

N° d'ordre : 2325

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

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

par **Rachel GROUBET**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : SCIENCES DES ALIMENTS et NUTRITION

**ETUDE DE L'ACTION DE LA VITAMINE A SUR LE RISQUE DE CANCER
COLIQUE LIE A UNE SURCHARGE LIPIDIQUE**

Soutenue le : 25 juin 2002

Après avis de :

Joëlle MASLIAH, Professeur, INSERM U 538, CHU Saint-Antoine, Paris

Khaled MEFLAH, Professeur, INSERM U 419, CHU, Nantes

Rapporteurs

Devant la commission d'examen formée de :

IJsbrand KRAMER, Professeur, Université Bordeaux 1

Président

Joëlle MASLIAH, Professeur, Université Paris

Khaled MEFLAH, Professeur, Université Nantes

Rapporteurs

Pierrette CASSAND, Professeur, Université Bordeaux 1

Véronique PALLET, MCU, Université Bordeaux 1

Philippe GORRY, MCU, Université Bordeaux 2

Examineur

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

Publications :

Redonnet A, **Groubet R**, Noel-Suberville C, Bonilla S, Martinez A, Higuieret 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):1161-7 (2001)

Bonilla S, Redonnet A, Noel-Suberville C, **Groubet R**, Pallet V, Higuieret P. Effect of a pharmacological activation of PPAR on the expression of RAR and TR in rat liver. *J Physiol Biochem* 57(1):1-8 (2001)

Groubet R, Pallet V, Redonnet A, Higuieret P, Cassand P. High fat diets affect early alterations of the vitamin A signalling in rat colonic mucosa. Soumise à publication dans *European Journal of Nutrition*

Groubet R, Pallet V, Higuieret P, Cassand P. Regulation of PPARgamma and COX gene expression, retinoid and Wnt signaling pathways by PUFAs and Vitamin A in F344 rats treated with DMH. Soumise à publication dans *Nutrition and Cancer*.

Communications:

Groubet R., Pallet V., Higuieret P., Cassand P. Etude de la fonctionnalité de la vitamine A dans une situation de surcharge lipidique dans le côlon de rat. 2^{ième} réunion du Réseau Nutrition Alimentation Cancer Recherche (NACRe). Paris, 4 et 5 octobre 2001. (Communication Orale).

Groubet R., Pallet V., Higuieret P., Cassand P. Experimental study of high intake of ω -polyunsaturated fatty acids (PUFAs) diet effects on appearance of aberrant crypt foci induced by 1,2-dimethylhydrazine 'DMH). 17th International Congress of Nutrition August 27-31 2001, Vienna. (Poster)

Groubet R., Ménanteau J.*, Méflah K.*, Pallet V., Higuieret P., Cassand P. Effet de l'acide linoléique (AGPI de la série n-6) sur les cellules coliques protégées ou non par la vitamine A. *Forum de cancérologie*. Paris, 6, 7 et 8 juin 2001. (Poster). * Unité INSERM 419, Institut de Biologie, Nantes.

Groubet R., Ménanteau J.*, Méflah K.*, Pallet V., Higuieret P., Cassand P. Effet de l'acide linoléique (AGPI de la série n-6) sur les cellules coliques protégées ou non par la vitamine A. XIX^{ème} CECED, *Club d'Etude des Cellules Epithéliales et Digestives*. Nîmes, 25 et 26 janvier 2001. (Communication orale). * Unité INSERM 419, Institut de Biologie, Nantes.

Groubet R., Pallet V., Higuieret P., Cassand P. Etude expérimentale des effets d'un apport alimentaire riche en acides gras polyinsaturés, sur l'apparition de tumeurs coliques chimio-induites. *Présentation du Réseau NACRe : Nutrition Alimentation Cancer Recherche*. Nantes, 29 septembre 2000. (Communication Orale).

Cassand P., Mazière S., Tavan E., **Groubet R.** and Meflah K. Effect of vitamin A on apoptosis of colonic tumors cells. 7th ICMAA, *International Conference on Mechanism of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis*, USA, 23-27th september 2000. (Poster)

Redonnet A., Noël-Suberville C., Bonilla S., **Groubet R.**, Higuieret P. Effects of a high fat diet on the expression of retinoic acid (RAR), retinoid X (RXR) and peroxisome proliferator activated (PPAR) nuclear receptors. 11th *European Fat-soluble Vitamins Group Meeting*, Toulouse, 9-11th march 2000. (Poster).

Groubet R., Pallet V., Higuieret P., Cassand P. Etude expérimentale des effets d'un apport alimentaire riche en acides gras polyinsaturés, sur l'apparition de tumeurs coliques chimio-induites. XVIII^{ème} CECED, *Club d'Etude des Cellules Epithéliales et Digestives*. Paris, 13 et 14 janvier 2000. (Communication orale).

Redonnet A., Noël-Suberville C., Bonilla S., **Groubet R.**, Higuieret P. Effets d'un régime hyperlipidique sur l'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RAR) de la triiodothyronine (TR) et des proliférateurs de peroxisomes (PPAR) dans le foie de rats. Corps gras, Nutrition et Santé, *Journées CHEVREUL 1999, AFECA, Pessac, 25 et 26 novembre 1999*. (Poster)

Redonnet A., Noël-Suberville C., Bonilla S., **Groubet R.**, Higuieret P. Effects of a high fat diet on the expression of retinoic acid (RAR), retinoid X (RXR) and peroxysome proliferator activated (PPAR) nuclear receptors in rat liver. *Body weight regulation and obesity: metabolic and clinical aspects*, Conjoint congress SEN/NS, Pamplona, 8th-11th September, 1999.

Bonilla S., Redonnet A., **Groubet R.**, Higuieret P., Noël-Suberville C. Effects of a pharmacological induction of PPAR by benzafibrate on the expression of retinoic acid (RAR) and triiodothyronine (TR) nuclear receptors in rat liver. *Body weight regulation and obesity: metabolic and clinical aspects*, Conjoint congress SEN/NS, Pamplona, 8th-11th September, 1999. (Poster).

Serment éthique des chercheurs

- **JE JURE** d'être fidèle à l'éthique du respect des personnes et des vies humaines et de contribuer au développement de la connaissance et à la plus large diffusion du savoir.
- Je respecterai toutes les espèces dans leur biodiversité : ce respect inspirera mes actes et mes projets, notamment au cours des mes expérimentations sur les animaux ou les tissus humains.
- Je m'efforcerai de soulager les souffrances de tous les êtres vivants. Admis (e) à avoir accès à l'intimité tissulaire ou génétique des personnes, je tairai leur identité et m'astreindrai au secret médical.
- Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.
- Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission.
- Je m'informerai et réfléchirai au sens de mes expérimentations et à leurs conséquences.
- Je veillerai à ce que mes travaux et recherches ne soient pas utilisés à des fins de destruction ou de manipulation.
- Je respecterai les savoirs des ethnies et des sociétés traditionnelles.
- Je n'aurai garde d'oublier mes responsabilités à l'égard des générations présentes et futures.
- Je n'accepterai pas que les considérations de nationalité, de culture, de politique ou d'avantages matériels me détournent de mes devoirs.
- J'interviendrai pour défendre, s'il m'en est donné l'occasion, l'ensemble de ces règles.
- Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.
- Que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

LE SERMENT ETHIQUE pour les chercheurs en sciences de la vie est adapté et inspiré du Serment d'Hippocrate des médecins. Il a été rédigé par trois personnalités du monde scientifique et philosophique : Jean-Marie Pelt, Gilles-Eric Séralini et Edgar Morin. Il a été présenté par le CRIIGEN et l'Institut Européen d'Ecologie, puis amendé et adopté à l'unanimité par les étudiants et les chercheurs lors du colloque « les 4ièmes Etats Généraux de l'Ethique de Metz », le 16 novembre 2000. Il a été soumis à l'approbation du ministre de l'Education, Jack Lang, qui lui a réservé un accueil chaleureux. Pour la première fois, il a été prononcé par un étudiant, Emmanuel Lemazurier, le 22 décembre 2000, soutenant sa thèse dans le laboratoire du Pr Gilles-Eric Séralini qui l'a prêté « par conviction ».

Souhaitons qu'il soit adopté officiellement dans toutes les universités concernées.

MERCI

Ce travail a été financé par le Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie, par la Ligue départementale Contre le Cancer de la Charente et de la Gironde et par l'Association pour la Recherche contre le Cancer.

M. le Professeur Paul Higueret, pour m'avoir accueillie au sein de l'Unité Nutrition et Signalisation Cellulaire.

Mme. le Professeur Pierrette Cassand, pour la confiance que vous m'avez accordée, pour m'avoir permis de découvrir la communauté scientifique grâce aux nombreuses communications réalisées au cours de ce travail, vous avez su également me faire partager vos connaissances et votre enthousiasme pour la recherche : merci, Pierrette.

Mme. Véronique Pallet, maître de conférences, pour tous les conseils scientifiques et techniques, le temps consacré et le soutien apporté, ainsi que le savoir que tu as su transmettre avec patience : merci Véronique.

Mme. le Professeur Joëlle Masliah, vous m'avez fait l'honneur d'être Rapporteur de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt que vous y avez porté ainsi que ma profonde reconnaissance.

M. le Professeur Khaled Méflah, votre venue en tant que Rapporteur de cette thèse m'a fait extrêmement plaisir, soyez assuré de ma profonde reconnaissance. Grâce à vous et aux membres de votre Unité, j'ai été initiée à la biologie cellulaire, ce qui a permis de réaliser une partie de ce travail. Veuillez recevoir ma sincère gratitude pour la confiance que vous m'avez accordée...

M. le Professeur IJsbrand KRAMER, vous m'avez fait l'honneur de présider cette thèse. Merci de tout cœur pour avoir si gentiment consacré une partie de votre précieux temps pour examiner ce travail.

M. Philippe Gorry, maître de conférence, le regard et l'analyse que tu as porté à ce travail ont permis de faire évoluer l'étudiante que j'étais. Reçois dans ces quelques lignes ma profonde reconnaissance.

M. Jean Ménanteau, j'ai eu la joie de partager votre bureau lors de mon séjour à Nantes où vous m'avez aidée, conseillée et soutenue. Tout aussi bavard que moi (!!!), merci pour les discussions à bâtons rompus, votre humour, votre sagesse.....

Un immense MERCI à la **Strasbourg connexion** :

Antoine Giovanne, premier maillon de la chaîne sans qui, ce travail ne serait peut-être pas ce qu'il est.

Olivier Lefebvre, deuxième maillon de la chaîne ; ce travail n'aurait jamais eu le même parfum sans toi...

Philippe Gorry, troisième maillon de la chaîne ; déjà cité parmi les membres du jury, merci pour m'avoir fait découvrir la technologie TaqMan, pour m'avoir permis de refaire du kendo.

David Maréchal, quatrième maillon de la chaîne ; gentillesse, dévouement et sourires : très bon cocktail : ne change pas.

Jean-Noël Freund, cinquième et dernier maillon de cette belle chaîne. J'espère de tout cœur que l'aboutissement de ce travail mènera à un post-doc chez toi. Que ce soit le cas ou pas, merci pour la confiance que tu m'as accordée et ta qualité d'écoute.

Mesdames Isabelle Hostein et Armelle Mémard, vos conseils avisés et votre patience m'ont permis d'avancer à grands pas dans mon travail. Merci de tout cœur...

Madame Anne-Marie Lefebvre, pionnière du PPAR dans le côlon en France, ta thèse a été un vrai livre de chevet tout au long de ces années. Merci pour tes conseils et tes encouragements, ils ont été précieux.

Un immense MERCI à **tous mes amis**, rencontrés tout au long de mes études réalisées en Franche-Comté, Bretagne, Pays de Loire et Aquitaine. Votre Amitié a mis du baume au cœur, du cœur à l'ouvrage et voici enfin l'ouvrage fini.

Un chaleureux merci à **Monsieur Laurent Caune**, pour le soin quotidien apporté à mes « bébés » (les rats), toujours disponible et souriant.

Je tiens également à exprimer tous mes remerciements à toutes les personnes, que j'aurais involontairement oubliées et qui ont contribué de près ou de loin, à ce travail.

Mes derniers mots seront plus privés : j'exprime ma plus profonde gratitude à **ma mère** pour m'avoir toujours tenu la main...

SOMMAIRE

Chapitre I : Introduction

A) Données générales.....	p. 13
1) Incidence du cancer colorectal	p. 13
2) Les mécanismes de la cancérogenèse.....	p. 15
3) La cancérogenèse colique.....	p. 18
B) Alimentation et cancer.....	p. 22
1) Données générales sur les facteurs impliqués dans l'apparition des cancers...	p. 22
2) Alimentation et cancer du côlon.....	p. 23
2.1) Statut lipidique et cancer du côlon.....	p. 24
2.1.1) Aspect quantitatif.....	p. 25
2.1.1.1) Etudes épidémiologiques.....	p. 25
2.1.1.2) Etudes expérimentales.....	p. 25
2.1.2) Aspect qualitatif.....	p. 26
2.1.2.1) Etudes épidémiologiques.....	p. 26
2.1.2.2) Etudes expérimentales.....	p. 26
2.2) Vitamine A et cancer du côlon.....	p. 27
2.2.1) Etudes épidémiologiques.....	p. 27
2.2.2) Etudes expérimentales.....	p. 28
3) Aspects cellulaires et moléculaires de la relation alimentation-cancer.....	p. 28
3.1) Principaux niveaux d'intervention.....	p. 28
3.2) Nutriment et expression des gènes	p. 31
3.2.1) Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyssomes: les PPAR.....	p. 32
3.2.1.1) Généralités.....	p. 32
3.2.1.2) Rôles de PPAR γ et PPAR δ dans le développement du cancer du côlon.....	p. 34
3.2.2) Les récepteurs de l'acide rétinoïque <i>tout-trans</i> : les RAR.....	p. 36
3.2.2.1) Généralités.....	p. 36
3.2.2.2) Rôle des RAR dans le développement du cancer du côlon.....	p. 37
3.2.3) Formation des hétérodimères avec RXR.....	p. 39
3.2.4) Gènes cibles dans le côlon.....	p. 40
3.2.4.1) Les cyclooxygénases.....	p. 40
a) PPAR et COX-2.....	p. 41
b) Rétinoïdes et COX-2.....	p. 42
3.2.4.2) La β -caténine.....	p. 42
a) PPAR et β -caténine.....	p. 43
b) Rétinoïdes et β -caténine.....	p. 44
C) Présentation du sujet de recherche.....	p. 44

Chapitre II : Matériel et méthodes

A) Modèles expérimentaux	p. 47
1) Les animaux.....	p. 47
2) Les régimes.....	p. 47
2.1) Le régime cafétéria.....	p. 47
2.2) Le régime hyperlipidique.....	p. 48

3) Protocoles expérimentaux.....	p. 50
3.1) Un mois de régime.....	p. 50
3.2) Protocoles de cancérogenèse colique chimio-induite (DMH).....	p. 50
3.2.1) Principe.....	p. 50
3.2.2) Trois mois de régime.....	p. 50
3.2.3) Cinq mois de régime hyperlipidique.....	p. 51
B) Etude des lésions préneoplasiques par la technique de Bird (1987).....	p. 52
C) Quantification des ARNm par la méthode traditionnelle de transcription inverse et d'amplification enzymatique en chaîne (RT-PCR) et de RT-PCR en temps réel, semi-quantitatives.....	p. 53
1) Principe de la RT-PCR.....	p. 53
2) Amorces oligonucléotidiques.....	p. 54
3) Mise en œuvre de la méthode.....	p. 56
3.1) Extraction des ARN totaux.....	p. 56
3.1.1) Dans la muqueuse colique	p. 56
3.1.1.1) Prélèvement de la muqueuse colique.....	p. 56
3.1.1.2) Extraction des ARN _{totaux}	p. 57
3.1.2) Dans les lignées cellulaires	p. 58
3.2) Contrôle de la qualité et de l'intégrité des ARN.....	p. 58
3.2.1) Dosage par spectrophotométrie	p. 58
3.2.2) Electrophorèse sur gel d'agarose en conditions dénaturantes.....	p. 58
3.3) Quantification des ARNm.....	p. 60
3.3.1) Préparation de l'ADNc.....	p. 60
3.3.1.1) Pour la PCR semi-quantitative traditionnelle.....	p. 60
3.3.1.2) Pour la PCR semi-quantitative en temps réel.....	p. 60
3.3.2) Quantification par RT-PCR traditionnelle.....	p. 61
3.3.2.1) Amplification enzymatique en chaîne (PCR).....	p. 61
3.3.2.2) Analyse des produits d'amplification.....	p. 62
3.3.2.3) Expression des résultats.....	p. 62
3.3.3) Quantification par RT-PCR en temps réel.....	p. 65
3.3.3.1) Principe.....	p. 65
3.3.3.2) Amplification enzymatique en chaîne (PCR).....	p. 67
3.3.3.3) Expression des résultats.....	p. 68
D) Quantification de l'expression des protéines cibles par immunorévélation (Western blot).....	p. 71
1) Principe.....	p. 71
2) Extraction des protéines de la muqueuse colique de rat.....	p. 71
3) Préparation de l'échantillon protéique.....	p. 71
4) Séparation électrophorétique.....	p. 72
5) Transfert des protéines.....	p. 72
6) Immunorévélation.....	p. 72
E) Etude in vitro.....	p. 74
1) Lignées et entretien des cellules.....	p. 74
2) Le test de Hoescht.....	p. 75
3) Traitements des cellules.....	p. 75
3.1) Traitement par l'acide rétinoïque <i>tout-trans</i>	p. 75
3.2) Traitement par l'acide linoléique.....	p. 75
4) Test d'exclusion au bleu Trypan.....	p. 76

5) Test de prolifération cellulaire par incorporation de ³ H)thymidine.....	p. 76
F) Calculs statistiques.....	p. 76

Chapitre III : Résultats et discussion

Partie I : Effet des différents régimes riches en lipides sur le statut nutritionnel

des animaux.....	p. 81
-------------------------	--------------

A) Régime cafétéria.....	p. 81
---------------------------------	--------------

1) Consommation alimentaire.....	p. 81
----------------------------------	-------

2) Croissance pondérale.....	p. 81
------------------------------	-------

B) Régime hyperlipidique : 25% huile de carthame.....	p. 81
--	--------------

1) Consommation alimentaire.....	p. 81
----------------------------------	-------

2) Croissance pondérale.....	p. 82
------------------------------	-------

3) Statut vitaminique A.....	p. 83
------------------------------	-------

3.1) Animaux non initiés à la DMH.....	p. 83
--	-------

3.2) Animaux initiés à la DMH.....	p. 84
------------------------------------	-------

C) Discussion partielle.....	p. 84
-------------------------------------	--------------

