two proteins, PPAR γ_1 and γ_2 , as the protein encoded by PPAR γ_3 mRNA is indistinguishable from PPAR γ_1 (Fajas et al. 1998).

In humans, PPAR α is present mainly in liver, heart, and kidney, whose tissues exhibit high fatty acid metab-

olism and high peroxisome-dependent activity. PPAR β is ubiquitously expressed in all tissues tested, whereas PPAR γ predominates in adipose tissue, large intestine, and macrophages and monocytes (Mukherjee et al. 1994; Auboeuf et al. 1997; Marx et al. 1998; Ricote et al. 1998; Spiegelman 1998). Consistent with their localization, the PPAR subtypes play different roles. After binding to specific elements (PPREs), PPAR α regulates the transcription of several target genes involved in lipid metabolism and homeostasis (Desvergne and Wahli 1995; Wahli et al. 1995; Lemberger et al. 1996; Sørensen et al. 1998). PPAR γ controls adipocyte (Chawla et al. 1994; Tontonoz et al. 1995; Schoonjans et al. 1996; Spiegelman et al. 1997) and monocyte/macrophage (Marx et al. 1998; Ricote et al. 1998; Tontonoz et al. 1998) differentiation. Until now, the precise role of PPAR β has not yet been elucidated.

Detailed descriptions of the morphological and functional changes occurring during the development of the human gastrointestinal tract are available (Ménard and Calvert 1991; Ménard 1994,1995; Montgomery

Correspondence to: C. Huin, Laboratoire de Biologie cellulaire du Développement, UPRES 2402 "Proliférateurs de Peroxysomes," Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

Received for publication August 9, 1999; accepted January 5, 2000 (9A5061).

et al. 1999). Several lines of evidence suggest an early role of the fetal digestive tract in fat digestion. We have reported that peroxisomes with fatty acid β -oxidation capacity are present in the fetal human gut (Dauça et al. 1996). The latter exhibits functional mechanisms to synthesize all the lipid classes and to secrete them in the form of lipoproteins (Levy et al. 1992; Basque et al. 1998). Thus far, no studies have been devoted to the expression of PPARs in the developing human fetal digestive tract. Because the localization of these receptors may help to clarify the physiological roles of PPARs, this analysis was undertaken by immunohistochemistry in esophagus, stomach, small intestine, and colon of human fetuses from Week 7 to Week 23 of development (WD). In this study we demonstrated a spatial and temporal distribution of PPARs in developing digestive tract that suggests a differential role for these receptors during morphogenesis and cell differentiation.

Materials and Methods

Tissue Specimens

Samples of esophagus, stomach, intestine, and colon from 23 fetuses ranging from 7 to 22 weeks of age were obtained from normal elective pregnancy terminations. The project was performed in accordance with the requirements of the Institutional Human Subject Review Board (University of Sherbrooke) for the use of human tissues. The latter were embedded in Polyfreeze Tissue Freezing Medium (Poly-science; Warrington, PA) and frozen in liquid nitrogen.

Production of Anti-PPAR Antibodies

As shown in Figure 1, the anti-PPAR α antibody was raised against the amino acid sequence $_{43}$ SSGSFGFTEYQY $_{56}$ of human PPAR α (Sher et al. 1993). The sequence $_{24}$ EGAPELNGGPQHAL $_{37}$ of human NUC1 (Schmidt et al. 1992) was used to produce the anti-PPAR β polyclonal antibody. The anti-PPAR γ_1/γ_2 antiserum was raised against the amino acid sequence EMPFWPTNFGISSVD common to PPAR γ_1 and PPAR γ_2 [amino acids 5–19 of mouse PPAR γ_1 (Zhu et al. 1993); 35–49 of PPAR γ_2 (Tontonoz et al. 1994)]. The sequence is well conserved in the two human PPAR γ isoforms (Elbrecht et al. 1996; Fajas et al. 1997). Taking advantage of the fact that the PPAR γ_2 differs from the PPAR γ_1 by an additional specific N-terminal amino acid region, the sequence of the hapten used to produce the anti-human PPAR γ_2 antibody was mapped at that region and corresponded to $_{2}$ GETLGDSPIDPESDS $_{16}$ of human PPAR γ_2 (Elbrecht et al. 1996; Fajas et al. 1997). The synthetic peptides were coupled to keyhole limpet hemocyanin as a carrier according to the glutaraldehyde method (Avrameas 1969). Polyclonal antibodies were raised by SC injections into rabbits using standard procedures. In addition, we used a commercial anti-PPAR γ antiserum (Interchim; Montluçon, France) directed against the amino acid sequence MMGEDKIKFKHITPL common to PPAR γ_1 and PPAR γ_2 (amino acids 256–270 of human PPAR γ_1 , 284–298 of human PPAR γ_2).

Characterization of the Antibodies

The polyclonal antibodies produced were characterized by immunoprecipitation and Western blotting assays. In vitro transcription and translation of mouse PPAR α /pSG5, PPAR β /pSG5, PPAR γ_1 /pSG5, and human PPAR γ_2 /pBluescript IIKS $^+$ plasmids (gift of Prof. W. Wahli; University of Lausanne, Switzerland) were performed using reticulocyte lysate (Promega; Charbonnières, France) and L-[35 S]-methionine. Translated products were either immunoprecipitated with the antibodies and analyzed by SDS-PAGE, followed by autoradiography, or directly submitted to Western blotting and enhanced chemiluminescence (ECL) in crossreaction assays.

Adult and fetal colon mucosae were homogenized in 25 mM Hepes buffer, pH 7.4, containing 0.4 M KCl, 1 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, and a cocktail of protease inhibitors (Complete; Roche, Mannheim, Germany). The homogenates were centrifuged at $15,000 \times g$ for 20 min (4°C). The protein concentration of the supernatant was determined (Bradford 1976). Samples were analyzed by Western blotting and ECL according to the manufacturer's protocol (Boehringer Mannheim Biochemica; Mannheim, Germany) using the different antibodies.

Nuclease Protection Assay

Partial human PPAR γ_2 cDNA corresponding to the 5'UTR sequence (Fajas et al. 1997) was obtained by standard RT-PCR using total RNA extracted from human adipocytes (Chomzynski and Sacchi 1987) and primers up (5'-CCCATC-TCTCCCAAATATTT-3') and down (5'-GGGCCAGAAT-GCGATCTCTGTG-3'). The resulting fragment (282 bp) was cloned into the pBSIIKS $^+$ plasmid (Stratagene; La Jolla, CA), giving rise to the pBIIKS $^+$ /hPPAR γ_2 vector. A pBIIKS $^+$ /hG3PDH clone containing a 380-bp DNA fragment of the human G3PDH encoding sequence (Tso et al. 1985) was produced using the same protocol and primers up (5'-CCC-ATCACCATCTTCCGA-3') and down (5'-CTACAGGCC-ACAGTTTCC-3'). Nuclease protection assay was carried out

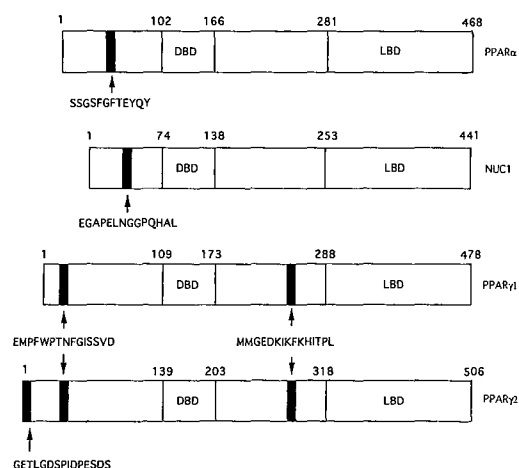


Figure 1 Schematic comparison of the different human PPAR subtypes vs PPAR α . The positions of the peptides used to produce the polyclonal antibodies are mapped. The DNA (DBD) and ligand (LBD) binding domains are represented.

according to Sambrook et al. (1989). Total RNA was extracted from human fetal intestines (14WD) and from 3T3 L1 cells (passage 58) as described above. 3T3 L1 cells were chosen for a positive control because those preadipocytes express PPAR γ_2 . Total RNA (5 μ g) was hybridized overnight with 32 P single-stranded DNA probes (10^5 cpm/sample) at 60C. After incubation, nonhybridized cDNA was digested by nuclease S1 (50 U/sample) for 60 min at 37C. The DNA/RNA hybrids were resolved by electrophoresis and the gel was exposed to Kodak film for 24 hr.

Immunohistochemical Analysis

Cryostat sections (3 μ m thick) were fixed in 2% formaldehyde in PBS for 45 min at 4C and rinsed in PBS. They were immersed in 100 mM glycine in PBS for 45 min at 4C, then washed in PBS. The sections were preincubated with a blocking solution containing 0.1% fish gelatin, 0.8% bovine serum albumin, and Tween-80 (2 μ l/100 ml PBS) for 30 min at room temperature (RT). They were first exposed to the primary antibody (diluted 1:250 in PBS/defatted dry milk 5% w/v) for 60 min at RT. After two washes in PBS, sections were exposed to the secondary antibody (1:50 in PBS-BSA 2%), fluorescein-conjugated goat anti-rabbit IgG (Boehringer Mannheim), for 60 min at RT. Negative controls were performed by replacing the primary antibody with PBS or with preimmune serum. Sections were then mounted in Vectashield medium and photographed with a Reichert-Jung Polyvar microscope (Vienna, Austria).

Results

Antibody Specificity

In vitro-translated mouse PPAR α , β , and γ_1 and human PPAR γ_2 were used for immunoprecipitation assays, taking advantage of the fact that the human peptide sequences chosen for immunization are well-conserved in the corresponding rodent sequences. Figure 2 shows

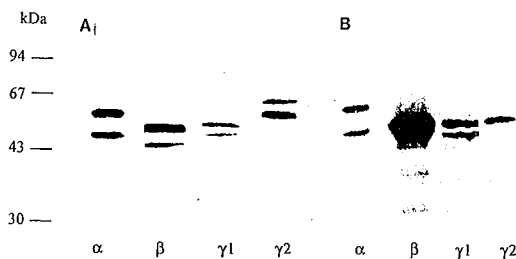


Figure 2 Recognition of the different PPAR subtypes by their respective antibody. (A) SDS-PAGE analysis of in vitro-translated mouse PPAR α , β , and γ_1 and human PPAR γ_2 . Two μ l of lysate was loaded in each lane and analyzed by SDS-PAGE on 10% gels. Dried gels were exposed for autoradiography. (B) Immunoprecipitation assay with in vitro-translated mouse PPAR α , β , and γ_1 and human PPAR γ_2 . Translation product was incubated with the appropriate primary anti-PPAR antibody (diluted 1:250). The complexes were immunoprecipitated using protein A-Sepharose, then analyzed by SDS-PAGE with 9000 cpm for PPAR α and PPAR γ_2 , 13000 cpm for PPAR β , and 16000 cpm for PPAR γ_1 . Exposure was 7 days for PPAR γ_2 and 27 days for the other PPARs.

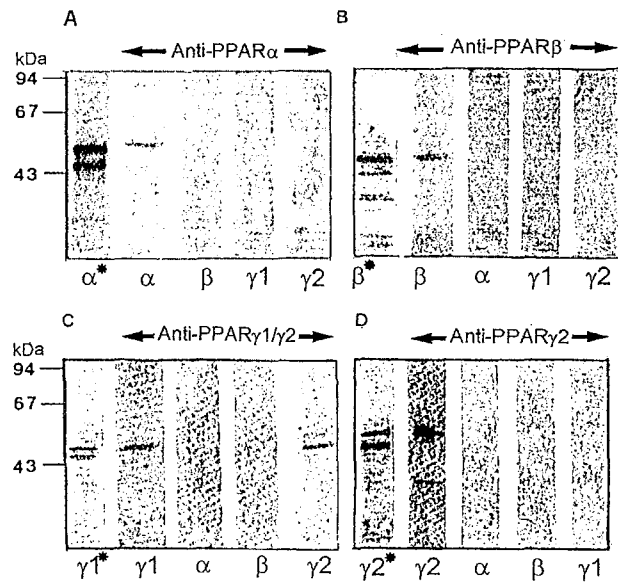


Figure 3 Specificity of anti-PPAR antibodies by Western blotting. Mouse PPAR α /pSG5, PPAR β /pSG5, PPAR γ_1 /pSG5, and human PPAR γ_2 /pBSIIK5⁺ plasmids were in vitro-translated using reticulocyte lysate and L-[35 S]-methionine. Translated products were submitted to SDS-PAGE (10%). The gels were either subjected to autoradiography (*) or processed by Western blotting and ECL using the anti-PPAR antibody (diluted 1:500) indicated above the different lanes.

that each antibody recognized the PPAR subtype against which it was raised. When preimmune serum was used as a control, no signal was obtained. Cross-reaction between each anti-PPAR antibody against the other PPAR subtypes was absent or very low, as demonstrated by Western blotting assays (Figure 3). The anti-PPAR antibodies produced were also characterized by Western blotting using cytosolic extracts from human adult and fetal colon mucosae. The presence of the different PPAR subtypes was detected in both samples examined (Figure 4). However, our results indi-

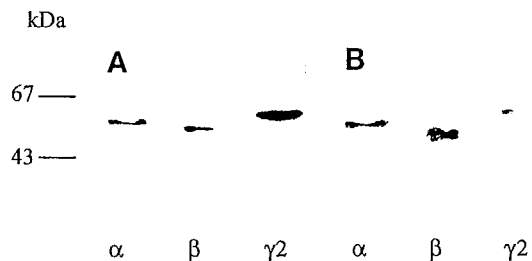


Figure 4 Western blotting analysis of PPAR α , β , and γ_2 expression in human fetal (A) and adult (B) colon mucosae. Fifty μ g of protein was run on 15% SDS-PAGE, then transferred onto a PVDF membrane. Immunoreactivity of the different PPAR subtypes was detected by incubation of the membrane with the appropriate primary antibody (diluted 1:1000 for anti-PPAR α and anti-PPAR β antibodies and 1:5000 for anti-PPAR γ_2 antibody). The final reaction was detected by ECL.

cated a higher expression of PPAR γ_2 in fetal colon compared to adult colon. In addition, the anti-PPAR γ antiserum provided by Interchim recognizes both human PPAR γ_1 and PPAR γ_2 , as attested by the manufacturer.

PPAR α Expression

The average immunohistochemical intensity values, as estimated by two independent investigators in four tissue sections from different fetuses, are summarized in Table 1 for the different PPARs. No immunoreactivity was found in control sections when the primary antibody was omitted or replaced by preimmune serum (not shown).

Figure 5A shows that the PPAR α subtype was expressed as early as 7WD in the stratified columnar epithelium. At this stage, the tissue exhibited a cytoplasmic and nuclear staining. At 14WD (Figure 5B), a lower intensity of fluorescence was observed for this tissue. The decrease was much more pronounced at 20WD because the immunoreaction was mainly restricted to the nuclei of epithelial cells (Figure 5C). Faint staining was observed in the nuclei of mesenchymal and muscular cells throughout development of the fetal esophagus.

At 12WD the gastric epithelium showed the highest labeling with the anti-PPAR α antibody compared with

the intensity of fluorescence in the extra-epithelial layers. The PPAR α protein was detected in the surface epithelial cells as well as in the epithelial growing buds (Figure 5D). At 15WD no significant change was noted in PPAR α expression (Figure 5E). Four weeks later the staining was barely detectable in the gastric epithelial cells (Figure 5F). PPAR α was faintly detected at 7WD in the stratified jejunal epithelium (Figure 5G). At 12WD PPAR α expression remained very low in the villous jejunum (Figure 5H) but was higher in ileum (Figure 5J). No immunoreaction was detected at 16WD in the jejunal epithelium (Figure 5I). Meanwhile, PPAR α was well expressed in the ileal tissue (Figure 5K). At 22WD (Figure 5L) PPAR α expression was high, particularly in nuclei of ileal cells. At 8WD (Figure 5M) the colon was a simple tube with a slit-like lumen composed of stratified epithelium surrounded by mesenchyme. At this stage the PPAR α subtype was moderately expressed in the epithelial cells (Figure 5M). Nuclei of mesenchymal cells were also stained by the antibody. At 14WD (Figure 5N) the luminal surface of the colon exhibited well-formed villi in which staining was slightly decreased. As mucous goblet cells differentiated, they produced secretory granules in which the PPAR α was not detected. At 20WD (Figure 5O), the villous structures were present in the different segments of the colon. The specialized cells facing the colon lumen were stained. However, the intensity of fluorescence was faint and diffuse.

Table 1 Differential expression of PPAR α , PPAR β , and PPAR γ_2 during fetal development of the human digestive tract^a

Esophagus	7WD	/	14WD	20WD
PPAR α	+++	/	++	+
PPAR β	+++	/	++	-
PPAR γ	++	/	+++	++
Stomach	/	12WD	15WD	19WD
PPAR α	/	++	++	-/+
PPAR β	/	+	+++	++
PPAR γ	/	+	++	+
Jejunum	7WD	12WD	16WD	/
PPAR α	-/+	-/+	-	/
PPAR β	++	++	++	/
PPAR γ	+++	++	++	/
Ileum	/	12WD	16WD	22WD
PPAR α	/	++	++	+++
PPAR β	/	+++	+++	+++
PPAR γ	/	+++	+++	+++
Colon	8WD	/	14WD	20WD
PPAR α	++	/	+	-/+
PPAR β	+++	/	-/+	++
PPAR γ	++	/	++	+++

^a -, absent; -/+, barely detectable; +, weak expression; ++, moderate expression; +++, strong expression. PPAR levels of expression, indicated by - or + sign, reflect differences in signal fluorescence intensities observed by optical microscopy. The results are average values of at least four different specimens of each organ analyzed.

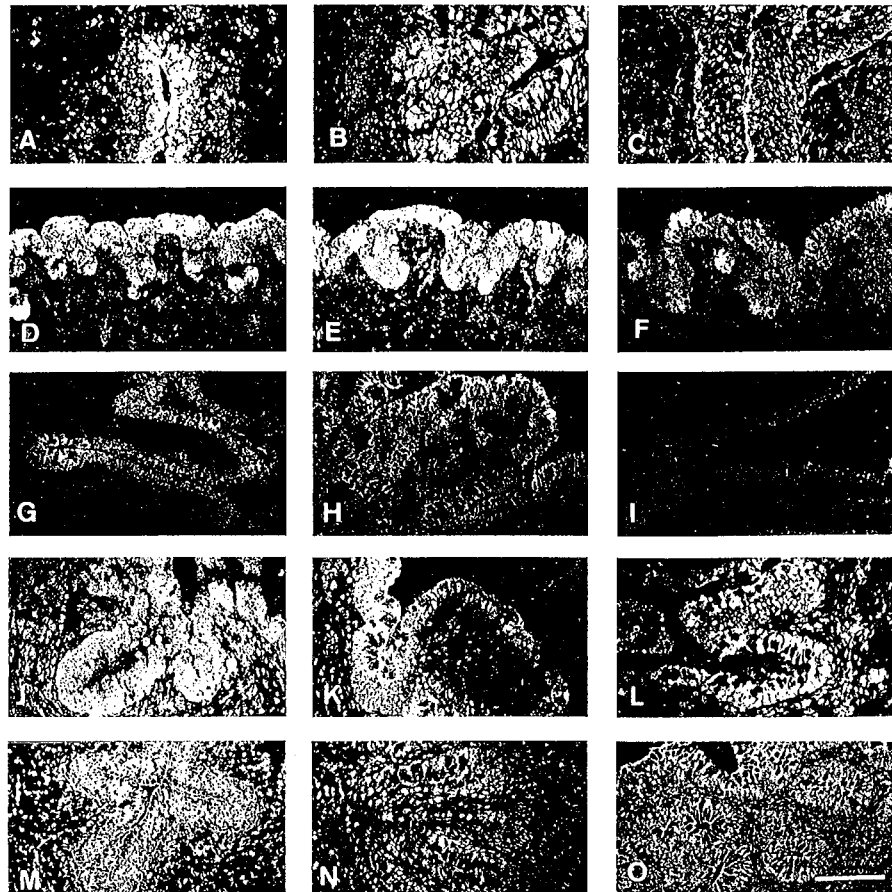
PPAR β Expression

Between 7WD (Figure 6A) and 14WD (Figure 6B), the PPAR β subtype was substantially expressed in the cytoplasm and nucleus of human esophageal epithelial cells. A marked decrease was observed in the intensity of immunoreaction at 20WD (Figure 6C). Whatever the developmental stage examined, PPAR β was detected overall in the gastric epithelium (Figures 6D-6F). A peak in fluorescence intensity was observed at 15WD (Figure 6E; Table 1). At later stages the staining was more restricted to nuclei (Figure 6F).

In the small intestine, the anti-PPAR β antibody showed stronger staining in the ileum (Figures 6J-6L) than in the jejunum (Figures 6G-6I) at all stages studied. The staining in the epithelial cells remained moderate and high throughout development of the jejunum and ileum, respectively. At 22 WD the intensity of fluorescence was stronger in the ileal crypt epithelial cells than in the differentiated villous cells (Figure 6L).

The PPAR β subtype was well expressed in the different layers of the human fetal colon at 8WD (Figure 6M) and 20WD (Figure 6O). The anti-PPAR β antibody was located mainly in the nuclei of the epithelial and mesenchymal cells. As for the ileum, stronger

Figure 5 Differential expression of PPAR α in developing human fetal digestive tract by immunohistochemistry. (A–C) Transverse esophageal sections at 7WD (A), 14WD (B), and 20WD (C), showing expression of the PPAR isotype mainly in the epithelial cells. (D–F) Gastric sections at 12WD (D), 15WD (E), and 19WD (F). Expression of PPAR α is detected in the cytoplasm of the gastric epithelial cells. (G–L) Small intestine. Expression of the PPAR subtype is faint in jejunum (G, 7WD; H, 12WD; I, 16WD) and higher in ileum (J, 12WD; K, 16WD; L, 22WD). The presence of PPAR α is also detected in the epithelial colon cells (M–O) at 8WD (M), 14WD (N), and 20WD (O). Bar = 75 μ m.



staining was observed in the crypt regions. However, it was barely detected at 14WD (Figure 6N).

PPAR γ Expression

The different antibodies (anti-PPAR γ , anti-PPAR γ_1/γ_2 , and anti-PPAR γ_2 antisera) used gave similar results for their distribution throughout the development of the human fetal digestive tract. However, the immunoreactivity was always higher with the anti-PPAR γ_2 antibody compared to that observed with the two other antibodies. One can explain this difference by a higher level of immunoglobulins in the anti-PPAR γ_2 antiserum. Therefore, only results obtained with the anti-PPAR γ_2 antiserum are presented here (Table 1). In addition, the presence of mRNA encoding PPAR γ_2 was confirmed in intestinal extracts from human fetuses by nuclease S1 protection assay (Figure 7).

The presence of the PPAR γ_2 protein was detected at 7WD (Figure 8A), 14WD (Figure 8B), and 20WD (Figure 8C) in esophagus. Throughout human fetal esophageal development, the staining was moderate or high and was restricted to nuclei of both epithelial and extra-epithelial cells.

Expression of PPAR γ_2 was lower in the gastric epithelium (Figures 8D–8F) than in the esophageal tissue. A slight increase was noted at 15WD (Figure 8E).

Staining with the anti-PPAR γ_2 antibody was particularly prominent in epithelial cell nuclei of jejunum (Figures 8G–8I) and ileum (Figures 8J–8L). Because nuclei were localized in the basal part of epithelial cells, PPAR γ_2 staining showed a spotted distribution along the basal plasma membrane. Owing to the abundance of nuclei, the intensity of fluorescence appeared higher in the crypt regions compared with the immunoreactivity in the upper villous regions (Figures 8I, 8K, and 8L).

