

N° d'ordre : 2985

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT, GEOSCIENCES,
SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

BARBARA DELAGE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

**MODULATION DE L'EXPRESSION DE RECEPTEURS NUCLEAIRES
PAR LA VITAMINE A ET LES ACIDES GRAS DANS LE PROCESSUS
DE CANCEROGENESE COLORECTALE :
APPROCHES EXPERIMENTALE ET HUMAINE**

Soutenue le : 20 juin 2005

Après avis de :

Philippe BOUGNOUX, Professeur, Université de Tours
Khaled MEFLAH, Professeur, Université de Nantes

Rapporteur
Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Philippe BOUGNOUX, Professeur, Université de Tours
Pierrette CASSAND, Professeur, Université Bordeaux 1
Jochen LANG, Professeur, Université Bordeaux 1
Khaled MEFLAH, Professeur, Université de Nantes
Eric RULLIER, Professeur, Université Bordeaux 2
Germain TRUGNAN, Professeur, Université Paris 6

Président

Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait jamais eu la même couleur sans l'encadrement du Pr. Pierrette Cassand dont je salue l'ouverture d'esprit qui m'a permis de m'épanouir pleinement dans mon travail durant ces années de thèse.

Je remercie également le Pr. Paul Higuieret qui m'a accueillie dans l'Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire.

Je remercie très sincèrement les membres du jury d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Enfin j'exprime toute ma gratitude aux personnes de l'Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire qui m'ont soutenue et offert leur amitié.

*« Point n'ait besoin d'espérer pour entreprendre ni de réussir pour persévérer »
Guillaume Le taciturne, Prince d'Orange (1533-1584)*

Avant-propos

Ce travail de thèse a été effectué au sein du Laboratoire Alimentation et Cancérogénèse du Côlon de l'ISTAB, Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire, sous la direction du Pr. Pierrette Cassand. Il a été financé par une bourse MENRT et par la Ligue régionale Contre le Cancer.

Les résultats de ce travail ont donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications :

Groubet R, Pallet V, Delage B, Redonnet A, Higuieret P, Cassand P. Hyperlipidic diets induce early alterations of the vitamin A signalling pathway in rat colonic mucosa. Endocrine Regulations. 2003, 37(3):137-44.

Delage B, Groubet R, Pallet V, Bairras C, Higuieret P, Cassand P. Vitamin A prevents high fat diet-induced ACF development and modifies the pattern of expression of proliferator and retinoic acid receptor m-RNA. Nutrition and Cancer. 2004, 48(1):28-36.

Delage B, Bairras C, Buaud B, Pallet V, Cassand P. A high fat diet generated alterations in nuclear receptor expression: prevention by vitamin A and links with COX-2 and β catenin. Int J Cancer. 2005, In press.

Delage B, Rullier A, Capdepon M, Rullier E, Cassand P. Nuclear receptor expression in healthy and tumor colorectal mucosa from lean and overweight patients. En préparation pour soumission à Cancer Letters.

Communications orales, invitée :

Delage B, Retailleau A, Pallet V, Higuieret P, Cassand P. Effet in vitro de l'acide linoléique et de l'acide rétinoïque tout-trans sur des cellules épithéliales de rat. Club d'Etude des Cellules Epithéliales Digestives (CECED), Nantes, 23-24 janvier 2003.

Delage B, Bairras C, Enderlin V, Pallet V, Higuieret P, Cassand P. High fat diet and vitamin A supplementation effect on induced carcinogenesis in rat colon : modulation of nuclear receptor expression. 8th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis, Pise, 4-8 octobre 2003.

Communications par affiche :

Delage B, Pallet V, Higuieret P, Cassand P. Effet d'un régime cafétéria sur la cancérogénèse colique induite chez le rat : modulation de l'expression des récepteurs nucléaires. 3^{èmes} Journées Scientifiques du Réseau National Alimentation Cancer Recherche (NACRe), Journées Francophones de Nutrition, Dijon, 27-28 novembre 2002.

Delage B, Bairras C, Enderlin V, Pallet V, Higuieret P, Cassand P. Effet d'un régime riche en acides gras supplémenté en vitamine A sur la cancérogénèse colique chimiquement induite : modulation de l'expression de récepteurs nucléaires et du taux de β -caténine. 4^{èmes} Journées Scientifiques du Réseau National Alimentation Cancer Recherche (NACRe) en partenariat avec l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Maisons-Alfort, 13-14 novembre 2003.

Sommaire

Avant-propos
Liste des figures
Liste des Tableaux
Abréviations

Chapitre I : Données Bibliographiques	1
I. Le Cancer	1
I.1. Epidémiologie du cancer	1
I.2. Biologie du cancer	4
I.2.1. La cancérogenèse	4
I.2.2. De la crypte normale aux lésions coliques cancéreuses	8
I.2.2.1. <i>Epithélium colique sain</i>	
I.2.2.2. <i>Adénomes et tumeurs malignes</i>	
I.2.2.3. <i>Le modèle adénome – carcinome</i>	
I.2.2.3. <i>Prédispositions génétiques au développement du CCR</i>	
II. Alimentation et Cancérogenèse Colique	15
II.1. Les facteurs alimentaires modulent le risque de CCR	15
II.2. Les Acides Gras : composés modulateurs du risque de CCR	16
II.2.1. Etudes épidémiologiques et expérimentales	16
II.2.1.1. <i>Acides gras</i>	
- <i>Acides gras à courtes chaînes</i>	
- <i>Acides gras à moyennes et longues chaînes</i>	
- <i>Acides gras mono-insaturés</i>	
- <i>Acides gras trans</i>	
- <i>Acides gras conjugués</i>	
II.2.1.2. <i>Acides gras poly-insaturés</i>	
- <i>AGPI série n-6</i>	
- <i>AGPI série n-3</i>	
II.2.2. Aspect quantitatif	19
II.2.2.1. <i>Apport calorique</i>	
II.2.2.2. <i>Obésité comme facteur de risque</i>	
II.2.3. Limites et difficultés dans l'interprétation des données	20
II.2.3.1. <i>Modèles animaux</i>	
II.2.3.2. <i>Les effets dépendent du moment d'exposition</i>	
II.2.3.3. <i>Interactions alimentaires</i>	
II.3. La Vitamine A : composé alimentaire protecteur potentiel du CCR	23
II.3.1. Généralités	23
II.3.2. Vitamine A et CCR	24
II.4. Mécanismes d'interaction alimentation-cancérogenèse colique	25
II.4.1. Généralités	25
II.4.2. Acides gras alimentaires, vitamine A et modulation du risque de cancer colorectal : mécanismes possibles	27
III. Les Récepteurs Nucléaires et leur implication dans la cancérogenèse colique	29
III.1. La superfamille des récepteurs nucléaires	29
III.1.1. Structure générale	31

III.1.2. Mode d'action	32
III.1.2.1. Les éléments de réponse	
III.1.2.2. Cofacteurs de transcription	
III.2. Les PPARs : récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes	34
III.2.1. Généralités	34
III.2.2. Organisation structurale et liaison à l'ADN	34
III.2.3. Localisation tissulaire des PPARs	35
III.2.4. Ligands des PPARs	36
III.2.5. PPAR γ et cancer	37
III.2.5.1. Historique de l'intérêt suscité par PPAR γ	
III.2.5.2. PPAR γ et CCR : rôle controversé	
-Résultats divergents issus des travaux expérimentaux	
-Hypothèse émergente concernant la fonction de PPAR γ	
-Expression de PPAR γ dans les tissus tumoraux	
III.2.6. PPAR δ et cancer colorectal	40
III.2.6.1. PPAR δ , gène cible de la β caténine ?	
III.2.6.2. Oncogénicité potentielle de PPAR δ ?	
III.3. Les RARs et les RXRs: récepteurs activés par la vitamine A	41
III.3.1. Organisation structurale et liaison à l'ADN	42
III.3.2. Localisation tissulaire des RARs	42
III.3.3. Voies de signalisation activées par les rétinoïdes	43
III.3.4. Gènes cibles	43
III.3.5. Altérations de l'expression des RARs et cancérogenèse	43
III.3.6. Rôles des RXRs	45
IV. Biomarqueurs du processus de la cancérogenèse colique	47
IV.1. Les cryptes aberrantes	47
IV.2. La cyclooxygénase-2	48
IV.2.1. COX-2 : cible de l'action anti-tumorale	50
IV.2.2. COX-2 et alimentation	51
IV.2.3. COX-2 et PPARs	51
IV.2.4. COX-2, RARs et rétinoïdes	53
IV.3. La β caténine	54
IV.3.1. Voie de signalisation classique de Wnt	54
IV.3.1.1. Description	
IV.3.1.2. Gènes cibles	
IV.3.1.3. Altération de cette voie au cours de la cancérogenèse colique	
IV.3.2. β caténine et alimentation	58
IV.3.3. β caténine et PPARs	58
IV.3.4. β caténine, RARs, RXRs et rétinoïdes	59
IV.4. COX-2 et β caténine	60
<u>Objectif de la Thèse</u>	62
<u>Chapitre II : Etudes Expérimentales</u>	64
I. Effets d'un régime hyperlipidique riche en acide linoléique sur le profil d'expression des récepteurs nucléaires PPARγ et RARβ/RXRα	64
I.1. Méthodologie	65
<i>Choix du modèle animal</i>	
<i>Choix de la dose d'initiateur chimique injecté</i>	
<i>Régimes alimentaires</i>	

I.2. Principaux résultats	67
I.3. Article 1 :	67
<i>“Vitamin A prevents high fat diet-induced ACF development and modifies the pattern of expression of peroxisome proliferator and retinoic acid receptor mRNA”</i>	
I.4. Conclusion	68
II. Effets d’un régime hyperlipidique inducteur de prise de poids sur le profil d’expression des récepteurs nucléaires PPARs et RARs/RXRα	70
II.1. Méthodologie	71
<i>Choix du modèle animal</i>	
<i>Régimes alimentaires</i>	
<i>Modalités d’administration de la vitamine A</i>	
II.2. Principaux résultats	72
II.3. Article 2 :	73
<i>“A high fat diet generates alterations in nuclear receptor expression : prevention by vitamin A and links with cyclooxygenase-2 and βcatenin”</i>	
II.4. Conclusion	74
<u>Chapitre III : Etude Chez l’Homme</u>	76
Description des profils d’expression des récepteurs nucléaires dans la muqueuse colorectale - saine et tumorale – chez l’Homme	
<i>Evaluation des modifications de l’expression des récepteurs chez des patients en surpoids ou obèses</i>	76
1. Méthodologie	78
2. Principaux résultats	79
3. Article 3 :	79
<i>“Nuclear receptor expression in healthy and tumor colorectal mucosa from lean and overweight patients”</i>	
4. Conclusion	80
<u>Conclusion Générale</u>	82
<u>Bibliographie</u>	88

Liste des figures

Figure 1. Incidence et mortalité par types de cancers dans le monde en 2002	2
Figure 2. Répartition de l'incidence des cancers colorectaux dans le monde en 2002	3
Figure 3. Répartition de la mortalité par les cancers colorectaux dans le monde en 2002	3
Figure 4. Histologie et représentation schématique d'un polype	5
Figure 5. Anatomie du côlon humain et structure de la muqueuse colique	9
Figure 6. Illustration du renouvellement cellulaire au niveau d'une crypte colique	10
Figure 7. Principales étapes de la cancérogenèse colique	11
Figure 8. Mécanismes moléculaires impliqués dans le modèle de cancérogenèse colorectale de Fearon et Vogelstein	13
Figure 9. Voies métaboliques des AGPI n-3 et n-6 et effets potentiels sur le processus cancéreux	18
Figure 10. Métabolisme général de la vitamine A	22
Figure 11. Voies de biosynthèse de la vitamine A	23
Figure 12. Structure et organisation de la superfamille des récepteurs nucléaires	30
Figure 13. Mécanismes de répression et d'activation transcriptionnelles par l'hétérodimère RAR-RXR	33
Figure 14. Homologies entre les isoformes humaines de PPAR et structures tridimensionnelles	35
Figure 15. Photographie de FCA colique	48
Figure 16. Implication des COXs dans le métabolisme des acides gras	49
Figure 17. Régulation présumée de la transcription du gène codant COX-2 par PPAR et RAR dans les cellules coliques	52
Figure 18. Voie canonique de signalisation de Wnt	55
Figure 19. Représentation schématique de la β caténine	56
Figure 20. PPAR δ incarne un point de convergence entre les voies de signalisation de Wnt et de la COX-2	61
Figure 21. Diagramme schématique de l'interaction de plusieurs nutriments via l'activation de récepteurs nucléaires	62
Figure 22. Voies de signalisation modulées par les acides gras alimentaires	83
Figure 23. Exemple d'une boucle de régulation entre PPAR γ et COX-2 impliquée dans la régulation de l'apoptose	85
Figure 24. Facteurs potentiels modulant le taux de β caténine libre	86

Liste des tableaux

Tableau I. Certains gènes associés au cancer chez l'Homme	7
Tableau II. Facteurs modulant l'apparition du cancer colorectal	15
Tableau III. Cancers dont la croissance est modulée par des ligands de PPAR γ	38
Tableau IV. Composition en acides gras de l'huile carthame	66
Tableau V. Composition en acides gras des différents régimes	71

Abréviations

9cis-RA	acide rétinoïque 9-cis
AA	acide arachidonique
ADH	alcool deshydrogenase
AG	acide gras
AGCC	acides gras à courte chaîne
AGPI	acide gras poly-insaturés
AP-1	activator protein complex-1
APC	adenomatous polyposis coli
APL	leucémie promyélocytique aiguë
AR	acide rétinoïque
ATRA	acide rétinoïque tout-trans
BCAC	β catenin accumulated crypt
CA	crypte aberrante
CCR	cancer colorectal
CIRC	centre international de recherche sur le cancer
CLA	acide linoléique conjugué
COX	cyclooxygénase
COXIB	inhibiteur spécifique de COX-2
CRABP	cellular retinoic acid binding protein
CRBP	cellular retinol binding protein
CRE	cyclic AMP response element
CREB	cyclic AMP response element binding protein
DHA	acide docosahexaénoïque
Dsh	dishevelled
EPA	acide eicosapentaénoïque
FAP	familial adenomatous polyposis
FCA	foyer de cryptes aberrantes
Fz	frizzled
GSK3β	glycogene synthase kinase3 β
HETE	acide hydroxyéicosatétraénoïque
HNPCC	hereditary non polyposis colon cancer
HRE	hormone response element

IARC	international agency for research on cancer
IGF	insulin-like growth factor
IMC	indice de masse corporelle
LEF	lymphoid enhancing factor
LOX	lipooxygénase
LRP	low-density lipoprotein receptor-related protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDF	mucine depleted foci
Min	multiple intestinal neoplasia
MMR	mismatch repair
NF-κB	nuclear factor-κB
NSAID	anti-inflammatoire non stéroïdien
PG	prostaglandine
PLM	promyelocytic leukemia
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	peroxisome proliferator response element
RAR	retinoic acid receptor
RARE	retinoic acid response element
RBP	retinol binding protein
RDHL	retinol deshydrogenase L
ROI	reactive oxygen intermediate
RXR	retinoic X receptor
RXRE	retinoic X response element
TCF	T-cell factor
TGFβ	transforming growth factorβ
TXA	thromboxane
TZD	thiazolidinédione
UICC	international union against cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor

*A mes très chers parents,
Anne-Marie et Daniel*

Chapitre I : Données Bibliographiques

Chapitre I : Données Bibliographiques

I. Le cancer

I.1. Epidémiologie du cancer

Le cancer existe depuis que la vie existe, aussi bien chez les plantes que chez les animaux. Hippocrate (460-v.370 av. J.-C) décrivait le « carcinome » comme une tumeur envahissante conduisant à une mort inéluctable. Cependant, si le cancer apparaît peu dans notre histoire, c'est que, d'une part, son diagnostic est resté longtemps méconnu et que, d'autre part, la moitié des cancers est diagnostiqué après 65 ans alors que l'espérance de vie n'a excédé 60 ans qu'au milieu du 20^{ème} siècle.

Chaque année, 10 millions de nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués et plus de 6 millions de personnes décèdent par cancer (données issues de l'UICC, International Union Against Cancer). Le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer ou IARC, International Agency for Research on Cancer) a publié des données mettant en évidence les variations de l'incidence des cancers en 2002 en fonction de la localisation géographique, du sexe et de l'âge des individus. A certaines exceptions nationales et locales près, les pays en voie de développement d'Afrique, d'Amérique latine et d'Asie présentent des taux élevés de cancers de l'estomac, du foie (cancer primitif) et du col de l'utérus. Ils présentent également des taux relativement élevés de cancers des voies aérodigestives supérieures (bouche, pharynx, larynx et œsophage). De leur côté, les pays développés d'Europe, d'Amérique du Nord, d'Australie et d'Asie présentent des taux relativement élevés de cancers du côlon et du rectum (cancers colorectaux), de cancers du sein, de l'endomètre et de la prostate.

L'incidence du cancer colorectal (CCRs), clairement modifiée selon les zones géographiques, compte pour environ 10 % des nouveaux cas de cancer avec plus de 1 million de nouveaux cas en 2002 (*CIRC*). Dans le monde, le CCR est le troisième cancer le plus commun chez les femmes (après les cancers du sein et du col de l'utérus) et le quatrième chez l'homme (après les cancers des poumons, de la prostate et de l'estomac) (**Figure 1**).

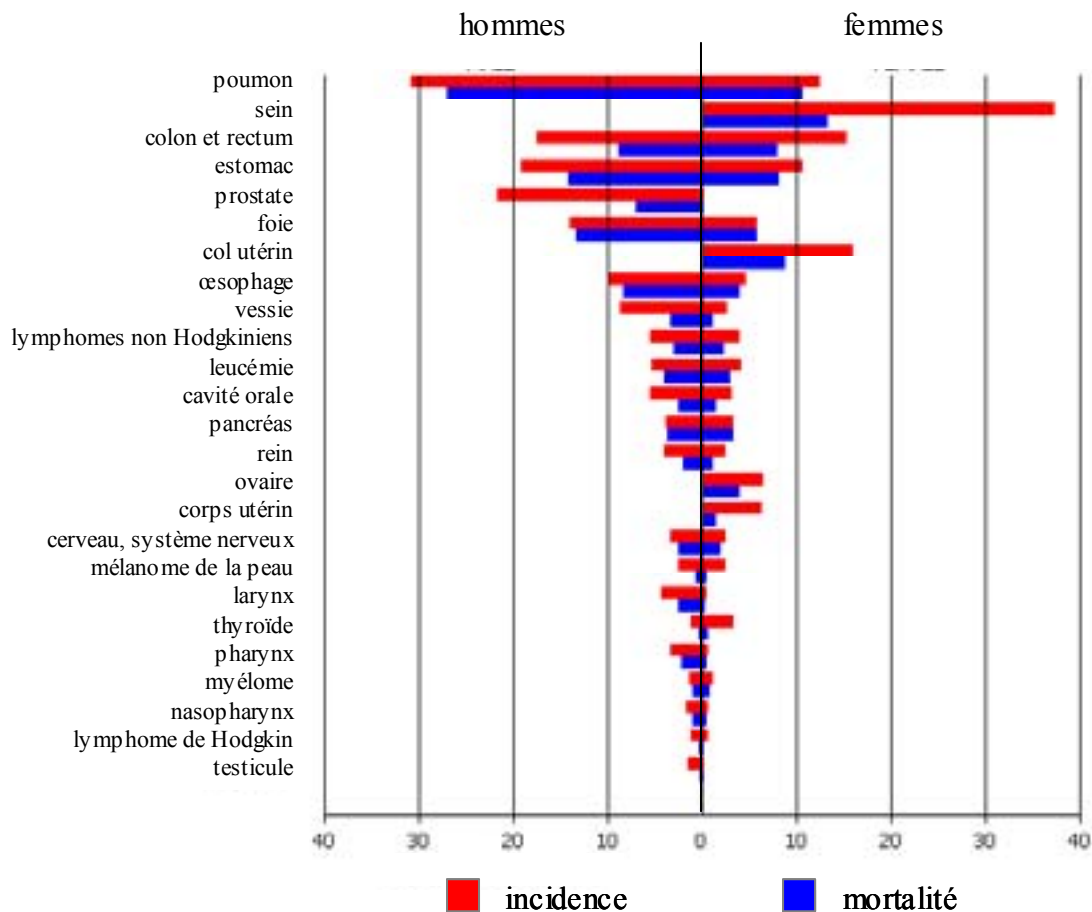


Figure 1. Incidence et mortalité par types de cancers dans le monde en 2002, données exprimées en taux standardisés par âge sur la population standard mondiale/100 000 (d'après le *CIRC*)

Le CCR est plus fréquent dans les pays occidentaux particulièrement en Amérique du Nord, Australie, Nouvelle-Zélande, Japon et Europe occidentale (Figures 2 et 3). Globalement, cette maladie touche pratiquement également les 2 sexes avec une légère prédominance masculine (Figure 1). Cependant, si l'incidence dépend de l'âge des individus, elle dépend aussi du sexe. En effet, dans les pays à risques élevés, l'incidence entre 35 et 60 ans est généralement plus élevée chez les femmes, tandis qu'elle est plus élevée chez l'homme après 60 ans. Il s'agit cependant d'un cancer rare avant 50 ans, l'âge moyen au diagnostic étant de 69.5 ans pour les hommes et de 72.8 ans pour les femmes. Dans tous les pays du monde, le taux de CCR est constamment plus élevé chez les résidents urbains. Le risque chez les personnes nées et vivant dans les régions rurales est environ 30 % moins élevé que celui des personnes résidant en milieu urbain.

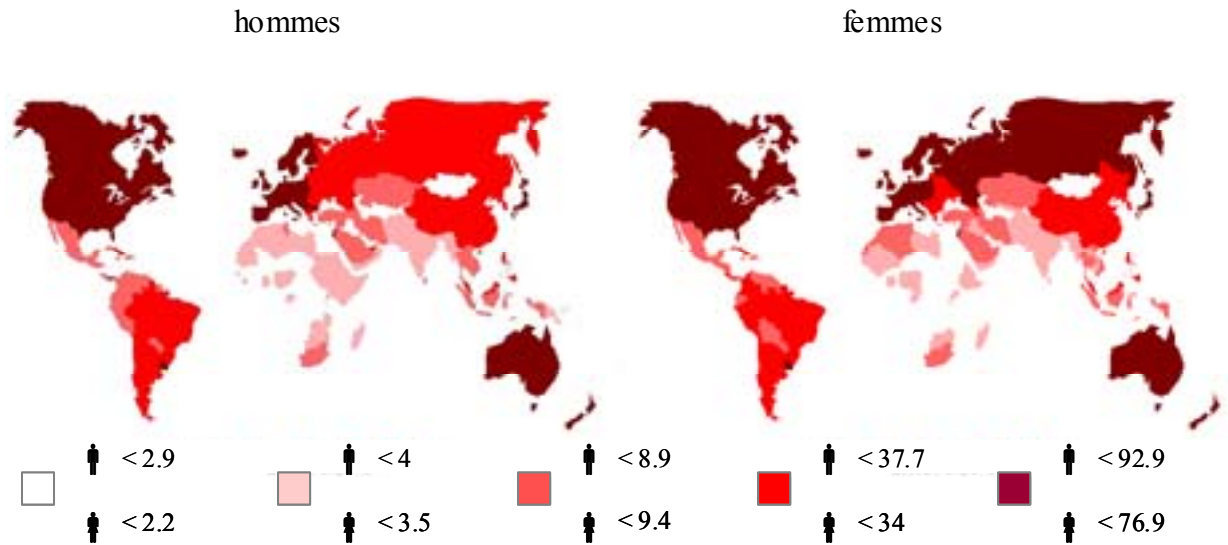


Figure 2. Répartition de l'incidence des cancers colorectaux dans le monde en 2002, données exprimées en taux standardisés par âge sur la population standard mondiale/100 000 (d'après le *CIRC*)

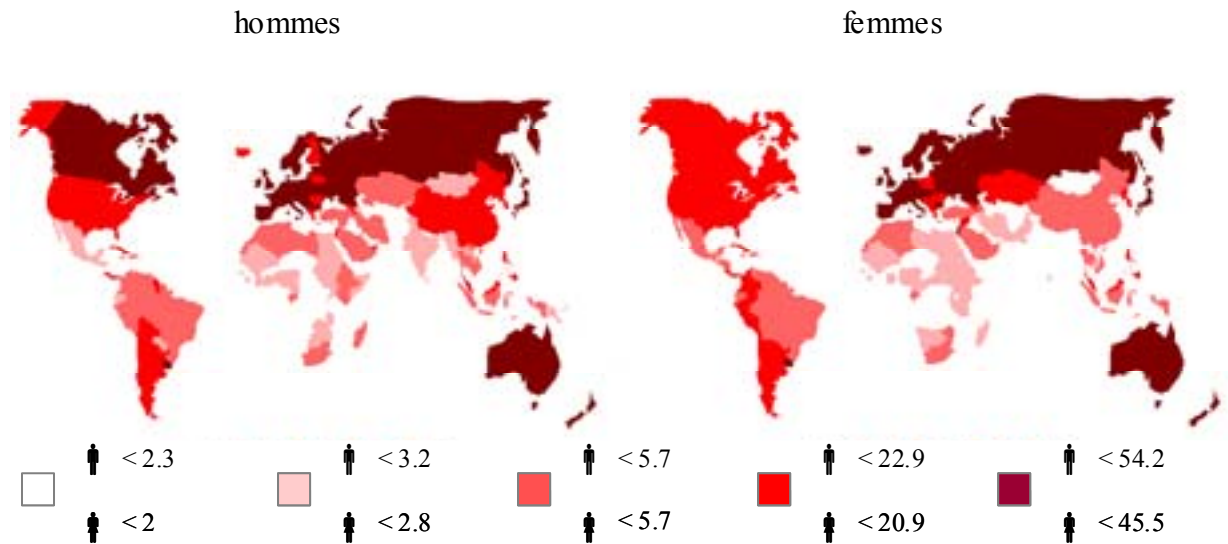


Figure 3. Répartition de la mortalité par les cancers colorectaux dans le monde en 2002, données exprimées en taux standardisés par âge sur la population standard mondiale/100 000 (d'après le *CIRC*)

En France, le cancer représente la première cause de mortalité depuis 1989, devant les maladies cardiovasculaires, avec plus de 250 000 nouveaux cas diagnostiqués en 2002. L'importance relative des cancers au sein de la population française évolue avec le temps. Alors qu'il y a 50 ans le cancer de l'estomac était le plus répandu, on observe une tendance à l'augmentation pour les cancers du sein, de la prostate et colorectaux. La répartition des cancers suivant les organes est similaire à celle observée au niveau mondial. La mortalité par cancer a concerné près de 150 000 individus en 2002 : la plus forte est observée chez les personnes atteintes de cancer du poumon (plus de 26 000 décès en 2002 en France) puis chez les individus atteints par une tumeur colique ou rectale (plus de 17 000 décès en 2002 en France).

L'épidémiologie descriptive montre l'importance des disparités géographiques dans l'incidence du cancer (Figure 2). Or, ces incidences changent rapidement. C'est le cas dans les pays occidentaux, au cours des dernières décennies, avec le déclin de certains cancers et l'émergence ou l'augmentation d'autres. De la même façon, il est estimé que, d'ici 2020, 60% des nouveaux cas de cancer pourraient apparaître dans les pays en voies de développement. Ainsi, les incidences de cancers sont modifiées à mesure que la population vieillit et que ces pays s'industrialisent et s'urbanisent. Ce point est également illustré par les incidences perturbées après des flux migratoires : au bout d'un certain temps, une personne immigrée présentera les mêmes risques de cancer que la population du pays d'accueil, d'autant plus vite qu'elle adoptera le mode de vie et en particulier le régime alimentaire. Ceci s'applique en particulier au cancer colorectal.

I.2. Biologie du cancer

I.2.1. La cancérogenèse

Lorsqu'on évoque 'le' cancer, il faudrait en réalité parler 'des' cancers. En effet, le mot 'cancer' regroupe une multitude de maladies différentes, plus d'une centaine, touchant pratiquement tous les tissus de l'organisme, mais qui ont en commun une croissance cellulaire non contrôlée menant à l'invasion des tissus environnants, voire à la migration vers d'autres tissus. Le mot 'cancer' vient du grec 'carcinos' désignant le crabe et évoquant cet animal dévorant les tissus. Cette image conforte l'idée que les cellules cancéreuses peuvent bloquer le fonctionnement des organes.

Le passage de la cellule normale à la cellule cancéreuse, processus appelé transformation, correspond à l'acquisition de propriétés caractéristiques : prolifération incontrôlée, indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération et insensibilité aux signaux inhibiteurs, abolition de l'apoptose, acquisition d'un pouvoir invasif, capacité à susciter

l'angiogenèse, instabilité génomique, etc. L'accumulation d'altérations génétiques sous-tend la transformation maligne de la cellule responsable de la tumeur et s'avère être un phénomène lent (jusqu'à plusieurs dizaines d'années chez l'Homme). Bien qu'une cellule tumorale possède toute une série de caractéristiques qui permettent de la définir, elle est issue d'un tissu normal dont elle conserve des propriétés. Une tumeur se distingue du tissu dans lequel elle prend naissance par une organisation propre qui sert à en faire le diagnostic. L'appellation '**tumeur bénigne**' est réservée à des lésions certes issues d'une prolifération anormale mais possédant des caractéristiques telles que des limites définies respectant la basale ou la capsule de l'organe concerné, des relations préservées entre les tissus et des cellules d'apparence normale avec des noyaux de taille et d'aspect réguliers. En revanche, les **lésions malignes** sont constituées de cellules manifestement anormales avec un certain degré de dédifférenciation, un envahissement du stroma de l'organe et présentant la faculté de migration vers des organes distants via les voies lymphatique ou hématogène. Entre les 2 états bénin et malin, il existe des lésions possédant des caractéristiques de l'état bénin mais avec un potentiel de progression vers le cancer (Figure 4).

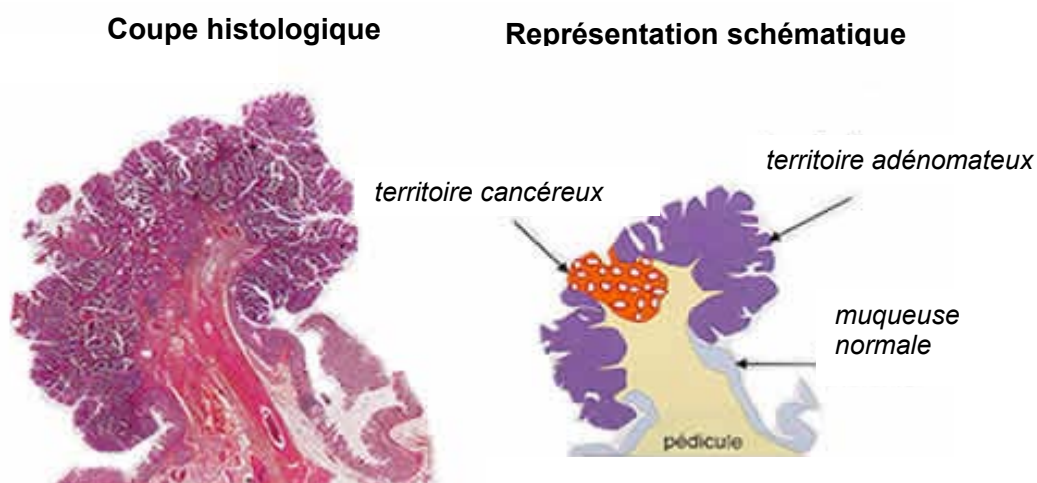


Figure 4. Histologie et représentation schématique d'un polype

Les recherches expérimentales menées depuis plusieurs dizaines d'années ont permis de mettre en évidence les mécanismes fondamentaux qui régissent le développement du cancer. Ainsi, on sait depuis longtemps que le développement d'un cancer est un processus multiphasique, décrit dès 1941 par Berenblum, qui met en jeu trois étapes essentielles, les phases d'initiation, de promotion et de progression-invasion (*Vogelstein et Kinzler, 1993*).

La phase d'**initiation** correspond à la première altération du patrimoine génétique d'une cellule normale. La stabilisation et la transmission aux cellules-filles confèrent un caractère irréversible à ce premier stade du processus cancérogène. Un certain taux de lésions de l'ADN a lieu spontanément à la suite de mécanismes endogènes, mais celles-ci peuvent également être produites à la suite d'exposition à des agents cancérogènes.

Dans un premier temps, les agents cancérogènes sont principalement métabolisés par un système enzymatique dépendant du cytochrome P450 (enzymes de phase I). Par un mécanisme d'hydroxylation, ce système permet ensuite la prise en charge de la molécule par un deuxième ensemble d'enzymes de conjugaison (enzymes de phase II) qui peut l'éliminer via les voies sanguines ou biliaires. Par ailleurs, ce système de métabolisation complexe qui mène normalement à une détoxification des molécules xénobiotiques, peut donner naissance à des métabolites électrophiles mutagènes. Ceux-ci peuvent se lier de manière covalente à une base de l'ADN et former ainsi ce qu'on appelle un adduit à l'ADN. Certains composés peuvent également alkyler les bases de l'ADN ce qui entraîne parfois une dépurination. D'autres agents, comme le bromure d'éthidium, sont capables de s'intercaler entre deux bases d'un même brin ou entre les deux brins d'ADN. On peut également observer des pontages entre l'ADN et des protéines, ou des pontages interbrins. Il peut également y avoir des cassures simple ou double brins de l'ADN provoquées, par exemple, par les rayons X. Ces lésions génomiques peuvent être la conséquence de deux mécanismes : la métabolisation des agents chimiques en composés génotoxiques, et une faille dans le système de réparation de l'ADN. Lorsque l'ADN est endommagé, les mécanismes cellulaires de réparation entrent en jeu. La grande majorité des lésions de l'ADN est ainsi éliminée par un mécanisme fidèle d'excision-resynthèse. Cependant, si le mécanisme de réparation fidèle est déficient ou si les lésions sont trop importantes, un système de réparation infidèle (système SOS) peut intervenir et conduire à la survie de la cellule mais induire l'installation de mutations responsables de l'apparition de cellules initiées.

Deux classes de gènes, les proto-oncogènes qui stimulent la croissance cellulaire et les gènes suppresseurs de tumeurs (encore appelés anti-oncogènes) qui l'inhibent, ont un rôle fondamental dans l'apparition du cancer (Tableau I). Des mutations de ces deux classes de gènes seront responsables de la prolifération cellulaire incontrôlée (*Stanley, 1995*). Les lésions de l'ADN à l'origine des mutations géniques sont donc un élément crucial dans le processus de cancérisation de la cellule.

Tableau I. Certains gènes associés au cancer chez l'Homme (Weinberg, 1996)

GENES SUPPRESSEURS DE TUMEURS	
Gènes codant des protéines du cytoplasme	
<i>APC</i>	Associé aux cancers du côlon et de l'estomac
<i>DPC4</i>	Code une molécule relais d'une voie d'inhibition de la division cellulaire. Associé au cancer du pancréas
<i>NF-1</i>	Code une protéine inhibitrice de la protéine stimulante Ras. Associé à des cancers du système nerveux, à la leucémie myéloïde
<i>NF-2</i>	Associé à des cancers du cerveau et du système nerveux
Gènes codant des protéines du noyau	
<i>MTS1</i>	code la protéine p16, frein du cycle cellulaire. Associé à plusieurs cancers
<i>RB</i>	code la protéine RB, frein essentiel du cycle cellulaire. Associé aux cancers de la rétine, des os, de la vessie, du poumon, du sein
<i>p53</i>	code la protéine p53 capable d'induire l'apoptose. Associé à de nombreux cancers (dont celui du côlon)
<i>WT1</i>	Associé à la tumeur de Wilms du rein
Gènes codant d'autres protéines	
<i>BRCA-1</i>	Associé au cancer du sein et de l'ovaire
<i>BRCA-2</i>	Associé au cancer du sein
<i>VHL</i>	Associé au cancer des cellules rénales
ONCOGENES	
Gènes codant des facteurs de croissance ou leurs récepteurs	
<i>PDGF</i>	Code le facteur de croissance des plaquettes associé au gliome (cancer du cerveau)
<i>Erb-B</i>	Code le facteur de croissance de l'épiderme. Associé aux cancers du cerveau et du sein
<i>Erb-B2</i>	(aussi <i>HER-2</i> ou <i>neu</i>). Code un récepteur de facteur de croissance. Associé au cancer du sein, de l'ovaire, des glandes salivaires
<i>RET</i>	Code un récepteur de facteur de croissance. Associé au cancer de la thyroïde.
Gènes codant des relais cytoplasmiques dans les voies de stimulation	
<i>Ki-ras</i>	Associé aux cancers du poumon, de l'ovaire, du côlon , du pancréas
<i>N-ras</i>	Associé aux leucémies
Gènes codant des facteurs de transcription activant les gènes stimulant la croissance	
<i>c-myc</i>	Associé aux leucémies, cancers du sein, de l'estomac et du poumon
<i>N-myc</i>	Associé à des cancers du système nerveux et du cerveau
<i>L-myc</i>	Associé au cancer du poumon
Gènes codant d'autres molécules	
<i>Bcl-1</i>	(aussi <i>PRAD1</i>). Code la cycline D1, activatrice de la division cellulaire. Associé aux cancers du sein, du cou, et de la tête
<i>Bcl-2</i>	Code une protéine inhibitrice de l'apoptose. Associé aux lymphomes.
<i>MDM2</i>	Code un antagoniste de la protéine p53 induisant l'apoptose. Associé aux sarcomes et d'autres cancers

La phase de **promotion** voit le passage de la cellule initiée d'un état phénotypiquement normal, qui peut durer des années, à un état prolifératif. La promotion tumorale est une phase assez longue au cours de laquelle des événements non génotoxiques vont favoriser la prolifération de la cellule initiée, qui va alors être à l'origine d'un clone (lésion bénigne), puis d'une tumeur bénigne. De nombreux mécanismes épigénétiques contrôlant la multiplication cellulaire, l'apoptose et les communications intercellulaires sont impliqués et modulables par des facteurs endogènes (par exemple, hormones, facteurs de croissance) et exogènes (par exemple, nutriments, médicaments, xénobiotiques). Cette phase est réversible, tout au moins à ses débuts.

L'acquisition définitive de la malignité s'effectue au cours de la phase de **progression** tumorale, transition de la tumeur bénigne (peu agressive et localisée) à la tumeur cancéreuse. Cette étape irréversible consiste en l'accroissement de la taille de la tumeur, favorisé par le processus de néovascularisation, l'accumulation de nouvelles altérations génétiques dans les cellules tumorales et l'acquisition par ces cellules de la capacité à envahir d'autres organes ou tissus.

Le développement d'une lésion tumorale implique, en effet, le franchissement de barrières anatomiques : **invasion** du tissu normal adjacent, **migration** à travers le réseau vasculaire pour coloniser des organes à distance. L'invasion du tissu normal adjacent et les métastases dans d'autres organes à distance de la lésion primitive, sont les facultés essentielles des lésions cancéreuses, susceptibles de mettre en péril le pronostic vital.

Ce modèle multiphasique de cancérogenèse élaboré chez l'animal a été conforté par l'équipe de Weinberg (*Hahn et al., 1999*) qui est parvenue à faire évoluer *in vitro* des cellules épithéliales humaines normales (HEK) et des fibroblastes (BJ) en cellules cancéreuses. Le processus a été réalisé par l'introduction de deux gènes modifiés dans le génome de la cellule - un gène participant à l'inhibition des protéines RB et p53, l'autre à l'activation de la protéine Ras, ces protéines contrôlant le cycle cellulaire - et du gène hTERT induisant la production de la télomérase nécessaire à la prolifération cellulaire.

1.2.2. De la crypte normale aux lésions coliques cancéreuses

1.2.2.1. Epithélium colique sain

Le côlon humain ou gros intestin est un organe musculaire d'environ 150 cm de long qui s'étend de la valvule iléo-caecale au rectum (Figure 5). Il contribue à trois fonctions importantes de l'organisme : 1) la concentration des matières fécales par absorption d'eau et d'électrolytes, 2) l'entreposage et l'évacuation maîtrisée des selles, 3) la digestion et

l'absorption des aliments non encore digérés. Sur le plan fonctionnel, le côlon peut être divisé en deux parties séparées par le côlon transverse, soit le côlon droit et le côlon gauche. Le côlon droit (caecum et côlon ascendant) joue un rôle majeur dans l'absorption de l'eau et des électrolytes, de même que dans la fermentation des sucres non digérés; le côlon gauche (côlon descendant, côlon sigmoïde et rectum) intervient surtout dans l'entreposage et l'évacuation des selles.

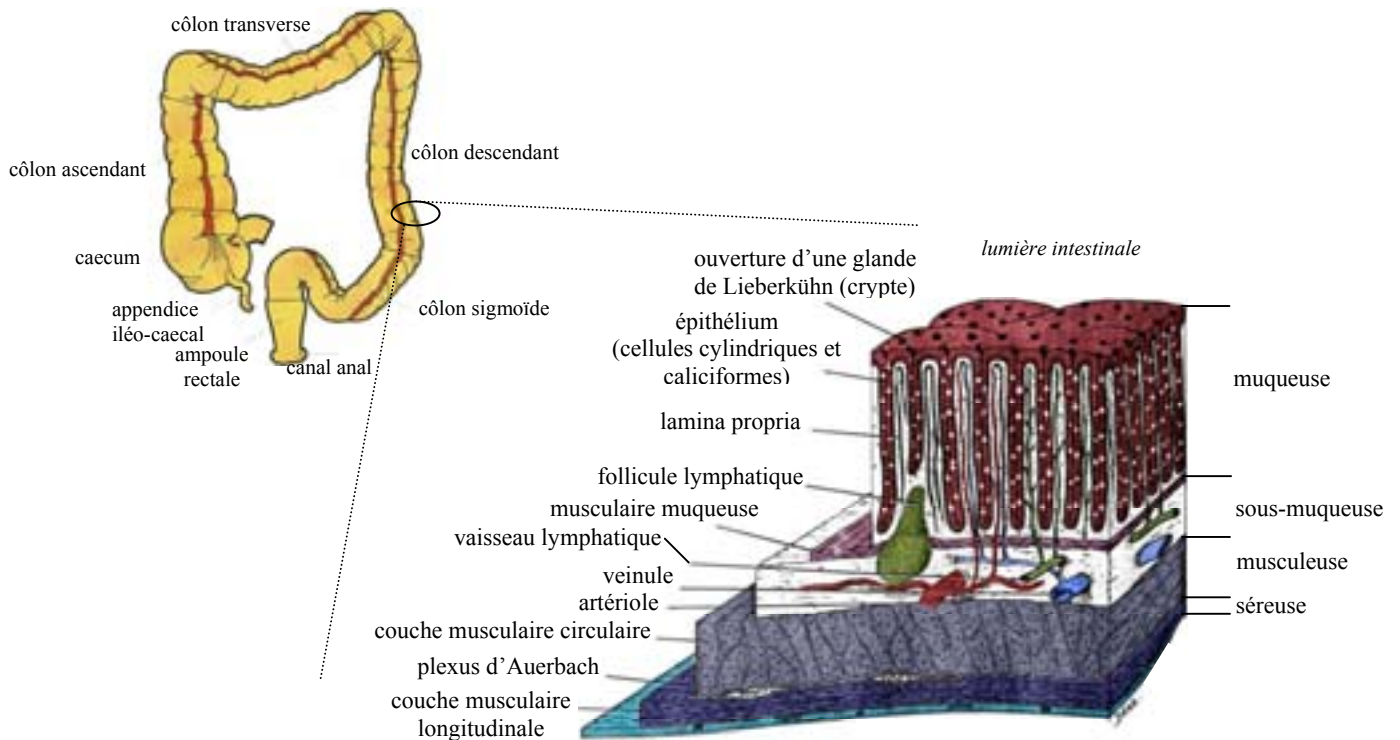


Figure 5. Anatomie du côlon humain et structure de la muqueuse colique
(d'après Scalon et Sanders, 1995)

Sa paroi comprend les quatre couches fondamentales présentes dans les autres organes creux du tube digestif - la muqueuse, la sous-muqueuse, la couche musculaire circulaire et la couche musculaire longitudinale - mais elle se distingue par plusieurs caractéristiques importantes (Figure 5). Ainsi, la muqueuse n'a pas les villosités trouvées dans l'intestin grêle et présente un aspect relativement lisse, mais elle est parsemée de nombreuses glandes de Lieberkühn ou cryptes qui s'ouvrent à sa surface.

L'épithélium colique est formé de cellules cylindriques absorbantes, et de cellules caliciformes sécrétant des mucines. Cet épithélium est en constant renouvellement : le fond de la crypte est constitué de cellules souches non différenciées qui prolifèrent, puis migrent

vers le haut du tubule tout en subissant un processus de différenciation, avant d'être éliminées dans la lumière colique (Figure 6).

Chez l'Homme, l'épithélium colique est complètement remplacé en quatre à huit jours. La muqueuse colique, vascularisée et innervée, est associée au réseau lymphatique.

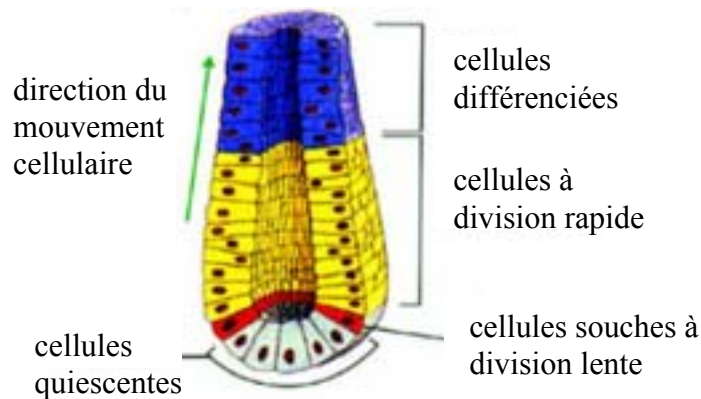


Figure 6. Illustration du renouvellement cellulaire au niveau d'une crypte colique

1.2.2.2. Adénomes et tumeurs malignes

La plupart des tumeurs bénignes colorectales sont représentées par des adénomes. Ces derniers naissent de la prolifération des cellules des cryptes de la muqueuse colique (Figure 7). Leur dédifférenciation peut atteindre 3 degrés de dysplasie : bas grade, grade modéré et haut grade. Les adénomes peuvent être sessiles (30% des cas) ou pédiculés (70%). Il en existe 3 types histologiques : tubuleux (75%), vilieux (5%) et tubulo-vilieux (20%). Des signes de malignité sont présents dans environ 30% des adénomes vilieux.

Le CCR peut se développer sur une muqueuse saine ou préférentiellement à partir d'une lésion (adénomes, polypose familiale ou maladies inflammatoires). Les tumeurs malignes coliques, souvent des épithéliomas glandulaires ou adénocarcinomes Lieberkünüens, peuvent être végétantes, ulcérées ou infiltrantes. La distribution de la topologie des cancers colorectaux dans les pays à haut risque est la suivante : 13% dans le caecum, 12% dans le côlon ascendant, 10% dans le côlon transverse, 11% dans le côlon descendant, 24% dans le sigmoïde et 30% dans le rectum.

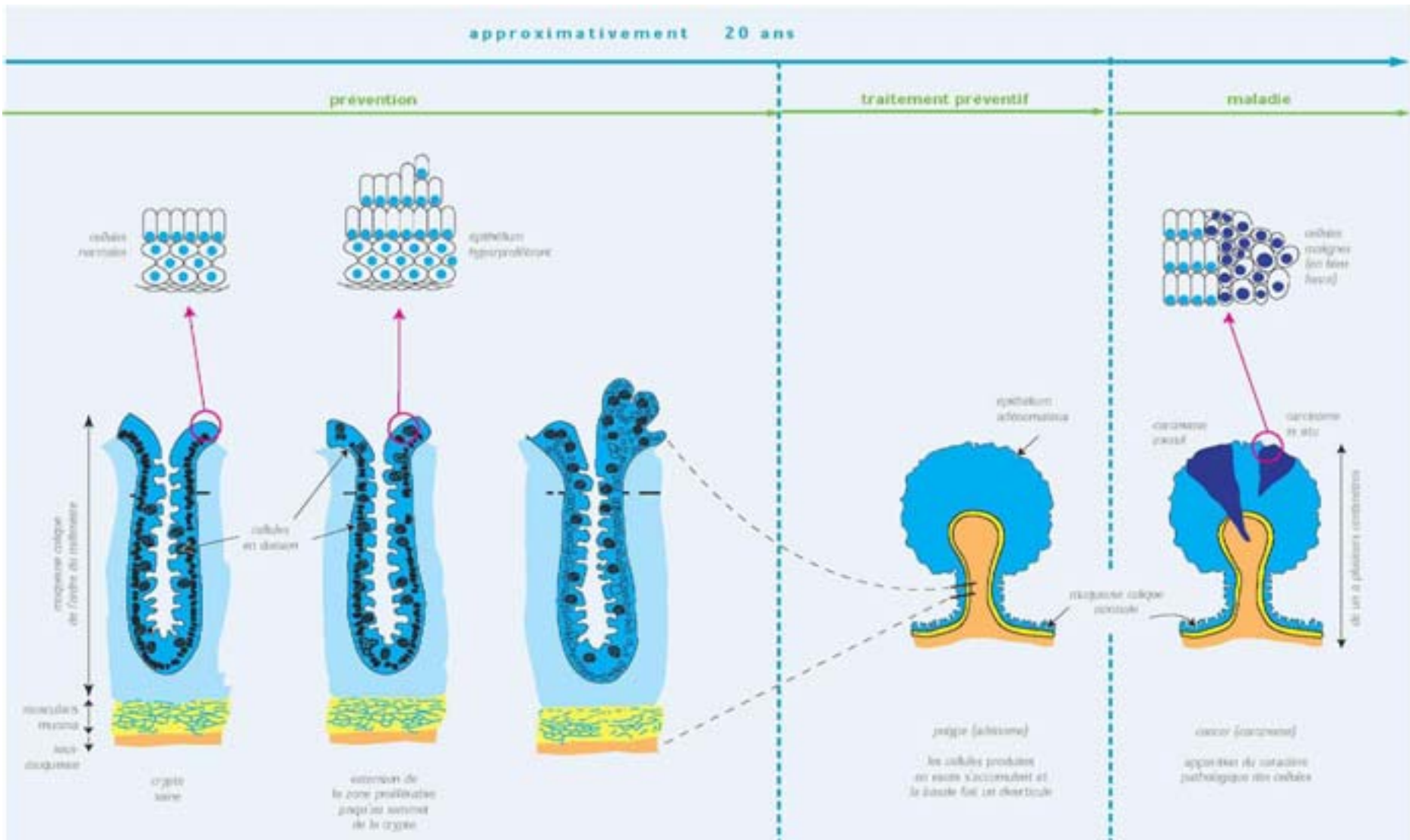


Figure 7. Principales étapes de la cancérogenèse colique (d'après Lipkin, 1974)

1.2.2.3. Le modèle adénome – carcinome

Le taux cumulé de CCRs est faible comparé à celui des adénomes, ce qui suggère que peu d'adénomes se transforment en tumeur maligne. Cependant, il a été observé qu'environ 80% des cancers du côlon gauche et du rectum et 50% des cancers du côlon droit étaient issus d'un adénome (*Bedenne et al., 1992*). De plus, il est estimé que 25% des gros adénomes (> 1 cm) se transformeront en cancer du vivant des sujets (*Faivre, 2001*).

Le modèle de filiation adénome – carcinome (*Hill et al., 1978*) est l'hypothèse admise aujourd'hui dans le processus de cancérogenèse colorectale. Celui-ci propose que la lésion initiale se développe en polype adénomateux qui évoluera ensuite en tumeur maligne. En 1990, Fearon et Vogelstein ont proposé une base moléculaire de la séquence adénome – carcinome, en décrivant un processus multiphasique au cours duquel les cellules coliques accumulent des altérations de multiples gènes parmi lesquels APC (Adenomatous Polyposis Coli), k-Ras, SMAD2, SMAD4 et p53.

Si le modèle initial de Fearon et Vogelstein identifiait les gènes mutés, l'exacte séquence de ces modifications n'était pas spécifiée. Or, il semble qu'un ordre dans les événements moléculaires soit observé dans les modèles expérimentaux chez l'animal (*Arends, 2000*) (Figure 8).

Le gène codant pour APC est précocément et fréquemment muté au cours de la cancérogenèse colorectale (plus de 80% des cas). Ce gène suppresseur de tumeur appartient à la voie de signalisation de Wnt. La protéine APC, en s'associant avec la GSK3 β et l'axine/conductine régule le pool cytosolique de β caténine, facteur de transcription impliqué dans l'expression des gènes codant pour c-myc et pour la cycline D1. Il semble d'ailleurs que dans la minorité des CCRs ne présentant pas de mutations d'APC, on trouve des mutations touchant le gène de la β caténine ou celui de l'axine/conductine. Une mutation du gène k-Ras peut aussi être le premier événement génétique à l'origine de la tumorigenèse : on retrouve des mutations dans 57% des foyers de cryptes aberrantes (FCA) dysplasiques et dans 80% des FCA non dysplasiques (*Takayama et al., 1998*). Ce proto-oncogène est en particulier impliqué dans la voie de signalisation EGFR-RAS-RAF-ERK-JUN/FOS stimulant la prolifération cellulaire. De récentes découvertes ont mis en exergue les interactions de k-Ras avec d'autres molécules impliquées dans le modèle séquentiel adénome-carcinome : c-myc (*Yeh et al., 2004*), p53 via p19^{ARF} (*Palmero et al., 1998*), SMAD2-4 (*de Caestecker et al., 1998*) et p27^{Kip1} régulée aussi par SMAD2-4 (*Kawada et al., 1997*). Les gènes codant pour SMAD4 et SMAD2 sont également souvent mutés au cours de l'évolution de l'adénome (*Eppert et al., 1996* ; *Moskaluk et al., 1996*) : les produits de ces gènes sont impliqués dans la voie de signalisation de TGF β (Transforming Growth Factor β) qui joue un rôle

fondamental dans la suppression de la prolifération cellulaire et l'activation des mécanismes d'apoptose (Becker et al., 2004).

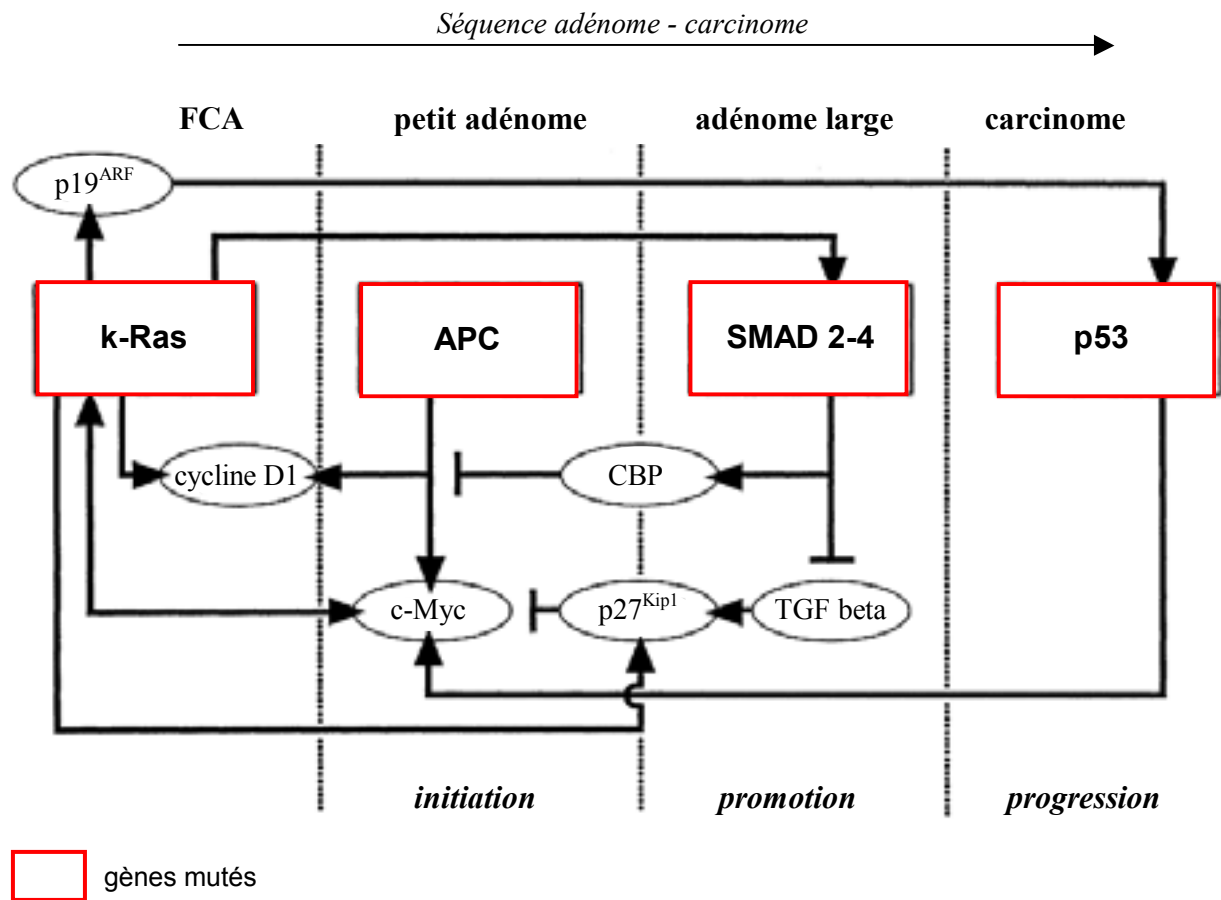


Figure 8. Mécanismes moléculaires impliqués dans le modèle de cancérogenèse colorectale de Fearon et Vogelstein
(d'après Arends, 2000)

Abréviations : APC : adenomatous polyposis coli; CBP : CREB (Cyclic AMP response element binding protein) binding protein; FCA : foyer de cryptes aberrantes; SMAD : mothers against decapentaplegic; TGF : transforming growth factor.