Partie II : Effet de régimes riches en lipides sur l'expression des récepteurs

nucléaires dans la muqueuse colique.....	p. 87
---	--------------

A) Le régime cafétéria.....	p. 87
------------------------------------	--------------

B) Le régime hyperlipidique.....	p. 88
---	--------------

C) Discussion partielle.....	p. 88
-------------------------------------	--------------

D) Résumé.....	p. 92
-----------------------	--------------

Partie III : Effet d'un régime hyperlipidique (25% d'AGPI n-6) sur le

développement des lésions néoplasiques chimio-induites.....	p. 93
--	--------------

A) Etude préliminaire des conditions d'initiation de la cancérogenèse

colique.....	p. 93
---------------------	--------------

1) Rappel du protocole.....	p. 93
-----------------------------	-------

2) Résultats.....	p. 93
-------------------	-------

3) Discussion.....	p. 94
--------------------	-------

B) Effet d'un régime hyperlipidique et d'une supplémentation en vitamine A sur

le développement de lésions néoplasiques chimio-induites.....	p. 95
--	--------------

1) Rappel du protocole.....	p. 95
-----------------------------	-------

2) Résultats.....	p. 95
-------------------	-------

3) Discussion.....	p. 96
--------------------	-------

C) Discussion partielle.....	p. 97
-------------------------------------	--------------

D) Résumé.....	p. 99
-----------------------	--------------

Partie IV : Effet d'un régime hyperlipidique et d'une supplémentation en vitamine A sur l'expression de gènes dans le côlon de rats.....	p. 100
A) Expression des récepteurs nucléaires.....	p. 101
1) Expression des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes : PPARγ	p. 101
1.1) Expression des ARNm de PPAR γ	p. 101
1.1.1) <u>Animaux non initiés à la DMH</u>	p. 101
1.1.2) <u>Animaux initiés à la DMH</u>	p. 101
1.2) Expression de la protéine PPAR γ	p. 102
2) Expression des récepteurs de l'acide rétinoïque <i>tout-trans</i> : RARβ	p. 104
2.1) Animaux non initiés à la DMH.....	p. 104
2.2) Animaux initiés à la DMH.....	p. 104
3) Expression des récepteurs de l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque : RXRα	p. 105
3.1) Animaux non initiés à la DMH	p. 105
3.2) Animaux initiés à la DMH	p. 105
4) Discussion partielle.....	p. 106
4.1) Régimes hyperlipidiques et expression du récepteur nucléaire PPARγ	p. 106
4.2) Régimes hyperlipidiques et expression du récepteur nucléaire RARβ	p. 108
4.3) Régimes hyperlipidiques et expression du récepteur nucléaire RXRα	p. 109
B) Expression de marqueurs précoces de cancérogenèse colique.....	p. 111
1) Expression de la cyclooxygénase 1 : COX-1	p. 111
1.1) Expression des ARNm de COX-1.....	p. 111
1.2) Expression de la protéine COX-1.....	p. 111
1.2.1) <u>Animaux non initiés à la DMH</u>	p. 113
1.2.2) <u>Animaux initiés à la DMH</u>	p. 113
2) Expression des ARNm de la cyclooxygénase 2 : COX-2	p. 114
2.1) Animaux non initiés à la DMH	p. 114
2.2) Animaux initiés à la DMH	p. 114
3) Discussion partielle.....	p. 115
3.1) Régimes hyperlipidiques et expression de la protéine cyclooxygénase-1	p. 115
3.2) Régimes hyperlipidiques et expression de la protéine cyclooxygénase-2	p. 115
4) Expression protéique de la β -caténine.....	p. 116
4.1) Animaux non initiés à la DMH	p. 118
4.2) Animaux initiés à la DMH	p. 118
4.3) Discussion partielle.....	p. 119
B) Discussion de la quatrième partie.....	p. 121
C) Résumé.....	p. 123

Partie V : Etude <i>in vitro</i> : Effets de l'acide linoléique et/ou de l'acide rétinoïque sur les cellules IEC-6 et PROb.....	p. 124
Résultats préliminaires	
A) Effet sur la prolifération cellulaire.....	p. 124
1) Effet de la concentration en acide rétinoïque <i>tout-trans</i> sur la prolifération des cellules IEC-6 et PROb	p. 124
2) Effet de la concentration en acide linoléique sur la prolifération des cellules IEC-6 et PROb	p. 125
3) Effet de l'acide linoléique et/ou de l'acide rétinoïque <i>tout-trans</i> sur la prolifération des cellules IEC-6 et PROb	p. 127
B) Expression des récepteurs nucléaires des cellules PROb.....	p. 129
1) Expression des ARNm du récepteur nucléaire RARβ	p. 129
2) Expression des ARNm du récepteur nucléaire PPARγ	p. 129
3) Expression des ARNm du récepteur nucléaire RXRα	p. 130
C) Discussion.....	p. 131
1) Effet des acides gras sur la prolifération cellulaire.....	p. 131
2) Effet de l'acide rétinoïque sur la prolifération cellulaire.....	p. 132
3) Expression des récepteurs nucléaires.....	p. 132
3.1) Expression du récepteur nucléaire RARβ	p. 132
3.2) Expression du récepteur nucléaire PPARγ	p. 132
3.3) Expression du récepteur nucléaire RXRα	p. 133
D) Résumé.....	p. 134
Chapitre IV : Discussion générale et Conclusions.....	p. 137
Références bibliographiques.....	p. 145
Annexes.....	p. 159

Liste des figures

Chapitre I : Introduction

- Figure 1: Répartition du taux d'incidence des cancers colorectaux dans le monde en 1998, données exprimées en taux standardisés par âge sur la population standard mondiale/100 000..... p. 14
- Figure 2: Anatomie du système digestif de l'Homme et structure de la muqueuse colique..... p. 19
- Figure 3: Illustration de la prolifération et différenciation des cellules épithéliales coliques (selon Reilly *et al.*, 1994)..... p. 20
- Figure 4: Les différentes étapes de la cancérogenèse colique (selon Bruce *et al.*, 1993)..... p. 21
- Figure 5: Alimentation et cancérogenèse colorectale : différents niveaux d'interactions possibles et quelques exemples d'**activation** et de **protection** par des composés alimentaires..... p. 30
- Figure 6: PPAR γ est un récepteur nucléaire capable de se lier à des ligands naturels ou synthétiques (Dubuquoy *et al.*, 1999)..... p. 34
- Figure 7 : Cadre théorique de l'hypothèse de travail..... p. 45

Chapitre II : Matériel et Méthodes

- Figure 1: Schéma du protocole expérimental..... p. 50
- Figure 2: Schéma du protocole expérimental de cancérogenèse chimio-induite pendant 3 mois de régime p. 51
- Figure 3: Schéma du protocole expérimental de cancérogenèse chimio-induite pendant 5 mois de régime p. 52
- Figure 4: Photographie de FCA colique (G : $\times 40$)..... p. 53
- Figure 5: Electrophorèse sur gel d'agarose en conditions dénaturantes : migration des ARN_{total} de la muqueuse colique (1) ; (2) ; (3) : ARN_{total} non dégradés, (4) ; (5) ARN_{total} dégradés..... p. 59
- Figure 6: Exemple d'une représentation semi-logarithmique d'incorporation du dCTP $\alpha^{32}\text{P}$ au cours de l'amplification des fragments d'ADNc et régression linéaire de la phase exponentielle dans la muqueuse colique de rat ayant consommé le régime témoin (5% d'huile de

carthame). L'efficacité de la PCR est de 78 %. (1-pente de la phase linéaire/100).....	p. 64
Figure 7: Principe de la sonde TaqMan	p. 66
Figure 8: A : Courbes d'amplification de la GAPDH , gamme de dilutions au cinquième d'ADNc obtenus à partir d'ARN _{total} de muqueuse colique. B : Droite standard de la GAPDH . Cette droite est la représentation graphique des Cp en fonction de la concentration initiale d'ARNm. La pente est de - 3,3 et le coefficient de régression de 1.....	p. 70

Chapitre III : Résultats et Discussion

Figure 1: Apports énergétiques des différents composants consommés et composition en acides gras des régimes hyperlipidique et cafétéria ..	p. 85
Figure 2: Effet des régimes sur l'expression de la protéine PPAR γ , dans le tissu colique de rats	p. 103
Figure 3: Autoradiographie des protéines PPAR γ et β -actine	p. 103
Figure 4: Effet des régimes sur l'expression de la protéine COX-1, dans le tissu colique de rats	p. 112
Figure 5: Autoradiographie des protéines COX-1 et β -actine	p. 112
Figure 6: Effet des régimes sur l'expression de la protéine β -caténine, dans le tissu colique de rats	p. 117
Figure 7: Autoradiographie des protéines β -caténine et β -actine.....	p. 118
Figure 8: Effet de la concentration en acide rétinoïque <i>tout-trans</i> sur la prolifération des cellules IEC-6 (A) et PROb (B) cultivées pendant 4 jours.....	p. 125
Figure 9: Effet de la concentration en acide linoléique sur la prolifération des cellules IEC-6 (A) et PROb (B) cultivées pendant 4 jours.....	p. 126
Figure 10: Effet de l'acide linoléique et/ou de l'acide rétinoïque <i>tout-trans</i> sur la croissance des cellules IEC-6 cultivées pendant 3 et 4 jours	p. 127
Figure 11: Effet de la concentration en acide rétinoïque <i>tout-trans</i> sur la prolifération de la lignée PROb cultivées pendant 4 jours	p. 128

Chapitre IV : Discussion générale et conclusions

Figure 1: Rôle paradoxal du PPAR γ dans les cancers. PUFA : acides gras poly-insaturés ; PG : prostaglandines (Dubuquoy <i>et al.</i> , 1999).....	p.139
---	-------

Figure 2: Profil des déséquilibres observés chez les animaux recevant le régime hyperlipidique seul **(A)** ou induits à la DMH **(B)** p. 144

Liste des tableaux

Chapitre I : Introduction

Tableau I:	Certains gènes associés au cancer chez l'Homme (Weinberg, 1996).....	p. 17
Tableau II:	Facteurs responsables des cancers en France (d'après Hill et Doyon, 1997).....	p. 22
Tableau III:	Facteurs modulant l'apparition de cancer colorectal (WCRF, 1997).....	p. 24
Tableau IV:	Classification des récepteurs nucléaires.....	p. 32
Tableau V:	Classification des isoformes de PPAR selon Brendel <i>et al.</i> 2000.....	p. 33
Tableau VI:	Travaux récents montrant l'action des rétinoïdes sur des lignées cellulaires coliques.....	p. 38
Tableau VII:	Les deux isoformes de cyclooxygénases : similitudes et différences	p. 41

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Tableau I:	Composition des régimes alimentaires (g/kg de poids sec).....	p. 49
Tableau II:	Composition en acides gras des différents régimes alimentaires (g/kg de poids sec).....	p. 49
Tableau III:	Séquences des amorces oligonucléotidiques et taille des fragments.....	p. 55
Tableau IV:	Séquences des amorces oligonucléotidiques, sondes TaqMan et taille des fragments	p. 56
Tableau V:	Références et dilutions des anticorps primaires utilisés	p. 73
Tableau VI:	Références et dilutions des anticorps secondaires utilisés	p. 73

Chapitre III : Résultats et Discussion

Tableau I:	Consommation quotidienne par animal	p. 82
Tableau II:	Apports énergétiques quotidiens (kJ) par animal	p. 82
Tableau III:	Masses corporelles (g) des animaux	p. 83

Liste des tableaux

Tableau IV:	Effet du régime hyperlipidique supplémenté ou non en vitamine A et de la DMH sur le taux de rétinol sérique	p. 83
Tableau V:	Effet du régime cafétéria sur l'expression des ARNm des récepteurs RXR α , PPAR γ et RAR β dans la muqueuse colique de rat	p. 87
Tableau VI:	Effet du régime hyperlipidique sur l'expression des ARNm des récepteurs RXR α , PPAR γ et RAR β dans la muqueuse colique de rat	p. 88
Tableau VII:	Effet d'un régime hyperlipidique sur le développement des foyers de cryptes aberrantes après 3 mois de régime	p. 94
Tableau VIII:	Effet d'un régime hyperlipidique enrichi ou non en vitamine A sur le développement des foyers de cryptes aberrantes après 5 mois de régime (15 mg/kg).....	p. 96
Tableau IX:	Effet du régime hyperlipidique supplémenté ou non en vitamine A et de la DMH sur l'expression des ARNm de PPAR γ dans la muqueuse colique de rat	p. 101
Tableau X:	Effet du régime hyperlipidique supplémenté ou non en vitamine A et de la DMH sur l'expression des ARNm de RAR β dans la muqueuse colique de rat	p. 104
Tableau XI:	Effet du régime hyperlipidique supplémenté ou non en vitamine A et de la DMH sur l'expression des ARNm de RXR α dans la muqueuse colique de rat.....	p. 105
Tableau XII:	Effet du régime hyperlipidique supplémenté ou non en vitamine A et de la DMH sur l'expression des ARNm de COX-1 dans la muqueuse colique de rat	p. 111
Tableau XIII:	Effet du régime hyperlipidique supplémenté ou non en vitamine A et de la DMH sur l'expression des ARNm de COX-2 dans la muqueuse colique de rat	p. 114
Tableau XIV:	Effet de l'acide rétinoïque <i>tout-trans</i> (AR) et/ou de l'acide linoléique (AL) sur l'expression des ARNm du récepteur PPAR γ dans la lignée PROb, après 4 jours de traitement	p. 129
Tableau XV:	Effet de l'acide rétinoïque <i>tout-trans</i> (AR) et/ou de l'acide linoléique (AL) sur l'expression des ARNm des récepteurs RXR α dans la lignée PROb, après 4 jours de traitement	p. 130

ANNEXES

Tableau I:	Nombre de FCA à n CA par animal consommant le régime témoin pendant <u>3 mois</u> (DMH : 50 mg/kg).....	p. 159
------------	---	--------

Liste des tableaux

Tableau II:	Nombre de FCA à n CA par animal consommant le régime hyperlipidique pendant <u>3 mois</u> (DMH : 50 mg/kg).....	p. 159
Tableau III:	Nombre de FCA à n CA par animal consommant le régime témoin pendant <u>3 mois</u> (DMH : 15 mg/kg).....	p. 160
Tableau IV:	Nombre de FCA à n CA par animal consommant le régime hyperlipidique pendant <u>3 mois</u> (DMH : 15 mg/kg).....	p. 160
Tableau V:	Nombre de FCA à n CA par animal consommant le régime témoin pendant <u>5 mois</u> (DMH : 15 mg/kg).....	p. 161
Tableau VI:	Nombre de FCA à n CA par animal consommant le régime hyperlipidique pendant <u>5 mois</u> (DMH : 15 mg/kg).....	p. 161
Tableau VII:	Nombre de FCA à n CA par animal consommant le régime hyperlipidique supplémenté en vitamine A pendant <u>5 mois</u> (DMH : 15 mg/kg).....	p. 162

Liste des abréviations

13-cis AR : Acide rétinoïque 13-cis	OMS : Organistaion Mondiale de la Santé (WHO, World Health Organization)
4-HPR : Fenretinide(N-(4-hydroxyphényl) retinamide)	Pb : Paire de bases
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire	PCR : Polymerase Chain Reaction
AG : Acide gras	PG : Prostaglandine
AGPI : Acide gras polyinsaturé	PKC : Protein kinase C
AOM : Azoxyméthanol	PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor (récepteur active par les proliférateurs de peroxyosome)
AP-1 : Activator protein –1	PPARE : PPAR response element
APC : Adenomatous polyposis coli	RAR : Retinoic acid receptor (récepteur de l'acide rétinoïque <i>tout-trans</i>)
APS : Ammonium persulfate	RBP : Retinol binding protein
AR 9-cis :Acide rétinoïque 9-cis	RT : transcriptase inverse
AR tt : Acide rétinoïque <i>tout-trans</i>	RXR : Retinoid X receptor (Récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque)
ARNm : Acide ribonucléique messenger	SDS : Sodium dodécyl sulfate
C/EBP : CCAAT-enhancer-binding protein	ser : Sérine
CA : Crypte aberrante	TCF : T cell factor
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC, International Agency on Cancer Research)	TGF : Transforming growth factor
COX-1 et 2 : Cyclooxygénase-1 et 2	TR : Thyroid receptor (récepteur de la triiodothyronine)
CRABP : Cellular Retinoic Acid Binding Protein	TZD : Thiazolidinedione
CRBP : Cellular Retinol Binding Protein	VDR : Vitamin D receptor
DCA : Desoxycholic acide	Wnt : Wingless proteins
DEPC : Diéthyl pyrocarbonate	FABPs : Fatty Acids Binding Proteins
DHA : Docosahexaenoic acide	
DMH :1,2-diméthylhydrazine	
DR : Direct repeat	
DTT : Dithiothréitol	
EPA : Eicosapentanoïque acide	
FAP : Familial Adenomatous Polyposis (Polypose adénomateuse familiale)	
FCA : Foyer de cryptes aberrantes	
GAPDH : Glycéraldéhyde (3P) phosphate déshydrogénase	
GSK-3 : Glycogen synthase kinase-3	
HETE : Hydroxyeicosatétranoïque acide	
HNF-4 : Hepatic nuclear factor-4	
HNPCC : Hereditary non polyposis colorectal cancer (cancer colorectal héréditaire sans polypose)	
HODE : Acide hydroxyoctadécadienoïque	
HRE : Hormone response element	
LEF : Lymphocyte enhancing factor	
MAM :Méthyl azoxyméthanol	
Min : Multiple intestinal neoplasia	
M-MLV : Moloney Murine Leukemia Virus	
NSAID : Non steroidal inflammatory drug (médicament anti-inflammatoire non stéroïdien)	

Chapitre I

Introduction



L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a attribué la majorité des cancers au style de vie et à diverses sources environnementales. Aujourd'hui l'alimentation est considérée comme l'une des causes majeures puisqu'on lui attribue plus d'un tiers des cas de cancers. En effet, les études épidémiologiques montrent que les facteurs alimentaires sont les déterminants les plus importants du risque environnemental en terme de cancers humains. Des composants naturels des aliments tels que les lipides, les protéines, les fibres, les minéraux et les vitamines peuvent influencer l'incidence des cancers.

Il existe aujourd'hui une politique nutritionnelle européenne. Lors de sa Présidence, la France (rapport du groupe de travail de la Direction Générale de la Santé : DGS) a fixé pour objectifs des 5 prochaines années d'augmenter la consommation de fruits et légumes (au moins 25%), la consommation de calcium, celle des glucides complexes (plus de 50% des apports énergétiques journaliers avec une diminution des sucres simples) et de diminuer la consommation des lipides et de l'alcool, ceci afin de modifier les comportements alimentaires de nos pays industrialisés et de prévenir les risques de cancer.