At 8 WD (Figure 8M) and 14WD (Figure 8N), most nuclei of colon epithelial and mesenchymal cells were labeled with the anti-PPAR γ_2 antibody. At 20WD the immunoreaction was higher and was more restricted to nuclei of specialized cells facing the colon lumen (Figure 8O).

Discussion

The results described here establish for the first time the presence and the spatiotemporal distribution of

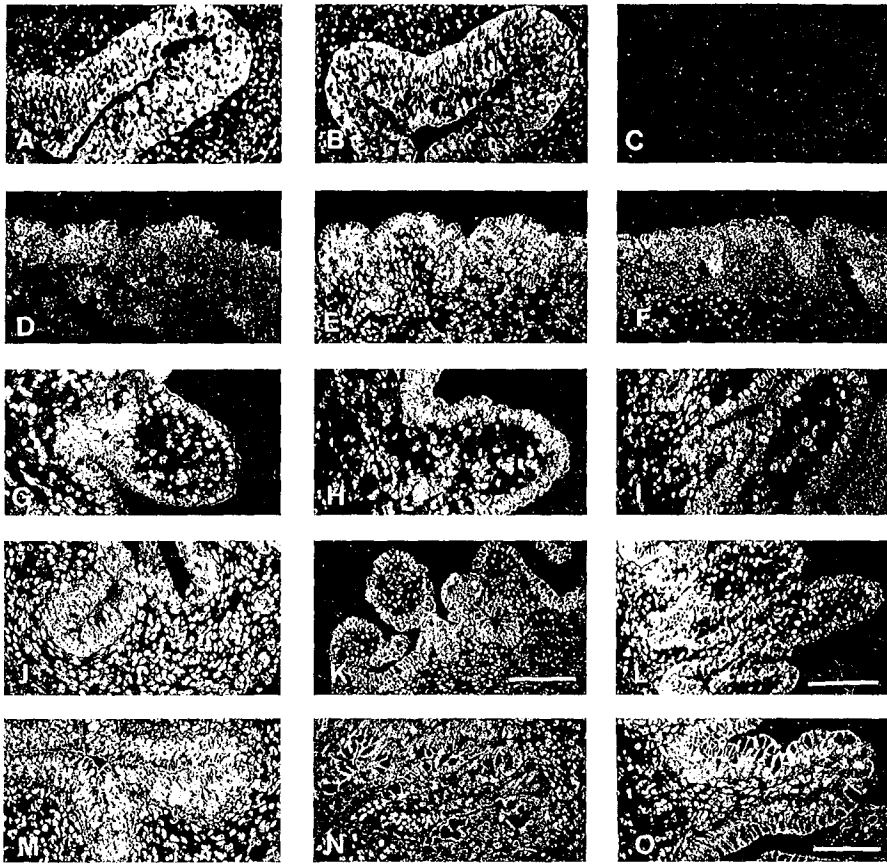


Figure 6 Differential expression of PPAR β in the developing human fetal digestive tract by immunohistochemistry. (A–C) Esophagus at 7WD (A), 14WD (B), and 20WD (C). A decrease in PPAR β expression is observed at 20WD. (D–F) Stomach at 12WD (D), 15WD (E), and 19WD (F). (G–I) Jejunum. Throughout jejunum morphogenesis (G, 7WD; H, 12WD; I, 16WD), PPAR β is detected in nuclei of mesenchymal and epithelial cells. However, the intensity of fluorescence is lower than that observed during ileal development (J, 12WD; K, 16WD; L, 22WD). (M–O) Colon (M, 8WD; N, 14WD; O, 20WD). The immunoreactivity is mainly detected in nuclei of epithelial and mesenchymal cells. Note that the reaction is absent in mucous secretory granules. Bars: A–J, M–O = 75 μ m; K, L = 120 μ m.

three PPAR subtypes in the developing human fetal digestive tract.

Expression of PPARs in Human Digestive Tract

With the use of polyclonal antibodies specifically directed against PPAR α , PPAR β , and PPAR γ (γ_1/γ_2 and γ_2), our immunohistochemical data show that the different PPAR subtypes are expressed as early as 7WD in human fetal digestive tract and in different cell types of endodermal and mesodermal origin. The presence of PPAR α , PPAR β , and PPAR γ has already been reported in adult rat esophagus, stomach, small intestine and colon by in situ hybridization (Braissant et al. 1996). In another recent study, quantification of PPAR mRNA by ribonuclease protection assay revealed relatively high expression of PPAR γ and PPAR β in adult mouse colon compared to small intestine. In contrast, PPAR α expression was higher in the intestinal mucosa (Mansen et al. 1996). Furthermore, PPAR γ is reported to be also expressed in human (Brockman et al. 1998; Sarraf et al. 1998) and rodent (Lefebvre et al. 1998; Saez et al. 1998) colon tumor cells. Although both PPAR γ_1 and γ_2 proteins are detected in fat tissues, it is believed that expression of the PPAR γ_2 isoform remains mainly adipocyte-specific, whereas the PPAR γ_1

isoform expression may be extra-adipocytic. However, in two recent studies the presence of the two PPAR γ isoforms is obvious in human (Dubois et al. 1998) and rodent (Lefebvre et al. 1998) colon cells as shown by the results obtained in Western blotting using polyclonal antibodies reactive with both PPAR γ_1 and PPAR γ_2 . Our data from immunohistochemical, Western blotting, and nuclease S1 protection assays

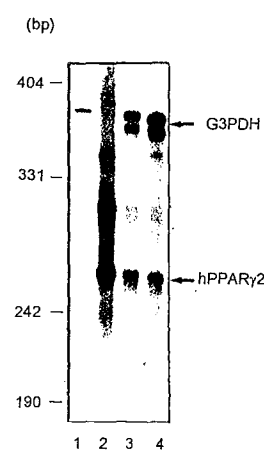
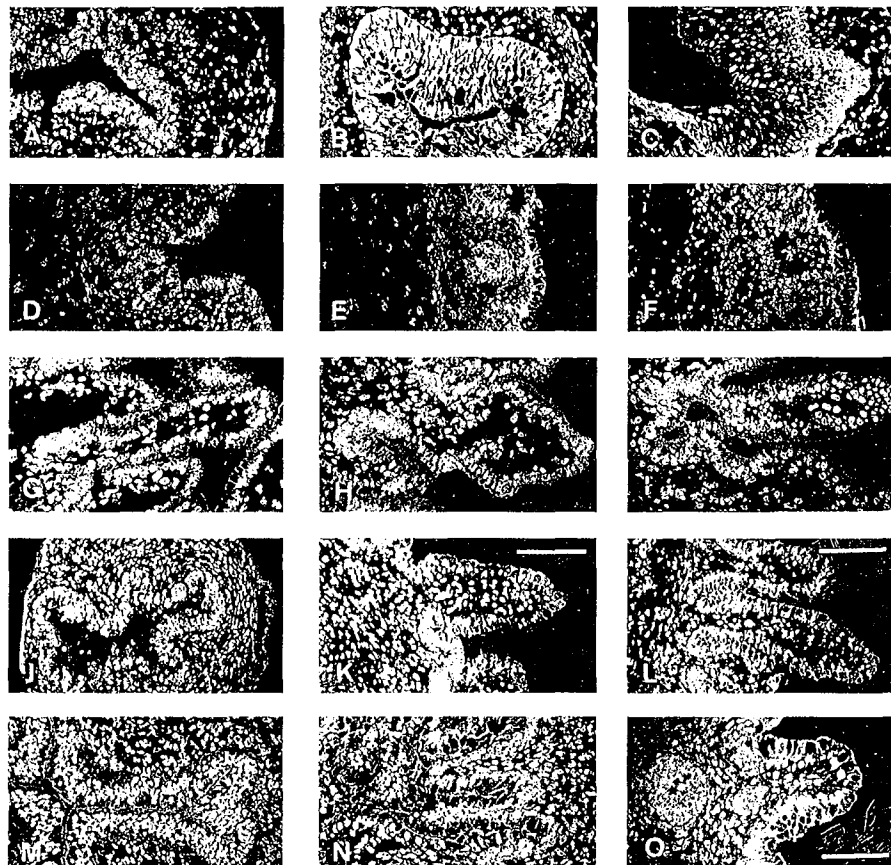


Figure 7 Detection of PPAR γ_2 mRNA in human fetal intestine (14WD) by nuclease protection assay. 32 P-labeled DNA probes to detect either G3PDH or PPAR γ_2 mRNA were prepared as described in Materials and Methods. 32 P-labeled G3PDH (Lane 1) and PPAR γ_2 (Lane 2) DNA probes (10^5 cpm) were run on a 5% polyacrylamide gel. Total RNA (5 μ g) isolated from 3T3 L1 cells (Lane 3) or from human fetal intestine (14WD) (Lane 4) were hybridized with the two radiolabeled probes. After nuclease S1 digestion, the resulting products were electrophoresed and the gels were autoradiographed. The presence of PPAR γ_2 mRNA is obvious in the two models examined.

Figure 8 Differential expression of PPAR γ_2 in developing human fetal digestive tract by immunohistochemistry. (A–C) Esophagus (A, 7WD; B, 14WD; C, 20WD). The PPAR γ isotype is expressed throughout fetal esophageal development. (D–F) Stomach at 12WD (D), 15WD (E), and 19WD (F), showing immunoreactivity in nuclei of growing pit cells. (G–I) Jejunum (G, 7WD; H, 12WD; I, 16WD). (J–L) Ileum (J, 12WD; K, 16WD; L, 22WD). (M–O) Colon (M, 8WD; N, 14WD; O, 20WD). In the small intestine and colon, PPAR γ exhibits a nuclear localization in both mesenchymal and epithelial cells. In the epithelium, PPAR γ is expressed in the different regions of the crypt–villous axis. Bars: A–J, M–O = 75 μ m; K, L = 120 μ m.



agree with these results. They are somewhat at variance with those of Braissant and Wahli (1998), who detected by in situ hybridization the presence of PPAR α and PPAR β mRNA, but not PPAR γ mRNA, in rat fetal intestine. The discrepancy probably reflects differences in models examined or in timing of functionality of the gut in fetal life, or in the techniques used, as we mostly analyzed protein levels.

Spatiotemporal Distribution of PPARs

PPARs are expressed at different levels in cell types of endodermal and mesodermal origin during development of the human fetal digestive tract.

At early stages (7–15WD) of esophageal and stomach development, PPAR α and PPAR β are more localized in the cytoplasm than in the nucleus, whereas at later stages they become predominantly nuclear. This expression pattern overlaps for the esophagus, with replacement of the columnar ciliated epithelium by adult squamous tissue exhibiting flattened cells with microvillous processes in their apical membrane (Johns 1952). For the stomach, it coincides with the acquisition of adult features, characterized by differentiation of gastric cells appearing at the base of the evolving pits (Salenius 1962), followed by differentiation of en-

terochromaffin cells and mucous neck cells (De Lomos 1977). PPAR α is involved in lipid metabolism and homeostasis (Wahli et al. 1995; Schoonjans et al. 1996). Indeed, the absence of PPAR α expression in knockout mice prevents the PP inducibility of genes encoding peroxisomal and microsomal lipid-metabolizing enzymes (Lee et al. 1995). The early onset of PPAR α expression in the esophagus and stomach suggests the involvement of this subtype in establishment of epithelial lipid metabolism. The decrease of PPAR β expression in the esophageal epithelium is likely due to a shift in the physiology of this tissue. A role of PPAR β in the onset of gastric cell differentiation is possible because Braissant and Wahli (1998) have found a correlation between the peak of ubiquitous expression of PPAR β during mouse embryogenesis and the period of greatest cell differentiation. Our results also show that PPAR γ is predominantly nuclear throughout esophageal and stomach development. This subtype is well expressed during esophageal morphogenesis, suggesting a role for PPAR γ during this process. On the other hand, PPAR γ expression is low or moderate during stomach formation.

In the intestine as a whole and whatever the fetal stage examined, the different PPAR subtypes are more expressed in ileum and, to a lesser extent, in colon

than in duodenum. The different spatiotemporal expression of PPAR α , PPAR β , and PPAR γ during development of the human fetal intestine and their ligand specificity (Sørensen et al. 1998) suggest that these receptors are involved in different intestinal functions. PPAR α ligands induce the expression of genes involved in lipid absorption and transport in the rat small intestine (Martin et al. 1997; Motojima et al. 1998). The physiological role of PPAR β in the small and large intestine remains unknown. PPAR γ ligands have been shown to inhibit proliferation and to induce differentiation of human colon cancer cells (Brockman et al. 1998; Sarraf et al. 1998). On the other hand, the same ligands enhance colon polyp and tumor formation in the min/+ mouse model (Lefebvre et al. 1998; Saez et al. 1998). It is evident from our results that PPAR γ is expressed along the intestinal crypt-villous region in both proliferating and differentiated cells. At present, it is difficult to speculate about the precise role played by PPAR γ in intestinal cell life.

In summary, the spatiotemporal distribution of the PPAR subtypes has been described during development of the human fetal digestive tract. The different PPARs are predominantly expressed in epithelial cells, although their presence is also detected in nuclei of cells of mesodermal origin. The three PPAR subtypes exhibit different patterns of expression in relation to the morphogenesis of the digestive tract. They are expressed very early, suggesting that these receptors play major roles in the development and/or the physiology of the digestive tract. Furthermore, the fact that PPAR γ is expressed at a high level whatever the region considered (except the stomach) and the stage studied argues for a prominent role of this receptor in human digestive tract.

Acknowledgments

Supported by the Association de la Recherche contre le Cancer (Contrat ARC no. 9233), the Ligue contre le Cancer (Comité de Meurthe et Moselle), the Fondation de la Recherche Médicale (Comité de Lorraine), and the Conseil de Recherches Médicales du Canada.

We are grateful to W. Wahli (University of Lausanne) for the mPPAR α /pSG5, mPPAR β /pSG5, mPPAR γ ₁/pSG5, and hPPAR γ ₂/pBSIIKS⁺ plasmids, to M. Donner (UPRES 2402, Nancy) for the 3T3 L1 cells, and to A. Stoekel for her skillful assistance.

Literature Cited

- Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Freing V, Riou JP, Laville M, Staels B, Auwerx J, Vidal H (1997) Tissue distribution and quantification of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 46:1319-1327
- Avrameas S (1969) Coupling of enzymes to protein with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 6:43-52
- Basque JR, Levy E, Beaulieu JF, Ménard D (1998) Apolipoproteins in human fetal colon: immunolocalization, biogenesis, and hormonal regulation. *J Cell Biochem* 70:354-365
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W (1996) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology* 137:354-366
- Braissant O, Wahli W (1998) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor - α , - β , - γ during rat embryonic development. *Endocrinology* 139:2748-2754
- Brockman JA, Gupta RA, Dubois RN (1998) Activation of PPAR γ leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 115:1049-1055
- Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135:798-800
- Chomzynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
- Dauça M, Cablé S, Calvert R, Colin S, Schilt J, Leheup B, Keller JM, Ménard D (1996) Peroxisomes and peroxisomal enzymes in the human fetal small intestine. *Biol Neonate* 69:12-21
- De Lomos (1977) The ultrastructure of endocrine cells in the corpus of the stomach of human fetuses. *Am J Anat* 148:359-384
- Desvergne B, Wahli W (1995) PPAR: a key nuclear factor in nutrient/gene interactions? In Baeuerle P, ed. *Inducible Transcription*. Vol 1. Boston, Birkhäuser, 142-176
- Dubois RN, Gupta R, Brockman J, Reddy BS, Krakow SL, Lazar MA (1998) The nuclear eicosanoid receptor, PPAR γ , is aberrantly expressed in colonic cancers. *Cancerogenesis* 19:49-53
- Elbrecht A, Chen Y, Cullinan CA, Hayes N, Leibowitz MD, Moller DE, Berger J (1996) Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors γ ₁ and γ ₂. *Biochem Biophys Res Commun* 224:431-437
- Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J (1997) The organisation, promoter analysis, and expression of the human PPAR gamma gene. *J Biol Chem* 272:18779-18789
- Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J (1998) PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* 438:55-60
- Johns BAE (1952) Developmental changes in the oesophageal epithelium in man. *J Anat* 86:431-442
- Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H, Gonzalez FJ (1995) Targeted disruption of the α isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 15:3012-3022
- Lefebvre AM, Chen I, Desreumeaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, Heyman R, Auwerx J (1998) Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ enhances the development of colon cancer tumors in C57BL/6J-APCmin/+ mice. *Nature Med* 4:1053-1057
- Lemberger T, Desvergne B, Wahli W (1996) Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:335-363
- Levy E, Thibault L, Ménard D (1992) Intestinal lipids and lipoproteins in the human fetus: modulation by epidermal growth factor. *J Lipid Res* 33:1607-1617
- Mansen A, Guardiola-Diaz H, Rafter J, Branting C, Gustafsson JA (1996) Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in the mouse colonic mucosa. *Biochem Biophys Res Commun* 222:844-851
- Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J (1997) Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPAR α and PPAR γ activators. *J Biol Chem* 272:28210-28217

- Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J (1998) Macrophages in human atheroma contain PPAR gamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPAR gamma activation in mononuclear phagocytes *in vitro*. *Am J Pathol* 153:17-23
- Ménard D (1994) Development of human intestinal and gastric enzymes. *Acta Paediatr* 405:1-6
- Ménard D (1995) Morphological studies of the developing human esophageal epithelium. *Microsc Res Tech* 31:215-225
- Ménard D, Calvert R (1991) Fetal and postnatal development of the small and large intestine: patterns and regulation. In Morisset J, Solomon TE, eds. *Growth of the Gastrointestinal Tract: Gastrointestinal Hormones and Growth Factors*. Boca Raton, FL, CRC Press, 159-174
- Montgomery RK, Mulberg AE, Grand RJ (1999) Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. *Gastroenterology* 116:702-731
- Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N (1998) Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α and γ activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem* 273: 16710-16714
- Mukherjee R, Jow L, Noonan D, McDonnell DP (1994) Human and rat peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 51:157-166
- Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK (1998) Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7614-7619
- Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, Alvarez JGA, U TM, Baird SM, Thomazy VA, Evans RM (1998) Activators of the nuclear receptor PPAR γ enhance colon polyp formation. *Nature Med* 4:1058-1061
- Salenius P (1962) On the ontogenesis of the human gastric epithelial cells. *Acta Anat (Basel)* 46:1-75
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, De Angelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, Spiegelman BM (1998) Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR γ . *Nature Med* 4:1046-1052
- Schmidt A, Endo N, Rutledge SJ, Vogel R, Shinar D, Rodan GA (1992) Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol Endocrinol* 6:1634-1641
- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1996) The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1302: 93-109
- Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ (1993) cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator-activated receptor. *Biochemistry* 32:5598-5604
- Sørensen HN, Treuter E, Gustafsson JA (1998) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Vitam Horm* 54:121-166
- Spiegelman BM (1998) PPAR gamma in monocytes: less pain, any gain? *Cell* 93:153-155
- Spiegelman BM, Hu E, Kim JB, Brun R (1997) PPAR gamma and the control of adipogenesis. *Biochimie* 79:111-112
- Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM (1994) mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8:1224-1234
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM (1995) Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev* 5:571-576
- Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM (1998) PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93:241-252
- Tso JY, Sun XH, Kao TH, Reece KS, Wu R (1985) Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* 13:2485-2502
- Wahli W, Braissant O, Desvergne B (1995) Peroxisome proliferator-activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. *Chem Biol* 2:261-266
- Zhu Y, Alvares K, Huang Q, Rao MS, Reddy JK (1993) Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 268:26817-26820

Recent Res. Devel. Lipids, 5(2001): 147-165 ISBN: 81-86846-98-0

Peroxisome proliferator-activated receptors are key regulators in cell differentiation

Hervé Schohn^{1*}, Cécile Huin¹, Patricia Passilly-Degrace², P.Collet¹, Norbert Latruffe², Lionel Domenjoud¹ and Michel Dauça¹

¹H.S., C.H., P.C. and M.D. from Laboratoire Proliférateurs de Peroxysomes, Faculte des Sciences, BP 239, F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, ²P. P-G and N.L. from Laboratoire de Biologie Moleculaire et Cellulaire (LBMC), faculte des Sciences Gabriel, Boulevard Gabriel, F-21000 Dijon

ABSTRACT

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-activated nuclear receptors. Activation of these receptors by specific ligand modifies the basal transcription of target genes. Several synthetic ligands known as peroxisome proliferator-activated activators are used in treatment of dyslipidemia, diabetes type-2 and inflammation processes. At the cellular level, PPARs activation promotes cell differentiation in many cell types. In this review, we will focus on the roles of PPARs in cell differentiation and cell dysfunctionment.

INTRODUCTION

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-activated transcription factors. They constitute a subfamily of the hormone nuclear receptors family. Since their discovery in the begining of the 90's, this field of research has dramatically expanded. PPARs are implicated in cell cycle progression, differentiation and cell detoxification. They participate in lipid homeostasis, foetus implantation and brain development. These promising proteins are found to be implicated in human diseases such as atherosclerosis and

*Corresponding author:
E-mail : schohn@scbiol.u-nancy.fr



**Transworld Research
Network.**

T.C. 36/248(1),
rivandrum-695 008, India.

neoplasia.

STRUCTURAL ORGANIZATION OF PPARs

The nuclear receptor subfamily of PPARs [1] consists of three isotypes named α (NR1C1, [2]), β/δ (NR1C2), and γ (NR1C3) (table 1). The different members are encoded by separate genes. The human and mouse PPAR γ gene transcription generates two transcripts, $\gamma 1$ and $\gamma 2$ resulting from alternative promoter usage and differential splicing [3-5]. PPAR $\gamma 2$ has an additional 29 and 30 NH₂-terminal amino acids sequence in human or mouse PPAR $\gamma 2$ protein respectively. In humans, a third transcript PPAR $\gamma 3$ is generated by differential promoter usage yielding a protein identical to PPAR $\gamma 1$ [5]. Like other nuclear receptors, PPARs have a similar protein structure consisting of a NH₂-terminal A/B domain, a DNA binding domain, a hinge region and a COOH-terminal ligand-binding domain. The DNA binding-domain share 85% similarity within the PPARs subfamily whereas the ligand-binding domains are only 70% similar within the subfamily members. Two activating function domains (AF) have been identified : AF-1 contains a phosphorylation site within a consensus target sequence for a mitogen-activated protein kinase (MAPK) within the A/B domain of PPAR α and γ . AF-2 is located in the COOH-terminal sequence of the ligand-binding domain ; its presence is necessary for binding of coactivators who increase the basal transcription of PPAR-dependent genes.

TISSUE EXPRESSION

Tissue expression of PPARs is diverse (table 1) [6-9]. PPAR α is mainly expressed in tissue having high fatty acid metabolism and high peroxisome-dependent activities such as liver, kidney, heart or in steroidogenic tissue such as adrenal gland. Higher expression of PPAR γ is restricted to adipose tissue, spleen and

intestine. Lower PPAR γ expression is observed in lung, breast and mammary glands. While PPAR $\gamma 1$ distribution correlates with that of PPAR α , PPAR $\gamma 2$ expression is restricted to adipose and colon. PPAR β/δ is expressed in almost all tissue and often at higher levels than others PPAR isotypes, except in liver where the receptor expression is low [7]. The highest expression of PPAR β/δ is observed in the developing neural tube and in the epiderma during rat development [10].