Enfin, des mutations inactivatrices du gène suppresseur de tumeur p53, contrôlant prolifération et apoptose et considéré comme «le gardien de l'intégrité du génome», se produisent tardivement, au cours de la progression.

Le modèle moléculaire de Fearon et Vogelstein, conforté par de nombreux travaux, révèle l'importance des voies de signalisation de Wnt et de TGFβ, ainsi que celle de l'acquisition successive des altérations, au cours de la survenue des CCRs sporadiques (Arends, 2000).

Ce modèle n'inclut cependant pas le rôle des gènes impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN (gènes MMR, MisMatch Repair, altérés dans 10% des CCRs sporadiques) ni les perturbations de la méthylation de l'ADN.

1.2.2.4. Prédispositions génétiques au développement du CCR

Si les CCRs sporadiques (auxquels on applique le modèle précédemment décrit) représentent plus de 80% des CCRs totaux, il existe aussi des formes issues de susceptibilités génétiques héréditaires (*de la Chapelle, 2004*). Deux formes héréditaires représentent moins de 5% des CCRs : il s'agit de la Polypose Adénomateuse Familiale (FAP, Familial Adenomatous Polyposis) et du syndrome de Lynch (HNPCC, Hereditary Non Polyposis Colon Cancer).

Les individus développant la FAP présentent toujours une mutation du gène APC tandis que le syndrome de Lynch est associé à des mutations des gènes MMR de la réparation: MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 (*Lynch et de la Chapelle, 2003*).

II. Alimentation et cancérogenèse colique

II.1. Les facteurs alimentaires modulent le risque de CCR

Dans le déterminisme des cancers interviennent à la fois des facteurs biologiques individuels (prédispositions génétiques, polymorphismes génétiques...) et des facteurs liés aux comportements individuels et à l'environnement (tabagisme, consommation d'alcool, habitudes alimentaires et nature/quantité des aliments ingérés, sédentarité, exposition à des produits chimiques, des virus...). Concernant les cancers sporadiques qui sont de loin les plus nombreux, les facteurs environnementaux et comportementaux jouent un rôle majeur.

Tableau II. Facteurs modulant l'apparition du cancer colorectal (WCRF, 2002)

Degré de certitude	Diminution du risque	Augmentation du risque
Convaincant	Activité physique Légumes	Excès calorique
Probable		Charcuteries Alcool
Possible	Fruits Fibres Amidon	Obésité et autres paramètres anthropométriques Tabagisme Sucre Farine de blé Graisse animale saturée Œufs Cuisson au barbecue, au grill, à la flamme
Insuffisant	Amidon résistant Calcium Caroténoïdes Vitamines C, D, E Folate Méthionine Céréales Thé vert	Sel et salaisons Cholestérol Lait et produits laitiers Café Aflatoxines

La recherche d'effets modulateurs de la cancérogenèse par les facteurs alimentaires a fait l'objet de nombreuses études épidémiologiques et expérimentales visant à mieux appréhender les conséquences de notre alimentation sur le risque de CCR. Le tableau II recense des facteurs susceptibles de moduler le risque de survenue du CCR. Ces facteurs sont classés suivant un 'degré de certitude' basé sur le nombre et la proportion d'études

montrant des résultats convergents. Globalement, ces études suggèrent l'existence d'une corrélation positive avec des apports excessifs en énergie fournie principalement par les matières grasses, des apports en viande et en sucre et une corrélation négative avec des apports en légumes, fruits, fibres ou amidon.

II.2. Les acides gras : composés modulateurs du risque de CCR

L'étude des conséquences d'une alimentation riche en lipides sur le risque de développement du CCR a fait l'objet de nombreux travaux. Si les données ne permettent pas toujours de conclure sur la relation acides gras – risque de cancer, elles n'excluent cependant pas un potentiel réel des acides gras à moduler le risque (Tableau II).

II.2.1. Etudes épidémiologiques et expérimentales

II.2.1.1. Acides gras à courtes, moyennes ou longues chaînes, acides gras trans, conjugués et mono-insaturés

- Acides gras à courtes chaînes (AGCC)

Parce que les acides gras à courtes chaînes sont le produit final majeur de la fermentation des fibres alimentaires dans le côlon, les études épidémiologiques s'intéressant en particulier au rôle de l'acide butyrique ont pour objectif principal de mieux comprendre le rôle protecteur des fibres (*Bingham et al., 2003*). Les études épidémiologiques réalisées dans les pays à haut risque de CCR ont révélé soit une prise alimentaire supérieure en butyrate soit une concentration plus forte de cet AGCC dans les fèces des individus sains comparés à ceux ayant développé adénomes ou CCRs (*Neoptolemos et al., 1988 ; Clausen et al., 1991*). Les études réalisées dans les pays à risque faible ont en général conclu à l'absence d'association entre butyrate et CCR (*O'Keefe et al., 1999*). Ceci s'explique principalement par des profils alimentaires et des flores bactériennes fermentaires coliques différents de ceux existant dans les pays industrialisés. Des effets bénéfiques du butyrate sont confirmés par les travaux expérimentaux (*Medina et al., 1998 ; Forest et al., 2003*).

- Acides gras à moyennes et longues chaînes

Peu d'auteurs se sont intéressés aux acides gras saturés, comprenant de 10 à 14 atomes de carbone, issus à la fois de l'alimentation et d'une synthèse de novo dans le tissu

mammaire (principalement acides laurique et myristique). Les rares travaux semblent mettre en évidence un effet promoteur (*Lee et al., 2001*) probablement indirect via leur contribution dans la synthèse des acides gras poly-insaturés (*Bartsch et al., 1999*). Aucune association n'a été montrée entre acides gras à longues chaînes (acides palmitique et stéarique) et CCR (*Slattery et al., 1997*).

- Acides gras trans

Les acides gras *trans*, formés durant l'hydrogénation des huiles végétales, semblent positivement associés au CCR (*Bakker et al., 1997; Le Marchand et al., 1997*). Cependant, ces observations, non seulement ne désignent pas précisément les acides gras *trans* impliqués, mais ne permettent pas non plus d'exclure que ces associations sont liées à des habitudes alimentaires telle la surconsommation d'acides gras et de sucres (*McKelvey et al., 1999*).

- Acides gras conjugués

Les effets bénéfiques des acides gras conjugués (comme l'acide linoléique conjugué, CLA) sur les cancers gastro-intestinaux ont principalement été observés *in vitro* (*Cho et al., 2003*) et sur les modèles animaux chimio-induits (*Park et al., 2001(a)*). A notre connaissance, aucune étude épidémiologique ou étude d'intervention humaine n'a été publiée à ce jour.

- Acides gras mono-insaturés

L'acide oléique est l'acide mono-insaturé prépondérant et le composant majeur de l'huile d'olive. Les données liant acide oléique et CCR restent peu convaincantes au regard des résultats divergents issus d'études épidémiologiques (*Stoneham et al., 2000; Nkondjock et al., 2003*) et expérimentales (*Takeshita et al., 1997; Calder et al., 1998*).

II.2.1.2. Acides gras poly-insaturés (AGPI)

Les acides gras poly-insaturés incluent les acides gras essentiels que sont l'acide linoléique (18:2 n-6) et l'acide α -linoléique (18:3 n-3) ainsi que leurs métabolites (Figure 9).

- AGPI série n-6

Dans une large majorité des études épidémiologiques, aucune association entre acide linoléique et CCR n'a été observée (*Willett et al., 1990; Giovannucci et al., 1994; Slattery et al., 1997; Pietinen et al., 1999; Terry et al., 2001; Nkondjock et al., 2003*). Une étude clinique a cependant révélé des modifications dans la composition en acides gras de la muqueuse colique au cours de la séquence adénome-cancer et a mis en évidence une diminution de la

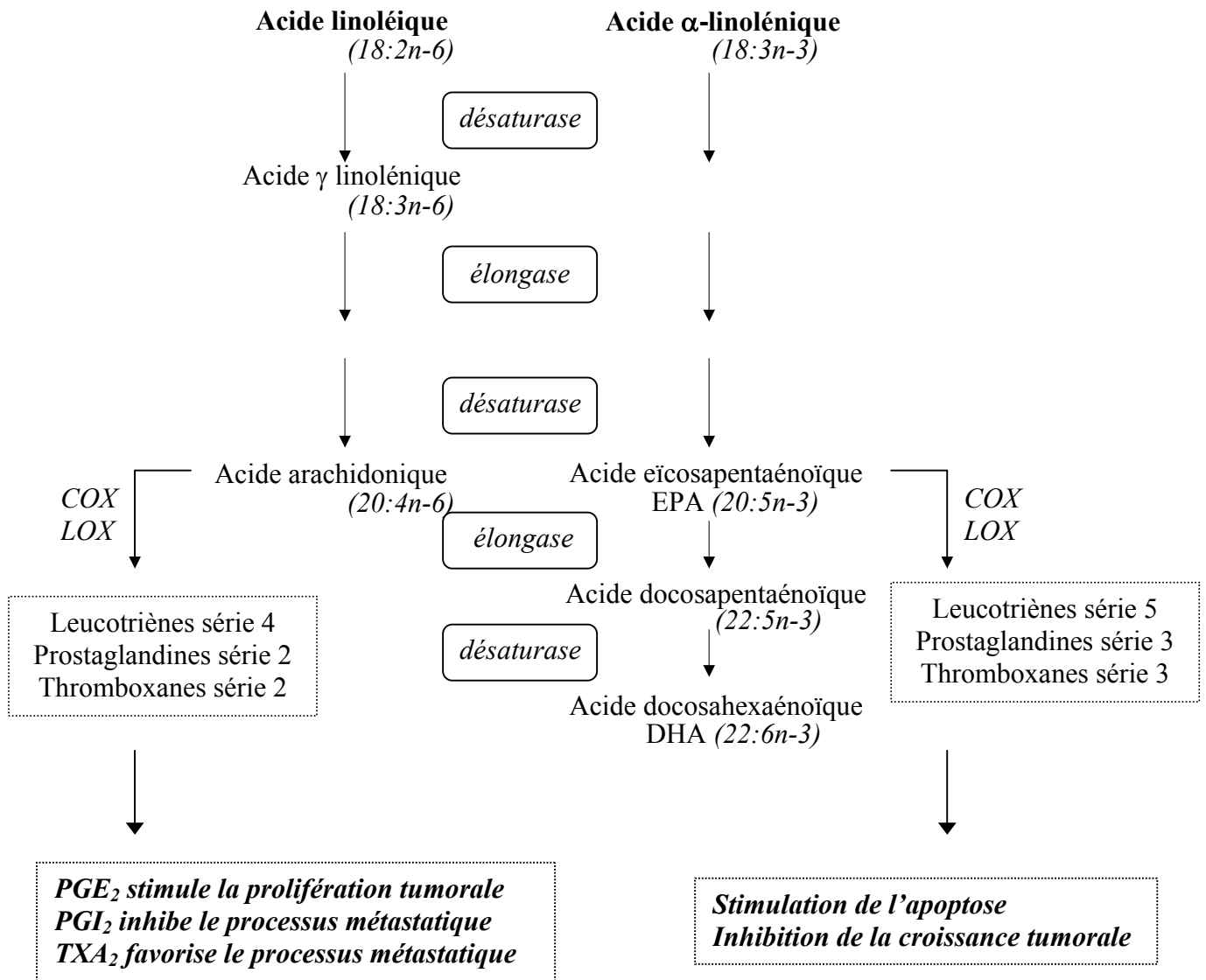


Figure 9. Voies métaboliques des AGPI n-3 et n-6 et effets potentiels sur le processus cancéreux (d'après *Roynette et al., 2004*)

Abréviations : COX : cyclooxygénase; LOX : Lipooxygénase; PG : prostaglandines; TXA : thromboxane.

concentration plasmatique en acide linoléique chez les patients atteints de CCR (*Fernandez-Banares et al., 1996*), résultat confirmé par l'étude de Baro et al. (1998).

Les études expérimentales fournissent des résultats variables et fonction de la teneur en acide linoléique des huiles utilisées. En effet, la consommation d'huiles de carthame (teneur en acide linoléique : 68-83%) et de germe de blé (55-60%) serait associée à une promotion de la cancérogenèse colique (*Wan et al., 2000; Dommels et al., 2003*) alors que celle des huiles de tournesol (69%), de soja (50-62%) et de sésame (39-47%) semble avoir des effets bénéfiques (*Meydani et al., 1991; Salerno et Smith, 1991*). Cependant, ces dernières ont fait l'objet de peu de travaux tandis que les huiles de carthame et de germe de blé sont régulièrement utilisées pour promouvoir la prolifération cellulaire et étudier, dans ce contexte, les mécanismes impliqués dans la promotion ou l'effet potentiellement protecteur de diverses molécules ou substances (*Ju et al., 2003; Delage et al., 2004*).

- AGPI série n-3

Sur 3 études cas-témoins (*Le Marchand et al., 1997; Slattery et al., 1997; Nkondjock et al., 2003*) et 3 études de cohorte (*Bostick et al., 1994; Pietinen et al., 1999; Terry et al., 2001*) ayant testé l'association entre la consommation en acide α -linoléique et le CCR, seuls Nkondjock et al. trouvent une diminution du risque de cancer avec des apports élevés en acide α -linoléique chez les femmes mais pas chez les hommes. L'étude menée par Baro et al. (1998) a cependant révélé une diminution significative de la concentration en acide α -linoléique dans le plasma de patients cancéreux. Fernandez-Banares et al. (1996) rapportent une quantité supérieure d'acide α -linoléique dans la muqueuse colique normale comparée à celle d'individus atteints par un adénome ou une tumeur maligne.

Les travaux expérimentaux réalisés *in vivo* montrent clairement un effet protecteur des AGPI n-3. L'incidence des tumeurs chimio-induites est significativement diminuée chez des animaux nourris avec des régimes riches en huile de poisson (riche en EPA et DHA) comparée à ceux nourris avec des régimes riches en acides gras saturés ou en AGPI n-6 (*Latham et al., 1999; Rao et al., 2001*). De la même façon, la consommation d'huile de périlla, riche en acide α -linoléique (65%), s'est révélée capable de réduire l'apparition de foyers de cryptes aberrantes chez des rats chimio-induits (*Onogi et al., 1996*).

II.2.2. Aspect quantitatif

II.2.2.1. Apport calorique

Il est difficile d'isoler le rôle propre de l'énergie de celui des aliments ayant un apport énergétique élevé comme les aliments riches en acides gras, principaux fournisseurs

d'énergie, d'autant plus que si la qualité des acides gras peut affecter la promotion tumorale, il en est de même pour leur quantité dans l'alimentation (Reddy, 1992).

Chez l'Homme, l'apport calorique ne semble pas impliqué dans l'apparition d'adénomes (Boutron-Ruault et al., 2001). Par contre, une méta-analyse réalisée sur 13 études cas-témoins révèle un effet dose-réponse de l'apport calorique sur le risque de CCR (Howe et al., 1997).

La sensibilité des modèles de cancérogenèse chimio-induite aux effets de la restriction calorique atteste de l'importance de la prise énergétique sur ce processus (Klurfeld et al., 1987; Reddy et al., 1987; Raju et Bird, 2003).

II.2.2.2. Obésité comme facteur de risque

L'obésité se définit par une accumulation excessive de tissu adipeux ayant des conséquences néfastes sur la santé. La mesure globale de l'obésité se détermine par l'indice de masse corporelle (IMC = poids/taille² en kg/m²) qui n'est cependant qu'une approximation imparfaite du pourcentage de matière grasse de l'organisme. La définition internationale de l'obésité tient compte des associations entre un IMC donné et le risque relatif de mortalité (Solomon et Manson, 1997).

Si surpoids et obésité sont des risques reconnus pour les maladies cardiovasculaires et le diabète de type II, le lien entre poids corporel et risque de cancer a été plus récemment établi. En effet, une étude prospective réalisée pendant 16 ans sur près de 900 000 américains a permis de mettre en évidence les effets du surpoids (25 <IMC< 29.9) et de l'obésité (IMC > 30) sur la survenue de 57 000 décès par cancer (Calle et al., 2003). Cette étude a mis en avant l'association entre un IMC élevé et l'augmentation de l'incidence de cancers au niveau de différents sites dont le côlon. Plusieurs études avaient déjà permis d'accumuler des preuves en faveur du lien obésité – CCR (Le Marchand et al., 1992; Giovannucci et al., 1995(a); Martinez et al., 1997). Un IMC élevé est responsable d'une augmentation du risque de survenue de gros adénomes (Boutron-Ruault et al., 2001). Le CIRC a reconnu le caractère préventif du maintien d'un poids normal (18.5 <IMC< 24.9) vis-à-vis du CCR (CIRC, 2002).

II.2.3. Limites et difficultés dans l'interprétation des données

Si la relation acides gras-cancer est très complexe, sa mise en évidence est d'autant plus difficile que l'interprétation des données est hardue.

II.2.3.1. Modèles animaux

Les conséquences de la consommation en acides gras alimentaires sur des modèles de cancérogenèse artificiellement induite, dépendent aussi du modèle animal utilisé. Par

exemple, il a été observé qu'une consommation en AGPI n-6 et en acides gras saturés augmentait significativement la croissance tumorale chez des rats F344 mais pas chez des Sprague-Dawley (*Zhao et al., 1991*).

II.2.3.2. Les effets peuvent dépendre du moment d'exposition

Depuis les travaux de Bull et al. (1979), il semblait acquis que les acides gras alimentaires modulaient principalement l'étape de promotion du processus de cancérogenèse colique. En effet, ils démontraient que l'ingestion d'un régime hyperlipidique après induction chimique de la cancérogenèse colique augmentait l'incidence des tumeurs chez les rats alors qu'il n'en était rien si le régime était administré pendant ou avant l'induction. Une étude récente démontre au contraire que les acides gras alimentaires altèrent déjà l'expression de gènes au cours de l'étape d'initiation (*Davidson et al., 2004*).

II.2.3.3. Interactions alimentaires

Les difficultés dans l'interprétation des résultats issus des travaux épidémiologiques et expérimentaux découlent en partie des interactions entre aliments ou composants alimentaires.

Une étude révèle en particulier que les effets bénéfiques de la consommation de butyrate dépendent pour partie des autres types d'acides gras contenus dans l'alimentation (*Nichenametla et al., 2004*).

Il a été proposé que le rapport AGPI n-3/AGPI n-6 présent dans l'alimentation pourrait contribuer à moduler le risque de CCR (*Hendrickse et al., 1994*). Il est recommandé que le rapport 18:2 n-6/18:3 n-3 tende vers 5 (*Legrand et al., 2000*). Il existe en effet une compétition entre AGPI n-3 et AGPI n-6 pour leur conversion métabolique par les diverses élongases et désaturases. Une plus haute affinité de ces enzymes pour les AGPI n-3 conduit à une inhibition compétitive du métabolisme des AGPI n-6 (*Roynette et al., 2004*). Ainsi, si on considère que la biosynthèse *de novo* de l'acide arachidonique (AA) et de ses métabolites (en particulier, la PGE₂, prostaglandine E₂) contribue significativement à la croissance tumorale, des modulations de cette cascade pourrait inhiber la cancérogenèse. En effet, McEntee et Whelan (2002), révèlent que les effets anti-tumorogéniques de l'EPA (n-3) sont dus à l'inhibition du métabolisme de l'acide linoléique (n-6), en amont de la formation de l'AA puisque ces effets sont annihilés par l'ajout concomitant d'AA à l'EPA.

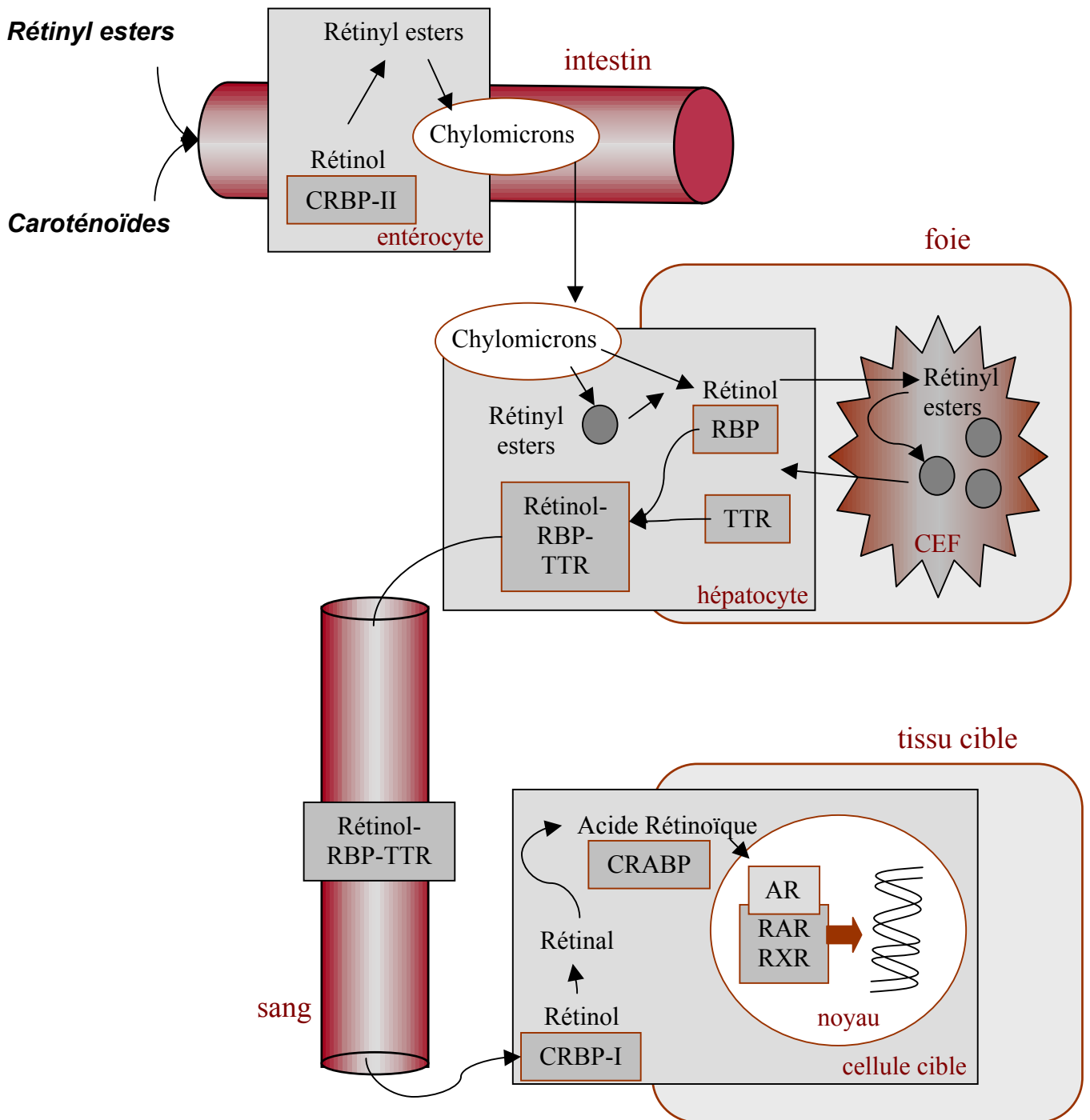


Figure 10. Métabolisme général de la vitamine A
(d'après *Bellovino et al.*, 2003)

Abréviations : AR : acide rétinoïque; CRABP : cellular retinoic acid binding protein; CRBP : cellular retinol binding protein; RBP : retinol binding protein; TTR : transthyrétine; RAR : retinoic acid receptor; RXR : retinoic X receptor.

II.3. La vitamine A : composé alimentaire protecteur potentiel du cancer colorectal

II.3.1. Généralités

La vitamine A, nutriment indispensable à la vie, exerce des rôles fondamentaux dans le développement embryonnaire, la spermatogenèse, la vision et la différenciation cellulaire (Wald, 1968; De Luca, 1991; Eskild et al., 1994). La vitamine A est apportée à l'organisme sous forme d'esters de rétinol par des produits d'origine animale (huile de foie de poisson, beurre, lait, fromages, œufs) et sous forme de β -carotène par une large variété de produits d'origine végétale (carottes, épinards, choux...).

Le métabolisme de la vitamine A peut se diviser en trois grandes étapes (Figure 10): l'absorption intestinale, le métabolisme hépatique (mise en réserve), la mobilisation de la vitamine A avant son transport jusqu'aux tissus cibles. Ces différentes étapes ont été largement décrites par Blaner (1994), Harrison et Hussain (2001), Bellovino et al. (2003), Li et Tso (2003), Marill et al. (2003). Dans la cellule cible, un métabolisme oxydatif donne lieu à la production, à partir du rétinol, de rétinol qui peut ensuite être converti de manière irréversible en acide rétinoïque (AR) (Figure 11).

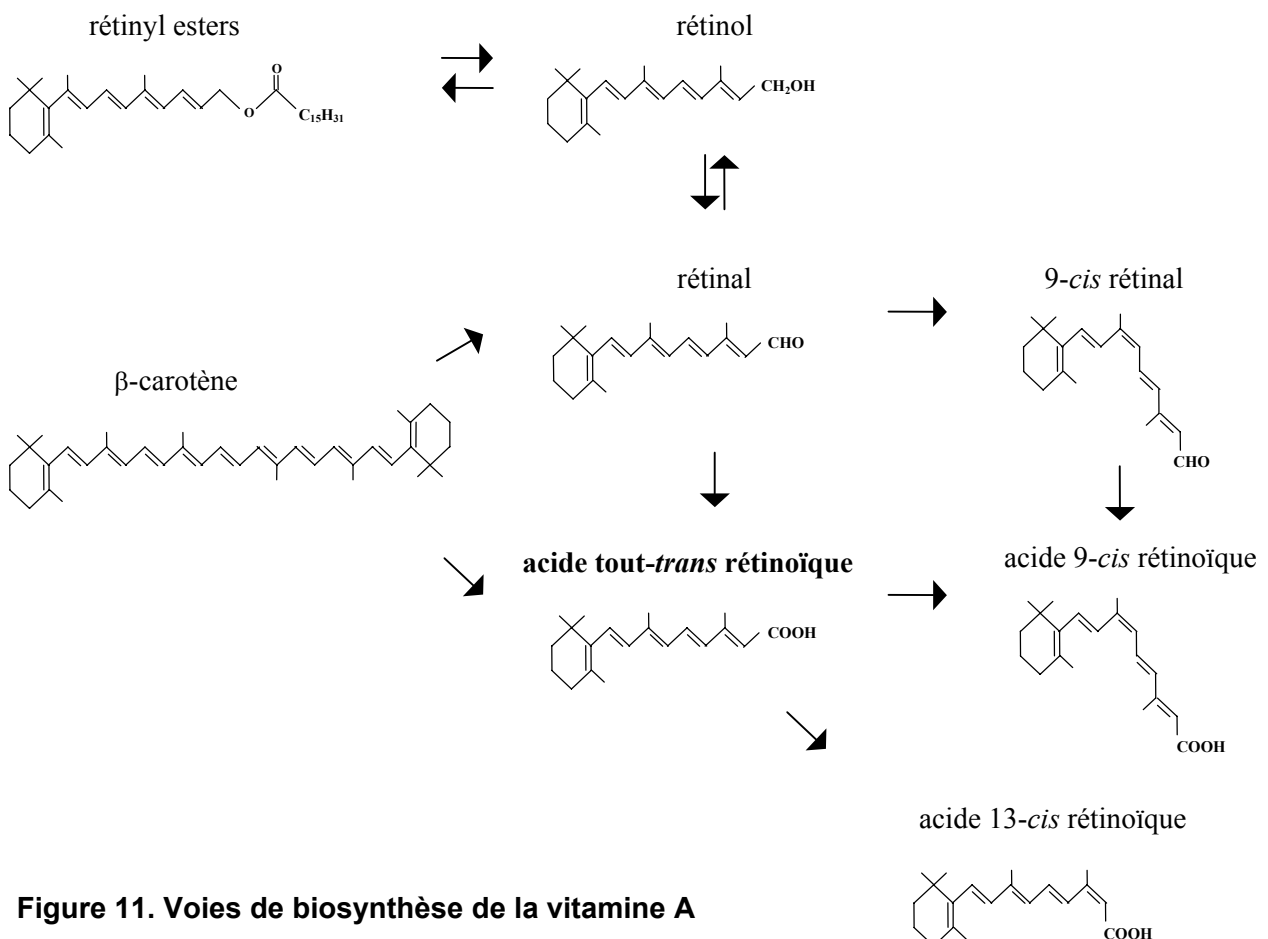


Figure 11. Voies de biosynthèse de la vitamine A

II.3.2. Vitamine A et CCR

La première mise en évidence du rôle des rétinoïdes, regroupant dérivés naturels et synthétiques de la vitamine A, a été rapportée en 1925 lorsque la vitamine A s'est avérée indispensable au maintien de l'homéostasie des cellules épithéliales (*Wolbach et Howe, 1925*). L'association entre déficience en vitamine A et lésions à différents sites épithéliaux a révélé l'intérêt des rétinoïdes dans la prévention du cancer (*Hong et Itri, 1994*). De plus, il a été observé un taux sérique significativement diminué chez des patients atteints de CCR par rapport à des individus sains (*Hronek et al., 2000*).

Les études épidémiologiques ayant pour objectif d'évaluer le potentiel protecteur du β -carotène n'ont rapporté aucun effet significatif sur les adénomes récurrents (*Greenberg et al., 1994; MacLennan et al., 1995; Malila et al., 1999; Albanes et al., 2000*). Cependant, chez l'Homme, seulement 1/6 du β -carotène est converti en vitamine A dans l'organisme. Une étude réalisée sur des patients avec un risque élevé de CCR a révélé les capacités immuno-modulatrices de la vitamine A via l'augmentation des cellules lymphocytaires T lors d'une supplémentation en β -carotène (*Kazi et al., 1997*).

Parmi les études qui ont examiné la relation vitamine A/CCR, peu d'entre elles suggèrent un effet protecteur du nutriment. Deux études cas-témoin ont mis en évidence une relation entre l'absorption de vitamine A et une diminution du risque de développement de CCR mais aucune association avec le rétinol (*Benito et al., 1993; Olsen et al., 1994*). Au contraire une autre étude prospective a révélé que la prise de rétinol était inversement associée au cancer du côlon, mais pas à celui du rectum (*Ferraroni et al., 1994*).

Les données fournies par les travaux expérimentaux démontrent clairement un effet protecteur de la vitamine A. Il a été observé que la supplémentation en palmitate de rétinol pouvait prévenir l'apparition de carcinomes coliques chez des rats consommant une alimentation contenant l'aflatoxine B1 (*Newberne et Rogers, 1973*). De plus, dans des modèles de cancérogenèse colique chimio-induite, le traitement des animaux avec l'acétate ou le palmitate de rétinol a conduit à une réduction du nombre de cryptes aberrantes (*Cassand et al., 1997*) et d'adénocarcinomes (*Zheng et al., 1997*).

L'acide rétinoïque tout-*trans* (ATRA, connu aussi sous les noms de trétinoïne et vasanoïde) est, avec l'acide rétinoïque 9-*cis*, un métabolite actif de la vitamine A. De nombreuses revues attestent de la capacité des rétinoïdes, et plus particulièrement de l'ATRA, à moduler la croissance cellulaire et le phénomène de mort cellulaire programmé et à induire la différenciation (*Kanungo et al., 2000; Nakagawa et al., 2003; Zhang et al., 2003*). Cette forme

acide de la vitamine A est déjà utilisée de façon usuelle dans le traitement de maladies spécifiques que sont l'acné, le psoriasis et la leucémie promyélocytaire aiguë (APL). De plus, les propriétés anti-tumorales de ce composé sont en cours d'exploitation. En effet, quelques études à court terme ont déjà été réalisées dans le but d'explorer le potentiel chimiopréventif des rétinoïdes chez des individus à haut risque de cancer (*Sun et Lotan, 2002; Brtko et Thalhamer, 2003*). Cependant, aucune d'entre elles n'a concerné des individus à haut risque de CCR. Pourtant, l'acide rétinoïque (AR) diminue le nombre de cryptes aberrantes chimio-induites (*Stopera et Bird, 1993*). Cependant, il n'est pas apte à prévenir les mutations de k-Ras induites par les cancérogènes coliques chimiques ou par l'acide déoxycholique (*Narahara et al., 2000*). Des travaux *in vitro* sur des lignées issues d'adénocarcinomes coliques confirment l'effet anti-tumoral de l'AR (*Kim et al., 2002 ; Bartolini et al., 2004*). L'AR semble aussi apte à réduire les capacités invasives des cellules tumorales (*Adachi et al., 2001*). Des essais réalisés *in vitro* suggèrent que des combinaisons de l'AR avec des agents cytotoxiques ou anti-mitotiques permettraient d'améliorer l'efficacité de la prévention et des traitements anti-tumoraux (*Paulsen et Lutzow-Holm, 2000 ; Callari et al., 2003*).

II.4. Mécanismes d'interaction alimentation / cancérogenèse colique

II.4.1. Généralités

Les données épidémiologiques et expérimentales montrent que l'alimentation est à la fois source d'éléments activateurs et protecteurs vis-à-vis du CCR. Un ensemble de données issues des études expérimentales *in vitro*, chez l'Homme et chez l'animal, révèlent qu'il existe différents niveaux d'intervention des facteurs alimentaires et suggèrent différents mécanismes d'interaction possibles entre l'alimentation et le processus de cancérogenèse colique.

L'alimentation peut être appréhendée à différents niveaux d'intégration : en effet, la cellule cible du processus de tumorigenèse est la cellule épithéliale colique. L'alimentation peut moduler des événements extra-cellulaires et intra-cellulaires, soit directement par la lumière intestinale, soit indirectement après absorption intestinale et métabolisation hépatique par la circulation sanguine et lymphatique. Les événements modulés peuvent être d'ordre physiologiques, biochimiques, cellulaires et moléculaires, les uns pouvant être la conséquence des autres. Ces événements peuvent intervenir à différents niveaux du processus de cancérogenèse colique, initiation, promotion ou progression tumorale. Enfin, les effets de l'alimentation peuvent être ceux d'un mélange alimentaire complexe ayant subi des

traitements technologiques, d'un aliment entier mais seul ou de certains constituants isolés d'un aliment.

Les mécanismes d'action de l'alimentation vis-à-vis de la cancérogenèse colique peuvent donc être multiples (*Potter, 1996; Lipkin et al., 1999*).

L'alimentation peut modifier des paramètres physiologiques et biochimiques de la digestion. En premier lieu, le régime va directement moduler la biodisponibilité des éléments cancérogènes ou anti-cancérogènes qu'il contient en modifiant l'absorption intestinale, via le temps de transit ou des phénomènes de piégeage. De plus, des composés alimentaires, ou certains types de facteurs comme la quantité d'aliments ingérés, peuvent modifier la population bactérienne, sa fermentation et ses activités enzymatiques et moduler la vitesse de transit, la masse fécale, le pH, le renouvellement cellulaire et des paramètres immunologiques. Un autre aspect est la régulation de la production des acides biliaires par les facteurs alimentaires.

L'alimentation peut également modifier des paramètres cellulaires et moléculaires de la cancérogenèse colique. Les facteurs alimentaires peuvent moduler une grande partie des mécanismes intervenant dans le déroulement du processus tumoral, tout d'abord par la modification du métabolisme endogène, au niveau hépatique ou colique, via la modulation des activités enzymatiques de phase I et II impliquées dans l'équilibre toxification/détoxification des xénobiotiques. Ensuite, les composés alimentaires peuvent avoir une action sur la formation de lésions génotoxiques. Les métabolites actifs de certains éléments peuvent induire des lésions de l'ADN, d'autres composés au contraire peuvent protéger les sites nucléophiles de l'ADN ou éliminer des espèces chimiques réactives telles les radicaux libres oxygénés (ROIs pour Reactive Oxygen Intermediates). Enfin, l'alimentation est également susceptible de moduler la croissance cellulaire en régulant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation ou l'apoptose.

Bruce et al. (*2000(a) et (b)*) impliquent principalement deux mécanismes majeurs reliant l'alimentation et l'augmentation du risque de CCR : le déclenchement d'une résistance tissulaire vis-à-vis de l'insuline et des altérations de la barrière épithéliale.

- Une surconsommation alimentaire chronique va engendrer une élévation de la production d'insuline et un excès d'énergie au niveau de tissus dont certains (tissus adipeux, muscles) vont réagir en réduisant leur réponse à l'insuline. Les cellules coliques expriment des récepteurs à l'insuline et à l'Insuline-like Growth Factor -I et -II (IGF-IR et -IIR). L'hyperinsulinémie et l'hypertriglycéridémie, via ces récepteurs, agissent comme des facteurs de croissance et des promoteurs de tumeur (*McKeown-Eyssen, 1994 ; Durai et al., 2005*). Cependant, si le taux élevé d'insuline et l'augmentation de l'énergie intracellulaire fournissent un stimulus pour la prolifération, il est plus probable qu'ils interviennent sur le cycle cellulaire

des cryptes aberrantes plutôt que sur celui des cryptes normales. De plus, l'augmentation de l'énergie intracellulaire conduit à une plus grande disponibilité de substrats oxydables donc à la formation de ROIs aptes à créer des dommages à l'ADN augmentant la fréquence des mutations et donc la possibilité d'initiation.

- Des altérations de la barrière épithéliale peuvent conduire à une irritation qui produit une réponse inflammatoire locale. La surexpression de la cyclooxygénase-2 et la production d'écicosanoïdes activent des cellules inflammatoires capables de générer des ROIs qui sont mutagènes. Une autre possibilité est la création d'un déséquilibre ionique lors d'altérations de la barrière épithéliale générant un stress oxydatif et la production de ROIs. Les ROIs, en plus de leur effet mutagène, peuvent activer la cyclooxygénase-2 et ainsi promouvoir la cancérogenèse via la production de prostaglandines. Les ROIs peuvent aussi activer les MAP kinases et augmenter l'expression des proto-oncogènes comme c-fos et c-jun (Wei, 1992).

II.4.2. Acides gras alimentaires, vitamine A et modulation du risque de cancer colorectal : mécanismes possibles

Les relations de cause à effet entre les acides gras alimentaires et la modulation du risque de CCR s'expliquent en grande partie par des effets propres aux AGPI n-3 et n-6 décrits par Bartsch et al. (1999) :

-la peroxydation des doubles liaisons conjuguées des AG conduisant à un stress oxydatif persistant et générant des produits tels le malondialdéhyde capable d'endommager l'ADN,

-la conversion de l'acide linoléique en écicosanoïdes participant à la stimulation de la prolifération cellulaire,

-les effets sur la fonctionnalité de certaines enzymes associées aux membranes comme le complexe P450 régulant le métabolisme des xénobiotiques,

-les effets sur la composition des membranes et les conséquences sur la fonctionnalité des récepteurs aux hormones et facteurs de croissance,

-l'influence des AG sur diverses voies de transduction du signal pouvant affecter diverses fonctions cellulaires via la modification de l'expression de gènes.

De part leur nature lipophile, les **acides gras alimentaires** mais aussi la **vitamine A** sont capables de pénétrer à l'intérieur de la cellule et de se fixer à des récepteurs dans le noyau. Ces récepteurs nucléaires permettent la transmission du message 'hormonal' puisque ce sont des facteurs de transcription capables de moduler l'expression de gènes cibles.

Chapitre I : Données Bibliographiques

Ainsi, certains acides gras alimentaires, leurs dérivés et l'acide rétinoïque peuvent lier spécifiquement des récepteurs nucléaires qui seront les médiateurs de leurs effets sur l'expression de gènes cibles.

Cet aspect de l'action des nutriments fait l'objet du sous-chapitre suivant qui rapportera, pour une large partie, l'état des travaux liant les récepteurs nucléaires et la modulation du risque de cancer colorectal.

III. Les récepteurs nucléaires et leur implication dans la cancérogenèse colique

III.1. La superfamille des récepteurs nucléaires

Deux systèmes hormonaux principaux sont rencontrés dans les cellules : (i) les hormones hydrophiles qui ne traversent pas la membrane cellulaire et se lient à des récepteurs membranaires, en déclenchant une cascade biochimique de seconds messagers, (ii) les hormones lipophiles, capables de traverser la membrane cellulaire, et qui vont agir directement dans le noyau, en se liant à des récepteurs spécifiques.

Des données bibliographiques ont permis d'établir que les hormones stéroïdiennes, thyroïdiennes et les rétinoïdes agissent dans les cellules cibles principalement par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires pour réguler la synthèse d'ARN messagers spécifiques. Les récepteurs nucléaires sont des protéines capables de se fixer, généralement sous forme de dimères, au niveau de séquences spécifiques d'ADN, appelées éléments de réponse aux hormones (HRE, Hormone Response Element), situées en amont du promoteur de gènes cibles et de moduler ainsi, en tant que facteurs de transcription, leur expression (*Mangelsdorf et Evans, 1995*). Les premiers récepteurs nucléaires clonés furent ceux des glucocorticoïdes (*Hollenberg et al., 1985 ; Miesfield et al., 1986*) et des œstrogènes (*Green et al., 1986*). Les études phylogénétiques ont permis de montrer la forte homologie de structure entre ces protéines et de les regrouper en une même superfamille de récepteurs nucléaires. Elle comprend des récepteurs pour différents ligands hydrophobes tels que les stéroïdes, les hormones thyroïdiennes, les dérivés hydroxylés de la vitamine D, l'acide rétinoïque (ce qui justifie d'assimiler les formes actives de la vitamine A et de la vitamine D à des hormones du point de vue de leur mode d'action) ou encore les acides gras et les éicosanoïdes. En plus de ces récepteurs dont les ligands sont connus, de nombreux travaux de clonage ont permis d'identifier des gènes inconnus jusqu'alors et homologues aux gènes codant pour les récepteurs nucléaires. Les ligands des protéines codées par ces gènes n'étant pas encore connus, ces récepteurs ont été regroupés sous le terme de récepteurs orphelins. Pour certains d'entre eux, des ligands ont récemment été trouvés (*Laudet et Vanacker, 1999*) (Figure 12).

La famille des récepteurs nucléaires, pour laquelle plus de 300 séquences ont été décrites, constitue ainsi la plus grande famille de facteurs de transcription connue chez les eucaryotes. Mangelsdorf et Evans (*1995*) ont divisé cette superfamille de récepteurs en quatre

classes en accord avec leurs propriétés de liaison au ligand, de liaison à l'ADN et de dimérisation. La première classe comprend les récepteurs des hormones stéroïdiennes (récepteurs des glucocorticoïdes, androgènes, œstrogènes, minéralocorticoïdes et progestérone). Les récepteurs qui forment des hétérodimères avec les RXRs (récepteurs de l'acide 9-*cis* rétinolique), forment la deuxième classe. Les classes III et IV regroupent des récepteurs qui se distinguent selon qu'ils se fixent à l'ADN sous forme d'homodimères ou de monomères. La plupart des récepteurs orphelins appartiennent à ces deux sous-familles (*Mangelsdorf et Evans, 1995; Giguere, 1997*). Très récemment, une totale réorganisation de cette classification a été proposée avec pour objectif de clarifier la situation des nombreux récepteurs au sein de cette superfamille (*Nuclear Receptor Committee, 1999; Duarte et al., 2002*).

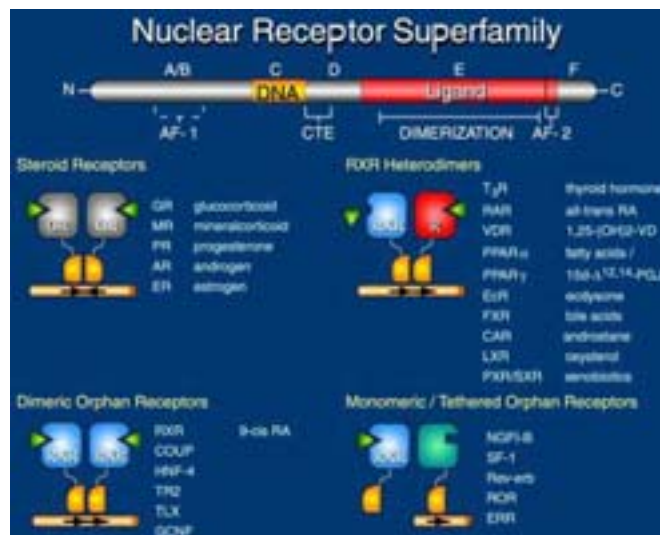


Figure 12. Structure et organisation de la superfamille des récepteurs nucléaires
(d'après *Olefsky, 2001*)

Abréviations : AF : région portant la fonction de l'activation dépendante ou non de la présence du ligand; CTE : constitutive transport element; GR : récepteur des glucocorticoïdes; MR : récepteur des minéralocorticoïdes; PR : récepteur de la progestérone; AR : récepteur des androgènes; ER : récepteur de l'œstrogène; T₃R : récepteur de la triiodothyronine; RAR : récepteur de l'acide rétinolique tout-*trans*; VDR : récepteur de la vitamine D₃; PPAR : récepteur des activateurs de prolifération peroxysomale; EcR* : récepteur de l'exdysone; FXR* : récepteur des acides bilières; CAR* : récepteur de l'androstane; LXR* : récepteur de l'oxystérol; PXR/SXR* : récepteurs de xénobiotiques; RXR : récepteur de l'acide 9-*cis* rétinolique; divers récepteurs orphelins dont ERR : récepteur apparenté au récepteur de l'œstrogène, HNF-4 : facteur nucléaire mis en évidence dans l'hépatocyte, TR2 : récepteur testiculaire.

*anciens récepteurs orphelins dont les ligands ont été identifiés récemment

III.1.1. Structure générale

Les récepteurs nucléaires présentent une forte homologie de structure, avec quatre domaines principaux possédant divers degrés de conservation entre les différents membres de la superfamille (Figure 12).

Le domaine A/B

Ce domaine, impliqué dans la transactivation de manière indépendante du ligand, est faiblement conservé et correspond à l'extrémité NH₂ de la protéine codée (Nagpal et al., 1992).

Le domaine C

Ce domaine de liaison à l'ADN, de 66 à 68 acides aminés, montre un fort degré d'homologie entre les différents membres de la superfamille. Deux motifs en doigt de zinc (C_I et C_{II}), composés chacun d'un atome de zinc chélaté par quatre résidus cystéine, jouent un rôle complémentaire dans les processus de liaison spécifique aux éléments de réponse situés dans le promoteur des gènes cibles (Mignotte, 1997). Ce domaine participe aussi à la dimérisation des récepteurs (Hirst et al., 1992).

Le domaine D

Cette région charnière entre les domaines C et E permet la réalisation de différentes configurations fonctionnelles et pourrait être impliquée dans la localisation nucléaire des récepteurs (élément CTE, Constitutive Transport Element)(Ylikomi et al., 1992).

Le domaine E

Le domaine carboxy-terminal possède une structure complexe, la plus longue en acides aminés. Il assure la fixation du ligand mais intervient également dans la dimérisation et la régulation de la transcription dépendante de ce ligand. La partie centrale du domaine E riche en leucine serait destinée à la dimérisation (modèle "leucine-zipper"), alors que la régulation de la transcription serait assurée par un domaine dénommé Ti. En fait la partie du domaine E qui est impliquée dans la liaison du ligand est très conservée entre récepteurs ayant la même spécificité de liaison mais elle ne possède pas de similarité apparente entre les récepteurs de différents types. A l'inverse le domaine Ti montre une conservation de 20 à 45 % entre tous les récepteurs (O'Donnell et Koenig, 1990).

Le domaine F

Certains récepteurs possèdent aussi ce domaine dont la taille est variable et la fonction encore inconnue.

III.1.2. Mode d'action

III.1.2.1. Les éléments de réponse

Les éléments de réponse aux hormones (HRE) regroupent plusieurs types selon le récepteur responsable de l'activation de la transcription (par exemple, GRE pour Glucocorticoid Response Element, PPRE pour Peroxisome Proliferator Response Element, RARE pour Retinoic Acid Response Element..). Leur structure est généralement basée sur un même principe : deux demi-sites, pour la plupart hexanucléotidiques, dérivés d'une séquence consensus qui leur est propre et combinés de manière palindromique ou directement répétée (Direct Repeat, DR) mais parfois plus complexe, séparés de 1 à 5 nucléotides ou bien strictement contigus. Plusieurs motifs peuvent répondre à un même récepteur nucléaire, mais la liaison sera plus ou moins favorisée et la transcription sera régulée différemment.

La liaison de certains récepteurs tels les PPARs et les RARs (Figure 12) à leurs éléments de réponse respectifs nécessite la formation d'hétérodimères avec un autre membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, les RXRs (*Rastinejad, 2001*). Ces derniers, dont le ligand est l'acide 9-*cis* rétinolique constituent les coactivateurs communs de nombreux récepteurs nucléaires et jouent ainsi un rôle central dans la régulation de l'expression génique.

III.1.2.2. Cofacteurs de transcription

Les travaux de recherche de ces dernières années ont montré que les récepteurs nucléaires sont au centre d'un système complexe de régulation, et que la fixation du ligand n'est pas toujours suffisante pour que le récepteur induise l'expression d'un gène (*Katzenellenbogen et al., 1996*). Le récepteur doit alors interagir, soit directement, soit indirectement avec la "machinerie" de transcription pour induire l'expression du gène cible. Des protéines appelées cofacteurs de transcription régulent l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs, leur permettant soit d'activer (coactivateurs), soit de réprimer (corépresseurs) l'expression d'un gène. La figure 13 rapporte l'exemple du mécanisme de régulation transcriptionnelle induite par l'hétérodimère RAR-RXR.

Le nombre des cofacteurs de transcription découverts ne cesse d'augmenter ce qui met en exergue la complexité de leur mode d'action avec les récepteurs nucléaires (*Freedman, 1999*). Leur capacité d'interaction avec plusieurs récepteurs leur confère un rôle central dans l'intégration des signaux hormonaux, d'autant plus qu'ils sont présents en quantité limitée dans la cellule. Avec l'exemple des récepteurs de l'acide rétinolique, Klein et al. (2000) montrent que le recrutement des corégulateurs peut varier et serait dépendant de la nature des ligands. En outre, la plasticité avec laquelle les récepteurs et les corégulateurs intègrent

et exécutent un programme complexe spatio-temporel d'expression génique, pourrait être due à une régulation des corégulateurs eux-mêmes par des kinases (McKenna et O'Malley, 2002).

L'activation des récepteurs nucléaires passe par l'action de ces cofacteurs (Figure 13).

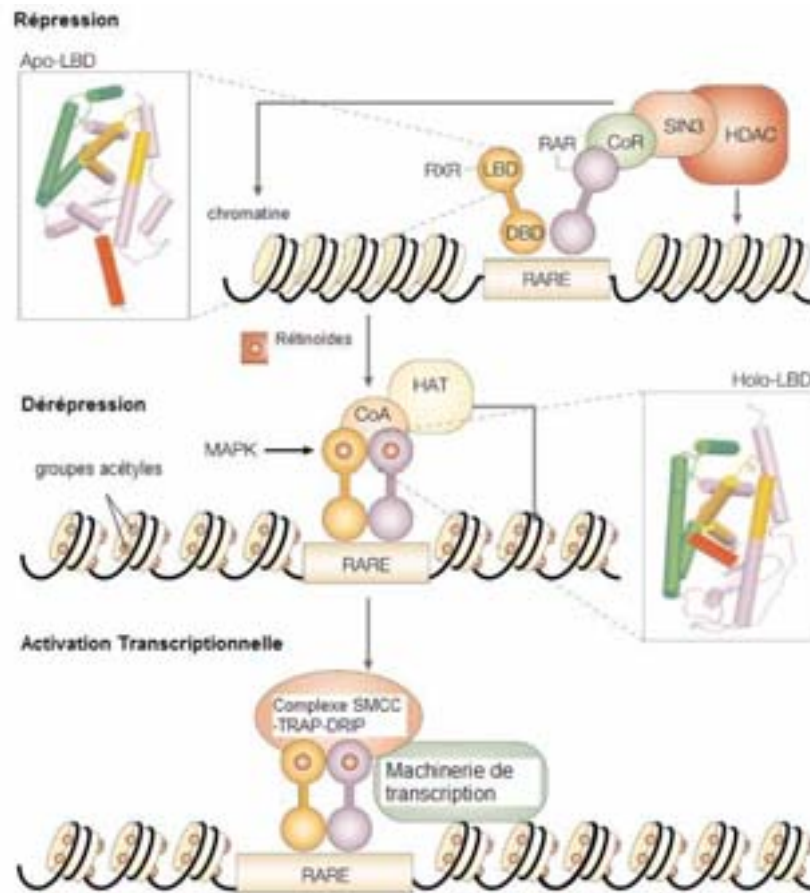


Figure 13. Mécanismes de répression et d'activation transcriptionnelles par l'hétérodimère RAR-RXR (d'après Altucci et Gronemeyer, 2001)

Abréviations : RAR : récepteur de l'acide rétinoïque; RXR : récepteur de l'acide 9-*cis* rétinoïque; RARE : élément de réponse aux rétinoïdes; CoR : co-répresseurs; HDAC : histone déacétylases; LBD : domaine de liaison au ligand; DBD : domaine de liaison à l'ADN; Apo-/Holo- : conformations allostériques; CoA : co-activateurs; MAPK : MAP Kinases; HAT : histone acétyltransférases; SMCC : Srb and mediator protein-containing complex; TRAP : thyroid hormone receptor-associated protein; DRIP : vitamin D receptor-interacting protein.

En l'absence de ligand, les co-répresseurs associées aux histones déacétylases maintiennent la chromatine condensée. La fixation d'un ligand induit un changement conformationnel des récepteurs qui interagissent avec des co-activateurs. Ceux-ci recrutent des HAT capables d'induire la décondensation de la chromatine. Le complexe SMCC-TRAP-DRIP va favoriser l'activation de la transcription en interagissant avec la machinerie transcriptionnelle classique.

Dans une première étape, la fixation du ligand sur son récepteur provoque un changement de conformation de ce dernier permettant une activité transcriptionnelle basale après le largage des corépresseurs. Dans une deuxième étape, les coactivateurs de transcription

peuvent se fixer sur l'hétérodimère, créant ainsi un "pont" entre les récepteurs et le complexe de transcription, ce qui entraîne une expression maximale du gène.

III.2. Les PPARs : récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes

III.2.1. Généralités

Trois isotypes de PPAR, dénommés α , δ (appelé alternativement PPAR β , PPAR δ , NUC-1 ou FAAR) et γ , ont été identifiés et décrits chez les vertébrés (Figure 14). Chacun d'eux est codé par des gènes distincts et possède une distribution tissulaire spécifique. PPAR α et PPAR γ ont été les premiers décrits donc les plus étudiés jusqu'à maintenant. Dans un premier temps, les fonctions majeures qui leur ont été définies ont permis de les classer comme des « *lipid sensors* » c'est-à-dire impliqués directement dans des voies métaboliques cruciales telles le stockage et le catabolisme des acides gras, le contrôle de l'homéostasie énergétique et le contrôle des réponses inflammatoires. **PPAR α** joue principalement un rôle dans l'oxydation des acides gras au niveau hépatique tandis que la première fonction connue de **PPAR γ** l'impliquait dans le processus de l'adipogenèse et dans la sensibilité à l'insuline. Plus tard, l'étude de l'isotype ubiquitaire δ a révélé son implication dans des processus aussi différents que la myélinisation, le métabolisme lipidique ou l'implantation embryonnaire.

III.2.2. Organisation structurale et liaison à l'ADN

Les trois isotypes de PPAR présentent une organisation en domaines (A/B, C, D et E/F) commune à tous les récepteurs nucléaires. Le domaine N-terminal A/B, qui contient une fonction de transactivation indépendante de la présence d'un ligand, est phosphorylé par la voie de signalisation des MAP kinases pour les isoformes α et γ de PPAR.

Le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs PPARs est le plus conservé parmi tous ceux des récepteurs nucléaires et sert donc de référence pour la superfamille. Les structures en doigt de zinc forment une structure globulaire capable de reconnaître une séquence ADN composée de six nucléotides (AGGTCA). Ainsi, l'hétérodimère PPAR/RXR reconnaît un élément de réponse fonctionnel formé par deux copies de la séquence hexanucléotidique séparées par un seul nucléotide (DR1). Ce motif ADN est appelé PPRE pour *Peroxisome Proliferator Response Element*.

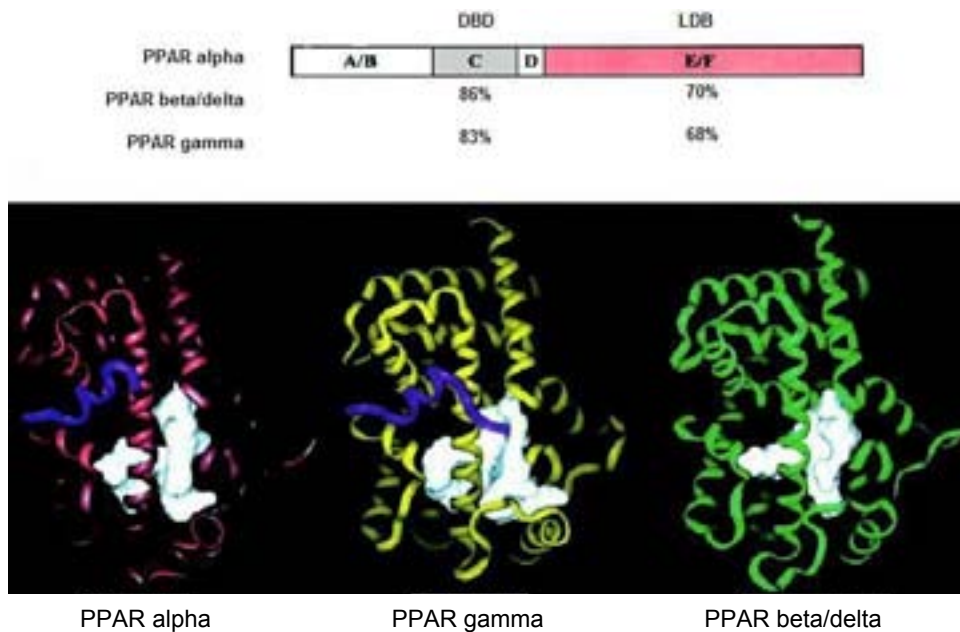


Figure 14. Homologies entre les isoformes humaines de PPAR et structures tridimensionnelles (d'après *Hihl et al., 2002*)

Abréviations : PPAR : peroxisome proliferator activated receptor; DBD : domaine de liaison à l'ADN; LDB : domaine de liaison au ligand.
La zone en blanc correspond à la poche dans laquelle vient se loger le ligand.