A) Données générales

1) Incidence du cancer colorectal

On estime à 945 000 le nombre des personnes touchées par le cancer colorectal au cours de l'année 2000 dans le monde (CIRC, 2000). A l'échelle mondiale, c'est le quatrième type de cancer le plus fréquent chez l'homme (après ceux du poumon, de l'estomac et de la prostate) et le troisième le plus fréquent chez la femme (après ceux du sein et de l'utérus). On observe des zones à haut risque en Amérique du Nord, Europe et Australie/Nouvelle-Zélande. Les pays industrialisés regroupent 65% des cas recensés dans le monde. L'Amérique Centrale, l'Asie (excepté le Japon) et l'Afrique sont des continents où le risque de cancer colorectal est le plus faible (CIRC, 1998 ; figure 1).

L'incidence est la même quel que soit le sexe dans le cas du cancer du côlon. Par contre, les hommes ont un risque plus élevé (+ 20 à 50 %) que les femmes d'être atteints de cancer du rectum. Le taux de survie à 5 ans pour les cancers du côlon et du rectum est de 50 à 60%, et en 2000, la mortalité attribuée aux cancers colorectaux dans le monde a été estimée pour 493 000 personnes, soit 7,9% des décès par cancer (données publiées par le CIRC en 2000).

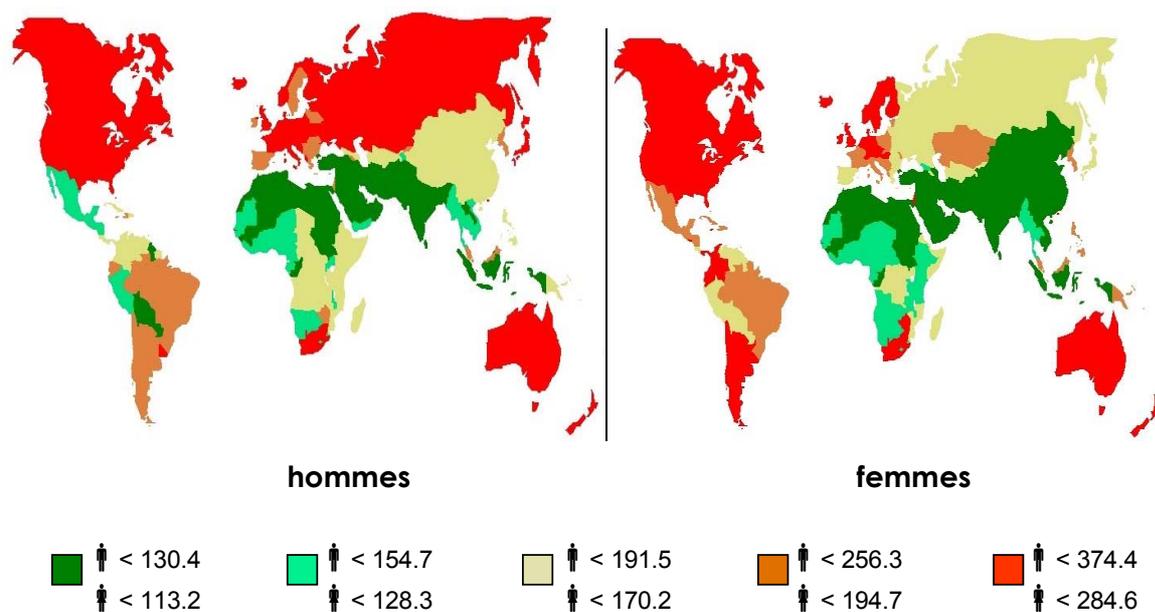


Figure 1 : Répartition du taux d'incidence des cancers colorectaux dans le monde en 1998, données exprimées en taux standardisés par âge sur la population standard mondiale/100 000.

En France, le cancer colorectal se situe au premier rang des cancers pour les deux sexes. Le cancer représente, en France, la première cause de mortalité depuis 1989, devant les maladies cardio-vasculaires, avec plus de 200 000 nouveaux cas diagnostiqués par an, tous âges et sexes confondus (Hill et Doyon, 1997). On estime à près de 33 000 le nombre de nouveaux cas de cancers colorectaux pour 1995 (Menegoz *et al.* 1997) dont 65% localisés au côlon, soit près de 21 500 cas. Les données issues des différents départements couverts par un registre des cancers permettent de comparer les distributions d'incidence du cancer colique en France. Les variations d'incidence sont peu marquées, pour les deux sexes, entre les différents départements. L'incidence est cependant un peu plus élevée en Alsace que dans les autres départements. Ces données d'incidence peuvent également être comparées à celles issues d'autres régions du monde (Parkin *et al.*, 1997).

2) Les mécanismes de la cancérogenèse

Le mot 'cancer' regroupe une multitude de maladies différentes, plus d'une centaine, touchant pratiquement tous les tissus de l'organisme, qui ont en commun une croissance cellulaire non contrôlée conduisant à l'invasion des tissus environnants, voire une migration vers d'autres tissus (métastases).

Les recherches expérimentales menées depuis de nombreuses années ont permis de mettre en évidence les mécanismes fondamentaux qui régissent le développement du cancer. Toutes les cellules d'une tumeur sont issues d'une unique cellule dont la division est devenue anormale à cause de facteurs multiples : la transformation maligne de la cellule responsable de la tumeur est un phénomène lent (jusqu'à plusieurs dizaines d'années chez l'Homme) qui survient en raison de l'accumulation de mutations dans certains de ses gènes. C'est donc un processus multiphasique, décrit dès 1941 par Berenblum, comprenant trois étapes essentielles : d'initiation, de promotion et de progression-invasion (Vogelstein et Kinzler, 1993).

La **phase d'initiation** comprend une altération du matériel génétique de la cellule, stable et transmissible aux cellules-filles, conférant ainsi 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 être également produites à la suite d'exposition à des agents cancérogènes. Les lésions de l'ADN à l'origine des mutations géniques sont donc un point clé dans le processus de cancérisation de la cellule et peuvent être de plusieurs types. Des composés électrophiles (molécules dérivées par exemple du benzo(a)pyrène, de l'aflatoxine ou d'amines aromatiques hétérocycliques), 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 (alkylnitrosourée, alkylsulfate...) peuvent également alkyler les bases de l'ADN ce qui entraîne parfois une dépurination. D'autres agents (le bromure d'éthidium par exemple) 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 les rayons X par exemple ou résultant d'autres lésions.

Ces lésions génomiques peuvent résulter de deux mécanismes : la métabolisation des agents chimiques en composés génotoxiques, et la défaillance des systèmes de

réparation de l'ADN. Dans un premier temps les agents cancérigènes sont principalement métabolisés par un système enzymatique dépendant du cytochrome P450 (enzymes de fonctionnalisation ou 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 (enzymes de phase II) qui peut l'éliminer via les voies sanguines ou biliaires après conjugaison à des composés hydrophiles. Par ailleurs, ce système de métabolisation complexe qui mène normalement à une détoxification des molécules xénobiotiques, peut donner naissance à des métabolites électrophiles mutagènes. 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, dans certains cas, un système de réparation "infidèle" (système SOS) peut avoir lieu, ce qui permet la survie de la cellule mais induit des mutations responsables de l'apparition de cellules initiées.

Deux classes de gènes, les oncogènes qui stimulent la croissance cellulaire, et les gènes suppresseurs de tumeurs 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).

La **phase de promotion** voit le passage de la cellule initiée d'un état phénotypiquement normal, qui peut durer des années, à un état néoplasique, prolifératif. Cette étape est induite par différents facteurs (chimiques, physiques) présents en quantité suffisamment importante pour provoquer l'expression de la mutation. Les substances promotrices présentent de manière générale une absence de pouvoir génotoxique. Ce sont principalement des mécanismes épigénétiques impliquant les voies de signalisation cellulaire et de communications intercellulaires qui interviennent au cours de cette étape (Decloître et Puisieux-Dao, 1993). Cette phase est réversible, tout au moins à ses débuts.

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

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

L'acquisition définitive de la malignité s'effectue au cours d'une **phase de progression** qui aboutit à la tumeur proprement dite. Cette étape est irréversible et se caractérise par une grande instabilité génomique. La dernière phase qui peut survenir est celle de l'**invasion** qui voit la dissémination des cellules tumorales migrant de leur organe d'origine vers d'autres tissus et former ainsi des métastases à distance.

Ce modèle multiphasique de cancérogenèse élaboré chez l'animal a été conforté dernièrement par l'équipe de Weinberg (Hahn *et al.*, 1999) qui est parvenue à faire évoluer des cellules épithéliales humaines normales (HEK) et des fibroblastes (BJ) en cellules cancéreuses *in vitro*. Le processus a été atteint par l'introduction de deux gènes modifiés dans le génome de la cellule (l'un inhibant les protéines RB et p53, l'autre activant la protéine Ras, toutes ces protéines contrôlant le cycle cellulaire), et du gène *hTERT* induisant la production de télomérase nécessaire à la prolifération cellulaire (chez l'Homme, les télomères raccourcissent de division en division cellulaire, et lorsqu'ils sont devenus trop petits, la cellule entre en apoptose, la télomérase va contourner ce verrou de sécurité).

3) La cancérogenèse colique

Le côlon humain est un organe musculaire d'environ 125 cm de long. 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.

Le côlon se divise en cinq parties : le caecum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant et le côlon sigmoïde. On trouve ensuite le rectum et l'anus. La muqueuse colique est constituée d'une lamina propria, ou chorion, où sont enchâssés des leucocytes et des cellules musculaires lisses. Elle est bordée par une rangée de cellules épithéliales. Dans le côlon, la muqueuse est lisse, contrairement à celle de l'intestin grêle, et est invaginée en tubules droits, les glandes de Lieberkühn, à la base desquelles se trouvent les cryptes (figure 2).

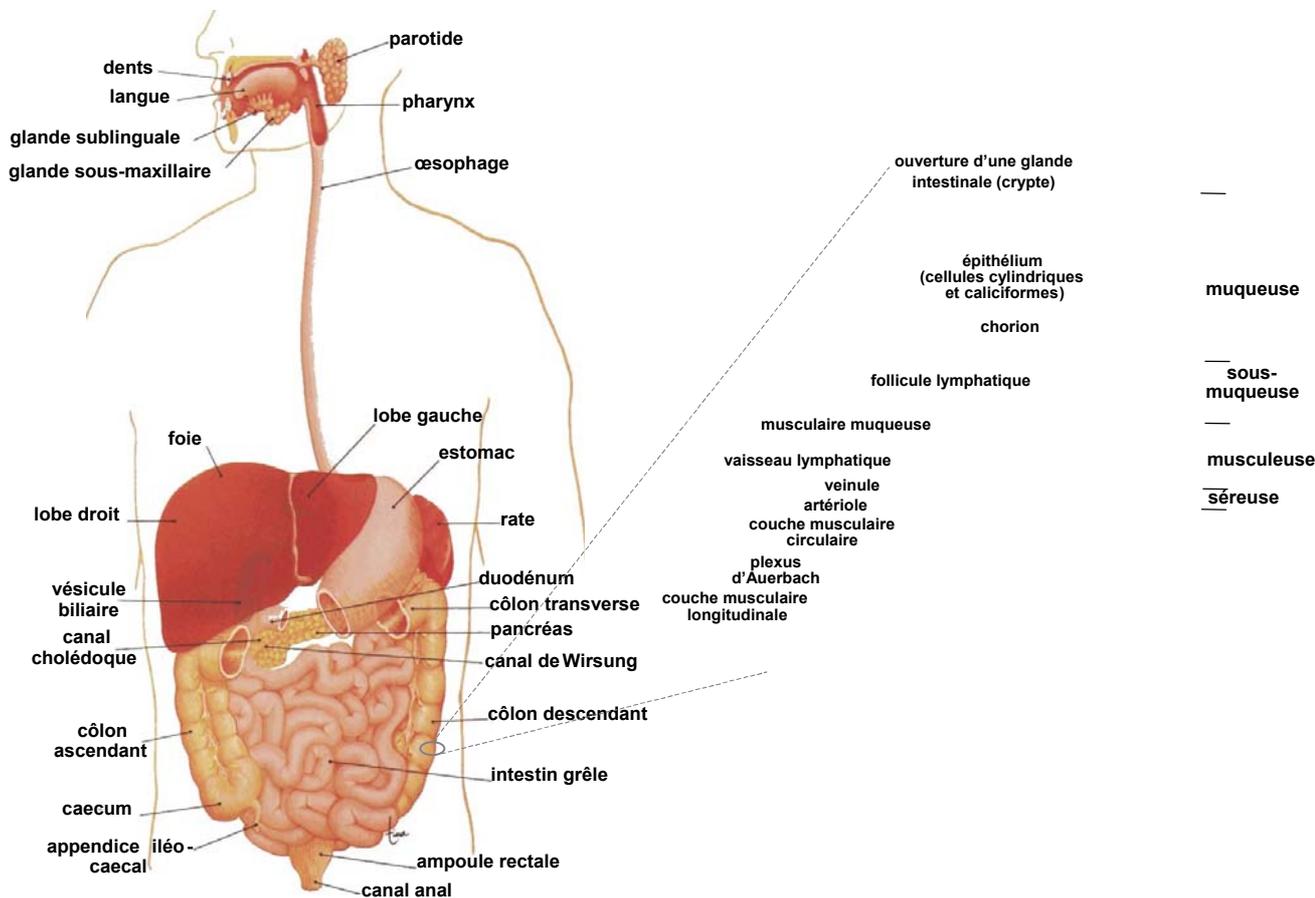


Figure 2 : Anatomie du système digestif de l'Homme et structure de la muqueuse colique.

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 3).

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.

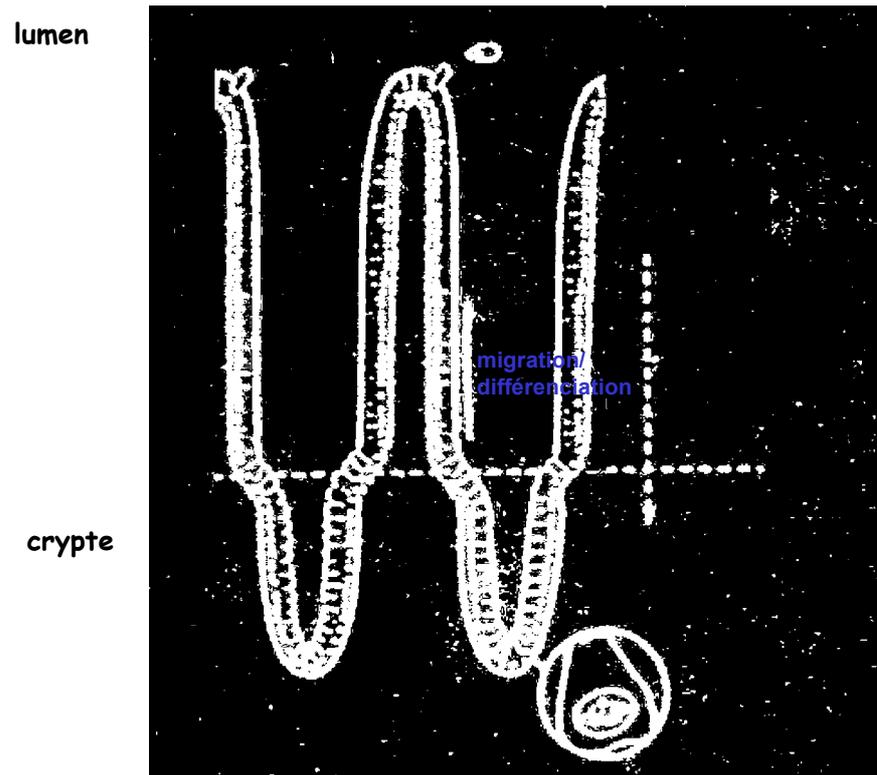


Figure 3 : Illustration de la prolifération et différenciation des cellules épithéliales coliques (selon Reilly *et al.*, 1994)

Le modèle 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. Vogelstein et ses collaborateurs 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 contrôlant la régulation cellulaire (figure 4). La plupart des cancers colorectaux sont sporadiques (80% des cas), mais il existe également deux formes issues de susceptibilités génétiques héréditaires : la polypose adénomateuse familiale (FAP, pour Familial Adenomatous Polyposis) et le syndrome HNPCC (pour Hereditary Non Polyposis Colon Cancer). Bien que le processus de cancérogenèse colorectal humain soit probablement le résultat de l'accumulation plutôt que de la succession séquentielle de modifications génétiques et épigénétiques, il semble qu'un ordre dans les événements moléculaires soit observé dans les modèles expérimentaux chez l'animal (Vogelstein *et al.*, 1988 ; Kinzler et Vogelstein, 1996).

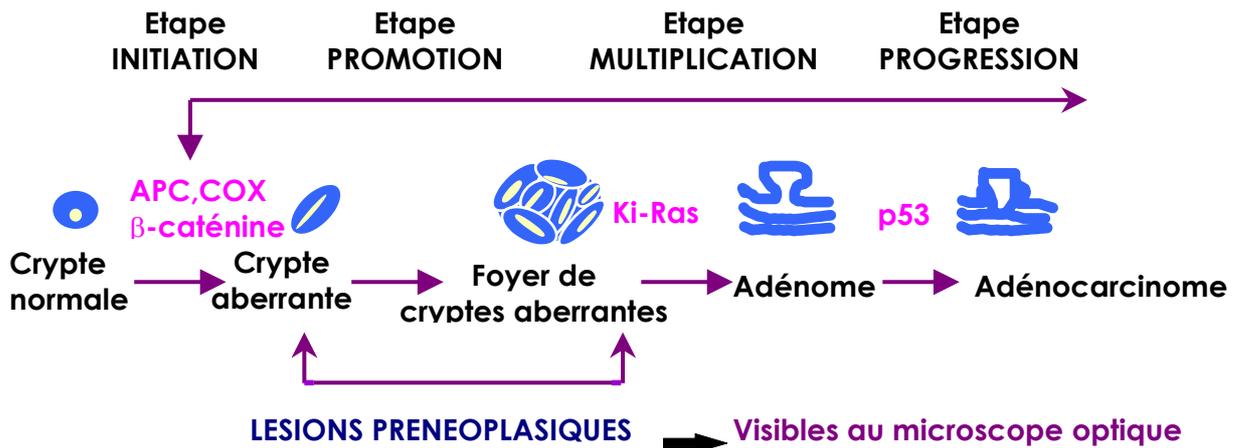


Figure 4: Les différentes étapes de la cancérogenèse colique (selon Bruce *et al.*, 1993)

Le premier événement pourrait être une mutation sur le gène *APC*, qui code la protéine cytoplasmique *APC*, indispensable au fonctionnement de la cadhérine, molécule impliquée dans l'adhésion intercellulaire. La perte de cette fonction perturbe la cohésion des cellules épithéliales coliques. Ensuite, une mutation du gène *Ki-ras* peut activer un signal de stimulation de croissance cellulaire entre la membrane et le noyau de la cellule. Le gène *SMAD4* est également souvent impliqué dans l'évolution de l'adénome : il code pour le facteur de transcription $TGF\beta$, une cytokine qui inhibe la croissance cellulaire en la bloquant en phase G1. Enfin, les cellules cancéreuses présentent dans de nombreux cas une mutation du gène *p53* qui contrôle normalement la croissance cellulaire via l'apoptose. Ces modifications génétiques sont souvent observées dans le cas des cancers sporadiques où l'on peut trouver, plus exceptionnellement, des mutations d'oncogènes *myc*, *erb-B2* et d'autres codant pour des cyclines. Le processus de cancérisation s'accompagne également assez fréquemment de perturbations dans la méthylation de l'ADN. La forme familiale de polypose adénomateuse présente toujours une mutation du gène *APC*, le syndrome HNPCC quant à lui, est associé à des mutations spécifiques de gènes impliqués dans la réparation des "mésappariements" de l'ADN : *MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *PMS2* (Alltonen *et al.*, 1993).