ACTIVATION OF PPARs

Formation of the heterodimer

PPARs bind to a specific hormone response element, named peroxisome proliferator response element (PPRE), in the promoter of target genes (figure 1). PPARs action is mediated through heterodimerization with the 9-cis retinoic acid receptor (RXR) [11, 12]. The PPAR/RXR consensus PPRE is a direct repeat of the AGGTCA sequence spaced by one base also referred to DR1 (see [13]). The precise sequence of PPRE and the spacer nucleotide are important in the binding of nuclear receptors as hetero- or homodimers [14-16]. Other nuclear receptors including retinoic acid receptor (RAR), COUP-TF1 and hepatic nuclear factor-4 (HNF-4), bind to DR1. Nakshatri and Bhat-Nakshatri [16] have demonstrated that base position within the consensus sequence and the spacer nucleotide determine the binding preference of PPAR/RXR and RAR/RXR heterodimers and HNF4 homodimers on DR1. Moreover, the promotor context determines whether an element function as a PPRE or an HNF-4 response element. Thus, the presence and relative level of promoter-specific transcription factors will determine the specificity of transcriptional response level. PPAR activation has also been shown to occur not only on the canonical DR1 : PPAR/RXR heterodimers binds *in vitro* to the palindromic estrogen response element

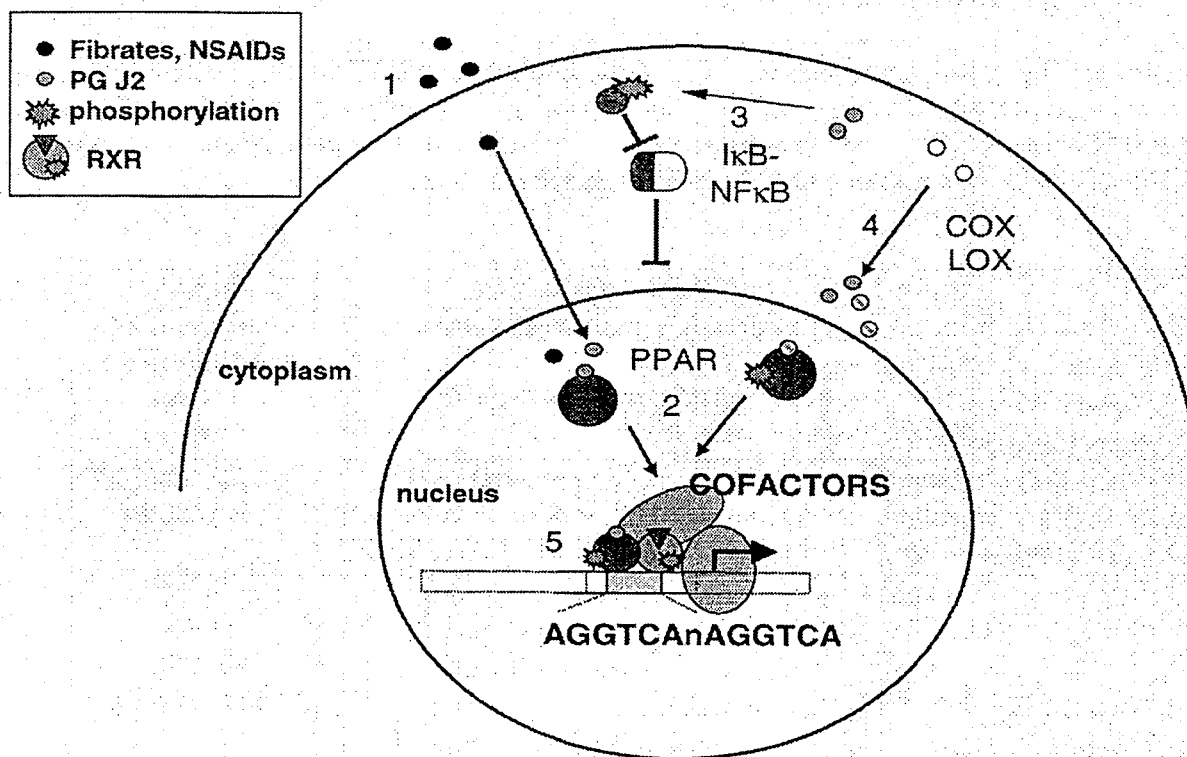


Figure 1 : Activation of PPARs

(1). Extracellular ligands cross the plasmic membrane and they bind to PPAR (1). Ligand binding follows phosphorylation (☀) or dephosphorylation of receptor (2). Several ligands, NSAIDs for instance (●), have been shown to inhibit PPAR transcription by direct interaction with activated receptor into the nucleus. Prostaglandin J2 derivative (☀) has also been shown to alter activation of NFκB (3) by inhibiting phosphorylation of IκB via IκB kinase. PPAR ligands could also be synthesized within the cell via the cyclooxygenase (☀) or the lipoxygenase (○) pathway from arachidonic or linoleic acid (4,○). Finally PPAR form an heterodimer with RXR which bind to PPRE on promoter of target genes (5). Subsequently, they increase or silence gene transcription level by interacting with cofactors or corepressors. (abbreviations : NSAID : nonsteroidal anti inflammatory drug ; PGJ2 : 15-deoxy-Δ-12, 14 prostaglandin J2; RXR, 9-*cis* retinoic acid receptor)

AGGTCAnnnTGACCT [17]. *In addition*, RXR as well as PPAR interact with the thyroid hormone receptor suggesting that crosstalk may exist between PPAR, RXR and thyroid hormone receptor [18, 19]. Formation of the heterodimer and subsequent transcriptional activation are ligand-dependent. Ligand binding induces a conformation change which places the COOH-terminal helix 12 of the ligand-binding domain adjacent to a hydrophobic cleft on the

surface of the ligand-binding domain. This occurs through direct protein interactions with the LXXLL motif present in the coactivator protein [20]. This modification allows the binding of coactivators on the AF-2 domain localised at the COOH-terminal of the ligand-binding domain. As for other nuclear receptors, coactivators consist of two general classes [20, 21]: One class includes the steroid receptor activator-1 family of proteins with histone acetyltransferase activity which

Table 1 : General characteristics of PPARs.

PPARs have also been detailed in salmon [207], turtle and Nile crocodile [208], chicken [209, 210], hamster [211], guinea pig [212], bovine [213] and pig [214]. The main PPAR ligands are depicted (for a complete list, see [30]). Abbreviations used : NSAIDs, nonsteroidal inflammatory drugs ; PGJ2, 15-deoxy- Δ -12, 14 prostaglandin J2 ; TZD ; thiazolidinedione.

name	species	Tissue localization	ligands
xPPAR α [63] mPPAR α [1] rPPAR α [199] hPPAR α [200]	xenope mouse rat human	- <u>high expression</u> : liver, heart, kidney et adipose tissues - <u>low expression</u> : intestine, spleen, testicule, muscle	leukotrien B4 eicosanoids fibrates NSAIDS
xPPAR β [63] mPPAR β [6] hPPAR β [201]	xenope mouse human	- ubiquitous expression in adult - high expression in rat brain development - also named hNUC1 [201], FAAR [202]	polyunsaturated fatty acids
xPPAR γ [63] mPPAR γ [6, 203] rPPAR γ [204] hPPAR γ [205, 206]	xenope mouse rat human	- three isotypes have been described : PPAR γ 1, PPAR γ 2 and PPAR γ 3. - PPAR γ 1 and γ 3 encode for an identical protein, whereas PPAR γ 2 has an additional 29 and 30 NH2-terminal amino acids sequence in human or mouse - adipose tissue	PGJ2 TZD NSAIDS Oxidized LDL

results in chromatin remodeling. As recently shown for estrogen receptor or orphan receptor steroidogenic factor 1 [22, 23], phosphorylation within AF-1 leads to recruitment of coactivators and subsequent transactivation. This occurs independently of AF-2 transactivation or in the presence of ligands [23]. Coactivators of the second class, as DRIP205/TRAP220, are part of a larger protein complex and interact with the basal transcription machinery. Protein interactions occur within the AF-2 domain in response to ligand binding [21]. Cyclic AMP response element-binding protein-binding protein and steroid receptor activator 1 have been shown to interact with the PPAR α [24, 25] and the PPAR γ /RXR heterodimer [26, 27] in a ligand-dependent manner. Ligand-binding also induces corepressor release. The nuclear

receptor corepressor (NcoR) dissociates from PPAR α and γ in the presence of specific ligands [28, 29]. Finally, ligand binding is necessary to induce transcription of PPAR target genes.

PPAR ligands

There is a large diversity of PPAR ligands. PPAR α ligands are fatty acids and their derivatives (Table 1, see also [30]). This receptor is activated by eicosanoids such as 8-S-hydroxy-eicosatetraenoic acid [31-33] and leukotriene B4 [34] (The latter is however controversial since different studies do not provide similar results [25, 32, 33]). These ligands are synthesized from arachidonic acid via the lipoxygenase pathway. Fibrates are synthetic ligands of PPAR α [32, 35]. They are

largely used in the treatment of hypertriglyceremia and combined hyperlipidemia. Nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) have also been shown to bind to PPAR α [36]. In addition, conjugated linoleic acid isomers, oxidized phospholipids and a new thiazolidinedione derivative were recently shown to be high affinity synthetic ligands for PPAR α [37-39]. PPAR β/δ is activated by polyunsaturated fatty acids [12]. PPAR γ is activated by arachidonic acid metabolites derived from the cyclooxygenase and the lipoxygenase pathway such as 15-deoxy- Δ -12, 14 prostaglandin J2 [40, 41] and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid respectively [42, 43]. Other ligands like 9- and 13-hydroxyoctadecadienoic acid derive from fatty acids of oxidized LDL [42]. Synthetic ligands, members of the thiazolidinedione family are agonists for PPAR γ [44]. These drugs are used in treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. In addition, indomethacin and ibuprofen, two well-known NSAIDs, function as ligands for PPAR γ [36].

Phosphorylation/dephosphorylation

This process is an important mechanism of PPAR activation ; it is also necessary for others transcription factors [21]. However, PPAR α is activated by phosphorylation as does estrogen receptor for exemple whereas transactivation of PPAR γ implicates dephosphorylation within the AF-1 domain. Human PPAR α is phosphorylated at serine 12 and 21 in the AF-1 domain by MAPK pathway [45]. Phosphorylation is insulin dependent [46] and is modulated by an unknown inhibitor under the control of Janus kinase 2/Signal Transducer and Activator of Transcription 5b (JAK2/STAT5b) himself regulated by growth hormone stimulation [47]. Ciprofibrate treatment in rat cells enhances phosphorylation of PPAR α [48]. Unexpectedly, the PPAR α phosphorylation leads to a decrease of acyl-coA oxidase, a

peroxisomal fatty acid β -oxydation marker [48]. In addition, peroxisome proliferators enhance extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1 and ERK2) phosphorylation at tyrosine residues [49]. PPAR γ 1 and γ 2 are phosphorylated at serine residues 82, 84 and 112, 114 respectively via MAPK pathway within the AF-1 domain (these respective serine residues may represent the same MAPK consensus sequence) [50, 51]. In preadipocytes and adipocytes, phosphorylation of PPAR γ is stimulated by insulin and is dependent on the MAPK pathway [52, 53] whereas prostaglandin F2 inhibits MAPK-dependent phosphorylation of PPAR γ [54]. The PPAR γ phosphorylation process decreases both ligand binding and transcriptional activities of target genes and ultimately arrests the preadipocyte differentiation into adipocytes [50]. In addition, phosphorylation at serine residues is achieved by different ways : phosphorylation of PPAR γ 1 at serine 84 occurs by ERK2 and c-jun N-terminal kinase (JNK) [51, 55] ; at serine 82, by stimulation of epidermal growth factor receptor via the MAPK-dependent pathway [53]. Stress protein kinase as JNK/Stress-Activated Protein Kinase phosphorylates PPAR γ 1 in a MAPK independent manner and subsequently lowers PPAR γ 1 transcriptional level [55]. Finally PPAR β/δ could be phosphorylated even though no MAPK consensus sequence has been found and therefore phosphorylation is processed by a MAPK independent pathway [51].

PPARS AND LIPID METABOLISM

Fatty acid metabolism

Various target genes implicated in lipid catabolism mainly in liver are under the control of PPAR α . Fatty acids are released from lipoprotein particles through the activity of lipoprotein lipase and then taken up by the cells. PPAR α -dependent lipoprotein lipase

hydrolyses triglycerides present in very low-density lipoproteins and stimulates LDL uptake [56]. PPAR α increases the transcription of apolipoproteins AI, AII [57, 58] and inhibits the transcription of apolipoprotein CIII [59] resulting, respectively, in modulation of high density lipoprotein-mediated cholesterol transport and in increase of lipoprotein lipase activity. Within the cells, intracellular transport is facilitated by stimulation of PPAR α -dependent target genes such as fatty acid transport protein, fatty acid translocase and hepatic cytosolic fatty acid-binding protein [60, 61]. Uptake of long-chain fatty acids involves activation into acyl coA thioesters by acyl-coA synthetase [60] and subsequently degradation by the peroxysomal β -oxidation pathway which enzymes are regulated by PPAR α [62-65]. Long-chain fatty acids import into mitochondria is regulated by PPAR α -dependent carnitine palmitoyl transferase I [66-68]. Furthermore, link between mitochondria metabolism and PPAR α -dependent regulation has been provided from the identification of functional PPRE on promoters of the β -oxidative medium chain acyl-coA deshydrogenase gene [69] and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coA synthase gene [70], the rate limiting enzyme of ketogenesis. Data from PPAR α knock-out mice also demonstrated that PPAR α positively regulates constitutive mitochondrial β -oxidation [71]. In these mice, feeding with a high fat diet leads to lipid accumulation in the liver reflecting the reduction of mitochondrial long chain fatty acid import. It must however be noted that PPAR α knock-out mice have metabolic changes including high cholesterol levels and low β -oxidation [72] and changes in lipoprotein metabolism [73]. Finally, liver PPAR α transcriptional level is under the control of circadian levels of glucocorticoids levels which participate to energy mobilization [74]. Fasting or glucocorticoids stress also induce PPAR α expression in hepatocytes [74, 75]. In addition to its implication in liver, PPAR α also alters

thermogenesis in adipose tissue by modulating the expression of uncoupling protein 1 and 2 [76, 77]. Uncoupling protein-1 in rat brown adipocytes is also regulated by PPAR γ [76].

Adipocyte differentiation

Adipocyte differentiation is a complex process leading to changes in gene expression [78-80]. This process involves CCAAT/enhancer binding proteins [81-83] and PPARs. PPAR γ is implicated in terminal adipocyte differentiation. Murine PPAR γ 2 was initially cloned as a component of an adipocyte-specific transcription factor ARF6 and found to be the heterodimer mPPAR γ 2/RXR α [84]. It regulates the expression of adipocyte fatty acid-binding protein aP2 [84], and phosphoenolpyruvate carboxykinase [85], which are markers of terminal adipocyte differentiation. Likewise, PPAR γ regulates the expression of lipoprotein lipase, fatty acid transport protein and fatty acid translocase in an adipocytic-specific manner [56, 61]. Finally, there is a dramatic increase in the expression of PPAR γ -dependent and CCAAT/enhancer binding protein-dependent target genes during cell differentiation and maturation [86, 87]. Activation of PPAR γ with thiazolidinedione also increases the number of small preadipocytes in rat white adipose tissue [88]. Subsequently, these cells undergo growth arrest and subterminal differentiation into adipocytes. The initial step of preadipocyte proliferation may depend on activation of PPAR β/δ [89]. In any NIH-3T3 fibroblasts lineage, a model of preadipocyte differentiation into adipocytes, treatment with cAMP elevating agents and activation of PPAR Δ promote mitotic clonal expansion [89]. In addition, in 3T3C2 fibroblasts, PPAR δ activated by fatty acids induce PPAR γ target -gene [90].

The pivotal role of PPAR γ was demonstrated by different ways : Retroviral expression of PPAR γ 2 induces adipocyte differentiation in cultured mouse fibroblasts [91].

Phosphorylation of PPAR γ blocks adipocyte differentiation in NIH3T3 cells [50]. Mice chimeric for wild-type and PPAR γ null cells show no contribution of null cells to formation of adipose tissue whereas in vitro differentiation of embryonic stem cells into adipocyte is directly dependent on PPAR γ expression and gene dosage [92]. Moreover, activation of PPAR γ with thiazolidinedione stimulates the trans-differentiation of myoblasts to adipoblasts [93]. Finally, PPAR γ is implicated in the control of cell cycle withdrawal through inhibition of the DNA-binding and transcriptional activity of E2F/DP factors [94]. In fact, PPAR γ down-regulated protein phosphatase 2A expression, phosphorylation of E2F/DP factors is then increased and subsequently E2F/DP activity is decreased.

PPARS AND CELL DIFFERENTIATION

PPARs have been found to promote differentiation in several cell types other than adipocytes. PPAR α induce differentiation of epidermal cells [95, 96]. Moreover, farnesol stimulates keratinocyte differentiation via PPAR α [97] whereas activation of PPAR γ with ligand inhibits keratinocyte proliferation [98]. PPAR α induces differentiation of tubular and interstitial testicular cells [99]. In liver, PPAR α promotes differentiation of oval cells [100] and hepatocyte maturation [101].

PPAR β/δ is highly expressed in brain [7]. In cerebellum, high expression of PPAR β is found in Purkinje cells [102]. The presence of this isotype correlated with oligodendrocyte differentiation [103]. In rat, PPAR β has also been shown to be implicated in brain development [10]. In reaggregated rat brain cell culture, PPAR β has an ubiquitous expression whereas low level of PPAR α is present in astrocytes [104]. PPAR β regulates acyl-coA synthetase 2 and thus it may be involved in brain lipid metabolism [104]. PPAR β/δ promotes differentiation in epidermal and tracheobronchial epithelial

cells [105]. Activation of PPAR β/δ also contributes to sebocyte maturation [106, 107]. Activation of PPAR γ with agonist induces differentiation of rat mesangial cells [108] and human trophoblasts [109]. In addition, mice deficient in PPAR γ exhibit abnormal placental development and trophoblast differentiation [110]. In contrast, PPAR γ activators, ciglitazone and troglitazone, inhibit maturation of MC3T3-E1 preosteoblast cell line [111].

PPARS IN CELL DISEASES

PPARs and atherosclerosis

Atherosclerosis is a multifactorial disease [112]. The atherosclerotic lesion is the result of a complex interplay between oxidized low density lipoprotein and the cellular components of the vessel wall, including smooth muscle cells, vascular endothelial cells and macrophages. This interaction promotes the formation of foam cells (lipid-laden monocytes/macrophages) associated with smooth muscles cells. Thus there is an accumulation of lipids and extracellular matrix in the intima of arteries and subsequently this pathologic process leads to a local inflammatory response [112]. PPAR α and γ are present in atherosclerotic lesions and macrophages foam cells [113-115]. However, they have diverse and somewhat opposite roles in cells interplaying in atherosclerotic lesions.

In vascular smooth muscle cells, PPAR α and γ are present [116, 117]. In these cells, PPAR γ activation with agonist inhibits platelet derived growth factor induced migration and phorbol ester induced vascular smooth muscle cell expression of matrix metalloproteinase-9 which in turn is implicated in matrix degradation required for cellular migration [116]. In contrast, in aortic smooth muscles cells PPAR α but not PPAR γ ligands inhibit inflammatory responses by repressing the NF κ B and AP-1 signalling pathways. Consequently, there is a decrease in IL-6

production and in inducible cyclooxygenase expression. These PPAR α effects are in agreement with previous study showing that in PPAR α deficient mice inflammatory stimuli rise to a prolonged response [34]. In addition, in hyperlipidemia patients treatment with fenofibrate reduced circulating IL-6 [117]. Thus, PPAR α and γ have protective effects on the activity of vascular smooth muscle cells : Activation of PPAR α decreases the inflammatory response by interfering with the NF κ B signalling pathway while PPAR γ activation specifically inhibits cell migration by lowering enzyme expression involved in extracellular matrix degradation.

In vascular endothelial cells, all PPARs isotypes are present [118-121]. The role of PPAR β/δ in these cells is however speculative. PPAR α activation inhibits the NF κ B signalling pathway and subsequently inhibits TNF α induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 which participate in adherence of monocytes [122]. In addition, PPAR α inhibits the AP-1 signalling pathway which is implicated in the thrombin activation of endothelin-1 production, a potent vasoconstrictor [123]. On the other hand, PPAR γ ligands inhibit the endothelial release of endothelin-1 [123, 124]. PPAR γ activation with troglitazone lowers the expression of intracellular adhesion molecule and vascular cell adhesion molecule-1 [125]. Moreover, PPAR γ ligands inhibit angiogenesis by reducing vascular endothelial cell growth factor receptors, Flt-1 and Flk/KDR [121] or alternatively by inducing apoptosis [119]. Furthermore, PPAR γ increases plasminogen activator inhibitor-1 expression [120, 121] which is thought to enhance apoptosis in vascular endothelial cells. Taken together, these results indicates that activation of PPARs may protect against atherogenic process formation by inhibiting endothelial cell functions.

PPAR α and γ are clearly present in monocytes/macrophages [114] and in foam cells [113, 115]. However, the implication of both PPAR isotypes is actually debated.

Initially, PPAR γ has been described as an inducer of monocyte differentiation into macrophages [126]. Foam cell formation is then achieved in the presence of PPAR γ ligands derived from oxidized LDL which are taken up via class B scavenger receptor, CD36 [42]. Three recent studies demonstrate that neither PPAR α nor PPAR γ activation with thiazolidinedione induces foam cell formation from human macrophages and macrophages derived from mouse PPAR γ null embryonic stem cells [127-129]. Moreover, it has also been report that PPAR γ ligands increase expressions of pro-inflammatory receptors, CD14 and CD11b/CD18 [114, 130], and class B scavenger receptors, CD36 and CLA1/SR-B1 [126, 131] whereas they reduce the expression of class A scavenger receptor [114, 130]. Moore et al. [129] show that using macrophages derived from PPAR γ deficient stem cells PPAR γ is not required for class A scavenger receptor expression while it regulates CD36 transcription, and subsequently contribute to lipid accumulation. In addition, both PPAR α and γ ligands induce expression of ABAC1 [127] which is involved in macrophage cholesterol export . ABAC1 expression depends on LXR transcription which is induced by PPAR ligands. Taken together, these data demonstrate that activation of PPAR γ is anti-atherogenic in foam cells.

Likewise, PPAR γ agonists have been shown to reduce inflammatory cytokines production by macrophages [114, 130]. In PPAR γ null stem cells-derived macrophages and in macrophage taken from PPAR γ null mice, neither loss of PPAR γ expression nor thiazolidinedione treatment affect cytokine expression or secretion [128, 129]. Furthermore, Chinetti et al. [127] demonstrated that in human monocytes-derived macrophages PPAR α is activated by thiazolidinedione and subsequently it could account for the observed anti-inflammatory effects of PPAR γ . In addition, PPAR γ ligands

could also act through a distinct signalling pathway. In fact, 15-deoxy- Δ -12, 14 prostaglandin J₂, a ligand of PPAR γ , has been shown to inhibit the NF κ B signaling pathway by interfering with I κ B kinase [132, 133]. More detailed information is however needed to clarify the effects of PPAR ligands in atherogenic process.