III.2.3. Localisation tissulaire des PPARs

Chez les vertébrés, les trois isotopes de PPAR présentent, comme précédemment indiqué, des profils distincts de localisations dans les tissus (*Escher et Wahli, 2000*). PPAR α s'exprime majoritairement dans le tissu adipeux brun, dans le foie, les reins, le cœur, la muqueuse intestinale de l'Homme et du rat. Chez l'Homme, il est aussi rencontré dans le muscle squelettique et le pancréas.

PPAR γ est exprimé majoritairement dans les tissus adipeux blanc et brun et le côlon de rat, mais on le trouve aussi dans le cœur, le muscle squelettique et le foie chez l'Homme. Trois isoformes de PPAR γ (γ 1-3), codés par un unique gène, ont été décrits à ce jour (*Fajas et al., 1997; Fajas et al., 1998*). L'isoforme γ 2 semblerait être spécifiquement exprimée dans le tissu adipeux blanc, l'isoforme γ 1 serait la plus largement exprimée et considérée comme l'isoforme majoritaire. L'ARNm γ 3 semble coder pour l'isoforme γ 1 (*Huin et al., 2002*).

Chez le rat et chez l'Homme, l'isoforme δ s'avère être exprimée dans tous les tissus étudiés à ce jour.

III.2.4. Ligands des PPARs (d'après une revue de *Desvergne et Wahli, 1999*)

Les propriétés particulières du domaine de liaison des ligands ont conduit à rendre attractive l'idée d'utiliser les PPARs comme des cibles thérapeutiques. En effet, contrairement aux RAR, TR, VDR, ER et GR, les isotypes de PPAR sont capables d'interagir spécifiquement avec une pléiade de ligands parmi lesquels se trouvent des composants naturels majeurs, tels que les acides gras. Les ligands sont classés en deux groupes, les ligands naturels et les ligands synthétiques.

L'identification des acides gras insaturés comme ligands des PPARs a fourni la preuve de l'activité transcriptionnelle des acides gras consécutivement à leur interaction directe avec ces récepteurs nucléaires. Cette découverte a permis de mettre en évidence le fait que les acides gras pouvaient agir comme des hormones et pas seulement comme des molécules fournissant de l'énergie. Les acides gras sont capables de lier les trois isotypes avec cependant une affinité plus importante pour PPAR α . De plus, en comparaison avec les acides gras insaturés (acide arachidonique, acide linoléique), la fixation des acides gras saturés s'effectue avec une affinité moindre. Parmi les ligands, la classe des eïcosanoïdes, dérivés de l'acide arachidonique, fournit de nombreux activateurs des PPARs : des leucotriènes, des acides hydroxyéïcosatétraénoïques (HETEs) et des prostaglandines. L'interaction de ces ligands avec les PPARs a permis d'établir l'implication de ces récepteurs dans la réponse inflammatoire.

Parmi les ligands synthétiques, des agents hypolipidémiantes comme les fibrates se fixent préférentiellement sur PPAR α . Les thiazolidinédiones (TZDs : troglitazone, pioglitazone et rosiglitazone) sont des antidiabétiques très utilisés dans les expériences de «gain-de-fonction» de PPAR γ puisqu'ils lient avec une très forte affinité ce dernier. Plus récemment, des antihyperglycémiantes et des antihyperlipidémiantes se sont avérés être de bons ligands de PPAR γ et de PPAR δ . Ces résultats révèlent le rôle primordial de ces récepteurs dans le devenir des cellules adipocytaires ainsi que dans la régulation des statuts glycémiques et lipidiques.

Plus récemment, des fonctions additionnelles ont été attribuées aux PPARs dans le processus de cancérisation et d'inflammation, suggérant un rôle en relation avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire.

Les PPARs traduisent les stimuli nutritionnels, pharmacologiques et métaboliques en modifiant l'expression des gènes. De nombreuses données bibliographiques mettent en évidence l'implication de l'isotype γ dans les processus de cancérogenèse colique (isoforme la plus exprimée dans le côlon), mais aussi, plus récemment, l'implication de l'isotype δ .

C'est pourquoi il sera mis en relief, dans les paragraphes suivants, des données bibliographiques associant PPAR γ et PPAR δ au processus de cancérogenèse et plus particulièrement à la cancérogenèse colique.

III.2.5. PPAR γ et cancer

III.2.5.1. Historique de l'intérêt suscité par PPAR γ

PPAR γ a d'abord été décrit comme le régulateur central de la différenciation adipocytaire. La découverte que de nombreux antidiabétiques (comme les TZDs) étaient des agonistes de PPAR γ a créé un réel engouement concernant l'implication potentielle de ce récepteur dans le diabète de type II et l'obésité. Altiook et al. (1997) ont démontré que le traitement de différentes lignées cellulaires d'adipocytes avec des TZDs suffisait à stopper la prolifération cellulaire durant la phase logarithmique de croissance et ce, d'une manière dépendante de PPAR γ . De plus, il a été observé une différenciation terminale de cellules primaires de liposarcome humain suite à une activation de PPAR γ par des ligands spécifiques (Tontonoz et al., 1997).

Ces observations ont ainsi conduit plusieurs groupes à s'intéresser à la capacité de PPAR γ à induire la différenciation dans le cadre du traitement de tumeurs. Ainsi, une réduction, ou un arrêt de la croissance, a pu être observée à la suite de l'utilisation de ligands de PPAR γ dans de nombreux types cellulaires, comme des cultures primaires ou métastatiques de cellules cancéreuses mammaires (Mueller et al., 1998) (Tableau III).

III.2.5.2. PPAR γ et cancer colorectal : rôle controversé

- Résultats divergents issus des travaux expérimentaux

Plusieurs études expérimentales suggèrent que les ligands de PPAR γ ont une activité anti-cancérogène (Osawa et al., 2003; Yoshizumi et al., 2004). Les acides gras poly-insaturés de type n-3 et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs, Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs) capables d'activer PPAR γ , sont en effet associés à la prévention du cancer du côlon. Cependant, les acides gras poly-insaturés n-6 tels l'acide linoléique, capables de la même manière de lier PPAR γ , sont associés à la promotion de ce même cancer. Ceci suggère donc que le type de ligand joue un rôle déterminant dans l'action de PPAR γ .

Tableau III. Cancers dont la croissance est modulée par des ligands de PPAR γ
(d'après *Koeffler, 2003*)

Liposarcome
Cancer colique
Cancer mammaire
Cancer de la prostate
Leucémie myéloïde
Neuroblastome
Glioblastome
Lymphome
Cancer des poumons
Cancer du col de l'utérus
Cancer de la vessie
Cancer de la tête et du cou
Cancer de l'œsophage
Cancer gastrique
Cancer pancréatique

En 1998, Lefebvre et al. (1998) et Saez et al. (1998) ont indépendamment montré que l'activation de PPAR γ pouvait promouvoir le développement de tumeurs dans le côlon de souris C57BL/6J-APC^{Min}/+. Or, un autre modèle murin a clairement montré que le statut PPAR^{+/-} (mutations sur un des deux allèles du gène codant PPAR γ - un seul allèle fonctionnel), conduisant à une sous-expression du récepteur, était associé à une sensibilité accrue vis-à-vis des cancérogènes chimiques. Ainsi, après 36 semaines de traitement, toutes les souris PPAR^{+/-}, contre la moitié des souris PPAR^{+/+}, sont mortes à la suite de cancers du côlon (*Girnun et al., 2002*).

De plus, plusieurs travaux effectués sur des cellules de cancer colique et utilisant des activateurs de PPAR γ , soutiennent l'hypothèse d'un rôle anti-proliférateur, pro-apoptotique et inducteur de la différenciation pour PPAR γ (*Brockman et al., 1998; Sarraf et al., 1998*). PPAR γ apparaît dès lors comme un potentiel gène suppresseur de tumeur. En 1999, des études génétiques conduites par Sarraf et al. ont révélé des mutations de PPAR γ dans quatre biopsies de cancer colorectal humain sur cinquante-cinq. Il s'agissait de mutations dites « perte de fonction » sur un seul des deux allèles et Sarraf et al. suggéraient l'idée que les récepteurs mutés développaient une activité de dominant négatif. Cependant, Koeffler (2003)

n'a observé aucune mutation de PPAR γ sur cinquante-cinq autres biopsies. Donc, si des mutations de PPAR γ existent, elles sont extrêmement rares.

Ainsi, de part la rareté des mutations rencontrées, PPAR γ ne peut encore aujourd'hui être défini comme un gène suppresseur de tumeurs.

- Hypothèse émergente concernant la fonction de PPAR γ

En 2002, une publication de Girnun et al. (2002) a permis de réconcilier les observations divergentes précédemment énoncées concernant le rôle de PPAR γ dans le cancer du côlon. En effet, ce travail a mis en évidence que la fonction de 'suppression de tumeur' de PPAR γ dépendait du statut du gène APC. Ainsi, les fonctions de PPAR γ seraient altérées lors d'une mutation inactivante du gène APC. Donc, l'augmentation du nombre de tumeurs coliques observée lors d'une activation de PPAR γ chez des souris APC^{Min/+} (Min, Multiple intestinal neoplasia – un seul allèle APC fonctionnel) (Lefebvre et al., 1998; Saez et al., 1998) s'expliquerait par l'altération de la voie de signalisation impliquant APC.

Ce travail met en avant les précautions à prendre concernant l'utilisation d'un modèle animal de cancer du côlon et l'utilisation de PPAR γ comme cible d'agents potentiellement anti-tumoraux. L'utilisation des souris APC^{Min/+} est reconnue comme étant un très bon modèle pour le cancer sporadique du côlon et la polypose adénomateuse familiale rencontrés chez l'Homme (Grodan et al., 1991; Nishisho et al., 1991; Miyoshi et al., 1992; Su et al., 1992). Cependant, les études expérimentales concernant le rôle de PPAR γ devraient tenir compte désormais du statut APC des animaux (ou des lignées de cellules coliques) et il faudrait alors préférer travailler avec des animaux 'sauvages' initiés chimiquement. De plus, l'administration de TZDs est utilisée dans le cadre du traitement du diabète de type II de nombreux patients obèses et diabétiques. Or, ces patients, de part leur obésité, ont un risque élevé de développer un cancer du côlon. Parce que APC est muté dans la majorité des cancers du côlon, la prise de TZDs peut se révéler dangereuse puisque apte à promouvoir, via l'activation de PPAR γ , le processus de cancérogenèse colique.

- Expression de PPAR γ dans les tissus tumoraux

La large majorité des travaux s'intéresse aux conséquences de l'activation de PPAR γ par ses ligands dans des modèles animaux de cancérogenèse ou sur des lignées de cellules tumorales. Peu d'études rapportent une association entre tumorigenèse ou tumorigénicité et modulation de l'expression de PPAR γ . Cependant, des modifications de son expression ont déjà été observées dans d'autres tissus que l'épithélium colique. En effet, un taux d'ARNm de PPAR γ significativement réduit a pu être mis en évidence dans des tumeurs prostatiques par rapport au tissu sain chez cinq patients (Mueller et al., 2000). De la même manière, une telle

sous-expression de PPAR γ avait été mise en évidence dans des tumeurs mammaires de souris par rapport à des glandes saines (Gimble *et al.*, 1998). Par contre, l'équipe de DuBois (1998(a)) a révélé une surexpression de PPAR γ dans des tumeurs intestinales de rats chimiquement initiés pour la cancérogenèse colique, mais pas systématiquement dans les polypes intestinaux ni dans des lignées de cellules coliques cancéreuses. L'étude de l'expression de PPAR γ chez des patients présentant une acromégalie s'est aussi révélée particulièrement intéressante : en effet, ces individus présentent un risque plus élevé que la moyenne de développer des polypes coliques. Il s'avère que PPAR γ est sous-exprimé dans la muqueuse colique de ces patients, ce qui pourrait être en relation avec la prévalence augmentée des polypes (Bogazzi *et al.*, 2002).

Toutes ces données bibliographiques associent l'activation de PPAR γ ou des modulations de son expression avec le processus de cancérogenèse ou l'état cancéreux du tissu. Ceci révèle l'intérêt croissant de ce récepteur à la fois comme intermédiaire dans la relation nutriments-expression génique et comme cible dans le traitement des cancers colorectaux.

III.2.6. PPAR δ et cancer colorectal

III.2.6.1. PPAR δ , gène cible direct de la β caténine ?

PPAR δ , activé par des prostacyclines, pourrait être une cible directe de la β caténine, effecteur majeur de la voie de signalisation Wnt et directement régulée par APC. En effet, il a été observé une surexpression du gène codant pour PPAR δ dans des lignées de cellules cancéreuses coliques humaines (He *et al.*, 1999(a)) et dans des tumeurs coliques de rats chimio-initiés (Gupta *et al.*, 2000). Cependant, dans une étude récente, Reed *et al.* (2004) ont mis en évidence que la perte du gène APC (via l'utilisation d'un système inductible Cre-LoxP) conduisait rapidement à l'accumulation nucléaire de la β caténine dans l'intestin grêle de souris et à une réduction des taux d'ARNm et de protéine PPAR δ . Ce résultat impliquerait donc que PPAR δ ne soit pas une cible directe de la β caténine et conforte des observations précédentes qui ne constataient pas d'altérations de l'expression de ce récepteur nucléaire lors du blocage de l'activité transcriptionnelle de la β caténine par l'utilisation d'un mutant dominant négatif TCF-LEF (partenaire obligatoire de la β caténine)(Van de Wetering *et al.*, 2002).

Les divergences de résultats peuvent provenir des modèles d'étude utilisés. En particulier, il est probable que les mécanismes de contrôle de l'expression de PPAR δ soient altérés dans les lignées cancéreuses coliques.

III.2.6.2. Oncogénicité potentielle de PPAR δ ?

Il est possible que PPAR δ soit surexprimée plus tardivement, lors de la progression tumorale. Le fait que des cellules cancéreuses coliques 'knockout' pour PPAR δ (PPAR $\delta^{0/0}$) s'avèrent incapables de former des tumeurs chez des souris nude, semble démontrer le potentiel oncogénique de la forme sauvage du récepteur (*Park et al., 2001(b)*). Le rôle de PPAR δ a aussi été testé chez des souris APC^{Min/+} mutées sur le gène de PPAR δ (PPAR $\delta^{-/-}$) (*Barak et al., 2002*). Bien qu'aucune différence n'ait été observée concernant le nombre moyen de polypes développés par les souris, l'inactivation de PPAR δ était associée à un nombre réduit de polypes de taille supérieure à 2 mm. Ainsi, ce récepteur ne serait pas indispensable à la formation initiale des polypes mais serait requis plus tardivement pour leur développement. Un travail récent réalisé sur des cellules cancéreuses coliques humaines PPAR $\delta^{-/-}$ ou PPAR $\delta^{+/-}$ et traitées avec un agoniste spécifique du récepteur, a révélé que le récepteur sauvage pourrait induire une suppression de l'apoptose plutôt qu'une stimulation de la prolifération (*Gupta et al., 2004*).

Au contraire, Harman et al. (2004) et Reed et al. (2004) ont mis en évidence une promotion de la tumorigenèse chez des souris APC^{Min/+} PPAR $\delta^{-/-}$. Ainsi, le caractère oncogénique ou non de PPAR δ reste débattu, d'autant que Orner et al. (2003) et Chen et al. (2004) n'ont pas observé de surexpression de PPAR δ dans des polypes coliques de souris APC^{Min/+}. La technique de microarray a aussi révélé une réduction de l'expression de PPAR δ dans des échantillons tumoraux humains par rapport à des tissus intestinaux sains (*Notterman et al., 2001*).

Ainsi, *in vivo*, PPAR δ n'est pas toujours surexprimé dans les tumeurs et il pourrait même être l'objet d'une régulation négative (*Notterman et al., 2001; Chen et al., 2004; Reed et al., 2004*).

III.3. Les RARs et les RXRs: récepteurs activés par la vitamine A

Le signal rétinolique est transduit via deux familles de récepteurs nucléaires appartenant à la superfamille des récepteurs aux hormones thyroïdiennes/stéroïdiennes, les RARs et les RXRs. Chaque famille comprend 3 isotypes codés par des gènes distincts : RAR α , β , γ et RXR α , β , γ . Des épissages alternatifs et des promoteurs différentiels permettent la génération d'au moins deux isoformes pour chaque isotype (exemples : RAR α 1 et α 2; RAR β 1, β 2, β 3, β 4 et β 5).

III.3.1. Organisation structurale et liaison à l'ADN

Comme la plupart des récepteurs aux hormones, les récepteurs aux rétinoïdes possèdent une structure modulaire composée des 6 régions comparables à celles des PPARs (Figure 14). La région la plus conservée est celle qui permet la reconnaissance et la liaison à l'ADN (domaine C). Le domaine de liaison au ligand (région E) contient des sites riches en résidus sérine qui sont la cible de phosphorylations régulatrices par des protéines kinases A (Rochette-Egly *et al.*, 1995) ou des MAP kinases (Adachi *et al.*, 2002).

L'acide rétinoïque, métabolite actif de la vitamine A, joue un rôle fondamental dans les processus de croissance et de différenciation à la fois dans les cellules normales et dans les cellules transformées (Love *et Gudas*, 1994). Les RARs sont activés par l'acide rétinoïque tout- *trans* et par l'isomère 9-*cis* tandis que les RXRs sont exclusivement activés par l'acide rétinoïque 9-*cis*. Ces récepteurs sous la forme d'hétérodimères (RAR/RXR) ou d'homodimères (RXR/RXR) agissent donc comme des facteurs de transcription activés par l'AR en se liant à des séquences génomiques respectivement RARE pour *Retinoic Acid Response Element* et RXRE pour *Retinoic X Response Element*, localisées dans les régions promotrices de leurs gènes cibles. RARE est un élément de réponse fonctionnel formé par deux copies de la séquence hexanucléotidique (AGGTCA) séparées par 5 nucléotides (DR5) ou parfois seulement 1 ou 2 (DR1 et DR2) tandis que RXRE est typiquement un élément de type DR1.

III.3.2. Localisation tissulaire

Les distributions tissulaires des différentes isoformes des RARs et RXRs ont été décrites par Wan (1993). L'isotype RAR α est présent dans la plupart des tissus tandis que l'expression de RAR β est restreinte principalement au cerveau et celle de RAR γ à la peau. Les RXRs sont largement exprimés dans les tissus : tandis que RXR β est détecté dans tous les tissus, on retrouve RXR α surtout dans le foie, les reins, la rate et la peau. RXR γ est exprimé dans les muscles et le cerveau.

Cependant, malgré les localisations spécifiques et les variations des taux d'expression dans les différents tissus, tous les isotypes de RAR et de RXR sont détectés dans la muqueuse colique (Stewart *et Thomas*, 1997; Nicke *et al.*, 1999; Fan *et al.*, 2003; Sun, 2004).

III.3.3. Voies de signalisation activées par les rétinoïdes

La formation d'hétérodimères est l'élément clé dans l'action directe des rétinoïdes sur l'expression de leurs gènes cibles. Cependant, il a été établi qu'ils peuvent aussi agir indirectement sur les mécanismes contrôlant l'homéostasie cellulaire. En effet, les rétinoïdes peuvent réguler des voies de signalisation qui interviennent dans les processus de prolifération, différenciation et apoptose. Parmi ces cibles, on trouve le complexe AP-1 (hétérodimère fos-jun), les MAP kinases (Erk1/2, p38, JNK) et la voie PI-3K/Akt (Niles, 2004). Ces voies, activées par des facteurs de croissance et de stress, et associées au processus tumorigénique, sont altérées par les rétinoïdes. En particulier, l'activité anti-proliférative des rétinoïdes semble médiée, au moins en partie, via la répression d'AP-1. Or, AP-1 régule la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et la promotion tumorale, et codant pour des métalloprotéases, pour le facteur angiogénique VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou encore pour TGF- β . Ainsi, l'intérêt thérapeutique des rétinoïdes est lié pour partie à leur capacité à contrecarrer l'action d'AP-1 (Benkoussa et al., 2002).

III.3.4. Gènes cibles

Balmer et Blomhoff (2002) ont établi que plus de 500 gènes étaient régulés directement via la présence de RARE ou RXRE dans les séquences régulatrices ou indirectement via la régulation de voies d'action régulées par l'acide rétinoïque. Parmi les gènes possédant un élément de réponse RARE ou RXRE, se trouvent des gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A (RBP, ADH) ou codant des récepteurs cytoplasmiques (CRBP I et II, CRABPI et II) et des récepteurs nucléaires (RAR α 2, RAR β 2, RAR β 4, RAR γ 2, RXR γ).

Les effets, directs ou non, des rétinoïdes s'exercent aussi sur les processus contrôlant l'homéostasie cellulaire. En effet, ils régulent négativement des gènes impliqués dans la prolifération (IL-6, c-erbB, Wnt-3A), dans la survie cellulaire (survivine) ou encore dans la progression tumorale (métalloprotéases, VEGF) et modulent différents gènes impliqués dans le cycle cellulaire (cyclines), l'apoptose (caspases), les relations intercellulaires (cadhérines).

III.3.5. Altérations de l'expression des RARs et cancérogénèse

Parce que les récepteurs nucléaires sont les médiateurs des effets des rétinoïdes sur l'expression génique, des modifications dans leur expression ou dans leur fonction peuvent

conduire à des réponses aberrantes des cellules aux rétinoïdes ainsi qu'à l'altération des processus homéostatiques et participer alors à la transformation cellulaire.

Quelques mutations du gène codant pour RAR α ont été décrites, la plus connue étant la translocation qui conduit à la fusion du gène RAR α avec le gène PLM (Promyelocytic Leukemia gene) à l'origine de la leucémie promyélocytaire aiguë (APL) (He et al., 1999(b)).

De nombreuses observations ont révélé des altérations dans l'expression de RAR β *in vivo* et *in vitro*. L'hypoexpression, voire l'extinction de l'expression de RAR β a été mise en évidence dans un grand nombre de tissus tumoraux provenant de poumon (Xu et al., 1997a), sein (Xu et al., 1997b), estomac (Kim et al., 2001), prostate (Lotan et al., 2000), peau (Issing et Wustrow, 1996), côlon (Xu et al., 2004), tête et cou (Youssef et al., 2004).

L'expression de RAR β dépend du taux cellulaire de rétinoïdes puisque le promoteur de son gène contient une séquence régulatrice RARE de type DR5 inductible par les rétinoïdes. Ainsi, les tissus dans lesquels le gène RAR β est éteint deviennent résistants aux rétinoïdes. Or, des souris transgéniques exprimant un antisens RAR β 2 développent spontanément des cancers pulmonaires alors que la transfection de RAR β 4 augmente la tumorigénicité de cellules cancéreuses de poumons (Houle et al., 1993; Berard et al., 1996).

Les mécanismes sous-tendant l'extinction (« silencing ») de l'expression du gène codant pour RAR β sont encore largement méconnus même s'il a été mis en évidence une association entre l'hyperméthylation d'une région spécifique du promoteur de RAR β et la perte de son expression (Cote et Momparler, 1997; Soprano et al., 2004). En effet, dans tous les cancers testés, il a été constaté des modifications dans le degré de méthylation du génome (Feinberg, 2001). Ainsi, l'hyperméthylation locale, au niveau des îlots CpG situés dans les promoteurs des gènes, semble être un mécanisme permettant d'inactiver l'expression des gènes suppresseurs de tumeur (Toyota et al., 1999). Récemment, Xu et al. (2004) ont conforté l'idée que la méthylation aberrante de certains gènes dans les tumeurs colorectales était un mécanisme alternatif à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur par des mutations somatiques.

L'AR inhibe la croissance de la plupart des cellules sensibles aux rétinoïdes (parce qu'elles expriment les RARs donc peuvent répondre à l'administration d'AR) et celle des cellules résistantes dans lesquelles on induit une surexpression de RAR β . L'AR ne semble pas supprimer la prolifération cellulaire via l'induction de l'apoptose des cellules tumorales mais plutôt via un arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire (Wu et al., 1997).

Cependant, des travaux montrent que la perte d'expression de RAR β ne conduit pas forcément à une absence de réponse des cellules aux rétinoïdes ce qui démontre que l'AR peut agir indépendamment des RAR (Zou et al., 2001). De plus, alors que l'expression des isoformes 2 et 4 de RAR β est gouvernée par un même promoteur, RAR β 2 semble agir comme

un gène suppresseur de tumeur alors que RAR β 4 fonctionne comme un dominant négatif. En effet, RAR β 4 aurait la capacité de supprimer l'action anti-tumorale de RAR β 2 et des souris transgéniques exprimant fortement RAR β 4 semblent développer spontanément des tumeurs dans plusieurs tissus (*Berard et al., 1994*).

III.3.6. Rôles des RXRs

L'action de l'acide rétinoïque nécessite deux récepteurs nucléaires, RAR et RXR, qui forment des hétérodimères RAR/RXR. RXR est aussi le partenaire obligatoire de plusieurs autres récepteurs nucléaires tels les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR), du récepteur de la vitamine D (VDR), des PPARs ou encore des récepteurs aux oxystérols (Figure 12). RXR est activable par les réxinoïdes, parmi lesquels on trouve son ligand naturel, l'acide rétinoïque 9-*cis* et des ligands synthétiques spécifiques. Cependant, dans le contexte de la formation d'hétérodimères avec RAR, TR ou VDR, RXR est incapable de répondre à son ligand. Ce phénomène de subordination de RXR pourrait prévenir l'activation simultanée de plusieurs voies puisque seul le partenaire d'hétérodimérisation de RXR, après liaison de son ligand, induit une réponse cellulaire.

Néanmoins, dans le cas de l'hétérodimère PPAR/RXR, les deux partenaires sont activables par leurs ligands respectifs. Desreumaux et al. (2001) ont montré que les agonistes de RXR étaient aussi efficaces que les ligands de PPAR γ pour atténuer l'inflammation du côlon sur un modèle murin de colite (inflammation d'une partie ou de la totalité du côlon). De plus, l'utilisation combinée des ligands respectifs montre que les récepteurs actifs ont des activités anti-inflammatoires synergiques. En 1999, Desvergnés et Whali avaient déjà constaté que l'hétérodimère PPAR/RXR était un médiateur important dans l'action de l'acide rétinoïque 9-*cis*.

Ouamrane et al. (2003) ont aussi observé que des réxinoïdes (nom donné aux ligands spécifiques de RXR) avaient la capacité d'activer des gènes cibles de PPAR α dans le foie et les reins de souris PPAR α ^{-/-}. En effet, RXR s'avère apte à former des homodimères capables de se lier au domaine PPRE et ainsi à transactiver les gènes cibles des PPARs (*Ijpenberg et al., 2004*). De plus, l'homodimère peut recruter par exemple le co-activateur de transcription SRC1 alors que l'hétérodimère PPAR/RXR en est incapable. Ainsi, le recrutement de co-activateurs spécifiques par un récepteur donné pourrait conduire à la formation de complexes de transcription spécifiques et alors induire l'activation de cascades différentes de signalisation. Ainsi, la recherche et la sélection de ligands des récepteurs nucléaires doit tenir compte du fait que l'effet modulateur d'un ligand sur un récepteur nucléaire donné implique le

recrutement de co-activateurs spécifiques. Ces données mettent encore en exergue le rôle central de l'acide rétinoïque 9-*cis* et de RXR dans la régulation d'une large variété de gènes.

Il existe peu de données concernant une potentielle implication de RXR dans le processus de cancérogenèse. Cependant, Tanaka et al. (2004) ont observé que la résistance aux rétinoïdes observée sur des cellules cancéreuses mammaires humaines, était la conséquence d'une localisation altérée de RXR α . En effet, une surexpression nucléaire ciblée grâce à l'utilisation d'un adénovirus rétablit l'effet des agonistes de RXR et conduit à l'entrée des cellules en apoptose. Deux publications majeures ont aussi permis de constater le rôle déterminant de RXR dans la protection vis-à-vis du CCR. La première indique que RXR interagit avec la β caténine, protéine oncogénique majeure, et favorise sa dégradation (Xiao et al., 2003). La seconde révèle que ce récepteur est un médiateur important de l'effet protecteur de certains acides gras polyinsaturés n-3 sur les colonocytes (Fan et al., 2003). En effet, alors que structurellement différent de l'acide rétinoïque 9-*cis*, le DHA (22:6) peut agir comme un agoniste de RXR. PPAR γ est, par contre, indifféremment activé par les acides gras polyinsaturés n-3 et n-6. Ainsi, le DHA peut influencer chacun des partenaires d'hétérodimérisation et ses effets propres sur les colonocytes sont la conséquence de sa capacité à activer RXR.

IV. Biomarqueurs du processus de la cancérogenèse colique

La recherche de biomarqueurs a principalement pour objectif d'évaluer le risque de développement du CCR chez un individu et dans une population ou d'identifier des modulateurs du processus de cancérogenèse. Pour la recherche dans le domaine alimentation et cancer, l'intérêt des biomarqueurs est de pouvoir identifier des facteurs alimentaires actifs (délétères ou protecteurs) et de comprendre la manière dont ils agissent. L'analyse des cryptes aberrantes auxquelles nous avons choisies de nous intéresser, est un bon biomarqueur précoce en cancérogenèse colique. D'autres biomarqueurs, comme la cyclooxygénase-2 et la β caténine, présentent un intérêt supplémentaire parce qu'ils entretiennent des relations avec les récepteurs nucléaires.

IV.1. Les cryptes aberrantes

Les cryptes aberrantes (CA), reconnues comme des lésions prénéoplasiques coliques, ont été mises en évidence et étudiées au cours du processus de cancérogenèse colique induite chez l'animal (*Bird, 1987 ; Pretlow et al., 1992; Bird et Good, 2000*) et dans la muqueuse colique de patients atteints de CCR (*Takayama et al., 1998*).

Les cellules épithéliales qui composent les CA ont un caractère hyperplasique, et des activités biochimiques perturbées (diminution de l'activité hexosaminidase, perturbation dans la sécrétion des mucines) (*Pretlow et Pretlow, 1988 ; McLellan et al., 1991; Caderni et al., 1995*). De plus, les cellules appartenant aux CA expriment des mutations dans les gènes k-Ras et c-fos impliqués dans le processus de tumorigenèse colique (*Kinzler et Vogelstein, 1996 ; Takayama et al., 2001*). Plus rarement, les cellules des cryptes aberrantes peuvent également présenter des mutations du gène CTNNB1 codant pour la β caténine (*Suzui et al., 1999*). Enfin, au cours de l'étape de promotion, les CA peuvent se multiplier par un mécanisme de fission et donner naissance à des foyers de plusieurs cryptes aberrantes (FCA) (*Fujimitsu et al., 1996*). Les FCA se développent au cours du temps et les FCA dysplasiques peuvent donner naissance à des adénomes puis des adénocarcinomes (*Bird, 1995 ; Takayama et al., 2001*).

Ces modifications des cellules épithéliales vont permettre de localiser des cryptes coliques de morphologie caractéristique : par rapport aux cryptes normales, les CA se présentent sous forme d'agréments, avec une zone péricryptale plus importante, une légère surélévation par

rapport au niveau de la muqueuse et une ouverture luminale allongée par rapport à l'ouverture ronde des cryptes normales (Figure 15).

Récemment, il a été distingué d'autres types de lésions qui seraient plus prédictives des tumeurs que les FCA. Yamada et al. (2000) ont différencié les cryptes anormales ressemblant aux CA et ne présentant pas de mutation dans CTNNB, par rapport à des cryptes nommées BCAC (pour β Catenin Accumulated Crypts), présentant des mutations dans CTNNB1 et une accumulation cytosolique et nucléaire de la β caténine. Caderni et al. (2003) ont révélé que l'identification et la numération des MDF (pour Mucine Depleted Foci) dans lesquels la production de mucines est très insuffisante voire nulle, permettaient une meilleure prédiction de l'effet modulateur de synbiotiques. Les BCAC et les MDF pourraient correspondre aux FCA dysplasiques précurseurs des CCR. Cependant, ces marqueurs ne sont pas, pour l'instant, applicables à l'Homme puisque l'identification des BCAC requiert une analyse histologique poussée et la révélation des MDF nécessite l'utilisation d'un colorant toxique.

Les FCA, rapidement induits par un traitement chimique cancérigène et classiquement révélés par une coloration au bleu de méthylène, restent les plus populaires pour les études expérimentales plus courtes et moins coûteuses que des études d'intervention chez l'Homme, permettant un contrôle maximum des paramètres influençant la cancérogenèse (Carpet, 1996).

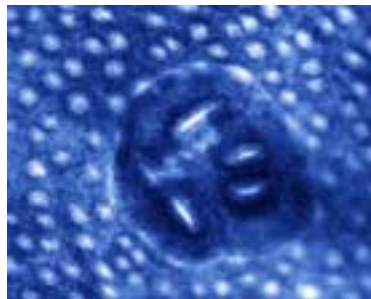


Figure 15. Photographie de FCA colique
(Coloration au bleu de méthylène; G : $\times 40$)

IV.2. La cyclooxygénase-2

Les cyclooxygénases (COXs) sont des glycoprotéines membranaires qui catalysent l'étape initiale dans la biosynthèse des prostaglandines (PGs) à partir de l'acide arachidonique (DuBois et al., 1998(b)). Deux isoformes, COX-1 et COX-2, codées par des gènes distincts, participent à la formation d'une grande variété d'éicosanoïdes tels que les PGs D_2 , E_2 , I_2 , $F_{2\alpha}$ et le tromboxane (Figures 9 et 16).

COX-1 est exprimée dans la plupart des tissus et ce, de manière constitutive, tandis que l'expression du gène codant COX-2 est induite par de nombreux stimuli tels les mitogènes, les cytokines, les facteurs de croissance ou encore des promoteurs de tumeur (*Eschwege et al., 2001*).

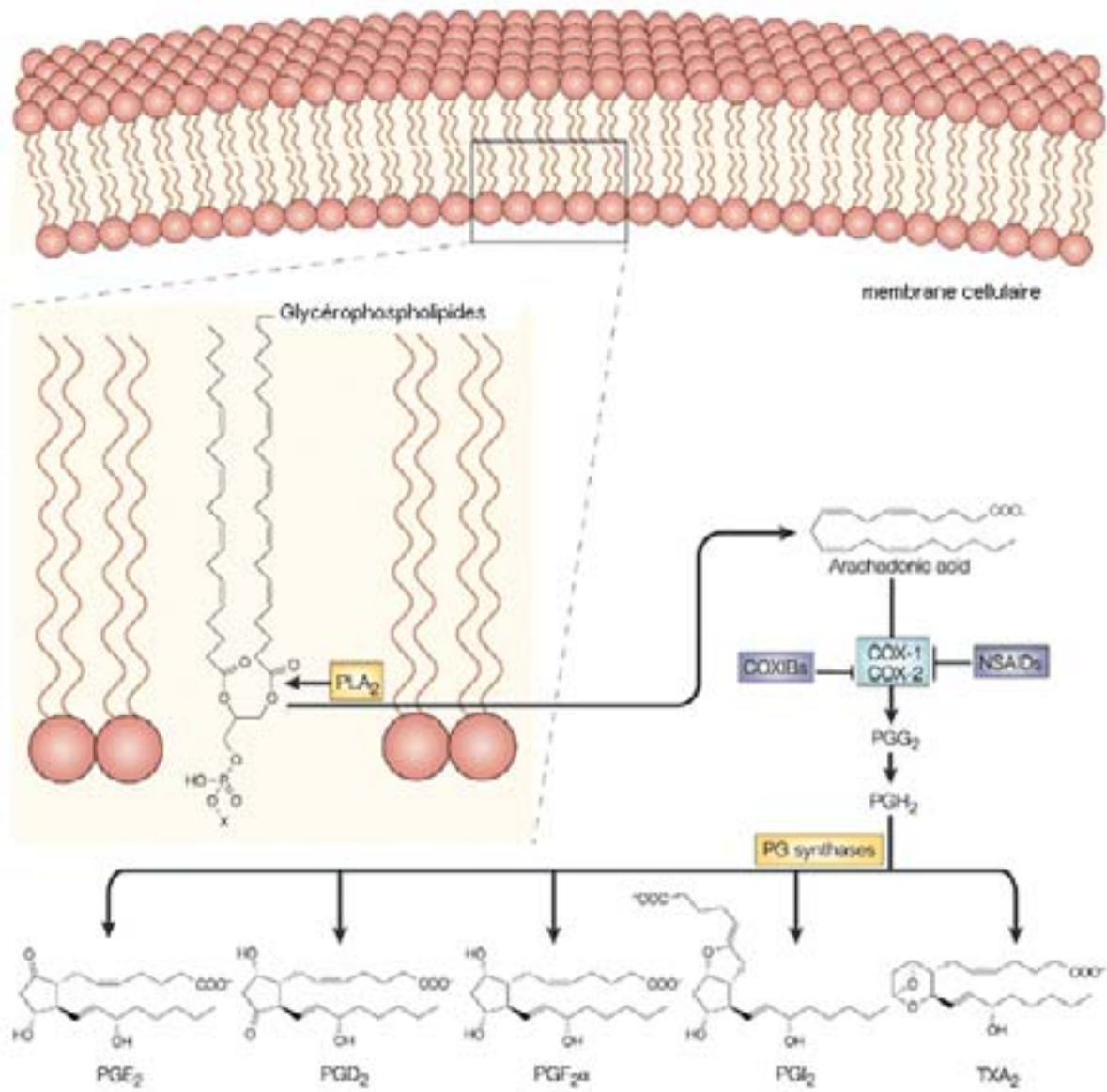


Figure 16. Implication des COXs dans le métabolisme des acides gras
(d'après *Gupta et DuBois, 2001*)

Abréviations : COX : cyclooxygénase; COXIB : inhibiteur spécifique de COX-2; NSAID : anti-inflammatoires non stéroïdiens; PG : prostaglandine; PLA₂ : phospholipase 2; TX : thromboxane.

Tandis que l'action de COX-1 semble principalement liée à la production de PGs dans le cadre du processus inflammatoire, de nombreuses publications révèlent des fonctions additionnelles de COX-2 et son implication dans le processus de cancérogenèse colique.

IV.2.1. COX-2 : cible de l'action anti-tumorale

Chez l'Homme et chez l'animal, il a pu être observé une surexpression de COX-2 dans les tumeurs colorectales alors que le tissu sain n'exprime que peu ou pas cette isoforme (*Kutchera et al., 1996*). De plus, des études cliniques et des études expérimentales ont mis en évidence une réduction significative du nombre de tumeurs colorectales lors de l'administration d'inhibiteurs des cyclooxygénases tels que l'aspirine et autres anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs) (*Thun et al., 1993; Smalley et DuBois, 1997; Williams et al., 1997*). Oshima et al. (*1996*) a mis en évidence une réduction dramatique du nombre et de la taille des polypes intestinaux chez des souris APC^{Δ716} (modèle génétique de la Polypose Adénomateuse Familiale humaine) pour lesquelles le gène COX-2 a été muté. De plus, COX-2 n'est pas détectée dans les petits polypes (dont la taille est inférieure à 2mm) suggérant l'implication de COX-2 non dans l'initiation mais dans l'étape de promotion de la tumorigenèse colorectale.

La surproduction subséquente de PGs est considérée comme un événement critique impliqué dans la médiation des effets promoteurs des facteurs de croissance et des oncogènes (*Coffey et al., 1997*). Elle est aussi associée à des effets tels l'inhibition de l'apoptose et la stimulation de la prolifération cellulaire. Les PGs semblent exercer un effet anti-proliférateur sur les lymphocytes avec pour conséquence l'apparition d'une immunosuppression locale associée à une réduction de l'activation des *natural killers* (*Kojima et al., 2001*).

Ainsi, la surexpression de COX-2 et la surproduction de PGs conduisent à modifier le comportement des tumeurs cancéreuses en induisant un échappement vis-à-vis du système immunitaire mais aussi en favorisant le potentiel métastatique (*Tsujii et al., 1997*) et la néovascularisation (*Cianchi et al., 2001*).

L'emploi de drogues, sans les effets indésirables des NSAIDs et capables d'inhiber spécifiquement COX-2 (COXIBs, inhibiteurs spécifiques de COX-2), peut permettre de s'opposer au développement tumoral via l'inhibition de l'activité de cette enzyme.

IV.2.2. COX-2 et alimentation

Dans le contexte de l'influence de l'alimentation sur le risque de cancer colique, COX-2 apparaît comme l'un des médiateurs participant aux voies d'action des nutriments. Des AGPIs de la série n-3 comme l'EPA (20:5) et le DHA (22:6) ont la capacité d'inhiber COX-2. En effet, les travaux de Singh et al. (1997) sur des rats F344 ont montré que la surexpression de COX-2 observée après initiation par l'azoxyméthane (AOM) était potentialisée par l'utilisation d'un régime riche en AGPIs de la série n-6 (huile de maïs) mais fortement diminuée par des AGPIs de la série n-3 (huile de poisson). Un travail récent a aussi démontré que des PGs pouvaient moduler l'activité de COX-2 (Bagga et al., 2003). Si l'acide arachidonique (AA) est le substrat préférentiel de COX-2, l'EPA et le DHA peuvent entrer en compétition avec l'AA. Dans ce cadre-là, la production de PGE₂ sera défavorisée au profit de celle de PGE₃ (Figure 9). Or, si PGE₂ favorise la surexpression de COX-2 via un feedback positif, PGE₃ exerce un rétro-contrôle négatif sur COX-2. Ainsi, quand PGE₂ favorise sa propre production, PGE₃ atténue l'induction de COX-2 et donc la production de PGE₂.

Outre ce mécanisme, il a été observé, dans le cadre d'une restriction de la prise alimentaire, une expression réduite de COX-2 associée à un nombre faible de cryptes aberrantes chez des animaux obèses, chimio-initiés pour la cancérogenèse colique (Raju et Bird, 2003).

Ainsi, un des mécanismes sous-tendant l'action de l'alimentation sur les événements précoces de la cancérogenèse colique, pourrait impliquer COX-2 et sa régulation par les AGs alimentaires.

L'ensemble des données est en accord avec les interventions nutritionnelles visant à restreindre les prises alimentaires et à en améliorer leur qualité.

IV.2.3. COX-2 et PPARs

Certains AGPIs sont capables d'activer PPAR_γ et peuvent aussi agir directement sur leur propre métabolisme en modulant l'expression de COX-2 qui participe à la production des PGs. Certaines PGs, et leurs dérivés comme la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ (Forman et al., 1995) sont capables de lier PPAR_γ et peuvent exercer un contrôle sur l'activité de COX-2 (Chinery et al., 1999).

Les NSAIDs conventionnels, qui inhibent indifféremment l'une ou l'autre des COXs, peuvent lier PPAR_γ (Nixon et al., 2003). En 1999, l'équipe de Prescott a mis en évidence que les effets des acides gras, des PGs et des NSAIDs sur la région régulatrice du gène COX-2 humain se faisait par l'intermédiaire de la séquence PPRE (Meade et al., 1999). Ceci

suggèrait que PPAR γ est un régulateur potentiel du gène codant COX-2. Cependant, à la même période, Staels et al. (1998) démontraient l'intervention d'un mécanisme indirect et indépendant de la présence de PPRE. Il n'est donc pas invraisemblable que les 2 mécanismes coexistent. Cependant, Lefebvre et al. (1998) n'ont observé aucune augmentation d'expression de COX-2 24h après le traitement par un ligand spécifique de PPAR γ sur les cellules cancéreuses coliques humaines HT-29 alors qu'une inhibition de l'expression de COX-2, ainsi qu'une diminution de la production de PGE $_2$, sont observables 48h après le traitement (Yang et Frucht, 2001). Ce travail met en évidence une action indirecte de PPAR γ sur l'expression de COX-2 et semble réfuter la présence d'élément de réponse PPRE dans le promoteur du gène codant COX-2 (Figure 17). De plus, il semble que PPAR γ puisse inhiber dramatiquement la liaison de NF- κ B avec l'ADN (Chen et al, 2003). Or NF- κ B est un facteur de transcription impliqué dans la régulation positive de la transcription de COX-2 (Shishodia et Aggarwal, 2004). PPAR γ s'opposerait donc à l'expression de COX-2 via l'inhibition de NF- κ B.

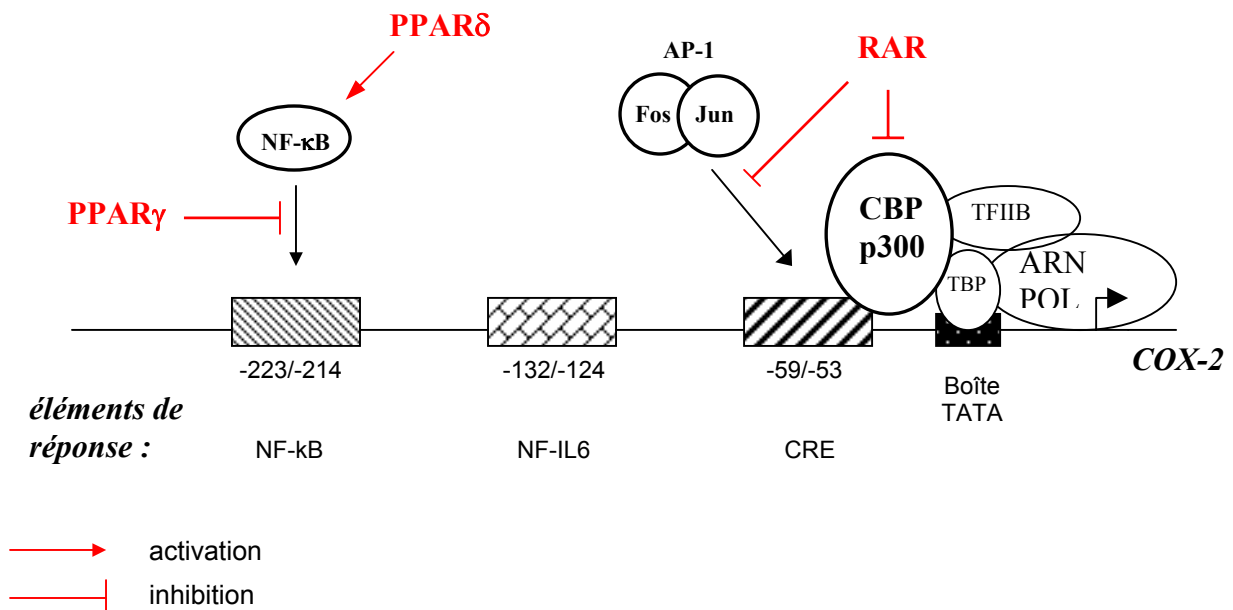


Figure 17. Régulation présumée de la transcription du gène codant COX-2 par PPAR et RAR dans les cellules coliques

Abréviations : AP-1 : Activator protein complex-1; ARN pol : ARN polymérase; CRE : Cyclic AMP response element; CBP : CREB (Cyclic AMP response element binding protein) binding protein; NF : nuclear factor; TBP : TATA box binding protein; TFIIB : transcription factor IIB.

L'implication de PPAR γ comme régulateur de l'expression de COX-2 est donc établie même si elle fait toujours l'objet de travaux qui cherchent à en élucider les mécanismes (*Inoue et al., 2000; Li et al., 2003*). Comprendre les relations entre PPAR γ et COX-2 présente un intérêt certain dans la prévention ou le traitement curatif visant à agir sur différentes voies de signalisation via une activation de PPAR γ et une inhibition de COX-2.

Il semble que PPAR δ exerce aussi une régulation indirecte de la transcription du gène codant pour COX-2 dans les cellules cancéreuses de foie. En effet, tout comme PPAR γ , son action s'établit via la modulation de NF-kB. Cependant, contrairement à PPAR γ , il s'agit d'une potentialisation de l'activité de ce facteur de transcription par PPAR δ (*Glinghammar et al., 2003*). Inversement, COX-2 est capable d'activer PPAR δ : directement, en fournissant des ligands tels PGI $_2$ et PGE $_2$ et indirectement, en activant la cascade de PI3K-Akt (*Wang et al., 2004(a)*) (Figure 20).

IV.2.4. COX-2, RARs et rétinoïdes

Les mécanismes d'action par lesquels les rétinoïdes régulent la croissance cellulaire et la différenciation, et suppriment l'apoptose, sont mal connus. Ainsi, différents travaux ont recherché une régulation éventuelle de l'expression ou de l'activité de COX-2 par les rétinoïdes. L'acide rétinoïque 9-*cis* et le fenrétinide (rétinoïde synthétique) se sont révélés capables d'inhiber la croissance, respectivement, de cellules cancéreuses de peau et de cellules cancéreuses de côlon, en réduisant l'expression de COX-2 (*Kanekura et al., 2000; Merritt et al., 2001*). L'altération de l'activité de COX-2 induit la diminution de la biosynthèse de PGs impliquées dans la stimulation de la prolifération cellulaire. Les données récentes issues d'une étude réalisée *in vitro* sur des macrophages et des lymphocytes suggèrent aussi que les rétinoïdes agissent comme des agents anti-inflammatoires via l'inhibition de COX-2 (*Kim et al., 2004*).

La suppression de l'expression de COX-2 par l'acide rétinoïque dans les cellules cancéreuses nécessite l'induction de RAR β (*Li et al., 2002*). Cependant, il ne semble pas s'agir d'une régulation directe puisque le promoteur du gène codant pour COX-2 ne contient pas la séquence consensus RARE. L'acide rétinoïque peut moduler la transcription de gène indirectement, via la régulation négative de l'hétérodimère c-fos/c-Jun (AP-1) (*DiSepio et al., 1999; Wu et al., 2002*). S'il n'existe pas d'élément de réponse spécifique de AP-1 (TRE, TPA responsive element) dans le promoteur du gène codant COX-2, il semble plausible que AP-1 se fixe sur CRE (Cyclic AMP Response Element), élément de réponse au facteur de transcription CREB. Ainsi, les travaux de Subbaramaiah et al. (2002) rapportent que l'ATRA

empêche la transcription de COX-2 en altérant la fixation de AP-1 sur CRE et en diminuant la biodisponibilité des co-activateurs de transcription, CBP et p300, une histone acétyl transférase (Figure 17).

IV.3. La β caténine

Plus de 90% des cancers colorectaux (CCRs) présentent des mutations activatrices de la voie canonique de signalisation Wnt (Figure 18). Les altérations génétiques de cette voie sont déjà présentes précocément dans les lésions pré-malignes comme les foyers de cryptes aberrantes et les petits polypes (*Powell et al., 1992*). Le gène suppresseur de tumeur APC est muté dans plus de 80% des CCRs. Il s'agit, dans la majorité des cas, d'une délétion monoallélique qui favorise la mutation ou la perte du second allèle et se traduit par la présence d'un produit APC tronqué qui pourrait se comporter comme un dominant négatif en présence de la protéine sauvage (*Dihlmann et al., 1999*). Des mutations dans le gène CTNNB1 codant pour la β caténine, sont retrouvées dans 10% des cas de CCRs ne présentant pas de mutations sur APC. Des mutations inactivatrices dans le gène codant pour l'axine ont aussi été observées dans certaines tumeurs colorectales (*Jin et al., 2003*).

IV.3.1. Voie de signalisation classique de Wnt

IV.3.1.1. Description (pour revue *Giles et al., 2003*)

La voie classique contrôle une cascade d'événements régulant la β caténine tandis qu'une voie dite 'non canonique' transduit le signal Wnt via des voies de signalisation incluant l'activation de c-jun N-terminal kinase (JNK) ou la libération du Ca^{2+} (*Kuhl et al., 2001*).

La voie canonique contrôle l'expression d'un pool de gènes principalement impliqués dans le déterminisme cellulaire et la prolifération. Cette voie, impliquée dès l'embryogenèse, participe aussi aux différents stades du développement chez de nombreux organismes allant du nématode à l'Homme.

Cette voie de signalisation est initiée par la fixation de glycoprotéines sécrétées, nommées Wnt (au moins 19 membres reconnus) à un récepteur à 7 domaines transmembranaires nommé Frizzled (Fz). C'est la formation d'un complexe ternaire comprenant Wnt, Fz et une protéine LRP (Low-density lipoprotein Receptor-related Protein) qui va permettre la transduction du signal dans la cellule. Par un mécanisme encore inconnu, ce complexe va induire l'hyperphosphorylation de la protéine Dishevelled (Dsh) qui inhibe alors l'activité de la glyco-gène

synthase kinase-3 β (GSK-3 β). Cette dernière est alors incapable de phosphoryler la β caténine qui va s'accumuler dans le cytosol. Elle est ensuite rapidement transloquée dans le noyau. Elle peut s'associer avec un membre de la famille des facteurs de transcription T-Cell transcription Factor/Lymphoid Enhancing Factor (TCF/LEF) pour former un hétérodimère indispensable à la modulation de la transcription de ses gènes cibles (Figure 18b).

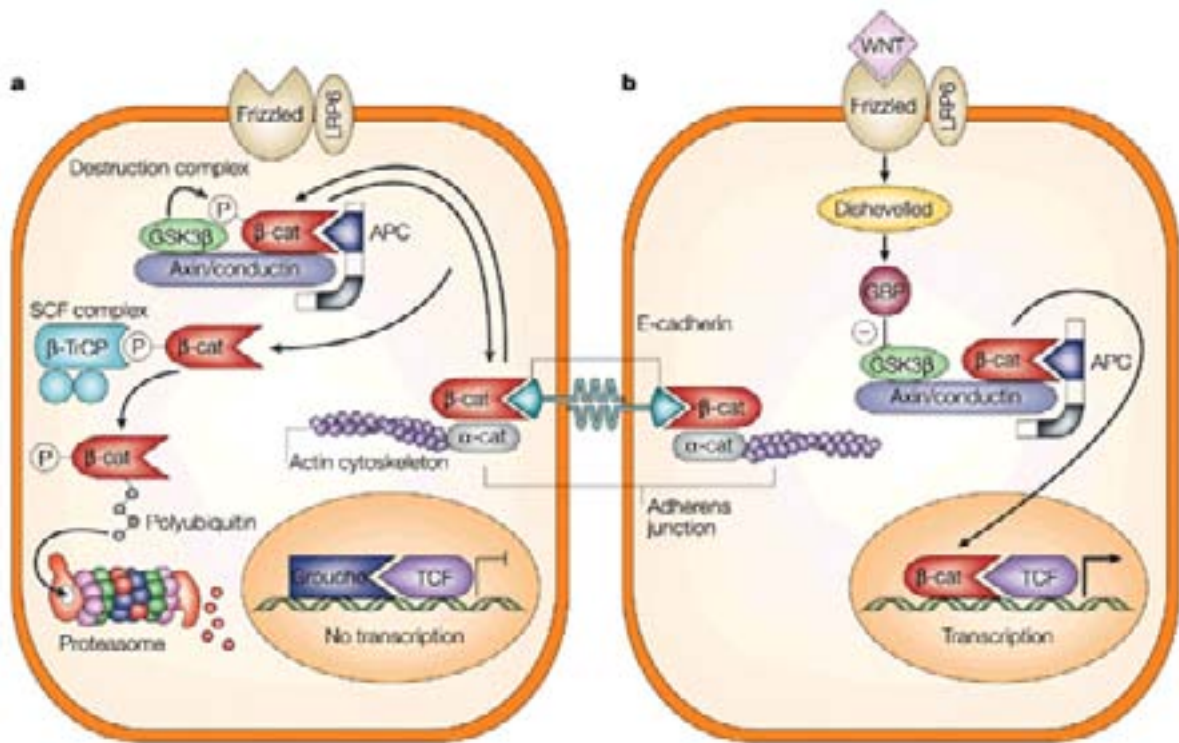


Figure 18. Voie canonique de signalisation de Wnt (d'après Fodde et al., 2001)

a : dégradation de la β caténine cytosolique en l'absence du ligand Wnt

b : translocation de la β caténine dans le noyau et induction de la transcription des gènes cibles

Abréviations : APC : adenomatous polyposis coli; α/β -cat : α/β caténine; GBP : inhibiteur de GSK3 β ; GSK : glycogène synthase kinase; Groucho : co-répresseur; LRP : low-density lipoprotein receptor-related protein; TCF : T-cell transcription factor; SCF : complexe SKP/Cullin/F-Box responsable de l'ubiquitinylation; β -TrCP : protéine F-Box appartenant au complexe SCF.

En l'absence de signal Wnt, on retrouve la β caténine à la fois associée à la cadhérine E, au niveau des membranes où elle assume une deuxième fonction dans les jonctions intercellulaires (Moon et al., 2002) et libre dans le cytosol où elle est rapidement phosphorylée (Figure 18a). En effet, si la voie de Wnt est inactive, l'inhibition exercée par Dsh sur GSK-3 β est levée et il se forme alors un complexe de dégradation de la β caténine qui comprend GSK-3 β , APC et Axine. Ces 2 derniers éléments sont phosphorylés par GSK-3 β et vont favoriser la

phosphorylation spécifique de la β caténine par cette kinase au niveau des résidus sérine/thréonine 41, 37 et 33 (Figure 19). La phosphorylation des deux derniers résidus est le signal pour l'ubiquitinylation de la β caténine et sa dégradation par le protéasome.