B) Alimentation et cancer

1) Données générales sur les facteurs impliqués dans l'apparition des cancers

Les données épidémiologiques tendent à montrer qu'il existe six grands facteurs influençant la cancérogenèse chez l'Homme : le régime alimentaire, le tabagisme, les processus liés à la reproduction, les infections bactériennes et virales, l'environnement chimique et physique et les facteurs héréditaires (Trichopoulos *et al.*, 1996). Ces derniers représentent moins de 5% des cancers mortels. En revanche, l'alimentation, l'alcool et le tabac occupent une place essentielle dans les facteurs de risques de cancers (tableau II).

Tableau II : Facteurs responsables des cancers en France (selon Hill et Doyon, 1997).

Facteurs	Proportion de décès par cancer (%)
Alimentation	35*
Alcool	12
Tabac	22
Infections	10
Vie reproductive	8
Expositions professionnelles	4**
Additifs alimentaires	1
Pollutions	3
Facteurs géophysiques (soleil, radioactivité naturelle...)	3
Pratiques médicales (radiologie...)	1
Facteurs héréditaires	< 5

* (10 - 70, Doll et Peto, 1981) ; ** (sous-estimation possible)

On distingue donc deux grandes classes de facteurs à l'origine du cancer et particulièrement du cancer colorectal : les cancers familiaux ou génétiques et les facteurs environnementaux. Ces derniers rendent compte de près de 90 % de l'ensemble des cancers.

C'est pourquoi dans cette introduction bibliographique, nous ne prendrons en compte que les facteurs environnementaux et plus précisément les facteurs alimentaires.

2) Alimentation et cancer du côlon

Les résultats de différentes études épidémiologiques suggèrent que dans les pays industrialisés environ 30% des décès par cancer pourraient être attribués à des déséquilibres alimentaires.

Dans le tableau III, sont présentés les facteurs susceptibles de moduler le risque de survenue du cancer colorectal, d'après les différentes études épidémiologiques recensées en 1997. Ces facteurs sont classés suivant un 'degré de certitude' basé sur le nombre et la proportion d'études montrant des tendances convergentes. Le tableau ne présente que les facteurs pour lesquels un classement a été possible.

Ces données suggèrent qu'une intervention sur les facteurs alimentaires pourrait conduire à une réduction significative du nombre de cas de cancer. Cette voie d'intervention constitue la prévention primaire.

Le résultat le plus significatif obtenu à ce jour concerne les effets préventifs d'une consommation riche en légumes et en fruits sur l'apparition d'un certain nombre de cancers, et principalement les cancers de l'appareil digestif (oropharynx, œsophage, estomac, côlon et rectum) et de l'appareil respiratoire (larynx et poumons). En revanche, une consommation excessive de sel, ou bien les régimes riches en produits carnés, sont fortement suspectés d'augmenter le risque de cancer de différents organes, particulièrement des voies digestives (Riboli, 2000).

Tableau III : Facteurs modulant l'apparition de cancer colorectal (WCRF, 1997).

Degré de certitude	Diminution du risque	Pas de relation	Augmentation du risque
Convaincant	Activité physique Fruits et Légumes		
Probable			Viande rouge Alcool
Possible	Fibres, Amidon Caroténoïdes	Calcium Sélénium Poissons	Obésité Grande taille Repas fréquents Sucre Graisse totale Graisse animale saturée Œufs Viande très cuite Charcuteries
Insuffisant	Amidon résistant Vitamines C, D, E Folate Méthionine Céréales Café		Fer

En résumé, de nombreuses études épidémiologiques ont contribué à mieux appréhender les conséquences de notre alimentation sur les risques de cancer. Globalement, ces études suggèrent l'existence d'une corrélation positive avec des apports élevés en matière grasse, en viande, en sucre, et une corrélation négative avec des apports en fibres, en amidon, et surtout en fruits et légumes (Potter, 1996 ; Riboli *et al.*, 1996). Les études épidémiologiques ont également cherché à préciser le rôle possible de différents nutriments ou composés alimentaires, mais aussi les aspects diététiques plus généraux comme la consommation énergétique totale, les habitudes culinaires ou l'activité physique.

2.1) Statut lipidique et cancer du côlon

L'étude des conséquences d'une alimentation riche en lipides sur les risques de développement du cancer colorectal a fait l'objet de nombreux travaux. Une des tendances actuelles est de privilégier un effet de la quantité de graisse ingérée plutôt qu'une composition spécifique en acides gras.

2.1.1) Aspect quantitatif

2.1.1.1) Etudes épidémiologiques

Un ensemble de données cohérentes permettent d'envisager que l'un des facteurs essentiels du risque de cancer est la consommation totale de lipides. Actuellement l'alimentation des populations occidentales apporte environ 45% de l'énergie sous forme de lipides. La plupart des études ont mis en évidence une association positive entre un apport calorique élevé et le risque de cancer colorectal (Giovannucci, 1995 ; Slattery *et al.*, 1997). C'est pourquoi il est aujourd'hui conseillé de réduire la part des lipides dans notre alimentation. D'autres études ont fait apparaître un risque élevé de cancer colorectal chez les sujets obèses (Giovannucci *et al.*, 1995 ; Thorling, 1996). Parmi les facteurs aggravants, la sédentarité joue également un rôle important. A l'inverse, un effet "protecteur net" de l'activité physique sur le risque de cancer colorectal a été rapporté (Whittemore *et al.*, 1990 ; Thune et Lund, 1996).

2.1.1.2) Etudes expérimentales

Les expérimentations animales portant sur des régimes plus ou moins riches en lipides montrent qu'il faut réduire l'apport énergétique lié au lipides à 20 % de l'énergie totale pour voir diminuer le risque de cancer colique. Par contre si on augmente la consommation en fruits et légumes, on peut tolérer jusqu'à 25% de l'apport énergétique sous forme de lipides.

Bird et Lafave (1995) ont montré que les régimes lipidiques exercent un effet variable sur le développement de foyers de cryptes aberrantes chimio-induits. Par ailleurs des travaux réalisés chez des rats Zucker obèses (fa/fa), soumis à des régimes hyperlipidiques, ont montré que l'obésité était une prédisposition essentielle associée au risque de cancer du côlon (Weber *et al.*, 2000).

Un ensemble de données convergentes sont en faveur de relations entre une alimentation riche en lipides, le développement de l'obésité et le risque de cancer (Newberne et Rogers, 1985 ; Giovannucci et Willett, 1994 ; Greenwald *et al.*, 2001).

Cependant, Dong-Yeon *et al.*, (1998) montrent qu'un régime hyperlipidique n'est pas toujours promoteur de cancer du côlon et ces auteurs suggèrent que les effets seraient dépendants du type d'acides gras et de la localisation des tumeurs dans le côlon.

2.1.2) Aspect qualitatif

2.1.2.1) Etudes épidémiologiques

Les résultats de la plupart des études cas-témoins et de deux études prospectives de cohortes indiquent que les lipides et notamment les lipides d'origine animale, accroissent le risque de cancer du côlon et du rectum (Giovanucci et Goldin, 1997).

Dans la population d'Europe centrale, il a été montré qu'un régime riche en graisses raffinées et viandes rouges augmente le risque de cancer colorectal (Levi *et al.*, 1999). Dans le bassin Méditerranéen les cancers du côlon et du sein ont une faible incidence, spécialement dans le sud de l'Italie et la Grèce, où la consommation d'huile d'olive est prédominante (huile essentiellement composée d'acides gras monoinsaturés).

Les acides gras polyinsaturés de la série n-6 (tel que l'acide linoléique) semblent favoriser la phase "promotionnelle" dans des modèles de cancers du sein, du côlon et de la prostate. En revanche, les acides gras polyinsaturés de la série n-3 (tels que l'acide α -linoléique, l'acide éicosapentanoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA)) semblent exercer des effets inhibiteurs (Greenwald *et al.*, 2001).

Le rapport n-6/n-3 apparaît crucial et on considère que les acides gras polyinsaturés de la série n-3 sont des inhibiteurs compétitifs des effets des acides gras polyinsaturés de la série n-6. C'est pourquoi quand ce rapport augmente, l'incidence tumorale augmente et inversement (Bartsch *et al.*, 1999).

Dans une méta-analyse récente, Zock et Katan (1998) ont référencé les études épidémiologiques et expérimentales relatant l'implication des acides gras polyinsaturés dans la cancérogenèse colique. Les auteurs ne trouvent pas d'augmentation du risque relatif du cancer colorectal dans les diverses études cas-témoin ou études de cohortes (consommation d'acide linoléique). Cependant il est important de noter que ces études prennent en compte la consommation d'acide linoléique en se basant sur la consommation d'huiles végétales dont l'acide linoléique est le principal composant.

2.1.2.2) Etudes expérimentales

Les résultats des études expérimentales sont divergents. Les conséquences d'un régime riche en lipides sur la cancérogenèse chimio-induite varient, en effet, selon le

modèle et les méthodes utilisées. Certaines études, réalisées chez le rat, indiquent que les acides gras polyinsaturés de la série n-6 sont plus promoteurs que les acides gras saturés. D'autres montrent que les acides gras polyinsaturés de la série n-6 n'ont pas d'effet ou encore, d'autres concluent que les acides gras polyinsaturés de la série n-6 sont moins promoteurs que les acides gras saturés (Zock et Katan, 1998).

Une méta-analyse faite chez le rat montre que la consommation en lipides ajustée à l'énergie totale augmente la croissance tumorale colique chez les rats Fisher-344 mais pas chez les rats Sprague-Dawley. Chez les rats Fisher-344, les acides gras polyinsaturés de la série n-6 et les acides gras saturés augmentent la croissance tumorale plus que les acides gras monoinsaturés ou les acides gras polyinsaturés de la série n-3. Les acides gras polyinsaturés de la série n-6 augmentent le nombre de foyers de cryptes aberrantes et d'adénocarcinomes chez le rat par rapport aux acides gras polyinsaturés des séries n-9 et n-3 (régimes à 5% de lipides) (Bartoli *et al.*, 2000).

En résumé, un ensemble de données cohérentes suggèrent que la quantité et la qualité des acides gras consommés jouent un rôle prépondérant dans la cancérogenèse colique. Une attention particulière doit être portée aux acides gras de la série n-6 en rapport avec leur potentiel promoteur de la croissance tumorale.

2.2) Vitamine A et cancer du côlon

2.2.1) Etudes épidémiologiques

Un ensemble de données sont en faveur de l'intervention des caroténoïdes notamment en tant que précurseurs de vitamine A. Chez l'Homme, 1/6 du β -carotène présent dans l'alimentation est converti en vitamine A dans l'organisme. Cette conversion dépend de différents facteurs tels que l'activité thyroïdienne, le stress, mais aussi de l'existence d'interférences alimentaires avec les nitrates, les protéines ou les lipides (Siveira et Moreno, 1998). Les caroténoïdes tels que l' α -carotène, le β -carotène, le lycopène, la β -cryptoxanthine, la lutéine et l'astaxanthine que l'on trouve dans les fruits et les légumes, ont des activités relatives à la prévention du cancer. Leur action peut résulter de leur activité antioxydante, de la modulation du métabolisme des cancérogènes, de l'inhibition de la prolifération cellulaire, de l'inhibition de l'expression d'oncogènes, des effets bénéfiques des

fonctions immunitaires, ou encore des effets bénéfiques sur la différenciation cellulaire.

Des études épidémiologiques suggèrent qu'il existe une association négative entre la prise de vitamines, caroténoïdes et fibres et le risque de cancer gastrique (Botterweck *et al.*, 2000). Par ailleurs, une concentration faible en vitamine A dans le sérum de patients atteints d'un cancer colorectal est associée à l'activation globale du système immunitaire. Ce phénomène pourrait être utilisé pour la détection de la progression tumorale et la réponse immunitaire (Hronek *et al.*, 2000).

2.2.2) Etudes expérimentales

Il est connu depuis longtemps que la déficience en vitamine A favorise le cancer du côlon chez l'animal (Newberne et Rogers, 1985). Dès 1993, Stopera et Bird ont montré que l'acide rétinoïque *tout-trans*, un des métabolites de la vitamine A, pouvait diminuer le nombre de foyers de cryptes aberrantes chez des rats chimio-induits mais également, pouvait modifier l'expression des gènes *c-myc* et *c-fos* dans ces foyers. Un argument supplémentaire a été apporté par Zheng *et al.*, (1999) montrant que les rétinoïdes préviennent la formation des foyers de cryptes aberrantes. De plus, l'acide rétinoïque *tout-trans* diminue le nombre de foyers de cryptes aberrantes induits par un acide biliaire, l'acide déoxycholique mais ne diminue pas le pourcentage de mutations de *K-ras* induites par cet acide biliaire (Narahara *et al.*, 2000). Le gène *Ras* est muté durant les premières étapes de la cancérogenèse du côlon et cette mutation est observée dans 40 à 50% des tumeurs humaines (Vogelstein *et al.*, 1988).

La consommation d'un régime hypolipidique supplémenté en β -carotène et en fibres protège le côlon par rapport au développement de cryptes aberrantes (Alabaster *et al.*, 1995).

3) Aspects cellulaires et moléculaires de la relation alimentation-cancer

3.1) Principaux niveaux d'intervention

Les données épidémiologiques montrent que l'alimentation est à la fois source de composants aggravants mais aussi protecteurs vis-à-vis du cancer colorectal. C'est pourquoi différents mécanismes d'interaction entre l'alimentation et le processus de cancérogenèse colique sont possibles.

L'alimentation peut moduler des événements extra cellulaires et/ou intra cellulaires, soit directement au niveau de la lumière colique, 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 être liés à différentes étapes du processus de cancérogenèse colique : initiation, promotion ou progression tumorale.

Les mécanismes d'action de l'alimentation vis-à-vis de la cancérogenèse colique peuvent donc être multiples. D'après Potter (1996) et Lipkin *et al.*, (1999), l'alimentation peut modifier de nombreux paramètres biologiques tels que, des paramètres physiologiques et biochimiques de la digestion (figure 5). En premier lieu, le régime va directement moduler la biodisponibilité des éléments cancérogènes ou anticancérogènes qu'il contient, en modifiant l'absorption intestinale, via le temps de transit, ou par phénomènes de piégeage. Dans un deuxième temps, des composés alimentaires ou des facteurs, comme la quantité d'aliments ingérés, vont avoir des actions sur le milieu colique. Ces actions peuvent être la modification de la population bactérienne, de sa fermentation et de ses activités enzymatiques, la modulation de la vitesse de transit, de la masse fécale, du pH colique, du renouvellement cellulaire, des paramètres immunologiques. Ces différentes modifications peuvent avoir lieu simultanément, indépendamment les unes des autres, mais elles sont aussi capables d'interagir. Par exemple, une activité enzymatique bactérienne varie en fonction du pH colique, ou bien la modification de la population bactérienne entraîne une réponse immunologique. Un troisième aspect de ces paramètres physiologiques et biochimiques est la régulation de la production d'acides biliaires par les nutriments.

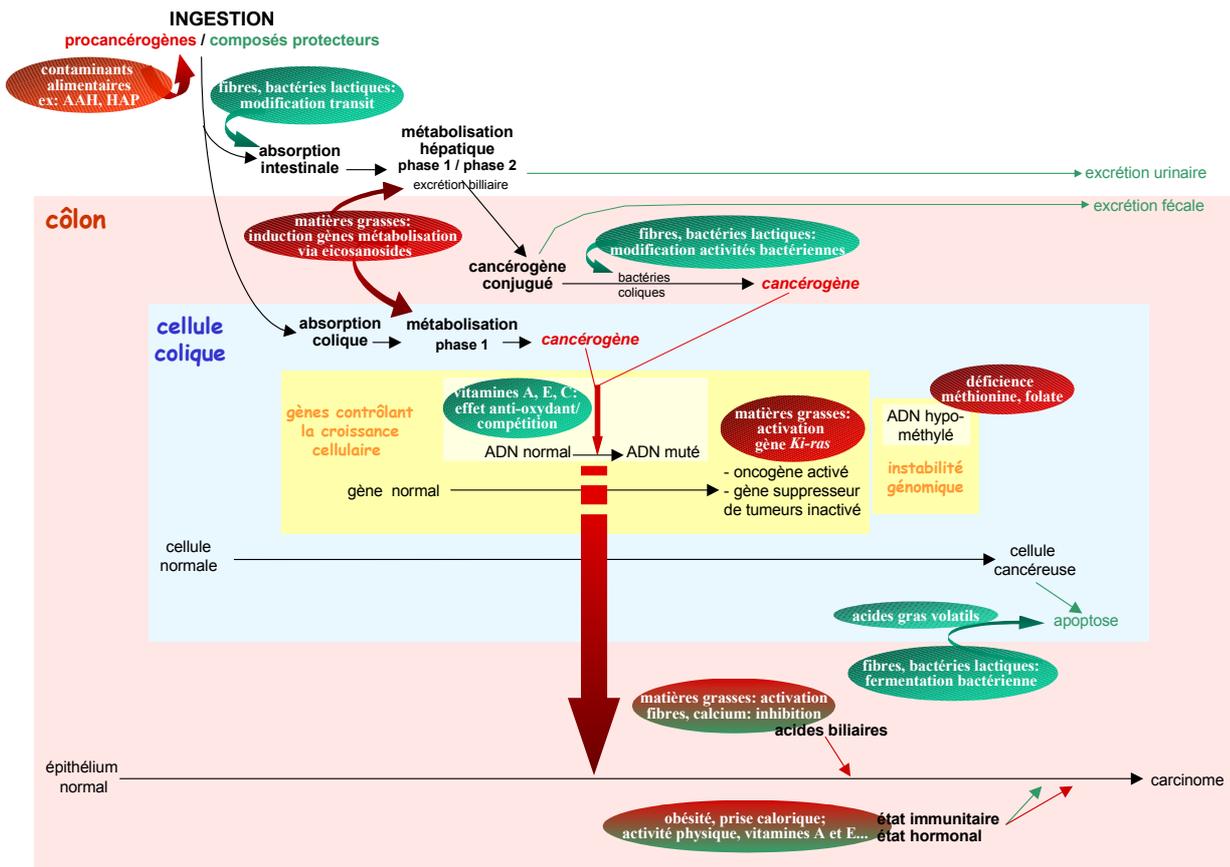


Figure 5 : Alimentation et cancérogenèse colorectale : différents niveaux d'interactions possibles et quelques exemples d'activation et de protection par des composants alimentaires.