PPAR α in hepatocarcinogenesis

PPAR α has been first identified as a mediator of pleiotropic effects of peroxisome proliferators [1]. These compounds consist of fibrates drugs, phthalate and adipate ester plasticizers, herbicides and perfluorinated fatty acids. In rodents, especially mouse and rat, they induce proliferation of peroxisomes and increase related enzyme activities and peroxisomal enzyme transcriptional levels [134]. Peroxisome proliferation ultimately results in hepatomegaly and hepatocarcinogenesis in rat and mouse while guinea pigs, monkeys and humans are refractory to peroxisome proliferator treatment [135, 136]. Modifications of non-peroxisomal enzymatic activities are also observed in livers of peroxisome proliferator-treated animals [137]. These pleiotropic effects of peroxisome proliferators depend on PPAR α expression as demonstrated by generating PPAR α knockout mice [62, 138]. Feeding mice with Wy 14,643 or clofibrate results in hepatocellular nodules in wild-type mice whereas PPAR α knockout mice are unaffected. These findings are thought to be achieved in part by peroxide hydrogen level elevation generated during fatty acid catabolism through the activation of PPAR α -dependent peroxisomal β -oxidation enzymes [139] (see also [136] for the proposed model of hepatocarcinogenesis mediated by peroxisome proliferators). In addition, peroxisome proliferators enhance DNA replication in rat [140], in mice and in primary rat hepatocytes [141, 142]. The mitogenic effects of peroxisome proliferators is in part reliant on the induction of growth regulatory

genes such as *c-myc*, *c-HA-ras*, *c-fos-c-jun* [143] or genes encoding cell cycle regulatory proteins such as cyclins [144]. Furthermore, peroxisome proliferators suppress apoptosis in rodent hepatoma cells and in primary rat hepatocytes [145]. Nafenopin, a potent peroxisome proliferator, inhibits *bcl-2* and *bak* expression in mouse hepatocytes [146]. This drug also stimulates rat G1-arrested cells to re-enter the cell cycle resulting in DNA synthesis [144]. In addition, a dominant negative PPAR α protein mutant can prevent apoptosis suppression of primary rat hepatocyte by nafenopin [145]. Thus, it appears clearly that in presence of peroxisome proliferators, apoptosis of cells is inhibited whereas activation of peroxisome proliferator-dependent PPAR α enhances cell proliferation in rat or mouse hepatocytes.

PPARs in colon cancers

It has been shown that there is a positive incidence of colon cancer development and high lipid diet [147-151]. In rat and mouse, high ω -6 fatty acids diet feeding increases frequency of adenoma development in colon whereas ω -3 fatty acids feeding protects against tumor formation [148, 152, 153]. Moreover, APC/Min mice predisposed to intestinal and colon neoplasia fed with polyunsaturated ω -6 fatty acids diet develop 2-3 times more adenomas than those fed with normal diet [151]. On the other hand, colorectal cancers require accumulation of genetic changes [154]. Studies of familial adenomatous polyposis and hereditary non-polyposis colorectal cancer have provided insights into both inherited and sporadic forms of human colon tumors. In hereditary nonpolyposis colorectal cancer, the genetic defect consist of mutations affecting the DNA mismatch repair process. Several genes have been identified and functionally correspond to those implicated in DNA mismatch repair in *E coli* [155, 156]. In familial adenomatous polyposis, the genetic defect affects the rate of tumor initiation by altering the function of the

APC gene [154]. The APC protein takes place in the Wnt/ β -catenin signalling pathway [157]. APC and β -catenin are phosphorylated by glycogen synthase kinase 3 β ; this process leads to degradation of β -catenin in a proteasome-dependent manner. In colorectal cancers, mutations affect the APC gene resulting in β -catenin stabilisation and β -catenin translocation into nucleus [158]. Subsequently, β -catenin interacts with members of the T-Cell transcription factors family (TCF, [159]) and alters transcription of TCF-dependent target genes like *c-myc* [160], cyclin D1 [161], cyclooxygenase-2 [162], *c-jun*, *fra-1* and urokinase-type plasminogen activator receptor [163] which are implicated in cell cycle progression, cell proliferation and apoptosis and in cell to cell interactions. In colon cancers, PPAR δ transcription level is up-regulated and seems to co-localise with cyclooxygenase-2 mRNA in the same regions within the tumors [164]. PPAR δ has been identified as a target gene of Tcf4, a member of the TCF family [165]. Transfection of the complete APC gene in a APC-mutated colon cell line, the HT29 cell line, restores cytoplasmic β -catenin degradation mediated by APC and subsequently lowers PPAR β transcriptional level. In addition, NSAIDs treatment decreases PPAR δ transcriptional activity leading to the hypothesis that NSAIDs protection is mediated by disruption in PPAR δ -dependent target gene expression [165].

PPAR γ has also been associated to colon cancers. The two isoforms exist even though PPAR γ 1 is predominant [166]. However, different studies provide opposite results: Activation of PPAR γ by specific ligands is responsible for tumor progression in APC/*Min* mice or heterozygote males C57Bl/6J-APC Min /+ [167, 168]. In contrast, in human colon cancer cell lines, activation of PPAR γ slows down their growth and consequently inhibits expression of tumor markers and increases transcription of proteins associated with colon cell differentiation [169]. In addition, development of transplantable

tumors in nude mice is lowered by treatment with troglitazone, a PPAR γ ligand [168]. Thus, the role of PPAR γ in colorectal cancers is speculative despite its high transcriptional level. Furthermore, loss-of-function mutations also affect PPAR γ gene in human sporadic carcinomas altering protein function as demonstrated by transfection studies [170].

In contrast to PPAR β/δ and γ , PPAR α is not up-regulated [171]. Its expression in tumoral cells is often lower than in normal tissue.

PPAR γ in others neoplastic processes

As stated before, thiazolidinediones are agonists of PPAR γ . These drugs and 15-deoxy- Δ -12, 14 prostaglandin J2, a natural PPAR γ ligand, have been used to study the role of PPAR γ activation in diverse cancer-derived cell lines *in vitro*. Taken together, results show that PPAR γ activation induces cell cycle arrest and terminal differentiation and/or apoptosis in malignant astrocytoma cell line [172], in choriocarcinoma cells [173], in human breast cancer cells [174-177], in human gastric cancer [178-180], in pancreatic carcinoma cells [181], in colon adenocarcinoma cells [166, 169, 182, 183], in lung cancer cells [184, 185], in myeloid leukemia cell lines [186, 187], in human prostate cancer cells [188] and in liposarcoma cells [189]. Thus, it appears clearly from these data that activation of PPAR γ has a *benefic* effect by limiting cancer cell growth. Moreover, terminal differentiation mediated by PPAR γ agonists was confirmed *in vivo* in patients with liposarcoma [190] or prostate cancer [191] and in mice with prostate cancer [188] or mammary cancer [174, 192]. On the other hand, PPAR γ is upregulated in human uterine leiomyomata, benign tumors of smooth muscle cells, compared with normal myometrium [193]. Further more, in guinea pig, troglitazone treatment combined with estradiol and all trans retinoic acid produced uterine leiomyomata whereas this PPAR γ effect is not observed when troglitazone is used alone [193]. Taken together, data suggest

that PPAR γ agonists are of clinical importance in limiting cancer development even though this beneficial effect depends on cancer type and treatment used [167, 168, 193].

In addition, genetic modifications affecting PPAR genes are also present. A truncated PPAR α protein has been described that lacks exon 6 in hepatoblastoma cells [194]. Its transcriptional level corresponds to 20-50% of PPAR α mRNA and it localizes exclusively in the cytoplasm. This truncated PPAR α protein is a dominant negative inhibitor of wild type PPAR α protein activity [194]. Likewise, a frameshift mutation has been described for the PPAR γ gene in sporadic colon cancer affecting exon 3 and subsequently provides a truncated protein without ligand-binding domain [170].

Moreover, treatment with clofibrate increases the translational level of a PPAR γ 2 truncated protein in rat liver [195]. This truncated protein specifically localizes in the mitochondrial matrix. Its translational level may depend on PPAR α activation [196]. The significance of these truncated proteins is however not established. Finally, a fusion protein, PAX8-PPAR γ 1, has been described in thyroid follicular carcinoma [197]. This chimeric protein corresponds to chromosomal translocation t(2;3)q(13;25). PAX8 promotes development of thyroid epithelium [198]. The resulting fusion protein is a dominant negative inhibitor of PPAR γ 1 activity [197].

CONCLUSION

PPARs participate to cell differentiation and may play important roles in pathologic processes including atherosclerosis and cancer. Discovery of PPAR agonists has often permit to understand the function of these transcription factors in human physiology and to find PPAR α and PPAR γ -dependent target genes. However, little is known about PPAR δ target genes. The main difficulty in this field is the absence of synthetic ligand. An other interesting challenge comes from the use of

PPAR agonists especially PPAR γ ligands, prostaglandin J2 derivatives, which interfere with NF κ B signaling pathway [132, 133]. Data demonstrate that synthetic PPAR γ ligands could interplay of signaling pathway affecting the synthesis of pro-inflammatory prostaglandins, the synthesis of PPAR ligands and consequently they may affect release or metabolic transformation of fatty acids within the cell. In addition, the net effect of prostaglandin J2 treatment in multiple cell pathologic process need to be clarified. Thus the knowledge of the different connections in PPARs ligand signaling pathways is of great importance for human physiology.

ABBREVIATIONS : MAPK, mitogen-activated protein kinase PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor ; PPRE, peroxisome proliferator response element; RXR, 9-cis retinoic acid receptor

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pr Oliver Nüsse for reading the manuscript.

REFERENCES

1. Isseman, I. and Green, S. 1990 Nature 347, 645 .
2. Committee, N.R.N. 1999 Cell 97, 161.
3. Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J.R., Chen, X.N., Noya, D., Rao, M.S. and Reddy, J.K. 1995 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7921.
4. 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. 1997 J. Biol. Chem. 272, 18779.
5. Fajas, L., Fruchart, J.C. and Auwerx, J. 1998 FEBS Lett. 438, 55_60.
6. Kliewer, S.A., Forman, B.M.,

- Blumberg, B., Ong, E.S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D.J., Umesono, K. and Evans, R.M. 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7355.
7. Braissant, O., Fougère, F., Scotto, C., Dauca, M. and Wahli, W. 1996 *Endocrinology* 137, 354.
8. Auboeuf, D., Rieusset, J., Fajas, L., Vallier, P., Freing, V., Riou, J., Laville, M., Auwerx, J. and Vidal, H. 1997 *Diabetes* 46, 1319.
9. Mukherjee, R., Jow, L., Croston, G.E. and Paterniti, J.R. 1997 *J. Biol. Chem.* 272, 8071.
10. Braissant, O. and Wahli, W. 1998 *Endocrinology* 139, 2748.
11. Kliewer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A. and Evans, R.M. 1992 *Nature* 358, 771.
12. Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K. and Wahli, W. 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2160.
13. Keller, J.M., Collet, P., Bianchi, A., Huin, C., Bouillaud-Kremerik, P., Bécuwe, P., Schohn, H., Domenjoud, L. and Dauça, M. 2000 *Int. J. Dev. Biol.* 44, 429.
14. Ijpenberg, A., Jeannin, E., Wahli, W. and Desvergne, B. 1997 *J. Biol. Chem.* 272, 20108.
15. DiRenzo, J., Soderstrom, M., Kurokawa, R., Ogliastro, M.H., Ricote, M., Ingrey, S., Horlein, A., Rosenfeld, M.G. and Glasse, C.K. 1997 *Mol. Cell. Biol.* 17, 2166.
16. Nakshatri, H. and Bhat-Nakshatri, P. 1998 *Nucleic Acids Res.* 26, 2491.
17. Keller, H., Givel, F., Perroud, M. and Wahli, W. 1995 *Mol. Endocrinol.* 9, 794.
18. Bogazzi, F., Hudson, L.D. and Nikodem, V.M. 1994 *J. Biol. Chem.* 169, 11683.
19. Chu, R., Madison, D., Lin, Y., Kopp, P., Rao, M.S., Jameson, J.L. and Reddy, J.K. 1995 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11593.
20. Xu, L. and Glass, C.K. 1999 *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 140.
21. Freedman, L.P. 1999 *Cell* 97, 5.
22. Hammer, G.D., Krylova, I., Zhang, Y., Darimont, B.D., Simpson, K., Weigel, N.L. and Ingraham, H.A. 1999 *Mol. Cell* 3, 521.
23. Tremblay, A., Tremblay, G.B., Lambrie, F. and Guiguere, V. 1999 *Mol. Cell* 3, 877.
24. Dowell, P., Ishmael, J.E., Avram, D., Peterson, V.J., Nevriy, D.J. and Leid, M. 1997 *J. Biol. Chem.* 272, 33435.
25. Krey, G., Braissant, O., L'Horset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M.G. and Wahli, W. 1997 *Mol. Endocrinol.* 11, 779.
26. Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B. and Spiegelman, B.M. 1999 *Science* 286, 1368.
27. Gelman, L., Zhou, G., Fajas, L., Raspe, E., Fruchart, J.C. and Auwerx, J. 1999 *J. Biol. Chem.* 274, 7681.
28. Dowell, P., Ishmael, J.E., Avram, D., Peterson, V.J., Nevriy, D.J. and Leid, M. 1999 *J. Biol. Chem.* 274, 15901.
29. Oberfield, J.L., Collins, J.L., Holmes, C.P., Goreham, D.M., Cooper, J.P., Cobb, J.E., Lenhard, J.M., Hull-Ryde, E.A., Mohr, C.P., Blanchard, S.G., Parks, D.J., Moore, L.B., Lehmann, J.M., Plunket, K., Miller, A.B., Milburn, M.V., Kliewer, S.A. and Willson, T.M. 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6102.
30. Bishop-Bailey, D. 2000 *Br. J. Pharmacol.* 129, 823.
31. Yu, K., Bayona, W., Kallen, C.B., Harding, H.P., Ravera, C.P., MacMahon, G., Brown, M. and Lazar, M.A. 1995 *J. Biol. Chem.* 270, 23975.
32. Forman, B.M., Chen, J. and Evans, R.M. 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA 94, 4318.
33. Kliewer, S.A. 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4318.
34. Devchand, P.R., Keller, H., Peters, J.M., Vazquez, M., Gonzalez, F.J. and Wahli, W. 1996 Nature 384, 39.
35. Isseman, I., Prince, R.A., Tugwood, J.D. and Green, S. 1993 J. Mol. Endocrinol. 11, 37.
36. Lehmann, J., Lenhard, J., Oliver, B., Ringold, G. and Kliewer, S. 1997 J. Biol. Chem. 272, 3406.
37. Murakami, K., Tobe, K., Ide, T., Mochizuki, T., Ohashi, M., Akanuma, Y., Yazaki, Y. and Kadowaki, T. 1998 Diabetes 47, 1841.
38. Moya-Camarena, S.Y., Heuvel, J.P., Blanchard, S.G., Leesnitzer, L.A. and Belury, M.A. 1999 J. Lipid Res. 40, 1426.
39. Delerive, P., Furman, C., Teissier, E., Fruchart, J.C., Duriez, P. and Staels, B. 2000 FEBS Lett. 471, 34.
40. Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M. and Evans, R.M. 1995 Cell 83, 803.
41. Kliewer, S.A., Lenhard, J., Willson, T., Patel, I., Morris, D. and Lehmann, J. 1995 Cell 83, 813.
42. Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G., Chen, H. and Evans, R.M. 1998 Cell 93, 229.
43. Huang, J., Welch, J.S., Ricote, M., Binder, C.J., Willson, T.M., Kelly, C., Witstum, J.L., Funk, C.D., Conrad, D. and Glass, C.K. 1999 Nature 400, 378.
44. Lehmann, J., Moore, L.B., Oliver, T.S., Wilkinson, W., Willson, T. and Kliewer, S. 1995 J. Biol. Chem. 270, 12953.
45. Juge-Aubry, C.E., Hammer, E., Siegrist-Kaiser, C., Pernin, A., Takeshita, A., Chin, W.W., Burger, A.G. and Meier, C.A. 1999 J. Biol. Chem. 274, 10505.
46. Shalev, A., Siegristkaiser, C.A., Yen, P.M., Wahli, W., Burger, A.G., Chin, W.W. and Meier, C.A. 1996 Endocrinology 137, 4499.
47. Zhou, Y.C. and Waxman, D.J. 1999 J. Biol. Chem. 274, 29874.
48. Passilly, P., Schohn, H., Jannin, B., Malki, M.C., Boscoboinik, D., Dauça, M. and Latruffe, N. 1999 Biochem. Pharmacol. 58, 1001.
49. Rokos, C.L. and Ledwith, B.J. 1997 J. Biol. Chem. 272, 13452.
50. Hu, E.D., Kim, J.B., Sarraf, P. and Spiegelman, B.M. 1996 Science 274, 2100.
51. Adams, M., Reginato, M., Shao, D., Lazar, M. and Chatterjee, V. 1997 J. Biol. Chem. 272, 5128.
52. Zhang, B., Berger, J., Zhou, G., Elbrecht, A., Biswas, S., White-Carrington, S., Szalkowski, D. and Moller, D.E. 1996 J. Biol. Chem. 271, 31771.
53. Camp, H.S. and Tafuri, S.R. 1997 J. Biol. Chem. 272, 10811.
54. Reginato, M.J., Krakow, S.L., Bailey, S.T. and Lazar, M.A. 1998 J. Biol. Chem. 273, 1855.
55. Camp, H.S., Tafuri, S.R. and Leff, T. 1999 Endocrinology 140, 392.
56. Shoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A.M., Heyman, R.A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B. and Auwerx, J. 1996 EMBO J. 15, 5336.
57. Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Laine, B., Fruchart, J.C., Auwerx, J. and Staels, B. 1994 J. Biol. Chem. 269, 31012.
58. Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Kosykh, V., Dallongeville, J., Fruchart, J.C., Staels, B. and Auwerx, J. 1995 J. Clin. Invest. 96, 741.
59. Staels, B., Vu-Dac, N., Kosykh, V.A., Saladin, R., Fruchart, J.C., Dallongeville, J. and Auwerx, J. 1995 J. Clin. Invest. 95, 705.
60. Shoonjans, K., Watanabe, M.,

- Susuki, H., Mahfoudi, A., Krey, G., Wahli, W., Grimaldi, P., Staels, B., Yamamoto, T. and Auwerx, J. 1995 *J. Biol. Chem.* 270, 19269.
61. Motojima, K., Passilly, P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J. and Latruffe, N. 1998 *J. Biol. Chem.* 273, 16710.
62. Lee, S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E., Owens, J., Kroetz, D., Fernandez-Salguero, P., Whesphal, H. and Gonzalez, F. 1995 *Mol. Cell. Biol.* 15, 3012.
63. Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. and Wahli, W. 1992 *Cell* 68, 879.
64. Tugwood, J.D., Isseman, I., Anderson, R.G., Bundell, K.R., McPheat, W.L. and Green, S. 1992 *EMBO J.* 11, 433.
65. Zhang, B., Marcus, S.L., Sajjadi, F.G., Alvares, K., Reddy, J.K., Subramani, S., Rachubinski, R.A. and Capone, J.P. 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7541.
66. Brandt, J.M., Djouadi, F. and Kelly, D.P. 1998 *J. Biol. Chem.* 273, 23786.
67. Mascaro, C., Acosta, E., Ortiz, J.A., Marrero, P.F., Hegardt, F.G. and Haro, D. 1998 *J. Biol. Chem.* 273, 8560.
68. Yu, G.S., Lu, Y.C. and Gulick, T. 1998 *J. Biol. Chem.* 273, 32901.
69. Gulick, T., Cresci, S., Cairra, T., Moore, D.D. and Kelly, D.P. 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11012.
70. Rodriguez, J.C., Gil-Gomez, G., Hegardt, F.G. and Haro, D. 1994 *J. Biol. Chem.* 269, 18767.
71. Aoyama, T., Peters, J.M., Iritani, N., Nakajima, T., Furihata, K., Hashimoto, T. and Gonzalez, F.J. 1998 *J. Biol. Chem.* 273, 5678.
72. Djouadi, F., Weinheimer, C.J., Saffitz, J.E., Pitchford, C., Bastin, J., Gonzalez, F.J. and Kelly, D.P. 1998 *J. Clin. Invest.* 15, 1083.
73. Peters, J.M., Hennuyer, N., Staels, B., Fruchart, J.C., Fievet, C., Gonzalez, F.J. and Auwerx, J. 1997 *J. Biol. Chem.* 272, 27307.
74. Lemberger, T., Saladin, R., Vazquez, M., Assimacopoulos, F., Staels, B., Desvergne, B., Wahli, W. and Auwerx, J. 1996 *J. Biol. Chem.* 271, 1764.
75. Lemberger, T., Staels, B., Saladin, R., Desvergne, B., Auwerx, J. and Wahli, W. 1994 *J. Biol. Chem.* 269, 24527.
76. Kelly, L.J., Vicario, P.P., Thompson, G.M., Candelore, M.R., Doebber, T.W., Ventre, J., Wu, M.S., Meurer, R., Forrest, M.J., Conner, M.W., Cascieri, M.A. and Moller, D.E. 1998 *Endocrinology* 139, 4920.
77. Teruel, T., Clapham, J.C. and Smith, S.A. 1999 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 311.
78. Reed, B.C. and Lane, M.D. 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 285.
79. Smas, C.M. and Sul, H.S. 1995 *Biochem J.* 309, 697.
80. Guo, X. and Liao, K. 2000 *Gene* 251, 45.
81. Christy, R., Yang, V., Ntambi, J., Geiman, D., Landschulz, W., Friedman, A., Nakabeppu, Y., Nelly, T. and Lane, M. 1989 *Genes Dev.* 3, 1323.
82. Freytag, S., Paielli, D. and Gilbert, J. 1994 *Genes Dev.* 8, 1654.
83. Clarke, S.L., Robinson, C.E. and Gimble, J.M. 1997 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 99.
84. Tontonoz, P., Graves, R.A., Budavari, A.I., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Hu, E., Tempst, P. and Spiegelman, B.M. 1994 *Nucleic Acids Res.* 22, 5628.
85. Tontonoz, P., Hu, E., Devine, J., Beale, E.G. and Spiegelman, B.M. 1995 *Mol. Cell. Biol.* 15, 351.
86. Wu, Z., Xie, Y., Bucher, N. and Farmer, S.R. 1995 *Genes Dev.* 9, 2350.

87. Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J. and Spiegelman, B.M. 1999 *Mol. Cell* 3, 151.
88. Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., Umesono, K., Akanuma, Y., Fujiwara, T., Horikoshi, H., Yazaki, Y. and Kadowaki, T. 1998 *J. Clin. Invest.* 101, 1354.
89. Hansen, J.B., Zhang, H., Rasmussen, T.H., Petersen, R.K., Flindt, E.N. and Kristiansen, K. 2001 *J. Biol. Chem.* 276, 3175.
90. Bastie, C., Holst, D., Gaillard, D., Jehl-Pietri, C. and Grimaldi, P.A. 1999 *J Biol Chem* 274, 21920.
91. Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B.M. 1994 *Cell* 79, 1147.
92. Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M. and Mortensen, R.M. 1999 *Mol. Cell* 4, 611.
93. Grimaldi, P.A., Teboul, L., Inadera, H., Gaillard, D. and Amri, E.Z. 1997 *Prostagland. Leuk. Essent. Fatty* 57, 71.
94. Altiok, S., Xu, M. and Spiegelman, B.M. 1997 *Gene Dev.* 11, 1987.
95. Hanley, K., Jiang, Y., He, S.S., Friedman, M., Elias, P.M., Bikle, D.D., Williams, M.L. and Feingold, K.R. 1998 *J. Invest. Dermatol.* 110, 368.
96. Rivier, M., Safonova, I., Lebrun, P., Griffiths, C.E., Ailhaud, G. and Michel, E. 1998 *J. Invest. Dermatol.* 111, 1116.
97. Hanley, K., Komuves, L.G., Ng, D.C., Schoonjans, K., He, S.S., lau, P., Bikle, D.D., Williams, M.L., Elias, P.M., Auwerx, J. and Feingold, K.R. 2000 *J. Biol. Chem.* 275, 11484.
98. Ellis, C.N., Varani, J., Fisher, G.J., Zeigler, M.E., Pershadsingh, H.A., Benson, S.C., Chi, Y. and Kurtz, T.W. 2000 *Arch. Dermatol.* 136, 609.
99. Schultz, R., Yan, W., Toppari, J., Volkl, A., Gustafsson, J.A. and Peltto-Huikko, M. 1999 *Endocrinology* 140, 2968.
100. Kaplanski, C., Pauley, C.J., Griffiths, T.G., Kawabata, T.T. and Ledwith, B.J. 2000 *Cancer Res.* 60, 580.
101. Stier, H., Fahimi, H.D., VanVeldhoven, P.P., Mannaerts, G.H., Völk, A. and Baumgart, E. 1998 *Differentiation* 64, 55.
102. Kremarik-Bouillaud, P., Schohn, H. and Dauça, M. 2000 .
103. Granneman, J., Skoff, R. and Xang, X. 1998 *J. Neurosci. Res.* 51, 563.
104. Basu-Modak, S., Braissant, O., Escher, P., Desvergne, B., Honegger, P. and Wahli, W. 1999 *J. Biol. Chem.* 274, 35881.
105. Matsuura, H., Adachi, H., Smart, R.C., Xu, X., Arata, J. and Jetten, A.M. 1999 *Mol. Cell. Endocrinol.* 147, 85.
106. Rosenfield, R.L., Deplewski, D., Kentsis, A. and Ciletti, N. 1998 *Dermatology* 196, 43.
107. Rosenfield, R.L., Kentsis, A., Deplewski, D. and Ciletti, N. 1999 *J. Invest. Dermatol.* 112, 226.
108. Asano, T., Wakisaka, M., Yoshinari, M., Iino, K., Sonoki, K., Iwase, M. and Fujishima, M. 2000 *Biochim. Biophys. Acta* 1497, 148.
109. Schaiff, W.T., Carlson, M.G., Smith, S.D., Levy, R., Nelson, D.M. and Sadovsky, Y. 2000 *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85.
110. Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A. and Evans, R.M. 1999 *Mol. Cell* 4, 585.
111. Jackson, S.M. and Demer, L.L. 2000 *FEBS lett.* 471, 119.
112. Ross, R. 1999 *New Eng. J. Med.* 340, 115.

113. Marx, N., Shuhova, G., Murphy, C., Libby, P. and Plutzky, J. 1998 *Am. J. Pathol.* 153.
114. Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J. and Glass, C.K. 1998a *Nature* 391, 79.
115. Ricote, M., Huang, J., Fajas, L., Li, A., Welch, J., Najib, J., Witzum, J.L., Auwerx, J., Palinski, W. and Glass, C.K. 1998b *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7614.
116. Marx, N., Schonbeck, U., Lazar, M.A., Libby, P. and Plutzky, J. 1998b *Circ. Res.* 83, 1097.
117. Staels, B., Koenig, W., Habib, A., Merval, R., Lebret, M., Torra, I.P., Delerive, P., Fadel, A., Chinetti, G., Fruchart, J.C., Najib, J., Maclouf, J. and Tedgui, A. 1998 *Nature* 393, 790.
118. Inoue, I., Shino, K., Noji, S., Awata, T. and Katayama, S. 1998 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 370.
119. Bishop-Bailey, D. and Hla, T. 1999 *J. Biol. Chem.* 274, 17042.
120. Marx, N., Bourcier, T., Sukhova, G.K., Libby, P. and Plutzky, J. 1999b *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 546.
121. Xin, X., Yang, S., Kowalski, J. and Gerritsen, M.E. 1999 *J. Biol. Chem.* 274, 9116.
122. Marx, N., Sukhova, G.K., Collins, T., Libby, P. and Plutzky, J. 1999a *Circulation* 99, 3125.
123. Delerive, P., Martin-Nizard, F., Chinetti, G., Trottein, F., Fruchart, J.C., Najib, J., Duriez, P. and Staels, B. 1999 *Circ. Res.* 85, 394.
124. Satoh, H., Tsukamoto, K., Hashimoto, Y., Hashimoto, N., Togo, M., Hara, M., Maekawa, H., Isoo, N., Kimura, S. and Watanabe, T. 1999 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 757.
125. Pasceri, V., Wu, H.D., Willerson, J.T. and Yet, E.T. 2000 *Circulation* 101, 235.
126. Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G., Thomazy, V.A. and Evans, R.M. 1998 *Cell* 93, 241.
127. Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A.T., Neve, B., Torra, I.P., Teissier, E., Minnich, A., JAYe, M., Duverger, N., Brewer, H.B., Fruchart, J., Clavey, V. and Staels, B. 2001 *Nat. Med.* 7, 53.
128. Chawla, A., Barak, Y., Nagy, L., Liao, D., Tontonoz, P. and Evans, R.M. 2001 *Nat. Med.* 7, 48.
129. Moore, K.J., Rosen, E.D., Fitzgerald, M.L., Randow, F., Andersson, L.P., Altshuler, D., Milstone, D.S., Mortensen, R.M., Spiegelman, B.M. and Freeman, M.W. 2001 *Nat. Med.* 7, 41.
130. Jiang, C., Ting, A.T. and Seed, B. 1998 *Nature* 391, 82.
131. Chinetti, G., Gbaguidi, F.G., Griglio, S., Mallat, Z., Antonucci, M., Poulain, P., Chapman, J., Fruchart, J., Tedgui, A., Najib-Fruchart, J. and Staels, B. 2000 *Circulation* 101, 2411.
132. Rossi, A., Kapahi, P., Natolli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M. and Santoro, M.G. 2000 *Nature* 403, 103.
133. Straus, D.S., Pascuel, G., Lei, M., Welch, J.S., Ricote, M., Hsiang, C.H., Senchanthalangsy, L.L., Ghosh, G. and Glass, C.K. 2000 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4844.
134. Gonzalez, F.J., Peters, J.M. and Cattley, R.C. 1998 *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1702.
135. Cattley, R.C., DeLuca, J., Elcombe, C., P, P.F.-C., Lake, B.G., Marsman, D.S., Pastoor, T.A., Popp, J.A., Robinson, D.E., Scwetz, B., Tugwood, J. and Wahli, W. 1998 *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 27, 47.
136. Corton, J.C., Lapinskas, P.J. and Gonzalez, F.J. 2000 *Mutation Res.* 448, 139.
137. Masters, C.J. and Crane, D.I. 1995

- Mesh. Ageing Dev. 80, 69.
138. Peters, J.M., Cattley, R.C. and Gonzalez, F.J. 1997 *Carcinogenesis* 18, 2029.
139. Reddy, J.K. 1990 *Biochem. Soc. Trans.*, 92,.
140. Marsman, D.S., Cattley, R.C., Conway, J.G. and Popp, J.A. 1988 *Cancer Res.* 48, 6739.
141. Karam, W.G. and Ghanayem, B.I. 1997 *Carcinogenesis* 18, 2077.
142. Peters, J.M., Aoyama, T., Cattley, R.C., Noumitsu, U., Hashimoto, T. and Gonzalez, F.J. 1998 *Carcinogenesis* 19, 1989.
143. Cherkaoui-Malki, M., Lone, Y.C., Corral-Debrinski, M. and Latruffe, N. 1990 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 855.
144. Chevalier, S. and Roberts, R.A. 1998 *Oncol. Rep.* 5, 1319.
145. Roberts, R.A., James, N.H., Woodyatt, N.J., Macdonald, N. and Tugwood, J.D. 1998 *Carcinogenesis* 19, 43.
146. Christensen, J.G., Gonzales, A.J., Cattley, R.C. and Goldsworthy, T.L. 1998 *Cell Growth Differ.* 9, 815.
147. Reddy, B.S. and Maeura, Y. 1984 *J. Natl. Cancer Inst.* 72, 745.
148. Reddy, B.S., Burill, C. and Rigotty, J. 1991 *Cancer Res.* 51, 487.
149. Hogan, M.L. and Shamsuddin, A.M. 1984 *J. Natl. Cancer Inst.* 73, 1293.
150. Temple, N.J. and El-Khatib, S.M. 1987 *Cancer lett.* 37, 109.
151. Wasan, H.S., Novelli, M., Bee, J. and Bodmer, W.F. 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3308.
152. Reddy, B.S. and Sugie, S. 1988 *Cancer Res.* 48, 6642.
153. Oshima, M. 1995 *Carcinogenesis* 16, 2605.
154. Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. 1996 *Cell* 87, 159.
155. Modrich, P. 1991 *Trends Genet.* 25, 229.
156. Fishel, R., Lescoe, M., Rao, M., Copeland, N., Jenkins, N., Garber, J., Kane, M. and Kolodner, R. 1993 *Cell* 75, 1027.
157. Willert, K. and Nusse, R. 1998 *Curr. Opin. Gen. Dev.* 8, 95.
158. Polakis, P. 1999 *Curr. Opin. Gen. Dev.* 9, 15.
159. Roose, J. and Clevers, H. 1999 *Biochem. Biophys. Acta* 87456, M23.
160. He, T., Sparks, A., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., daCosta, L., Morin, P., Vogelstein, B. and Kinzler, K. 1998 *Science* 281, 1509.
161. Tetsu, O. and McCormick, F. 1999 *Nature* 398, 422.
162. Howe, L.R. 1999 *Cancer Res.* 59, 1572.
163. Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M.L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W.F., Moyer, M.P., Riecken, E.O., Buhr, H.J. and Hanski, C. 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1603.
164. Gupta, R.A., Tan, J., Krause, W.F., Geraci, M.W., Willson, T.M., Dey, S.K. and DuBois, R.N. 2000 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13275.
165. He, T., Chan, T., Vogelstein, B. and Kinzler, K. 1999 *Cell* 99, 335.
166. DuBois, R.N., Gupta, R., Brockman, J., Reddy, B.S., Krakow, S.L. and Lazar, M.A. 1998 *Carcinogenesis* 19, 49.
167. Lefebvre, A.M., Chen, I., Desreumaux, P., Najib, J., Fruchart, J.C., Geboes, K., Briggs, M., Heyman, R. and Auwerx, J. 1998 *Nat. Med.* 4, 1053.
168. Saez, E., Tontonoz, P., Nelson, M.C., Alvarez, J.G., Ming, U.T., Baird, S.M., Thomazy, V.A. and Evans, R.M. 1998 *Nat. Med.* 4, 1058.
169. 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. 1998 *Nat. Med.* 4, 1046.

170. Sarraf, P., Mueller, E., Smith, W.M., Wright, H.M., Kum, J.B., Aaltonen, L.A., Chapelle, A.d.I., Spiegelman, B.M. and Eng, C. 1999 *Mol. Cell* 3, 799.
171. Lauer, C., Völkl, A., Riedl, S., Fahimi, H.D. and Beier, K. 1999 *Carcinogenesis* 20, 985.
172. Chattopadhyay, N., Singh, D.P., Heese, O., Godbole, M.M., Sinohara, T., Black, P.M. and Brown, E.M. 2000 *J. Neurosci. Res.* 61, 67.
173. Keelan, J.A., Sato, T.A., Marvin, K.W., Lander, J., Gilmour, R.S. and Mitchell, M.D. 1999 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 579.
174. Elstner, E., Muller, C., Koshizuka, K., Williamson, E.A., Park, D., Asou, H., Shintaku, P., Said, J.W., Heber, D. and Koeffler, H.P. 1998 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8806.
175. Mueller, E., sarraf, P., Tontonoz, P., Evans, R.M., Martin, K.J., Fletcher, M., Singer, S. and Spiegelman, B.M. 1998 *Mol. Cell* 1, 465.
176. Clay, C.E., Namen, A.M., Atsumi, G.I., Willingham, M.C., High, K.P., Kute, T.E., Trimboli, A.J., Fonteh, A.N., Dawson, P.A. and Chilton, F.H. 1999 *Carcinogenesis* 20, 1905.
177. Yee, L.D., Sabourin, C.L.K., Liu, L., Li, H.M., Smith, P.J., Seewaldt, V. and Kniss, D.A. 1999 *Int. J. Onc* 15, 967.
178. Kitamura, S., Miyazaki, Y., Hiraoka, S., Toyota, M., Nagasawa, Y., Kondo, S., Kiyohara, T., Shinomura, Y. and Matsuzawa, Y. 1999 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 453.
179. Takahashi, N., Okumura, T., Motomura, W., Fujimoto, Y., Kawabata, I. and Kohgo, Y. 1999 *FEBS Lett.* 455, 135.
180. Sato, H., Ishihara, S., Kawashima, K., Moriyama, N., Suetsugu, H., Kazumori, H., Okuyama, T., Rumi, M., Fukuda, R., Nagasue, N. and Kinoshita, Y. 2000 *Br. J. Cancer* 83, 1394.
181. Motomura, W., Okumura, T., Takahashi, N., Obara, T. and Kohgo, Y. 2000.
182. Kitamura, S., Miyazaki, Y., Shinomura, Y., Kondo, S., Kanayama, S. and Matsuzawa, Y. 1999 *Jpn J. Cancer Res.* 90, 75.
183. Lefebvre, M., Paulweber, B., Fajas, L., Woods, J., McCrary, C., Colombel, J.F., Najib, J., Fruchart, J.C., Datz, C., Vidal, H., Desreumaux, P. and Auwerx, J. 1999 *J. Endocrinol.* 162.
184. Chang, T. and Szabo, E. 2000 *Cancer Res.* 60, 1129.
185. Tsubouchi, Y., Sano, H., Kawahito, Y., Mukai, S., Yamada, R., Kohno, M., Inoue, K., Hla, T. and Kondo, M. 2000 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 400.
186. Asou, H., Verbeek, W., Williamson, E., Elstner, E., Kubota, T., Kamada, N. and Koeffler, H.P. 1999 *Int. J. Oncol.* 15, 1027.
187. Hirase, N., Kanase, T., Mu, Y., Muta, K., Umemura, T., Takayenagi, R. and Nawata, H. 1999 *Oncology* 57 (suppl.S2), 17.
188. Kubota, T., Koshizuka, K., Williamson, E.A., Asou, H., Said, J.W., Holden, S., Miyoshi, I. and Koeffler, H.P. 1998 *Cancer Res.* 58, 3344.
189. Tontonoz, P., Singer, S., Forman, B.M., Sarraf, P., Fletcher, J.A., Fletcher, C.D.M., Brun, R.P., Mueller, E., Altiock, S., Oppenheim, H., Evans, R.M. and Spiegelman, B.M. 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 237.
190. Demetri, G., Fletcher, C., Mueller, E., Sarraf, P., Naujoks, R., Campbell, N., Spiegelman, B. and Singer, S. 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3951.
191. Hisatake, J.I., Ikezoe, T., Carey, M.,

- Holden, S., Tomoyasu, S. and Koeffler, H.P. 2000 .
192. Suh, N., Wang, Y., Williams, C.R., Risingsong, R., Gilmer, T., Willson, T.M. and Sporn, M.B. 1999 *Cancer Res.* 59, 5671.
193. Tsibris, J.C.M., Porter, K.B., Jazayeri, A., Tzimas, G., Nau, H., Huang, H., Kuparadze, K., Porter, G.W., O'Brien, W.F. and Specally, W.N. 1999 *Cancer Res.* 59, 5737.
194. Gervois, P., Torra, I.P., Chinetti, G., Grötzinger, T., Dubois, G., Fruchart, J.C., Fruchart-Najib, J., Leitersdorf, E. and Staels, B. 1999 *Mol. Endocrinol.* 13, 1535.
195. Casas, F., Domenjoud, L., Rochard, P., Hatier, R., Rodier, A., Daury, L., Kremarik-Bouillaud, P., bécuwe, P., Keller, J., Schohn, H., Wrutniak-Cabello, C., Cabello, G. and Dauça, M. 2000 *FEBS Lett.* 478, 4.
196. Casas, F., Pineau, T., Rochard, P., Rodier, A., Daury, L., Dauça, M., Cabello, G. and Wrutniak-Cabello, C. 2000 *FEBS Lett.* 482, 71.
197. Kroll, T., Sarraf, P., Pecciarini, L., Chen, C., Mueller, E., Spiegelman, B. and Fletcher, J. 2000 *Science* 289, 1357.
198. Mansouri, A., Chowdhury, K. and Gruss, P. 1998 *Nat. Genet.* 19, 87 .
199. Göttlicher, M., Widmark, E., Li, Q. and Gustafsson, J.A. 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4653.
200. Tugwood, J.D., Aldridge, T.C., Lambe, K.G., MacDonald, N. and Woodyatt, N.J. 1996 *Ann. NY Acad. Sci.* 804, 252.
201. Schmidt, A., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Shinar, D. and Rodan, G.A. 1992 *Mol. Endo.* 6, 1634.
202. Amri, E.-Z., Bonino, F., Ailhaud, G., Abumrad, N.A. and Grimaldi, P.A. 1995 *J. Biol. Chem.* 270, 2367.
203. Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I. and Spiegelman, B.M. 1994 *Genes Dev.* 8, 1224.
204. Guardiola-Diaz, H.M., Rehnmark, S., Usuda, N., Albrektsen, T., Feltkamp, D., Gustafsson, J.A. and Alexson, S.E. 1999 *J Biol Chem* 274, 23368.
205. Greene, M.E., Blumberg, B., Kwan, K., Greene, G.L. and Nimer, S.D. 1997 *Adv Exp Med Biol* 400A, 253.
206. Sher, T., Yi, H.F., McBride, O.W. and Gonzalez, F.J. 1993 *Biochemistry* 32, 5598.
207. Ruyter, B., Andersen, O., Dehli, A., Farrants, A.K.O., Gjoen, T. and Thomassen, M.S. 1997 *Biochim Biophys Acta* 1348, 331.
208. Hughes, S., Zelus, D. and Mouchiroud, D. 1999 *Mol. Biol. Evol.* 16, 1521.
209. Diot, C. and Douaire, M. 1999 *Poult. Sci.* 78, 1198.
210. Takada, I., Yu, R.T., Hu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Kliewer, S.A., Evans, R.M. and Umesono, K. 2000 *Mol. Endocrinol.* 14, 733.
211. Aperlo, C., Pognonec, P., Saladin, R., Auwerx, J. and Boulukus, K.E. 1995 *Gene* 162, 297.
212. Bell, A.R., Savory, R., Horley, N.J., Choudhury, A.I., Dickins, M., Gray, T.J., Salter, A.M. and Bell, D.R. 1998 *Biochem J.* 332, 689.
213. Sunvold, H., Brzozowska, A. and Lien, S. 1997 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 857.
214. Grindflek, E., Sundvold, H., Klungland, L. and Lien, S. 1998 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 713.

Original article

Expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma in differentiating human colon carcinoma Caco-2 cells

Cécile Huin ^a, Hervé Schohn ^{a,*}, Renée Hatier ^b, Marc Bentejac ^c, Laurent Antunes ^d, François Plénat ^d, Maurice Bugaut ^c, Michel Dauça ^a

^aLaboratoire de biologie cellulaire du développement, EA 3446 "Proliférateurs de peroxysomes", Faculté des sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France

^bEMI Inserm 0014, laboratoire de microscopie électronique, Faculté de médecine, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France

^cLaboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, Faculté des sciences, 21000 Dijon cedex, France

^dLaboratoire d'anatomie pathologique, CHU Nancy, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France

Received 23 May 2001; accepted 26 June 2001

Abstract

The expression of peroxisome proliferator-activated receptors α (PPAR α) and γ (PPAR γ) was studied in the human adenocarcinoma Caco-2 cells induced to differentiate by long term culture (15 days). The differentiation of Caco-2 cells was attested by increases in activities of sucrase-isomaltase and alkaline phosphatase (two brush border enzymes), fatty acyl-CoA oxidase (AOX) and catalase (two peroxisomal enzymes), by an elevation in the protein levels of villin (a brush border molecular marker), AOX, peroxisomal bifunctional enzyme (PBE), catalase and peroxisomal membrane protein of 70 kDa (PMP70), and by the appearance of peroxisomes. The expression of PPAR α and PPAR γ was investigated by Western blotting, immunocytochemistry, Northern blotting and S1 nuclease protection assay during the differentiation of Caco-2 cells. The protein levels of PPAR α , PPAR γ , and PPAR γ_2 increased gradually during the time-course of Caco-2 cell differentiation. Immunocytochemistry revealed that PPAR α and γ were localized in cell nuclei. The PPAR γ_1 protein was encoded by PPAR γ_3 mRNA because no signal was obtained for PPAR γ_1 mRNA using a specific probe in S1 nuclease protection assay. The amount of PPAR γ_3 mRNA increased concomitantly to the resulting PPAR γ_1 protein. On the other hand, the mRNA of PPAR α and PPAR γ_2 were not significantly changed, suggesting that the increase in their respective protein was due to an elevation of the translational rate. The role played by the PPAR subtypes in Caco-2 cell differentiation is discussed. © 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

Keywords: Caco-2 cell; Intestinal differentiation; Peroxisome; Peroxisome proliferator-activated receptor

Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are transcription factors belonging to the nuclear receptor superfamily and have been initially described as molecular targets for compounds that cause peroxisome proliferation. To date, three isotypes of PPAR have been described in humans: α (Sher et al., 1993), NUC1, also called β or δ (Schmidt et al., 1992) and γ (Elbrecht et al., 1996; Fajas et al., 1997). There are three subtypes of PPAR γ mRNA, transcribed from three different promoters, which give rise to two proteins, PPAR γ_1 and γ_2 as the protein encoded by

PPAR γ_3 mRNA is indistinguishable from PPAR γ_1 (Fajas et al., 1997 and 1998).

In humans, PPAR α is present mainly in liver, heart and kidney, whose tissues exhibit high fatty acid metabolism and high peroxisome-dependent activity. PPAR β is ubiquitously expressed in all tissues tested, whereas PPAR γ predominates in adipose tissue, large intestine, macrophages and monocytes (Mukherjee et al., 1994; Auboeuf et al., 1997; Marx et al., 1998; Ricote et al., 1998; Spiegelman, 1998). Consistent with their localization, the PPAR subtypes play different roles. After binding to specific elements (PPREs), PPAR α regulates the transcription of several target genes involved in lipid metabolism and homeostasis (Desvergne and Wahli, 1995; Lemberger et al., 1996; Sørensen et al., 1998). PPAR γ controls adipocyte (Chawla

* Corresponding author. Fax: +33 38 391 2319.

E-mail address: schohn@scbio.uhp-nancy.fr (H. Schohn).

et al., 1994; Tontonoz et al., 1994, 1995; Schoonjans et al., 1996; Spiegelman et al., 1997) and monocyte/macrophage (Marx et al., 1998; Ricote et al., 1998; Tontonoz et al., 1998) differentiation. Until now, the precise role of PPAR β has not yet been elucidated.