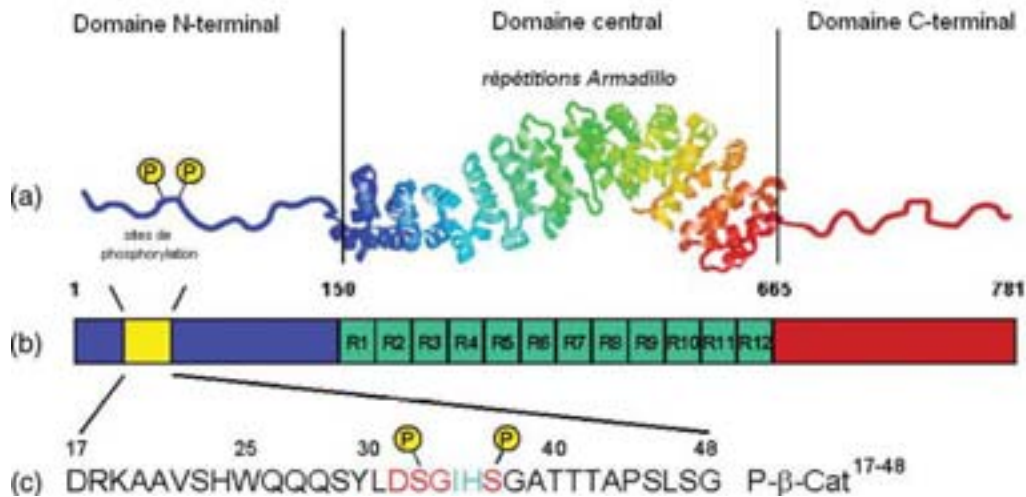


Figure 19. Représentation schématique de la β caténine (d'après *Megy et al., 2005*)

a : structure tridimensionnelle de la région de répétitions Armadillo de la β caténine; cette région est constituée de 12 copies d'un motif contenant 42 acides aminés; la structure des domaines N- et C-terminaux restent inconnus

b : structure primaire de la protéine

c : région de 32 acides aminés contenant la séquence consensus DSGXXS qui contient les sites de phosphorylation

En résumé, le signal Wnt conduit à stabiliser la β caténine tandis que son absence favorise la dégradation de cette dernière. De part sa fonction dans les jonctions adhérentes, la β caténine favorise les communications intercellulaires tandis qu'elle va moduler l'expression de gènes cibles, en association avec TCF/LEF lorsqu'elle se trouve dans le noyau.

IV.3.1.2. Gènes cibles

Un nombre considérable de gènes cibles de la voie canonique de signalisation Wnt joue un rôle dans le développement et dans le processus tumorigénique (*Wong et Pignatelli, 2002; Lustig et Behrens, 2003*). Nous nous attacherons à citer ceux qui participent au développement du cancer.

- Gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire :

Des proto-oncogènes, tels c-myc, c-jun, fra-1 sont directement régulés par l'hétérodimère β caténine/TCF/LEF. Via l'induction de l'expression de ces gènes mais aussi des gènes codant pour la cycline D1 (activateur des kinases dépendantes des cyclines) et la gastrine, Wnt favorise la progression des cellules dans le cycle cellulaire. Wnt va parallèlement induire l'expression du gène anti-apoptotique survivine.

- Gènes impliqués dans la croissance tumorale :

Cette voie va aussi favoriser la croissance tumorale en induisant l'expression de la gastrine ou encore la croissance vasculaire en régulant l'expression du facteur pro-angiogénique VEGF.

- Gènes impliqués dans la progression tumorale :

Wnt régule positivement l'expression des gènes codant pour des protéases telles la matrilysine/MMP7, MMP-26 et uPAR qui dégradent la matrice extracellulaire favorisant l'invasion et la progression tumorale.

- Autres gènes :

La β caténine semble participer à la régulation, probablement indirecte, des gènes codant pour COX-2 et PPAR δ . Les données bibliographiques restent divergentes concernant la régulation dont PPAR δ fait l'objet.

IV.3.1.3. Altération de la voie canonique de Wnt au cours de la cancérogenèse colique

Il n'existe à ce jour aucune preuve de l'implication des voies de signalisation non canoniques dans la tumorigenèse colique. Seules des mutations dans la voie classique ont été identifiées au cours de ce processus. Des mutations inactivatrices dans le gène APC, le gène Axine ou des mutations activatrices dans le gène codant la β caténine, conduisent à une activation constitutive de la voie de Wnt et par conséquent à une transcription constitutive des gènes qu'elle régule.

De plus, parce que la localisation de la β caténine est intimement liée à sa fonction, la présence de grandes quantités de β caténine dans le noyau des cellules coliques est positivement corrélée à un mauvais pronostic clinique.

IV.3.2. β caténine et alimentation

A ce jour, aucun lien direct entre l'alimentation, sa qualité et sa quantité, et la β caténine n'a été établi. Cependant, parce que la β caténine peut être utilisée comme un marqueur de la cancérogenèse colique, sa localisation et sa quantification sont souvent établies dans l'étude de la modulation de la cancérogenèse par des régimes alimentaires (*Mutanen et al., 2000*; *Schmelz et al., 2001*; *Jaszewski et al., 2004*).

IV.3.3. β caténine et PPARs

Dans le tissu adipeux, PPAR γ est impliqué dans le processus de différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures (adipogenèse). Moldes et al. (2003) ont montré que la différenciation médiée par PPAR γ était associée à une diminution du taux de β caténine dans ce tissu. Ainsi, PPAR γ s'oppose à l'inhibition de l'adipogenèse médiée par la voie de signalisation Wnt (*Ross et al., 2000*). L'antagonisme apparent de ces deux voies de signalisation suggère une régulation de la β caténine par PPAR γ . Un traitement par un agoniste de PPAR γ à des souris génétiquement obèses (db/db) a permis de déterminer que le gène CTNNB1 codant pour la β caténine était probablement un gène cible de PPAR γ dans le tissu adipeux. En effet, Gerhold et al. (2002) ont observé une diminution de l'expression de CTNNB1 consécutive à l'utilisation de TZDs, agonistes de PPAR γ .

Puisque PPAR γ est capable d'altérer la croissance de nombreuses cellules tumorales, l'hypothèse d'un mécanisme d'action comparable à celui observé dans le tissu adipeux a été envisagée. Cependant, aucun élément de réponse aux PPARs n'a encore été mis en évidence dans le promoteur du gène CTNNB1. De plus, il n'est pas exclu que PPAR γ intervienne dans la régulation post-traductionnelle de la β caténine. En effet, l'activation de PPAR γ dans des cellules cancéreuses pancréatiques a conduit à augmenter l'expression de la cadhérine E et ainsi à favoriser la translocation de la β caténine cytosolique vers les membranes (*Ohta et al., 2002*). De plus, la régulation de la β caténine par PPAR γ dans les hépatocytes semble indépendante de celle exercée par le complexe GSK-3 β -APC-Axine puisque PPAR γ affecte le taux de β caténine de manière équivalente lorsque ce complexe n'est plus fonctionnel. Ceci est confirmé par le fait que PPAR γ ne modifie pas l'état de phosphorylation de la β caténine (*Sharma et al., 2004*). Pourtant il a pu être observé que PPAR γ pouvait prévenir la migration des cellules endothéliales induite par VEGF (phénomène impliqué dans la néovascularisation) en altérant la régulation de la protéine Akt et des MAP

kinases qui inhibent la GSK-3 β (Goetze *et al.*, 2002). Les travaux de Girnun *et al.* (2002) confirment que PPAR γ affecte le taux de β caténine dans les cellules épithéliales coliques et réduit ainsi leur sensibilité vis-à-vis de cancérogènes chimiques.

Dans ce tissu, l'action de PPAR γ est dépendante de la fonctionnalité de APC (Girnun *et al.*, 2002). Or, comme PPAR γ régule la β caténine, cette dernière pourrait participer à la régulation des gènes cibles contrôlés par PPAR γ et ainsi participer à sa propre régulation. En effet, un travail récent révèle que la surexpression de la β caténine induit une surexpression de PPAR γ et établit clairement qu'elle favorise la transactivation des gènes cibles de PPAR γ (Jansson *et al.*, 2005).

Le gène codant pour PPAR δ pourrait subir une régulation positive par la β caténine. Cependant, à ce jour, non seulement la régulation transcriptionnelle de PPAR δ reste mal comprise mais les mécanismes d'action de cette isoforme sont inconnus.

IV.3.4. β caténine, RARs, RXRs et rétinoïdes

Les rétinoïdes contribuent à moduler la prolifération des cellules coliques. Tout comme pour PPAR γ , un mécanisme d'action potentiel pourrait consister à s'opposer à la prolifération stimulée par la voie de Wnt. Byers *et al.* (1996) ont montré que l'effet différenciateur de l'acide 9-*cis* rétinoïque sur des cellules cancéreuses mammaires était associé à une augmentation de l'adhésion intercellulaire ainsi qu'à une stabilisation de la β caténine. Les deux phénomènes sont probablement liés puisqu'une augmentation concomitante de la translocation de la β caténine vers la membrane a été observée. Le complexe cadhérine E- β caténine, également activé par l'acide rétinoïque tout-*trans*, joue un rôle fondamental dans la communication intercellulaire au sein des jonctions adhérentes et permet de prévenir le processus invasif (Vermeulen *et al.*, 1995).

Easwaran *et al.* (1999) n'excluent pas la possibilité que les rétinoïdes puissent aussi prévenir, via l'activation des RARs, la transcription induite par la β caténine. En effet, dans des cellules coliques, RAR est capable de prévenir l'hétérodimérisation de la β caténine en séquestrant ses co-facteurs de transcription, TCF/LEF. Ces observations sont en accord avec la répression de la transcription induite par la β caténine, du gène codant pour la cycline D1 par l'acide rétinoïque (Shah *et al.*, 2002). RAR peut aussi trans-réprimer la transcription des gènes cibles de la β caténine en créant une compétition pour un co-activateur de transcription commun, p300 (Shah *et al.*, 2003). Il est aussi plausible que, via un mécanisme comparable, la β caténine puisse s'opposer à la transcription des gènes cibles de RAR.

Par ailleurs, il existe une autre voie, initiée par RXR, qui régule le taux de β caténine. En effet, Xiao et al. (2003) ont mis en évidence la capacité de RXR à déclencher la dégradation de la β caténine indépendamment de l'activité d'APC.

De façon surprenante, Mollersen et al. (2004) ont récemment observé un effet stimulateur de l'acide rétinoïque sur la formation de tumeurs chez des souris Min/+. Ce résultat révèle que, tout comme pour PPAR γ , l'altération de l'activité de la β caténine par RAR pourrait être influencée par le statut du gène APC. De plus, si l'on n'exclut pas la possibilité pour l'acide rétinoïque de favoriser la dégradation de la β caténine par le complexe APC-GSK-3 β -Axine, ce mécanisme devient stérile lorsque APC est muté. Il a été aussi récemment évoqué la participation de APC dans le contrôle de la biosynthèse de l'acide rétinoïque. En effet, APC régule l'expression de la rétinol déshydrogénase L (RDHL) dans les cellules épithéliales coliques. Ainsi, l'inactivation de APC pourrait altérer la biosynthèse de l'acide rétinoïque et ce mécanisme pourrait aussi participer au développement tumoral (Jette et al., 2004).

IV.4. β caténine et COX-2

L'existence de relations entre ces deux protéines est établie depuis qu'il a été montré la régulation de l'expression de COX-2 par la β caténine (Oshima et al., 1996; Prescott et White, 1996; Mei et al., 1999). L'utilisation de cellules HT-29 APC^{-/-}, qui surexpriment COX-2, révèle que l'introduction de la protéine APC sauvage conduit à une diminution du taux de protéine COX-2, sans modifier la transcription du gène, et rend les cellules sensibles à l'apoptose. Ces résultats suggèrent que APC pourrait limiter la traduction des ARNm COX-2 (Hsi et al., 1999). Dans des lignées de cellules cancéreuses mammaires, il a cependant été observé une augmentation des ARNm et du taux de COX-2 consécutive à la surexpression de la β caténine (Howe et al., 1999). Or, chez l'Homme, si le promoteur du gène COX-2 contient des sites potentiels de liaison de TCF, il n'a pas encore été observé d'activation de gènes rapporteurs suite à la surexpression de la β caténine. Il est possible que les relations entre COX-2 et β caténine soient indirectes, via un intermédiaire non encore identifié.

Certains NSAIDs et COXIBs sont capables d'induire une augmentation des ARNm APC (Kishimoto et al., 2000) et de favoriser ainsi la phosphorylation inactivante de la β caténine (Boon et al., 2004). Ils peuvent aussi limiter l'accumulation nucléaire de la β caténine dans les tumeurs d'animaux chimio-induits pour la cancérogenèse colique (Brown et al., 2001), dans des lignées de cellules cancéreuses coliques humaines (Smith et al., 2000; Hawcroft et al., 2002; Gardner et al., 2004) ainsi qu'au niveau d'adénomes de patients atteints de la FAP

(Boon *et al.*, 2004). Ainsi, il ne peut être exclu que l'inhibition de COX-2 puisse se faire indirectement, via la modulation de la voie de Wnt.

PPAR δ est une cible commune des voies de Wnt et de la cyclooxygénase-2 puisque la β caténine pourrait induire la transcription de son gène et l'activité COX-2 lui assure la disponibilité de ligands (Figure 20). Ainsi, la production et l'utilisation d'antagonistes de PPAR δ pourraient participer au traitement du cancer colorectal (Wang *et al.*, 2004b) sous réserve de clarifications concernant sa régulation et sa fonction. En effet, l'accumulation de données divergentes concernant la régulation et l'action cellulaire de PPAR δ (Reed *et al.*, 2004) s'oppose actuellement à l'utilisation de ce récepteur comme candidat pour des interventions thérapeutiques ou préventives.

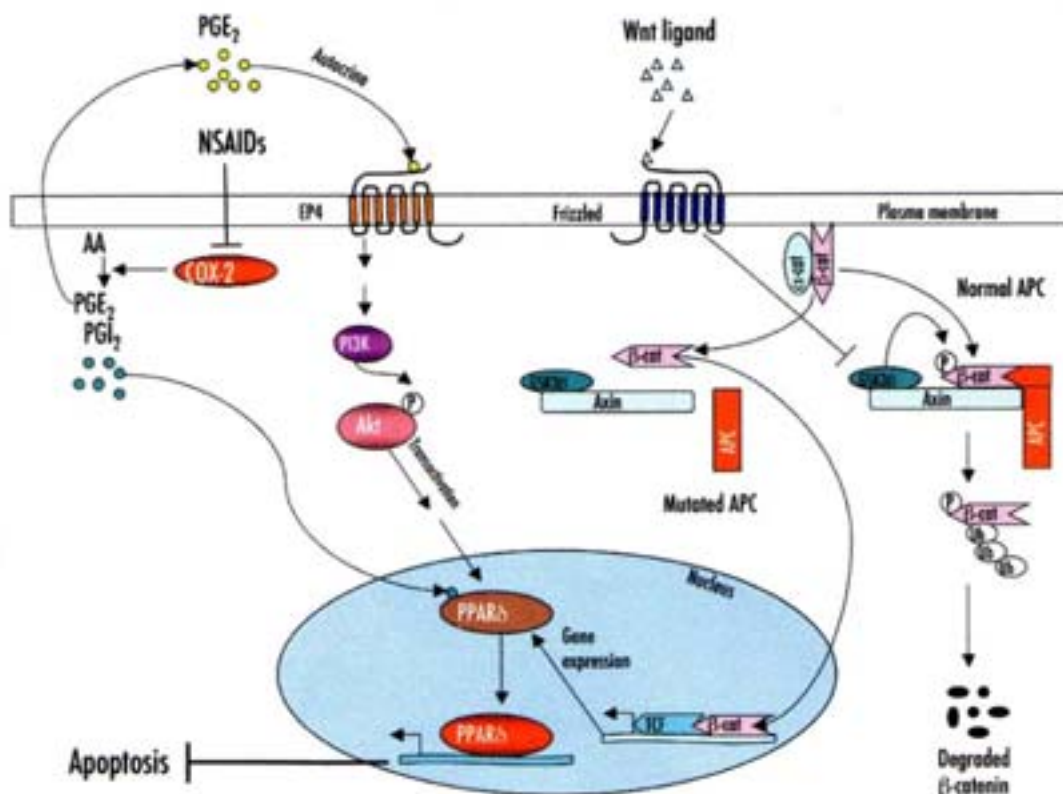


Figure 20. PPAR δ incarne un point de convergence entre les voies de signalisation de Wnt et de la COX-2 (d'après Wang *et al.*, 2004b)

Abréviations : AA : acide arachidonique; Akt : protéine kinase B; APC : adenomatous polyposis coli; α/β -cat : α/β caténine; COX-2 : cyclooxygénase-2; EP : récepteur des prostaglandines; GSK : glycogène synthase kinase; NSAID : anti-inflammatoires non stéroïdiens; PG : prostaglandine; PI3K : phosphoinositide-3 kinase; PPAR : récepteur activé par les proliférateurs de peroxyssomes; TCF : T-cell transcription factor.



Objectif de la Thèse

Objectif de la Thèse

Les êtres vivants sont en constante interaction avec leur environnement. Les nutriments sont capables de moduler l'expression de gènes spécifiques non seulement impliqués dans leur propre métabolisme mais aussi dans le contrôle de la croissance et de la mort cellulaire. Des dérégulations de ce processus pourrait être à l'origine de certaines pathologies comme l'obésité et le cancer. Cependant, le caractère initialement adaptatif d'un tel processus pourrait également dans l'avenir être utilisé dans un but thérapeutique.

Les mécanismes moléculaires sous-tendant les effets modulateurs des nutriments sur l'incidence du cancer colorectal sont mal connus. Cependant un mécanisme majeur par lequel les nutriments et les comportements alimentaires peuvent agir directement sur le contrôle de gènes est la régulation de l'expression et de l'activation de récepteurs nucléaires (Figure 21). Les données présentées dans le premier chapitre de ce manuscrit établissent clairement l'implication de ces protéines dans la cancérogenèse colorectale.

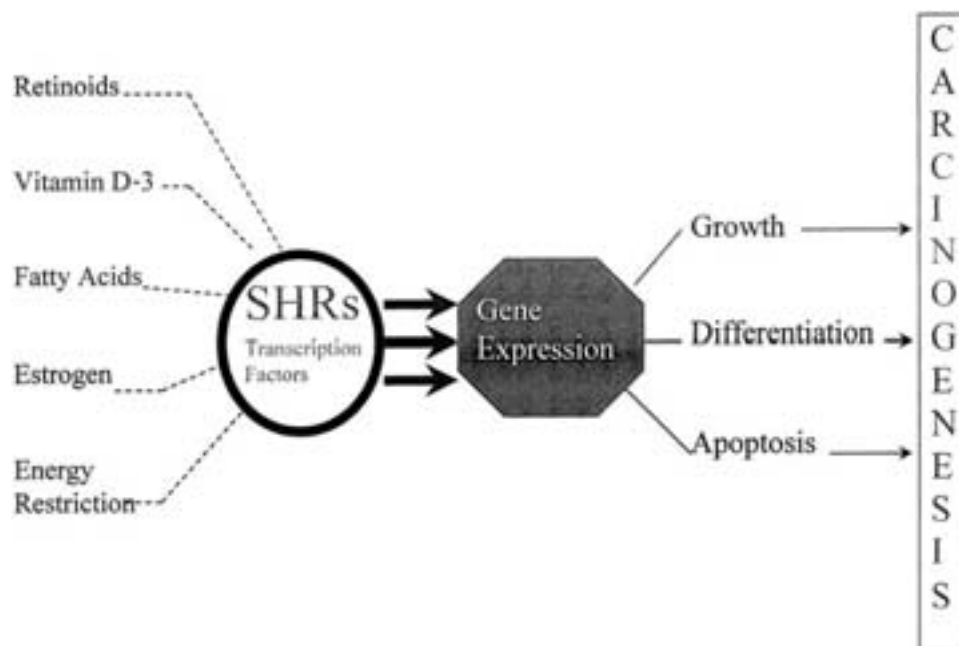


Figure 21. Diagramme schématisé de l'interaction de plusieurs nutriments via l'activation de récepteurs nucléaires (d'après *Belury, 1999*)

Abréviations : SHR : steroid hormone receptor.

Objectif de la Thèse

Les données bibliographiques présentées dans le **Chapitre I** révèlent l'implication forte des acides gras et des rétinoïdes non seulement dans la modulation du risque de CCR mais plus strictement sur les récepteurs PPARs, RXRs et RARs qui sont les médiateurs majeurs de leurs actions. Ainsi, ces facteurs de transcription pourraient intervenir directement dans la relation Alimentation-Cancer.

La première de nos hypothèses de travail suggère qu'un apport alimentaire excessif en acides gras pourrait affecter l'expression des récepteurs nucléaires activés par les nutriments contribuant alors à la promotion de la cancérogenèse colique. De la même manière, la consommation de rétinoïdes, modulant l'expression des récepteurs de l'acide rétinoïque, pourrait participer à la prévention nutritionnelle vis-à-vis du CCR.

Dans l'effet délétère d'un apport énergétique excessif, sont incriminés à la fois la qualité et la quantité des acides gras. Ainsi, dans l'objectif d'éprouver nos hypothèses de travail, nous avons mis en œuvre deux approches expérimentales, l'une basée sur l'utilisation d'un régime hyperlipidique riche en un acide gras poly-insaturé n-6, l'autre sur celle d'un régime très déséquilibré, inducteur de prise de poids et contenant plusieurs types d'acides gras, sur des groupes d'animaux chimio-initiés pour la cancérogenèse colique. Dans chacune des approches, les effets de la vitamine A ont été explorés.

Dans le but de décrire ou prédire l'effet délétère ou protecteur des nutriments considérés, nous avons cherché à quantifier l'expression de la β caténine et de la cyclooxygénase-2.

Les résultats de ces travaux sont présentés dans le **Chapitre II**.

Le surpoids et l'obésité, ainsi que les maladies associées regroupées sous le nom de Syndrome X, constituent un risque majeur de développer un cancer colorectal. Or, les récepteurs nucléaires pourraient représenter un relai principal dans cette relation causale. Conformément aux orientations générales des recherches sur la relation Nutrition-Cancer, nous avons cherché à caractériser l'expression des récepteurs nucléaires et de la cyclooxygénase-2, dans les muqueuses coliques saines et tumorales de patients en surpoids ou obèses ayant développé un CCR.

Les résultats de cette étude font l'objet du **Chapitre III**.



Chapitre II : Etudes Expérimentales

Chapitre II : Etudes Expérimentales

I. Effets d'un régime hyperlipidique riche en acide linoléique sur le profil d'expression des récepteurs nucléaires PPAR γ et RAR β /RXR α

Les études réalisées sur des modèles animaux établissent que le lien étroit entre la consommation des lipides et le risque de cancer colorectal dépend du type d'acides gras ingérés. En effet, l'utilisation d'huiles dont la teneur en AGPI n-6 (principalement AA et LA) est élevée correspond à une promotion du processus de cancérogenèse colique chez des animaux chimio-induits (*Wu et al., 2004*) alors que la consommation d'huiles riches en AGPI n-3 aurait une action protectrice (*Roynette et al., 2004*).

L'aptitude des acides gras à moduler le risque de cancer colorectal implique des mécanismes encore mal connus et mal compris. Il est cependant clair que ces nutriments agissent au niveau cellulaire sur plusieurs voies de signalisation (*Hwang et Rhee, 1999*). Il est aujourd'hui établi que l'un des mécanismes de l'action cellulaire des acides gras, et principalement des AGPIs, implique l'intervention des PPARs qui régulent la transcription de gènes, non seulement impliqués dans le métabolisme lipidique, mais aussi dans diverses réponses cellulaires (*Clay et al., 2000*). Les données bibliographiques présentées dans le premier chapitre de ce manuscrit révèlent que l'implication de l'isoforme γ des PPARs au cours du développement du cancer colorectal est indiscutable mais sa contribution reste encore relativement inconnue.

Un acide gras modifié, l'acide rétinoïque tout-*trans* (métabolite actif de la vitamine A) exerce aussi des fonctions cellulaires via l'activation de récepteurs nucléaires, les RARs. L'expression des RARs est souvent altérée dans les tumeurs colorectales. L'isoforme β de RAR est considérée comme ayant une activité de suppresseur de tumeur. En effet, l'intervention d'un phénomène d'hyperméthylation du promoteur réduisant le gène au silence au cours de la cancérogenèse colorectale suggère fortement que l'expression de RAR β peut compromettre la survie des cellules anormales (*Xu et al., 2004*).

Les actions cellulaires de PPAR γ et de RAR β sont dépendantes de la présence de RXR, récepteur de l'acide rétinoïque 9-*cis*, ainsi que des co-activateurs de transcription spécifiques que celui-ci recrute. Ainsi, RXR est un point de convergence essentiel entre les voies de signalisation de PPAR γ et de RAR β .

Dans ce premier travail nous avons envisagé qu'un régime hyperlipidique, riche en acide linoléique et promoteur de la cancérogenèse colique, pourrait modifier précocément à la fois l'expression des ARNm de PPAR γ et celle des récepteurs de l'acide rétinoïque, RAR β et RXR α . Parce que ces récepteurs régulent directement l'expression de gènes cibles et sont impliqués dans la cancérogenèse colique, des altérations précoces de leurs profils d'expression pourraient alors être associées et/ou participer au processus de cancérogenèse.

Ainsi, les objectifs spécifiques de cette étude étaient :

- (i) de confirmer l'effet promoteur d'un régime riche en acide linoléique sur le processus de cancérogenèse colique et d'examiner, dans ce contexte, l'expression des récepteurs PPAR γ , RXR α et RAR β ,
- (ii) de déterminer l'effet conjoint de ce régime hyperlipidique et de la vitamine A, à la fois, sur l'étape promotionnelle de la cancérogenèse et sur le profil d'expression de leurs récepteurs,
- (iii) de comparer les profils d'expression de ces récepteurs chez des rats initiés ou non par la DMH.

Les résultats obtenus ont fait l'objet de **l'article 1** publié dans ***Nutrition and Cancer*** (Delage et al., 2004. 48(1):28-36).

I.1. Méthodologie

- *Choix du modèle animal*

Différents modèles animaux sont utilisés pour étudier la cancérogenèse colorectale proprement dite et les divers paramètres pouvant potentiellement influencer ce processus. Principalement, il s'agit des souris APC^{Min}/+ ou d'animaux (rats et souris) traités avec un cancérogène chimique spécifique du côlon, l'azoxyméthane (AOM) ou son précurseur, la 1,2-diméthylhydrazine (DMH). Les souris Min, qui présentent une mutation de type nonsense sur un des allèles du gène APC, développent spontanément des adénomes colorectaux. Si elles sont considérées comme un bon modèle du cancer sporadique humain, il semble qu'il ne s'agisse

pas du modèle le mieux adapté pour l'étude de l'implication des récepteurs PPAR γ et RAR β dans le cancer colorectal (*Girnun et al., 2002; Mollersen et al., 2004*).

Ainsi, nous avons préféré l'utilisation de rats mâles F344 initiés chimiquement avec la DMH. Ces animaux développent spontanément des foyers de cryptes aberrantes (*Furukawa et al., 2002*) ce qui suggère qu'ils pourraient avoir une sensibilité accrue aux inducteurs chimiques et aux facteurs environnementaux dont l'alimentation fait partie.

- Choix de la dose d'initiateur chimique injecté

Dans le but de limiter d'éventuelles modifications des profils d'expression des récepteurs consécutives à l'utilisation de la DMH, une faible et unique dose de ce cancérogène (15mg/kg) - comparativement aux doses répertoriées dans la bibliographie - a été injectée ip un mois après le début de l'expérimentation.

- Régimes alimentaires

Durant 20 semaines, les rats F344 ont été soumis à l'un des 3 régimes se distinguant par leur teneur en huile de carthame (5 ou 25%) et par leur teneur en palmitate de rétinol (5 ou 200UI/g d'aliment). L'huile de carthame contient approximativement 73% d'AGPI dont une large part correspond à l'acide linoléique (C18:2 n-6) (**Tableau IV**). La vitamine A est présente sous sa forme alimentaire, d'esters de rétinol.

Tableau IV. Composition en acides gras de l'huile carthame
(d'après le *Manuel des Corps Gras*, 1992)

	% relatif
	Moyenne
C14	<0.1
C16	6 à 7
C16:1	<0.5
C18	2 à 3
C18:1	10 à 20
C18:2	68 à 83
C18:3	<0.2
C20	<0.5
C20:1	<0.2
C22	<0.2

Les animaux sont astreints à l'un des 3 régimes alimentaires (CD, Control Diet : 5% huile et 5UI/g palmitate de rétinol; HFD, High Fat Diet : 25% huile et 5UI/g palmitate de rétinol; VAHFD, Vitamin A supplemented-High Fat Diet : 25% huile et 200UI/g palmitate de rétinol) tout au long de l'expérience (Figure 1, article 1). En effet, si les acides gras semblent agir préférentiellement au stade promotionnel, la vitamine A modulerait plutôt l'étape d'initiation.

I.2. Principaux résultats

Ces travaux ont permis :

- (i) de fournir un modèle pour l'étude de l'expression des récepteurs nucléaires dans un contexte d'alimentation hyperlipidique riche en un acide gras, l'acide linoléique,
- (ii) de vérifier que la consommation du régime HFD a un effet promoteur sur le processus de cancérogenèse (Tableau 4, article 1),
- (iii) d'observer que l'effet promoteur était associé à des altérations de l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires à la fois chez les animaux initiés et non initiés à la DMH (Tableau 5, article 1),
- (iv) de montrer que la supplémentation du régime HFD en palmitate de rétinol prévient l'effet promoteur lié au régime hyperlipidique et est associée à un profil d'expression des récepteurs équivalent à celui observé avec le régime contrôle (Tableau 5, article 1).

En effet, chez les rats chimio-induits, l'effet promoteur du régime HFD sur le nombre et la multiplicité des cryptes aberrantes présentes dans la muqueuse colique s'accompagne d'un taux d'ARNm PPAR γ significativement augmenté et de taux significativement réduits des ARNm des récepteurs de l'acide rétinoïque, RAR β et RXR α .

La présence de vitamine A associée à l'apport excessif d'huile de carthame (i) prévient la promotion de la cancérogenèse et (ii) pour partie, s'oppose aux effets de HFD sur les taux d'ARNm des récepteurs ou rétablit des taux proches de ceux observés dans la muqueuse colique des rats soumis au régime contrôle.

L'utilisation des régimes CD et HFD chez des animaux initiés et non initiés a permis d'évaluer l'effet modulateur de la DMH sur les taux d'expression des récepteurs et met en évidence la capacité d'un régime alimentaire, indépendamment de la présence de l'initiateur chimique, à modifier l'expression des récepteurs.

I.3. Article 1

Article 1 :

'Vitamin A prevents high fat diet-induced ACF development and modifies the pattern of expression of peroxisome proliferator and retinoic acid receptor mRNA'

Vitamin A Prevents High Fat Diet-Induced ACF Development and Modifies the Pattern of Expression of Peroxisome Proliferator and Retinoic Acid Receptor m-RNA

Barbara Delage, Rachel Groubet, Véronique Pallet, Céline Bairras, Paul Higuieret, and Pierrette Cassand

Abstract: Some dietary compounds, among them fats, are modulators of colon cancer risk. This study reports the modulating effects of n-6, with or without vitamin A, on promotion of colon preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) and on the expression of nuclear receptors (PPAR γ , RXR α , and RAR β). One group of male Fisher rats was fed a basic diet (5% safflower oil) and two groups were fed a high-fat diet (HFD, 25% safflower oil). Of these, one was supplemented with 200 IU vitamin A for 5 mo. The safflower oil contained polyunsaturated fatty acids, mainly linoleic acid (73%). The data showed an increasing effect of safflower oil-enriched diet on aberrant crypt foci occurrence and multiplicity. This effect was impaired by vitamin A supplementation. In addition, an HFD-related up-regulation of PPAR γ and a concomitant down-regulation of RAR β mRNA expression were observed with or without chemical initiation and were prevented by vitamin A. Moreover, when treated with DMH, HFD rats exhibited a dramatically decreased expression of RXR α mRNA (-49%). It was hypothesized that HFD, leading to hyperexpression of PPAR γ , would produce an alteration of retinoic acid signaling and, in this way, create a background modulating colon cancer risk.

Introduction

Colon cancer is the most common gastrointestinal cancer and the fourth leading cause of cancer deaths in the world. Genetic factors alone are unable to explain the geographical differences observed in colon cancer incidence. Lifestyle and especially diet are considered to be epigenetic factors involved in the onset of colorectal cancer. Some diet components, such as fruits, vegetables, and seeds (containing fiber and vitamins), seem to have a positive impact on health, whereas others may favor cancer onset. A high-fat diet (HFD) has been particularly singled out to have the most important nutritional influence on colon cancer development

(1-3). Several epidemiological studies have provided evidence for an association between total dietary fat or energy intake and an increased colon cancer risk (1,4).

The fatty acid composition of foods seems to be of critical importance (5), and all fatty acids do not appear to be comparable in their relationship to this disease. Although the involvement of specific fatty acids has not been exhaustively studied, some recent epidemiological and experimental data have clearly linked dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) with a high colon cancer risk. Moreover, a high ratio between linoleic acid (LA, n-6 PUFA, C18:2) and docosahexanoic acid (n-3 PUFA, C22:6) has been observed to be correlated with tumor-promoting effects in the breast and colon (6,7). LA, an essential n-6 PUFA, is especially found in vegetable seeds and oils from safflower, sunflower, soybean, and corn. Until recently, n-6 PUFAs were widely recommended, but long-term bad effects on health, such as tumorigenesis, hyperinsulinemia, and atherosclerosis, are now associated with them. Such observations have led to interrogations about how n-6 PUFAs act at the cellular level to modify the balance between proliferation and differentiation.

One efficient and direct mechanism for fatty acids to induce a genomic response involves nuclear receptors called peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). In fact, overexpression of the cyclooxygenase-2 enzyme in colon tumors (8) provides PPAR ligands (especially prostaglandins) from n-6 fatty acids. However, several PUFAs such as LA can activate PPARs without any metabolism. PPARs are members of the steroid nuclear receptor superfamily. These receptors act as ligand-activated transcription factors. Three major subtypes of PPAR, α , δ , and γ , have been originally described as involved in the control of lipid metabolism and cellular homeostasis. These transcription factors belong to the class II superfamily of nuclear receptors, which heterodimerize with Retinoic X receptor (RXR) and bind to specific direct repeats on DNA. PPAR γ activation has been

shown to have seemingly pleiotropic consequences such as proliferation, differentiation, and apoptosis (9). This may be explained either by the large number of PPAR ligands identified (10–12) or by the capacity of PPAR to modulate the expression of genes implicated in a large range of cellular biological responses. The implication of PPAR in tumorigenesis was first proposed by Hill and Melanson (13) and later by Reddy et al., after observation of correlations between dietary fat and colorectal cancer (14).

Contrary to the effects of n-6 PUFA, other dietary components such as vitamin A may play positive roles in the prevention of colon tumorigenesis. Thus, the occurrence of colon cancer would increase with vitamin A deficiency, and vitamin A supplementation could reduce colon cancer risk (15). Retinoids regulate a wide range of biological processes, including cellular proliferation, differentiation, and development (16). They are generally accepted to be chemopreventive agents against carcinogenesis (17) and as relevant molecules for chemotherapy to fight against a wide range of human cancers (18,19). Among retinoids, the best results have been obtained with all-*trans*-retinoic acid, which is an active metabolite of vitamin A (20). Biological effects of retinoids are in part mediated by two nuclear receptors, RAR and RXR, which belong, as does PPAR, to the class II steroid receptor superfamily (21,22). All isoforms, RAR α , β , and γ and RXR α , β , and γ , are mainly expressed during development and differentiation processes. Among these receptors, RAR β has come to light as being involved in the maintenance of a differentiated cellular state. Consistent with this, silencing or abnormal expression of the RAR β gene has been reported in several human cancer cell lines including colon cancer cell lines (23).

As has been previously shown in rat liver and adipose tissue (24), we suggest that a HFD induces modifications in the pattern of expression of these nuclear receptors. Under these conditions, fatty acids such as LA could promote colon carcinogenesis not only by modifying target genes of PPAR but also by disturbing the vitamin A pathway. Another vitamin A metabolite, 9-*cis*-retinoic acid, which binds to RXR, also seems able to prevent *in vitro* invasion by colon cancer cells (25). Moreover, RXR α , particularly expressed in colonic crypts (22), is the common partner for PPAR γ and RAR β in the mediation of the effects of fatty acids and retinoic acid, respectively.

To better understand the implication of diet in the risk of tumor onset, the earliest molecular disturbances induced by fatty acids in the early stage of colon carcinogenesis need to be identified. Therefore, the purpose of the current study was to examine the effects of a LA (n-6 PUFA)-enriched diet individually and in combination with vitamin A on the promotion of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colonic preneoplastic lesions in rats. In addition, whether these diets modify the mRNA expression of the nuclear receptors involved (PPAR γ , RXR α , and RAR β) was investigated. Their role as transcription factors makes them relevant candidates for the mediation of the effects of a HFD and vitamin A on the occurrence of preneoplastic lesions.

Materials and Methods

Animals

Sixty weanling male F344 rats, weighing 50–80g, were purchased from Harlan (Gannat, France). They were randomly divided into three experimental groups and housed singly with a 12 h:12 h light-dark cycle at 50% humidity and $21 \pm 1^\circ\text{C}$. All rats were fed and given water *ad libitum*. Each rat was weighed three times weekly.

Diets

The rats were assigned to one of three dietary groups (Table 1). Each diet was obtained as a dry powder from the Institut National de la Recherche Agronomique (Centre de Recherches, domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas, France). Vitamin and mineral mixes of the diets were used as described by Potier de Courcy et al. (26). Lipids added to the powder for the control diet (CD) and for the HFD were 5 and 25 g, respectively, of safflower oil per 100 g of diet. The third group was fed an HFD supplemented with vitamin A (VAHFD, 200 IU retinyl palmitate/g diet). The safflower oil (Provence Régime, Pont-Saint-Esprit, France) contained approximately 73.4% of PUFAs, mainly LA (C18:2 n-6) (27). The composition of CD and HFD did not take into the account that 2 g of carbohydrate are needed to provide the same caloric intake as 1 g of lipid. Then, the HFD provided 2,050 kJ/100 g diet and the CD provided only 1,620 kJ/100 g diet.

The fatty acid composition (Table 2) was determined after chloroform:methanol (2:1 vol/vol) extraction (28). After

Table 1. Composition of Experimental Diets^a

Component	CD	HFD	VAHFD
Casein ^b	18	18	18
Safflower oil ^b	5	25	25
Corn starch ^b	70.3	50.3	50.3
Cellulose ^b	1.9	1.9	1.9
Mineral mix ^c	3.8	3.8	3.8
Vitamin mix ^d	1	1	1
Retinyl palmitate ^e	5	5	200
Energy intake ^f	1,620	2,050	2,050

^a: Abbreviations are as follows: CD, control diet; HFD, high fat diet; VAHFD, high fat diet supplemented with vitamin A.

^b: Values are g/100 g diet.

^c: Mineral mix composition (per kg mineral mix): 380 g calcium monohydrogen phosphate, 240 g dipotassium phosphate, 180 g calcium carbonate, 69 g sodium chloride, 20 g magnesium hydroxide, 90 g magnesium sulfate, 8.6 g iron sulfate, 5 g zinc sulfate, 5 g manganese sulfate, 1 g copper sulfate, 20 mg cobalt carbonate, 40 mg potassium iodide, 20 mg ammonium molybdate, 20 mg sodium selenite, 800 mg sodium fluoride, and 500 mg chromium potassium sulfate dodecahydrate.

^d: Vitamin mix composition (mg/kg diet): 1,500 choline concentrate (50%), 100 vitamin E (500 IU/g), 25 vitamin D3 (100,000 IU/g), 45 niacin, 30 calcium pantothenate, 10 thiamin hydrochloride, 10 riboflavin, 10 pyridoxine hydrochloride, 100 ascorbic acid, 50 *p*-aminobenzoic acid, 2 folic acid, 13.5 vitamin B-12 concentrate (1 g/kg), 10 *D*-biotin, 1 menadione, 50 *meso*-inositol, and 8,033.5 sucrose.

^e: IU/g of diet.

^f: Values are kJ/100 g diet.

Table 2. Composition of Fatty Acids in Different Diets (g/kg dry weight)^a

	CD (5% safflower oil)	HFD (25% safflower oil)
C12:0	— ^b	— ^b
C14:0	0.05	0.27
C16:0	3.52	17.60
C18:0	1.42	7.15
SFA total	4.99	25.02
C16:1 (n-7)	— ^c	— ^c
C18:1 (n-7)	5.00	24.95
C20:1 (n-9)	— ^c	— ^c
MUFA1 total ^d	5.00	24.95
C18:2 (n-6)	38.85	194.25
C18:3 (n-3)	0.05	0.25
Other ^b	1.14	5.08

a: Abbreviations are as follows: CD, control diet; HFD, high fat diet; SFA, saturated fatty acids; MUFA, mono unsaturated fatty acids.

b: Includes fatty acids detected at <0.1% of total fatty acid weight and fatty acids not identified.

c: Fatty acids not detected.

d: MUFA, monounsaturated fatty acid.

methylation by boron fluoride methanol (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) at 100°C for 10 min, methylated extracts were analyzed by gas-liquid chromatography. Diets were freshly mixed three times a week. To minimize oxidation, oil was stored in the dark, at 4°C, under nitrogen.

Experimental Protocol

The experimental procedure is summarized in Fig. 1. Rats were fed one of the three diets during a 5-mo period. After 1 mo of diet, the animals were given either one intraperitoneal injection of DMH (15 mg/kg, Fluka, Saint Quentin Fallavier, France) or an injection of the vehicle (0.9% NaCl solution).

Rats were sacrificed 5 mo after the beginning of the experiment. Colons were rapidly removed, slit open longitudinally, and cleaned with ice-cold 0.9% NaCl solution. Except for aberrant crypt foci (ACF) analysis, mucosal scrapings were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

ACF Analysis

The ACF were scored using the procedure described by Bird (29). Immediately after the animals were sacrificed, colons were removed and flushed with NaCl 0.9% at 4°C and then opened longitudinally, cut into 5-cm segments, and fixed flat between two pieces of filter paper in 10% buffered formalin (Sigma). After 48 h in buffered formalin, each piece of colon was stained with a 0.2% methylene blue PBS solution (Sigma) for 5 min. The mucosal side was then observed mounted on a microscope slide at $\times 50$ magnification. ACF were distinguished from the surrounding normal crypts by their increased staining, size, and the easily discernible pericryptal zone. Crypt multiplicity was determined as the number of crypts in each focus and scored blindly by a single observer.

RNA Extraction and Reverse Transcription

Total RNA was isolated from colonic mucosa using an extraction kit (RNagents Total RNA Isolation System, Promega, Charbonnières, France). Total RNA mixed with RNasin (40 U, Life Technologies, Cergy Pontoise, France) and with DNase (20 U, Life Technologies) was incubated for 15 min at 37°C to denature DNA and inhibit RNase. Reverse primers were then added and incubated for 10 min at 70°C. After that, the solution was mixed with 5X First Strand Buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), DTT (0.1 M, Invitrogen), dNTP (10 mM each one, Invitrogen), and Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies) for 1 h at 42°C. The total volume was 40 μ l. Parallel reactions for each RNA sample were run in the absence of Superscript II reverse transcriptase to assess the degree of any contaminating genomic DNA. Moreover, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) reactions without any RNA sample were also done to verify the absence of any other contamination.

Quantification of PPAR γ cDNA or RXR α cDNA by Real-Time PCR

Real-time PCR assay involving LightCycler™ technology associates rapid thermocycling with on-line fluores-

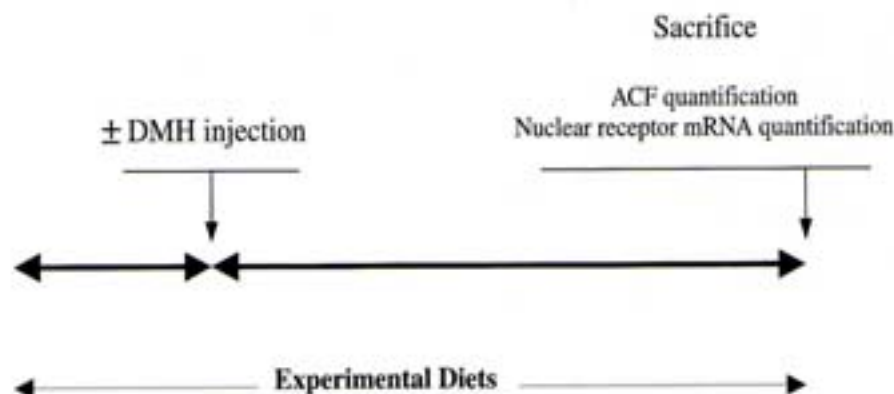


Figure 1. Experimental design. DMH, 1,2-dimethylhydrazine; ACF, aberrant crypt foci.

cence detection of the PCR products. PCR reactions were performed in a volume of 20 μ l containing oligonucleotide primers (5 μ M of each), MgCl₂ (5 mM), and DNA Master SYBR Green (Roche Diagnostics, Meylan, France) containing Taq DNA polymerase, reaction buffer, dNTP, and the double-stranded DNA-specific fluorescent dye SYBR Green I. Amplification occurred in a two-step procedure: 1) denaturing at 95°C for 10 min and 30 cycles with denaturing at 95°C for 8 s and 2) annealing at 60°C for 6 s and extension at 72°C for 10 s. After each elongation phase, the fluorescence of SYBR Green I was measured, and increasing amounts of PCR products were monitored from cycle to cycle. For each primer pair used, melting curve analysis showed a single melting peak after amplification, indicating specific product. Moreover, PCR products were subjected to analysis by electrophoresis on a 1.5% agarose gel (Sigma). The identity and specificity of amplified products were also verified by sequencing with the Dye Terminator Reaction Cycle Kit (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) and were analyzed on an ABI PRISM™ 377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer). Quantification data were analyzed using LightCycler analysis software, version 3.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). In this analysis, the background fluorescence was removed by setting a noise band. The log-linear portion of the standard amplification curve was identified, and the crossing point (Cp) was the intersection of the best-fit line through the log-linear region and the noise band. The standard curve was a plot of the Cp versus the amount of initial cDNA used for amplification. The Cp was always the same for a given dilution of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA, whatever the dietary conditions, demonstrating that GAPDH mRNA expression was not altered by diets and could be used as normalizer for data from target mRNA. The relation between the Cp and the initial amount of cDNA was found to be linear. The correlation coefficient (*r*) was 1, and PCR amplification efficiencies of the target and the housekeeping gene were similar and close to 100%. These standard curves were used to estimate the concentration of both the target and the GAPDH gene in each

sample. The results were then normalized by the ratio of the relative concentration of target to that of GAPDH in the same sample.

Quantification of RAR β mRNA by TaqMan PCR

A recently developed technique, TaqMan PCR, is able to measure an accumulating PCR product in real time by using a dual-labeled TaqMan fluorogenic probe (30). A reporter fluorophore emission is suppressed by a quencher fluorophore. During PCR, the probe anneals to the DNA template and the 5'-3'-nuclease activity of Taq polymerase releases the reporter from the vicinity of the quencher dye, resulting in increased reporter fluorescence. Fluorescence intensity is directly related to the amount of target DNA. The fluorescent signal is captured using a LightCycler® (Roche Diagnostics, Meylan, France). The reaction was performed in a volume of 20 μ l containing oligonucleotide primers (5 μ M of each), TaqMan probe (5 μ M, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), MgCl₂ (5 mM), and LightCycler DNA Master Hybridization Probes 10X (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) with FastStart Taq DNA polymerase, reaction buffer, and dNTP (with dUTP instead of dTTP). Amplification required 45 cycles (denaturing at 95°C for 5 s, annealing at 60°C for 30 s).

Primers and Fluorogenic Probes

Probe and primer sequences (Table 3) were designed using Primer Express software (Version 1, PE Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Primers were purchased from Prologo France (Paris) and probes were purchased from PE Applied Biosystems; each probe was synthesized with the fluorescent reporter dye 6-carboxy-fluorescein (FAM) attached to the 5' end and the quencher dye 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine (TAMRA) attached to the 3' end. Specificity of primers and probes was validated through the verification of RT-PCR product specificity.

Table 3. Primers and Probes Used for LightCycler™ Real-Time PCR^a

Primers	5' → 3'	Position	Temp (°C)	Product Length (bp)
GAPDH ^b	F1 GAACATCATCCCTGCATCCA	1455-1474	60	78
	R1 CCAGTGAGCTTCCCGTCA	1514-1532	60	
Probe	FAM-GCTGCCAAGGCTGTGGGCAAG-TAMRA	1480-1500	67	67
RAR β ^c	F CTTGGGCTCTGGGACAAAT	642-661	59	
	R TGCGGAACCTCCACGATCTTAAT	688-709	60	171
Probe	FAM-CAGTGAGCTGGCCACCAAGTGCA-TAMRA	663-685	68	
RXR α ^d	F GCTGGTGTGGAAGATGCGTGAC	1238-1259	59	146
	R GGGTACTGTGTTTGCAGTACG	1388-1367	59	
PPAR γ ^e	F GCCATCTTACGATGCTGTCC	1078-1099	60	146
	R GCGAAGTCAAACCTGGGGTCC	1225-1204	60	

^a: Sequences are shown for forward (F) and reverse (R) primers. Abbreviations are as follows: FAM, 6-carboxy-fluorescein; TAMRA, 6-carboxy-tetramethyl-rhodamin.

^b: From Ref. 58.

^c: Determined by Primer Express Software (version 1, PE Applied Biosystems) (59).

^d: Determined from cDNA of RXR α of rat (60).

^e: Determined from cDNA of PPAR γ of rat (51).

Statistical Procedure

Experimental data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Experimental data are expressed as the mean \pm SE and differences with $P < 0.05$ were considered significant.

Results

Diet and Body Weight

Energy provided by 100 g of lipid-enriched diets (HFD and VAHFD) was greater than by 100 g of CD (2,050 versus 1,620 kJ), but HFD-fed rats and VAHFD-fed rats consumed less than CD-fed rats (14.5 and 13.7 g/day/rat, respectively, versus 17.4 g/day/rat). Consequently, energy intake from food consumption among CD-, HFD-, and VAHFD-fed rats, 281.4 ± 21.9 , 297.8 ± 37.5 , and 281.1 ± 24.2 kJ/day/rat, respectively, showed no significant difference. The excess in energy provided by HFDs and VAHFDs was compensated for by the fact that HFD-fed rats ate less. The comparison between CD and HFD \pm VA then became possible. In the same manner, the mean \pm SD final body weights of the animals were $402.1 \text{ g} \pm 17.9$, $413.0 \text{ g} \pm 19.6$, and $398.6 \text{ g} \pm 29.2$ for CD, HFD, and VAHFD, respectively. Thus, HFD and VAHFD did not induce any significant body weight gain (Table 1).

Quantification of AC and ACF

As expected, no ACF were observed in animals given 0.9% NaCl solution. After 4 mo of DMH-treatment, all the animals developed ACF. The rats fed HFD had the highest number of total AC (113.86 ± 29.00 , mean \pm SD) and total ACF (33.43 ± 9.40) but AC and ACF numbers in this group did not differ significantly from those in the CD group, in part, because of the variability in individual rat responses. However, the crypt multiplicity of AC/ACF was significantly different from HFD compared with CD, in particular for large foci: twice more for 4–6 AC/foci and three times more for 7–12 AC/foci (Table 4).

The VAHFD-exposed rats showed lower numbers of total AC (-63%) and ACF (-60%) compared with HFD. More-

over, multicrypt foci were observed less with VAHFD compared with HFD: -59% for 1–3 AC, -62% for 4–6 AC, and -57% for 7–12 AC.

mRNA Expression of Nuclear Receptors

Without DMH induction, RT-PCR on HFD-fed rat colonic mucosa revealed a significantly higher level of PPAR γ mRNA expression ($+194\%$) and a significantly lower level of RAR β mRNA expression (-74%) compared with the CD group. The expression of RXR α mRNA seems not to have been modified by the type of diet (CD or HFD) (Table 5).

In DMH-treated rat colon mucosa, an equivalent pattern of nuclear receptor expression was found: PPAR γ mRNA expression increased ($+58\%$) and RAR β mRNA expression decreased (-75%) with HFD compared with CD. Moreover, RXR α mRNA expression, which was not modified with HFD compared with CD, decreased drastically when animals were chemically initiated (-49%).

In addition, for both types of diet (CD and HFD), DMH administration modified the levels of expression of nuclear receptor compared with DMH-noninduced rats: PPAR γ ($+179\%$ with CD and $+50\%$ with HFD), RAR β (-52% with CD and -54% with HFD), and RXR α (-21% with CD and -55% with HFD).

In chemically initiated rats, data showed an equivalent level of PPAR γ expression in the CD and VAHFD dietary groups. On the other hand, this expression level was significantly different compared with the HFD group (-50%). Moreover, the RAR β mRNA down-regulation observed as a consequence of HFD consumption seemed to be less accentuated when vitamin A was associated with the HFD (-58% with vitamin A instead of -75% without). RXR α , less expressed in the HFD group compared with the CD (-49%), was significantly up-regulated in the VAHFD group ($+123\%$).

Discussion

The relationship between diet and cancer is much more complex than was previously thought. Nutrition has become one of the highest priority areas for cancer research and can-

Table 4. Effect of Experimental Diets on Total Number of AC and ACF in DMH-Treated Rats^a

Diets	n	ACF/colon	AC/colon	Multiplicity AC/ACF	AC/ACF		
					1–3 AC	4–6 AC	7–12 AC
CD	7	21.29 \pm 1.80	61.86 \pm 5.70	2.92 \pm 0.16	5.05 \pm 0.63	1.81 \pm 0.33	0.10 \pm 0.06
HFD	7	33.43 \pm 9.40	113.86 \pm 29.00	3.46 \pm 0.25	6.29 \pm 1.20	4.24 \pm 0.75 ^b	0.30 \pm 0.09 ^c
VAHFD	9	13.22 \pm 2.60 ^d	42.67 \pm 7.60 ^e	3.41 \pm 0.29	2.56 \pm 0.49 ^f	1.63 \pm 0.40 ^f	0.13 \pm 0.05

a: Values are means \pm SEM; n, number of rats; Student's *t*-test, ANOVA, and Tukey's test. Abbreviations are as follows: CD, control diet; HFD, high fat diet; VAHFD, high fat diet supplemented with vitamin A; n, number of rats; AC, aberrant crypt; ACF, aberrant crypt foci.

b: Significantly different from CD ($P < 0.01$).

c: Significantly different from CD ($P < 0.054$).

d: Significantly different from HFD ($P < 0.04$).

e: Significantly different from HFD ($P < 0.02$).

f: Significantly different from HFD ($P < 0.01$).

Table 5. Effect of Experimental Diets on Nuclear Receptor Expression^a

	Experimental Diets				
	CD	HFD	CD + DMH	HFD + DMH	VAHFD + DMH
PPAR γ mRNA	1.31 \pm 0.33	3.85 \pm 0.16 ^b	3.65 \pm 0.25 ^b	5.77 \pm 0.45 ^c	2.91 \pm 0.21 ^d
RAR β mRNA	5.00 \pm 0.55	1.30 \pm 0.15 ^e	2.40 \pm 0.19 ^e	0.60 \pm 0.11 ^f	1.00 \pm 0.12 ^g
RXR α mRNA	6.80 \pm 0.75	6.13 \pm 0.65	5.35 \pm 0.60	2.74 \pm 0.42 ^h	11.93 \pm 0.74 ^d

a: Nuclear receptors mRNA are expressed in percent of GAPDH mRNA. Values are means \pm SEM, Student's *t*-test, ANOVA, Tukey's test. Abbreviations are as follows: CD, control diet; HFD, high fat diet; VAHFD, high fat diet supplemented with vitamin A.

b: Significantly different from CD ($P < 0.001$).

c: Significantly different from HFD ($P < 0.01$).

d: Significantly different from HFD + DMH ($P < 0.001$).

e: Significantly different from CD ($P < 0.01$).

f: Significantly different from CD + DMH ($P < 0.001$).

g: Significantly different from HFD + DMH ($P < 0.05$).

h: Significantly different from CD + DMH ($P < 0.01$).

cer prevention. The aim of the current study was to better appreciate how nutrients such as LA and retinyl palmitate create early molecular disturbances in related nuclear receptor expression associated with promotion of or protection against colon carcinogenesis.

In the 1990s, the observation of ACF in carcinogen-treated rodent colons was associated with the disease in progression. These foci were regarded as precursor lesions of colorectal cancer. Because there is a correlation between ACF multiplicity and the onset of colon tumors at the later stages, their number and growth features were used to identify modulators of colon carcinogenesis (29).

The first results of the present study showed a promoting effect of the safflower oil-enriched diet (HFD) on ACF multiplicity compared with the CD. Even if energy provided by both diets was different, energy intake from food consumption was statistically comparable between these two groups. Thus, the impact of HFD intake on colon carcinogenesis seems to be only the consequence of the type of fatty acids contained in this diet. Safflower oil, found in the HFD, is composed of 73% of an essential PUFA, LA (n-6 18:2). That HFD-fed rats consumed less than CD-fed rats could be explained because LA appears to be more satiating and less palatable than other 18-carbon unsaturated fatty acids. As suggested by Tsuruta et al. (31), the unpalatable side of LA could contribute to attenuating effects of LA even if the work of Rice and Corwin (32) showed no association between essential fatty acid (linolenic acid and LA) consumed and food intake. However, DMH initiation of HFD-fed rat colons led to the onset of multicrypt foci (four or more AC per foci) correlated with tumor onset at the later stages (33,29). Our data confirmed that, in vivo, LA is positively related to the development of colorectal cancer. Besides, in most in vitro studies, LA showed no effect on cell proliferation (34,35). Many in vivo studies demonstrated clearly a colon tumor-enhancing effect of corn oil, which contains 58% LA, and an inhibiting effect of fish oil, in which 30% of n-3 (eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) is found (36). Very few studies have investigated the effects of PUFAs on ACF formation. Onogi et al. (37) showed a decrease in total ACF multiplicity

with a basal diet rich in n-3 compared with safflower oil. Effects of dietary n-6 PUFAs on colon cancer in humans are still controversial and difficult to define, but recent work with LA showed no significant increase in oxidative DNA damage (a possible cause of cancer risk) and on plasma levels of malondialdehyde, an end product of lipid peroxidation (38).