Il a aussi été montré que les facteurs alimentaires pouvaient moduler une grande partie des mécanismes qui interviennent 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 détoxification/toxification de xénobiotiques. Ensuite, les composés alimentaires peuvent avoir une action sur la formation de lésions génotoxiques : les métabolites actifs de certains composants 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 tels que les radicaux libres oxygénés. Enfin, l'alimentation est également susceptible de jouer un rôle dans l'expression de

certains gènes et de moduler les processus liés à la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaires.

C'est dans ce troisième aspect de l'action des nutriments que s'inscrit notre travail de thèse. En effet, les acides gras et les rétinoïdes modulent l'expression de gènes via des récepteurs nucléaires agissant comme des facteurs de transcription de gènes du "développement".

3.2) Nutriments et expression des gènes

La plupart des processus physiologiques nécessitent un système de communication intercellulaire complexe contrôlé par l'action combinée des systèmes nerveux et endocrinien. En réponse à des stimuli divers, le système endocrinien opère par la synthèse de messagers spécifiques, les hormones. Certaines d'entre elles, de nature lipophile, sont capables de pénétrer à l'intérieur de la cellule et de se fixer à des récepteurs spécifiques dans le noyau. Ces récepteurs, regroupés sous le terme de récepteurs nucléaires, vont transmettre le message hormonal au noyau en modulant l'activité transcriptionnelle de gènes cibles. Contrairement aux récepteurs membranaires pour lesquels le message apporté par la fixation du ligand est transmis au travers de la membrane via un second messenger, les récepteurs nucléaires fixent des ligands lipophiles et se comportent au sein du noyau comme des facteurs de transcription. La famille des récepteurs nucléaires inclut les récepteurs des différentes classes de stéroïdes mais également des récepteurs pour des composés non stéroïdiens comme les hormones thyroïdiennes ou les acides rétinoïques (tableau IV). Certains récepteurs sont qualifiés de récepteurs orphelins en raison de l'absence de ligand physiologique connu.

L'étude du contrôle de l'expression des gènes par ces récepteurs nucléaires est devenue un thème central dans la biologie moléculaire moderne.

Tableau IV: Classification des récepteurs nucléaires

Classe	I	II	III	IV
Récepteurs	Stéroïdes classiques Récepteurs hormonaux	Formation d'un hétérodimère avec RXR	Récepteurs orphelins Homodimères	Récepteurs orphelins Monomères
Acides aminés discriminatoires	CGSCKV ou CEGCKA	CEGCKG	CEGCKS CDGCKG ou CEGCKG	CESCKG ou CEGCKG
Séquences consensus HRE	Répétition inverse de AGAACA	Répétition directe de AGGTCA	Répétition directe de A/GGTCA	Extended half-sites of AGGT/CCA/G
Récepteurs	Récepteur des oestrogènes, glucocorticoïdes et progestérone	PPAR RAR, Vit D, TR et LXR	COUP-TF I HNF-4 TAK-1 ARP-1	NGF1-B SF-1

3.2.1) Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes : les PPAR

3.2.1.1) Généralités

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) appartiennent à une sous-famille des récepteurs hormonaux nucléaires. Trois PPAR différents, dénommés α , δ (ou encore NUC-1 ou FAAR) et γ , ont été décrits, chacun d'eux étant codé par des gènes séparés et ayant une distribution tissulaire distincte. Les PPAR se trouvent dans la cellule sous forme d'hétérodimères avec un autre récepteur nucléaire, le récepteur de l'acide 9-cis rétinolique (RXR). Les deux PPAR les mieux connus et les plus étudiés sont PPAR α et PPAR γ . PPAR α joue un rôle important dans l'oxydation des acides gras au niveau hépatique tandis que PPAR γ joue un rôle crucial dans l'adipogenèse et la sensibilité à l'insuline. L'isoforme γ de PPAR est le plus souvent associée aux acides gras. Il existe trois isoformes : γ 1, γ 2 et γ 3 qui ont les mêmes ligands avec une affinité identique, apparente mais leur différence réside dans le fait que leur induction et leur expression est spécifique des tissus (tableau V).

Tableau V : Classification des isoformes de PPAR selon Brendel *et al.*, 2000.

Récepteurs	Ligands naturels	Ligands synthétiques	Distribution tissulaire	Propriétés biologiques*
PPARα	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Leucotriènes ▪ Acide phytanique ▪ 8S-HETE ▪ Acides gras insaturés 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hypolipidémiants (tous les fibrates, tibrates) ▪ Anti-inflammatoires (indométhacine, acide flufénamique, ibuprofène, fénoprofène) 	foie, cœur, rein, tissu adipeux brun de souris	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anti-inflammatoire et anti-oxydant (interférence avec le NFκB et inhibition de la COX2). ▪ Pro-inflammatoire et pro-oxydant (cellules hépatiques, macrophages). ▪ Inhibition de la multiplication et de la migration des cellules musculaires lisses vasculaires. ▪ Anti-apoptotique (selon type cellulaire)
PPARβ ou δ	Divers acides gras saturés et insaturés	Quelques fibrates hypolipidémiants (benzafibrate, GW3233)	Ubiquiste	Anti-apoptotique
PPARγ	Prostaglandine (15d-PGJ2) Acides gras insaturés 9-HODE 13-HODE	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Glitazones antidiabétiques thiazolidinediones comprenant : troglitazone, rosiglitazone, ciglitazone, pioglitazone et darglitazone ▪ Anti-inflammatoires (indométhacine, ac. flufénamique, ibuprofène, fénoprofène) ▪ Antagoniste :GW002 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PPARγ1 Ubiquiste ▪ PPARγ2 Surtout dans le tissu adipeux blanc ▪ PPARγ3 Surtout dans les macrophages et le côlon 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anti-inflammatoire et anti-oxydant (diminution de la production de cytokines et interférence avec le NFκB) ▪ Différenciation cellulaire ▪ Antimitotique et pro-apoptotique

* L'effet biologique résultant de l'activation des récepteurs PPAR peut varier considérablement en fonction du modèle utilisé (souris, cellules, etc.) ainsi qu'en fonction du dosage et de la nature des ligands testés.

Les PPAR activés modifient la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans le métabolisme lipidique après liaison à des éléments de réponse spécifiques situés dans le promoteur de ces gènes.

PPAR γ est activé par des acides gras polyinsaturés, certains dérivés d'acides gras, des ligands synthétiques anti-diabétiques comme les thiazolidinediones, et un certain nombre d'autres ligands anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) (figure 6).

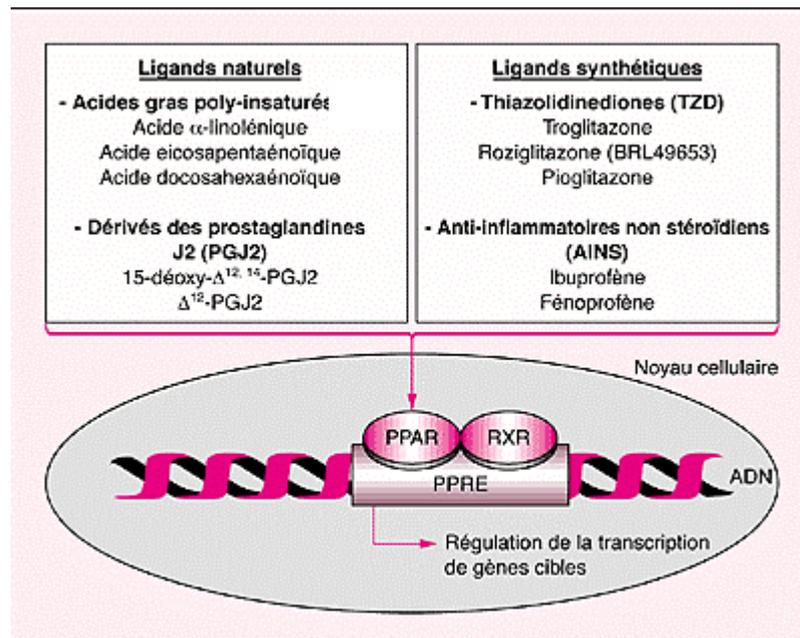


Figure 6: PPAR γ est un récepteur nucléaire capable de se lier à des ligands naturels ou synthétiques (Dubuquoy *et al.*, 1999).

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

Les PPAR traduisent les stimuli nutritionnels, pharmacologiques et métaboliques en modifiant l'expression des gènes. Il existe un consensus dans les données bibliographiques mettant en évidence l'implication de l'isoforme γ du PPAR dans les processus de cancérogenèse colique (isoforme la plus exprimée dans le côlon), mais aussi, plus récemment, l'isoforme δ .

C'est pourquoi il sera mis en relief dans ce paragraphe les données bibliographiques impliquant le PPAR γ dans la cancérogenèse colique et plus particulièrement *in vivo*.

3.2.1.2) Rôles de PPAR γ et PPAR δ dans le développement de cancers du côlon

Des données épidémiologiques ont montré une forte corrélation entre l'augmentation du risque de cancer colique et la consommation d'acides gras poly-insaturés qui sont des activateurs de PPAR γ (Giovanucci et Willet, 1994, Wasan *et al.*, 1997). Par ailleurs, la réduction du risque de cancer par la prise d'AINS pourrait être

médiée par une diminution de la production de PGJ2 de l'activation de PPAR γ . Chez l'Homme, comme chez la souris, l'ARNm et la protéine PPAR γ sont fortement exprimés dans les adénomes et les adénocarcinomes du côlon (Mansen *et al.*, 1996 ; Fajas *et al.*, 1997 ; Lefebvre *et al.*, 1998 ; Hafraoui *et al.*, 1999 ; Lefebvre *et al.*, 1999).

PPAR γ est connu pour être fortement exprimé dans le côlon (Considine *et al.*, 1996 ; Mansen *et al.*, 1996 ; Lefebvre *et al.*, 1998). **In vivo**, plusieurs publications ont impliqué directement PPAR γ et PPAR δ dans le développement de tumeurs colorectales. Tout d'abord, l'équipe de J. Auwerx et celle de R. M. Evans ont indépendamment montré que l'activation de PPAR γ pouvait promouvoir le développement de tumeurs dans le côlon de souris C57BL/6J-APC^{Min}/+ (Lefebvre *et al.*, 1998 ; Saez *et al.*, 1998), un très bon modèle pour le cancer sporadique du côlon et la polypose adénomateuse familiale chez l'Homme (Grodén *et al.*, 1991 ; Nishisho *et al.*, 1991 ; Miyoshi *et al.*, 1992 ; Su *et al.*, 1992). Si le rôle exact de PPAR γ dans le développement de cancers colorectaux n'est pas encore entièrement élucidé, plusieurs données confortent l'idée que ce récepteur est impliqué dans ces pathologies.

D'après Sarraf *et al.*, (1999) la mise en évidence de quatre mutations de PPAR γ , conduisant à une perte de fonction du récepteur, observées sur cinquante-cinq biopsies de cancer colorectal humain, suggère que PPAR γ protégerait contre le développement de ces tumeurs. Au contraire, on peut aussi envisager que si dans toutes ces biopsies PPAR γ est très fortement exprimé, c'est qu'il ne protège pas mais plutôt favorise le développement de ces tumeurs. Si PPAR γ freinait leur développement ou prévenait leur apparition, on s'attendrait à ce que son expression soit réduite ou abolie lorsque la maladie se déclenche. De plus, Sarraf *et al.* (1999) n'ont pas montré que les récepteurs mutés avaient un effet dominant négatif.

D'autres données sont en faveur de l'existence d'une forte corrélation entre l'absorption d'acides gras d'origine animale, activateurs potentiels de PPAR γ , et le développement de cancers du côlon (Giovanucci *et al.*, 1994 ; Wasan *et al.*, 1997).

De plus, Wächtershauser *et al.*, (2000) ont montré le rôle de PPAR γ dans la régulation de la différenciation cellulaire de la lignée Caco-2.

Très récemment, un autre isotype de PPAR a été impliqué dans le développement de tumeurs colorectales : le PPAR δ (He *et al.*, 1999). Tout comme

PPAR γ , PPAR δ est fortement exprimé dans le côlon et peut-être activé par des acides gras provenant d'une alimentation riche en lipides.

Il semblerait ici encore que l'activité de PPAR δ , comme celle de PPAR γ , puisse conduire dans certains cas au développement de tumeurs (Park *et al.*, 2001). Il est intéressant à cet égard de noter que la surexpression de PPAR δ dans des lignées issues de cancers colorectaux humains inhibe l'apoptose induite par le sulindac (He *et al.*, 1999). On est donc en droit de penser que le développement d'antagonistes de PPAR γ et/ou de PPAR δ pourrait constituer une nouvelle approche pour la lutte contre de tels cancers. Cependant, Gupta *et al.*, (2000) pensent qu'il n'y a pas une évidence directe du rôle de PPAR δ dans la promotion ou l'inhibition de la cancérogenèse colique.

Si l'action majeure des PPAR dans le développement du cancer colique est confirmée, ils peuvent représenter un des liens moléculaires entre la nutrition et le risque de développement de certains cancers.

3.2.2) Les récepteurs de l'acide rétinoïque tout-trans: les RAR

3.2.2.1) Généralités

Dans la superfamille des récepteurs nucléaires on peut distinguer plusieurs classes de récepteurs. Ces classes sont elles-mêmes constituées par différents récepteurs (par exemple les récepteurs de l'acide rétinoïque) résultant de produits de gènes individuels (RAR α , RAR β et RAR γ) et des isoformes peuvent exister en cas d'épissage alternatif ou d'usage différentiel du promoteur (RAR β 1, RAR β 2, RAR β 3 et RAR β 4) (Chambon, 1996).

De nombreux travaux ont cherché à préciser la répartition spatio-temporelle des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque au cours du développement, dans l'espoir de pouvoir attribuer aux différentes isoformes des rôles particuliers (Lohnes *et al.*, 1994 ; Mendelsohn *et al.*, 1994). La distribution des différentes isoformes chez l'adulte est spécifique (revue dans Wan, 1993) : ainsi les transcrits du RAR α sont distribués dans l'ensemble des tissus, ceux de la forme β sont plutôt restreints au cerveau, foie, rein et poumons, tandis que ceux de la forme γ sont restreints à la peau et aux poumons.

Parmi les gènes possédant un élément de réponse aux RAR (RARE) dans leur promoteur, se trouvent les gènes de leurs propres récepteurs RAR α 2, β 2 et γ 2, des CRBPI, CRABP I et II, de l'alcool déshydrogénase (enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque), ainsi que des gènes codant pour des facteurs de transcription. Ainsi la présence d'un élément de réponse à l'acide rétinoïque dans le promoteur contrôlant l'expression des formes RAR β 2 et RAR β 4 permet une régulation positive de ces isoformes par l'acide rétinoïque (Leid *et al.*, 1992). Les effets des rétinoïdes s'exercent aussi sur l'expression de gènes essentiels impliqués dans les processus de croissance, de différenciation et d'homéostasie cellulaires. Par ailleurs les rétinoïdes inhibent le facteur AP-1 (Pfahl, 1993, Chen *et al.*, 1995) et réduisent ainsi la synthèse de métalloprotéases (par exemple les collagénases), de certaines cytokines et de certaines enzymes comme l'ornithine décarboxylase qui est surexprimée dans les cellules cancéreuses du côlon.

L'intérêt particulier de l'étude du gène RAR β tient à ce que le produit de ce gène constitue un des médiateurs des effets qu'exercent les rétinoïdes sur les cellules normales et néoplasiques (Houle et Bradley, 1993). Il est aujourd'hui admis que RAR β joue un rôle majeur dans les processus de différenciation et de prolifération cellulaires.

Li *et al.*, (1995) ont montré que RAR β était un régulateur négatif de la croissance des cellules épithéliales de sein humaines. De plus, l'acide rétinoïque *tout-trans* (par l'intermédiaire de RAR β) et ses dérivés présentent une activité antimétastatique sur la croissance de six lignées de cellules métastatiques humaines issues du pancréas (Jimi *et al.*, 1998).

3.2.2.2) Rôle des RAR dans le développement du cancer du côlon

Dans le tableau VI sont rapportés les principaux travaux effectués sur des lignées cellulaires de côlon murin ou humain, montrant l'influence des rétinoïdes sur la prolifération de ces cellules.

La plupart de ces études montrent une action antiproliférative des rétinoïdes sur différentes lignées coliques. D'une part, Stewart et Thomas (1997) démontrent que lorsque les lignées cellulaires MC-26 et LoVo prolifèrent en présence de rétinoïdes, l'action de ceux-ci passent par les isoformes α et γ du RAR. RAR β n'aurait alors aucun rôle.

Tableau VI: Travaux récents montrant l'action des rétinoïdes sur des lignées cellulaires coliques.

Rétinoïdes	Type cellulaire	Concentrations	Durée de traitement	Croissance cellulaire	Références
AR 9-cis	HT-29 Caco-2	10^{-9} à 10^{-7} M	4 jours		Kane <i>et al.</i> , 1996
AR tt AR 9-cis	Caco-2	10^{-8} M	3 jours		McCormack <i>et al.</i> , 1996
AR tt AR 9-cis	MC-26	10^{-10} à 10^{-7} M	4 jours	 	Stewart et Thomas, 1997
AR tt AR 9-cis	LoVo	10^{-10} à 10^{-7} M	4 jours	 	
α et β Carotène Canthaxanthine AR tt	DLD-1 Colo 320 DM	10^{-5} M	4 jours		Onogi <i>et al.</i> , 1998
AR tt 13-cis AR	HT-29	10^{-6} M	10 jours		Nicke <i>et al.</i> , 1999
AR tt	LoVo	10^{-10} à 10^{-6} M	10 jours		
AR tt AR 9-cis	DLD-1 HT-29 WiDr HCT-15 Colo 201 et 205	10^{-8} à 10^{-6} M	9 jours	Résistance aux rétinoïdes 	Lee <i>et al.</i> , 2000

Légende : Homme ; murin ; AR tt : acide rétinoïque *tout-trans*

D'autre part, bien que les lignées cellulaires HT-29 et LoVo expriment le même profil de récepteurs nucléaires des acides rétinoïques ($RAR_{\alpha,\beta,\gamma}$ et RXR_{α} et β), LoVo montre une résistance aux rétinoïdes (Nicke *et al.*, 1999). A l'opposé, Onogi *et al.*, (1998) montrent que l'induction des rétinoïdes (acide rétinoïque) passe par le RAR_{β} .