In a recent study (Huin et al., 2000), we have reported that the PPAR subtypes exhibit different patterns of expression in relation to morphogenesis and cell differentiation in the developing human fetal digestive tract. Recent reports indicate that the growth of several different colon carcinoma cell lines is inhibited by the ligand activation of PPAR γ (Brockman et al., 1998) and that transplantable tumors in mice derived from human colon cancer cells show significant reduction of growth when mice are treated with troglitazone, a PPAR γ ligand (Sarraf et al., 1998). On the other hand, Lefebvre et al. (1998) have reported that ligand activation of PPAR γ in C57BL/6J-APC^{Min/+} mice promotes the development of colon tumors, and Saez et al. (1998) found that it accelerates the formation of colonic polyps in the same mice. Those divergent observations lead us to investigate the expression of PPARs in the human colon cancer Caco-2 cells since it has been known that they undergo spontaneous differentiation in culture when they reach confluence (Pinto et al., 1983). The PPAR expression was analyzed by immunocytochemistry, Western- and Northern-blotting and S1 nuclease protection assay. The results indicate that as Caco-2 cell differentiation goes on characterized by the appearance of brush border and peroxisomal molecular markers, the protein levels of PPAR α , PPAR γ_1 and PPAR γ_2 increase gradually. The amount of PPAR γ_3 mRNA increases concomitantly to the resulting PPAR γ_1 protein. On the other hand, the amounts of PPAR α and PPAR γ_2 mRNA are not significantly changed during Caco-2 cell differentiation suggesting that the increase in their respective protein is due to an elevation of the translational rate.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture conditions

The human adenocarcinoma cell line Caco-2 was originally established by Fogh and Trempe (1975). Cells were cultured in Dulbecco's modified minimum medium (DMEM) containing 4.5 g l⁻¹ glucose, without glutamine and supplemented with 20% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (56 °C for 30 min) and 1% (v/v) non-essential amino acids (all obtained from Eurobio, Les Ulis, France) using an incubator at 37 °C with a humidified 10% CO₂ atmosphere. The cells (from passages between 85 and 100) were seeded at an initial concentration of 6 × 10⁴ ml⁻¹ and subcultured every 5 days. After 5, 10 and 15 days of culture, the cells were processed for ultrastructural cytochemistry and immunocytochemistry or frozen in liquid nitrogen until used.

2.2. Ultrastructural cytochemistry of catalase

The presence of peroxisomes in Caco-2 cells was investigated using the procedure of Novikoff et al. (1972), which allows the visualization of the peroxisomal catalase activity after reduction of alkaline 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma Chemical Co, St-Louis, MO, USA). In brief, Caco-2 cell monolayers were fixed at 4 °C for 40 min in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, containing 2.8% (v/v) glutaraldehyde, then washed 3 times for 20 min in presence of the same buffer containing 7.5% (w/v) sucrose. Cells were treated for 3 h at 37 °C in DAB-medium. The latter was replaced after 90 min. Samples were postfixed in 1% (v/v) osmium tetroxide buffered with 0.1 M potassium phosphate, pH 7.4, for 30 min, dehydrated in ethanol and embedded in araldite/epon (v/v) mixture. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds (1963) and observed with a Philips CM12 electron microscope at 80 kV.

2.3. Enzyme assays

Cell monolayers were rinsed three times with ice-cold 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4, scraped with a rubber policeman and homogenized in 2 mM Tris/HCl, pH 7.1, containing 30 mM mannitol. Homogenates were kept for 1 h on ice, then centrifuged for 15 min at 15 000 × g. The supernatants were assayed for protein concentration according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as a standard. Sucrase-isomaltase (EC.3.2.1.26) activity was determined according to Messer and Dahlqvist (1966). Alkaline phosphatase (EC.3.1.3.1) activity was measured according to Garen and Levinthal (1960). For both enzyme activity, 1 unit is defined as the activity that hydrolyses 1 μmole of substrate per minute at 37 °C under the experimental conditions. Fatty acyl-coenzyme A oxidase (AOX; EC.1.3.99.3) was determined using the method reported by Hryb and Hogg (1979) with homogenates prepared in 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, containing 0.1% (v/v) Triton X-100. Lauroyl-CoA (Sigma Chemical Co) was used as a substrate and the molecular extinction coefficient was 6930 M⁻¹ cm⁻¹. One unit is defined as the activity that converts 1 μmole NAD⁺ into NADH, H⁺ per minute at 37 °C under the experimental conditions. Catalase (EC.1.11.1.6) activity was assayed according to Baudhuin et al. (1964). One unit 'Baudhuin' (UB) is defined as the activity that hydrolyses 1 μmole of substrate per minute at 4 °C.

2.4. Immunoblot analysis

Cell homogenates were prepared according to two protocols. Firstly, Caco-2 cells were homogenized in 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, containing 5 mM EDTA and 1% (v/v) Triton X-100, then centrifuged at 15 000 × g for 30 min at 4 °C. The protein concentration of the supernatant was

etermined using the DC detergent protein quantification kit Biorad, Hercules, CA, USA). These homogenates were used for immunoblotting of peroxisomal proteins. Secondly, Caco-2 cells homogenates were prepared according to Jansen et al. (1996) and used for PPARs immunoblotting. Samples were analyzed by Western blotting and ECL chemiluminescence kit, Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol. The membrane was incubated for 1 h at room temperature with rabbit polyclonal antibody raised against pig villin (diluted 1:20 000) (Robinet al., 1985) or rat AOX (diluted 1:2000) (Duclos et al., 1997) or rat peroxisomal bifunctional enzyme (PBE; diluted 1:2000) (Duclos et al., 1997), or rat 70 kDa peroxisomal membrane protein (PMP70; diluted 1:2000) (Duclos et al., 1997), or beef catalase (diluted 1:5000) (El Bouthoury et al., 1992), or human PPAR α (diluted 1:1000), or human PPAR γ 1 polyclonal antibody directed against a common peptide sequence to both PPAR γ ₁ and PPAR γ ₂ (diluted 1:1000), or human PPAR γ ₂ (diluted 1:5000) (Huin, 2000). The bands were scanned with a Scan Sharp G x 330 densitometer (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Results were expressed as means \pm SD from three independent experiments. Data are presented as pixels number per band in arbitrary unit.

2.5. Immunocytochemistry

Immunocytochemical analysis was performed as described by Plénat et al. (1994). In brief, Caco-2 cells were scraped with a rubber policeman, centrifuged at 1000 \times g for 5 min at 4 °C and fixed in 4% (w/v) formaldehyde in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4, overnight at 4 °C. Cell pellets were washed once in the same buffer containing 0.15 M NaCl, then embedded in paraffin. Semi-thin section (5 μ m) of cell pellets were laid onto superfrost slides. Sections were deparaffined by successive washes in xylene (three times for 5 min), in 99% (v/v) ethanol (twice for 5 min), in 95% (v/v) (twice for 5 min) and finally rinsed in bidistilled water for 3 min. All procedures were at room temperature. Cell sections were rehydrated with 0.1 M potassium phosphate buffer containing 0.1% (v/v) Tween 20 for 5 min at room temperature. Sections were then incubated overnight at 4 °C with rabbit polyclonal antibodies (diluted at 1:400), raised against either PPAR α or PPAR γ (Huin et al., 2000). The same dilution was used for the commercial PPAR γ antiserum purchased from Affinity Bioagents (Golden, Co, USA). Sections were then successively washed with 0.1 M potassium phosphate buffer containing 0.1% (v/v) Tween 20, incubated with goat anti rabbit biotinylated IgG solution (Dako S.A., Trappes, France), diluted 1:200, for 1 h at room temperature, washed again and incubated with streptavidin/peroxidase mix (Dako), diluted at 1:200, for 1 h at room temperature. Cell sections were washed and peroxidase substrate (AEC, Dako) was added for 5 min. Enzymatic reaction was stopped by immersing the slides in bidistilled water. Cell

sections were finally stained with 0.1% (w/v) hematoxylin. Negative controls were achieved by omitting anti-PPAR antiserum. Inhibition controls were carried out by preincubating diluted antisera with increased amounts (1–5 μ g) of the PPAR peptide used for rabbit immunization. For both antisera, a 50% inhibition was obtained starting with 1 μ g of PPAR peptide (results not shown).

2.6. Northern blot analysis

Total RNA was extracted from Caco-2 cells (Chomczynski and Sacchi, 1987) and poly(A⁺)RNA was prepared (Aviv and Leder, 1972). A cDNA comprising part of the E domain of the human PPAR α (Sher et al., 1993) was obtained by reverse transcription coupled to PCR (Sambrook et al., 1989). The first cDNA strand was synthesized from 2 μ g of poly(A⁺)RNA using the avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Roche) and the primer α -down (5'-GTACATGTCTCTTGTAGATCTC-3', hybridizing at the 3' end of the E domain of PPAR α). The cDNA was then subjected to PCR amplification with the primers α -down and α -up (5'-GCTGCTATAATTTGCTGTGGA-3', hybridizing at the 5'-end of the E domain of PPAR α) using the *Taq* polymerase (Life Technologies, Paisley, UK). Amplification was carried out by 30 cycles at 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, followed by an extension step at 72 °C for 5 min. A cDNA comprising part of the A/B domain of the human PPAR γ (Elbrecht et al., 1996; Fajas et al., 1998) was obtained as described above. The primers used were γ -down (5'-GTCTGTGGAGATAAAGCTTCTGGGATTTTAC-3') and γ -up (5'-CGCCACGCCGTGGCCGCAGAAATGACC-3'). The PCR products were purified using the prep A gene DNA purification matrix kit (Biorad) then sequenced (Sanger et al., 1977) using the circum vent thermal cycle dideoxy DNA sequencing kit (Biorad).

Total (10 μ g) and poly(A⁺) (2 μ g) RNAs were resolved on a 1% agarose gel then transferred onto a nylon positive membrane (Q-Biogen, Ilkirch, France). The membranes were probed with the purified PCR products labeled with [α -³²P] dCTP using a megaprime DNA labeling kit (Amersham Pharmacia Biotech). They were washed four times in 2 \times SSC for 5 min at room temperature, twice in 0.5 \times SSC containing 0.1% (v/v) SDS for 15 min at 60 °C and subsequently revealed by autoradiography with X-OMAT films (Kodak, Stuttgart, Germany). Blots were dehybridized and rehybridized with a labeled glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) probe (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Results are expressed as PPAR relative values (PPAR pixel numbers versus G3PDH pixel numbers).

2.7. Nuclease protection assay

Specific human PPAR α , PPAR γ ₁, PPAR γ ₂, PPAR γ ₃ and G3PDH cDNAs were obtained by standard RT-PCR using total RNA (5 μ g) extracted from Caco-2 cells. Selected up

Table 1
Primers selected for S1 nuclease protection assay.

Probe	Primer up (5'–3')	Primer down (5'–3')	Length (bp)	Reference
hPPAR α	GCCCAGGCTGAAGCTCAGGG	GACACGGAAAGCCACTCTTGC	244	Sher et al. (1993)
hPPAR γ_1	TCGGACCCCGAGCCCGAG	TCAAACGAGAGTCAGCCTTTAAAC	133	Fajas et al. (1997)
hPPAR γ_2	CCCATCTCTCCCAAATATTT	CACAGAGATCGCATTCCGGCCC	282	Fajas et al. (1997)
hPPAR γ_3	GAAAGAAGCCGACACTAAACCAC	ACACCTCATCTTTACGACCTCTTC	222	Fajas et al. (1998)
G3PDH	CCCATCACCATCTTCCGA	GGAAACTGTGGCCTGTAG	380	Tso et al. (1985)

and down primers are indicated in table 1. Amplification was carried out by 30 cycles (95 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 30 s) followed by an extension step at 72 °C for 5 min. After purification, the PCR fragments were cloned into the pBluescript II KS⁺ vector to obtain the recombinant plasmids pKS⁺/PPAR α , pKS⁺/PPAR γ_1 , pKS⁺/PPAR γ_2 and pKS⁺/G3PDH then sequenced. The PPAR γ_1 probe (133 nt) contained exon A1 (94 nt) and a part of exon E1 (39 nt) according to the definition of the genomic structure of the human PPAR γ gene by Fajas et al. (1998). The PPAR γ_2 probe (282 nt) spanned exon B (243 nt) and the 5' end of exon 1 (39 nt) whereas the PPAR γ_3 probe (222 nt) contained the full length exon A2 (76 nt) and exon 1 (146 nt).

The plasmids were linearized as follows: pKS⁺/PPAR γ_1 and pKS⁺/PPAR γ_2 with *Bam* HI, pKS⁺/PPAR γ_3 and pKS⁺/G3PDH with *Eco* RI, then labeled with [α -³²P] dCTP by down extension using *Taq* polymerase and the specific primer (Table 1). Total RNA (5 μ g) extracted from Caco-2 cells at different durations of culture, was first treated by RNase free RQ-1 DNase (Promega, La Jolla, CA, USA) then hybridized with the labeled single-stranded DNA probes (10⁵ cpm per sample) at 60 °C for 16 h. Non hybridized DNA was digested by S1 nuclease (50 U per sample) for 1 h at 37 °C then extracted by phenol/chloroform procedure (Sambrook et al., 1989). The DNA/RNA hybrids were resolved by electrophoresis on a 5% polyacrylamide gel under denaturing conditions. Then, the gel was exposed to a X-OMAT Kodak film for 24 h. The resulting bands were quantified by densitometry and the values were standardized versus the corresponding G3PDH values.

2.8. Statistical analysis

Data concerning the activities of sucrase-isomaltase, alkaline phosphatase, AOX and catalase were expressed as means \pm standard deviations from three independent experiments. Densitometric analyses of S1 nuclease protection assay blots were carried out from four independent experiments. Evaluation of statistical significances was assessed using analysis of variance (ANOVA) and the Fisher protected least significant difference test (multiple comparisons) (Winer, 1971). Statistical significance is indicated in each figure.

3. Results

3.1. Assessment of Caco-2 cell differentiation

The specific activities of sucrase-isomaltase and alkaline phosphatase (two brush border membrane enzymes), AOX and catalase (two peroxisomal enzymes) were determined in homogenates of Caco-2 cells cultured for 5, 10 and 15 days. As shown in table 2, the specific activities of sucrase-isomaltase and alkaline phosphatase increased steadily during cell culture. They were increased by 2.3 and 5.7 fold, respectively at day 15 of culture when compared to control values (5 days of culture). The pattern of peroxisomal enzymes was somewhat different as AOX and catalase specific activities increased by 1.7 and 3 fold, respectively, between day 5 and day 10 of cell culture then remained constant.

Using specific polyclonal antibodies, the protein levels of villin, a molecular marker of brush border development, and of AOX, PBE, catalase and PMP70 (both peroxisomal proteins) were analyzed by Western blotting. An unique band with molecular weight of 90 kDa was detected for villin in Caco-2 cell homogenates. Its intensity increased about 2.3 fold following 15 days of culture (Fig. 1). Whatever the duration of culture, three bands were immunodetected for AOX at 65.6, 56 and 42 kDa, respectively. This is consistent with previous western blot data for this enzyme (Duclos et al., 1997). Scanning densitometry of the intensity of the 56 kDa subunit revealed a gradually increase giving a maximum of about 3.3 fold at 15 days of culture (Fig. 2). PBE and catalase exhibited only one band estimated at

Table 2
Specific activities of enzymes from cultured Caco-2 cells.

Enzymes	Duration of Caco-2 cell culture		
	5 days	10 days	15 days
Sucrase-isomaltase	65.1 \pm 3.9	80.7 \pm 5.5	155.2 \pm 10.1
Alkaline phosphatase	0.95 \pm 0.1	35.2 \pm 4.1	55 \pm 4.5
AOX	0.74 \pm 0.04	1.10 \pm 0.1	1.11 \pm 0.05
Catalase	12.3 \pm 0.2	34.6 \pm 0.5	35.6 \pm 0.6

They were determined as described in *Materials and methods* and expressed as mU mg⁻¹ protein. Values represent means \pm standard deviations from three independent experiments. ANOVA and multiple comparison analysis show a significant difference ($p < 0.01$) for all enzymes activities measured at day 15 versus day 5.

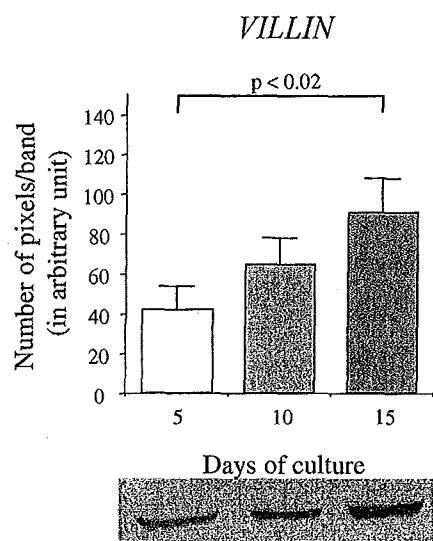


Fig. 1. Western blotting of villin during Caco-2 cell differentiation. Homogenates were prepared as described in *Materials and methods* and assayed for Western blotting using rabbit antiserum raised against villin. The observed bands were scanned. Histograms correspond to results obtained from three independent experiments. Results are expressed as means \pm standard deviations of pixel number/band. ANOVA and multiple comparison analysis show a significant difference ($p < 0.02$) for villin protein level at day 15 versus day 5.

70 kDa and 60 kDa, respectively (Fig. 2). The 60 kDa band corresponded to the monomer of catalase. During cell culture, an increase of about 2 and 3 fold was noted in the intensity of the protein level of PBE and catalase, respectively (Fig. 2). A weak increase was also observed for PMP70 level following 10 days of culture (Fig. 2). However, this increase was not statistically significant.

In order to establish whether these biochemical changes were related to structural alterations in cultured Caco-2 cells, we investigated the presence of peroxisomes by ultrastructural cytochemistry of catalase. DAB-positive structures were not detected in proliferating Caco-2 cells at 5 days of culture (not shown). They were very scarce at day 10 (Fig. 3a,b). On the other hand, their presence was evident after 15 days of culture (Fig. 3c,d). Peroxisomes exhibited two different profiles: round to oval forms and elongated, worm-like structures.

3.2. PPAR immunoblotting

Polyclonal antibodies against human PPAR α , PPAR γ and PPAR γ_2 were applied for Western blotting in order to investigate the expression of these PPAR subtypes during Caco-2 cell culture. As shown in Fig. 4, a major band estimated at 52 kDa was detected in homogenates by PPAR α antibody. Its intensity increased about 1.9 fold between day 5 and day 15 of culture. The polyclonal anti-PPAR γ antibody which was directed against a common peptide sequence to both PPAR γ_1 and PPAR γ_2 recognized a large band at 50 kDa which may comprised the two PPAR γ isotypes (Fig. 4). A 3.3 fold increase in the intensity of this

band was noted by 15 days when compared to values obtained with Caco-2 cells after 5 days of culture. In addition, we used another polyclonal antibody raised against a NH₂-terminal peptide specific to PPAR γ_2 and which has been previously described (Huin et al., 2000). A slighter band was immunodetected, which showed a 2 fold increase in its intensity between day 5 and day 15 of Caco-2 cell culture (Fig. 4).

3.3. PPAR immunocytochemistry

Polyclonal antibodies against PPAR α (Fig. 5a–c) and PPAR γ (Fig. 5d–i) were used. At day 5, only few nuclei were immunostained whatever the antiserum used (Fig. 5a,d,g). An immunoreactivity was also found in the cytoplasm. PPAR immunostaining increases at day 10 (not shown) and was pronounced at day 15 (Fig. 5b,e,h). At this duration of culture, the signals were mainly localized in nuclei. However, all nuclei were not positively stained. Moreover, a positive reaction could also be observed in cytoplasm. The immunostaining of nuclei was always more pronounced with PPAR α antiserum than with PPAR γ antiserum. Using the commercial antiserum directed against PPAR γ (Fig. 5g,h), a similar labeling to that obtained with the PPAR γ antiserum (Fig. 5d,e) prepared in our laboratory was found. At least, no immunostaining was observed in control sections (Fig. 5c,f,i) when the first antiserum was omitted.

3.4. PPAR mRNA quantification

In a first step, Northern blot analysis of PPAR α and PPAR γ expression was carried out using total and poly(A⁺) RNA extracted from Caco-2 cells cultured for 5, 10 and 15 days. The sequences of the DNA probes used for this study were found identical to the published ones (Sher et al., 1993; Elbrecht et al., 1996; Fajas et al., 1997). Three transcripts were found for PPAR α with sizes of 1.8, 5.8 and 10 kb, respectively, in good agreement with previous reports (Gebel et al., 1992; Farrants et al., 1993; Steineger et al., 1994). Densitometrical analysis of the 1.8 kb signal revealed after 10 days of culture an elevation of the PPAR α mRNA level to almost 1.5 fold the amount found in cells after 5 days of culture (Fig. 6). A slight decrease of the mRNA level was observed by 15 days of culture when quantification was achieved with poly(A⁺) mRNA. Using a A/B domain DNA probe hybridizing with the different messengers of PPAR γ , an unique signal at 2.1 kb was found with the poly(A⁺) RNA. By day 10, the mRNA level was strongly increased to 2.8 fold the level found with cells cultured for 5 days (Fig. 6). Thereafter, the PPAR γ mRNA level did not change significantly.

To further quantify PPAR mRNA levels, S1 nuclease protection assays were carried out. For that purpose, specific DNA probes for PPAR α and for the different PPAR γ transcripts were prepared by RT-PCR, cloned and their

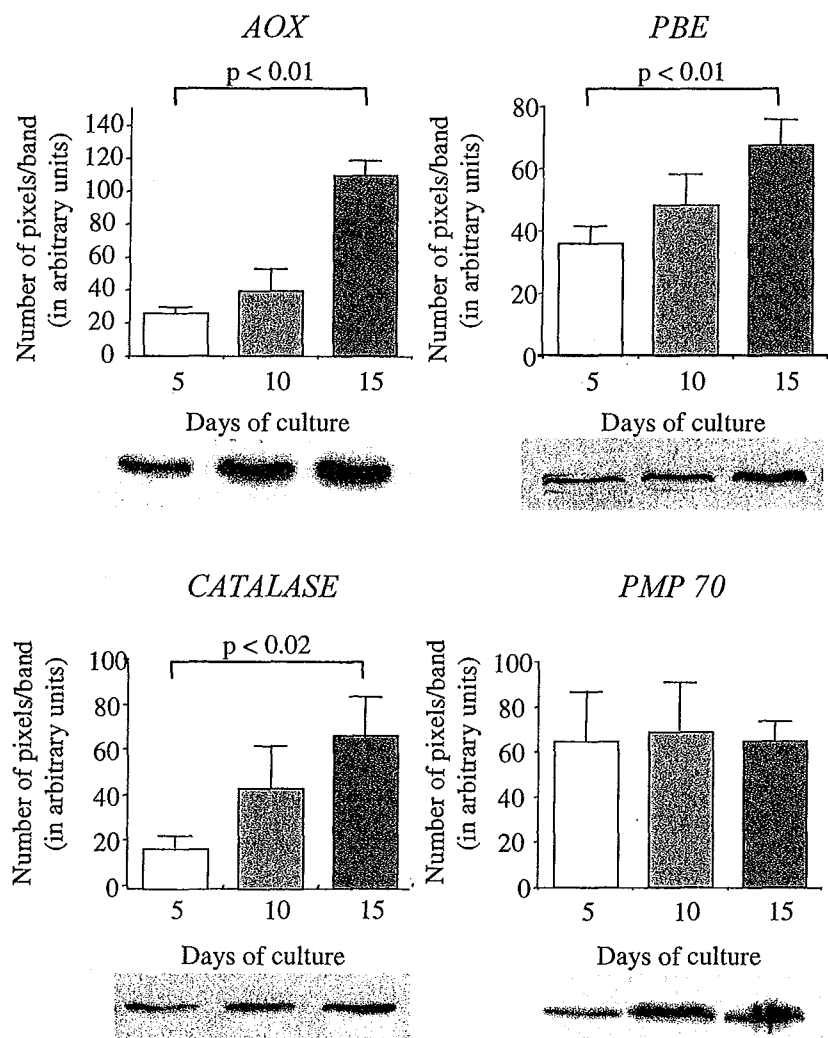


Fig. 2. Western blotting of peroxisomal proteins during Caco-2 cell differentiation. Homogenates were prepared as described in Materials and Methods and assayed for Western blotting using rabbit antisera raised against AOX, PBE, catalase and PMP70, respectively. The resulting bands were scanned. Histograms correspond to results obtained from three independent experiments. Results are expressed as means \pm standard deviations of pixel number/band. ANOVA and multiple comparison analysis show significant differences for AOX, PBE ($p < 0.01$) and catalase ($p < 0.02$) protein level at day 15 versus day 5.

sequences were controlled. Nuclease protection assay for PPAR α (Fig. 7a,c) confirmed the results obtained by Northern blotting. The PPAR γ_2 (Fig. 7d) and PPAR γ_3 (Fig. 7e) transcripts hybridized with their respective probe corresponding to bands estimated at 282 and 222 nt, respectively. In addition, two protected RNA fragments estimated at 243 and 39 nt for PPAR γ_2 , at 146 and 76 nt for PPAR γ_3 , could be generated when PPAR γ probes hybridized with non spliced mRNA. For PPAR γ_2 , only the 243 nt fragment was observed (Fig. 7d), whereas that of 39 nt was eluted from the gel during electrophoresis. Likewise, an additional RNA fragment at 222 nt corresponding to exon A2 of PPAR γ_3 probe was observed (Fig. 7e) whereas the 76 nt-RNA fragment corresponding to exon A2 was eluted from the gel during electrophoresis (Fig. 7e). The mRNA levels for PPAR γ_1 were too low in cultured Caco-2 cells to be detected by the method used (Fig. 7b). The PPAR γ_2 mRNA level was quantified with the 282 nt band corresponding to mature mRNA. It was not significantly altered during

differentiation of Caco-2 cells. By contrast, a 2 fold increase in the PPAR γ_3 mRNA level estimated with the 222 nt band occurred between day 5 and day 15 of culture (Fig. 7c). This increase was statistically significant.