The present study, using HFD, provided a model for studying 1) molecular disturbances of PPAR and vitamin A nuclear receptor (RAR and RXR) expression in a situation of cancer promotion induced by this diet and 2) the impact of dietary vitamin A supplementation on ACF number and multiplicity and on the molecular disturbances induced by this diet.

Vitamin A, under its active form, retinoic acid, can activate not only the RAR but also the RXR family, which is considered to be a regulator of numerous systems of hormonal responses. The explanation comes from the necessity for all members of the class II nuclear receptor family to be heterodimerized with RXR to be efficient. The addition of vitamin A to the HFD, in the form of retinyl palmitate, demonstrated a protective effect on ACF number and multiplicity when compared with ACF in HFD-fed rat colons. The potential chemopreventive action of several retinoids on the initiation phase of carcinogenesis and on established ACF in azoxymethane (AOM)-induced rat colons has been previously confirmed (39,40) as well as when retinoids are associated with n-3 fatty acids known for their cancer-protective effect (41,42). Moreover, Shivapurkar et al. (43) have previously observed that rats exposed to AOM and fed high-fat, low-fiber, Western-style diets developed a larger number of ACF and subsequent colonic tumors. In their study, the addition of dietary β -carotene retarded colonic tumor progression. The same modulation of susceptibility to chemically induced colon cancer has previously been seen by Newberne et al. (44) with rats fed different dietary levels of corn oil and retinyl acetate.

Relationships between dietary fat and vitamin A remain unclear as to their ability to interact at the cellular and molecular levels to influence the colonic phenotype during co-administration. The first evidence of interaction was provided

by Deming et al. (45) and Ribaya-Mercado (46), who indicated that dietary fat is necessary for absorption and bioconversion of β -carotene into vitamin A. They emphasized that a low dietary fat intake associated with high dietary fiber consumption negatively affects β -carotene bioavailability. These observations may confirm that an interplay exists between fat and vitamin A from the point of intestinal absorption to target gene regulation.

Our data in DMH-induced rat colons demonstrated that HFD can modify, at the mRNA level, the expression of various nuclear receptors; we observed an up-regulation of PPAR γ and a concomitant down-regulation of vitamin A receptor expression.

There are various mechanisms that could explain how dietary fat modifies the expression of the target receptor of vitamin A. One of them has been provided by Randolph and Ross (47), who observed, in an MCF-7 human mammary epithelial carcinoma cell line and an hepG2 human hepatoma cell line, that fatty acids increased the uptake and esterification of retinol. If retinol esterification restricted the production of retinoic acid from retinol, a decrease in the cellular pool of retinoic acid would modify RAR expression. Indeed, RAR β gene expression has been shown to be up-regulated by retinoic acid (48,49). Upstream mechanisms able to modulate the availability of intracellular retinyl esters or modify the pool size of retinol could consequently affect active retinoid bioavailability. Randolph and Simon (50) strongly suggested that fatty acids have the capacity to regulate the cellular concentrations of active retinoic acids by modulating the rate of retinol metabolism.

Another mechanism of action of fatty acids could be transduced by a modification of the balance between nuclear receptors. Indeed, fatty acids may modulate target gene expression, in part, through PPAR activation, which requires RXR as a partner. This is confirmed by the observation of an up-regulation of PPAR γ when rats were fed an HFD in comparison with the CD. However, under these nutritional conditions, a decrease in vitamin A receptor (RAR β and RXR α) mRNA was simultaneously observed. This could indicate that retinoid and peroxisome proliferator signaling pathways converge through the direct interaction of their respective nuclear receptors (51). RXR would then be the reliable element inducing a competition between PPAR and RAR signaling pathways. Such a phenomenon appears credible; indeed, vitamin D nuclear receptor has been demonstrated to be able to confine RXR and consequently to decrease the association of RAR-RXR, necessary for vitamin A target gene regulation, inducing then a transrepression of the retinoid pathway (52). Other evidence given by Jimenez-Lara and Aranda (53) has led to the hypothesis of a competition for common coactivators and binding to DNA. Moreover, recent work has also shown cross-talk between PPAR α and liver X receptor (LXR) signaling pathways leading to the transrepression of LXR action through reduction of LXR/RXR formation (54). It may be possible that RAR target gene expression is indirectly modulated by PPAR and/or PPAR target gene expression by RAR in this way.

Evidence is provided here that the HFD, which induces an increased PPAR γ expression, is able to modify vitamin A target receptor expression. The overexpression of the PPAR γ gene (55) and the underexpression or silencing of the RAR β gene have been independently indicated to be associated with colon carcinogenesis and tumor progression (56).

On the other hand, the addition of retinyl palmitate to an HFD seems to prevent, at least partially, not only the down-regulation of vitamin A nuclear receptor expression but also the overexpression of PPAR γ induced by the fat diet. A new balance between nuclear receptors appears, with the use of VAHFD, as a consequence of the simultaneous actions of fatty acids and vitamin A. The present results have shown that HFD influences RAR and RXR expression and that vitamin A supplementation modifies the mRNA expression profile of nuclear receptors created by fatty acids. The cross-talk involved is still to be elucidated. Vitamin A may influence lipid metabolism (57), but the competition for heterodimerization with RXR α could be a way for vitamin A to attenuate the effects of an HFD on PPAR γ , RXR α , and RAR β gene expression.

Fatty acids are now recognized to modulate, via PPAR, not only genes implicated in lipid homeostasis but also processes such as apoptosis, proliferation, and differentiation (9), even though the involvement of PPAR in early events occurring in carcinogenesis remains unclear. The current study revealed that an HFD modified not only PPAR γ but also the expression of the vitamin A nuclear receptor (RAR β and RXR α) gene. Vitamin A supplementation revealed similar nuclear receptor expression levels as that obtained with the CD. Moreover, even without chemical initiation, equivalent nuclear receptor expression patterns were found with the different dietary conditions. Such observations then seem to indicate that HFD induces molecular modifications able to create conditions favoring carcinogenesis processes. Moreover, the alteration of the function of the retinoid pathway and its antitumor activity could be a means by which HFD promotes carcinogenesis.

Acknowledgments and Notes

This study was supported in part by a grant from the Ligue Régionale Contre le Cancer de la Gironde et de la Charente and by the Conseil Régional d'Aquitaine. The authors thank Laurent Caune for care of the rats and Kathryn Mayo who took part in correcting the English. The first two authors have contributed equally to this work. Address correspondence to P. Cassand, Laboratory of Nutrition and Cellular Signalling, University Bordeaux 1, Avenue des facultés, 33405 Talence cedex, France. Phone: +33 (0)5 40 00 87 17; FAX: +33 (0)5 40 00 27 76; E-mail: p.cassand@istab.u-bordeaux1.fr.

Submitted 11 July 2003; accepted in final form 11 December 2003.

References

1. Giovannucci E and Willet WC: Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med* 26, 443-452, 1994.

2. Potter JD: Hormones and colon cancer. *JNCI* **87**(14), 1039-1040, 1995.
3. Greenwald P, Clifford CK, and Milner JA: Diet and cancer prevention. *Eur J Cancer* **37**(8), 948-965, 2001.
4. Slattery ML, Potter JD, Duncan DM, and Berry TD: Dietary fats and colon cancer: assessment of risk associated with specific fatty acids. *Int J Cancer* **73**(5), 670-677, 1997.
5. Chang NW and Huang PC: Effects of the ratio of polyunsaturated and monounsaturated fatty acid to saturated fatty acid on rat plasma and liver lipid concentrations. *Lipids* **33**(5), 481-487, 1998.
6. Reddy BS: Dietary fat and colon cancer: animal model studies. *Lipids* **17**, 807-813, 1992.
7. Horrobin DF: The role of essential fatty acids and prostaglandins in breast cancer. In *Diet, Nutrition and Cancer: A Critical Evaluation*, Reddy BS and Cohen LA (eds). Boca Raton, FL: CRC Press, 1986, pp 101-124.
8. Kawai N, Tsujii M, and Tsuji S: Cyclooxygenases and colon cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 187-196, 2002.
9. Clay CE, Namen AM, Fonteh AN, Atsumi G, High KP, and Chilton FH: 15-Deoxy- Δ (12,14)PGJ(2) induces diverse biological responses via PPAR γ activation in cancer cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **62**(1), 23-32, 2000.
10. Schoonjans K, Martin G, Staels B, and Auwerx J: Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol* **8**(3), 159-166, 1997.
11. Desvergne B and Wahli W: Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* **20**(5), 649-688, 1999.
12. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, and Henke BR: The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* **43**(4), 527-550, 2000.
13. Hill JO and Melanson EL: Overview of the determinants of overweight and obesity: current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exerc* **31**(11), S515-S521, 1999.
14. Reddy BS, Hirose Y, Cohen LA, Simi B, Cooma I, et al.: Preventive potential of wheat bran fractions against experimental colon carcinogenesis: implications for human colon cancer prevention. *Cancer Res* **60**(17), 4792-4797, 2000.
15. Willett WC and Hunter DJ: Vitamin A and cancers of the breast, large bowel, and prostate: epidemiologic evidence. *Nutr Rev* **52**(2), S53-S59, 1994.
16. Altucci L and Gronemeyer H: Nuclear receptors in cell life and death. *Trends Endocr Metab* **12**(10), 460-468, 2001.
17. Lotan R: Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J* **10**(9), 1031-1039, 1996.
18. Lippman SM, Kessler JF, and Meykscens FL: Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agents. *Cancer Treat Rep* **71**, 493-515, 1987.
19. Moon RC and Mehta RG: Chemoprevention of mammary cancer by retinoids. *Basic Life Sci* **52**, 213-224, 1990.
20. Sporn MB: Carcinogenesis and cancer: different perspectives on the same disease. *Cancer Res* **51**(23), 6215-6218, 1991.
21. Pfahl M: Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev* **14**(5), 651-658, 1993.
22. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, et al.: The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839, 1995.
23. McCormack SA, Viar MJ, Tague L, and Johnson LR: Altered distribution of the nuclear receptor RAR beta accompanies proliferation and differentiation changes caused by retinoic acid in Caco-2 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **32**(1), 53-61, 1996.
24. Redonnet A, Groubet R, Noël-Suberville C, Bonilla S, Martinez A, and Huguier P: Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome proliferator, retinoic acid, and triiodothyronine nuclear receptors in the rat. *Metabolism* **50**(10), 1161-1167, 2001.
25. Adachi Y, Itoh F, Yamamoto H, et al.: Retinoic acids reduce matrix metalloproteinase 7 and inhibit tumor cell invasion in human colon cancer. *Tumour Biol* **22**(4), 247-253, 2001.
26. Potier de Courcy G, Durand G, Abraham J, and Gueguen L: Recommendations sur les conditions d'alimentation des animaux de laboratoire (rats et souris). *Sci Alim* **9**, 209-217, 1989.
27. The USDA Nutrient Database For Standard Reference, 1997.
28. Chomczynski P and Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159, 1987.
29. Bird RP: Role of aberrant crypt foci understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett* **93**, 55-71, 1995.
30. Freeman WM, Walker SJ, and Vrana KE: Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* **26**, 112-125, 1999.
31. Tsuruta M, Kawada T, Fukuwatari T, and Fushiki T: The olfactory recognition of long-chain fatty acids in rats. *Physiol Behav* **66**(2), 285-288, 1999.
32. Rice HB and Corwin RL: Food intake in rats is unaffected by the profile of dietary essential fatty acids. *Physiol Behav* **75**(5), 611-619, 2002.
33. McLellan EA, Medline A, and Bird RP: Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions in rat colon. *Carcinogenesis* **12**(11), 2093-2098, 1991.
34. Awad AB, Kamei A, Horvath PJ, and Fink CS: Prostaglandin synthesis in human cancer cells: influence of fatty acids and butyrate. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **53**(2), 87-93, 1995.
35. Collett ED, Davidson LA, Fan YY, Lupton JR, and Chapkin RS: n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**(5), C1066-C1075, 2001.
36. Dommels YE, Alink GM, van Bladeren PJ, and van Ommen B: Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid and colorectal carcinogenesis: results from cultured colon cells, animal models and human studies. *Environ Toxicol Pharmacol* **12**, 233-244, 2002.
37. Onogi N, Okuno M, Komaki C, Moriwaki H, Kawamori T, et al.: Suppressing effect of perilla oil on azoxymethane-induced foci of colonic aberrant crypts in rats. *Carcinogenesis* **17**(6), 1291-1296, 1996.
38. de Kok TMCM, Zwingman I, Moonen EJ, Schilderman PAEL, Rhijsburger E, et al.: Analysis of oxidative DNA damage after human dietary supplementation with linoleic acid. *Food Chem Toxicol* **41**(3), 351-358, 2003.
39. Wargovich MJ, Jimenez A, McKee K, Steele VE, et al.: Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. *Carcinogenesis* **21**(6), 1149-1155, 2000.
40. Pereira MA: Prevention of colon cancer and modulation of aberrant crypt foci, cell proliferation, and apoptosis by retinoids and NSAIDs. *Adv Exp Med Biol* **470**, 55-63, 1999.
41. Latham P, Lund EK, and Johnson IT: Dietary n-3 PUFA increases the apoptotic response to 1,2-dimethylhydrazine, reduces mitosis and suppresses the induction of carcinogenesis in the rat colon. *Carcinogenesis* **20**(4), 645-650, 1999.
42. Komaki C, Okuno M, Onogi N, Moriwaki H, et al.: Synergistic suppression of azoxymethane-induced foci of colonic aberrant crypts by the combination of beta-carotene and perilla oil in rats. *Carcinogenesis* **17**(9), 1897-1901, 1996.
43. Shivapurkar N, Tang Z, Frost A, and Alabaster O: Inhibition of progression of aberrant crypt foci and colon tumor development by vitamin E and beta-carotene in rats on a high-risk diet. *Cancer Lett* **91**(1), 125-132, 1995.
44. Newberne PM, Bueche D, Riengropitak S, and Schrage TF: The influence of dietary levels of vitamin A and fat on colon cancer. *Nutr Cancer* **13**(4), 235-242, 1990.
45. Deming DM, Boileau AC, Lee CM, and Erdman JW Jr: Amount of dietary fat and type of soluble fiber independently modulate postabsorptive conversion of beta-carotene to vitamin A in mongolian gerbils. *J Nutr* **130**(11), 2789-2796, 2000.
46. Ribaya-Mercado JD: Influence of dietary fat on beta-carotene absorption and bioconversion into vitamin A. *Nutr Rev* **60**(4), 104-110, 2002.
47. Randolph RK and Ross AC: Regulation of retinol uptake and esterification in MCF-7 and HepG2 cells by exogenous fatty acids. *J Lipid Res* **32**(5), 809-820, 1991.

48. de The H, Marchio A, Tiollais P, and Dejean A: Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor alpha and beta genes. *EMBO J* **8**(2), 429-433, 1989.
49. Sun SY, Wan H, Yue P, Hong WK, and Lotan R: Evidence that retinoic acid receptor beta induction by retinoids is important for tumor cell growth inhibition. *J Biol Chem* **275**(22), 17149-17153, 2000.
50. Randolph RK and Simon M: Metabolic regulation of active retinoid concentrations in cultured human epidermal keratinocytes by exogenous fatty acids. *Arch Biochem Biophys* **318**(1), 6-14, 1995.
51. Miyata KJ, McCaw SE, Marcus SL, Rachubinski RA, and Capone JP: The peroxisome proliferator-activated receptor interacts with the retinoid X receptor in vivo. *Gene* **148**, 327-330, 1994.
52. Polly P, Carlberg C, Eisman JA, and Morrison NA: 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 receptor as a mediator of transrepression of retinoid signaling. *J Cell Biochem* **67**(3), 287-296, 1997.
53. Jimenez-Lara AM and Aranda A: Interaction of vitamin D and retinoid receptors on regulation of gene expression. *Horm Res* **54**(5-6), 301-305, 2000.
54. Yoshikawa T, Ide T, Shimano H, et al.: Cross-talk between peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) [alpha] and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. PPARs suppress sterol regulatory element-binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol Endocrinol* Web Medline, May 1, 2003.
55. DuBois RN, Gupta R, Brockman J, Reddy BS, Krakow SL, et al.: The nuclear eicosanoid receptor, PPAR γ , is aberrantly expressed in colonic cancers. *Carcinogenesis* **19**(1), 49-53, 1998.
56. Sun SY and Lotan R: Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* **41**(1), 41-55, 2002.
57. Zolfaghari R and Ross AC: Recent advances in molecular cloning of fatty acid desaturase genes and the regulation of their expression by dietary vitamin A and retinoic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **68**(2), 171-179, 2003.
58. Medhurst AD, Harrison DC, Read SJ, Campbell CA, Robbins MJ, and Pangalos MN: The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J Neurosci Methods* **98**, 9-20, 2000.
59. Zelent A, Krust A, Petkovich M, Kastner P, and Chambon P: Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. *Nature* **339**(6227), 714-717, 1989.
60. Gearing KL, Göttlicher M, Teboul M, Widmark E, and Gustafsson J-Å: Interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 1440-1444, 1993.

I.4. Conclusion

Nos données supportent les observations selon lesquelles, *in vivo*, un apport alimentaire excessif en acide linoléique est lié à la promotion du processus de cancérogenèse colorectale (*Takeshita et al., 1997*). Elles confirment aussi l'intérêt à accorder aux récepteurs nucléaires directement responsables de variations de l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie cellulaire et dont l'expression est vraisemblablement modulée dans le processus de cancérogenèse colique.

La promotion par HFD est associée à un profil d'expression spécifique (Tableaux 4 et 5, article 1) : La surexpression du gène codant pour PPAR γ est en accord avec des données bibliographiques démontrant que des agonistes naturels (AGPIs) et synthétiques (TZDs) de PPAR γ peuvent moduler le taux des ARNm de PPAR γ (*Chambrier et al., 2002; Li et al., 2005; Ceni et al., 2005*). Cependant, à notre connaissance, aucune étude mécanistique n'a été effectuée pour permettre d'expliquer l'implication des AGPIs dans la régulation transcriptionnelle du gène codant pour PPAR γ . De plus, la modulation de l'expression de PPAR γ s'accompagne aussi de celle des récepteurs de l'acide rétinoïque, RXR α et RAR β , considérés tous deux comme des éléments favorisant les processus de différenciation et/ou d'apoptose. Ainsi, une hypoexpression des ARNm de ces récepteurs participerait à la promotion observée. Plusieurs mécanismes sont évoqués pour expliquer l'altération de l'expression des récepteurs par les acides gras, en particulier une diminution de la biodisponibilité de la vitamine A et des phénomènes de compétition entre les nutriments et leurs récepteurs. Il a aussi récemment été montré qu'en plus de son rôle primordial dans la fonctionnalité de PPAR γ , RXR α est vraisemblablement impliqué dans les effets opposés des AGPIs n-3 et des AGPIs n-6 sur la cancérogenèse colique puisqu'il est capable de lier préférentiellement les AGPIs n-3 (*Fan et al., 2003*). Ainsi, il n'est pas à exclure que les AGPI n-6 pourraient favoriser la promotion en affectant l'expression de RXR α , capable contrairement à PPAR γ , de médier des effets spécifiques des AGPI n-3.

La supplémentation en palmitate de rétinol semble s'opposer à la promotion induite par HFD ainsi qu'aux altérations de l'expression des récepteurs (Tableaux 4 et 5, article 1) : Ces résultats confortent l'implication de la vitamine A et de ses récepteurs dans des processus anti-tumoraux. La vitamine A semble avoir un effet antagoniste à celui du régime hyperlipidique. L'addition de vitamine A au régime HFD pourrait améliorer la disponibilité de ses métabolites dans la cellule et ainsi, soit prévenir les effets des acides gras sur la

promotion et l'expression des ARNm des récepteurs, soit plus indirectement en régulant de façon opposée l'expression des récepteurs.

Les profils d'expression associés au régime HFD sont équivalents chez les animaux initiés et non initiés (Tableau 5, article 1) : Ces résultats montrent qu'un régime hyperlipidique promoteur de la cancérogenèse crée des modifications précoces dans l'expression de certains récepteurs. Ces altérations peuvent constituer des conditions favorisant l'augmentation de la sensibilité d'un tissu aux agents mutagènes.

II. Effets d'un régime hyperlipidique inducteur de prise de poids sur le profil d'expression des récepteurs nucléaires PPARs et RARs/RXR α

L'obésité est causée par le déséquilibre entre les prises et les dépenses énergétiques, ce qui conduit à une balance énergétique positive associée à un gain de poids. Alors que les données concernant l'incidence du CCR dans nos sociétés industrialisées positionnent déjà cette maladie parmi les premiers cancers mortels, le mode de vie et en particulier la surconsommation d'une alimentation énergétique et déséquilibrée sont responsables de l'installation d'états de surpoids et d'obésité néfastes pour la santé humaine. Or l'obésité est un facteur de risque majeur de développement du cancer colorectal.

Ainsi, l'exemple de l'obésité souligne la capacité de l'alimentation à moduler le risque de cancer colorectal. Comme dans le cadre du CCR, les récepteurs nucléaires -particulièrement les PPARs- jouent un rôle fondamental puisqu'ils s'avèrent être des cibles privilégiées pour le traitement de l'obésité. Dans l'article 1, nous avons constaté qu'une alimentation riche en acide linoléique, capable de promouvoir la cancérogenèse colique, était associée à des modifications de l'expression de récepteurs nucléaires. Or, ce type d'alimentation n'est pas le reflet des régimes alimentaires humains.

Ainsi, ce second travail s'est intéressé aux modulations potentielles de l'expression des récepteurs dans le cadre de la surconsommation d'une alimentation déséquilibrée et capable d'induire un état de surpoids. Nous avons aussi recherché si l'augmentation de la disponibilité en vitamine A pouvait moduler les effets de la consommation excessive d'acides gras à la fois sur la promotion et sur l'expression des récepteurs.

Ainsi, les objectifs spécifiques de cette étude étaient :

- (i) de déterminer si le gain de poids induit par la surconsommation d'un régime hyperlipidique est précocément associé à un profil spécifique d'expression des récepteurs PPAR γ et δ , RAR α et β et RXR α ,
- (ii) d'associer ce profil avec des données sur les biomarqueurs de la cancérogenèse colique que sont les FCA, la cyclooxygénase-2 et la β caténine,
- (iii) d'observer les effets de la vitamine A sur le profil d'expression des récepteurs et sur les biomarqueurs.

Les résultats obtenus ont fait l'objet de **l'article 2** accepté pour publication dans *International Journal of Cancer (Delage et al., 2005, in press)*.

II.1. Méthodologie

- Choix du modèle animal

Dans l'objectif d'étudier les effets d'une alimentation présentant de fortes similitudes avec un régime humain déséquilibré, nous avons écarté les rats F344, présentant une certaine susceptibilité à développer spontanément des FCA, au profit des rats de souche Wistar.

- Régimes alimentaires

Durant 8 semaines, ces animaux ont été soumis soit à un régime standard (alimentation dite d'entretien), dans lequel 8% de l'énergie totale est fournie par les acides gras, soit à un régime hyperlipidique (HLD), dans lequel 59% de l'énergie est fournie par les acides gras (Tableau V). Le régime HLD équivaut au régime dit 'cafétéria' contenant différents constituants appartenant à l'alimentation humaine et induisant une hyperphagie et un surpoids (*Berraondo et al., 2000*). Les aliments du régime HLD (pâté, lardons, chocolat, chips, biscuits) ont été choisis afin de mimer les comportements alimentaires observés chez l'Homme. Une unique dose de DMH (15mg/kg) a été injectée à tous les animaux après 4 semaines de régime.

Tableau V. Composition en acides gras des différents régimes
(données fournies par l'Institut Technique des Corps Gras)

	% relatif	
	Moyenne	
	Standard	HLD/VAHLD
C14	4.3	1.9
C16	17.6	26.6
C16:1(n-7)	0.2	1.4
C18	3.1	12.8
C18:1(n-9)	16.3	34.4
C18:2(n-6)	49.7	15.2
C18:3(n-3)	3.4	1
C20:1(n-9)	0.4	0.5

- Modalités d'administration de la vitamine A

Nous avons fait le choix d'administrer la vitamine A sous forme d'esters de rétinol dans le régime hyperlipidique (correspondant au régime VAHLD), mais aussi sous la forme directement active, l'acide rétinoïque tout-*trans* (ATRA) administré par gavage. Cette dernière forme correspond à la forme utilisée dans le traitement de plusieurs maladies (leucémie promyélocytaire aiguë, acné, psoriasis...) et donne des résultats prometteurs dans le traitement de cancers (*Brtko et Thalhamer, 2003*). Si les recommandations nutritionnelles peuvent clairement être bénéfiques pour la santé et prévenir l'installation de l'obésité et des maladies associées comme le cancer du côlon, elles nécessitent des efforts individuels difficiles et souvent inefficaces. Ainsi, puisque l'activité des rétinoïdes est utilisée dans le traitement de certaines lésions, nous nous sommes intéressés aux effets de l'administration orale de la forme active de la vitamine A aux différents groupes d'animaux.

II.2. Principaux résultats

Cette étude a permis :

- (i) de mettre en évidence que la prise de poids observée après 2 mois de régimes HLD ou VAHLD est associée à un nombre plus élevé de FCA par rapport au régime standard (Tableau III, article 2),
- (ii) d'observer des profils d'expression de récepteurs distincts par rapport au régime standard mais aussi selon que la vitamine A est associée ou non aux acides gras alimentaires (VAHLD vs. HLD) (Tableau IV, article 2),
- (iii) d'associer les différents régimes à des modulations des taux de COX-2 et β caténine (Tableau IV, Figure 3A, article 2),
- (iv) de mettre en évidence des modifications du taux de β caténine par l'administration d'ATRA chez les animaux soumis au régime VAHLD (Figure 3A, article 2).

Les différentes observations que nous avons décrites correspondent au début de la phase de gain de poids significatif chez les animaux soumis aux régimes HLD et VAHLD par rapport aux animaux contrôles (Tableau II, article 2).

Les régimes HLD et VAHLD, qui se distinguent par leur teneur en esters de rétinol, sont associés à des profils d'expression des récepteurs différents entre eux et par rapport à celui qui est observé dans la muqueuse colique des animaux 'standard'.

L'administration d'ATRA aux animaux soumis au régime HLD ou VAHLD est associée à une réduction du nombre de FCA et du taux de β caténine. Elle n'induit par contre aucune modification de l'expression des récepteurs nucléaires.

II.3. Article 2

Article 2 :

***'A high fat diet generates alterations in nuclear receptor expression:
prevention by vitamin A and links with cyclooxygenase-2 and β catenin'***

A high-fat diet generates alterations in nuclear receptor expression: Prevention by vitamin A and links with cyclooxygenase-2 and β -catenin

Barbara Delage*, Céline Bairras, Benjamin Buaud, Véronique Pallet and Pierrette Cassand

Laboratory of Food and Colon Carcinogenesis, Unit of Nutrition and Cellular Signalling, University Bordeaux 1, Talence, France

Epidemiologic studies suggest that intake of high energy from fat, inducing overweight, increases the risk of cancer development and promotes colon carcinogenesis. It is therefore important to understand which parameters are affected early on by a high-fat diet in order to devise and improve protective nutritional strategies. We investigated the effect of high energy/fat intake on colon mucosa of male Wistar rats induced by a single 1,2-dimethylhydrazine (DMH) injection. Aberrant crypt foci (ACF) were numbered and modifications in cyclooxygenase-2 (COX-2) and β -catenin levels assessed. Peroxisome proliferator- and retinoic acid-activated receptors (PPAR and RAR, RXR) are key transcription factors regulating gene expression in response to nutrient-activated signals. A short-term study was designed to evaluate whether alterations in mRNA expression of nuclear receptors can be detected at the beginning of the weight gain phase induced by an appetizing hyperlipidic diet (HLD). HLD consumption induced early down-regulation of PPAR γ (–33.1%) and RAR β (–53.1%) mRNA expression concomitant with an increase in levels of COX-2 (+45.5%) and β -catenin (+84.56%) and in the number of ACF (191.56 \pm 88.60 vs. 21.14 \pm 11.64, $p < 0.05$). These findings suggest that HLD increases ACF occurrence, possibly through alterations in the mRNA expression profile of nuclear receptors. Moreover, the use HLD rich in retinyl esters or supplemented with all-*trans* retinoic acid led to a reduction in the number of ACF. Vitamin A also prevented HLD-induced alterations and the increase in levels of COX-2 and β -catenin. The present observations show a protective role for vitamin A against disturbances associated with HLD exposure in induced colon carcinogenesis.

© 2005 Wiley-Liss, Inc.

Key words: colon carcinogenesis; nuclear receptor; high energy/fat intake; vitamin A

The incidence of obesity and colon cancer is increasing in all industrialized countries. Colon carcinogenesis is a multifactorial disease, and diet is strongly involved in its etiology. A prospective cohort study has reported that increased body weight was associated with increased death rates from cancer.¹ Thus, the high prevalence of obesity, explained by a lifestyle characterized by high energy/fat intake, led to increased risk of colon cancer development. These conclusions are reinforced by data suggesting that the number of preneoplastic colonic lesions^{2–4} induced by a high-fat diet is reduced by restriction of energy intake⁵ or by fiber- and vitamin-rich diets.^{6,7} These data illustrate the potential of nutritional methods for reducing the deleterious consequences of high fat/energy intake on the risk of colon cancer.

It is likely that diet affects cancer occurrence at the level of the cell signaling pathways rather than at the level of mutations. Nuclear receptors have a central role in the regulation of gene expression in response to diet. Thus, growing evidence points to the involvement of nuclear receptors in colon tumorigenesis. Indeed, they function as ligand-activated transcription factors and regulate a wide range of target genes that affect almost all biologic processes. Nuclear receptors belonging to the class II superfamily heterodimerize with the obligate partner RXR and bind to specific DNA sequences. Among numerous free fatty acids, PUFAs bind PPARs with a higher affinity than SFAs and MUFAs. Thus, PPARs represent key elements mediating, at least in part, the effects of a high-fat diet on gene regulation. However, the wide range of PPAR activity remains poorly understood. Various gain-of-function experiments argue for a protective role of PPAR γ , while others support the opposite idea.⁸ Vitamin A and its most

potent natural form, RA, also regulate a wide spectrum of processes, including proliferation, differentiation and development. Vitamin A is now recognized as a promising agent for chemoprevention and chemotherapy for a variety of human cancers, including epithelial cancers.⁹ This nutrient acts mainly by activating RAR and RXR. Among the different nuclear receptor isotypes, the involvement of PPAR γ and RAR β is the most studied in the context of colon cancer development.^{10,11} Although less investigated, other isoforms, such as PPAR γ , RAR α and RXR α , could also participate in the modulation of cancer risk.^{12–14}

In addition to the direct regulation of target genes, nuclear receptor expression may affect 2 signaling pathways related to colon carcinogenesis involving COX-2 and β -catenin. COX-2, which catalyzes prostaglandin biosynthesis, is induced by dietary fatty acids and overexpressed in tumors. Alterations in the Wnt pathway lead to nuclear accumulation of β -catenin, resulting in abnormal gene expression and tumoral promotion. Both PPAR γ and vitamin A-activated nuclear receptors are involved in the regulation of these 2 proteins.^{15–18} Although some investigations have examined the use of vitamin A and its natural and synthetic derivatives in the treatment and prevention of many cancers,¹⁹ very few have explored the potential efficiency of retinoids in modulating the risk of colon cancer.

The present study is focused on the hypothesis that overfeeding a high fat/energy diet affects nuclear receptor expression in colonic mucosa and therefore may facilitate the occurrence of ACF. Because the model of Min mice might not be suitable for studying nuclear receptor expression,^{16,20} we used DMH-induced Wistar rats. The occurrence of ACF, nuclear receptor expression and levels of COX-2 and β -catenin were analyzed in these animals to investigate the connection between diet, receptor expression and abnormal proliferation.

Material and methods

Animals and diets

Ninety male Wistar rats (7 weeks old) were purchased from Harlan (Gannat, France). They were randomly divided into 6 experimental groups and housed singly with a 12:12 hr light–dark

Abbreviations: AC, aberrant crypt; ACF, aberrant crypt foci; ATRA, all-*trans* retinoic acid; COX-2, cyclooxygenase-2; Cp, crossing point; DMH, 1,2-dimethylhydrazine; FAM, 6-carboxyfluorescein; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HLD, hyperlipidic diet; Min, multiple intestinal neoplasia (mouse); MUFA, monounsaturated fatty acid; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PUFA, polyunsaturated fatty acid; PVDF, polyvinylidene difluoride; RA, retinoic acid; RAR, retinoic acid-activated receptor; RXR, retinoid X receptor; SFA, saturated fatty acid; TAMRA, 6-carboxytetramethylrhodamine; VAHLD, vitamin A-enriched hyperlipidic diet.

TABLE I – COMPOSITION OF EXPERIMENTAL DIETS

	Standard diet	High-fat diets	
		HLD	VAHLD
Lipids ¹²	8	59	59
SFA ²	0.96	25.37	25.37
MUFA ²	2.48	23.01	23.01
PUFA ²	4.56	10.62	10.62
Glucides ¹	71	32	32
Proteins ¹	21	9	9
Provitamin A activity ^{3,4}	7.5	7.5	27.3

¹Values are in percent of total energy provided. –²Lipids were extracted from food according to the method of Folch *et al.*,⁵⁸ trans-methylated and submitted to gas chromatography. –³Values are in IU/g of diet (1 µg retinol equivalents = 3.33 IU of retinol or retinyl esters). –⁴Vitamin A levels were determined by normal-phase HPLC according to NF EN 12823-1 (Institut des Corps Gras, Pessac, France). Data are provitamin A activities in the different diets and do not take account of the ATRA administrated by gavage.

AQ12

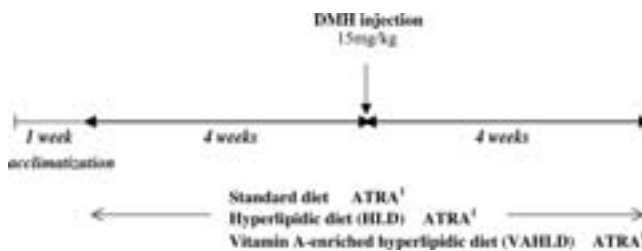


FIGURE 1 – Experimental design. ATRA was administered intragastrically, 1 mg/kg body weight once every 2 days.

cycle at 50% humidity and $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Each rat was weighed 3 times weekly. All animals were fed and given water *ad libitum*. Food intake was recorded daily.

After 7 days of acclimatization to the housing conditions, each group of rats was fed one of 3 diets (Table I): the standard diet or one of 2 high-fat diets, HLD and VAHLD. The first was a standard rodent diet (A04-type pellets; UAR, Villemoisson-sur-Orge, France), while the high-fat diets consisted of a selection of palatable human foods that induce voluntary and spontaneous hyperphagia in rats. The high-fat diets were highly comparable to a diet-induced obesity model called “cafeteria diet”, previously described by Berraondo *et al.*²¹ Animals receiving the high-fat diets were presented daily with a fresh mix of the following items: pâté, bacon, chocolate, potato chips, biscuits and pelleted chow in a proportion of 2:1:1:1:1:1. In the high-fat diets, energy supplied as lipids represented 59% of the total energy intake and consisted of 43% SFA, 39% MUFA and 18% PUFA. Lipid composition was determined by gas chromatography.

The quantity of vitamin A in the high-fat diets was different, depending on the type of pâté used: the HLD, prepared with a pâté rich in ham, contained 7.5 UI/g of chow and the VAHLD, prepared with a pâté rich in liver, contained 27.3 UI/g of chow. The quantity found in the standard diet was 7.5 UI/g of chow. Vitamin A quantity expressed as provitamin A activity was determined by HPLC.

Experimental protocol

Rats were fed one of the 3 diets during a 2-month period. After 1 month of diet, animals were given one i.p. injection of 15 mg/kg of DMH (Fluka, St. Quentin Fallavier, France). Once every 2 days, in each group, half of the animals received intragastric administration of ATRA (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) in 500 µl of coconut oil at a concentration of 1 mg/kg body weight (Fig. 1). ATRA suspensions were prepared fresh daily under dim illumina-

F1

tion and used not more than 45 min after preparation. Control rats were gavaged with 500 µl of the coconut oil vehicle.

Rats were killed 2 months after the beginning of the experiment. Colons were rapidly removed, slit open longitudinally and cleaned with ice-cold 0.9% NaCl solution. Except for ACF analysis, mucosal scrapings were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Assessment of ACF in the colon

The full length of the colon was examined for ACs. Tissue was washed with physiologic saline, cut open longitudinally, pinned out flat and fixed in 10% buffered formalin. Colon samples were stained with 0.5% methylene blue for 5 min, rinsed, placed on a glass slide and examined microscopically using $\times 40$ magnification for assessment of the number of ACs and ACF following a procedure previously described.²² The criteria for the identification of ACs were (i) increased size, (ii) thicker epithelial cell lining and (iii) increased pericryptal zone relative to normal crypts. Crypt multiplicity was defined as the number of crypts in each focus and scored blindly by a single observer. The efficacy end point was inhibition of the overall occurrence of ACs and ACF.

RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was isolated from colonic mucosa using an extraction kit (RNAagents Total RNA Isolation System; Promega, Charbonnières, France) according to the manufacturer’s protocol. RNA samples were reverse-transcribed as follows: 2 µg of total RNA were mixed with RNasin (0.5 U, Promega) and DNase I (0.5 U, Roche, Meylan, France) and incubated for 15 min at 37°C . Reverse primers (0.75 µM of each) were added and incubated for 10 min at 70°C . ImProm-II 5X reaction buffer (1×, Promega), MgCl_2 (10 mM, Promega), dNTP (0.5 mM each, Roche) and ImProm-II Reverse Transcriptase (10 U, Promega) were added for 1 hr at 42°C . Total volume was 20 µl, and each target mRNA was co-reverse-transcribed with β_2 -microglobulin mRNA except for RAR β , which was co-reverse-transcribed with GAPDH mRNA. Parallel reactions for each RNA sample were run in the absence of ImProm-II Reverse Transcriptase to assess the degree of contaminating genomic DNA. Moreover, RT-PCRs without any RNA sample were also assessed, to verify the absence of other contamination.

Analysis of gene expression using real-time PCR

Real-time quantitative RT-PCR involving LightCycler technology (Roche, Mannheim, Germany), using SYBR green detection, was performed according to the protocol recommended by the manufacturer and previously described.²³ PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel (Sigma). The identity and specificity of amplified products were assessed by sequencing with the Dye Terminator Reaction Cycle Kit on an ABI PRISM 377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT).

Forward and reverse primer sequences for PPAR γ and RXR α were similar to those used by Groubet *et al.*²⁴ The nucleotide sequences for the other primer pairs were as follows: β_2 -microglobulin sense 5'-GCCCAACTTCCTCAACTGCTACG-3', antisense 5'-GCATATACATCGGTCTCGGTGGG-3'; PPAR δ sense 5'-CGCAACAAGTGTCACTAGT-3', antisense 5'-CCAAAGCGGATAGCGTTGTG-3'; RAR α sense 5'-GCCTCGAATCTACAA-GCCTTGC-3', antisense 5'-GGATACTGCGTCCGAAGAAGC-3'; COX-2 sense 5'-GCAAAGGCCTCCATTGACCAGAG-3', antisense 5'-CGGGATACAGTTCATGGCATCG-3'.

Quantification data were analyzed using the LightCycler analysis software, version 3.5. In this analysis, the end point used in the real-time PCR quantification, Cp, was defined as the PCR cycle number that crosses an arbitrarily placed signal threshold. The standard curve was a plot of the Cp vs. the amount of initial cDNA used for amplification. The Cp was always the same for a given dilution of β_2 -microglobulin or GAPDH cDNA, whatever the diet-

any conditions, demonstrating that reference mRNA expression was not altered by diets and could be used as a normalizer for data from target mRNA. The relationship between the Cp and the initial amount of cDNA was linear. The correlation coefficient (r) was 1, and PCR amplification efficiencies of the target and the housekeeping gene were similar and close to 100%. Standard curves were used to estimate the concentration of both the target and the reference gene in each sample. Then, the results were normalized by the ratio of the relative concentration of target to that of β_2 -microglobulin in the same sample.

Quantification of RAR β mRNA by TaqMan PCR

The TaqMan PCR technique measures an accumulating PCR product in real time using a dual-labeled TaqMan fluorogenic probe. The experiment was conducted as previously described²³ using the same primers and fluorogenic probes purchased from Prologo (Paris, France). Each probe was synthesized with the fluorescent reporter dye FAM attached to the 5' end and the quencher dye TAMRA attached to the 3' end.

Quantification data were analyzed using the LightCycler Relative Quantification software (Roche, Mannheim, Germany) because RAR β and reference (GAPDH) cDNA amplification did not have the same efficiencies (Fig. 2*a,b*). This software provided calibrator-normalized relative quantification, including PCR efficiency correction. The calibrator was chosen among the rats fed CD. RNA was prepared and reverse-transcribed as described above. cDNA was used as the calibrator in all experiments for RAR β quantification. Results are expressed as the target/reference ratio divided by the target/reference ratio of the calibrator.

Immunoblotting

About 0.2 g of colonic mucosa was homogenized with an Ultra-Turrax T25 homogenizer in 3 ml of extraction buffer (Igepal CA-630 1%, sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, EDTA Na_2 13% and a cocktail of protease inhibitor in PBS, pH 7.4). After centrifugation at 11,000g for 15 min at 4°C, the supernatant was collected and the protein concentration measured at 595 nm using a bicinchoninic acid protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL) with BSA as a standard. Proteins were subjected to 10% SDS-PAGE and then transferred to PVDF membranes (Bio-Rad, Yvry-sur-Seine, France) in semidry medium at 90 mA for 2 hr. Transfer of proteins to PVDF membranes was confirmed by staining gels with Coomassie brilliant blue R-250 0.1% in methanol 40%, acetic acid 10%. Membranes were incubated with anti- β -catenin (developed in rabbit, Sigma) or anti-COX-2 (developed in rabbit; Santa Cruz Biotechnology, tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France) or anti- β -actin antibodies (developed in mouse, Sigma). Immunoreactive polypeptide bands were visualized enzymatically in a secondary antibody reaction using peroxidase-conjugated antirabbit or antimouse IgG (Sigma). Peroxidase substrates were added with Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France). The chemiluminescence reaction was visualized by autoradiography (Autoradiography films biomax light 1, Perkin-Elmer Life Sciences) and evaluated with an image analysis software (Bio 1D; Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France). The software provides data which are the sum of the intensities of the pixels inside the volume (*i.e.*, the signal obtained by the light emission captured on film) \times the area of a single pixel (in mm^2). A range of protein concentrations was loaded onto the gels, and different times of film exposure were used to ensure linear responses. β -Actin was revealed to assess the quality of loadings and transfer.

β -Catenin immunohistochemistry

To determine whether diets and/or ATRA administration affect localization of β -catenin, 7 μm sections of paraffin-embedded colon tissues from 6 rats of each dietary group were mounted on slides, deparaffinized, rehydrated and washed in PBS (pH 7.2). Antigen retrieval was achieved using microwave heating at 800 W

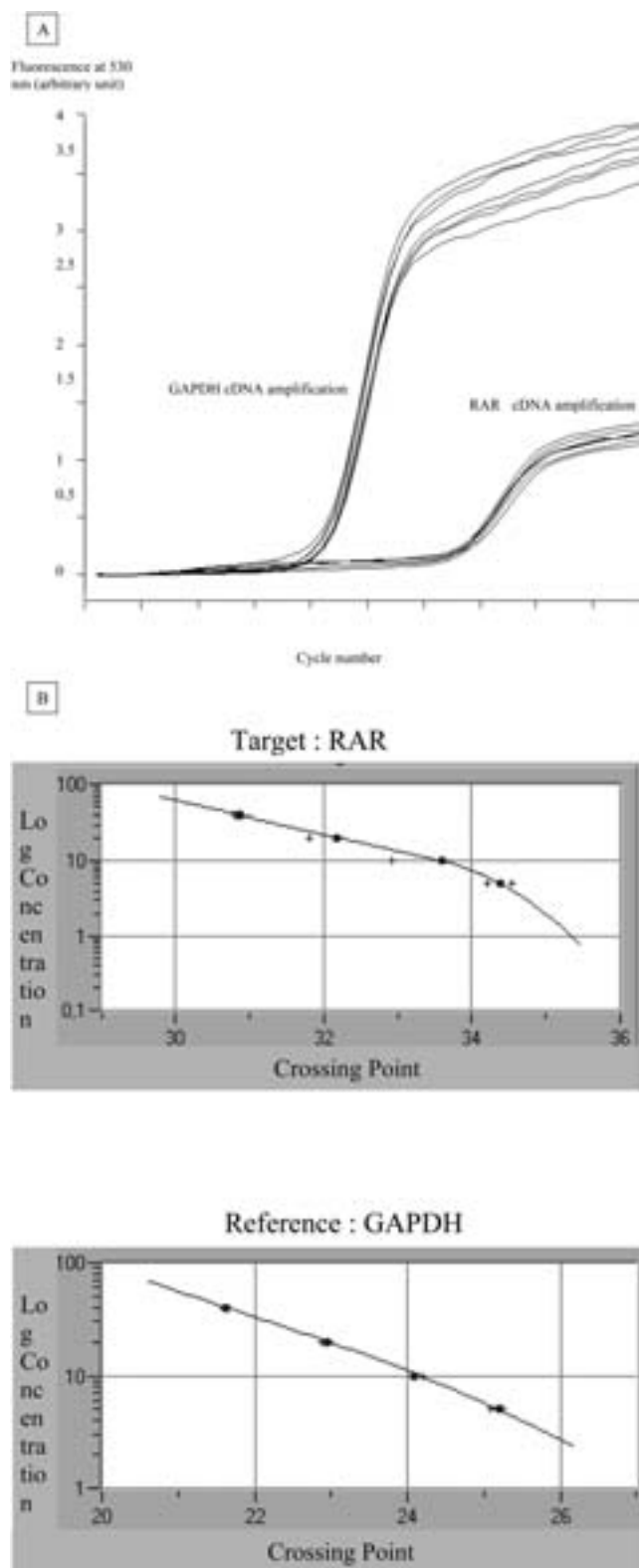


FIGURE 2 – (a) Fluorescence detection vs. cycle number of amplification. The figure reveals distinct target and reference PCR efficiencies. (b) Standard curves for target (RAR β) and reference (GAPDH) are created by a dilution series of a nucleic acid. The figure shows the initial cDNA log concentration plotted vs. Cp for the detection of significant fluorescence and reveals nonlinear standard curves. LightCycler Relative Quantification software takes account of the differences in PCR efficiencies according to the concentration of cDNA.

F2
AQ3

AQ4

TABLE II – DIETARY CHARACTERISTICS AND BODY WEIGHTS OF ANIMALS FED THE DIFFERENT EXPERIMENTAL DIETS¹

Diet groups	Mean food intake (g/day)	Mean calorie intake (kJ/day)	Mean body weight (g) on experimental diets at		
			Week 0, initial weight	Week 4	Week 8, final weight
Control diets					
Standard diet	23.84 ± 2.05 ^a	445.33 ± 38.29 ^a	196.33 ± 3.65 ^a	320.50 ± 15.44 ^a	390.50 ± 23.17 ^a
Standard diet + ATRA	22.82 ± 0.88 ^a	446.28 ± 16.44 ^a	193.67 ± 3.80 ^a	314.92 ± 8.60 ^a	392.64 ± 10.13 ^a
High-fat diets					
HLD	32.11 ± 2.58 ^b	943.71 ± 75.83 ^b	197.00 ± 6.99 ^a	331.13 ± 15.59 ^a	421.38 ± 20.10 ^b
HLD + ATRA	30.69 ± 2.30 ^b	901.98 ± 67.60 ^b	196.00 ± 5.42 ^a	321.20 ± 10.08 ^a	421.43 ± 13.13 ^b
VAHLD	34.94 ± 1.94 ^b	1026.89 ± 57.02 ^b	200.70 ± 2.67 ^a	327.60 ± 9.48 ^a	423.28 ± 23.22 ^b
VAHLD + ATRA	32.29 ± 2.29 ^b	949.00 ± 67.30 ^b	199.00 ± 2.30 ^a	316.67 ± 7.51 ^a	413.53 ± 11.66 ^b

¹Values are means ± SEM of measures performed on 15 rats, Student's *t*-test or ANOVA. For each column, different letters (a, b) indicate statistical differences between values obtained in each dietary group ($p < 0.05$).

TABLE III – EFFECT OF EXPERIMENTAL DIETS ON THE OCCURRENCE OF PRENEOPLASTIC LESIONS IN THE COLON OF RATS ADMINISTRATION DMH

Diet groups	ACF/colon	AC/ACF		
		1 AC	2 AC	3 AC or more
Control diets				
Standard diet	21.14 ± 11.64 ^a	12.86 ± 8.19 ^a	6.57 ± 4.23 ^a	1.71 ± 2.25 ^a
Standard diet + ATRA	22.89 ± 24.65 ^{a,d}	16.22 ± 20.02 ^a	5.33 ± 6.29 ^a	1.33 ± 2.03 ^a
High-fat diets				
HLD	191.56 ± 88.60 ^b	109.44 ± 56.36 ^b	58.30 ± 32.67 ^b	17.33 ± 8.76 ^b
HLD + ATRA	167.50 ± 128.30 ^{b,c}	121.83 ± 102.13 ^b	37.50 ± 28.72 ^b	8.00 ± 10.28 ^{a,b,c}
VAHLD	99.00 ± 28.43 ^c	65.25 ± 21.20 ^b	26.50 ± 9.19 ^b	6.50 ± 4.07 ^{c,d}
VAHLD + ATRA	46.2 ± 19.41 ^d	28.80 ± 13.29 ^a	12.80 ± 6.98 ^a	4.10 ± 4.01 ^{a,c}

Rats were fed the diets for 4 weeks, injected once with a low dose of DMH (15 mg/kg body weight) and then fed the diets for an additional 4 weeks. Rats received intragastric administration of ATRA (1 mg/kg body weight) or vehicle once every 2 days during the experimental period. Values are means ± SEM of measures performed on 9 rats, Student's *t*-test or ANOVA. For each column, different letters (a–d) indicate statistical differences between values obtained in each dietary group ($p < 0.05$).

for 8 min in citrate buffer (10 mM, pH 6). Endogenous peroxidase activity was quenched by incubation with 3% hydrogen peroxide in PBS for 30 min, and then sections were washed and blocked with 10% horse serum in PBS for 20 min. Sections were incubated overnight in a moist chamber at 4°C with the primary antibody, anti- β -catenin (developed in rabbit, Sigma) at a dilution of 1:100. Slides were washed in PBS and then incubated with a biotinylated goat antirabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) for 1 hr at room temperature at 1:500. Antigen-antibody complexes were detected with the streptavidin-biotin peroxidase (Amersham, Orsay, France) method using 3-amino-9-ethylcarbazole as a chromogenic substrate (AEC kit; Vector, Société ABCYS, Paris, France). After washing in tap water, some slides were counterstained with hematoxylin for 1 min. One section on each slide had the primary antibody step eliminated. Immunostained sections were examined by light microscopy.

Statistical procedure

Experimental data were analyzed by one-way ANOVA followed by Student's *t*-test using the Statgraphics Plus software. Experimental data are expressed as means ± SEM, and differences at $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

General observations

As expected, within 2 months, the body weights of animals fed the high-fat diets (HLD and VAHLD) were significantly higher than in the standard diet group. However, weights started to differ significantly only in the second period of the experimental procedure, *i.e.*, at the end of the second 4-week period ($p < 0.05$) (Table II). Energy provided by high-fat diets was greater than that of the standard diet (2,939 kJ/100 g vs. 1,868 kJ/100 g). Moreover, animals fed high-fat diets consumed a greater amount of food than those controls. Because our aim was to study the early molecular alterations linked to diet, the experimental procedure was ended 1

month after chemical initiation and after 2 months of diet consumption, at the beginning of significant weight gain. Intragastric administration of ATRA did not modify the weight gain of animals in each diet group. No difference in weight gain was observed in the HLD and VAHLD groups, which received different amounts of vitamin A. Concomitantly with these observations, the high-fat diets induced an increase in fat mass for both visceral and *s.c.* adipose tissues compared to the standard diet (data not shown).

On the basis of food consumption and body weight gain, the present data show that the weight gain of rats fed the high-fat diets was due to the fact that they ate more food rich in energetic components.

Quantification of ACs and ACF

To limit potential disturbances of molecular events by the chemical inducer, animals were treated with a single low DMH dose (15 mg/kg body weight) sufficient to initiate abnormal proliferation.²⁵ ACF were counted in 9 rats per group. The data are reported in Table III. ACF were present throughout the length of the colons except at the level of Peyer's patches. Rats fed HLD showed a significantly greater number of total ACF/colon compared to those fed standard diet (191.56 ± 88.60 vs. 21.14 ± 11.64, $p < 0.05$). Colon mucosa from the VAHLD group presented an intermediate number of total ACF (99 ± 28.43), both significantly different from the standard and HLD groups ($p < 0.05$). The occurrence of ACF induced by DMH in rats fed the standard diet was unchanged by ATRA administration. No significant effect was observed in ATRA-treated HLD-fed rats in spite of a decrease in the mean number of total ACF (167.50) and ACF with 1, 2 or 3 ACs compared to the results observed in HLD-fed rats. A significant effect of ATRA administration on ACF occurrence was observed in the VAHLD + ATRA group compared to the VAHLD alone group (46.2 ± 19.41 vs. 99.00 ± 28.43, $p < 0.05$). Under these dietary conditions (VAHLD + ATRA), the occurrence of ACF with 1–3 ACs appeared comparable to that observed in controls.

TABLE IV – EFFECT OF EXPERIMENTAL DIETS ON NUCLEAR RECEPTOR mRNA EXPRESSION

Diet groups	mRNA relative quantification ¹				
	PPAR δ	PPAR γ	RAR α	RAR β	RXR α
Control diets					
Standard diet	0.44 \pm 0.10 ^a	1.69 \pm 0.36 ^a	1.32 \pm 0.28 ^a	0.32 \pm 0.21 ^a	4.63 \pm 0.93 ^a
Standard diet + ATRA	0.42 \pm 0.07 ^a	1.51 \pm 0.30 ^a	1.42 \pm 0.32 ^a	0.29 \pm 0.34 ^a	4.59 \pm 0.43 ^a
High-fat diets					
HLD	0.48 \pm 0.09 ^a	1.13 \pm 0.24 ^b	1.10 \pm 0.21 ^a	0.15 \pm 0.03 ^b	4.81 \pm 0.58 ^a
HLD + ATRA	0.48 \pm 0.08 ^a	1.10 \pm 0.16 ^b	1.55 \pm 0.34 ^a	0.17 \pm 0.03 ^b	5.28 \pm 0.81 ^a
VAHLD	0.44 \pm 0.12 ^a	2.58 \pm 0.37 ^c	1.45 \pm 0.72 ^a	0.66 \pm 0.37 ^a	5.18 \pm 1.15 ^a
VAHLD + ATRA	0.48 \pm 0.06 ^a	2.13 \pm 0.55 ^c	1.15 \pm 0.29 ^a	0.64 \pm 0.35 ^a	4.46 \pm 0.52 ^a

Values are means \pm SEM of measures performed on 9 rats, Student's *t*-test or ANOVA. ¹Target mRNA are expressed in percent of β_2 -microglobulin mRNA, except for RAR β expressed first in percent of GAPDH mRNA and then submitted to normalization with a calibrator. For each column, different letters (a–c) indicate statistical differences between values obtained in each dietary group ($p < 0.05$).

TABLE V – EFFECT OF EXPERIMENTAL DIETS ON COX-2 EXPRESSION

Diet groups	COX-2 expression	
	mRNA ¹	Protein ²
Control diets		
Standard diet	1.03 \pm 0.26 ^a	7,695.05 \pm 1,843.96 ^a
Standard diet + ATRA	1.15 \pm 0.16 ^a	7,743.50 \pm 1,423.70 ^a
High-fat diets		
HLD	1.55 \pm 0.26 ^b	11,194.50 \pm 2,190.85 ^b
HLD + ATRA	1.69 \pm 0.52 ^b	11,790.10 \pm 5,664.63 ^b
VAHLD	1.31 \pm 0.48 ^{a,b}	7,847.34 \pm 1,610.78 ^a
VAHLD + ATRA	1.28 \pm 0.12 ^{a,b}	6,782.30 \pm 3,941.40 ^a

¹Target mRNA are expressed in percent of β_2 -microglobulin mRNA. ²Data for protein levels were obtained from autoradiographic film analyzed by Bio ID software, which provides data representing the sum of the intensities of the pixels inside the volume (signal revealed by the specific antibody) \times area of a single pixel (in mm²). Values are means \pm SEM of measures performed on 6 rats, Student's *t*-test or ANOVA. For each column, different letters (a, b) indicate statistical differences between values obtained in each dietary group ($p < 0.05$).

mRNA expression of nuclear receptors

We then investigated whether the modulation of ACF occurrence observed after a 2-month period of high-fat diet was associated with modifications in the expression of peroxisome proliferator and retinoid receptors. Relative quantification of the mRNA expression of these nuclear receptors was performed on the colonic epithelium of 9 rats per group (Table IV). In contrast to the effects observed on AC and ACF occurrence, administration of ATRA did not modify the mRNA expression of nuclear receptors induced by each kind of diet. Expression of PPAR δ mRNA was not modified by the different diets, while downregulation of PPAR γ was induced by HLD. Surprisingly, VAHLD, with an identical composition in fatty acids as HLD, provoked the opposite effect, with overexpression of PPAR γ mRNA compared to the standard diet ($p < 0.05$). High-fat diet in DMH-treated rats had no significant effect on the mRNA expression of RAR α or on that of the common partner RXR α . Rats fed HLD showed a significantly decreased level of RAR β mRNA expression compared to those fed the standard diet ($p < 0.05$).