Enfin, Côté *et al.*, (1998) montrent sur des biopsies de tumeurs coliques humaines ainsi que sur la lignée DLD-1 que la méthylation du promoteur de RAR_{β} et plus particulièrement de $RAR_{\beta 2}$, est inversement corrélée avec son expression. La perte

d'expression de RAR β , gène suppresseur de tumeur contribue au développement tumoral.

Ces différents arguments font que nous avons privilégié l'étude de l'isoforme RAR β dans ce travail de thèse.

3.2.3) Formation des hétérodimères avec RXR

Les RXR ont été découverts au début des années 90 en tant que cofacteurs augmentant l'affinité des récepteurs de type RAR pour l'ADN (Kastner *et al.*, 1997). Cependant, leur dimension ne se limite pas aux RAR car ils stimulent également la fixation et l'activité transcriptionnelle de plusieurs autres classes de récepteurs nucléaires, comme ceux de la vitamine D3 (VDR), des hormones thyroïdiennes (TH) ou encore des récepteurs de prolifération et d'activation des peroxysomes (PPAR) ainsi que d'autres récepteurs orphelins (revue générale de Mangelsdorf *et al.*, 1995). Bien que structurellement comparables aux récepteurs dits stéroïdiens, ces récepteurs ont des mécanismes d'action et de régulation sensiblement différents.

Chez les vertébrés, il existe trois isoformes de RXR, nommées α , β et γ (Leid *et al.*, 1992 ; Mangelsdorf *et al.*, 1992). De façon inattendue, la formation de certains hétérodimères comme RXR/TR et RXR/RAR, empêche l'acide rétinoïque 9-*cis* de se fixer au RXR (Kurokawa *et al.*, 1994 ; Forman *et al.*, 1995). Ceci montre que dans ces cas là, la présence du ligand n'est pas indispensable à l'hétérodimérisation du RXR. Le RXR serait alors une sorte de partenaire silencieux. Néanmoins, dans certains cas, le RXR peut être un partenaire actif. Un des meilleurs exemples est celui de l'hétérodimère RXR/PPAR : les deux partenaires de cet hétérodimère sont activables de manière indépendante et répondent de manière synergique lorsqu'ils sont tous les deux activés par leur ligand respectif (Kliwer *et al.*, 1992). Ainsi les acides gras pourraient réguler la protéine CRBP II (Cellular Retinol Binding Protein II) par l'intermédiaire du complexe PPAR α /RXR dans le jéjunum car CRBP II possède un RXRE. On observe donc une augmentation de l'expression des ARNm de CRBP II chez des animaux nourris avec un régime hyperlipidique (Suzuki *et al.*, 1998 ; Suruga *et al.*, 1999 (a)).

Le RXR est donc indispensable à l'hétérodimérisation de plusieurs récepteurs nucléaires et est ainsi capable de moduler les réponses hormonales.

3.2.4) Gènes cibles dans le côlon

Les gènes cibles régulés par les PPAR et les RAR sont très peu connus dans le côlon.

Il n'est pas encore clairement établi que l'expression des protéines appartenant au processus de cancérogenèse colique soit directement contrôlée par l'un de ces récepteurs nucléaires. En revanche, il a été montré différentes corrélations entre l'expression de certaines protéines et celle de récepteurs nucléaires. Ainsi, deux protéines considérées comme des marqueurs précoces de la cancérogenèse sont aussi « régulées » par ces récepteurs nucléaires : c'est le cas de la cyclooxygénase-2 et de la β -caténine.

3.2.4.1) Les cyclooxygénases

Les cyclooxygénases (COX) sont des glycoprotéines membranaires responsables de la synthèse de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (Smith et Marnett, 1991, Goppelt-Struebe, 1995 ; Subbaramaiah *et al.*, 1997). Ils existe deux isoformes de COX, très proches de par leur structure et leurs activités métaboliques : COX-1 ou forme constitutive et COX-2 ou forme inductible. Ces deux formes présentent une homologie de séquence en acides aminés de 67%. Elles produisent les même types de prostaglandines (Kosaka *et al.*, 1994 ; Kurumbail *et al.*, 1996 ; Luong *et al.*, 1996 ; Jouzeau *et al.*, 1997 ; DuBois *et al.*, 1998 (a)). Elles se distinguent surtout par leur profil d'expression tissulaire et leur régulation. Le tableau VII résume les similitudes et différences entre les gènes de COX-1 et COX-2 humaines ainsi que leurs produits (Eschwège *et al.*, 2001).

L'expression de COX-2 est absente ou faible dans la plupart des épithéliums humains normaux. COX-2 est souvent exprimée dans les cellules néoplasiques, provenant de lignées cellulaires, ou de tissus tumoraux animaux ou humains. Cette isoforme semble donc jouer un rôle important dans le développement des lésions cancéreuses et dans le processus invasif. L'expression de COX-2 semble même être corrélée à l'agressivité tumorale dans le cancer du côlon (Tsuji *et al.*, 1997). Une augmentation de l'expression de COX-2 serait associée au développement d'adéno-carcinome, probablement avec acquisition d'un phénotype invasif et métastatique dans le côlon (Hida *et al.*, 1998).

Tableau VII : Les deux isoformes de cyclooxygénases : similitudes et différences

	Cyclooxygénase-1	Cyclooxygénase-2
Forme	Constitutive	Inductible
Localisation	Ubiquiste	Reins (macula densa, anse de Henlé), sites inflammatoires, cancers épithéliaux
Site catalytique	Isoleucine	Valine
Localisation du gène	Chromosome 9	Chromosome 1
Composition du gène	11 exons – 10 introns	10 exons – 9 introns
Taille du gène	22 kilobases	8,3 kilobases
Taille de l'ARNm	2,8 kilobases	4,5 kilobases
Masse de la protéine	72 kDa	72 – 74 kDa
Nombre de bande électrophorétique	1	2
Particularité de l'ARNm	/	17 copies de séquences AUUUA, boîte TATA
Homologie entre		
-COX d'espèces différentes	90%	90%
-COX de même espèce	60%	60%
Localisation cellulaire	Réticulum endoplasmique	Réticulum endoplasmique + membrane nucléaire
Expression tissulaire	-Plaquettes -Estomac -Rein -Cellules endothéliales	-Monocytes -Cellules synoviales -Cellules tumorales -Fibroblastes
Régulation	Constitutive (x 2 à 4)	Inductible (X 100)

Certains effets des aliments sur la régulation transcriptionnelle de COX-2 contribueraient au développement de tumeur dans le côlon (Glinghammar et Rafter, 2001). Les acides gras induisent l'expression de COX-2 dans les cellules épithéliales mammaires (Meade *et al.*, 1999).

a) PPAR et COX-2

Dans différents modèles animaux, il a été mis en évidence que le développement du cancer colorectal est influencé par les prostaglandines, un des ligands naturels de PPAR γ . La diminution de la production de prostaglandines observée chez les souris, pour lesquelles le gène de COX-2 a été modifié ainsi que chez les animaux et humains traités avec des inhibiteurs de COX, prévient ou

atténue le développement de cancer colique (Thun *et al.*, 1991 ; Jacoby *et al.*, 1996 ; Oshima *et al.*, 1996). Ces dernières études suggèrent donc que le rôle potentiel de la cyclooxygénase COX-2 et des PG dans la genèse des cancers du côlon pourrait être médié indirectement par l'activation de PPAR γ . Au contraire, Bishop-Bailey et Hla (1999) montrent que la 15 δ PGJ₂ induit l'apoptose des cellules endothéliales via le PPAR γ .

Lefebvre *et al.*, (1998) observent que l'activation de PPAR γ n'induit pas une augmentation d'expression de COX-2 dans la lignée HT-29.

Par ailleurs, plus récemment, Roy *et al.*, (2001) observent une surexpression de PPAR δ et de COX-2 dans le côlon de rats chimio-induits par l'AOM. L'expression de PPAR δ dans la phase de promotion tout comme l'expression de la cyclooxygénase-2 augmente de façon conséquente durant les différentes étapes de la cancérogenèse. Parce que la cyclooxygénase-2 et PPAR δ sont surexprimés, localisés sur le même site tumoral dans le côlon et parce que les cyclooxygénases génèrent les prostaglandines PGI₂ qui activent PPAR δ , la cyclooxygénases-2 pourrait jouer un rôle important dans la modulation du processus à travers l'activation de ce récepteur.

b) Rétinoïdes et COX-2

L'acide 9-*cis* rétinoïque inhibe la croissance cellulaire d'une lignée épithéliale de la peau et supprime l'expression de COX-2 ainsi que la biosynthèse de PGE₂ (Kanekura *et al.*, 2000).

Par ailleurs, Merritt *et al.*, (2001) ont montré que l'action d'un rétinoïde (le fenrétinide(N-(4-hydroxyphényl)rétinamide, 4-HPR) inhibe la croissance des cellules HT-29 et diminue l'expression de COX-2.

Ces résultats récents suggèrent qu'il existe une corrélation entre l'expression de COX-2 et les rétinoïdes.

3.2.4.2) La β -caténine

Il est maintenant établi que la principale conséquence physiologique des mutations inactivatrices du gène APC est l'accumulation dans le cytosol et le noyau de β -caténine, un régulateur transcriptionnel de la voie de signalisation relayée par les facteurs Wnt .

Cette voie de signalisation joue un rôle très important au cours du développement embryonnaire et contrôle, chez l'adulte, la prolifération cellulaire dans certains tissus. Elle comprend plusieurs étapes qui peuvent être résumées ainsi : en l'absence de signal Wnt, la β -caténine est phosphorylée par la kinase GSK3 β au sein d'un complexe multimérique qui comprend plusieurs partenaires dont la protéine APC et l'axine (ou une protéine apparentée). La β -caténine est alors ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. En présence d'un signal Wnt, la kinase GSK3 β est inhibée, la β -caténine non étiquetée pour la dégradation va s'accumuler dans le cytoplasme, migrer avec des partenaires de transcription appartenant à la famille LEF-TCF (*-T cell factor*) contrôler la transcription de gènes cibles impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Cadigan et Nusse, 1997).

Il faut savoir que la β -caténine n'exerce pas seulement un rôle de signalisation mais également un rôle dans l'adhérence cellulaire en étant le relais entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine au niveau des plaques d'adhérence. Ainsi, la β -caténine est présente sous deux formes, cytoplasmique impliquée dans la signalisation, et sous-membranaires à fonction structurale. Des mutations de différents partenaires de la voie de signalisation relayée par la β -caténine, mutations inactivatrices des gènes APC et axine, mutations activatrices du gène de la β -caténine, sont responsables d'un grand nombre de tumeurs chez l'Homme, toutes ces mutations induisent une activation constitutive de cette voie engendrant alors une prolifération cellulaire incontrôlée (Polakis, 2000).

a) PPAR et β -caténine

Les événements moléculaires impliqués dans le développement des tumeurs coliques et secondaires à l'activation de PPAR γ ne sont pas entièrement connus mais pourraient impliquer au moins en partie la β -caténine dont les concentrations sont augmentées dans le côlon de souris C57BL/6J-APC^{Min/+} ainsi que dans les cellules de carcinome colique HT-29 (Lefebvre *et al.*, 1998).

Parmi les gènes cibles des complexes β -caténine/Tcf-4 se trouve PPAR δ . He *et al.* (1999) ont montré que l'expression de PPAR δ était induite par le complexe β -caténine/Tcf-4, l'activité de ce complexe étant elle-même inhibée par l'expression de la protéine APC. He *et al.*, (1999) avancent l'hypothèse que le traitement que reçoivent certains patients atteints de cancer colorectal, traitement qui consiste en l'administration d'AINS tels que le sulindac, contrecarre l'action des complexes β -

caténine/Tcf-4 en inhibant, entre autres, la fixation de PPAR δ sur ses éléments de réponse, bloquant ainsi une des cascades transcriptionnelles induites de manière inappropriée par ce complexe. Ces travaux apportent une nouvelle lumière sur la relation qu'entretiennent la β -caténine et les PPAR.

b) Rétinoïdes et β -caténine

Vermeulen *et al.* (1995) montrent que l'adhésion cellulaire, qui implique la β -caténine cytoplasmique, est favorisée par l'effet différenciateur de l'acide 9-*cis* rétinoïque sur les cellules épithéliales. Il semble y avoir en effet une interaction entre la β -caténine et l'acide 9-*cis* rétinoïque puisque Byers *et al.*, (1996) ont montré que le taux protéique de la β -caténine est élevé dans des cellules de cancer du sein traitées par l'acide 9-*cis* rétinoïque mais il n'y a pas de changement dans l'expression des ARNm. Ces résultats sont dépendants de la concentration en ions calciques dans la cellule.

Dans les cellules coliques, selon Easwaran *et al.*, (1999), il y aurait un effet direct de l'acide rétinoïque *tout-trans* (RAR) sur la transactivation du complexe β -caténine-LEF/TCF.

Par ailleurs, la modulation de l'expression de la β -caténine, tout comme celle de l'activité de COX-2 est associée avec une inhibition de la croissance tumorale dans le côlon chez des souris C57BL/6J-APC^{Min/+} (Rao *et al.*, 2000).

C) Présentation du sujet de recherche

Des études épidémiologiques récentes, réalisées sur des populations de pays industrialisés, suggèrent que des apports excessifs en lipides pourraient être impliqués dans l'augmentation de la prévalence des cancers colorectaux. Parmi les hypothèses avancées pour élucider ces phénomènes, certaines envisagent l'intervention des récepteurs nucléaires car ils constituent l'un des relais de l'action des nutriments sur l'expression génique. Dans ce domaine l'action des acides gras, via leurs récepteurs nucléaires (PPARs), est évidemment privilégiée mais le rôle des rétinoïdes est aussi envisagé.

Notre travail s'inscrit dans ce courant de recherche et notre hypothèse suggère qu'un apport alimentaire excessif en lipides s'accompagne d'une modification du profil d'expression des récepteurs nucléaires (RAR, RXR, PPAR) qui contribuerait, via

une modification de l'expression génique, à augmenter les risques de cancérogenèse colique.

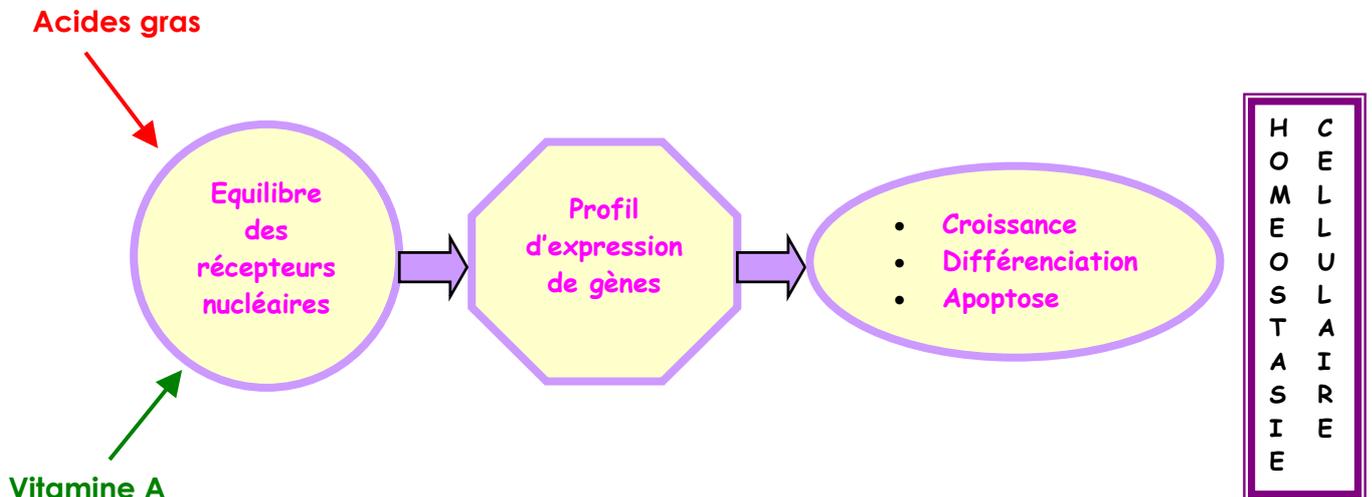


Figure 7 : Cadre théorique de l'hypothèse de travail.

Pour éprouver cette hypothèse, nous avons adopté deux approches:

- une approche *in vivo* réalisée chez des rats soumis à des régimes alimentaires riches en lipides, supplémentés ou non en vitamine A. Dans chaque série expérimentale, un groupe d'animaux a été traité par un inducteur de la cancérogenèse colique : la 1,2-diméthylhydrazine (DMH). Notre objectif est de corréler la modification du profil d'expression des récepteurs nucléaires aux modifications phénotypiques néoplasiques et d'étudier des marqueurs précoces de la cancérogenèse colique tels que les cyclooxygénases et la β -caténine,
- une approche *in vitro* réalisée sur des cultures de cellules épithéliales intestinales de rat (IEC-6) et sur des lignées cellulaires coliques (PROb), qui vise à étudier les effets des acides gras et/ou de l'acide rétinoïque sur la prolifération cellulaire.

La méthodologie utilisée lors de ce travail est présentée dans le chapitre II. Les résultats obtenus sont rapportés et discutés dans le chapitre III. Enfin, dans la discussion générale, nous avons évoqué les liens entre la consommation excessive et

prolongée de lipides, des modifications de l'action cellulaire de la vitamine A et le risque du cancer colique.

Chapitre II

Matériel et Méthodes

A) Modèles expérimentaux

1) Les animaux

Les expériences réalisées avec le régime dit cafétéria, ont été effectuées sur 16 rats mâles de la lignée Wistar (IFFA CREDO) à l'âge de 5 semaines dont le poids moyen initial est d'environ 150-200 g.

Les expériences de cancérogenèse chimio-induite ont été réalisées sur 104 rats mâles de la lignée Fisher-344 (HARLAN) à l'âge de 4 semaines dont le poids moyen initial est d'environ 40-60 g. Les rats Fisher-344 sont sensibles à la cancérogenèse colique chimiquement induite.