4. Discussion

The present study provides new insights about the relation between the differentiation of Caco-2 cells and the expression of PPAR α and PPAR γ .

4.1. Caco-2 cell differentiation is accompanied by peroxisomal alterations

The Caco-2 cell line is among the few intestinal cell lines known to display in vitro a typical enterocytic differentiation. The latter presents several precise chronological, morphological and functional characteristics. It is a growth-

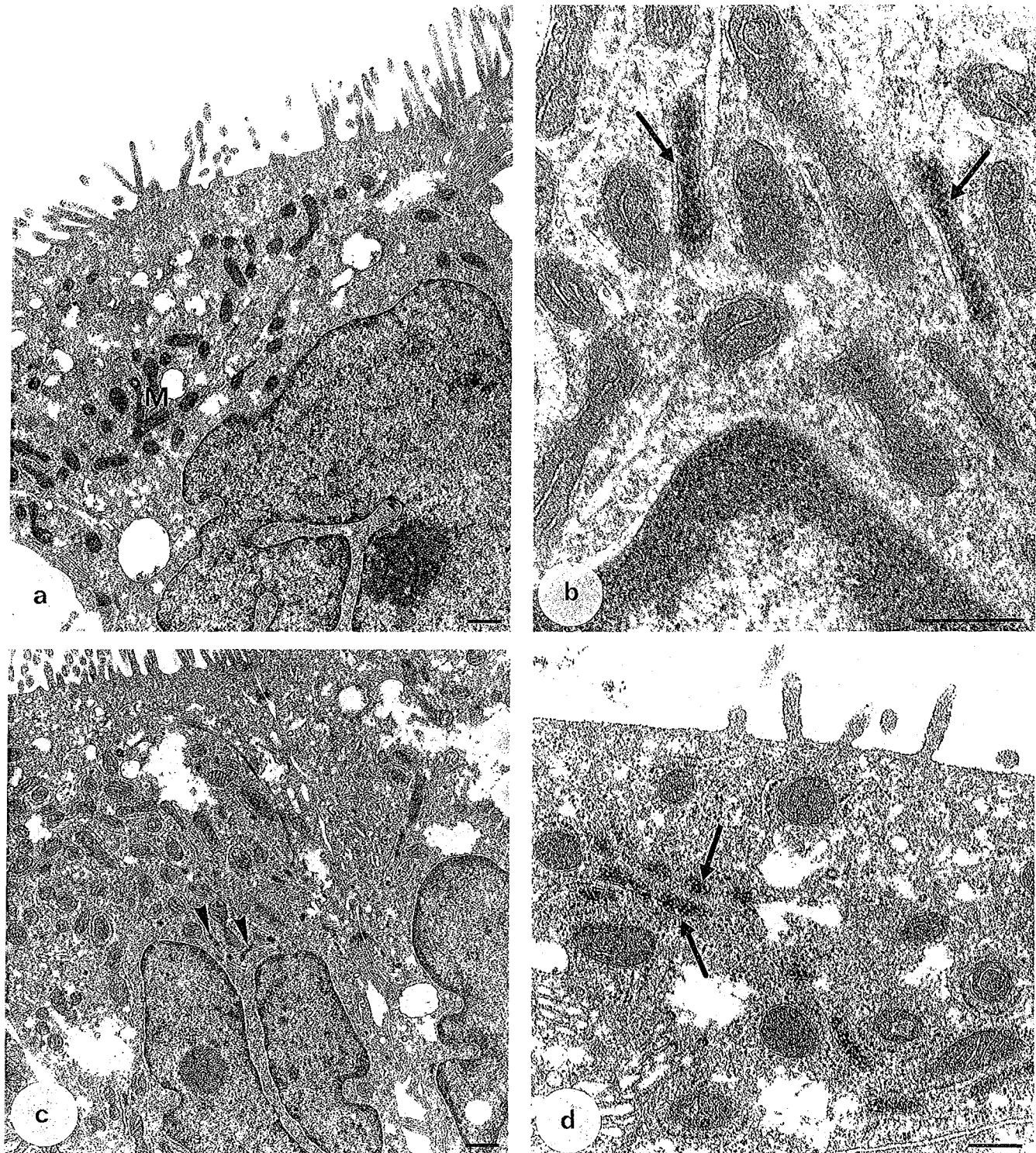


Fig. 3. Peroxisomes in Caco-2 cells. The visualization of the peroxisomal catalase activity was carried out as described in *Materials and methods*. **a**. Cross section in 10 day-old Caco-2 cell monolayer. Note the presence of a plurilobular nucleus and of microvilli at the apex of the cell. **b**. Visualization of DAB-positive structures in 10 day-old Caco-2 cells. Peroxisomes (arrowheads) are located near mitochondria. **c** and **d**. DAB-positive structures in 15 day-old cells. The visualization of peroxisomes was more evident. They are oval to vermiform (arrows and arrow heads). M: mitochondrion; Bar: 1 μm (**a** and **c**); 0.5 μm (**b** and **d**).

related process, with the cells being undifferentiated when exponentially growing, and with the onset of the differentiation taking place at confluency and being complete within 20 days (Pinto et al., 1983; Rousset et al., 1985). In the late

stages of the culture, the cells form a polarized monolayer and exhibit a typical brush border. Although the pattern of molecular brush border markers has been extensively analyzed during Caco-2 cell differentiation (Zweibaum et al.,

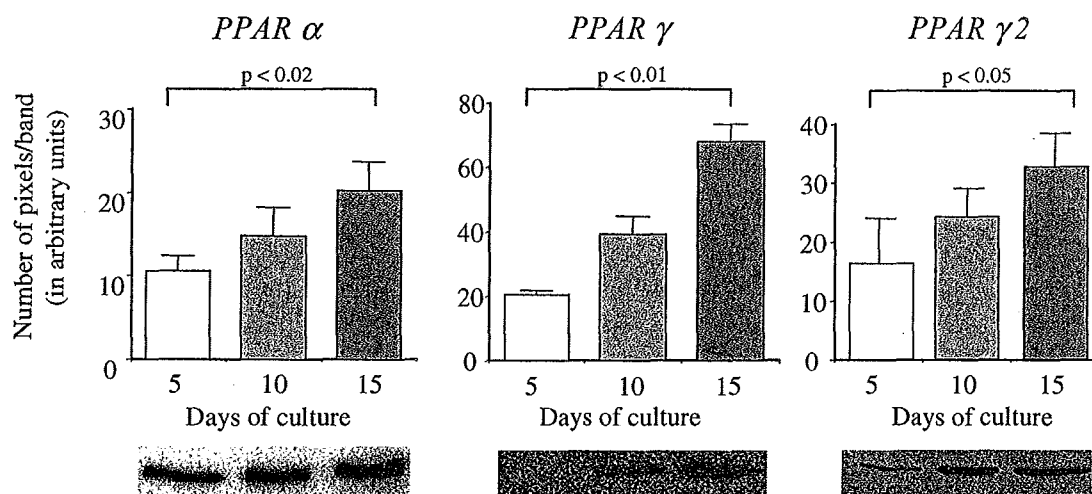


Fig. 4. Western blotting of PPAR α and γ during Caco-2 cell differentiation. Homogenates were prepared as described in *Materials and methods* and assayed for Western blotting using a rabbit antiserum raised against PPAR α , PPAR γ and PPAR γ_2 . Histograms correspond to results obtained from three independent experiments. Results are expressed as means \pm standard deviations of pixel number/band. ANOVA and multiple comparison analysis show significant differences for PPAR α ($p < 0.02$), PPAR γ ($p < 0.01$) and PPAR γ_2 ($p < 0.05$).

1983; Robine et al., 1985; Rousset et al., 1985), no study has been devoted to the peroxisomal compartment. We found that the expression of AOX and catalase was biochemically detectable in Caco-2 cells cultured for 5 days even though DAB-positive structures were not currently seen at this stage of culture. This result is in good agreement with previous reports showing that morphologically identifiable peroxisomes are scarce or absent in colon carcinoma cells despite the presence of AOX and catalase (Cablé et al., 1992; Lauer et al., 1999). The differentiation of Caco-2 cells is accompanied by a marked increase in number and enzyme activity of peroxisomes. Interestingly, these peroxisomal changes mimic those occurring in differentiating epithelial cells along the crypt–villus axis of the intestine (Cablé et al., 1992). Moreover, peroxisomes in differentiated Caco-2 cells are morphologically similar to those encountered in human enterocytes from the 16th week of gestation (Dauça et al., 1996) to the adult life (Roels et al., 1991).

4.2. PPAR α expression increases during Caco-2 cell differentiation

In the present study, increases in mRNA and protein levels were observed for PPAR α between day 5 and day 10 of Caco-2 cell culture, which represent the earlier period of cell differentiation. Thereafter, the protein amount increased steadily whereas the PPAR α mRNA level remained constant. In addition, the PPAR α protein was mainly detected in nuclei of differentiating Caco-2 cells as shown by immunocytochemistry. Our data are in line with former reports showing that the differentiation of human hepatoblastoma HepG2 cells is accompanied by an increase in PPAR α expression (Stier et al., 1998). The concomitant development of the peroxisomal compartment during Caco-2 cell

differentiation suggested a participation of PPAR α in biogenesis of peroxisomes. However, PPAR α is highly expressed in human colon carcinoma characterized by their paucity of peroxisomes (Lauer et al., 1999). In addition, tissues of PPAR α -null mice exhibit a basal level of peroxisomes, suggesting that PPAR α is not required for the constitutive formation and biogenesis of peroxisomes (Lee et al., 1995; Gonzalez, 1997). We found that the protein level and the activity of several peroxisomal enzymes were increased during Caco-2 cell differentiation. Because the genes encoding those peroxisomal enzymes are controlled by PPAR α (Zhang et al., 1992; Varanasi et al., 1996), it is very likely that this transcription factor participates actively to the maturation process of peroxisomes in Caco-2 cells.

4.3. Differential PPAR γ expression during Caco-2 cell differentiation

Transcription of the human PPAR γ gene from three different promoters gives rise to three different PPAR γ mRNA (Fajas et al., 1998). By S1 nuclease protection assay with specific probes, we detected the presence of PPAR γ_2 and PPAR γ_3 in Caco-2 but not that of PPAR γ_1 mRNA. The result concerning PPAR γ_1 mRNA is at variance with the previous work of Fajas et al. (1998). The discrepancy may be due to a difference in the nature and the specificity of the probe used. During Caco-2 cell differentiation, no significant change was observed in the mRNA level of PPAR γ_2 , whereas an increase was noted in the amount of the corresponding protein as attested by our immunocytochemical and Western blot data using a polyclonal antibody which recognized specifically the human PPAR γ_2 protein (Huin et al., 2000). A possible explanation includes an enhanced translation rate for the PPAR γ_2 mRNA. On the other hand, a significant increase was found in the PPAR γ_3 mRNA level

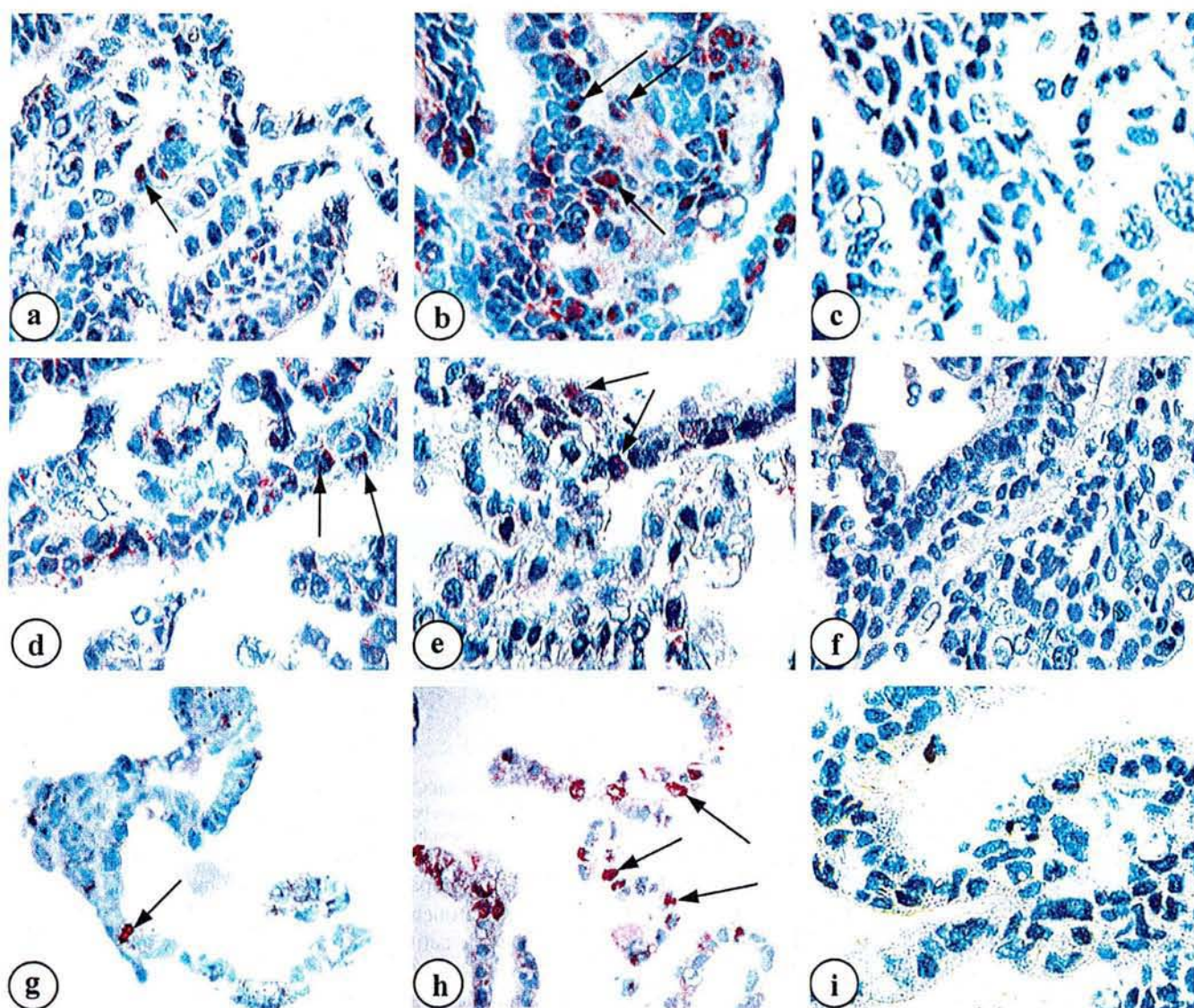


Fig. 5. PPAR localization in Caco-2 cells during the differentiation process. Immunocytochemistry was performed as described in *Materials and methods* using PPAR α (a–c), produced (d–f) and commercial (g–i) PPAR γ rabbit antisera. No signal was obtained with controls (c, f, i) performed with Caco-2 cells cultured for 15 days. Nuclear immunoreactivity (arrows) was observed at day 5 (a, d, g) whatever the antiserum used. Nuclear localization was evident at day 15 (b, e, h). Immunoreactivity was strongest with PPAR α antiserum than with PPAR γ antisera (compare b to e, h).

between day 5 and day 15 of Caco-2 cell culture. It has been demonstrated that PPAR γ_1 protein is encoded by both PPAR γ_1 and PPAR γ_3 mRNA (Fajas et al., 1997 and 1998). Using polyclonal antibodies that recognized both PPAR γ_1 and PPAR γ_2 proteins, our immunocytochemical and Western blot data revealed an increase in PPAR γ content during Caco-2 cell differentiation. It is likely that the PPAR γ_1 protein contributes partly to this increase for the following reasons:

- the intensity of the band recognized by the anti-PPAR γ antibody increased steadily during cell culture whereas the protein level of PPAR γ_2 remained constant after 10 days of cell culture;
- the level of the PPAR γ_3 mRNA encoding the PPAR γ_1 protein increased gradually with time in cell culture.

PPAR γ is reported to be expressed in human (Brockman et al., 1998; Sarraf et al., 1998) and rodent (Lefebvre et al., 1998; Saez et al., 1998) colon tumor cells. Although both PPAR γ_1 and PPAR γ_2 proteins are detected in fat tissues, it is believed that expression of the PPAR γ_2 isoform remains mainly adipocyte-specific whereas the PPAR γ_1 isoform may be extra-adipocytic. However, in a recent report we have demonstrated the presence of the PPAR γ_2 protein and mRNA in the human fetal intestine by immunocytochemistry, Western blotting and S1 nuclease protection assay (Huin et al., 2000). The physiological role of PPAR γ in colon is still debated. PPAR γ ligands have been shown to inhibit the proliferation and to induce the differentiation of human colon cancer cells (Brockman et al., 1998; Sarraf et al., 1998). On the other hand, the same ligands enhance colon

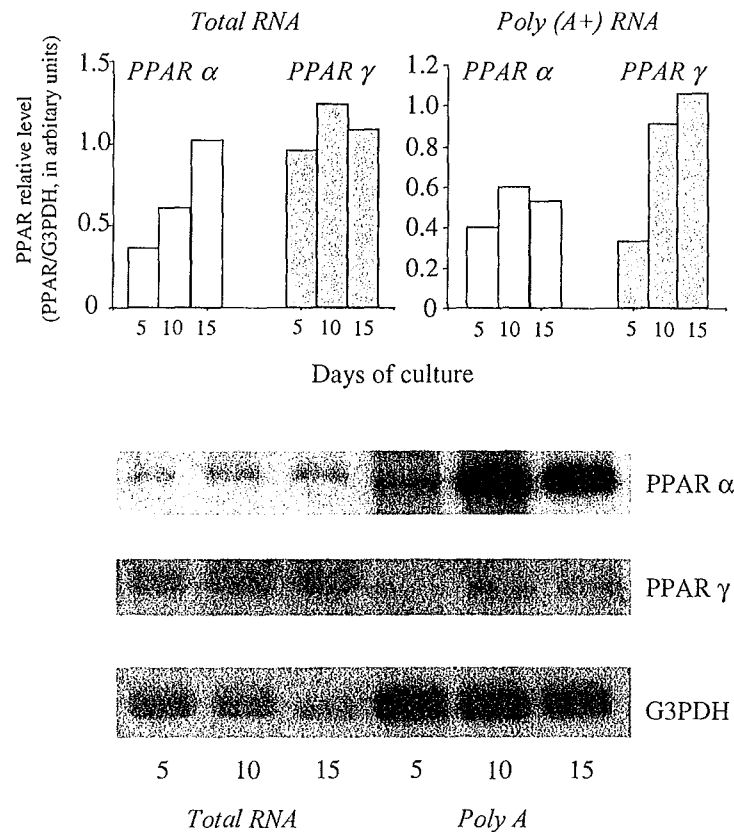


Fig. 6. PPAR α and γ transcript levels analyzed by Northern blotting. Total and poly(A⁺)RNA from Caco-2 cells cultured for 5, 10, 15 days were analyzed by Northern blotting. Membranes were hybridized with PPAR α DNA probe, dehybridized and reprobbed with PPAR γ and G3PDH probes, successively. The bands were scanned and PPAR values were standardized against G3PDH values then plotted. Results are expressed in arbitrary units.

polyp and tumor formation in the *Min*^{+/+} mouse model (Lefebvre et al., 1998; Saez et al., 1998). It is evident from our results that the spontaneous differentiation of Caco-2 cells is accompanied by an increase in PPAR γ expression. Our data are in good agreement with those of Wachtershauser et al. (2000) showing that PPAR γ mRNA and protein increase significantly during butyrate-induced Caco-2 cell differentiation. PPAR γ also plays a major role in the differentiation of other cells such as adipocytes (Tontonoz et al., 1994; Wu et al., 1999), monocytes/macrophages (Tontonoz et al., 1998), preputial sebocytes (Rosenfield et al., 1999), epidermal cells (Rivier et al., 1998) as well as colon (Brockman et al., 1998; Sarraf et al., 1998; Kitamura et al., 1998), prostate (Kubota et al., 1998) and breast (Mueller et al., 1998) cancer epithelial cells. Furthermore, activation of PPAR γ results in differentiation in patients with liposarcoma (Demetri et al., 1999). PPAR γ does not only control genes responsible for the differentiated cell phenotype, but also participates to the regulation of cell cycle withdrawal (Altiok et al., 1997). In fact, PPAR γ activation inhibits the DNA-binding and transcriptional activity of E2F/DP factors, which are involved in cell growth. At the present time, it is difficult to speculate about the precise role played by PPAR γ in the colon cell's life.

In summary, the long-term culture of the human adenocarcinoma Caco-2 cells leads to their differentiation. The

latter is accompanied by the development of the peroxisomal compartment marked by an increase in both number and enzyme activity of peroxisomes. Concomitantly to the differentiation of Caco-2 cells, the expression of PPAR α , PPAR γ_1 and PPAR γ_2 is increased. A possible involvement of PPAR α in the maturation process of peroxisomes is suggested because this transcription factor controls genes encoding peroxisomal proteins. On the other hand, the consequences of the increase in PPAR γ expression in cell differentiation remain unclear.

Acknowledgements

We wish to thank Dr. M. Rousset (Inserm U505, Paris, France) and Prof. D. Louvard (Institut Curie, Paris, France) for providing us with the Caco-2 cell line and the anti-villin antibody, respectively; Dr. L. Domenjoud for reading the manuscript. We express our gratitude to Prof. D. Desor for the statistical analysis of our results, to A. Stoekel and J. Chanel for the expert technical assistance. This study was supported by grants from the *Association de la recherche contre le cancer (contrat ARC No. 9233)*, the *Ligue contre le cancer (comité de Meurthe et Moselle)*, the *Fondation de la recherche médicale (comité de Lorraine)* and ARERS.