Expression of COX-2 and β -catenin

In a large majority of colon cancers, the tumorigenic process is characterized by upregulation of COX-2 and loss of β -catenin degradation, leading to its accumulation. Whether the different diets could modify the levels of COX-2 and β -catenin proteins in the colonic mucosa was thus investigated.

Compared to the control group, the amount of COX-2 mRNA transcript and protein was increased in the HLD group ($p < 0.05$) both with and without ATRA (Table V). A slight, but not statisti-

cally significant, increase in the COX-2 mRNA level was also detected in the VAHLD group. However, the amount of COX-2 protein was comparable to that of controls and significantly lower than in the HLD group ($p < 0.05$).

HLD affected the level of total β -catenin (Fig. 3a). Rats fed HLD exhibited the highest level of β -catenin, whereas no significant modifications were found in the HLD + ATRA and the VAHLD groups ($p < 0.05$). In contrast, rats fed VAHLD + ATRA had the lowest level of β -catenin. Immunohistochemical analysis on 7 μ m sections of colon did not reveal any modification in β -catenin localization in any of the diet groups. In each dietary condition, β -catenin was clearly detectable along the basolateral membrane and in the cytoplasm of epithelial cells facing the lumen (Fig. 3b).

Discussion

Analysis of the relationship between lifestyle and disease occurrence has enjoyed increasing interest in recent decades. The idea that the risk of developing several malignant disorders is related to dietary fat intake and overweight now emerges as a general consensus. Nutritional factors are designated as the causative agents and estimated to account for approximately one-third of cancers in Western countries.²⁶ Since overweight and obesity participate in enhancing the risk of colon cancer, not only the type but also the amount of food that is consumed must be taken into account in health-maintenance programs. The present study is based on the use of high-fat diets containing various sources of fat commonly consumed in Western countries. These diets contained 60% of lipids, of which a large majority were saturated and possessed a palatable quality, leading to overconsumption and subsequent weight gain.²¹ Epidemiologic and experimental data suggest that energy in the form of fat and carbohydrate has a stronger influence on the risk of cancer than protein.²⁷ However, when animals were fed high-fat diets, they also ate less protein and carbohydrate than those fed the standard diet. Levels and sources of protein in the diet could have a significant influence on tumorigenesis.^{28–30} Carbohydrates as well as proteins may induce a broad range of effects,^{31,32} including modulation of cancer risk.³³ Although potential effects of proteins and carbohydrates on the occurrence of ACF and associated molecular disturbances cannot be ruled out, energy intake provided by fat appears to be the prevalent factor in the promotion of intestinal cancer. Overfeeding the high-fat diets (HLD and VAHLD) was associated with high energy intake and high fat intake, both of which increase the risk of colon cancer development.³⁴ As expected, early exposure to the high-fat diets induced both weight gain and an increase in the number of DMH-induced colonic preneoplastic lesions (ACF). Previous studies have suggested that there is a high degree of correlation between the number of multicrypt ACF and the outcome of colonic tumors at later stages.³⁵ The present study was conducted to analyze early

AQ16

T4

T5

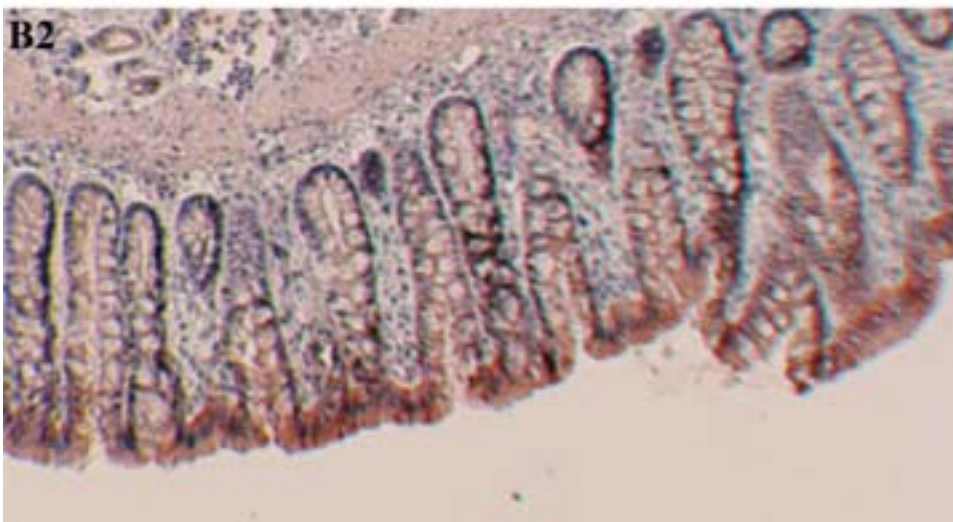
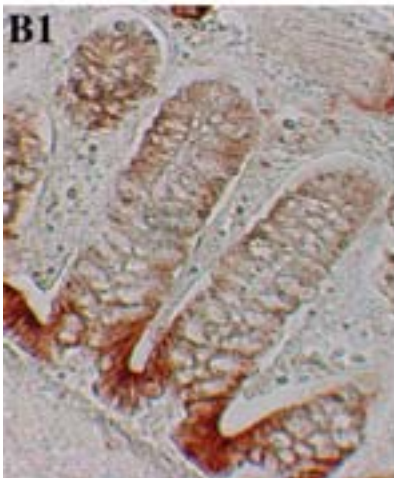
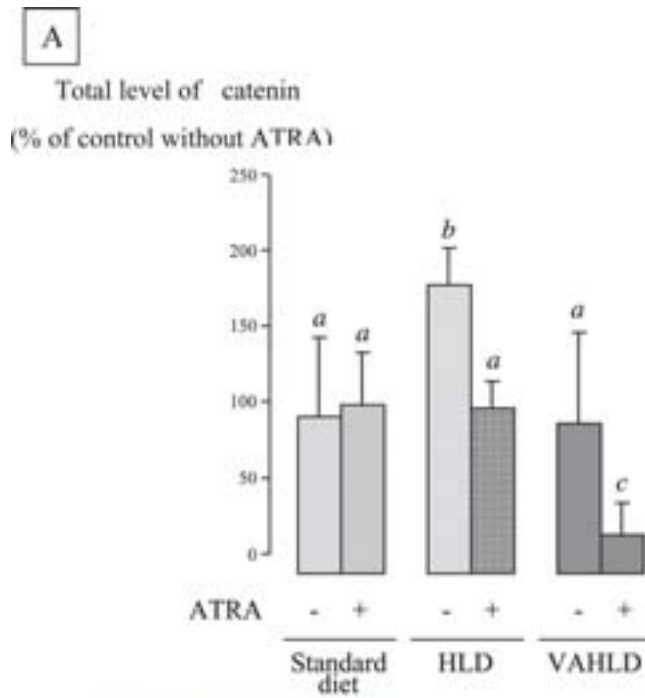


FIGURE 3 – β -Catenin levels and localization. (a) Effect of high-fat diet administration and ATRA supplementation on total β -catenin level in colon mucosa. Data represent means of measures performed on 6 animals, with SE represented by vertical bars. Different letters (a–c) indicate statistical differences between values obtained in each dietary group ($p < 0.05$). (b) Qualitative data on β -catenin localization obtained by immunohistochemistry. Intense staining of cells facing the lumen is observed (b1, original magnification $\times 400$) whatever the diet, with or without ATRA. Counterstaining with hematoxylin reveals no nuclear localization of β -catenin (b2, original magnification $\times 200$).

molecular alterations associated with high energy intake/weight gain in the earliest steps of carcinogenesis.

Colon carcinogenesis is a multistep process involving both progressive loss of growth control mechanisms and accumulation of mutations resulting in an increased level of neoplasia. The multistage process has been described as a "progressive disorder in signal transduction".³⁶ According to this model, progressive nongenetic disruptions in homeostatic mechanisms controlling proliferation, differentiation and apoptosis can increase the occurrence of cancer.

A number of studies on the colon tumor-promoting effects of dietary fat have focused on PPAR γ , first, because this receptor has a central role in nutrient-controlled gene regulation and, second, because of its involvement in colon carcinogenesis. The majority of reports concerning PPAR γ are gain-of-function experiments. Colon tumor cell lines respond to PPAR γ agonists by reducing growth rate and increasing differentiation or apoptosis.³⁷⁻⁴⁰ Our results show that HLD downregulates the level of PPAR γ mRNA. Underexpression of PPAR γ in rodent and human mammary gland carcinomas^{41,42} and in human prostate adenocarcinomas have been reported previously.⁴³ Moreover, Sarraf *et al.*⁴⁴ detected somatic loss-of-function mutations in the gene encoding PPAR γ in a few cases of sporadic colorectal carcinoma, suggesting that the wild-type gene compromises the survival of abnormal cells. The mechanism by which HLD downregulates PPAR γ mRNA remains unknown. In addition to downregulation of PPAR γ mRNA, we found that HLD produced an increase in the number of ACF. This observation is consistent with a clinical report that reduced levels of PPAR γ mRNA might be correlated with increased prevalence of colonic polyps.⁴⁵ In contrast to PPAR γ , the δ isoform appears to be involved in tumor formation rather than in ACF occurrence.⁴⁶ The PPAR δ isoform, expressed aberrantly during the development of colorectal cancer, was not affected by HLD in our experiment, though its mRNA levels were reported to be regulated in response to nutritional state in other tissues.⁴⁷ PPAR δ is a direct transcriptional target of β -catenin, and β -catenin levels were increased by HLD. It might thus be surprising that we did not detect an increase in the level of PPAR δ mRNA. However, even if the level of total β -catenin increased in the mucosa of rats fed HLD, immunohistochemical analyses did not reveal any abnormal nuclear localization.

Concomitant with the decrease in PPAR γ mRNA level, we found that HLD negatively affected the expression of RAR β . Vitamin A is involved in the maintenance of epithelial homeostasis, mainly through its interaction with RARs and RXRs. Loss of vitamin A sensitivity is a common feature of human cancer cells and appears to be a consequence of the silencing of the RAR β gene.⁴⁸ Various mechanisms have been evoked to explain how dietary fat modifies RAR β expression. High-fat diets may modify cell membrane properties⁴⁹ and, thus, alter retinol transport across colonocyte membranes. Alternatively, HLD might increase retinol esterification or modulate the rate of retinol metabolism.^{50,51} Autoregulation of RAR β gene expression plays an important role in the response of colon cancer cells to RA. Thus, one hypothesis is that HLD leads to a decrease in the cellular concentration of active RAs. A decrease in RA availability should then affect RAR β expression. However, why in our experiment HLD specifically induced downregulation of RAR β without modifying the levels of RAR α and RXR α mRNA remains to be elucidated. Our results do not exclude the possibility of alterations of RAR α and RXR α at the protein level.

Several reports have indicated that COX-2 is involved in colon carcinogenesis since this protein is overexpressed in human tumors.^{52,53} Fatty acids and derivatives are involved in the regulation of COX-2, which appears to be one of the main targets of these nutrients.⁵⁴ In the present study, feeding rats HLD induced an increase in the level of COX-2 mRNA and protein concomitant with underexpression of both nuclear receptors, PPAR γ and RAR β . Interestingly, associations between nuclear receptors and COX-2 regulation are supported by data from the literature. Inhibi-

tion of COX-2 expression is one of the mechanisms by which the PPAR γ pathway induces apoptosis and inhibits inflammation.¹⁵ Badawi and Badr⁴² also demonstrated a correlation between downregulation of the PPAR γ mRNA and the increase of COX-2 in human breast cancer, suggesting that the 2 events are closely related. Other reports also indicate that RAR β inhibits COX-2, to mediate a protective action against carcinogenesis.^{17,55} Thus, underexpression of RAR β and PPAR γ could participate in the effect of fatty acids on DMH-induced COX-2 overexpression.

The loss of β -catenin degradation is another event occurring early in colon tumorigenesis.⁵⁶ Even though our results showed an increase in the level of β -catenin in rats fed HLD, there was no change in β -catenin localization compared to rats fed the standard diet. The present results may describe an event prior to β -catenin translocation toward the nucleus. Vitamin A nuclear receptors are implicated in the targeting of β -catenin for degradation.¹⁸ Thus, we can postulate that alterations in nuclear receptor expression patterns could modify the level of β -catenin. Therefore, the observed β -catenin accumulation might be a consequence of RAR β downregulation. These results might be relevant to the role of nuclear receptors in the risk of colon cancer.

Vitamin A and its active form, ATRA, are used with promising results in the treatment of many tumors.⁹ Because overfeeding HLD affected early RAR β expression, another high energy/fat diet containing a higher level of vitamin A (mainly under the form of retinyl esters) was used, to determine whether vitamin A could prevent or reverse the HLD-induced modifications in gene expression. As expected, the level of RAR β mRNA was increased when vitamin A was included. Surprisingly, the level of PPAR γ mRNA in rats fed VAHLD also appeared significantly increased compared to that in rats fed HLD. Because this pattern of expression was associated with a reduction in ACF occurrence, our results support the idea that upregulation of both RAR β and PPAR γ is associated with an antiproliferative effect. The partial prevention of ACF occurrence by VAHLD also revealed the capability of vitamin A to thwart or reverse the effects of high energy/fat intake by restoring or maintaining levels of COX-2 and β -catenin comparable with those obtained with the standard diet. Interestingly, these results demonstrate that the alterations in gene expression pattern induced by fat/energy intake can be, at least in part, antagonized by vitamin A.

The present results also demonstrate that RAR β underexpression is a crucial parameter in disorders induced by HLD. Diet-derived ATRA is the main signaling retinoid in the body, and oral administration of ATRA restores expression of certain nuclear retinoid receptors altered during premalignant or malignant lesion development.⁵⁷ ATRA administration is useful in treating acute promyelocytic leukemia and dermatologic diseases and is promising in new therapies against cancer.⁹ Vitamin A under its active form is efficiently taken up by gastrointestinal cells and subsequently delivered to target cells. ATRA is not submitted to hepatic immobilization since *in vivo* it is synthesized from the vitamin A storage form in an irreversible way. Until now, very few *in vivo* experiments have analyzed the chemopreventive action of ATRA in colon tumorigenesis. Oral administration of ATRA, performed in each of our dietary groups, tended to reduce ACF occurrence in rats fed HLD or VAHLD. However, ATRA did not prevent the diet-induced alterations of the different molecular biomarkers that we analyzed. The dose of ATRA that we used appears insufficient to modify the expression level of its own receptor, RAR β . Only β -catenin levels appeared to be affected by the presence of ATRA. The mechanism by which ATRA affects β -catenin levels is unknown, but we cannot exclude that the regulation of β -catenin levels relies on the activation of RAR β by ATRA even in the absence of induction of RAR β expression. Our results reveal that maintenance of low levels of β -catenin could participate in the prevention of ACF occurrence. Additional studies are needed to further document the role of ATRA in the prevention of HLD-induced disturbances. There are, however, limitations in the use of

ATRA since this compound could be toxic, as observed in acute promyelocytic leukemia therapy.

In conclusion, our study demonstrates that excessive fat/energy intake inhibits RAR β and PPAR γ expression at an early stage and participates in DMH-induced ACF occurrence by increasing the level of COX-2 and β -catenin. These molecular alterations might correspond to some of the early events in the modification of the cell program that facilitates the onset of cancer. Although the mechanisms by which fat/energy intake promote ACF occurrence remain to be elucidated, downregulation of RAR β justifies the interest in the mode of action of vitamin A. This nutrient,

probably in part through RAR β upregulation, might prevent HLD-induced alterations of COX-2 and β -catenin levels. A detailed understanding of nutrient-induced signaling mechanisms and their consequences in colon cancer and in normal colon physiology will certainly contribute to the development of effective therapies.

Acknowledgements

We thank Mr. L. Caune for animal care and Ms. K. Mayo and Dr. S.J. Saupé for correcting the English.

References

- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;348:1625–38.
- Hambly RJ, Rumney CJ, Cunninghame M, Fletcher JM, Rijken PJ, Rowland IR. Influence of diets containing high and low risk factors for colon cancer on early stages of carcinogenesis in human flora-associated (HFA) rats. *Carcinogenesis* 1997;18:1535–9.
- Reddy BS. Dietary fat, calories, and fiber in colon cancer. *Prev Med* 1993;22:738–49.
- Dommels YE, Heemskerk S, van den Berg H, Alink GM, van Bladeren PJ, van Ommen B. Effects of high fat fish oil and high fat corn oil diets on initiation of AOM-induced colonic aberrant crypt foci in male F344 rats. *Food Chem Toxicol* 2003;41:1739–47.
- Raju J, Bird RP. Energy restriction reduces the number of advanced aberrant crypt foci and attenuates the expression of colonic transforming growth factor beta and cyclooxygenase isoforms in Zucker obese (fa/fa) rats. *Cancer Res* 2003;63:6595–601.
- Mutanen M, Pajari AM, Oikarinen SI. Beef induces and rye bran prevents the formation of intestinal polyps in Apc(Min) mice: relation to β -catenin and PKC isozymes. *Carcinogenesis* 2000;21:1167–73.
- Kallay E, Bareis P, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Toyokuni S, Cross HS. Vitamin D receptor activity and prevention of colonic hyperproliferation and oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1191–96.
- Auwerx J. Nuclear receptors. I. PPAR gamma in the gastrointestinal tract: gain or pain? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G581–5.
- Brtko J, Thalhammer J. Renaissance of the biologically active vitamin A derivatives: established and novel directed therapies for cancer and chemoprevention. *Curr Pharm Des* 2003;9:2067–77.
- DuBois RN, Gupta R, Brockman J, Reddy BS, Krakow SL, Lazar MA. The nuclear eicosanoid receptor, PPAR γ , is aberrantly expressed in colonic cancers. *Carcinogenesis* 1998;19:49–53.
- Cote S, Mompalao RL. Activation of the retinoic acid receptor beta gene by 5-aza-2'-deoxycytidine in human DLD-1 colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 1997;8:56–61.
- Harman FS, Nicol CJ, Marin HE, Ward JM, Gonzalez FJ, Peters JM. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis. *Nat Med* 2004;10:481–3.
- Altucci L, Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nature Rev Cancer* 2001;1:181–93.
- Fan YY, Spencer TE, Wang N, Moyer MP, Chapkin RS. Chemopreventive n-3 fatty acids activate RXR α in colonocytes. *Carcinogenesis* 2003;24:1541–8.
- Yang WL, Frucht H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2001;22:1379–83.
- Girnun GD, Smith WM, Drori S, Sarraf P, Mueller E, Eng C, Nambiar P, Rosenberg DW, Bronson RT, Edelman W, Kucherlapati R, Gonzalez FJ, et al. APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPAR γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13771–6.
- Li M, Song S, Lippman SM, Zhang XK, Liu X, Lotan R, Xu XC. Induction of retinoic acid receptor-beta suppresses cyclooxygenase-2 expression in esophageal cancer cells. *Oncogene* 2002;21:411–18.
- Xiao JH, Ghosn C, Hinchman C, Forbes C, Wang J, Snider N, Cordrey A, Zhao Y, Chandraratna RA. Adenomatous polyposis coli (APC)-independent regulation of β -catenin degradation via a retinoid X receptor-mediated pathway. *J Biol Chem* 2003;278:29954–62.
- Sun SY, Lotan R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;41:41–55.
- Mollers L, Paulsen JE, Olstorn HB, Knutsen HK, Alexander J. Dietary retinoic acid supplementation stimulates intestinal tumour formation and growth in multiple intestinal neoplasia (Min)/+ mice. *Carcinogenesis* 2004;25:149–53.
- Berraondo B, Marti A, Duncan JS, Trayhurn P, Martinez JA. Up-regulation of muscle *UCP2* gene expression by a new β 3-adrenoceptor agonist, trectadrine, in obese (cafeteria) rodents, but downregulation in lean animals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:156–63.
- Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 1987;37:147–51.
- Delage B, Groubet R, Pallet V, Bairras C, Higuieret P, Cassand P. Vitamin A prevents high fat diet-induced ACF development and modifies the pattern of expression of peroxisome proliferator and retinoic acid receptor mRNA. *Nutr Cancer* 2004;48:28–36.
- Groubet R, Pallet V, Delage B, Redonnet A, Higuieret P, Cassand P. Hyperlipidic diets induce early alterations of the vitamin A signalling pathway in rat colonic mucosa. *Endocr Regul* 2003;37:137–44.
- Bird RP, McLellan EA, Bruce WR. Aberrant crypts, putative precancerous lesions, in the study of the role of diet in the aetiology of colon cancer. *Cancer Surv* 1989;8:189–200.
- Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981;66:1191–308.
- Visek WJ, Clinton SK. Dietary protein and cancer. In: Alfin-Slater RB, Kritchevsky D, eds. Human nutrition a comprehensive treatise. Cancer and nutrition. vol.7. New York: Plenum Press, 1991.103–26.
- Clinton SK, Imrey PB, Mangian HJ, Nandkumar S, Visek WJ. The combined effects of dietary fat, protein, and energy intake on azoxymethane-induced intestinal and renal carcinogenesis. *Cancer Res* 1992;52:857–65.
- McIntosh GH, Regester GO, Le Leu RK, Royle PJ, Smithers GW. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. *J Nutr* 1995;125:809–16.
- McIntosh GH, Le Leu RK. Whey proteins protect more than red meat against azoxymethane induced ACF in Wistar rats. *Cancer Lett* 2003;198:43–51.
- Guillon F, Champ MM. Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *Br J Nutr* 2002;88:S293–306.
- Kaur N, Gupta AK. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J Biosci* 2002;27:703–14.
- Mathers JC, Mickleburgh I, Chapman PC, Bishop DT, Burn J. Can resistant starch and/or aspirin prevent the development of colonic neoplasia? The Concerted Action Polyp Prevention (CAPP) 1 study. *Proc Nutr Soc* 2003;62:51–7.
- Lipkin M, Reddy B, Newmark H, Lamprecht SA. Dietary factors in human colorectal cancer. *Annu Rev Nutr* 1999;19:545–86.
- Bird RP, Good CK. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol Lett* 2000;112/113:395–402.
- Weinstein IB. The role of protein kinase C in growth control and the concept of carcinogenesis as a progressive disorder in signal transduction. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1990;24:307–16.
- Brockman JA, Gupta RA, Dubois RN. Activation of PPAR γ leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 1998;115:1049–55.
- Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, Spiegelman BM. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR γ . *Nat Med* 1998;4:1046–52.
- Yoshizumi T, Ohta T, Ninomiya I, Terada I, Fushida S, Fujimura T, Nishimura G, Shimizu K, Yi S, Miwa K. Thiazolidinedione, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, inhibits growth and metastasis of HT-29 human colon cancer cells through differentiation-promoting effects. *Int J Oncol* 2004;25:631–9.
- Kato M, Kusumi T, Tsuchida S, Tanaka M, Sasaki M, Kudo H. Induction of differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in colon cancer cell lines by troglitazone. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:73–9.
- Gimble JM, Pighetti GM, Lerner MR, Wu X, Lightfoot SA, Brackett DJ, Darcy K, Hollingsworth AB. Expression of peroxisome proliferator

- tor activated receptor mRNA in normal and tumorigenic rodent mammary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:813–7.
42. Badawi AF, Badr MZ. Expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and levels of prostaglandin E₂ and 15-deoxy- δ 12, 14-prostaglandin J₂ in human breast cancer and metastasis. *Int J Cancer* 2003;103:84–90.
 43. Mueller E, Smith M, Sarraf P, Kroll T, Aiyyer A, Kaufman DS, Oh W, Demetri G, Figg WD, Zhou XP, Eng C, Spiegelman BM, et al. Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10990–5.
 44. Sarraf P, Mueller E, Smith WM, Wright HM, Kum JB, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Spiegelman BM, Eng C. Loss-of-function mutations in PPAR γ associated with human colon cancer. *Mol Cell* 1999;3:799–804.
 45. Bogazzi F, Ultimieri F, Raggi F, Costa A, Gasperi M, Cecconi E, Mosca F, Bartalena L, Martino E. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression is reduced in the colonic mucosa of acromegalic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2403–6.
 46. Park BH, Vogelstein B, Kinzler KW. Genetic disruption of PPAR δ decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2598–603.
 47. Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* 2001;142:4195–202.
 48. Lee MO, Han SY, Jiang S, Park JH, Kim SJ. Differential effects of retinoic acid on growth and apoptosis in human colon cancer cell lines associated with the induction of retinoic acid receptor beta. *Biochem Pharmacol* 2000;59:485–96.
 49. Jump DB. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004;41:41–78.
 50. Randolph RK, Ross AC. Regulation of retinol uptake and esterification in MCF-7 and HepG2 cells by exogenous fatty acids. *J Lipid Res* 1991;32:809–20.
 51. Randolph RK, Simon M. Metabolic regulation of active retinoid concentrations in cultured human epidermal keratinocytes by exogenous fatty acids. *Arch Biochem Biophys* 1995;318:6–14.
 52. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:3785–9.
 53. Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* 1995;55:2556–9.
 54. Singh J, Hamid R, Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of dietary fat during the postinitiation stage of colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1997;57:3465–70.
 55. Trifan OC, Hla T. Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. *J Cell Mol Med* 2003;7:207–22.
 56. Lustig B, Behrens J. The Wnt signalling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:199–221.
 57. Lotan R, Xu XC, Lippman SM, Ro JY, Lee JS, Lee JJ, Hong WK. Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its upregulation by isotretinoin. *N Engl J Med*. 1995;332:1405–10.
 58. Folch J, Lees M, Sloane GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497–509.



Author Proof

II.4. Conclusion

Nos données supportent l'hypothèse selon laquelle des apports excessifs en acides gras induisant une prise de poids sont précocément associés à des altérations de l'expression des ARNm des récepteurs PPAR γ et RAR β .

L'effet promoteur du régime HLD est associé à un profil spécifique d'expression : L'effet promoteur, mis en évidence par le dénombrement des FCA, est confirmé par des taux élevés de COX-2 et de β caténine (Tableau IV, Figure 3A, article 2). Alors que le régime riche en AGPI n-6 conduisait à la surexpression de PPAR γ (Tableau 5, article 1), la surconsommation du régime HLD associe un effet promoteur sur la cancérogenèse à un taux abaissé d'ARNm PPAR γ . Donc, un effet promoteur des acides gras n'est pas systématiquement lié à une surexpression de PPAR γ . Ce résultat confirme la complexité de la fonction de ce récepteur dans le processus de la cancérogenèse colique (Girnun et al., 2002) et confirme qu'il est une cible pharmacologique potentielle pour le traitement du CCR. L'hypoexpression concomitante de PPAR γ et de RAR β supporte les données évaluant que ces 2 récepteurs ont des activités anti-tumorales via l'induction de processus tel que celui de la différenciation. Il n'est donc pas à exclure que leur sous-expression soit un mécanisme qui facilite l'échappement de cellules anormales vis-à-vis de la mort cellulaire ou de l'arrêt de croissance. Ainsi, dans le cadre de la promotion de la cancérogenèse colique par une surconsommation d'une alimentation hyperlipidique, les acides gras pourraient faciliter la prolifération cellulaire en altérant l'expression de gènes qui la compromette.

La vitamine A présente dans le régime VAHLD développe une activité antagoniste à celle des acides gras (Tableau IV, article 2) : Nos résultats confortent encore l'implication de la vitamine A et de ses récepteurs dans des processus anti-tumoraux. De plus, la présence de vitamine A dans le régime VAHLD permet le maintien ou la réinduction d'une expression des ARNm de RAR β (déterminante dans l'effet antiprolifératif du nutriment) comparable à celle observée avec le régime standard et prévient l'hypoexpression de PPAR γ . Ainsi, la vitamine A n'agit pas exclusivement sur sa propre voie d'action même si aucun mécanisme connu n'explique encore comment elle module l'effet promoteur des acides gras et l'expression des ARNm PPAR γ .

L'administration d'ATRA influence le taux de β caténine (Figure 3A, article 2) : Si l'utilisation de la forme active de la vitamine A permet de prévenir en particulier le stockage du nutriment dans le foie, elle peut avoir un effet toxique pour l'organisme. La dose d'ATRA

utilisée semble pourtant déterminante pour l'observation d'éventuels effets sur l'expression des récepteurs. En effet, nos résultats encore préliminaires montrent que sans modifier l'expression des ARNm RAR β , l'ATRA peut moduler le taux de β caténine qui semble déterminant dans l'apparition des FCA.

L'ensemble de ces résultats justifie l'intérêt d'étudier l'expression des récepteurs nucléaires, précocément modulée par les régimes hyperlipidiques consommés dans les pays occidentaux.

Nos données justifient aussi l'intérêt d'étudier la participation de la vitamine A dans le traitement du cancer colorectal et de l'employer dans une optique de prévention nutritionnelle de ce cancer.



Chapitre III : Etude Chez l'Homme

Chapitre III : Etude Chez l'Homme

Description des profils d'expression des récepteurs nucléaires dans la muqueuse colorectale - saine et tumorale - chez l'Homme

Evaluation des modifications de l'expression des récepteurs chez des patients en surpoids ou obèses.

Actuellement, de nombreux travaux de biologie cellulaire et moléculaire visent à mieux comprendre les mécanismes d'intervention des récepteurs nucléaires dans le contrôle de l'expression génique et les processus physiopathologiques. Dans ce domaine de recherche, les approches chez l'Homme ne sont que faiblement documentées. La majeure partie des données bibliographiques a été obtenue sur des modèles expérimentaux et ce n'est que très récemment que des travaux cliniques se sont consacrés à l'expression des récepteurs nucléaires dans différentes pathologies (maladie d'Alzheimer, hypothyroïdie, diabète, obésité, cancer...). Les résultats de ces travaux permettent de mieux caractériser les fonctions des récepteurs nucléaires et envisagent qu'ils puissent constituer des cibles thérapeutiques. C'est dans ce courant de recherche que s'inscrit le travail présenté ici. En effet, l'**objectif premier** de cette étude était de définir les profils d'expression des PPARs et des récepteurs activés par les rétinoïdes ainsi que leurs interactions potentielles dans les muqueuses saines et les carcinomes colorectaux. La caractérisation de l'implication des récepteurs et de la modulation de leur expression dans le processus tumoral a pour but d'améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués dans le cancer et à terme de favoriser le développement de stratégies chimiopréventives et curatives. De plus, à ce jour et à notre connaissance, aucune analyse visant à comparer l'expression des récepteurs PPARs, RXR α et RARs dans les tumeurs colorectales humaines n'a été publiée.

Un deuxième volet de ce travail se positionne dans le domaine de recherche Nutrition-Cancer. En effet, des études de mortalité par cancer ou d'incidence des cancers montrent que les individus présentant un surpoids ou obèses constituent une population à haut risque de cancers (*Bianchini et al., 2002; Calle et al., 2003*). Actuellement, en France, environ 42% des individus sont en surpoids et 11% sont obèses (*étude ObEpi 2003*). A l'échelle mondiale, un milliard de personnes sont en surpoids dont 300 millions sont obèses (*WCRF*).

L'obésité correspond à un excès de masse grasse apprécié de manière générale par l'indice de Quetelet appelé aussi Indice de Masse Corporelle (IMC) (*Deurenberg et al., 1991*). En pratique, les seuils utilisés sont pour l'homme comme pour la femme de 25 pour définir le surpoids, de 30 pour l'obésité modérée, de 35 pour l'obésité sévère et 40 pour l'obésité massive. Au delà de ce simple constat d'excès de tissu adipeux, l'obésité est une pathologie complexe associant des facteurs génétiques, un déséquilibre du métabolisme énergétique, des facteurs psycho-pathologiques et des complications diverses, en particulier endocrinométaboliques. L'obésité constitue un problème majeur de santé publique du fait de sa prévalence, de la fréquence et de la gravité de ses complications. En particulier, l'obésité et le diabète de type II sont souvent associés et la quasi-totalité des obèses sont insulino-résistants. Le terme de Syndrome X regroupe les désordres métaboliques souvent associés à l'état d'obésité : hyperinsulinémie, hyperlipidémie, hypercholestérolémie, insulino-résistance, hyperglycémie, diabète de type II (non insulino-dépendant), hypertension et hyperuricémie (*Reaven, 1988*). Plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'un excès de poids corporel, défini par un IMC supérieur à 25, était associé à une augmentation du risque de cancer colorectal (*Calle et al., 2003; Giovannucci, 2003*). Des preuves substantielles indiquent une association positive entre l'IMC et le risque de cancer colorectal (*Caan et al., 1998; Murphy et al., 2000*). L'hypothèse actuelle suggère que l'IMC serait responsable d'une augmentation de l'incidence de CCR via l'élévation de la concentration sanguine d'insuline et de facteurs de croissance insulino-mimétiques (IGF, Insulin-like Growth Factor) qui favoriseraient la prolifération de cellules coliques malignes (*McKeown-Eyssen, 1994; Giovannucci, 1995(b)*).

Le **second objectif** de cette étude visait à évaluer s'il existe une relation entre l'IMC et l'expression des récepteurs nucléaires dans la muqueuse colorectale.

- Spécifiquement, les PPARs sont largement impliqués dans le métabolisme des lipides et dans le processus d'adipogenèse (*Kersten, 2002*). Ils constituent déjà des cibles thérapeutiques pour le traitement de l'insulino-résistance par les TZDs (AvandiaTM, ActosTM). Ces antidiabétiques ont d'ailleurs démontré sur des modèles animaux leur capacité à inhiber le processus de cancérogenèse colique (*Osawa et al., 2003*). Ces données corroborent l'idée d'une implication de l'hyperinsulinémie dans la relation obésité-CCR et attribuent aussi aux PPARs un rôle clé dans la relation Obésité-Cancer.

- De par le rôle important que tient la vitamine A dans le développement du tissu adipeux, des modulations de la biodisponibilité de ce nutriment ont des répercussions sur la masse corporelle. Ainsi, des souris carencées en vitamine A présentent une augmentation marquée de leur masse adipeuse et de leur poids (*Ribot et al., 2001*). Il n'est donc pas impossible de penser que l'installation d'un état de surpoids ou d'obésité soit associée à des altérations de la fonctionnalité de la vitamine A. De plus, il semble que ce nutriment améliore, vraisemblablement de façon indirecte, la capacité de l'insuline à maintenir une glycémie normale (*Facchini et al., 1996*). Ainsi, serait-il possible que la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie soient favorisée par une faible biodisponibilité en vitamine A ? Une étude humaine a montré que des patients présentant un diabète de type II, caractérisé par une résistance des tissus périphériques à l'insuline, possédaient un statut vitaminique A normal (*Basualdo et al., 1997*). Pourtant, une étude récente a montré que les concentrations sériques de rétinol mesurées chez des patients en surpoids ou obèses, présentant souvent des altérations de la sensibilité à l'insuline, s'avéraient plus faibles que chez des individus de poids normal (*Viroonudomphol et al., 2003*). Ainsi, le lien potentiel entre biodisponibilité en vitamine A et insuline reste présumé. Cependant, il n'est pas à exclure que des altérations dans la fonctionnalité de la vitamine A puissent exister chez des patients en surpoids ou obèses et favoriser à terme l'apparition de tumeur colorectale.

En résumé, nous avons déterminé les profils d'expression des récepteurs nucléaires dans la muqueuse colique saine et tumorale et cherché à apprécier la présence d'altérations précoces de l'expression de ces récepteurs chez les patients en surpoids.

1. Méthodologie

Cette étude a été réalisée sur 20 patients de sexe masculin âgés de 41 à 87 ans et hospitalisés pour un cancer colorectal dans le service d'Hépatogastro-Entérologie de l'hôpital St André (Bordeaux) durant la période s'étendant de janvier 2003 à septembre 2004. Neuf patients présentaient un IMC<25 et onze un IMC>25 (dont quatre avec IMC>30). Avec la collaboration du Pr. Eric Rullier, les échantillons de tissus colorectaux sains et tumoraux ont été prélevés pour chaque patient lors de l'opération de résection d'un segment colique contenant la tumeur. L'analyse microscopique des échantillons sains et tumoraux a été effectuée par le Dr. Anne Rullier, anatomopathologiste au CHU de Bordeaux. Les informations concernant l'âge, l'IMC, la localisation et le stade des tumeurs sont regroupés dans le **tableau I** de l'article 3.

2. Principaux résultats

Cette étude a permis :

- (i) de mettre en évidence des différences d'expression des récepteurs nucléaires PPARs, RARs et RXR α entre la muqueuse saine et les tumeurs colorectales,
- (ii) d'observer des corrélations distinctes entre les récepteurs nucléaires selon le tissu (sain ou tumoral),
- (iii) de comparer les profils des récepteurs nucléaires chez les patients avec un IMC<25 et chez les patients en surpoids ou obèses (IMC>25),
- (iv) d'évaluer, dans la muqueuse saine, si l'expression des récepteurs était significative de l'indice de masse corporelle des patients.

Aucune corrélation de l'expression des récepteurs avec les stades ou les sites de localisation des tumeurs n'a été mise en évidence. La sous-représentation du stade A de Dukes pourrait avoir constitué une limite.

Nous avons aussi déterminé l'expression de COX-2 modulée par les différents récepteurs et reconnue pour être dérégulée dans les CCRs.

3. Article 3

Article 3 :

***'Nuclear receptor expression in healthy and tumor colorectal mucosa
from lean and overweight patients'***

Nuclear receptor expression in healthy and tumor colorectal mucosa from lean and overweight patients

Barbara Delage^a, Anne Rullier^b, Maylis Capdepon^c,
Eric Rullier^c, Pierrette Cassand^a

^a *Laboratory of Food and Colon Carcinogenesis, Unit of Nutrition and Cellular Signalling, University Bordeaux I, Avenue des facultés, 33405 Talence cedex, France*

^b *Department of Pathology, Pellegrin Hospital, 33076 Bordeaux, France*

^c *Department of Digestive Surgery, Saint-André Hospital, 33075 Bordeaux, France*

Abstract

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and retinoid-activated receptors (RARs and RXRs) are transcriptional regulators involved in both lipid metabolism and cellular homeostasis. Given the nuclear receptor properties in improving obesity-associated disorders and in chemoprevention or chemotherapeutic, we need to better understand the relationship between the overweight and the increasing risk of developing colorectal cancer (CRC). So, we investigated the mRNA expression of nuclear receptor subtypes in 20 resected samples of CRC and paired non tumor tissues. Interestingly and despite heterogeneous pattern in the expression level of PPAR γ and PPAR δ , the expression of retinoid-activated receptors was significantly increased in tumor tissues from lean compared to overweight patients. Nevertheless, the quantification of receptor expression in macroscopically normal mucosa did not reveal differences explaining the causal link between weight statut and CRC risk.

Keywords: Peroxisome proliferator-activated receptor; Retinoid-activated receptor; Colorectal cancer; Overweight; BMI

1. Introduction

Approximately 5% of individuals will develop colorectal carcinoma during their lifetime. It typically progresses from adenomatous polyps, dysplastic polyps to invasive carcinoma [1,2]. Colorectal cancer (CRC) appears particularly vulnerable to the effects of nutritional factors and dietary habits. Indeed, the etiology of CRC involves changes in cell environment and signal transduction related to dietary components. Excessive consumption of calories from fat is specifically thought to be largely responsible for the increasing incidence of CRC in western countries. Obesity status associated with high Body Mass Indices (BMI) is correlated with high rates of CRC [3,4]. The underlying mechanisms of why and how overweight and obesity increase cancer risk are emerging only gradually. One supposed mechanism is the onset of insulin resistance and the resulting hyperinsulinemia developing growth-promoting effects [5].

Alterations in the homeostasis of the metabolism of fatty acids and their derivatives are considered as one major cause of obesity-related symptoms called Syndrome X including hyperinsulinemia, hyperlipidemia, hypertension and type II diabetes [6]. Peroxisome proliferator-activated nuclear receptor (PPAR) family, which includes three isotypes α , β/δ and γ , plays a pivotal role in fat metabolism regulation and adipogenesis. Knowledge concerning these ligand-activated transcription factors identified the primordial role of PPAR γ and β/δ in adipocytic fate. Main inducer of adipocyte differentiation, PPAR γ is a target for insulin sensitizing drugs called thiazolidinediones (TZD) [7]. The δ isoform of PPAR was also involved in fat metabolism since Cheng et al. observed that knock out mice for PPAR β/δ were able to upregulate fat burning and increase their body weight when submitted to high fat diets [8]. Moreover, hypolipidemic and hypoglycemic drugs were shown to activate PPAR β/δ [9]. Contrary to the differentiating role of PPAR γ , the β/δ isotype could promote pre-adipocyte proliferation before the differentiation step [10].

Obesity-related diseases could affect the integrity of colon tissue homeostasis since they increase the risk factor of CRC [11]. Antidiabetic treatments were shown able to inhibit colon carcinogenesis in rodent models [12,13] and to promote differentiation of colon cancer cells [14]. Moreover, concomitant suppression of hyperlipidemia and polyp formation were recently observed in APC-deficient mice treated with TZD [15]. PPAR γ clearly appears as an interesting target for drug development in prevention of both obesity and colon pathogenesis. Indeed, the activation of PPAR γ by antidiabetic TZD, polyunsaturated fatty acids (PUFA) as

those present in fish oil as well as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) revealed anticolonial cancer properties [16,17]. Anti-proliferative effect of PPAR γ observed *in vitro* [14,18] and inactivating mutation in PPAR γ gene found in colonic tumors [19] argue for its potential function as tumor suppressor. Moreover, a significant inverse correlation was found between the mRNA expression of the receptor in colon mucosa and the risk of polyp occurrence [20]. PPAR β/δ may also play an important role in the process of colon carcinogenesis. Indeed, PPAR β/δ mRNA has been found to be frequently overexpressed in both colon cancer cells [21] and in tumours of chemically-initiated animals [22].

PPAR belong to the superfamily of ligand-activated nuclear receptors. Their transcriptional activity is dependent on the presence of the retinoic X receptor (RXR), activated by 9-cis retinoic acid (9-cis RA). Heterodimerization with RXR is essential for the activity of all class II nuclear receptors [23] and explain how fatty acids and retinoids can supervise lipid metabolism [24]. The acid forms of vitamin A - 9-cis RA and all-trans retinoic acid (atRA) - also exhibit anti-tumoral activities in many tissues through binding to RXR and retinoic acid-activated receptor (RAR). Indeed, retinoids have chemopreventive and chemotherapeutic activities with regard to their capacity to induce cell differentiation and apoptosis [25]. RXR α is by far the most prevalent isoform in colon, while RXR β and RXR γ are expressed at low levels [26]. All the three RAR isotypes - α , β , γ - are expressed or induced by retinoids in colon cancer cell lines [27]. Alterations in retinoid receptor expression and function have been observed in various *in vivo* and *in vitro* cancer cells, but poorly investigated in CRC [28]. These defects could induce disturbances in biological activities of retinoids and in the response of target cells to retinoid derivatives.

Gene expression profiling aim to elucidate features underlying pathogenesis and has already led to highlight alterations in many genes in colon cancer [29,30]. In order to better characterize the involvement of nuclear receptors in both healthy colorectal mucosa and tumor tissue, we determined their mRNA expression pattern in patients with colorectal cancer. Moreover, overweight and obese individuals have an increased risk of developing colorectal cancer and BMI was shown to be correlated with the risk. Thus, we investigated whether high body weights are related with early alterations in the expression of nuclear receptors in normal colon mucosa.

Table 1. Summary of clinical and pathological data

Case n°	Age	BMI	T ^a	N ^a	M ^a	Dukes ^b	Site
1	80	20.83	4	1	x	C	asc. colon
2	80	29.75	3	1	x	C	asc. colon
3	72	38.75	3	1	x	C	rectum
4	82	31.41	3	0	x	B	rectum
5	81	21.47	3	0	x	B	sigmoid
6	69	25.34	3	0	x	B	asc. colon
7	56	24.68	3	1	1	D	asc. colon
8	66	21.91	3	0	x	B	asc. colon
9	69	24.34	4	1	x	C	rectum
10	86	24.91	4	1	1	D	asc. colon
11	87	23.03	3	1	x	C	rectum
12	66	27.68	4	0	x	B	sigmoid
13	73	28.13	4	1	x	C	sigmoid
14	71	34.60	3	1	x	C	rectum
15	60	30.24	2	0	1	D	sigmoid
16	61	26.12	3	0	x	B	sigmoid
17	41	18.73	4	1	x	C	asc. colon
18	85	25.95	3	1	x	C	asc. colon
19	72	29.06	2	0	1	D	des.colon
20	76	22.72	3	1	1	D	rectum

^a According to the TNM classification : T, primary tumor; N, regional lymph nodes; M, metastasis

^b According to the Dukes classification

2. Material and Methods

2.1. Patients and samples.

Tumors samples and normal adjacent tissue samples that were microscopically confirmed to be free of cancer were obtained from 20 patients undergoing surgery for colorectal cancer at the St André Hospital (Bordeaux, France) from January 2003 to September 2004. All selected patients were men without neoadjuvant treatment. Informations concerning age, BMI (kg/m^2), site, pTNM and Dukes stage are indicated in Table 1. Following surgery, samples from tumor and adjacent normal mucosa were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for subsequent RNA extraction or paraffin-embedded for subsequent immunohistochemical analysis.

2.2. RNA extraction and reverse transcription (RT).

Total RNA was extracted from colon tissue samples using the RNAgents Total RNA Isolation System kit according to the manufacturer's instructions (Promega, Charbonnières, France). Purified RNA was quantified and assessed for purity by UV spectrophotometry. Reverse transcription was as follows: 2 μg of total RNA was mixed with Rnasin (1U/ μL , Promega, Charbonnières, France) and Dnase I (0.5U/ μL , Roche Diagnostics, Meylan, France) and incubated 15 min at 37°C . Reverse primers (0.75 μM of each) were added and incubated for 10 min at 70°C . ImProm-IITM 5X reaction buffer (1X, Promega, Charbonnières, France), MgCl_2 (2.5 mM, Promega, Charbonnières, France), dNTP (0.5 mM each one, Roche Diagnostics, Meylan, France) and ImProm-IITM Reverse Transcriptase (Promega, Charbonnières, France) were added for 1 hr at 42°C . The total volume was 20 μL and each target mRNA was co-reverse transcribed with $\beta 2$ -microglobulin mRNA. Parallel reactions for each RNA sample were run in the absence of ImProm-IITM Reverse Transcriptase to assess the degree of contaminating genomic DNA. Moreover, RT-PCR reactions without any RNA sample were also assessed in order to verify the absence of other contamination.

2.3. Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR).

Real-time quantitative PCR involving LightCyclerTM technology (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), was performed according to the protocol recommended by the manufacturer and previously described [Delage et al., 2005, *in press*].

SYBR green I fluorescence dye was sufficiently sensitive to accurately detect amplified products from all target cDNA (PPAR δ , PPAR γ , RAR α , RXR α and COX-2) except for RAR β and RAR γ amplified product detected using dual-labeled and specific TaqMan fluorogenic probes.

Quantification data were analyzed using the LightCycler Relative Quantification Software (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The principle of real-time quantification is based on the quantization of the PCR product during the linear phase of the amplification process. The software provides a crossing point (Cp), defined as the PCR cycle number, function of the Log of the DNA concentration (in ng). The standard curve was a plot of the Cp versus the amount of initial cDNA used for amplification. The Cp was always the same for a given dilution of β 2-microglobulin, whatever the samples, demonstrating that reference mRNA expression was stably expressed and could be used as a normalizer for data from target mRNA. Standard curves were used to estimate the concentration of both the target and the reference gene in each sample. This software provides a calibrator-normalized relative quantification including PCR efficiency correction considering then the difference existing between amplification efficiencies of reference and target cDNA. cDNA from tissue sample from patient A was arbitrary chosen to be the calibrator. The cDNA calibrator was used in all experiments. Results are expressed as the target/reference ratio divided by the target/reference ratio of the calibrator.

Primers and fluorogenic probes were purchased from Proligo France (Paris, France). Each probe was synthesized with the fluorescent reporter dye FAM (6-carboxy-fluorescein) attached to the 5'-end and a quencher dye TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) to the 3'-end. Specificity of primers was validated through the verification of RT-PCR product specificity. RT-PCR products were subjected to analysis by electrophoresis on a 1.5% agarose gel and resulted in a single product with the desired length (β 2-microglobulin, 112bp; PPAR δ , 139bp; PPAR γ , 144bp; RAR α , 235bp; RAR β , 133bp; RAR γ , 167bp; RXR α , 142bp; COX-2, 130bp). The identity of amplified products were assessed by sequencing with a Dye Terminator Reaction Cycle Kit (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) and were analyzed on an ABI PRISM™ 377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer).

The forward and reverse primer sequences and the probes were as follows:

β 2-microglobulin: sense 5' CTTGGGCTGTGACAAAGTC 3', antisense 5' GTCTTTCAGC-AAGGACTGG 3', Taqman probe 5' (6-Fam)TGGTTCCTCGGCAGGCATACTC (Tamra) 3';

PPAR δ : sense 5' GGGAGAGGTCTGTGTAGCTGCTG 3', antisense 5' ATGGAGCAGCCA-CAGGAGGAAGCC 3';

PPAR γ : sense 5' CGGATGGCCACCTCTTT-GCTC 3', antisense 5' GGCGAGGGCGATC-TTGACAGG 3';

RAR α : sense 5' ACGTTGTTCTGAGCTGTTGTTTCGTA 3', antisense 5' CTGCCAGTACT-GCCGACTGC 3';

RAR β : sense 5' AGGCTTGCTGGGTCGTCTTT 3', antisense 5' CCTTCTCAGTGCCATC-TGCTTAAT 3', Taqman probe 5' (6-Fam)AGACCGCCAGGACCTTGAGGAACCGA-(Tamra) 3';

RAR γ : sense 5' GCAAAGACAAGGTCTGTGAG 3', antisense 5' GACCAGATCACTCTG-CTCAAAGC 3', Taqman probe 5' (6-Fam) TATCCTGATGCTGCGTATCTGCACAAGG-T (Tamra);

RXR α : sense 5' GAGCAGCTTATTCCAGCCTGCC 3', antisense 5' CGACCCTGTCACCA-ACATTTGC 3';

COX-2: sense 5' TGGTGCCTGGTCTGATGAT 3', antisense 5' GCCTGCTTGTCTGGAAC-AAC 3'

2.4. Statistical analysis.

All statistics were calculated using SPSS 9.0 software. Differences between healthy mucosa and tumor were evaluated using Wilcoxon-test. Associations between mRNA expression levels were tested for correlation by Spearman's test. A p value < 0.05 was considered as significant.

3. Results

3.1. Patient characteristics

Pertinent clinical and pathological data are listed in Table 1. All patients were men with a median age of 72 years (range 41 – 87).

Six patients (30%) had tumors of Dukes B, nine patients (45%) were classified as Dukes C or as Dukes D (25%).

Eleven patients (55%) had a BMI higher than 25 and are designated as overweight. Among them, four patients had a BMI value higher than 30 defining an obesity status.

No correlation was found between age, BMI and tumor classification.

Table 2. Nuclear receptor and COX-2 mRNA expression in colorectal tumors

Gene	n	Normal colon mucosa		Tumor tissue		p ^a
		Median	Range	Median	Range	
PPAR _γ	20	2.91	(1.05-6.64)	3.51	(0.76-14.96)	n.s.
PPAR _δ	20	1.24	(0.69-2.34)	1.53	(0.40-4.42)	0.028
RXR _α	20	0.69	(0.22-1.05)	0.94	(0.21-2.81)	0.004
RAR _α	20	1.23	(0.69-1.77)	1.44	(0.43-3.93)	0.011
RAR _β	20	1.61	(0.12-5.39)	3.00	(0.24-10.82)	0.014
RAR _γ	20	1.15	(0.49-1.78)	2.75	(0.83-7.11)	<0.001
COX-2	20	1.61	(0.66-6.75)	14.5	(0.50-560.5)	<0.001

Statistical analysis were performed using Wilcoxon-test

n.s. not significant

^a Wilcoxon test

3.2. mRNA expression level of nuclear receptors

The mRNA expression of the nuclear receptor subtypes was detectable by quantitative real-time RT-PCR in all healthy and tumor samples. The median mRNA expression values are shown in Table 2.

Compared to normal mucosa, PPAR expression levels in tumors were not significantly different for PPAR γ despite a slight trend of elevated levels in tumors (3.51 vs 2.91, n=20). PPAR δ appeared upregulated in tumors (1.53 vs 1.24, n=20). Nevertheless, no statistical difference was found for PPAR δ expression when patients were divided according to the BMI: normal range of body weight (BMI<25, n=9) and overweight groups (BMI>25, n=11)(Table 3).

Retinoid receptor mRNA expression levels were all significantly increased in tumor tissues compared with healthy mucosa (n=20)(Table 2). Expression levels were increased with the following percentages : RXR α 36.2%, RAR α 17.1%, RAR β 86.3%, RAR γ 139.1%. However, while the mRNA expression of retinoid receptors appeared significantly increased in patients with a normal BMI (<25, n=9), the trend of increase was not significant in overweight patient group (BMI>25, n=11)(Table 3 and Figure 1). RAR γ constitutes an exception since it was overexpressed whatever the body weight of patients.

Associations between mRNA expression values for receptors are listed in Table 4 and reveal variable correlations in healthy and tumor tissues. Further analysis between receptor mRNA expression in tumors and Dukes stages or tumor sites did not show any correlation.

Moreover, the analysis of the receptor expression in healthy mucosa did not reveal significant difference according to the BMI of patients (Table 5).

3.3. mRNA expression level of COX-2

COX-2 gene expression was clearly upregulated in colorectal tumors compared to normal colon tissue (14.5 vs 1.61, n=20)(Table 2). COX-2 expression did not correlate with the expression of nuclear receptors, BMI and tumor stages and was unchanged in healthy tissue whatever the body mass index (Table 5).

Table 3. Nuclear receptor and COX-2 mRNA expression in colorectal tumors of patients**3a.** Nuclear receptor and COX-2 mRNA expression in colorectal tumors of patients with BMI<25

Gene	n	Healthy colon mucosa		Tumor tissue		p ^a
		Median	Range	Median	Range	
PPAR _γ	9	2.99	(1.96-5.39)	3.58	(1.63-5.70)	n.s.
PPAR _δ	9	1.17	(0.69-2.34)	1.44	(0.65-4.42)	n.s.
RXR _α	9	0.76	(0.46-1.05)	1.09	(0.60-1.69)	0.021
RAR _α	9	1.07	(0.69-1.43)	1.43	(0.95-3.93)	0.011
RAR _β	9	1.65	(1.00-2.49)	4.61	(0.62-8.49)	0.051 ^b
RAR _γ	9	1.03	(0.76-1.40)	2.72	(0.91-4.57)	0.011
COX-2	9	1.30	(0.66-3.35)	13.59	(0.50-560.46)	0.011

3b. Nuclear receptor and COX-2 mRNA expression in colorectal tumors of patients with BMI>25

Gene	n	Healthy colon mucosa		Tumor tissue		p ^a
		Median	Range	Median	Range	
PPAR _γ	11	2.91	(1.05-6.64)	3.43	(0.76-14.96)	n.s.
PPAR _δ	11	1.24	(0.69-2.34)	1.62	(0.40-3.55)	n.s.
RXR _α	11	1.23	(0.22-0.87)	0.69	(0.21-2.81)	n.s.
RAR _α	11	1.23	(0.79-1.77)	1.45	(0.43-2.77)	n.s.
RAR _β	11	1.53	(0.12-5.39)	2.73	(0.24-10.82)	n.s.
RAR _γ	11	1.33	(0.49-1.78)	2.95	(0.83-7.11)	0.016
COX-2	11	3.63	(0.73-6.75)	15.41	(1.02-166.86)	0.010

Statistical analysis were performed using Wilcoxon-test

n.s. not significant

^a Wilcoxon test

^b Limit of significance

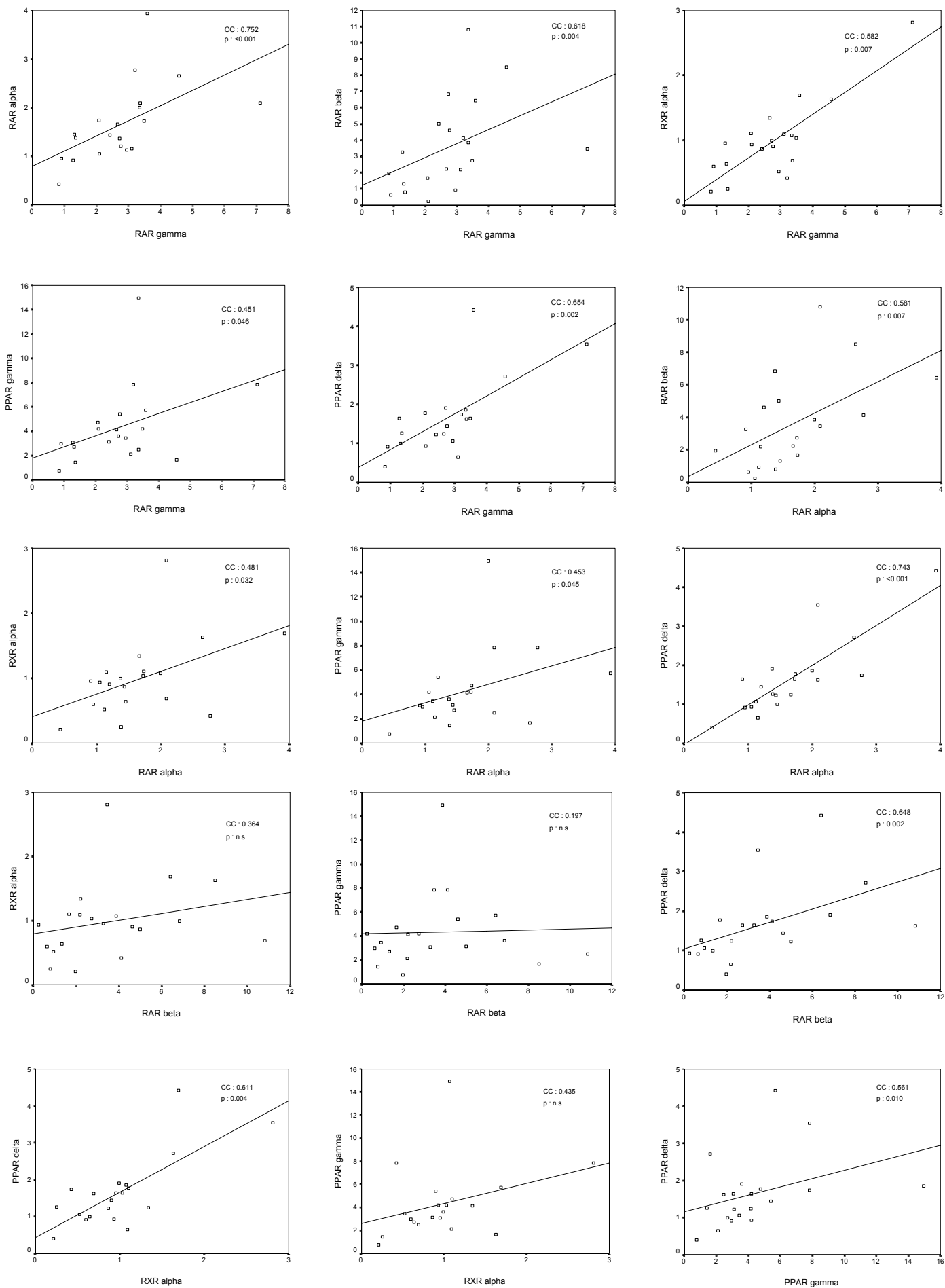


Fig.1. Associations between mRNA expression levels of nuclear receptor subtypes in tumor tissue. CC : correlation coefficient; p : p value based on Spearman's test

Table 4. Associations between nuclear receptor mRNA expression in colon tissue**4a.** Associations between nuclear receptor mRNA expression in healthy colon tissue

	PPAR γ	PPAR δ	RXR α	RAR α	RAR β	RAR γ
PPAR γ	1.000	0.062 (n.s.)	0.506 (0.023) ^a	0.023 (n.s.)	0.267 (n.s.)	-0.030 (n.s.)
PPAR δ		1.000	0.124 (n.s.)	0.315 (n.s.)	-0.021 (n.s.)	-0.036 (n.s.)
RXR α			1.000	0.132 (n.s.)	0.209 (n.s.)	-0.127 (n.s.)
RAR α				1.000	0.050 (n.s.)	-0.114 (n.s.)
RAR β					1.000	-0.150 (n.s.)
RAR γ						1.000

4b. Associations between nuclear receptor mRNA expression in colorectal tumors

	PPAR γ	PPAR δ	RXR α	RAR α	RAR β	RAR γ
PPAR γ	1.000	0.561 (0.010) ^a	0.435 (n.s.)	0.453 (0.045)	0.197 (n.s.)	0.451 (0.046)
PPAR δ		1.000	0.611 (0.004)	0.743 (<0.001)	0.648 (0.002)	0.654 (0.002)
RXR α			1.000	0.481 (0.032)	0.364 (n.s.)	0.582 (0.007)
RAR α				1.000	0.581 (0.007)	0.752 (<0.001)
RAR β					1.000	0.618 (0.004)
RAR γ						1.000

n.s. not significant

^a correlation coefficient with the p value from Spearman's test in parentheses

Table 5. Comparison between nuclear receptor and COX-2 mRNA expression in healthy colon mucosa from patients with BMI<25 or with BMI>25

Gene	n	BMI<25		BMI>25		p ^a
		Median	Range	Median	Range	
PPAR _γ	20	2,99	(1,96-5,39)	2,82	(1,05-6,64)	n.s.(0.882)
PPAR _δ	20	1,17	(0,69-2,34)	1,25	(0,72-1,60)	n.s.(0.882)
RXR _α	20	0,76	(0,46-1,05)	0,62	(0,22-0,87)	n.s.(0.095)
RAR _α	20	1,07	(0,69-1,43)	1,23	(0,79-1,77)	n.s.(0.824)
RAR _β	20	1,65	(1,00-2,49)	1,53	(0,12-5,39)	n.s.(0.370)
RAR _γ	20	1,03	(0,76-1,40)	1,33	(0,49-1,78)	n.s.(0.230)
COX-2	20	1,3	(0,66-3,35)	3,63	(0,73-6,75)	n.s.(0.080)

Statistical analysis were performed using Wilcoxon-test

n.s. not significant

^a Wilcoxon test

4. Discussion

In this report, we have assessed the mRNA expression levels of nuclear receptors in 20 patients with colorectal cancer and exhibiting distinct BMI ranging from 18.7 to 38.7. Nuclear receptors are transcription factors involved in many cellular processes from embryonic development to cell death. Dysfunction of nuclear receptor signaling could lead to reproductive, proliferative and metabolic diseases such as infertility, cancer and obesity.