Les animaux ont été élevés dans une animalerie maintenue à 22-24°C, soumise à l'alternance de 12 heures de jour et 12 heures de nuit conformément aux normes européennes. Après une semaine d'acclimatation pendant laquelle ils sont nourris avec un régime semi-synthétique de croissance, les rats sont répartis par cage de deux. Ils ont un accès libre à l'eau et à la nourriture renouvelées quotidiennement et sont pesés tous les deux jours. Quel que soit le protocole, la nourriture est pesée précisément chaque jour, ainsi que les aliments non consommés de la veille, afin de connaître la quantité d'énergie ingérée par les rats.

A la fin de chaque période expérimentale, les animaux sont sacrifiés par décapitation. Les côlons sont ensuite prélevés et préparés afin de dénombrer les foyers de cryptes aberrantes ou d'extraire les ARN_{totaux} et les protéines. Les échantillons sont stockés à -80°C.

2) Les régimes

Deux régimes ont été mis en place : le régime dit cafétéria qui induit une prise de poids et dont la source de lipides provient d'aliments variés et un régime dit hyperlipidique dont la source de lipides est une huile. Ces deux régimes permettent d'étudier l'effet de la quantité et de la qualité des lipides consommés.

2.1) Le régime cafétéria

Le régime cafétéria est un régime hyperlipidique dont 45% des lipides totaux sont des acides gras saturés et 12% des acides gras polyinsaturés (Berraondo *et al.*, 2000).

Les constituants du régime cafétéria ont été choisis afin de mimer les comportements alimentaires observés chez l'Homme. Ils correspondent à des aliments variés : chocolat, chips, pâté, biscuit, lardons, aliment standard.

Chaque aliment est donné à raison de 5 g/rat/jour, sauf pour le pâté (10 g/rat/jour). Au total, 35 g de nourriture/rat/jour/ ont été proposés, aussi bien pour le régime cafétéria que pour le régime standard, donné sous la forme classique de bouchons (A04 , UAR).

2.2) Le régime hyperlipidique

Les régimes sont préparés au laboratoire par addition d'huile de carthame (Province Régime) selon les quantités souhaitées (25% : régime hyperlipidique et 5% : régime témoin) à une poudre alipidique (Atelier de Préparation des Aliments expérimentaux de l'INRA, Jouy en Josas) dont les ingrédients figurent dans le tableau I. L'huile de Carthame a été choisie car elle contient 80% d'acides gras polyinsaturés composés essentiellement d'acide linoléique, acide gras polyinsaturé de la série n-6, tandis que les acides gras polyinsaturés de la série n-3 sont présents sous forme de traces (tableau II) (Bonilla *et al.*, 2000).

Afin de minimiser les risques d'oxydation de l'huile au contact de l'air, celle-ci est conservée sous azote, à l'abri de la lumière, à 4°C. Les régimes sont préparés tous les deux jours et placés au réfrigérateur. Un régime hyperlipidique sera supplémenté en vitamine A à raison de 200 UI de palmitate de rétinol/g de régime.

L'apport quantitatif en carbohydrates a été choisi afin que les régimes, témoin ou hyperlipidiques, soient isocaloriques. Il est à noter que la littérature décrit les effets des régimes hyperlipidiques comme étant indépendant de la quantité et de la nature des carbohydrates employés dans leur composition.

Tableau I : Composition des régimes alimentaires (g/kg de poids sec).

Régimes	Régime à 5% de lipides	Régime à 25% de lipides	Régime à 25% de lipides + Vit A
Caséines	180	180	180
Huile de Carthame	50	250	250
Amidon de maïs	703	503	503
Cellulose	19	19	19
Complément minéral n°102 ¹	38	38	38
Complément vitaminique n°102 ¹	10	10	10
Palmitate de rétinol (UI)	5	5	200

¹composition selon les recommandations de Potier de Courcy *et al.*, 1989.

Tableau II: Composition en acides gras des différents régimes alimentaires (g/kg de poids sec).

	5% d'huile de Carthame	25% d'huile de Carthame	Témoins A04	Cafétéria
C12 :0	-	-	-	-
C14 :0	0,05	0,27	3,50	12,40
C16 :0	3,52	17,60	14,10	173,00
C18 :0	1,42	7,15	2,50	83,20
AG saturés totaux	4,99	25,02	20,10	268,60
C16:1(n-7)	-	-	0,20	9,10
C18:1(n-9)	5,00	24,95	13,10	223,6
C20:1(n-9)	-	-	0,30	3,30
AGMI totaux	5,00	24,95	13,60	336,00
C18:2(n-6)	38,85	194,25	39,80	98,80
C18:3(n-3)	0,05	0,25	2,70	6,50
Autres*	1,14	5,08	3,80	40

*Les autres acides gras comprennent les acides gras à chaîne carbonée inférieure à 12 ou supérieure à 18 atomes de carbone.

(-) : acides gras non détectés

(AG : acides gras, AGMI : acides gras monoinsaturés, AGPI : acides gras polyinsaturés)

3) Protocoles expérimentaux

3.1) Un mois de régime

Après acclimatation, 8 rats sont soumis au régime cafétéria : groupe des rats « obèses », 8 rats sont nourris avec un régime standard : lot de référence, 4 rats sont nourris avec le régime hyperlipidique et 4 rats, avec un régime témoin à 5% de lipides pendant un mois (figure 1).

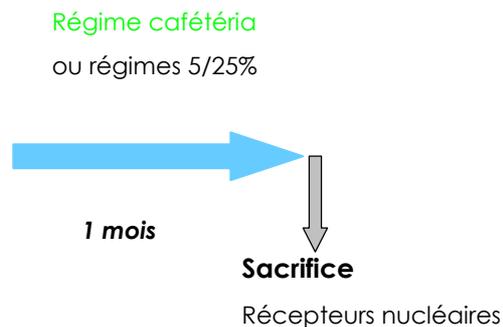


Figure 1: Schéma du protocole expérimental

3.2) Protocoles de cancérogenèse colique chimio-induite (DMH)

3.2.1) Principe

La 1,2-diméthylhydrazine (DMH) est une substance cancérogène fréquemment utilisée pour l'induction de lésions prénéoplasiques au niveau du côlon. La DMH est un cancérogène indirect qui nécessite une activation métabolique.

La DMH est activée par les monooxygénases hépatiques de fonctionnalisation, en méthylazoxyméthanol (MAM). Le MAM est alors conjugué à l'acide glucuronique par des enzymes de conjugaison. Ce complexe hydrophile est excrété vers le côlon via la voie des acides biliaires. Il peut alors être déconjugué grâce à la β -glucuronidase bactérienne, libérant ainsi le MAM qui se transforme spontanément en ion diazonium réabsorbé par les colonocytes. C'est l'ion diazonium, cancérogène ultime, qui agit sur le génome des cellules coliques et provoque ainsi le processus de cancérisation (Fiala, 1977).

3.2.2) Trois mois de régime

Deux doses de DMH (50 et 15 mg/kg) ont été testées afin d'évaluer l'amplitude de réponse des acides gras sur le développement des lésions néoplasiques par rapport à la concentration en DMH.

36 animaux sont séparés en deux lots : 18 reçoivent le régime témoin et 18 le régime hyperlipidique. Après un mois de régime, chaque lot est séparé en deux groupes. 12 animaux reçoivent une injection intra-péritonéale de 1,2-diméthylhydrazine (DMH) à 15 mg/kg diluée dans une solution de NaCl à 0,9% (6 rats) ou deux injections intra-péritonéales (à trois jours d'intervalle) de DMH à 25 mg/kg (6 rats). 6 rats, non induits, de chaque groupe servent de témoins et reçoivent une injection de solution de NaCl.

Après 2 mois de traitements, les animaux sont sacrifiés afin de dénombrer les foyers de cryptes aberrantes (FCA) induits (figure 2).

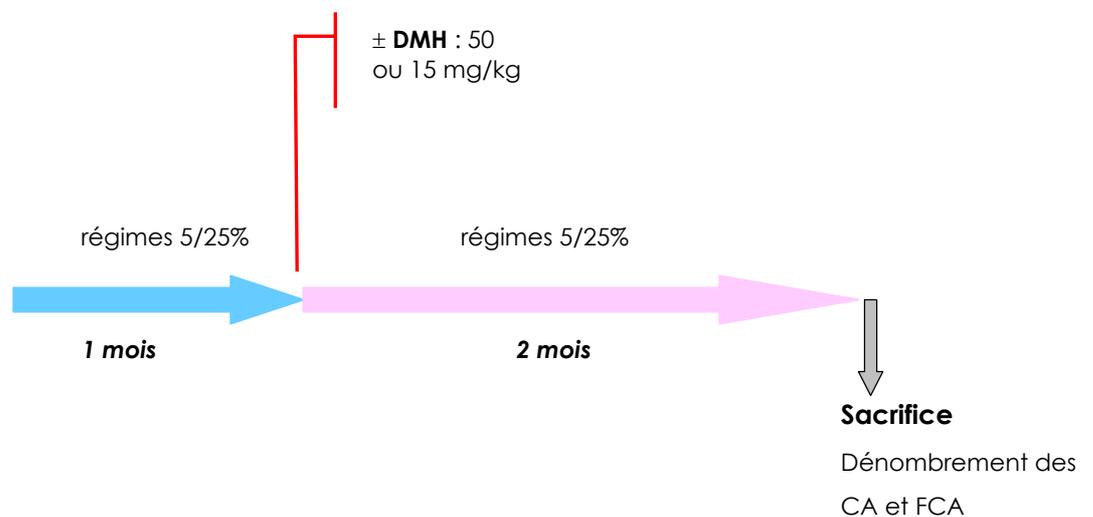


Figure 2: Schéma du protocole expérimental de cancérogenèse chimio-induite pendant 3 mois de régime

3.2.3) Cinq mois de régime hyperlipidique

60 animaux sont répartis en trois lots : 22 reçoivent un régime témoin (5% de lipides), 22 un régime hyperlipidique (25% de lipides), 16 un régime à 25% de lipides supplémenté en vitamine A (200 UI de palmitate de rétinol /g de régime).

Après un mois de régime, chacun des lots, témoins et hyperlipidiques, est séparé en deux groupes : 16 animaux reçoivent une injection intra-péritonéale de DMH à 15 mg/kg diluée dans une solution de NaCl à 0,9%. Les 6 animaux restant reçoivent une injection de la solution de NaCl et servent de témoins.

Les 16 rats recevant un régime hyperlipidique supplémenté en vitamine A sont induits à la DMH.

Tous les animaux sont sacrifiés, après 5 mois de régime, afin de dénombrer les foyers de cryptes aberrantes et d'élaborer un profil d'expression des récepteurs nucléaires et de marqueurs précoces de cancérogenèse colique (figure 3).

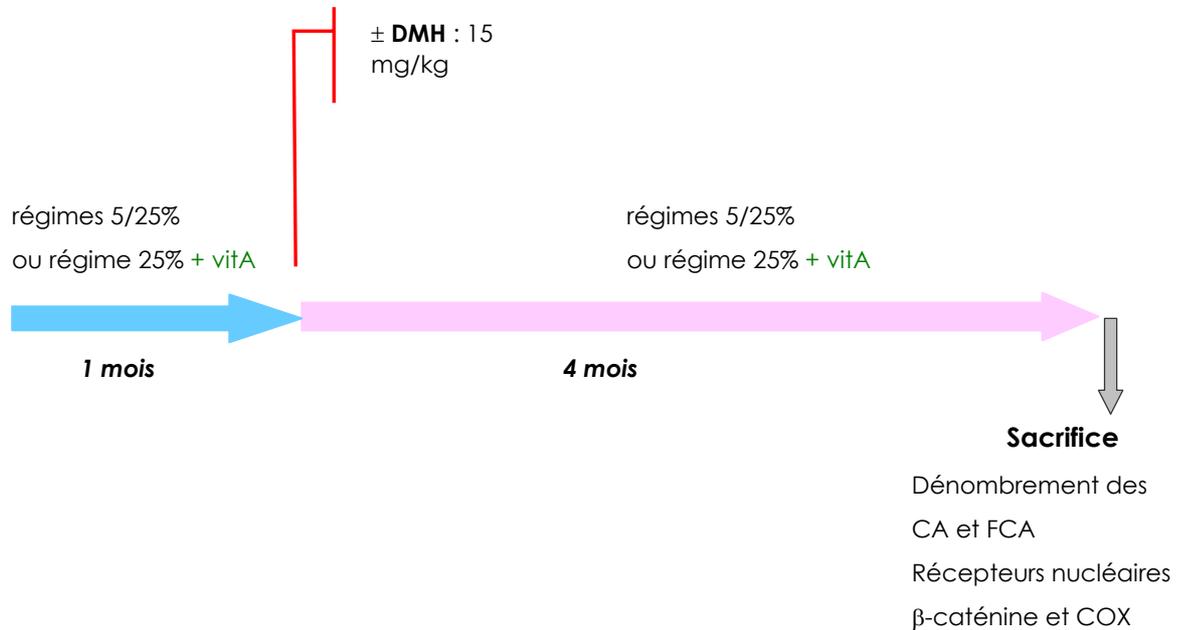


Figure 3: Schéma du protocole expérimental de cancérogenèse chimio-induite pendant 5 mois de régime

B) Etude des lésions préneoplasiques par la technique de Bird (1987)

Avant le sacrifice, les animaux sont codés. Les codes ne sont révélés qu'à la fin de la lecture de tous les côlons. Cette méthode de lecture « en aveugle » est utilisée afin que l'identification et le dénombrement des foyers de cryptes aberrantes (FCA) puissent s'opérer de la manière la plus objective possible.

Immédiatement après le sacrifice, les côlons sont prélevés, rincés avec une solution de NaCl, 0,9%, coupés en quatre à cinq morceaux égaux, ouverts longitudinalement et aplatis entre deux papiers filtre avant d'être fixés dans un tampon phosphate 50 mM (pH 7,4) contenant 10% de formol. Les côlons sont maintenus dans ce fixateur pendant au moins 24 heures, puis colorés au bleu de méthylène (2%) et observés au microscope optique (×40) (Figure 4).

Les cryptes aberrantes se distinguent des cryptes normales par :

- une coloration bleu intense
- une taille généralement deux à trois fois supérieure
- une forme allongée
- une ligne épithéliale plus épaisse
- une zone péricryptale supérieure à celle séparant deux cryptes normales, (Mc Lellan *et al.*, 1991)

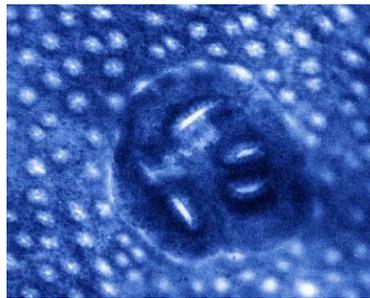


Figure 4: Photographie de FCA colique (G : x40).

C) Quantification des ARNm par la méthode de transcription inverse et d'amplification enzymatique en chaîne (RT-PCR) semi-quantitative traditionnelle et en temps réel.

Nous avons utilisé une technique de RT-PCR semi-quantitative traditionnelle pour quantifier les ARNm des récepteurs nucléaires RXR α et PPAR γ chez les rats ayant consommé les régimes cafétéria et hyperlipidique pendant un mois, et la technique de PCR semi-quantitative en temps réel pour quantifier i) les ARNm des récepteurs nucléaires RXR α , RAR β et PPAR γ , ii) des cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) chez les animaux ayant consommé le régime hyperlipidique pendant 5 mois et sur la lignée cellulaire PROb.

1) Principe de la RT-PCR

L'amplification enzymatique en chaîne ou « Polymerase Chain Reaction » (PCR) est une méthode *in vitro* permettant d'amplifier un fragment spécifique d'ADN en utilisant l'activité catalytique d'une polymérase thermorésistante : la « Taq DNA polymerase », purifiée à partir de la bactérie thermophile *Thermophilus aquaticus* (Chien *et al.*, 1976 ; Saiki *et al.*, 1988).

Pour amplifier les ARNm par la technique de PCR, il faut au préalable réaliser une transcription inverse de ces ARN en ADN complémentaire (ADNc). Cette étape est réalisée par la transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney (M-MLV), qui synthétise l'ADNc à partir d'une amorce complémentaire d'une séquence localisée en 3' (en aval) de la partie à amplifier. Pour réaliser la PCR, une seconde amorce, équivalente à la séquence de l'ARN est ajoutée et la « Taq polymérase » synthétise le second brin entre les amorces puis effectue l'amplification.

La quantité d'ARN des récepteurs nucléaires (RAR β , RXR α et PPAR γ) et des cyclooxygénases dans la muqueuse colique n'est pas connue en valeur absolue, leur proportion est déterminée par rapport à un étalon interne, l'ARNm de la β -actine, simultanément transcrit en ADNc et amplifié dans le milieu réactionnel de l'ARNm à quantifier (RT-PCR semi-quantitative traditionnelle). Le gène de la GAPDH est utilisé comme gène de référence pour la quantification par PCR en temps réel. La β -actine a été choisie comme étalon pour sa stabilité dans l'organisme, quelles que soient les conditions expérimentales. En effet, le gène de la β -actine est transcrit chez l'animal indépendamment des conditions nutritionnelles (Ma *et al.*, 1990) et, en particulier, de l'apport lipidique du régime (Clarke et Jump, 1994 ; Poirier *et al.*, 1997). Il en est de même pour le gène de la GAPDH (Medhurts *et al.*, 2000).

2) Amorces oligonucléotidiques

Les oligonucléotides ont été synthétisés par la société Genset (Paris). Afin de vérifier la spécificité de ces amorces, les fragments de PCR ainsi amplifiés ont été séquencés au laboratoire de biochimie de l'hôpital Pellegrin par la technique de terminaison de chaîne (kit ABI Prism) sur un séquenceur Perkin Elmer 377 DNA Sequencer. Les résultats du séquençage montrent que les techniques que nous utilisons permettent d'amplifier spécifiquement les ARNm de : β -actine, GAPDH, RAR β , RXR α , PPAR γ , COX-1 et COX-2 de rat.

De plus, pour les gènes GAPDH et RAR β , il a fallu choisir des couples d'amorces compatibles avec l'utilisation de sondes TaqMan spécifiques.

Les amorces oligonucléotidiques et la taille des fragments amplifiés sont rapportées dans les tableaux III et IV.