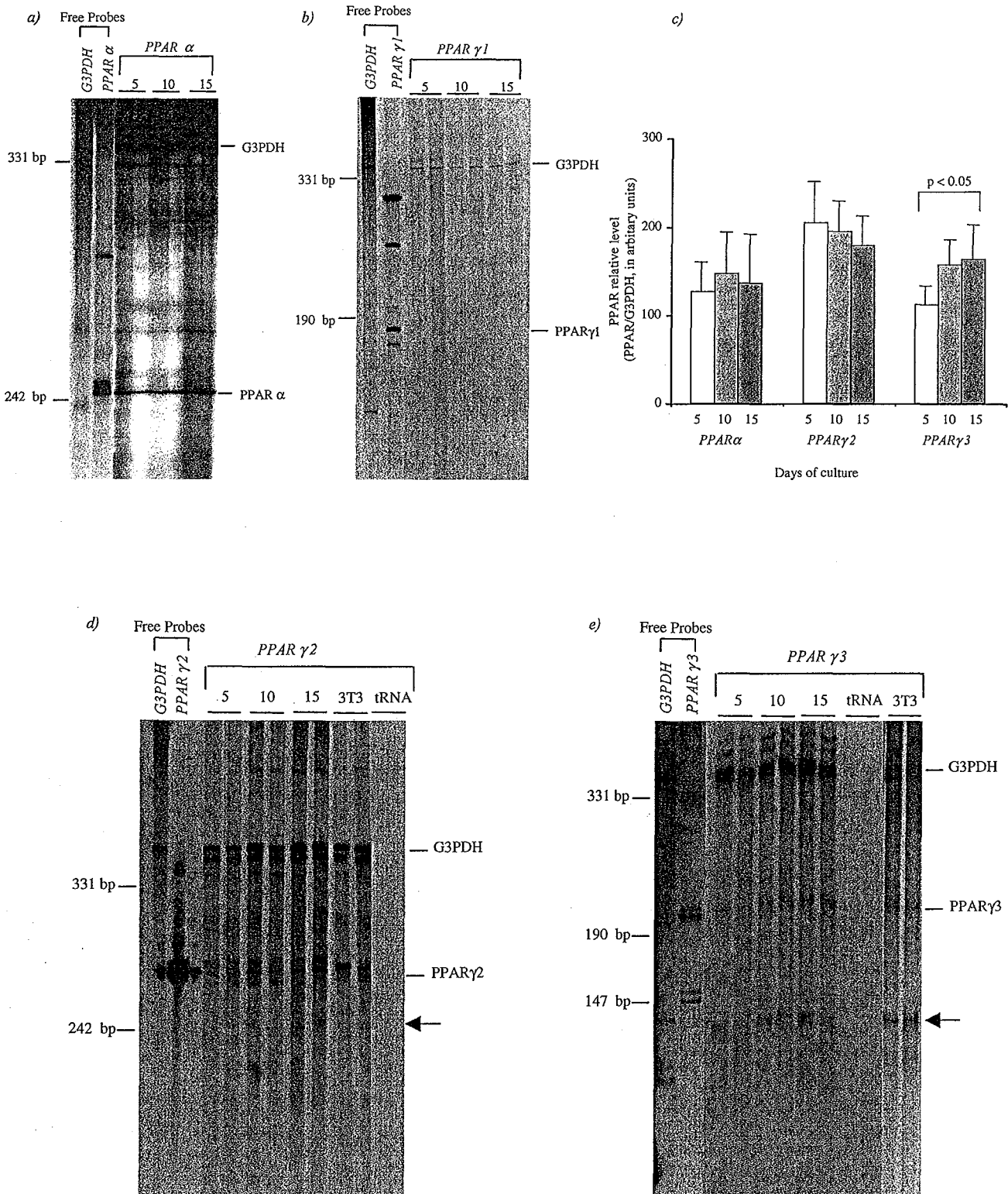


Fig. 7. S1 Nuclease protection assay. Typical detection of PPAR α (a), PPAR $\gamma 1$ (b), PPAR $\gamma 2$ (d) and PPAR $\gamma 3$ (e) mRNA, from Caco-2 cells cultured for 5, 10 and 15 days. Total RNA from cultured Caco-2 cells was hybridized with each labeled PPAR and G3PDH single-strand probes. After 16 h incubation, non hybridized cDNA was digested by S1 nuclease. RNA/DNA hybrids and free probes were run on a 5% polyacrylamide gel under denaturing conditions followed by autoradiography. For PPAR $\gamma 2$ and PPAR $\gamma 3$ mRNA, the position of the second protected fragment is indicated by an arrow. Positive and negative controls were performed with RNA extracted from 3T3 preadipocyte cells and tRNA, respectively. Arrows in d and e correspond to non spliced RNA fragments estimated at 243 and 222 nt for PPAR $\gamma 2$ and PPAR $\gamma 3$ respectively. c. PPAR mRNAs are expressed as mean percentages (\pm SD) of the ratio of PPAR values to G3PDH values from at least three independent experiments. ANOVA and multiple comparison analysis show that the PPAR $\gamma 3$ mRNA level at day 15 was significantly different ($p < 0.05$) to that at day 5.

References

- Altiock, S., Xu, M., Spiegelman, B.M., 1997. PPAR γ induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via downregulation of PP2A. *Genes Dev.* 11, 1987–1998.
- Auboeuf, D., Rieusset, J., Fajas, L., Vallier, P., Freing, V., Riou, J.P., Laville, M., Staels, B., Auwerx, J., Vidal, H., 1997. Tissue distribution and quantification of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 46, 1319–1327.
- Aviv, H., Leder, P., 1972. Purification of biologically active protein globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1408–1412.
- Baudhuin, S.B., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Wattiaux, R., Jacques, P., de Duve, C., 1964. Tissue fractionation studies. 17 – Intracellular distribution of monoaminotransferase, d-aminoacid oxidase and catalase in rat liver tissue. *Biochem. J.* 92, 179–184.
- Brockman, J.A., Gupta, R.A., Dubois, R.N., 1998. Activation of PPAR γ leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 115, 1049–1055.
- Cablé, S., Keller, J.M., Colin, S., Haffen, K., Keding, M., Parache, R.M., Dauça, M., 1992. Peroxisomes in human colon carcinomas. A cytochemical and biochemical study. *Virchows Archiv. B. Cell Pathol.* 62, 221–226.
- Chawla, A., Schwarz, E.J., Dimaculangan, D.D., Lazar, M.A., 1994. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135, 798–800.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Dauça, M., Cablé, S., Calvert, R., Colin, S., Schilt, J., Leheup, B., Keller, J.M., Menard, D., 1996. Peroxisomes and peroxisomal enzymes in the human fetal small intestine. *Biol. Neonate* 69, 12–21.
- Demetri, G.D., Fletcher, C.D., Mueller, E., Sarraf, P., Naujoks, R., Campbell, N., Spiegelman, B.M., Singer, S., 1999. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3951–3956.
- Desvergne, B., Wahli, W., 1995. PPAR: a key nuclear factor in nutrient/gene interactions? In: Baeuerle, P. (Ed.), *Inducible Transcription*, Vol 1. Birkhäuser, Boston, pp. 142–176.
- Duclos, S., Bride, J., Ramirez, L.C., Bournot, P., 1997. Peroxisome proliferation and beta-oxidation in FaO and MH1C1 rat hepatoma cells, HepG2 human hepatoblastoma cells and cultured human hepatocytes: effect of ciprofibrate. *Eur. J. Cell Biol.* 72, 314–323.
- El Bouthoury, F., Keller, J.M., Colin, S., Parache, R.M., Dauça, M., 1992. Peroxisomal enzymes in normal and tumoral human breast. *J. Pathol.* 166, 27–35.
- Elbrecht, A., Che, Y., Cullinan, C.A., Hayes, N., Leibowitz, M.D., Moller, D.E., Berger, J., 1996. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator-activated receptors γ_1 and γ_2 . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 431–437.
- Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Saladin, R., Najib, J., Fruchart, J.C., Deeb, S., Vidal-Puig, A., Flier, J., Briggs, M.R., Staels, B., Vidal, H., Auwerx, J., 1997. The organisation, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J. Biol. Chem.* 272, 18779–18789.
- Fajas, L., Fruchart, J.C., Auwerx, J., 1998. PPAR γ_3 mRNA: a distinct PPAR γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 438, 55–60.
- Farrants, A.K., Nilsson, A., Troen, G., Blomhoff, R., Pedersen, J.I., 1993. The effect of retinoids and clofibrate on the peroxisomal oxidation of palmitic acid and 3 alpha, 7 alpha, 12 alpha-trihydroxy-5 beta-cholestanoic acid in rat and rabbit hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1168, 100–107.
- Fogh, J., Trempe, G., 1975. New human tumor cell lines. In: Fogh, J. (Ed.) *Human Tumor Cells In Vitro*. Plenum Press, New York, pp. 115–141.
- Garen, A., Levinthal, C., 1960. A fine structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *E. coli*. Purification and characterization of alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 38, 470–483.
- Gebel, T., Arand, M., Oesch, F., 1992. Induction of the peroxisome proliferator-activated receptor by fenofibrate in rat liver. *FEBS Lett.* 309, 37–40.
- Gonzalez, F.J., 1997. Recent update on the PPAR α -null mouse. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 231, 139–144.
- Hryb, D.J., Hogg, J.F., 1979. Chain length specificities of peroxisomal and mitochondrial beta-oxidation in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 1200–1206.
- Huin, C., Corriveau, L., Bianchi, A., Keller, J.M., Collet, P., Krémárik-Bouillaud, P., Domenjoud, L., Bécuwe, P., Schohn, H., Ménard, D., Dauça, M., 2000. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the developing human fetal digestive tract. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 1–9.
- Kitamura, S., Miyazaki, Y., Shinomura, Y., Kondo, S., Kanayama, S., Matsuzawa, Y., 1998. Peroxisome proliferator-activated receptor γ induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Jpn. Cancer Res.* 90, 75–80.
- Kubota, T., Koshizuka, K., Williamson, E.A., Asou, H., Said, J.W., Holden, S., Miyoshi, I., Koeffler, H.P., 1998. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, troglitazone has potent antitumor effects against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 58, 3344–3352.
- Lauer, C., Völkl, A., Riedl, S., Fahimi, H.D., Beier, K., 1999. Impairment of peroxisomal biogenesis in human colon carcinoma. *Cancer Biol.* 20, 985–989.
- Lefebvre, A.M., Chen, I., Desreumeaux, P., Najib, J., Fruchart, J.C., Geboes, K., Heyman, R., Auwerx, J., 1998. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ enhances the development of colon cancer tumors in C57BL/6J, -APC^{min/+} mice. *Nat. Med.* 4, 1053–1057.
- Lee, S.S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E.J., Owens, J.W., Kroetz, D.L., Fernandez-Salguero, P.M., Westphal, H., Gonzalez, F.J., 1995. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell Biol.* 15, 3012–3022.
- Lemberger, T., Desvergne, B., Wahli, W., 1996. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 335–363.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Mansen, A., Guardioladiaz, H., Rafter, J., Branting, C., Gustafsson, J.A., 1996. Expression of the proliferator activated receptor (PPAR) in the mouse colonic mucosa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 844–851.
- Marx, N., Sukhova, G., Murphy, C., Libby, P., Plutzky, J., 1998. Macrophages in human atheroma contain PPAR γ : differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ expression and reduction of MMP-9 activity through PPAR γ in mononuclear phagocytes in vitro. *Am. J. Pathol.* 153, 17–23.
- Messer, M., Dahlqvist, A., 1966. A one-step ultramicromethod for the assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.* 14, 376–392.
- Mueller, E., Sarraf, P., Tontonoz, P., Evans, R.M., Martin, K.J., Zhang, M., Fletcher, C., Singer, S., Spiegelman, B.M., 1998. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR γ . *Mol. Cell.* 1, 465–470.
- Mukherjee, R., Jow, L., Noonan, D., McDonnell, D.P., 1994. Human and rat peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 51, 157–166.

- lovikoff, P.M., Davis, C., Quintana, N., 1972. Studies on microperoxisomes. II. A cytochemical method for light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 20, 1006–1023.
- into, M., Robine-Leon, S., Appay, M.D., Keding, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J., Zweibaum, A., 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* 47, 323–330.
- lénat, F., Martinet, Y., Martinet, N., Vignaud, J.M., 1994. Immunohistochemical methods for studying mononuclear phagocytes in tissue sections. *J. Immunol. Methods* 174, 133–154.
- eynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208–212.
- icote, M., Huang, J., Fajas, L., Li, A., Welch, J., Najib, J., Witztum, J.L., Auwerx, J., Palinski, W., Glass, C.K., 1998. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7614–7619.
- tivier, M., Safonova, I., Lebrun, P., Griffiths, C.E., Ailhaud, G., Michel, E., 1998. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor, subtypes during the differentiation of human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 111, 1116–1121.
- obine, S., Huet, C., Moll, R., Sahuquillo-Merino, C., Coudrier, E., Zweibaum, A., Louvard, D., 1985. Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8488–8492.
- oels, F., Espeel, M., Pauwels, M., De Craemer, D., Egberts, H.J., Van der Spek, P., 1991. Different types of peroxisomes in human duodenal epithelium. *Gut* 32, 858–865.
- osenfield, R.L., Kentsis, A., Deplewski, D., Ciletti, N., 1999. Rat preputial sebocyte differentiation involves peroxisome proliferator-activated receptors. *J. Invest. Dermatol.* 112, 226–232.
- ousset, M., Laburthe, M., Pinto, M., Chevalier, G., Rouyer-Fessard, C., Dussaulx, E., Trugnan, G., Boige, N., Brun, J.L., Zweibaum, A., 1985. Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line Caco-2: modulation by forskolin. *J. Cell Physiol.* 123, 377–385.
- aez, E., Tontonoz, P., Nelson, M.C., Alvarez, J.G., Ming, U.T., Baird, S.M., Thomazy, V.A., Evans, R.M., 1998. Activators of the nuclear receptor PPAR γ enhance colon polyp formation. *Nat. Med.* 4, 1058–1061.
- ambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- anger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467.
- arraf, P., Mueller, E., Jones, D., King, F.J., De Angelo, D.J., Partridge, J.B., Holden, S.A., Chen, L.B., Singer, S., Fletcher, C., Spiegelman, B.M., 1998. Differentiation and reversal malignant changes in colon cancer through PPAR γ . *Nat. Med.* 4, 1046–1052.
- schmidt, A., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Shinar, D., Rodan, G.A., 1992. Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol. Endocrinol.* 6, 1634–1641.
- choonjans, K., Staels, B., Auwerx, J., 1996. The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1302, 93–109.
- Sher, T., Yi, H.F., McBride, O.W., Gonzalez, F.J., 1993. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator-activated receptor. *Biochemistry* 32, 5598–5604.
- Spiegelman, B.M., 1998. PPAR γ in monocytes: less pain, any gain? *Cell* 93, 153–155.
- Spiegelman, B.M., Hue, E., Kim, J.B., Brun, R., 1997. PPAR γ and the control of adipogenesis. *Biochimie* 79, 111–112.
- Sørensen, H.N., Treuter, E., Gustafsson, J.A., 1998. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Vitam. Horm.* 54, 121–166.
- Steiniger, H., Sorensen, H.N., Tugwood, J.D., Skrede, S., Spydevold, O., Gautvik, K.M., 1994. Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. Hormonal modulation of fatty-acid induced transcription. *Eur. J. Biochem.* 225, 967–974.
- Stier, H., Fahimi, H.D., Van Veldhoven, P.P., Mannaerts, G.P., Völkl, A., Baumgart, E., 1998. Maturation of peroxisomes in differentiating human hepatoblastoma cells (HepG2): possible involvement of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α). *Differentiation* 64, 55–66.
- Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B.M., 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ , a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147–1156.
- Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B.M., 1995. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 571–576.
- Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G., Thomazy, V.A., Evans, R.M., 1998. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93, 241–252.
- Tso, J.Y., Sun, X.H., Kao, T.H., Reece, K.S., Wu, R., 1985. Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res.* 13, 2485–2502.
- Varanasi, U., Chu, R., Huang, Q., Castellon, R., Yeldandi, A.V., Reddy, J.K., 1996. Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene. *J. Biol. Chem.* 271, 2147–2155.
- Wachtershauser, A., Loitsch, S.M., Stein, J., 2000. PPAR γ is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 380–385.
- Winer, B.J., 1971. *Statistical Principles in Experimental Design*, 2nd Edition, Vol. 1. McGraw-Hill, New York.
- Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, S., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J., Spiegelman, B.M., 1999. Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin insensitivity. *Mol. Cell* 3, 151–158.
- Zhang, B., Marcus, S.L., Sajjadi, F.G., Alvares, K., Reddy, J.K., Subramani, S., Rachubinski, R.A., Capone, J.P., 1992. Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the gene encoding rat peroxisomal enoyl-CoA-hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7541–7545.
- Zweibaum, A., Triadou, N., Keding, M., Augeron, C., Robine-Leon, S., Pinto, M., Rousset, M., Haffen, K., 1983. Sucrase-isomaltase: a marker of fetal and malignant epithelial cells of the human colon. *Int. J. Cancer* 32, 407–412.

Mademoiselle HUIN Cécile

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1
en BIOLOGIE MOLECULAIRE & CELLULAIRE

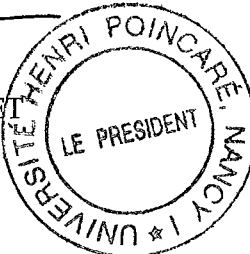
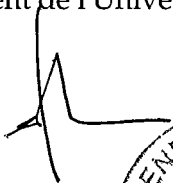
VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

n° 751

Nancy, le 5 décembre 2002

Le Président de l'Université

CI. BURLET



Service de la Scolarité

Affaire suivie par : Georges BILLANT

AVIS DU JURY SUR LA REPRODUCTION DE LA THESE SOUTENUE

Formation Doctorale

..... Biologie... Santé... Environnement.....

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I en

..... Biologie... Cellulaire et moléculaire.....

Nom et prénom de l'auteur : Huin Cécile
Date de la soutenance : Vendredi 15 Novembre 2002

Président du Jury - Nom, Prénom : Pr. PLENAT François

Membres du Jury - Nom, Prénom :

Mme SIMON-ASSMANN Patricia (IR2)
M. LATRUFFE Norbert (IR).
M. DOMENSOUJ Lionel (MCU)
M. JAUGA Michel (IR)

- Thèse pouvant être reproduite en l'état
- Thèse pouvant être reproduite après corrections suggérées au cours de la soutenance
- Thèse ne pouvant être reproduite

Le 15/11/2002
Le Président du Jury

Professeur F. PLENAT

RAPPORT DE SOUTENANCE

Concernant la thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1

en Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée par Carole Huin

Date de la soutenance Vendredi 15 Novembre 2002



Le jury au complet s'est réuni le 11/11/2002 à 14h30.
Madame Carole Huin a, dans un premier temps, fait un
brilliant résumé de son travail de thèse. Le candidat a ensuite
répondu avec assurance et précision aux multiples questions
posées par les membres du jury. A l'issue d'un vote à bulletin secret,
le jury a accordé à Mlle Carole Huin le titre de Docteur de l'Unive
rsité Henri Poincaré, Nancy I, avec la mention très honorable avec
félicitations.

Mention accordée { honorable
 très honorable
 très honorable avec félicitations

Président du Jury - Nom, Prénom et signature : P. PLÉNAI François

Membres du Jury - Nom, Prénom et signature :

P. SIMON. ASSMANN

N. LATRUFFE

L. DOMENJOU

M. DAUÇA

Philippe Assmann

Nathalie Latruffe

Lionel Domenjou

Maria Dauca

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) are transcription factors belonging to the nuclear receptor family. Three isotypes of PPAR have been described in humans (α , NUC-1 also called β or δ ; and γ). PPAR have been implicated in a variety of biological processes including colon cancer. We have studied the expression of PPAR in colonic tissues in three biological situations: during development of the human fetal digestive tract, in Caco-2 cells used as a model of enterocyte-like differentiation and in biopsies from tumoral and normal adjacent human colon.

The PPAR subtypes are expressed as early as 7 weeks of foetus development in cell types of endoderm and mesoderm origins. The presence of PPAR γ protein is found by Western blotting and that of the encoding mRNA by nuclease-S1 protection assay, confirming that this subtype is not adipocyte-specific. PPAR α , PPAR β and PPAR γ exhibit different spatio-temporal patterns of expression during morphogenesis of the digestive tract. Whatever the stage and the gut region (except the stomach) examined, PPAR γ is expressed at a high level, suggesting some fundamental role for this receptor in development and/or physiology of the human digestive tract.

The expression of PPAR α and γ was next studied in Caco-2 cells. This cell line exhibits enterocyte-like differentiation during long term culture. We showed by immunohistochemistry that both isotype protein levels increased gradually during cell differentiation. Using Nuclease S1 protection assay, we demonstrated that there is not a concomitant increase in the transcriptional level of PPAR subtypes, especially PPAR α and isoforme PPAR γ_2 which seemed to be regulated at the translational level.

Since PPAR γ has been involved in human colon carcinoma, we finally investigated the expression of this PPAR subtype in biopsies obtained from human colon adenocarcinoma. At the transcriptional level, PPAR γ was less abundant in tumours than in normal-paired tissues. In contrast, using immunohistochemistry we showed that the PPAR γ protein amount was more abundant in tumoral tissues. In addition PPAR γ immunostaining was exclusively found in cytoplasm. Moreover, in normal adjacent tissues PPAR γ was present in the upper one-third of the crypts suggesting that PPAR γ expression is associated to the differentiation/maturation process of columnar cells.

PPAR, Colorectal cancer, development, Caco-2

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Trois sous-types de PPAR ont été décrits chez l'homme (α , NUC-1 aussi nommé β ou δ , et γ). Les PPAR sont impliqués dans de nombreux processus biologiques dont le cancer colorectal. Nous avons étudié l'expression des PPAR dans le colon dans trois situations biologiques : durant le développement du tractus digestif fœtal humain, au cours de la différenciation des cellules Caco-2 en tant que modèle de différenciation entérocytaire et dans des biopsies de tumeurs coliques humaines et du tissu sain apparenté.

Les différents sous-types de PPAR sont exprimés dès la 7^{ème} semaine de développement dans les cellules d'origine mésodermique et endodermique. La présence de la protéine PPAR γ est confirmée par immunoréplique et celle des ARNm codant par protection à la nucléase S1. Ceci confirme que ce sous-type n'est pas uniquement spécifique de l'adipocyte. Les PPAR montrent un profil d'expression différent durant la morphogenèse du tractus digestif fœtal. Aux différents stades et régions observés, PPAR γ est exprimé à des taux importants, suggérant un rôle fondamental pour ce récepteur dans le développement et/ou dans la physiologie du tractus digestif humain

Les expressions de PPAR α et de PPAR γ ont été étudiées dans les cellules Caco-2, cellules qui se différencient spontanément en entérocytes dans des conditions standard de culture. Nous avons montré par immunocytochimie que l'expression des deux isotypes augmente graduellement durant la différenciation. Par la technique de protection à la nucléase S1, nous avons montré une augmentation concomitante des taux transcriptionnels des sous-types de PPAR, notamment de PPAR α et de PPAR γ 2 qui semblent être régulé par un taux translationnel.

Enfin, nous avons étudié l'expression des sous-types de PPAR dans des biopsies obtenues à partir d'adénocarcinomes coliques humains. Le taux transcriptionnel de PPAR γ est plus faible au niveau des tumeurs. Par contre, nous avons montré par immunocytochimie que la protéine PPAR γ est plus abondante dans le tissu tumoral. La localisation de la protéine dans les tumeurs est cytoplasmique. Dans le tissu sain, PPAR γ est localisé dans la partie supérieure des glandes suggérant un rôle de ce récepteur dans la différenciation / maturation des cellules.

PPAR, cancer du colon, développement, Caco-2