Analysis of PPAR β/δ mRNA levels in normal and tumor tissues (n=20) suggests that PPAR β/δ is upregulated in colorectal carcinomas. This result is not surprising in light of previous reports demonstrating elevated nuclear β catenin levels in CRC [31,32]. In a larger majority of CRC, the inactivation of the tumor suppressor gene adenomatous polyposis coli (APC) leads to the loss of control of β catenin degradation inducing the overexpression of the downstream target genes of β catenin as PPAR β/δ [21]. Moreover, the upregulation of this isotype has been already observed in rodent colorectal tumors and in primary human colorectal adenocarcinomas [21,22]. However, the function of PPAR β/δ remains elusive with data revealing that PPAR β/δ alone was not proneoplastic and was dispensable for polyp formation [33]. Nevertheless, it has also been suggested that PPAR β/δ might contribute directly to tumorigenesis. Indeed, in a nude mouse xenograft model, PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ colon cancer cells exhibited a decreased capacity to form tumors compared to wild-type controls [34]. Interestingly, in CRC, PPAR β/δ was shown to co-localize with COX-2 within tumors [22]. COX-2 seems to be a critical promotor of colorectal carcinogenesis. Our result indicating increased COX-2 levels in tumors are in agreement with previously published data [35]. Thus, during carcinogenesis process, the activation of PPAR β/δ could be facilitated by the increased production of endogenous eicosanoids via COX-2 pathway [22]. Moreover, the cross-link between PPAR β/δ and COX-2 could be strengthened by the fact that the receptor upregulates COX-2 gene expression as observed in hepatocellular carcinoma cells [36]. In spite of recent divergent data [37,38] and the lack of correlation with COX-2 mRNA expression, our results did not exclude the possible oncogenicity of PPAR β/δ in CRC [39].

PPAR γ is almost ubiquitously expressed, with the highest levels observed in adipose tissue and colon. We observed no significant changes in PPAR γ mRNA expression between normal and tumor tissue what is supported by previous data [40]. Girnun et al. had already observed that a wild-type PPAR γ could decrease sensitivity to chemical carcinogenesis in mice by maintaining a steady-state level of β catenin except when the protein was already

deregulated as in CRC [41]. These data support the potential tumor suppressive action of PPAR γ observed *in vitro* [18,42]. Nevertheless, a very recent report has demonstrated that deregulated APC/ β catenin could indirectly induce aberrant PPAR γ overexpression [43] supporting experimental data in APC^{Min}/+ mice [44]. This implies the possibility that β catenin pathway could dramatically affect the functionality of PPAR γ in CRC since the down-regulation of the receptor in normal colon mucosa was also hypothesized as an early event that promote carcinogenesis [20,45]. Herein, the steady-state level of PPAR γ can not exclude a loss of PPAR γ transcriptional activity induced by somatic mutations [19], post-translation modifications [46] or inhibition by PPAR β/δ [47]. Moreover, at least in part, the inactivation of PPAR γ could enhance COX-2 pathway seeing that a functional PPAR γ could alter COX-2 gene expression [48].

Since RXR α serve as the obligate partner for PPAR γ , the bioavailability of the receptor could be a limiting step for PPAR γ transcriptional activity. Synthetic ligands of RXR α were shown to exhibit insulin-sensitizing activity [49,50] and to act synergically with PPAR γ ligands to enhance PPAR γ /RXR α -mediated transactivation [48]. While no change in RXR α expression level has been noted earlier in 17 patients with CRC [40], our data revealed a significant increase in tumor versus normal tissues. Such an upregulation was previously observed in human esophageal [51], breast [52] and hepatocellular carcinomas [53]. Little is known about the function of RXR α in colon tumorigenesis even if the receptor could be involved in mediating preventive effects against CRC [54]. Thus, our result can not exclude a loss of RXR α functionality due to an altered localization [55] or an inhibitory effect of unliganded RXR α on PPAR γ transactivation [56]. Moreover, the positive correlation between RXR α and PPAR γ in healthy mucosa supporting their closed relationship was lost in CRC. This observation suggests dysregulations of the interaction between these receptors.

Recent data have suggested that the tumor suppressive activity of PPAR γ required a functional RAR β isotype [57]. Thus, the role of PPAR γ could be affected by alterations in retinoid pathway that participate in enhancing tumorigenesis. RAR isotypes mediate the majority of the biological effects produced by retinoids. Their expression has been investigated in the past few years in various cancers, but very few reports examined it in CRC. Nevertheless, to our knowledge, this is the first report of detailed analysis of alterations in the mRNA expression level of nuclear receptors RAR α , β and γ in colorectal carcinomas. The β isotype has been extensively studied in cancer cells and human carcinomas, and several

studies have suggested that it might play a role in tumor suppression [58-60]. The paradigm for most tumor suppressor genes is mutation of one allele and loss of the second allele, which is not the case for PPAR γ and RAR β . However, epigenetic events and specifically abnormal hypermethylation of normally unmethylated CpG islands in the promoter region were identified as a mechanism to suppress gene expression [61]. Surprisingly and in contrast to our hypothesis, the present results demonstrated that the expression profile of RAR isotypes is different in tumor than in non-neoplastic tissues with significant upregulation in CRC. Furthermore, we could show a complex association between the expression of mRNA for RAR subtypes, RXR α and PPAR δ in cancer tissues, suggesting interactions and cross-talk among these receptors in the tumorigenesis of this disease. This also demonstrated a profound dysregulation in the retinoid pathway in this cancer. Downregulation of mRNA expression of RAR β was considered as a mechanism underlying the phenomenon of retinoid resistance observed in many cancer cells, including colorectal cells [62,63]. A variety of tumors have also a high frequency of abnormal expression of the other RAR subtypes. However, it appears clearly that disruption in retinoid pathway did not always implicated the loss of expression of retinoid receptors. Specifically, RAR α was shown to be expressed at significantly higher levels in breast, liver and esophageal tumors [51,64,65]. Whether the upregulation of RAR subtypes in CRC results from perturbed transcriptional regulation as a part of tumor progression or deregulation of mechanisms of downregulation remains to be ascertained. Moreover, following our observations, *in vitro* experiments are needed to investigate the ability of retinoids to inhibit the growth of RAR-elevated colon cancer cells and thus indicate if RAR expression is correlated with sensitivity to retinoic acid. Disruption in retinoid responses could also imply alterations in the expression of cellular retinol/retinoic acid binding protein (CRBP/CRABP) which play a critical role in sensitizing tumors to the growth-suppressive effect of retinoids [66,67] and in co-regulators modulating RARE transactivation [68].

The relation between excess body weight and colorectal cancer risk suggests that excess energy is an important risk factor of developing cancer. This notion is supported by experimental observations that energy restriction can confer a strong protection against the development of tumors in animals [69,70]. Furthermore, there is evidence that individuals who maintain their body weight and take regular physical activity are protected against CRC [71,72]. BMI was shown to correlate with the risk of CRC in many studies [73,74]. That is why we speculated that molecular alterations associated with high BMI in healthy mucosa could indicate an increased risk of developing cancer. Aberrations in the level and the

functionality of PPAR and retinoid receptors may contribute to the promotive effect of obesity on the process of carcinogenesis. Thus, since individuals with the highest BMI are known to have an increased risk of CRC, we hypothesized that altered expression of nuclear receptor could be associated with elevated body weight. No significant difference has been observed in receptor expression pattern in normal mucosa from patients with normal BMI or with higher BMI, suggesting that obesity could then alter the functionality of nuclear receptors more than their mRNA expression level. Nevertheless, it remains plausible that alterations are already present in the healthy mucosa since all the individuals developed a CCR. Moreover, the non significant upregulation of retinoid receptor expression between normal and tumor tissues in patients with the highest BMI evidenced that the overweight status might modulate retinoid receptor expression. It is possible to assume that overweight and associated metabolic diseases might alter the cellular capacity to respond to retinoid derivatives. This conclusion is supported by the finding that diabetes and hyperinsulinemia may be associated with vitamin A deficiency [75].

In conclusion, a better understanding in nuclear receptor functionality is warranted to unravel the intricate mechanisms facilitating the occurrence of colorectal cancer. Indeed, the study described here demonstrated that alterations in the pattern of nuclear receptor expression might be associated with colorectal carcinogenesis. Moreover, deepened studies are needed to verify if overweight might affect tumor responses to retinoids. There was considerable variability in the expression levels of RARs in tumors indicating that retinoids may eventually be helpful to treat colorectal cancer.

Acknowledgements

This study was supported in part by a grant from the Ligue Régionale Contre le Cancer de la Gironde et de la Charente.

References

- [1] E.R. Fearon, B. Vogelstein, A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 (1990) 759-767.
- [2] K.W. Kinzler, B. Vogelstein, Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87 (1996) 159-170.
- [3] F. Bianchini, R. Kaaks, H. Vainio, Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol.* 3 (2002) 565-574.

- [4] E E. Calle, C. Rodriguez, K. Walker-Thurmond, M.J. Thun, Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 1625-1638.
- [5] E. Giovannucci, Nutrition, insulin, insulin-like growth factors and cancer. *Horm Metab. Res.* 35 (2003) 694-704.
- [6] S. Haffner, H. Taegtmeier, Epidemic obesity and the metabolic syndrome. *Circulation* 108 (2003) 1541-1545.
- [7] A.R. Vasudevan, A. Balasubramanyam, Thiazolidinediones: a review of their mechanisms of insulin sensitization, therapeutic potential, clinical efficacy, and tolerability. *Diabetes Technol. Ther.* 6 (2004) 850-863.
- [8] L. Cheng, G. Ding, Q. Qin, Y. Huang, W. Lewis, N. He, R.M. Evans, M.D. Schneider, F.A. Brako, Y. Xiao, Y.E. Chen, Q. Yang, Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat. Med.* 10 (2004) 1245-1250.
- [9] B. Desvergne, W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* 20 (1999) 649-688.
- [10] C. Jehl-Pietri, C. Bastie, I. Gillot, S. Luquet, P.A. Grimaldi, Peroxisome-proliferator-activated receptor delta mediates the effects of long-chain fatty acids on post-confluent cell proliferation. *Biochem. J.* 350 Pt 1 (2000) 93-98.
- [11] T. Suehiro, T. Matsumata, Y. Shikada, K. Sugimachi, Hyperinsulinemia in patients with colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 52 (2005) 76-78.
- [12] I.G. Popovich, M.A. Zabezhinski, P.A. Egormin, M.L. Tyndyk, I.V. Anikin, A.A. Spasov, A.V. Semenchenko, A.I. Yashin, V.N. Anisimov, Insulin in aging and cancer: antidiabetic drug diabenol as geroprotector and anticarcinogen. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 1117-1129.
- [13] E. Osawa, A. Nakajima, K. Wada, S. Ishimine, N. Fujisawa, T. Kawamori, N. Matsushashi, T. Kadowaki, M. Ochiai, H. Sekihara, H. Nakagama, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice. *Gastroenterology* 124 (2003) 361-367.
- [14] T. Yoshizumi, T. Ohta, I. Ninomiya, I. Terada, S. Fushida, T. Fujimura, G. Nishimura, K. Shimizu, S. Yi, K. Miwa, Thiazolidinedione, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, inhibits growth and metastasis of HT-29 human colon cancer cells through differentiation-promoting effects. *Int. J. Oncol.* 25 (2004) 631-639.
- [15] N. Niho, M. Takahashi, T. Kitamura, Y. Shoji, M. Itoh, T. Noda, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in *Apc*-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Cancer Res.* 63, (2003) 6090-6095.
- [16] S.A. Kliewer, S.S. Sundseth, S.A. Jones, P.J. Brown, G.B. Wisely, C.S. Koble, P. Devchand, W. Wahli, T.M. Willson, J.M. Lenhard, J.M. Lehmann, Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 (1997) 4318-4323.
- [17] J.M. Lehmann, J.M. Lenhard, B.B. Oliver, G.M. Ringold, S.A. Kliewer, Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 3406-3410.
- [18] T. Shimada, K. Kojima, K. Yoshiura, H. Hiraishi, A. Terano, Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut* 50 (2002) 658-664.

- [19] P. Sarraf, E. Mueller, W.M. Smith, H.M. Wright, J.B. Kum, L.A. Aaltonen, A. de la Chapelle, B.M. Spiegelman, C. Eng, Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. *Mol. Cell.* 3 (1999) 799-804.
- [20] F. Bogazzi, F. Ultimieri, F. Raggi, A. Costa, M. Gasperi, E. Cecconi, F. Mosca, L. Bartalena, E. Martino, Peroxisome proliferator activated receptor gamma expression is reduced in the colonic mucosa of acromegalic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 2403-2406.
- [21] T.C. He, T.A. Chan, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 99 (1999) 335-345.
- [22] R.A. Gupta, J. Tan, W.F. Krause, M.W. Geraci, T.M. Willson, S.K. Dey, R.N. DuBois, Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (2000) 13275-13280.
- [23] F. Rastinejad, Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001) 33-38.
- [24] H. Keller, C. Dreyer, J. Medin, A. Mahfoudi, K. Ozato, 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 (1993) 2160-2164.
- [25] J. Brtko, J. Thalhamer, Renaissance of the biologically active vitamin A derivatives: established and novel directed therapies for cancer and chemoprevention. *Curr. Pharm. Des.* 9 (2003) 2067-2077.
- [26] K.F. Kane, M.J. Langman, G.R. Williams, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and retinoid X receptor expression in human colorectal neoplasms. *Gut* 36 (1995) 255-258.
- [27] L.V. Stewart, M.L. Thomas, Retinoids differentially regulate the proliferation of colon cancer cell lines. *Exp. Cell Res.* 233 (1997) 321-329.
- [28] S.Y. Sun, R. Lotan, Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 41 (2002) 41-55.
- [29] D.A. Notterman, U. Alon, A.J. Sierk, A.J. Levine, Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res.* 61 (2001) 3124-3130.
- [30] S. Muro, I. Takemasa, S. Oba, R. Matoba, N. Ueno, C. Maruyama, R. Yamashita, M. Sekimoto, H. Yamamoto, S. Nakamori, M. Monden, S. Ishii, K. Kato, Identification of expressed genes linked to malignancy of human colorectal carcinoma by parametric clustering of quantitative expression data. *Genome Biol.* 4 (2003) R21.
- [31] H. Sheng, J. Shao, C.S. Williams, M.A. Pereira, M.M. Taketo, M. Oshima, A.B. Reynolds, M.K. Washington, R.N. DuBois, R.D. Beauchamp, Nuclear translocation of beta-catenin in hereditary and carcinogen-induced intestinal adenomas. *Carcinogenesis* 19 (1998) 543-549.
- [32] S. Miyamoto, Y. Endoh, T. Hasebe, G. Ishii, K. Kodama, M. Goya, M. Ono, N. Saitoh, T. Chiba, A. Ochiai, Nuclear beta-catenin accumulation as a prognostic factor in Dukes' D human colorectal cancers. *Oncol. Rep.* 12 (2004) 245-251.
- [33] Y. Barak, D. Liao, W. He, E.S. Ong, M.C. Nelson, J.M. Olefsky, R. Boland, R.M. Evans, Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99 (2002) 303-308.
- [34] B.H. Park, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Genetic disruption of PPARdelta decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (2001) 2598-2603.

- [35] H. Sano, Y. Kawahito, R.L. Wilder, A. Hashiramoto, S. Mukai, K. Asai, S. Kimura, H. Kato, M. Kondo, T. Hla, Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 55 (1995) 3785-3789.
- [36] B. Glinghammar, J. Skogsberg, A. Hamsten, E. Ehrenborg, PPARdelta activation induces COX-2 gene expression and cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308 (2003) 361-368.
- [37] K.R. Reed, O.J. Sansom, A.J. Hayes, A.J. Gescher, D.J. Winton, J.M. Peters, A.R. Clarke, PPARdelta status and Apc-mediated tumourigenesis in the mouse intestine. *Oncogene* 23 (2004) 8992-8996.
- [38] F.S. Harman, C.J. Nicol, H.E. Marin, J.M. Ward, F.J. Gonzalez, J.M. Peters, Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis. *Nat. Med.* 10 (2004) 481-483.
- [39] R.A. Gupta, D. Wang, S. Katkuri, H. Wang, S.K. Dey, R.N. DuBois, Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-delta accelerates intestinal adenoma growth. *Nat. Med.* 10 (2004) 245-247.
- [40] J. Feilchenfeldt, M.A. Brundler, C. Soravia, M. Totsch, C.A. Meier, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and associated transcription factors in colon cancer: reduced expression of PPARgamma-coactivator 1 (PGC-1). *Cancer Lett.* 203 (2004) 25-33.
- [41] G.D. Girnun, W.M. Smith, S. Drori, P. Sarraf, E. Mueller, C. Eng, P. Nambiar, D.W. Rosenberg, R.T. Bronson, W. Edelmann, R. Kucherlapati, F.J. Gonzalez, B.M. Spiegelman, APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPARgamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99 (2002) 13771-13776.
- [42] M.W. Matthiessen, G. Pedersen, T. Albrektsen, S. Adamsen, J. Fleckner, J. Brynskov, Peroxisome proliferator-activated receptor expression and activation in normal human colonic epithelial cells and tubular adenomas. *Scand. J. Gastroenterol.* 40 (2005) 198-205.
- [43] E.A. Jansson, A. Are, G. Greicius, I.C. Kuo, D. Kelly, V. Arulampalam, S. Pettersson, The Wnt/beta-catenin signaling pathway targets PPARgamma activity in colon cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102 (2005) 1460-1465.
- [44] A.M. Lefebvre, I. Chen, P. Desreumaux, J. Najib, J.C. Fruchart, K. Geboes, M. Briggs, R. Heyman, J. Auwerx, Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat. Med.* 4 (1998) 1053-1057.
- [45] C.Y. Hao, D.H. Moore, P. Wong, J.L. Bennington, N.M. Lee, L.C. Chen, Alteration of gene expression in macroscopically normal colonic mucosa from individuals with a family history of sporadic colon cancer. *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 1400-1407.
- [46] M. Fu, C. Wang, X. Zhang, R.G. Pestell, Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 68 (2004) 1199-1208.
- [47] Y. Shi, M. Hon, R.M. Evans, The peroxisome proliferator-activated receptor delta, an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99 (2002) 2613-2618.
- [48] W.L. Yang, H. Frucht, Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 22 (2001) 1379-1383.
- [49] R. Mukherjee, P.J. Davies, D.L. Crombie, E.D. Bischoff, R.M. Cesario, L. Jow, L.G. Hamann, M.F. Boehm, C.E. Mondon, A.M. Nadzan, J.R. Paterniti Jr., R.A. Heyman, Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* 386 (1997) 407-410.

- [50] Q. Shen, G.W. Cline, G.I. Shulman, M.D. Leibowitz, P.J. Davies, Effects of rexinoids on glucose transport and insulin-mediated signaling in skeletal muscles of diabetic (db/db) mice. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 19721-19731.
- [51] A. Kumar, J. Kaur, T.K. Chattopadhyay, M. Mathur, R. Ralhan, Differential expression of retinoic acid receptors in normal and malignant esophageal tissues. *J. Exp. Ther. Oncol.* 4 (2004) 1-8.
- [52] M. Friedrich, R. Axt-Flidner, C. Villena-Heinsen, W. Tilgen, W. Schmidt, J. Reichrath, Analysis of vitamin D-receptor (VDR) and retinoid X-receptor alpha in breast cancer. *Histochem. J.* 34 (2002) 35-40.
- [53] S. Adachi, M. Okuno, R. Matsushima-Nishiwaki, Y. Takano, S. Kojima, S.L. Friedman, H. Moriwaki, Y. Okano, Phosphorylation of retinoid X receptor suppresses its ubiquitination in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 35 (2002) 332-340.
- [54] Y.Y. Fan, T.E. Spencer, N.Wang, M.P. Moyer, R.S. Chapkin, Chemopreventive n-3 fatty acids activate RXRalpha in colonocytes. *Carcinogenesis* 24 (2003) 1541-1548.
- [55] T. Tanaka, B.L. Dancheck, L.C. Trifiletti, R.E. Birnkrant, B.J. Taylor, S.H. Garfield, U. Thorgeirsson, L.M. De Luca, Altered localization of retinoid X receptor alpha coincides with loss of retinoid responsiveness in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 3972-3982.
- [56] T. Monden, M. Yamada, Y. Nihei, M. Kishi, T. Tomaru, S. Ishii, T. Hashida, N. Shibusawa, K. Hashimoto, T. Satoh, K. Kasai, M. Mori, Unliganded RXR acts as an inhibitory factor on troglitazone-induced activation. *Life Sci.* 76 (2004) 731-741.
- [57] S.Y. James, F. Lin, S.K. Kolluri, M.I. Dawson, X.K. Zhang, Regulation of retinoic acid receptor beta expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands in cancer cells. *Cancer Res.* 63 (2003) 3531-3538.
- [58] S. Cote, D. Sinnett, R.L. Momparker, Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoter region of the retinoic acid receptor beta gene in human colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs.* 9 (1998) 743-750.
- [59] A. Arapshian, Y.S. Kuppumbatti, R. Mira-y-Lopez, Methylation of conserved CpG sites neighboring the beta retinoic acid response element may mediate retinoic acid receptor beta gene silencing in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene* 19 (2000) 4066-4070.
- [60] A.K. Virmani, A. Rathi, S. Zochbauer-Muller, N. Sacchi, Y. Fukuyama, D. Bryant, A. Maitra, S. Heda, K.M. Fong, F. Thunnissen, J.D. Minna, A.F. Gazdar, Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 92 (2000) 1303-1307.
- [61] X.L. Xu, J. Yu, H.Y. Zhang, M.H. Sun, J. Gu, X. Du, D.R. Shi, P. Wang, Z.H. Yang, J.D. Zhu, Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World. J. Gastroenterol.* 10 (2004) 3441-3454.
- [62] L. Emionite, F. Galmozzi, M. Grattarola, F. Boccardo, L. Vergani, S. Toma, Histone deacetylase inhibitors enhance retinoid response in human breast cancer cell lines. *Anticancer Res.* 24 (2004) 4019-4024.
- [63] M.O. Lee, S.Y. Han, S. Jiang, J.H. Park, S.J. Kim, Differential effects of retinoic acid on growth and apoptosis in human colon cancer cell lines associated with the induction of retinoic acid receptor beta. *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 485-496.
- [64] B.M. van der Leede, J. Geertzema, T.M. Vroom, D. Decimo, Y. Lutz, P.T. van der Saag, B. van der Burg, Immunohistochemical analysis of retinoic acid receptor-alpha in human breast tumors: retinoic acid receptor-alpha expression correlates with proliferative activity. *Am. J. Pathol.* 148 (1996) 1905-1914.

- [65] K. Sano, T. Takayama, K. Murakami, I. Saiki, M. Makuuchi, Overexpression of retinoic acid receptor alpha in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 3679-3683.
- [66] J. Kwong, K.W. Lo, L. Shuk-Nga Chow, K.F. To, K.W. Choy, F.L. Chan, S.C. Mok, D.P. Huang, Epigenetic silencing of cellular retinol-binding proteins in nasopharyngeal carcinoma. *Neoplasia* 7 (2005) 67-74.
- [67] D. Manor, E.N. Shmidt, A. Budhu, A. Flesken-Nikitin, M. Zgola, R. Page, A.Y. Nikitin, N. Noy, Mammary carcinoma suppression by cellular retinoic acid binding protein-II. *Cancer Res.* 63 (2003) 4426-4433.
- [68] M.O. Lee, H.J. Kang, Role of coactivators and corepressors in the induction of the RARbeta gene in human colon cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 1298-1302.
- [69] B.S. Reddy, C.X. Wang, H. Maruyama, Effect of restricted caloric intake on azoxymethane-induced colon tumor incidence in male F344 rats. *Cancer Res.* 47 (1987) 1226-1228.
- [70] J. Raju, R.P. Bird, Energy restriction reduces the number of advanced aberrant crypt foci and attenuates the expression of colonic transforming growth factor beta and cyclooxygenase isoforms in Zucker obese (fa/fa) rats. *Cancer Res.* 63 (2003) 6595-601.
- [71] H. Vainio, R. Kaaks, F. Bianchini, Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence. *Eur. J. Cancer Prev.* 11 Suppl 2 (2002) S94-S100.
- [72] E. Giovannucci, Diet, body weight, and colorectal cancer: a summary of the epidemiologic evidence. *J. Womens Health (Larchmt).* 12 (2003) 173-182.
- [73] J. Lin, S.M. Zhang, N.R. Cook, K.M. Rexrode, I.M. Lee, J.E. Buring, Body mass index and risk of colorectal cancer in women (United States). *Cancer Causes Control.* 15 (2004) 581-589.
- [74] M. Heo, D.B. Allison, K.R. Fontaine, Overweight, obesity, and colorectal cancer screening: disparity between men and women. *BMC Public Health.* 4 (2004) 53.
- [75] T.K. Basu, C. Basualdo, Vitamin A homeostasis and diabetes mellitus. *Nutrition.* 13 (1997) 804-806.

4. Conclusion

Le processus de cancérogenèse est associé à des modifications de l'expression des récepteurs nucléaires : Comme nous l'avons rapporté dans le chapitre I, les données expérimentales sur l'expression et la fonction des récepteurs nucléaires ne sont pas univoques. Les données obtenues sur des échantillons de tumeurs humaines mettent en évidence le fait que des modifications de l'expression de gènes sont associées au processus tumoral (*Xu et al., 2004*) et s'étendent de la perte totale d'expression à la surexpression génique. A l'image de ce qui a déjà pu être observé dans d'autres tissus tumoraux (*Sano et al., 2003; Kumar et al., 2004*), la sous-expression des récepteurs aux rétinoïdes, considérée comme la cause d'une altération de la réponse des cellules tumorales aux rétinoïdes, n'est pas toujours la règle. La surexpression de tous les isotypes de RAR ainsi que de RXR α mise en évidence dans le tissu tumoral par rapport à la muqueuse saine ne nous permet pas de déterminer si cette dérégulation de l'expression est associée à un gain de fonction ou masque une perte de fonctionnalité de la voie des rétinoïdes.

En effet, il ne peut être exclu qu'une altération de la voie de la vitamine A soit la conséquence d'une disponibilité réduite en rétinoïdes ou de perturbations de l'activité transcriptionnelle des récepteurs. Dans ce cas-là, la surexpression des récepteurs n'est pas le reflet de la fonctionnalité de la voie des rétinoïdes.

De plus, s'il s'agit d'un gain de fonction, il est possible que les conséquences de l'activation de la voie des rétinoïdes sur la croissance cellulaire soient différentes voire opposées à celles observées dans un contexte physiologique. En effet, il a déjà été observé que des concentrations physiologiques de rétinoïdes pouvaient promouvoir la croissance de cellules cancéreuses (*Esquenet et al., 1996; Stewart et Thomas, 1997*). Par ailleurs, une étude *in vivo* a révélé récemment que l'activation de la voie des rétinoïdes pouvait conduire à la promotion tumorale dans un contexte où la fonctionnalité du gène suppresseur de tumeur APC était altérée (*Mollersen et al., 2004*). Des travaux antérieurs avaient déjà mis en évidence que la perte d'APC ne perturbait pas seulement la régulation de la β caténine mais pouvait induire des altérations d'autres voies de signalisation comme celles des PPARs (*Girnun et al., 2002*). Ainsi, de nombreux mécanismes non encore élucidés sous-tendent l'action centrale d'APC dans le maintien de l'homéostasie des cellules épithéliales coliques.

De plus, alors que les données bibliographiques révèlent l'existence de relations entre les récepteurs nucléaires et la cyclooxygénase-2, nous n'avons pas mis en évidence de corrélations entre ces partenaires ni dans le tissu sain, ni dans les tumeurs colorectales. Les causes de la dérégulation de COX-2 restent encore obscures malgré les données bibliographiques indiquant l'implication des récepteurs nucléaires dans la régulation

transcriptionnelle de son gène. Cependant, l'altération de la fonctionnalité d'APC (dans plus de 80% des CCR sporadiques) peut expliquer au moins en partie la surexpression critique de COX-2 dans l'hypothèse où la β caténine contrôlerait effectivement la transcription du gène COX-2.

Il serait intéressant de vérifier l'intégrité d'APC ainsi que la localisation de la β caténine à la fois dans le tissu sain et le tissu tumoral afin de définir si l'expression des récepteurs et de COX-2 est lié à la fonctionnalité de la voie de Wnt.

Cette étude chez l'homme n'a pas mis en évidence d'association entre l'indice de masse corporelle et l'expression des récepteurs dans la muqueuse colorectale saine :

un travail récent a pu mettre en évidence que la muqueuse saine d'individus avec un risque élevé de développer un CCR, ainsi que celle des souris APC^{Min}/+, présentait des altérations moléculaires pouvant favoriser l'initiation tumorale (*Hao et al., 2005*). Dans un contexte de surpoids, considéré comme un facteur de risque de CCR, l'indice de masse corporelle s'avère corrélé au risque. Nous n'avons pas constaté de différences d'expression des récepteurs nucléaires et de COX-2 dans la muqueuse saine des patients de poids normal (IMC<25) et en surpoids (IMC>25). Toutefois, l'IMC est avant tout une donnée épidémiologique, c'est-à-dire qu'il n'est en aucun cas une mesure précise de la masse grasse, ce qui sous-entend de larges variations de composition corporelle entre individus pour un même IMC ou de très faibles variations pour des individus avec un IMC proche de 25 mais classés dans deux catégories distinctes (poids normal ou surpoids). Il est aussi probable que les muqueuses colorectales saines présentent déjà des modifications dans l'expression de certains gènes puisque tous les patients ont développé un cancer colorectal (*Hao et al., 2005*).

Cependant, nous avons noté une différence d'expression des récepteurs des rétinoïdes entre tissu sain et tissu tumoral selon l'IMC des patients. La capacité des cellules cancéreuses à répondre aux rétinoïdes reste donc un enjeu majeur pour le traitement du CCR.

Ce travail a permis pour la première fois d'effectuer chez l'Homme un état des lieux de l'expression à la fois des PPARs et des récepteurs activés par les rétinoïdes dans le tissu colorectal sain et tumoral.



Conclusion Générale

Conclusion Générale

Les recherches de ces dernières décennies ont mis en lumière le rôle important joué par l'alimentation dans le risque de maladies chroniques et en particulier le risque de cancer. Les prédispositions génétiques responsables de l'apparition précoce du cancer colorectal sont peu fréquentes. Par contre, la probabilité élevée de développer un cancer sporadique est principalement la conséquence à long terme de l'exposition répétée à certains facteurs exogènes parmi lesquels l'alimentation tient une place prépondérante.

Notre travail s'inscrit dans les recherches en nutrition visant à comprendre les relations entre l'alimentation et le cancer colorectal dans un objectif général de prévention nutritionnelle de la tumorigenèse, voire de traitement. Si les études épidémiologiques renseignent sur les facteurs alimentaires capables de moduler le risque de cancer, les études sur les animaux représentent une approche importante dans la compréhension des mécanismes d'action.

Les mécanismes d'action des acides gras sont multiples mais restent encore mal détaillés ou inconnus (Figure 22). L'une des voies majeures reste celle des régulateurs transcriptionnels nommés récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes. En réalité, si les proliférateurs de peroxysomes sont effectivement des ligands de PPAR α , de nombreux travaux ont prouvé qu'il n'en était pas de même pour les isoformes δ et γ qui s'avèrent être activés par une pléïade de ligands synthétiques et naturels parmi lesquels se trouvent les acides gras et leurs métabolites (Desvergne et Wahli, 1999). PPAR γ et PPAR δ sont des acteurs majeurs de la régulation du métabolisme lipidique et participent clairement au maintien de l'homéostasie des tissus adipeux et épithélial colique. Ainsi, parce qu'ils se situent à l'interface des notions d'apports nutritionnels et de régulation de la prolifération/différenciation, nous avons fait l'hypothèse que les effets modulateurs des acides gras alimentaires sur la promotion du cancer colique pouvaient conduire à des modifications précoces de l'expression de ces récepteurs nucléaires.

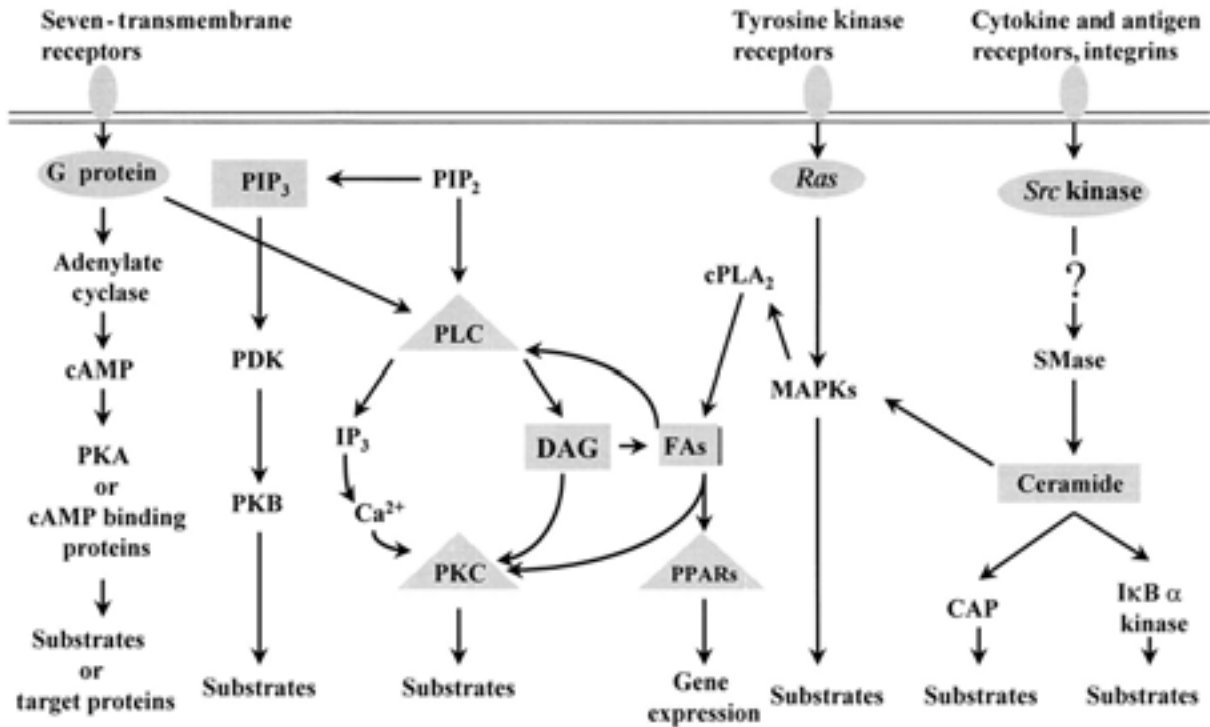


Figure 22. Voies de signalisation modulées par les acides gras alimentaires
(d'après *Hwang et Rhee, 1999*)

Abréviations : CAP : protéine kinase activée par les céramides; cPLA₂ : phospholipase A₂ cytosolique; DAG : diacylglycérol; FA : fatty acid; IκB : sous-unité inhibitrice; PDK : protéine kinase dépendante du phosphoinositide; PKA : protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique; PKB : protéine kinase proto-oncogénique; PIP₂ : phosphatidyl inositol biphosphate; PIP₃ : phosphatidyl inositol triphosphate; PLC : phospholipase C; PKC : protéine kinase C; MAPK : protéine kinase activée par des mitogènes; PPAR : récepteur activé par les proliférateurs de peroxydase; SMase : sphingomyélinase.

Les études expérimentales que nous avons conduites ont en effet permis de mettre en évidence des modifications précoces des profils d'expression des ARNm des récepteurs nucléaires dans la muqueuse colique chez des animaux chimio-initiés et nourris avec des régimes hyperlipidiques.

Dans chacune des situations expérimentales, l'expression de **PPAR_γ** s'est avérée modifiée par l'apport excessif en acides gras alimentaires. Cependant, la promotion de la cancérogenèse colique par le régime riche en huile de carthame (25% de lipides totaux - article 1) et par le régime inducteur de prise de poids (59% de lipides totaux - article 2) est associée respectivement à une surexpression et à une sous-expression du gène codant ce récepteur. Dans un premier temps, nos données sembleraient renforcer les divergences bibliographiques concernant le rôle de PPAR_γ. En effet, les données bibliographiques révèlent que ce récepteur est surexprimé dans des tumeurs coliques mais que sa sous-expression pourrait

Conclusion Générale

aussi favoriser le risque de développer un CCR. De la même façon, l'activation de PPAR γ a pu être associée à une réduction ou un arrêt de la croissance des cellules cancéreuses comme à la promotion tumorale. Puisque les 2 régimes hyperlipidiques diffèrent en terme de qualité et de quantité en acides gras, il est possible que les modulations de l'expression de ce récepteur dépendent plus du type de régime hyperlipidique - plus spécifiquement du type d'acides gras poly-insaturés présents dans le régime et de leur biodisponibilité - que de l'effet promoteur même du régime sur la cancérogenèse colique. Cependant, l'implication de PPAR γ dans la modulation précoce de la cancérogenèse ne peut assurément pas être exclue. En effet, la supplémentation en vitamine A associée à la réduction du nombre d'ACF prévient la surexpression de PPAR γ par le régime riche en huile de carthame ou la favorise dans le cadre du régime inducteur de prise de poids. L'expression du gène codant pour PPAR γ serait donc bien liée à la modulation du processus de cancérogenèse colique. De plus, dans le tissu adipeux, il a pu être observé que la sous-expression de PPAR γ tout comme son activation par les TZDs pouvaient avoir un effet commun d'amélioration de la sensibilité tissulaire à l'insuline (*Tsuchida et al., 2005*). Il est ainsi probable que des mécanismes différents soient mis en jeu en fonction du taux d'expression du gène de PPAR γ . De plus, la fonctionnalité de ce récepteur - c'est à dire sa capacité à activer la transcription de ses gènes cibles et le degré de son activité transcriptionnelle - dépend de la présence de RXR α . Or, non seulement la fixation d'un ligand sur RXR α augmente l'activité transcriptionnelle de PPAR γ , mais RXR α pourrait aussi moduler cette activité en fonction du type d'acides gras poly-insaturés présents dans l'alimentation.

Ainsi, si l'expression de PPAR γ est clairement altérée lors d'une modulation précoce de la cancérogenèse colique, l'étude de sa fonctionnalité est indispensable à une meilleure compréhension de son rôle. De plus, si l'étude humaine n'a pas permis d'observer de différences d'expression de ce récepteur entre le tissu sain et le tissu tumoral, on ne peut exclure qu'il ne soit pas impliqué plus tardivement dans la cancérogenèse d'autant que son expression et sa fonctionnalité sont intimement liées aux dérégulations de la **cyclo-oxygénase-2** et de la **β caténine** au cours de la tumorigenèse.

La promotion de la cancérogenèse par les régimes hyperlipidiques n'est pas associée à des modulations précoces de l'expression des ARNm de **PPAR δ** alors que nous avons observé une surexpression de ce récepteur dans les tumeurs colorectales humaines. Ces données sont en accord avec les résultats suggérant que PPAR δ est impliqué tardivement dans le processus tumoral. De plus, comme pour PPAR γ , les données bibliographiques confirment que l'expression et la fonctionnalité de PPAR δ dépendent de l'expression de la cyclooxygénase-2 et de la β caténine (Figure 20).

Conclusion Générale

Les mécanismes qui sous-tendent les relations qu'entretiennent COX-2/ β caténine et PPARs nécessitent d'être explorés dans le cadre de la promotion de la cancérogenèse colique par des régimes hyperlipidiques et particulièrement la capacité de PPAR γ et RXR α à réguler les taux de COX-2 (Figures 17 et 23) et de β caténine (Figure 24) dans l'objectif de mieux appréhender le rôle de ces récepteurs.

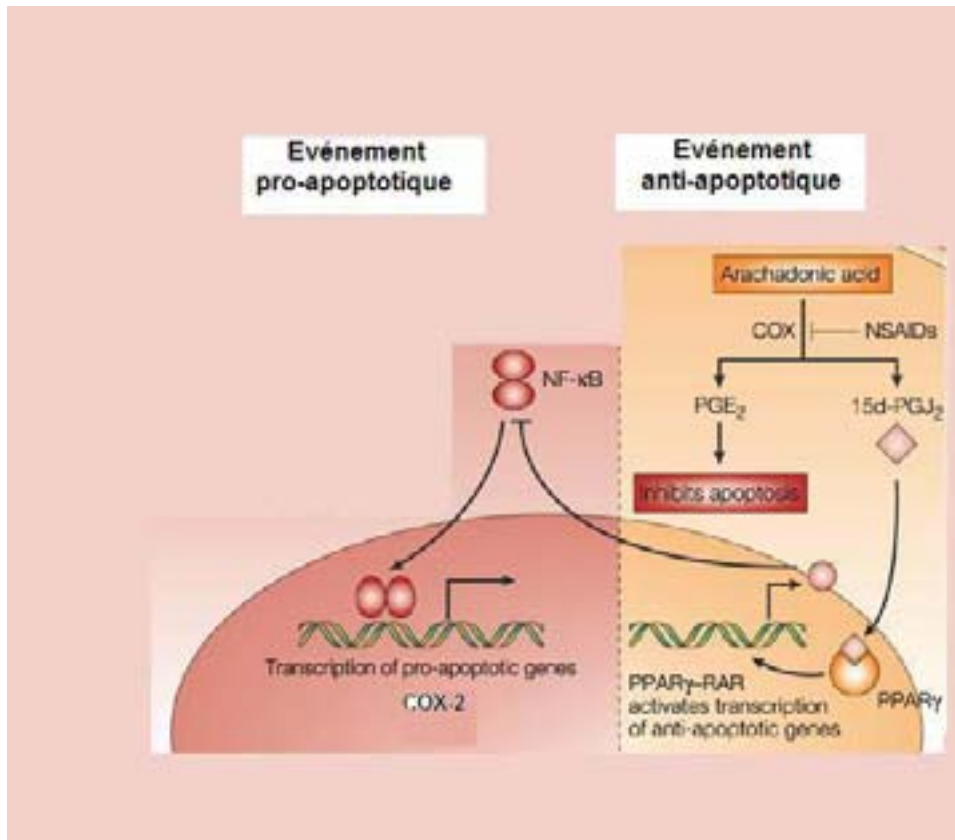


Figure 23. Exemple d'une boucle de régulation entre PPAR γ et COX-2 impliquée dans la régulation de l'apoptose (d'après *Peek et Blaser, 2002*)

Abréviations : COX-2 : cyclooxygénase-2; NF- κ B : nuclear factor κ B; NSAID : anti-inflammatoire non stéroïdien; 15d-PGJ₂ : 15 déoxy-prostaglandine J₂; PPAR : récepteur activé par les proliférateurs de peroxyssome; RXR : récepteur activé par les réxinoïdes.

Nos travaux ont aussi mis en évidence l'altération de l'expression de **RAR β** dans la muqueuse colique des rats nourris avec l'un ou l'autre des régimes hyperlipidiques confirmant que l'expression de ce gène est défavorable à la promotion induite par l'excès d'acides gras alimentaires. Cependant, nous avons détecté cette isoforme dans la muqueuse colique saine de patients atteints d'un cancer colorectal et nous n'avons pas observé de différences en fonction du poids corporel des patients (poids normal ou surpoids). De plus, cette isoforme est

Conclusion Générale

surexprimée dans le tissu cancéreux. Ainsi, nos données suggèrent que la réduction ou la suppression de l'expression du gène $RAR\beta$ n'est pas un phénomène essentiel et nécessairement concomitant au développement tumoral. L'expression de $RAR\beta$ n'apparaît pas non plus forcément altérée par le statut pondéral des patients. Néanmoins, le maintien de l'expression de ce récepteur par une supplémentation alimentaire des animaux en vitamine A a prévenu la promotion de la cancérogenèse associée à la consommation des régimes hyperlipidiques. Donc ce nutriment peut participer directement à la prévention de la cancérogenèse colique favorisée par des apports excessifs en lipides.

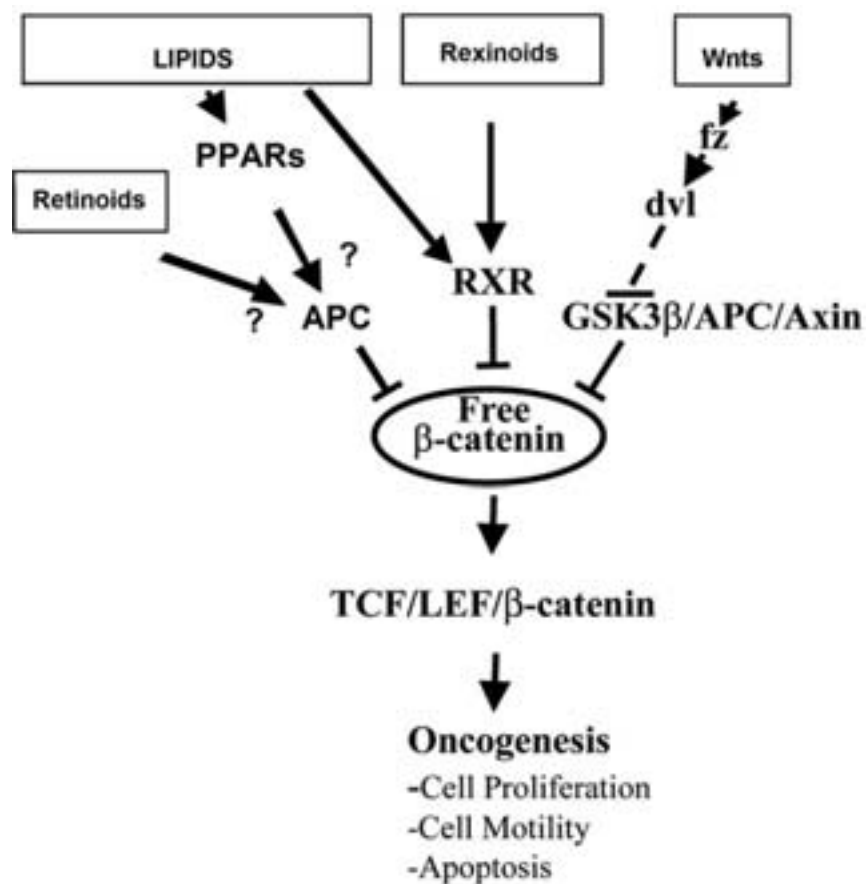


Figure 24. Facteurs potentiels modulant le taux de βcaténine libre

Abréviations : APC : adenomatous polyposis coli; dvl : dishevelled; fz : frizzled; GSK : glycogène synthase kinase; PPAR : récepteur activé par les proliférateurs de peroxyssome; RXR : récepteur activé par les rétinoides; TCF : T-cell transcription factor.

Conclusion Générale

Nos observations chez l'homme n'excluent pas une altération de la voie des rétinoïdes dont l'expression des récepteurs ne serait pas le reflet. Il serait donc envisageable de tester *in vitro* la capacité de réponse aux rétinoïdes des cellules cancéreuses coliques surexprimant RAR. De plus, la détermination du taux de rétinol présent dans le tissu sain et tumoral des patients pourrait permettre de conclure sur une potentielle diminution de la biodisponibilité en vitamine A couplée ou non au surpoids ou à la présence de tissu malin. De la même façon, la quantification de l'expression des protéines liant le rétinol (CRBP/CRABP) pourrait déterminer si elles sont impliquées dans une possible altération de la réponse aux rétinoïdes.

Par ailleurs, les effets anti-prolifératifs des rétinoïdes sont médiés au moins en partie par leur capacité à maintenir des taux équilibrés de β caténine (Figure 24) et de COX-2 (Figure 17). Ainsi, l'étude des conséquences d'une surexpression des récepteurs aux rétinoïdes dans un contexte de dérégulation de ces deux protéines est aussi à envisager.

Enfin, les relations et trans-régulations des récepteurs PPARs, RXRs et RARs entre eux restent à explorer. En effet, la biodisponibilité de RXR ainsi que sa capacité à lier des acides gras et des rétinoïdes en font un élément central de la régulation de l'expression et de la fonctionnalité des voies d'action des PPARs et des RARs. De plus, quelques données expérimentales mettent en évidence des régulations hétérologues entre les voies. En particulier, l'acide rétinoïque s'avère être un ligand potentiel de PPAR δ (Shaw *et al.*, 2003) et l'homodimère RXR/RXR est capable de moduler l'expression de PPAR γ (Ljpenberg *et al.*, 2004). A l'inverse, l'hétérodimère PPAR γ /RXR α pourrait contrôler l'expression de RAR β (James *et al.*, 2003) expliquant au moins en partie la capacité du dimère à s'opposer à la croissance des cellules cancéreuses. Ces données suggèrent que l'état de l'expression des récepteurs et l'état d'activation de leur voie de signalisation pourraient avoir des répercussions sur l'expression et l'activation d'autres récepteurs et ainsi expliquer l'étendue de leurs fonctions.



Bibliographie

Bibliographie

A

Adachi S, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Takano Y, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H, Okano Y. Phosphorylation of retinoid X receptor suppresses its ubiquitination in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. **2002**. 35(2):332-40

Adachi Y, Itoh F, Yamamoto H, Iku S, Matsuno K, Arimura Y, Imai K. Retinoic acids reduce matrilysin (matrix metalloproteinase 7) and inhibit tumor cell invasion in human colon cancer. *Tumour Biol*. **2001**. 22(4):247-53

Albanes D, Malila N, Taylor PR, Huttunen JK, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M, Hartman AM, Barrett MJ, Pietinen P, Hartman TJ, Sipponen P, Lewin K, Teerenhovi L, Hietanen P, Tangrea JA, Virtanen M, Heinonen OP. Effects of supplemental alpha-tocopherol and beta-carotene on colorectal cancer: results from a controlled trial (Finland). *Cancer Causes Control*. **2000**. 11(3):197-205

Altiock S, Xu M, Spiegelman BM. PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev*. **1997**. 11(15):1987-98

Altucci L, Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer*. **2001**. 1(3):181-93. Review

Arends JW. Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol*. **2000**. 190(4):412-6. Review

B

Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2003**. 100(4):1751-6

Bakker N, Van't Veer P, Zock PL. Adipose fatty acids and cancers of the breast, prostate and colon: an ecological study. EURAMIC Study Group. *Int J Cancer*. **1997**. 72(4):587-91

Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res*. **2002**. 43(11):1773-808. Review

Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R, Evans RM. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**. 99(1):303-8

Baro L, Hermoso JC, Nunez MC, Jimenez-Rios JA, Gil A. Abnormalities in plasma and red blood cell fatty acid profiles of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*. **1998**. 77(11):1978-83

Bibliographie

Bartolini G, Ammar K, Mantovani B, Scanabissi F, Ferreri AM, Rocchi P, Orlandi M. Retinoids and cancer: antitumor effect of ATRA and of a new derivative of retinoic acid, IIF, on colon carcinoma cell lines CaCo-2 and HT-29. *Anticancer Res.* **2004.** 24(3a):1779-83

Bartsch H, Nair J, Owen RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis.* **1999.** 20(12):2209-18. Review

Basualdo CG, Wein EE, Basu TK. Vitamin A (retinol) status of first nation adults with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr.* **1997.** 16(1):39-45

Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity.* **2004.** 21(4):491-501

Bedenne L, Faivre J, Boutron MC, Piard F, Cauvin JM, Hillon P. Adenoma--carcinoma sequence or "de novo" carcinogenesis? A study of adenomatous remnants in a population-based series of large bowel cancers. *Cancer.* **1992.** 69(4):883-8

Bellovino D, Apreda M, Gragnoli S, Massimi M, Gaetani S. Vitamin A transport: in vitro models for the study of RBP secretion. *Mol Aspects Med.* **2003.** 24(6):411-20. Review

Belury MA. Symposium: Steroid Hormone Receptor and Nutrient Interactions: Implications for Cancer Prevention. Introduction. *J Nutr.* **1999.** 129 (2S Suppl):569S-570S. Review

Benito E, Cabeza E, Moreno V, Obrador A, Bosch FX. Diet and colorectal adenomas: a case-control study in Majorca. *Int J Cancer.* **1993.** 55(2):213-9

Benkoussa M, Brand C, Delmotte MH, Formstecher P, Lefebvre P. Retinoic acid receptors inhibit AP1 activation by regulating extracellular signal-regulated kinase and CBP recruitment to an AP1-responsive promoter. *Mol Cell Biol.* **2002.** 22(13):4522-34

Berard J, Gaboury L, Landers M, De Repentigny Y, Houle B, Kothary R, Bradley WE. Hyperplasia and tumours in lung, breast and other tissues in mice carrying a RAR beta 4-like transgene. *EMBO J.* **1994.** 13(23):5570-80

Berard J, Laboune F, Mukuna M, Masse S, Kothary R, Bradley WE. Lung tumors in mice expressing an antisense RARbeta2 transgene. *FASEB J.* **1996.** 10(9):1091-7

Berraondo B, Marti A, Duncan JS, Trayhurn P, Martinez JA. Up-regulation of muscle UCP2 gene expression by a new beta3-adrenoceptor agonist, trectadrine, in obese (cafeteria) rodents, but down-regulation in lean animals. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **2000.** 24(2):156-63

Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol.* **2002.** 3(9):565-74. Review

Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjonneland A, Overvad K, Martinez C, Dorransoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet.* **2003.** 361(9368):1496-501. Erratum in: *Lancet.* **2003.** 362(9388):1000

Bird RP, Good CK. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol Lett.* **2000.** 112-113:395-402. Review

Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in murine colon treated with a colon carcinogen : preliminary findings. *Cancer Letters.* **1987.** 37:147-151

Bibliographie

Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Letters*. **1995**. 93:55-71

Blaner WS. Retinoid (Vitamin A) metabolism and the liver. *The liver: Biol And Path*, 3rd ed. **1994**. 30:529-541

Bogazzi F, Ultimieri F, Raggi F, Costa A, Gasperi M, Cecconi E, Mosca F, Bartalena L, Martino E. Peroxisome proliferator activated receptor gamma expression is reduced in the colonic mucosa of acromegalic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. **2002**. 87(5):2403-6

Boon EM, Keller JJ, Wormhoudt TA, Giardiello FM, Offerhaus GJ, van der Neut R, Pals ST. Sulindac targets nuclear beta-catenin accumulation and Wnt signalling in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis and in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer*. **2004**. 90(1):224-9

Bostick RM, Potter JD, Kushi LH, Sellers TA, Steinmetz KA, McKenzie DR, Gapstur SM, Folsom AR. Sugar, meat, and fat intake, and non-dietary risk factors for colon cancer incidence in Iowa women (United States). *Cancer Causes Control*. **1994**. 5(1):38-52

Boutron-Ruault MC, Senesse P, Meance S, Belghiti C, Faivre J. Energy intake, body mass index, physical activity, and the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nutr Cancer*. **2001**. 39(1):50-7

Brockman JA, Gupta RA, Dubois RN. Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology*. **1998**. 115(5):1049-55

Brown WA, Skinner SA, Vogliagis D, O'Brien PE. Inhibition of beta-catenin translocation in rodent colorectal tumors: a novel explanation for the protective effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs in colorectal cancer. *Dig Dis Sci*. **2001**. 46(11):2314-21

Brtko J, Thalhamer J. Renaissance of the biologically active vitamin A derivatives: established and novel directed therapies for cancer and chemoprevention. *Curr Pharm Des*. **2003**. 9(25):2067-77. Review

Bruce WR, Giacca A, Medline A. Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **2000(b)**. 9(12):1271-9. Review

Bruce WR, Wolever TM, Giacca A. Mechanisms linking diet and colorectal cancer: the possible role of insulin resistance. *Nutr Cancer*. **2000(a)**. 37(1):19-26. Review

Bull AW, Soullier BK, Wilson PS, Hayden MT, Nigro ND. Promotion of azoxymethane-induced intestinal cancer by high-fat diet in rats. *Cancer Res*. **1979**. 39(12):4956-9

Byers S, Pishvaian M, Crockett C, Peer C, Tozeren A, Sporn M, Anzano M, Lechleider R. Retinoids increase cell-cell adhesion strength, beta-catenin protein stability, and localization to the cell membrane in a breast cancer cell line: a role for serine kinase activity. *Endocrinology*. **1996**. 137(8):3265-73

C

Caan BJ, Coates AO, Slattery ML, Potter JD, Quesenberry CP Jr, Edwards SM. Body size and the risk of colon cancer in a large case-control study. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **1998**. 22(2):178-84

Caderni G, Femia AP, Giannini A, Favuzza A, Luceri C, Salvadori M, Dolara P. Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. *Cancer Res*. **2003**. 63(10):2388-92.

Caderni G., Giannini, A., Lancioni, L., Luceri, C., Biggeri, A. Dolara, P. Characterisation of aberrant crypt foci in carcinogen-treated rats : association with intestinal carcinogenesis. *Br J Cancer*. **1995**. 71: 63-769

Bibliographie

- Calder PC, Davis J, Yaqoob P, Pala H, Thies F, Newsholme EA. Dietary fish oil suppresses human colon tumour growth in athymic mice. *Clin Sci (Lond)*. **1998**. 94(3):303-11
- Callari D, Sinatra F, Paravizzini G, Libra M, Emmanuele G, Fiore B, Pezzino MF, Rasa D, Mazzarino MC, D'Alessandro N, Travali S. All trans retinoic acid sensitizes colon cancer cells to hyperthermia cytotoxic effects. *Int J Oncol*. **2003**. 23(1):181-8
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. **2003**. 348(17):1625-38
- Cassand P, Maziere S, Champ M, Meflah K, Bornet F, Narbonne JF. Effects of resistant starch- and vitamin A-supplemented diets on the promotion of precursor lesions of colon cancer in rats. *Nutr Cancer*. **1997**. 27(1):53-9
- Ceni E, Mello T, Tarocchi M, Crabb DW, Caldini A, Invernizzi P, Surrenti C, Milani S, Galli A. Antidiabetic thiazolidinediones induce ductal differentiation but not apoptosis in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol*. **2005**. 11(8):1122-30
- Chambrier C, Bastard JP, Rieusset J, Chevillotte E, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Hainque B, Riou JP, Laville M, Vidal H. Eicosapentaenoic acid induces mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Obes Res*. **2002**. 10(6):518-25.
- Chen F, Wang M, O'Connor JP, He M, Tripathi T, Harrison LE. Phosphorylation of PPARgamma via active ERK1/2 leads to its physical association with p65 and inhibition of NF-kappabeta. *J Cell Biochem*. **2003**. 90(4):732-44
- Chen LC, Hao CY, Chiu YS, Wong P, Melnick JS, Brotman M, Moretto J, Mendes F, Smith AP, Bennington JL, Moore D, Lee NM. Alteration of gene expression in normal-appearing colon mucosa of APC(min) mice and human cancer patients. *Cancer Res*. **2004**. 64(10):3694-700
- Chinery R, Coffey RJ, Graves-Deal R, Kirkland SC, Sanchez SC, Zackert WE, Oates JA, Morrow JD. Prostaglandin J2 and 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 induce proliferation of cyclooxygenase-depleted colorectal cancer cells. *Cancer Res*. **1999**. 59(11):2739-46
- Cho HJ, Kim WK, Kim EJ, Jung KC, Park S, Lee HS, Tyner AL, Park JH. Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation and ErbB3 signaling in HT-29 human colon cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **2003**. 284(6):G996-1005
- Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappie O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R, Masini E. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology*. **2001**. 121(6):1339-47
- CIRC, Centre International de Recherche sur le Cancer - IARC, International Agency for Research on Cancer. Globocan consultable sur le site du CIRC : www-dep.iarc.fr et Handbooks of cancer prevention. Vol.6. *Weight control and physical activity*. Lyon, France. **2002**
- Clausen MR, Bonnen H, Mortensen PB. Colonic fermentation of dietary fibre to short chain fatty acids in patients with adenomatous polyps and colonic cancer. *Gut*. **1991**. 32(8):923-8
- Clay CE, Namen AM, Fonteh AN, Atsumi G, High KP, Chilton FH. 15-deoxy-Delta(12,14)PGJ(2) induces diverse biological responses via PPARgamma activation in cancer cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **2000**. 62(1):23-32. Review
- Coffey RJ, Hawkey CJ, Damstrup L, Graves-Deal R, Daniel VC, Dempsey PJ, Chinery R, Kirkland SC, DuBois RN, Jetton TL, Morrow JD. Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins, and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997**. 94(2):657-62

Bibliographie

Corpet DE. Introduction aux modèles utilisés en expérimentation animale. **1996**. In : Alimentation et Cancer, évaluation des données scientifiques, chapitre 14. Eds, Lavoisier Tec et Doc, Paris, pp 243-254

Cote S, Momparler RL. Activation of the retinoic acid receptor beta gene by 5-aza-2'-deoxycytidine in human DLD-1 colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs*. **1997**. 8(1):56-61

D

Davidson LA, Nguyen DV, Hokanson RM, Callaway ES, Isett RB, Turner ND, Dougherty ER, Wang N, Lupton JR, Carroll RJ, Chapkin RS. Chemopreventive n-3 polyunsaturated fatty acids reprogram genetic signatures during colon cancer initiation and progression in the rat. *Cancer Res*. **2004**. 64(18):6797-804

de Caestecker MP, Parks WT, Frank CJ, Castagnino P, Bottaro DP, Roberts AB, Lechleider RJ. Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev*. **1998**. 12(11):1587-92

de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. **2004**. 4(10):769-80. Review

Delage B, Groubet R, Pallet V, Bairras C, Higuere P, Cassand P. Vitamin A prevents high fat diet-induced ACF development and modifies the pattern of expression of peroxisome proliferator and retinoic acid receptor m-RNA. *Nutr Cancer*. **2004**. 48(1):28-36.

DeLuca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis and neoplasia. *FASEB J*. **1991**. 5:2924-33

Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz MD, Colombel JF, Auwerx J. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med*. **2001**. 193(7):827-38

Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. **1999**. 20(5):649-88. Review

Deurenberg P, Weststrate JA, Seidell, JC. Body mass index as a measure of body fatness: age- and sex-specific prediction formulas. *Br J Nutr*. **1991**. 65(2):105-14

Dihlmann S, Gebert J, Siermann A, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M. Dominant negative effect of the APC1309 mutation: a possible explanation for genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res*. **1999**. 59(8):1857-60

DiSepio D, Sutter M, Johnson AT, Chandraratna RA, Nagpal S. Identification of the AP1-antagonism domain of retinoic acid receptors. *Mol Cell Biol Res Commun*. **1999**. 1(1):7-13

Dommels YE, Heemskerk S, van den Berg H, Alink GM, van Bladeren PJ, van Ommen B. Effects of high fat fish oil and high fat corn oil diets on initiation of AOM-induced colonic aberrant crypt foci in male F344 rats. *Food Chem Toxicol*. **2003**. 41(12):1739-47

Duarte J, Perriere G, Laudet V, Robinson-Rechavi M. NUREBASE: database of nuclear hormone receptors. *Nucleic Acids Res*. **2002**. 30, 364-68

DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*. **1998(b)**. 12(12):1063-73. Review

Bibliographie

DuBois RN, Gupta R, Brockman J, Reddy BS, Krakow SL, Lazar MA. The nuclear eicosanoid receptor, PPARgamma, is aberrantly expressed in colonic cancers. *Carcinogenesis*. **1998(a)**. 19(1):49-53

Durai R, Yang W, Gupta S, Seifalian AM, Winslet MC. The role of the insulin-like growth factor system in colorectal cancer: review of current knowledge. *Int J Colorectal Dis*. **2005**. (in press)

E

Easwaran V, Pishvaian M, Salimuddin, Byers S. Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr Biol*. **1999**. (23):1415-8

Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrusis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell*. **1996**. 86(4):543-52

Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res*. **2000**. 448(2):121-38. Review

Eschwege P, de Ledinghen V, Camilli T, Kulkarni S, Dalbagni G, Droupy S, Jardin A, Benoit G, Weksler BB. Les cyclooxygenases. *Presse Med*. **2001**. 30(10):511-4

Eskild W, Hansson V. Vitamin A functions in the reproductive organs, In: Blomhoff R (Ed.), Vitamin A in Health and Disease, Marcel Dekker, New York, **1994**. 531-539

Esquenet M, Swinnen JV, Heyns W, Verhoeven G. Control of LNCaP proliferation and differentiation: actions and interactions of androgens, 1alpha,25-dihydroxycholecalciferol, all-trans retinoic acid, 9-cis retinoic acid, and phenylacetate. *Prostate*. **1996**. 28(3):182-94

F

Facchini F, Coulston AM, Reaven GM. Relation between dietary vitamin intake and resistance to insulin-mediated glucose disposal in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr*. **1996**. 63(6):946-9

Faivre J. Epidémiologie et prévention du cancer colorectal. Paris : Springer Digest Edition, **2001**.

Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*. **1997**. 272(30):18779-89

Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett*. **1998**. 438(1-2):55-60

Fan YY, Spencer TE, Wang N, Moyer MP, Chapkin RS. Chemopreventive n-3 fatty acids activate RXRalpha in colonocytes. *Carcinogenesis*. **2003**. 24(9):1541-8

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. **1990**. 61(5):759-67. Review

Feinberg AP. Methylation meets genomics. *Nat Genet*. **2001**. 27(1):9-10.

Fernandez-Banares F, Esteve M, Navarro E, Cabre E, Boix J, Abad-Lacruz A, Klaassen J, Planas R, Humbert P, Pastor C, Gassull MA. Changes of the mucosal n-3 and n-6 fatty acid status occur early in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Gut*. **1996**. 38(2):254-9

Bibliographie

Ferraroni M, La Vecchia C, D'Avanzo B, Negri E, Franceschi S, Decarli A. Selected micronutrient intake and the risk of colorectal cancer. *Br J Cancer*. **1994**. 70(6):1150-5

Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. **2001**. 1(1):55-67. Review

Forest V, Clement M, Pierre F, Meflah K, Menanteau J. Butyrate restores motile function and actin cytoskeletal network integrity in apc mutated mouse colon epithelial cells. *Nutr Cancer*. **2003**. 45(1):84-92

Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*. **1995**. 83(5):803-12

Freedman LP. Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell*. **1999**. 97:5-8

Fujimitsu, Y, Nakanishi, H, Inada, K, Yamachika, T, Ichinose, M, Fukami, H, Tatematsu, M. Development of aberrant crypt foci involves a fission mechanism as revealed by isolation of aberrant crypts. *J J Cancer Research*. **1996**. 87:1199-1203

Furukawa F, Nishikawa A, Kitahori Y, Tanakamaru Z, Hirose M. Spontaneous development of aberrant crypt foci in F344 rats. *J Exp Clin Cancer Res*. **2002**. 21(2):197-201.

G

Gardner SH, Hawcroft G, Hull MA. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on beta-catenin protein levels and catenin-related transcription in human colorectal cancer cells. *Br J Cancer*. **2004**. 91(1):153-63.

Gerhold DL, Liu F, Jiang G, Li Z, Xu J, Lu M, Sachs JR, Bagchi A, Fridman A, Holder DJ, Doebber TW, Berger J, Elbrecht A, Moller DE, Zhang BB. Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Endocrinology*. **2002**. 143(6):2106-18

Giguere V. Les récepteurs nucléaires orphelins: régulateurs essentiels du développement, de l'organogenèse et de l'homéostasie. *Méd Sci*. **1997**. 13:459-66

Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochem Biophys Acta*. **2003**. 1653(1):1-24. Review

Gimble JM, Pighetti GM, Lerner MR, Wu X, Lightfoot SA, Brackett DJ, Darcy K, Hollingsworth AB. Expression of peroxisome proliferator activated receptor mRNA in normal and tumorigenic rodent mammary glands. *Biochem Biophys Res Commun*. **1998**. 253(3):813-7

Giovannucci E. Diet, body weight, and colorectal cancer: a summary of the epidemiologic evidence. *J Womens Health (Larchmt)*. **2003**. 12(2):173-82. Review

Giovannucci E. Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control*. **1995(b)**. 6(2):164-79. Review

Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med*. **1995(a)**. 122(5):327-34

Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC. Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res*. **1994**. 54(9):2390-7

Bibliographie

Girnun GD, Smith WM, Drori S, Sarraf P, Mueller E, Eng C, Nambiar P, Rosenberg DW, Bronson RT, Edelmann W, Kucherlapati R, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**. 99(21):13771-6

Glinghammar B, Skogsberg J, Hamsten A, Ehrenborg E. PPARdelta activation induces COX-2 gene expression and cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **2003**. 308(2):361-8

Goetze S, Eilers F, Bungenstock A, Kintscher U, Stawowy P, Blaschke F, Graf K, Law RE, Fleck E, Grafe M. PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt. *Biochem Biophys Res Commun*. **2002**. 293(5):1431-7

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. **1986**. 320, 134-39

Greenberg ER, Baron JA, Tosteson TD, Freeman DH Jr, Beck GJ, Bond JH, Colacchio TA, Collier JA, Frankl HD, Haile RW, et al. A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. Polyp Prevention Study Group. *N Engl J Med*. **1994**. 331(3):141-7

Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. **1991**. 66(3): 589-600

Gupta RA, DuBois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer*. **2001**. 1(1):11-21. Review

Gupta RA, Tan J, Krause WF, Geraci MW, Willson TM, Dey SK, DuBois RN. Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2000**. 97(24):13275-80

Gupta RA, Wang D, Katkuri S, Wang H, Dey SK, DuBois RN. Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-delta accelerates intestinal adenoma growth. *Nat Med*. **2004**. 10(3):245-7

H

Hahn WC, Counter, CM, Lundberg, AS, Beijersbergen, RL, Brooks, MW, Weinberg, RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. **1999**. 400:464-467

Hao CY, Moore DH, Wong P, Bennington JL, Lee NM, Chen LC. Alteration of gene expression in macroscopically normal colonic mucosa from individuals with a family history of sporadic colon cancer. *Clin Cancer Res*. **2005**. 11(4):1400-7

Harman FS, Nicol CJ, Marin HE, Ward JM, Gonzalez FJ, Peters JM. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis. *Nat Med*. **2004**. 10(5):481-3

Harrison EH, Hussain MM. Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *J Nutr*. **2001**. 131(5):1405-8. Review

Hawcroft G, D'Amico M, Albanese C, Markham AF, Pestell RG, Hull MA. Indomethacin induces differential expression of beta-catenin, gamma-catenin and T-cell factor target genes in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*. **2002**. 23(1):107-14

He LZ, Merghoub T, Pandolfi PP. In vivo analysis of the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia in the mouse and its therapeutic implications. *Oncogene*. **1999(b)**. 18(38):5278-92. Review

Bibliographie

He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*. **1999(a)**. 99(3):335-45

Hendrickse CW, Kelly RW, Radley S, Donovan IA, Keighley MR, Neoptolemos JP. Lipid peroxidation and prostaglandins in colorectal cancer. *Br J Surg*. **1994**. 81(8):1219-23

Hihi AK, Michalik L, Wahli W. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci*. **2002**. 59(5):790-8. Review

Hill MJ, Morson BC, Bussey HJR. Aetiology of adenoma-carcinoma sequence in large bowel. *Lancet*. **1978**. 1:245-247

Hirst MA, Hinck L, Danielsen M, Ringold GM. Discrimination of DNA response elements for thyroid hormone and estrogen is dependent on dimerization of receptor DNA binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1992**. 89, 5527-31

Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*. **1985**. 318:635-41

Hong WK, Itri LM. Retinoids and human cancer. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine, Second Edition. New York, NY: Raven Press Ltd., **1994**. 594-630

Houle B, Rochette-Egly C, Bradley WE. Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor beta in human epidermoid lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1993**. 90(3):985-9

Howe GR, Aronson KJ, Benito E, Castelletto R, Cornee J, Duffy S, Gallagher RP, Iscovich JM, Dengao J, Kaaks R, Kune GA, Kune S, Lee HP, Lee M, Miller AB, Peters RK, Potter JD, Riboli E, Slattery ML, Trichopoulos D, Tuyns A, Tzonou A, Watson LF, Whittemore AS, Shu Z, et al. The relationship between dietary fat intake and risk of colorectal cancer: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *Cancer Causes Control*. **1997**. 8(2):215-28

Howe LR, Subbaramaiah K, Chung WJ, Dannenberg AJ, Brown AM. Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res*. **1999**. 59(7):1572-7

Hronek M, Zadak Z, Solichova D, Jandik P, Melichar B. The association between specific nutritional antioxidants and manifestation of colorectal cancer. *Nutrition*. **2000**. 16(3):189-91

Hsi LC, Angerman-Stewart J, Eling TE. Introduction of full-length APC modulates cyclooxygenase-2 expression in HT-29 human colorectal carcinoma cells at the translational level. *Carcinogenesis*. **1999**. 20(11):2045-9

Huin C, Schohn H, Hatier R, Bentejac M, Antunes L, Plenat F, Bugaut M, Dauca M. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma in differentiating human colon carcinoma Caco-2 cells. *Biol Cell*. **2002**. 94(1):15-27.

Hwang D, Rhee SH. Receptor-mediated signaling pathways: potential targets of modulation by dietary fatty acids. *Am J Clin Nutr*. **1999**. 70(4):545-56. Review

I

Ijpenberg A, Tan NS, Gelman L, Kersten S, Seydoux J, Xu J, Metzger D, Canaple L, Chambon P, Wahli W, Desvergne B. In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J*. **2004**. 23(10):2083-91

Inoue H, Tanabe T, Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem*. **2000**. 275(36):28028-32

Bibliographie

Issing WJ, Wustrow TP. Expression of retinoic acid receptors in squamous cell carcinomas and their possible implication for chemoprevention. *Anticancer Res.* **1996.** 16(4C):2373-7

J

James SY, Lin F, Kolluri SK, Dawson MI, Zhang XK. Regulation of retinoic acid receptor beta expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands in cancer cells. *Cancer Res.* **2003.** 63(13):3531-8.

Jansson EA, Are A, Greicius G, Kuo IC, Kelly D, Arulampalam V, Pettersson S. The Wnt/beta-catenin signaling pathway targets PPAR{gamma} activity in colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2005.** 102(5):1460-5

Jaszewski R, Millar B, Hatfield JS, Nogothu K, Finkenauer R, Rishi AK, Naumoff JA, Kucuk O, Axelrod BN, Majumdar AP. Folic acid reduces nuclear translocation of beta-catenin in rectal mucosal crypts of patients with colorectal adenomas. *Cancer Lett.* **2004.** 206(1):27-33

Jette C, Peterson PW, Sandoval IT, Manos EJ, Hadley E, Ireland CM, Jones DA. The tumor suppressor adenomatous polyposis coli and caudal related homeodomain protein regulate expression of retinol dehydrogenase L. *J Biol Chem.* **2004.** 279(33):34397-405.

Jin LH, Shao QJ, Luo W, Ye ZY, Li Q, Lin SC. Detection of point mutations of the Axin1 gene in colorectal cancers. *Int J Cancer.* **2003.** 107(5):696-9

Ju J, Liu Y, Hong J, Huang MT, Conney AH, Yang CS. Effects of green tea and high-fat diet on arachidonic acid metabolism and aberrant crypt foci formation in an azoxymethane-induced colon carcinogenesis mouse model. *Nutr Cancer.* **2003.** 46(2):172-8

K

Kanekura T, Higashi Y, Kanzaki T. Inhibitory effects of 9-cis-retinoic acid and pyrrolidinedithiocarbamate on cyclooxygenase (COX)-2 expression and cell growth in human skin squamous carcinoma cells. *Cancer Lett.* **2000.** 161(2):177-83

Kanungo J, Potapova I, Malbon CC, Wang H. MEKK4 mediates differentiation in response to retinoic acid via activation of c-Jun N-terminal kinase in rat embryonal carcinoma P19 cells. *J Biol Chem.* **2000** 275(31):24032-9

Katzenellenbogen JA, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol Endocrinol.* **1996.** 10:119-31

Kawada M, Yamagoe S, Murakami Y, Suzuki K, Mizuno S, Uehara Y. Induction of p27^{Kip1} degradation and anchorage independence by Ras through the MAP kinase signaling pathway. *Oncogene.* **1997.** 15(6):629-37

Kazi N, Radvany R, Oldham T, Keshavarzian A, Frommel TO, Libertin C, Mobarhan S. Immunomodulatory effect of beta-carotene on T lymphocyte subsets in patients with resected colonic polyps and cancer. *Nutr Cancer.* **1997.** 28(2):140-5

Kersten S. Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. *Eur J Pharmacol.* **2002.** 440(2-3):223-34. Review.

Kim BH, Kang KS, Lee YS. Effect of retinoids on LPS-induced COX-2 expression and COX-2 associated PGE(2) release from mouse peritoneal macrophages and TNF-alpha release from rat peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol Lett.* **2004.** 150(2):191-201

Bibliographie

Kim EJ, Kang YH, Schaffer BS, Bach LA, MacDonald RG, Park JH. Inhibition of Caco-2 cell proliferation by all-trans retinoic acid: role of insulin-like growth factor binding protein-6. *J Cell Physiol.* **2002.** 190(1):92-100

Kim JH, Choi YK, Kwon HJ, Yang HK, Choi JH, Kim DY. Inactivation of retinoic acid receptor beta by promoter CpG hypermethylation in gastric cancer. *Differentiation.* **2001.** 68(1):13-21

Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons for hereditary colorectal cancer. *Cell.* **1996.** 87:159-170

Kishimoto Y, Takata N, Jinnai T, Morisawa T, Shiota G, Kawasaki H, Hasegawa J. Sulindac and a cyclooxygenase-2 inhibitor, etodolac, increase APC mRNA in the colon of rats treated with azoxymethane. *Gut.* **2000.** 47(6):812-9.

Klein ES, Wang JW, Khalifa B, Gavigan SA, Chandraratna RA. Recruitment of nuclear receptor corepressor and coactivator to the retinoic acid receptor by retinoid ligands. Influence of DNA-heterodimer interactions. *J Biol Chem.* **2000.** 275:19401-08.

Klurfeld DM, Weber MM, Kritchevsky D. Inhibition of chemically induced mammary and colon tumor promotion by caloric restriction in rats fed increased dietary fat. *Cancer Res.* **1987.** 47(11):2759-62

Koeffler HP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin Cancer Res.* **2003.** 9(1):1-9. Review

Kojima M, Morisaki T, Uchiyama A, Doi F, Mibu R, Katano M, Tanaka M. Association of enhanced cyclooxygenase-2 expression with possible local immunosuppression in human colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol.* **2001.** 8(5):458-65.

Kuhl M, Geis K, Sheldahl LC, Pukrop T, Moon RT, Wedlich D. Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ signaling. *Mech Dev.* **2001.** 106(1-2):61-76

Kumar A, Kaur J, Chattopadhyay TK, Mathur M, Ralhan R. Differential expression of retinoic acid receptors in normal and malignant esophageal tissues. *J Exp Ther Oncol.* **2004.** 4(1):1-8

Kutchera W, Jones DA, Matsunami N, Groden J, McIntyre TM, Zimmerman GA, White RL, Prescott SM. Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1996.** 93(10):4816-20

L

Latham P, Lund EK, Johnson IT. Dietary n-3 PUFA increases the apoptotic response to 1,2-dimethylhydrazine, reduces mitosis and suppresses the induction of carcinogenesis in the rat colon. *Carcinogenesis.* **1999.** 20(4):645-50

Laudet V, Vanacker JM. Les récepteurs nucléaires d'hormones en folie! *Méd Sci.* **1999.** 15, 225-29

Le Marchand L, Wilkens LR, Hankin JH, Kolonel LN, Lyu LC. A case-control study of diet and colorectal cancer in a multiethnic population in Hawaii (United States): lipids and foods of animal origin. *Cancer Causes Control.* **1997.** 8(4):637-48

Le Marchand L, Wilkens LR, Mi MP. Obesity in youth and middle age and risk of colorectal cancer in men. *Cancer Causes Control.* **1992.** 3(4):349-54

Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* **2001.** 276(20):16683-9

Bibliographie

Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, Briggs M, Heyman R, Auwerx J. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med*. **1998**. 4(9):1053-7

Legrand P, Bourre JM, Descomps B, Durand G, Renaud S. Lipides. Apports nutritionnels conseillés pour la population française. 3^{ème} édition. Afssa CNERNA CNRS Editions TEC&DOC **2000**.

Li E, Tso P. Vitamin A uptake from foods. *Curr Opin Lipidol*. **2003**. 14(3):241-7. Review

Li H, Ruan XZ, Powis SH, Fernando R, Mon WY, Wheeler DC, Moorhead JF, Varghese Z. EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: evidence for a PPAR-gamma-dependent mechanism. *Kidney Int*. **2005**. 67(3):867-74

Li M, Song S, Lippman SM, Zhang XK, Liu X, Lotan R, Xu XC. Induction of retinoic acid receptor-beta suppresses cyclooxygenase-2 expression in esophageal cancer cells. *Oncogene*. **2002**. 21(3):411-8

Li MY, Deng H, Zhao JM, Dai D, Tan XY. PPARgamma pathway activation results in apoptosis and COX-2 inhibition in HepG2 cells. *World J Gastroenterol*. **2003**. 9(6):1220-6

Lipkin M, Reddy B, Newmark H, Lamprecht SA. Dietary factors in human colorectal cancer. *Annu Rev Nutr*. **1999**. 19:545-86. Review

Lipkin M. Phase 1 and phase 2 proliferative lesions of colonic epithelial cells in diseases leading to colonic cancer. *Cancer*. **1974**. 34(3):suppl:878-88.

Lotan Y, Xu XC, Shalev M, Lotan R, Williams R, Wheeler TM, Thompson TC, Kadmon D. Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal and malignant prostates. *J Clin Oncol*. **2000**. 18(1):116-21.

Love JM, Gudas LJ. Vitamin A, differentiation and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. **1994**. 6(6):825-31

Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol*. **2003**. 129(4):199-221

Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. **2003**. 348(10):919-32. Review

M

MacLennan R, Macrae F, Bain C, Battistutta D, Chapuis P, Gratten H, Lambert J, Newland RC, Ngu M, Russell A, et al. Randomized trial of intake of fat, fiber, and beta carotene to prevent colorectal adenomas. The Australian Polyp Prevention Project. *J Natl Cancer Inst*. **1995**. 87(23):1760-6

Malila N, Virtamo J, Virtanen M, Albanes D, Tangrea JA, Huttunen JK. The effect of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on colorectal adenomas in middle-aged male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **1999**. 8(6):489-93

Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*. **1995**. 83, 841-50

Manuel des Corps Gras Tome I. Editions TEC&DOC **1992**.

Marill J, Idres N, Capron CC, Nguyen E, Chabot GG. Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Curr Drug Metab*. **2003**. 4(1):1-10. Review

Martinez ME, Giovannucci E, Spiegelman D, Hunter DJ, Willett WC, Colditz GA. Leisure-time physical activity, body size, and colon cancer in women. Nurses' Health Study Research Group. *J Natl Cancer Inst*. **1997**. 89(13):948-55

Bibliographie

- McEntee MF, Whelan J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia. *Biomed Pharmacother.* **2002.** 56(8):380-7. Review
- McKelvey W, Greenland S, Chen MJ, Longnecker MP, Frankl HD, Lee ER, Haile RW. A case-control study of colorectal adenomatous polyps and consumption of foods containing partially hydrogenated oils. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **1999.** 8(6):519-24
- McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell.* **2002.** 108:465-74
- McKeown-Eyssen G. Epidemiology of colorectal cancer revisited: are serum triglycerides and/or plasma glucose associated with risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **1994.** 3(8):687-95. Review
- McLellan EA, Medline A, Bird RP. Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci-putative preneoplastic lesions. *Cancer Research.* **1991.** 51:5270-5274.
- Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem.* **1999.** 274(12):8328-34
- Medina V, Afonso JJ, Alvarez-Arguelles H, Hernandez C, Gonzalez F. Sodium butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *J Parenter Enteral Nutr.* **1998.** 22(1):14-7
- Megy S, Bertho G, Gharbi-Benarous J, Baleux F, Benarous R, Girault JP. Solution structure of a peptide derived from the oncogenic protein beta-Catenin in its phosphorylated and nonphosphorylated states. *Peptides.* **2005.** 26(2):227-41
- Mei JM, Hord NG, Winterstein DF, Donald SP, Phang JM. Differential expression of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 and formation of activated beta-catenin-LEF-1 transcription complex in mouse colonic epithelial cells contrasting in Apc. *Carcinogenesis.* **1999.** 20(4):737-40
- Merritt G, Aliprandis ET, Prada F, Rigas B, Kashfi K. The retinoid fenretinide inhibits proliferation and downregulates cyclooxygenase-2 gene expression in human colon adenocarcinoma cell lines. *Cancer Lett.* **2001.** 164(1):15-23
- Meydani SN, Lichtenstein AH, White PJ, Goodnight SH, Elson CE, Woods M, Gorbach SL, Schaefer EJ. Food use and health effects of soybean and sunflower oils. *J Am Coll Nutr.* **1991.** 10(5):406-28. Review
- Miesfield R, Rusconi S, Godowski PJ, Maler BA, Okret S, Wilkström AC, Gustafsson J Å, Yamamoto KR. Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA. *Cell.* **1986.** 68:389-99
- Mignotte V. Les doigts de zinc (2): les récepteurs hormonaux nucléaires. *Hématologie.* **1997.** 4:351-53
- Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet.* **1992.** 1(4): 229-33
- Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, Silva D, Park BH, Liu J, Farmer SR. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J.* **2003.** 376(Pt 3):607-13
- Mollersen L, Paulsen JE, Olstorn HB, Knutsen HK, Alexander J. Dietary retinoic acid supplementation stimulates intestinal tumour formation and growth in multiple intestinal neoplasia (Min)/+ mice. *Carcinogenesis.* **2004.** 25(1):149-53

Bibliographie

Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science*. **2002**. 296(5573):1644-6

Moskaluk CA, Kern SE. Cancer gets Mad: DPC4 and other TGFbeta pathway genes in human cancer. *Biochim Biophys Acta*. **1996**. 1288(3):M31-3

Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, Fletcher C, Singer S, Spiegelman BM. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell*. **1998**. 1(3):465-70

Mueller E, Smith M, Sarraf P, Kroll T, Aiyer A, Kaufman DS, Oh W, Demetri G, Figg WD, Zhou XP, Eng C, Spiegelman BM, Kantoff PW. Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2000**. 97(20):10990-5

Murphy TK, Calle EE, Rodriguez C, Kahn HS, Thun MJ. Body mass index and colon cancer mortality in a large prospective study. *Am J Epidemiol*. **2000**. 152(9):847-54

Mutanen M, Pajari AM, Oikarinen SI. Beef induces and rye bran prevents the formation of intestinal polyps in Apc(Min) mice: relation to beta-catenin and PKC isozymes. *Carcinogenesis*. **2000**. 21(6):1167-73

N

Nagpal S, Saunders M, Kastner P, Durand B, Nakshatri H, Chambon P. Promoter context-and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell*. **1992**. 70:1007-19

Nakagawa S, Fujii T, Yokoyama G, Kazanietz MG, Yamana H, Shirouzu K. Cell growth inhibition by all-trans retinoic acid in SKBR-3 breast cancer cells: involvement of protein kinase Calpha and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *Mol Carcinog*. **2003**. 38(3):106-16

Narahara H, Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Uedo N, Sakai N, Yano H, Ishiguro S. K-ras point mutation is associated with enhancement by deoxycholic acid of colon carcinogenesis induced by azoxymethane, but not with its attenuation by all-trans-retinoic acid. *Int J Cancer*. **2000**. 88(2):157-61

Neoptolemos JP, Clayton H, Heagerty AM, Nicholson MJ, Johnson B, Mason J, Manson K, James RF, Bell PR. Dietary fat in relation to fatty acid composition of red cells and adipose tissue in colorectal cancer. *Br J Cancer*. **1988**. 58(5):575-9

Newberne PM, Rogers AE. Rat colon carcinomas associated with aflatoxin and marginal vitamin A. *J Natl Cancer Inst*. **1973**. 50(2):439-48

Nichenametla S, South E, Exon J. Interaction of conjugated linoleic acid, sphingomyelin, and butyrate on formation of colonic aberrant crypt foci and immune functions in rats. *J Toxicol Environ Health A*. **2004**. 67(6):469-81

Nicke B, Kaiser A, Wiedenmann B, Riecken EO, Rosewicz S. Retinoic acid receptor alpha mediates growth inhibition by retinoids in human colon carcinoma HT29 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **1999**. 261(3):572-7

Niles RM. Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutat Res*. **2004**. 555(1-2):81-96. Review

Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*. **1991**. 253(5020): 665-669

Bibliographie

Nixon JB, Kamitani H, Baek SJ, Eling TE. Evaluation of eicosanoids and NSAIDs as PPARgamma ligands in colorectal carcinoma cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2003**. 68(5):323-30

Nkondjock A, Shatenstein B, Maisonneuve P, Ghadirian P. Assessment of risk associated with specific fatty acids and colorectal cancer among French-Canadians in Montreal: a case-control study. *Int J Epidemiol*. **2003**. 32(2):200-9

Notterman DA, Alon U, Sierk AJ, Levine AJ. Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res*. **2001**. 61(7):3124-30

Nuclear Receptor Committee. A unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Subfamily. *Cell*. **1999**. 97:161-63

O

ObEpi 2003 : « L'obésité et le surpoids en France », étude tns-Sofres **2004**. réalisée pour l'Institut Roche de l'Obésité avec la collaboration de l'Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). www.tns-sofres.com/

O'Donnell AL, Koenig RJ. Mutational analysis identifies a new functional domain of the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol*. **1990**. 4:715-20.

Ohta T, Elnemr A, Yamamoto M, Ninomiya I, Fushida S, Nishimura G, Fujimura T, Kitagawa H, Kayahara M, Shimizu K, Yi S, Miwa K. 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*. **2002**. 21(1):37-42

O'Keefe SJ, Kidd M, Espitalier-Noel G, Owira P. Rarity of colon cancer in Africans is associated with low animal product consumption, not fiber. *Am J Gastroenterol*. **1999**. 94(5):1373-80

Olefsky JM. Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem*. **2001**. 276(40):36863-4. Review

Olsen J, Kronborg O, Lynggaard J, Ewertz M. Dietary risk factors for cancer and adenomas of the large intestine. A case-control study within a screening trial in Denmark. *Eur J Cancer*. **1994**. 30A(1):53-60

Onogi N, Okuno M, Komaki C, Moriwaki H, Kawamori T, Tanaka T, Mori H, Muto Y. Suppressing effect of perilla oil on azoxymethane-induced foci of colonic aberrant crypts in rats. *Carcinogenesis*. **1996**. 17(6):1291-6

Orner GA, Dashwood WM, Blum CA, Diaz GD, Li Q, Dashwood RH. Suppression of tumorigenesis in the Apc(min) mouse: down-regulation of beta-catenin signaling by a combination of tea plus sulindac. *Carcinogenesis*. **2003**. 24(2):263-7

Osawa E, Nakajima A, Wada K, Ishimine S, Fujisawa N, Kawamori T, Matsushashi N, Kadowaki T, Ochiai M, Sekihara H, Nakagama H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice. *Gastroenterology*. **2003**. 124(2):361-7

Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell*. **1996**. 87(5):803-9

Ouamrane L, Larrieu G, Gauthier B, Pineau T. RXR activators molecular signalling: involvement of a PPAR alpha-dependent pathway in the liver and kidney, evidence for an alternative pathway in the heart. *Br J Pharmacol*. **2003**. 138(5):845-54

P

Palmero I, Pantoja C, Serrano M. p19^{ARF} links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature*. **1998**. 395(6698):125-6

Park BH, Vogelstein B, Kinzler KW. Genetic disruption of PPARdelta decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2001(b)**. 98(5):2598-603

Park HS, Ryu JH, Ha YL, Park JH. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br J Nutr*. **2001(a)**. 86(5):549-55

Paulsen JE, Lutzow-Holm C. In vivo growth inhibition of human colon carcinoma cells (HT-29) by all-trans-retinoic acid, difluoromethylornithine, and colon mitosis inhibitor, individually and in combination. *Anticancer Res*. **2000**. 20(5B):3485-9

Peek RM Jr, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*. **2002**. 2(1):28-37. Review.

Pietinen P, Malila N, Virtanen M, Hartman TJ, Tangrea JA, Albanes D, Virtamo J. Diet and risk of colorectal cancer in a cohort of Finnish men. *Cancer Causes Control*. **1999**. 10(5):387-96

Potter JD. Nutrition and colorectal cancer. *Cancer Causes Control*. **1996**. 7(1):127-46. Review

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. **1992**. 359(6392):235-7

Prescott SM, White RL. Self-promotion? Intimate connections between APC and prostaglandin H synthase-2. *Cell*. **1996**. 87(5):783-6. Review

Pretlow TP, Oriordan MA, Somich GA, Amini SB, Pretlow TG. Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate. *Carcinogenesis*. **1992**. 13:1509-1512

Pretlow TP, Pretlow TG. Putative preneoplastic changes identified by enzyme histochemical and immunohistochemical techniques. *J Histochemistry and Cytochemistry*. **1988**. 46:577-583

R

Raju J, Bird RP. Energy restriction reduces the number of advanced aberrant crypt foci and attenuates the expression of colonic transforming growth factor beta and cyclooxygenase isoforms in Zucker obese (fa/fa) rats. *Cancer Res*. **2003**. 63(20):6595-601

Rao CV, Hirose Y, Indranie C, Reddy BS. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. *Cancer Res*. **2001**. 61(5):1927-33

Rastinejad F. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr Opin Struct Biol*. **2001**. 11:33-38

Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. **1988**. 37(12):1595-607. Review

Reddy BS, Wang CX, Maruyama H. Effect of restricted caloric intake on azoxymethane-induced colon tumor incidence in male F344 rats. *Cancer Res*. **1987**. 47(5):1226-8

Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: animal model studies. *Lipids*. **1992**. 27(10):807-13. Review

Bibliographie

Reed KR, Sansom OJ, Hayes AJ, Gescher AJ, Winton DJ, Peters JM, Clarke AR. PPARdelta status and Apc-mediated tumorigenesis in the mouse intestine. *Oncogene*. **2004**. 23(55):8992-6

Ribot J, Felipe F, Bonet ML, Palou A. Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPAR gamma 2 expression. *Obes Res*. **2001**. 9(8):500-9

Rochette-Egly C, Oulad-Abdelghani M, Staub A, Pfister V, Scheuer I, Chambon P, Gaub MP. Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A. *Mol Endocrinol*. **1995**. 9(7):860-71

Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*. **2000**. 289(5481):950-3

Roynette CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C. n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin Nutr*. **2004**. 23(2):139-51. Review

S

Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, Alvarez JG, Ming UT, Baird SM, Thomazy VA, Evans RM. Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat Med*. **1998**. 4(9):1058-61

Salerno JW, Smith DE. The use of sesame oil and other vegetable oils in the inhibition of human colon cancer growth in vitro. *Anticancer Res*. **1991**. 11(1):209-15

Sano K, Takayama T, Murakami K, Saiki I, Makuuchi M. Overexpression of retinoic acid receptor alpha in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. **2003**. 9(10 Pt 1):3679-83

Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, Spiegelman BM. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med*. **1998**. 4(9):1046-52

Sarraf P, Mueller E, Smith WM, Wright HM, Kum JB, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Spiegelman BM, Eng C. Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. *Mol Cell*. **1999**. 3(6):799-804

Scalon VC, Sanders T. Essentials of anatomy and physiology, 2nd Edition, **1995**. Ed. Davis FA.

Schmelz EM, Roberts PC, Kustin EM, Lemonnier LA, Sullards MC, Dillehay DL, Merrill AH Jr. Modulation of intracellular beta-catenin localization and intestinal tumorigenesis in vivo and in vitro by sphingolipids. *Cancer Res*. **2001**. 61(18):6723-9

Shah S, Hecht A, Pestell R, Byers SW. Trans-repression of beta-catenin activity by nuclear receptors. *J Biol Chem*. **2003**. 278(48):48137-45

Shah S, Pishvaian MJ, Easwaran V, Brown PH, Byers SW. The role of cadherin, beta-catenin, and AP-1 in retinoid-regulated carcinoma cell differentiation and proliferation. *J Biol Chem*. **2002**. 277(28):25313-22

Sharma C, Pradeep A, Wong L, Rana A, Rana B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation can regulate beta-catenin levels via a proteasome-mediated and adenomatous polyposis coli-independent pathway. *J Biol Chem*. **2004**. 279(34):35583-94

Shaw N, Elholm M, Noy N. Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem*. **2003**. 278(43):41589-92.

Shishodia S, Aggarwal BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)-kappaB by suppressing activation of IkappaBalpha kinase

Bibliographie

in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9. *Cancer Res.* **2004.** 64(14):5004-12

Singh J, Hamid R, Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of dietary fat during the postinitiation stage of colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **1997.** 57(16):3465-70

Slattery ML, Potter JD, Duncan DM, Berry TD. Dietary fats and colon cancer: assessment of risk associated with specific fatty acids. *Int J Cancer.* **1997.** 73(5):670-7

Smalley WE, DuBois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol.* **1997.** 39:1-20. Review

Smith ML, Hawcroft G, Hull MA. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. *Eur J Cancer.* **2000.** 36(5):664-74

Solomon CG, Manson JE. Obesity and mortality: a review of the epidemiologic data. *Am J Clin Nutr.* **1997.** 66:1044S-1050S. Review

Soprano DR, Qin P, Soprano KJ. Retinoic acid receptors and cancers. *Ann Rev Nutr.* **2004.** 24:201-21

Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature.* **1998.** 393(6687):790-3

Stanley L. Molecular aspects of chemical carcinogenesis : the roles of oncogenes and tumor suppressor genes. *Toxicology.* **1995.** 96:173-194

Stewart LV, Thomas ML. Retinoids differentially regulate the proliferation of colon cancer cell lines. *Exp Cell Res.* **1997.** 233(2):321-9

Stoneham M, Goldacre M, Seagroatt V, Gill L. Olive oil, diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *J Epidemiol Community Health.* **2000.** 54(10):756-60

Stopera SA, Bird RP. Effects of all-trans retinoic acid as a potential chemopreventive agent on the formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci: differential expression of c-myc and c-fos mRNA and protein. *Int J Cancer.* **1993.** 53(5):798-803

Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, Gould KA, Dove WF. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science.* **1992.** 256(5057): 668-70

Subbaramaiah K, Cole PA, Dannenberg AJ. Retinoids and carnosol suppress cyclooxygenase-2 transcription by CREB-binding protein/p300-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res.* **2002.** 62(9):2522-30

Sun SY, Lotan R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol.* **2002.** 41(1):41-55. Review

Sun SY. Retinoic acid receptor beta and colon cancer. *Cancer Biol Ther.* **2004.** 3(1):87-8

Suzui M, Ushijima T, Dashwood RH, Yoshimi N, Sugimura T, Mori H, Nagao M. Frequent mutations of the rat beta-catenin gene in colon cancers induced by methylazoxymethanol acetate plus 1-hydroxyanthraquinone. *Molecular Carcinogenesis.* **1999.** 24:232-237

T

Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, Kato J, Kogawa K, Miyake H, Niitsu Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *New England Journal of Medicine*. **1998**. 339:1277-1284

Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Miyanishi K, Nobuoka A, Nakajima T, Satoh T, Takimoto R, Kato J, Sakamaki S, Niitsu Y. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*. **2001**. 121(3):599-611

Takeshita M, Ueda H, Shirabe K, Higuchi Y, Yoshida S. Lack of promotion of colon carcinogenesis by high-oleic safflower oil. *Cancer*. **1997**. 79(8):1487-93

Tanaka T, Dancheck BL, Trifiletti LC, Birnkrant RE, Taylor BJ, Garfield SH, Thorgeirsson U, De Luca LM. Altered localization of retinoid X receptor alpha coincides with loss of retinoid responsiveness in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Mol Cell Biol*. **2004**. 24(9):3972-82

Terry P, Bergkvist L, Holmberg L, Wolk A. No association between fat and fatty acids intake and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **2001**. 10(8):913-4

Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW Jr. Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res*. **1993**. 53(6):1322-7

Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CD, Brun RP, Mueller E, Altiock S, Oppenheim H, Evans RM, Spiegelman BM. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997**. 94(1):237-41

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1999**. 96(15):8681-6.

Tsuchida A, Yamauchi T, Kadowaki T. Nuclear receptors as targets for drug development: molecular mechanisms for regulation of obesity and insulin resistance by peroxisome proliferator-activated receptor gamma, CREB-binding protein, and adiponectin. *J Pharmacol Sci*. **2005**. 97(2):164-70

Tsuji M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997**. 94(7):3336-40

V

Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*. **2002**. 111(2):241-50

Vermeulen SJ, Bruyneel EA, van Roy FM, Mareel MM, Bracke ME. Activation of the E-cadherin/catenin complex in human MCF-7 breast cancer cells by all-trans-retinoic acid. *Br J Cancer*. **1995**. 72(6):1447-53

Viroonudomphol D, Pongpaew P, Tungtrongchitr R, Changbumrung S, Tungtrongchitr A, Phonrat B, Vudhivai N, Schelp FP. The relationships between anthropometric measurements, serum vitamin A and E concentrations and lipid profiles in overweight and obese subjects. *Asia Pac J Clin Nutr*. **2003**. 12(1):73-9

Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics*. **1993**. 4:138-141

W

- Wald G. The molecular basis of visual excitation. *Nature* **1968**. 219(156):800-7
- Wan G, Kato N, Watanabe H. High fat diet elevates the activity of inducible nitric oxide synthase and 1,2-dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci in colon of rats. *Oncol Rep*. **2000**. 7(2):391-5
- Wan YJ. Retinoic acid and its receptors. *Am J Surg*. **1993**. 166(1):50-3. Review
- Wang D, Mann JR, Dubois RN. WNT and cyclooxygenase-2 cross-talk accelerates adenoma growth. *Cell Cycle*. **2004(a)**. 3(12):1512-5
- Wang D, Wang H, Shi Q, Katkuri S, Walhi W, Desvergne B, Das SK, Dey SK, DuBois RN. Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Cancer Cell*. **2004(b)**. 6(3):285-95
- WCRF, World cancer research fund **2002**. www.WCRF.org/
- Wei H. Activation of oncogenes and/or inactivation of anti-oncogenes by reactive oxygen species. *Med Hypotheses*. **1992**. 39(3):267-70. Review
- Weinberg RA. How cancer arises. *Scientific American*. **1996**. 275:62-70
- Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med*. **1990**. 323(24):1664-72
- Williams CS, Smalley W, DuBois RN. Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention. *J Clin Invest*. **1997**. 100(6):1325-9. Review
- Wolbach SB, Howe PR. Tissue changes following deprivation of fat-soluble vitamin A. *J Exp Med*. **1925**. 42:753-777
- Wong NA, Pignatelli M. Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol*. **2002**. 160(2):389-401. Review
- Wu B, Iwakiri R, Ootani A, Tsunada S, Fujise T, Sakata Y, Sakata H, Toda S, Fujimoto K. Dietary corn oil promotes colon cancer by inhibiting mitochondria-dependent apoptosis in azoxymethane-treated rats. *Exp Biol Med*. **2004**. 229(10):1017-25
- Wu Q, Chen ZM, Su WJ. Anticancer effect of retinoic acid via AP-1 activity repression is mediated by retinoic acid receptor alpha and beta in gastric cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. **2002**. 34(9):1102-14
- Wu S, Donigan A, Platsoucas CD, Jung W, Soprano DR, Soprano KJ. All-trans-retinoic acid blocks cell cycle progression of human ovarian adenocarcinoma cells at late G1. *Exp Cell Res*. **1997**. 232(2):277-86

X

- Xiao JH, Ghosn C, Hinchman C, Forbes C, Wang J, Snider N, Cordrey A, Zhao Y, Chandraratna RA. Adenomatous polyposis coli (APC)-independent regulation of beta-catenin degradation via a retinoid X receptor-mediated pathway. *J Biol Chem*. **2003**. 278(32):29954-62
- Xu XC, Sneige N, Liu X, Nandagiri R, Lee JJ, Lukmanji F, Hortobagyi G, Lippman SM, Dhingra K, Lotan R. Progressive decrease in nuclear retinoic acid receptor beta messenger RNA level during breast carcinogenesis. *Cancer Res*. **1997(b)**. 57(22):4992-6

Bibliographie

Xu XC, Sozzi G, Lee JS, Lee JJ, Pastorino U, Pilotti S, Kurie JM, Hong WK, Lotan R. Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development. *J Natl Cancer Inst.* **1997(a)**. 89(9):624-9

Xu XL, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Gu J, Du X, Shi DR, Wang P, Yang ZH, Zhu JD. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* **2004**. 10(23):3441-54

Y

Yamada Y, Yoshimi N, Hirose Y, Kawabata K, Matsunaga K, Shimizu M, Hara A, Mori H. Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **2000**. 60(13):3323-7.

Yang WL, Frucht H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis.* **2001**. 22(9):1379-83

Yeh E, Cunningham M, Arnold H, Chasse D, Monteith T, Ivaldi G, Hahn WC, Stukenberg PT, Shenolikar S, Uchida T, Counter CM, Nevins JR, Means AR, Sears R. A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol.* **2004**. 6(4):308-18.

Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, Gronemeyer H, Chambon P. Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J.* **1992**. 11:3681-94

Yoshizumi T, Ohta T, Ninomiya I, Terada I, Fushida S, Fujimura T, Nishimura G, Shimizu K, Yi S, Miwa K. Thiazolidinedione, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, inhibits growth and metastasis of HT-29 human colon cancer cells through differentiation-promoting effects. *Int J Oncol.* **2004**. 25(3):631-9

Youssef EM, Estecio MR, Issa JP. Methylation and regulation of expression of different retinoic acid receptor beta isoforms in human colon cancer. *Cancer Biol Ther.* **2004**. 3(1):82-6

Z

Zhang H, Satyamoorthy K, Herlyn M, Rosdahl I. All-trans retinoic acid (atRA) differentially induces apoptosis in matched primary and metastatic melanoma cells - a speculation on damage effect of atRA via mitochondrial dysfunction and cell cycle redistribution. *Carcinogenesis.* **2003**. 24(2):185-91

Zhao LP, Kushi LH, Klein RD, Prentice RL. Quantitative review of studies of dietary fat and rat colon carcinoma. *Nutr Cancer.* **1991**. 15(3-4):169-77. Review

Zheng Y, Kramer PM, Olson G, Lubet RA, Steele VE, Kelloff GJ, Pereira MA. Prevention by retinoids of azoxymethane-induced tumors and aberrant crypt foci and their modulation of cell proliferation in the colon of rats. *Carcinogenesis.* **1997**. 18(11):2119-25

Zou CP, Youssef EM, Zou CC, Carey TE, Lotan R. Differential effects of chromosome 3p deletion on the expression of the putative tumor suppressor RAR beta and on retinoid resistance in human squamous carcinoma cells. *Oncogene.* **2001**. 20(47):6820-7



**MODULATION DE L'EXPRESSION DE RECEPTEURS NUCLEAIRES PAR LA VITAMINE A ET LES
ACIDES GRAS DANS LE PROCESSUS DE CANCEROGENESE COLORECTALE :
APPROCHES EXPERIMENTALE ET HUMAINE**

L'alimentation est l'un des facteurs exogènes majeurs impliqués dans le risque de cancer chez l'Homme, et en particulier dans le risque de développer un cancer colorectal. Selon leur qualité et leur quantité, les aliments peuvent être protecteurs ou activateurs de la cancérogenèse colique. Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans les recherches en Nutrition dont l'objectif est d'établir de nouvelles données scientifiques nécessaires à une meilleure compréhension des relations alimentation - cancer.

Divers arguments expérimentaux révèlent le rôle majeur des récepteurs nucléaires dans de nombreux processus biologiques. Spécifiquement, les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyssomes et les récepteurs activés par les métabolites actifs de la vitamine A sont des régulateurs transcriptionnels impliqués à la fois dans le métabolisme lipidique et dans les processus de contrôle de l'homéostasie cellulaire. Ces données en font des cibles potentielles à la fois dans le traitement des altérations métaboliques associées à l'obésité et dans la chimioprévention et le traitement du cancer colorectal.

Nous avons mis en évidence des modifications précoces de l'expression des ARNm de PPAR γ et de RAR β dans la muqueuse colique d'animaux chimio-initiés pour la cancérogenèse colique et nourris avec des régimes hyperlipidiques. Nos résultats montrent que l'expression de PPAR γ , modulée par un apport excessif en acides alimentaires, serait dépendante du type d'acides gras présents dans le régime. De plus, la promotion de la cancérogenèse colique par les acides gras est associée à une sous-expression de RAR β dans la muqueuse épithéliale. La supplémentation alimentaire en vitamine A prévient la promotion du cancer en permettant le maintien à la fois d'une expression adéquate du récepteur des rétinoïdes et de PPAR γ et permet un maintien de taux équilibrés des biomarqueurs, β caténine et COX-2.

Nos travaux expérimentaux ont été complétés par une étude chez l'Homme. Si aucune modification de l'expression des récepteurs nucléaires n'a pu être observée dans la muqueuse saine des patients en fonction de leur statut pondéral, le profil d'expression des différents isotypes des récepteurs dans les tumeurs a permis de mettre en évidence une expression différentielle des récepteurs des rétinoïdes en fonction de l'indice de masse corporelle.

Nos résultats supportent l'hypothèse de dérégulations précoces de l'expression des récepteurs favorisant l'augmentation du risque de développer un cancer colorectal et plaident en faveur de l'utilisation de la vitamine A dans la prévention nutritionnelle et le traitement du cancer colorectal.

- Mots Clés -

Récepteurs nucléaires - PPAR - RAR - Régimes hyperlipidiques - Vitamine A - Cancérogenèse colorectale -
 β caténine - COX-2

**MODULATION OF NUCLEAR RECEPTOR EXPRESSION BY VITAMIN A AND FATTY ACIDS IN THE
PROCESS OF COLORECTAL CANCER : EXPERIMENTAL AND HUMAN STUDIES**

Analysis of the relationship between lifestyle and disease occurrence has enjoyed increasing interest in recent decades. Some dietary compounds, among them fats and vitamin A, are major modulators of colorectal cancer risk. They could act as protective or promotive agents towards colorectal carcinogenesis.

Colorectal carcinogenesis is a multistep process described as a progressive disorder in signal transduction. A number of studies on the colon tumor-promoting effects of dietary fats and excess in fat intake have focused on the nuclear receptor called PPAR. Vitamin A, recognized as a promising agent for chemoprevention and chemotherapy for a variety of cancers acts mainly through RAR and RXR nuclear receptors. PPAR, RAR and RXR are key transcription factors regulating gene expression in response of nutrient-activated signals.

Our data showed that an appetizing hyperlipidic diet consumption induced early down-regulation of PPAR γ and RAR β in colonic mucosa of chemically-initiated rats. The hypo-expression of PPAR γ and RAR β was associated with the promotion of carcinogenesis by the diet. RAR β underexpression could be a crucial parameter in disorders induced by the hyperlipidic diet. The alterations on nuclear receptor expression - PPAR γ and RAR β - and biomarker levels - β catenin and COX-2 - associated with the hyperlipidic diet are antagonized by vitamin A.

A human study performed on healthy and tumor colorectal tissues from 20 patients allowed us to show differential expression of retinoid receptors with the body mass index of patients. Deepened data are warranted on adenomatous polyps and on colorectal mucosa from patients with a low cancer risk.

Our results provide new arguments assuming that early nuclear receptor deregulations could contribute to colorectal carcinogenesis.

- Key words -

Nuclear receptors - PPAR - RAR - Hyperlipidic diets - Vitamin A - colorectal carcinogenesis -
 β catenin - COX-2