Tableau III: Séquences des amorces oligonucléotidiques et taille des fragments.

amorces	séquences 5' → 3'	sites complémentaires	taille des fragments amplifiés
β-actine*	amont AGGATGCAGAAGGAGATTACTGCC	2814-2837	222 pb
	aval GTAAAACGCAGCTTCAGTAACAGTCC	3159-3135	
PPAR_γ**	amont CCCTTTGGTGACTTTATGGAGC	1078-1099	146 pb
	aval CCTCGATGGGCTTCACGTTCA	1225-1204	
GAPDH***	amont GAACATCATCCCTGCATCCA	1455-1474	78 pb
	aval CCAGTGAGCTTCCCGTTCA	1532-1514	
RXR_α#	amont GCTGGTGTCGAAGATGCGTGAC	1238-1259	171 pb
	aval GGGTACTTGTGTTTGCAGTACG	1388-1367	
COX-1 ##	amont GCACAACACTTCACCCACCAG	662-682	149 pb
	aval CCCATCCTGAAGAGCCGCAG	808-788	
COX-2 ##	amont GCAAAGGCCTCCATTGACCAGAG	1424-1446	175 pb
	aval CGGGATACAGTCCATGGCATCG	1576-1598	

* déterminée à partir de la séquence du gène de la β-actine de rat (Nudel *et al.*, 1983)

** déterminée à partir de la séquence de l'ADNc de PPAR_γ de rat (Miyakita *et al.*, 1998)

***déterminée à partir de la séquence de l'ADNc de GAPDH de rat (Medhurst *et al.*, 2000)

déterminée à partir de la séquence de l'ADNc de RXR_α de rat (Gearing *et al.*, 1993)

déterminées à partir des séquences de l'ARNm de COX-1 et COX-2 (Feng *et al.* 1993).

Tableau IV: Séquences des amorces oligonucléotidiques, sondes TaqMan et taille des fragments.

amorces	séquences 5' → 3'	sites complémentaires	taille des fragments amplifiés	Tm
GAPDH *	amont GAACATCATCCCTGCATCCA	1455-1474	78 pb	59-61°C
	aval CCAGTGAGCTTCCCGTTCA	1514-1532		
Sonde	FAM-GCTGCCAAGGCTGTGGGCAAG-TAMRA	1480-1500		66-68°C
RARβ **	amont CTGGGCCTCTGGGACAAAT	642-661	67 pb	59°C
	aval TGGCGAACTCCACGATCTTAAT	688-709		
Sonde	FAM-CAGTGAGCTGGCCACCAAGTGCA-TAMRA	663-685		68°C

* déterminée à partir de la séquence de l'ADNc de GAPDH de rat (Medhurst *et al.*, 2000)

** déterminée grâce au logiciel Primer Express (version 1, PE Applied Biosystem) (Zelent *et al.*, 1989).

FAM : 6-carboxy-fluorescéine

TAMRA : 6-carboxy-tétraméthyl-rhodamine

Tm : Température de fusion

3) Mise en œuvre de la méthode

Les différentes étapes de biologie moléculaire sont délicates en raison de l'action possible de RNases pouvant provenir des prélèvements d'organes, de l'expérimentateur ou de l'environnement. Pour cela, la préparation des échantillons doit être effectuée à 4°C. Le port de gants est indispensable, ainsi que l'utilisation de vaisselle et de tampons stériles. Le matériel utilisé est traité avec une solution aqueuse de DEPC (0,1%) (diéthyl pyrocarbonate ; Sigma).

3.1) Extraction des ARN totaux

3.1.1) Dans la muqueuse colique

3.1.1.1) Prélèvement de la muqueuse colique

La muqueuse colique, très riche en RNases, est rapidement prélevée après la mort de l'animal afin d'éviter, au maximum, la dégradation des ARNm. Sur une plaque de verre recouverte de papier aluminium et posée sur la glace, le côlon est ouvert longitudinalement. La muqueuse est grattée et séparée en deux parties aliquotes dans des tubes eppendorfs froids. Environ 300 mg d'échantillon sont

répartis dans chaque tube eppendorf et plongés dans l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C.

3.1.1.2) Extraction des ARN_{totaux}

L'extraction des ARN est réalisée à l'aide du kit SV Total RNA Isolation System (Promega) (méthode dérivée de Chomczynski et Sacchi (1987)), dont le protocole a été adapté pour la muqueuse colique. Les volumes des solutions de lyse, d'acétate de sodium et de phénol-chloroforme ont été multipliés par deux.

Les volumes des solutions correspondent aux quantités nécessaires pour un échantillon de 250 mg de muqueuse colique.

* Rappel des principales étapes *

Lyse des cellules : L'échantillon est décongelé dans 6 ml de solution de lyse (thiocyanate de guanidine (4 M) ; citrate de sodium (26 mM, pH 4,0) ; N-lauryl sarcosine (0,5%) et β -mercaptoéthanol (0,125 M)) et homogénéisé à l'aide d'un potter à 600 tours/min.

Extraction des ARN : 600 μ l d'acétate de sodium (2 M, pH 4,0) sont ajoutés, puis 6 ml de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (125/24/1) avant d'agiter pendant 10 secondes afin d'obtenir une émulsion qui sera laissée 15 minutes dans la glace. Après une centrifugation de 20 min à 12000 g, la phase aqueuse, est prélevée. La galette de protéines et la phase phénolique contenant les grands fragments d'ADN sont éliminées.

Précipitation des ARN : Un volume d'isopropanol, égal à la phase aqueuse prélevée, est ajouté puis le tube est placé à -20°C pendant au moins une heure. Après une centrifugation de 15 minutes à 4°C, à 12000 g, le culot est lavé avec 1,5 ml d'éthanol à 75%, centrifugé à nouveau à 4°C, 12000 g pendant 10 min, puis séché sous vide. Le culot d'ARN_{totaux} est remis en suspension dans 200 μ l d'eau Milli-Q stérile.

5 μ l sont prélevés afin de doser les ARN.

Les ARN_{totaux} répartis dans des tubes eppendorfs sont conservés dans l'acétate de sodium (0,1 volume) et l'isopropanol (1 volume) à -20°C.

Lors de l'utilisation, l'échantillon est centrifugé à 4°C, 12000 g pendant 10 min. Le culot est décollé, lavé dans 500 μ l d'éthanol à 75% et centrifugé dans les conditions précédentes puis séché sous vide. Le culot est repris dans le volume d'eau Milli-Q

nécessaire afin d'avoir une concentration finale en ARN de 5 µg/µl (RT-PCR, ³²P) ou 1 µg/µl (RT-PCR en temps réel). Les ARN peuvent également être conservés dans l'eau Milli-Q stérile et placés à -80°C.

Un dosage est effectué afin de vérifier cette concentration et de calculer le rendement de l'extraction. Pour un échantillon de muqueuse colique compris entre 200 et 300 mg, le rendement de l'extraction est de $2,86 \pm 1,12$ µg d'ARN_{total}/mg de tissu.

3.1.2) Dans les lignées cellulaires

L'extraction des ARN_{total} est réalisée à partir d'environ $8 \cdot 10^6$ cellules à l'aide du kit SV Total RNA Isolation System (PROMEGA) (dérivé de la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987)) selon les indications données par le fabricant.

3.2) Contrôle de la qualité et de l'intégrité des ARN_{total}

3.2.1) Dosage par spectrophotométrie

A 260 nm, une unité de densité optique correspond à 40 µg d'ARN/ml (Sambrook *et al.*, 1989). La spectrophotométrie permet également de contrôler :

- ◆ l'absence de contamination protéique, déterminée par le calcul du rapport DO260/DO280 qui doit être compris entre 1,7-2,0,
- ◆ l'absence de contamination phénolique, déterminée par le calcul du rapport DO260/DO270 qui doit être compris entre 1,27-1,29, mais surtout traduite par l'absence d'un pic à 270 nm sur le spectre,
- ◆ l'absence de contamination au thiocyanate de guanidium, déterminée par le rapport DO260/DO230 qui doit être supérieur ou égal à 2.

3.2.2) Electrophorèse sur gel d'agarose en conditions dénaturantes

Les ARN_{total} sont séparés sur un gel d'agarose (1%) en conditions dénaturantes afin de contrôler leur intégrité.

Pour éliminer l'ADN et les protéines contaminants, la cuve est préalablement lavée pendant une heure avec une solution contenant : NaOH (0,5 N) (Sigma), SDS (2%) (Sigma) et eau Milli-Q. La cuve est ensuite rincée à l'eau Milli-Q.

Les échantillons sont préparés pour un dépôt de 20 µl final contenant 25 µg d'ARN_{total} dans du tampon MOPS (acide 3-morpholinopropanesulfonique) (0,5 X) (Fluka) contenant du formamide désionisé (0,5 X) (Sigma) et du formaldéhyde (0,17

X) (Sigma). Les échantillons sont mis dans un bain-marie à 55°C pendant 15 minutes. Après cette étape, une solution de bleu de bromophénol (0,25%) (Sigma) et de xylène cyanol (0,25%) (Sigma) est ajoutée.

Le gel d'agarose (1%) (Fluka) est préparé avec du tampon MOPS (1 X), du formaldéhyde (0,17 X), du bromure d'éthidium (20 µg/ µl ; Gibco BRL) puis coulé dans la cuve et recouvert de tampon MOPS (1X). Les échantillons déposés migrent pendant trois heures à 70/80 V (voltage constant).

Les ARN ainsi séparés peuvent être visualisés sous rayonnement U.V. à 302 nm. Nous pouvons alors observer une trame continue d'ARN de différentes tailles, avec deux bandes majoritaires bien distinctes représentant les ARN ribosomiques 28S et 18S aux tailles respectives de 4,4 kb et 2,2 kb (figure 5).

Si les ARN ont été dégradés, cette trame est incomplète et les ARNr sont peu présents voire absents.

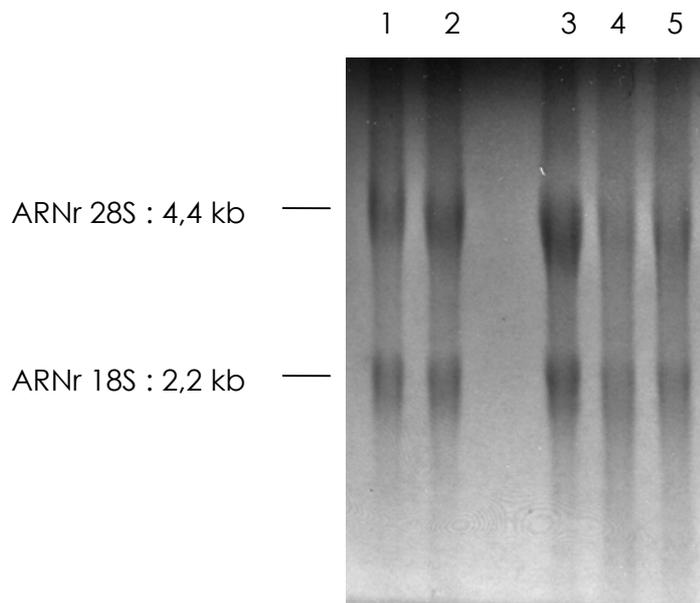


Figure 5 : Electrophorèse sur gel d'agarose en conditions dénaturantes : migration des ARN_{totaux} de la muqueuse colique (1) ; (2) ; (3) : ARN_{totaux} non dégradés, (4) ; (5) ARN_{totaux} dégradés

3.3) Quantification des ARNm

3.3.1) Préparation de l'ADNc

3.3.1.1) Pour la PCR semi-quantitative traditionnelle

Le milieu réactionnel (volume final de 29 μ l) contient les ARN_{totaux} (45 μ g), un inhibiteur de ribonucléases (30 unités de Rnasin ; Life technology), la DNaseI-RNase free (15 unités ; Life technology), le DTT (dithiothréitol : 10 mM ; Gibco) et le tampon de transcription inverse (1 X) contenant : Tris-HCl (pH 8,3 ; 50 mM), KCl (75 mM) et MgCl₂ (3 mM) (Gibco BRL).

Une première incubation de 15 minutes à 37°C est réalisée, afin de casser les structures tridimensionnelles des ARN, puis les amorces aval désirées ((β -actine (1 μ M) et PPAR γ (1,5 μ M) pour une coamplification β -actine /PPAR γ , ou β -actine (1 μ M) et RXR α (1 μ M) pour une coamplification β -actine /RXR α)) sont ajoutées ainsi que les dNTP (0,20 mM) et la M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) transcriptase inverse (180 unités ; Gibco BRL). Le tout est incubé pendant une heure à 37°C pour la synthèse de l'ADNc. Les ADNc ainsi obtenus sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

3.3.1.2) Pour la PCR semi-quantitative en temps réel

La préparation de l'ADNc diffère de celle décrite précédemment car la quantité d'ARN_{totaux} utilisée au départ est plus faible (5 μ g).

Le milieu réactionnel (volume final de 29 μ l) contient les ARN_{totaux} (5 μ g), un inhibiteur de ribonucléases (40 unités de Rnasin ; Life technology), la DNaseI-RNase free (20 unités ; Life technology). Le mélange est incubé pendant 15 min à 37°C. Puis, l'amorce aval (1,2 μ M) du gène qui sera amplifié est additionnée. Le mélange réactionnel est incubé pendant 10 min à 70°C. Après avoir refroidi les tubes dans la glace, le tampon de RT (1X) contenant : Tris-HCl (pH 8,3, 50 mM), KCl (75 mM), MgCl₂ (3 mM) (Gibco BRL), DTT (0,01 M ; Gibco BRL), dNTPs (0,25 mM) et la Superscript II, transcriptase reverse (200 unités ; Life Technologies) sont ajoutés au mélange.

Le mélange est incubé pendant 1h à 42°C. Les ADNc ainsi obtenus sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

3.3.2) Quantification par RT-PCR traditionnelle

3.3.2.1) Amplification enzymatique en chaîne (PCR)

L'amplification est menée dans un thermocycleur (DNA Thermal Cyclers 480 de Perkin Elmer) pendant 33 cycles suivant la chronologie suivante:

- 1 minute à 95°C.
- 1 minute d'hybridation des amorces à 60°C.
- 2 minutes de polymérisation à 72°C.

L'ADNc du gène de la β -actine, qui sert d'étalon interne, sera coamplifié dans le même tube avec l'ADNc du gène d'intérêt. Nous avons précédemment vérifié que la coamplification de l'ADNc du gène RXR α avec l'ADNc du gène de la β -actine ne diminue pas le rendement d'amplification, et que les amorces ne s'hybrident pas entre elles. Il en est de même pour l'ADNc du gène de PPAR γ et de la β -actine. D'autre part, pour chaque série de PCR, un tube contenant tous les constituants du milieu réactionnel mais dans lequel l'ADNc est remplacé par de l'eau, sert de témoin négatif afin de vérifier l'absence d'ADN contaminant.

Le milieu réactionnel (180 μ l) contient l'ADNc, le tampon d'amplification (1 X) (Tris-HCl 10 mM (pH 8,3) ; KCl 50 mM ; MgCl₂ 2 mM), dNTP (0,2 mM), la gélatine 1% (10 mg/l). A cela s'ajoutent:

- les amorces amont de la β -actine, RXR α (1,25 μ M) (si coamplification β -actine /RXR α),
- les amorces amont de PPAR γ (1,85 μ M) (si coamplification β -actine /PPAR γ),
- les amorces aval de la β -actine, RXR α (1,05 μ M),
- les amorces aval de PPAR γ (1,60 μ M),
- 80 μ l d'huile de paraffine sont déposés sur le milieu réactionnel, évitant l'évaporation.

Après 12 minutes de dénaturation à 97 °C, 4,5 unités de Taq polymérase sont ajoutées au milieu réactionnel contenant les α^{32} P dCTP (1,85 MBq ; activité spécifique 370 MBq/ml) (ICN 39011X) pour réaliser l'amplification.

3.3.2.2) Analyse des produits d'amplification

8 µl du milieu réactionnel sont prélevés en fin de chaque cycle du 7^{ème} au 24^{ème} cycle. La séparation des fragments d'ADN coamplifiés est réalisée par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% pendant deux heures à 45 mA (ampérage constant), dans du tampon TEB (Tris 9 mM, EDTA 9 mM (pH 8), acide borique 2 mM (Sigma)). La radioactivité incorporée est révélée après deux heures d'autoradiographie (Kodak). Les bandes visibles sur le film sont découpées sur le gel. Les fragments de gel sont immergés dans 3 ml de liquide scintillant afin de quantifier la radioactivité incorporée à l'aide d'un compteur à scintillation (AS 6000 de Beckman).

3.3.2.3) Expression des résultats

Dans la phase linéaire, la radioactivité mesurée au niveau d'une bande est proportionnelle au nombre de molécules d'ADN formées au cours de l'amplification. Ce nombre double à chaque cycle de PCR, de même que la quantité (Y) de dCTP marqués incorporée lors de la PCR suit l'équation:

$$Y = A \times 2^n$$

Y : radioactivité incorporée

A : quantité initiale d'ADN

n : nombre de cycles de PCR

Quand on représente le logarithme de la radioactivité incorporée (Y) en fonction du nombre de cycles (n), la courbe obtenue présente deux phases (figure 6) :

- une phase exponentielle au début et au milieu de la réaction d'amplification,
- un plateau en fin de réaction dû à une diminution de l'activité de la Taq polymérase et/ou à une diminution du rapport de la quantité de molécules qui servent de matrices sur la quantité des amorces et des dNTPs.

Or le rendement de l'amplification n'est jamais de 100%, car, par exemple, toutes les molécules d'ADN présentes dans le milieu réactionnel ne servent pas de matrice à chaque cycle d'amplification. C'est pourquoi l'équation précédente s'écrit sous la forme :

$$Y = A(1+R)^n$$

Chelly *et al.*, (1990) ont montré que $\log(Y)=f(n)$ est une sygmoïde dont la partie linéaire correspond à la phase exponentielle de la PCR où la quantité d'ADN synthétisée est proportionnelle à la quantité initiale d'ADNc (A), reflétant la quantité initiale d'ARN messagers (Figure 6).

Ces auteurs ont montré que la proportion (A) d'un ARN messenger donné par rapport à l'ARN messenger de la β -actine peut être calculée par la formule (appliquée dans le cas de PPAR) :

$$\frac{A_{PPAR}}{A_{\beta-act}} = \frac{Y_{PPAR}(1+R_{\beta-act})^n}{Y_{\beta-act}(1+R_{PPAR})^n}$$

Dans la pratique, un logiciel de représentation scientifique (Sigma Plot, Jandel Corporation) permet de tracer la droite de régression linéaire de la partie exponentielle de la courbe $\log(Y)=f(n)$. L'équation de la droite, calculée par l'ordinateur, est de type $y = a x + b$ et peut s'écrire :

$$\mathbf{\log(Y) = \log(1+R)+\log A}$$

La quantité initiale d'ARNm (A) est donnée par l'ordonnée à l'origine ($\log(A)$) et le rendement de l'amplification par la pente ($R=10^{a-1}$, a : valeur de la pente).

Le calcul se simplifie alors :

$$\frac{A_{PPAR}}{A_{\beta-act}} = \frac{10^{b_{PPAR}}}{10^{b_{\beta-act}}} = \frac{10^{\log A_{PPAR}}}{10^{\log A_{\beta-act}}}$$

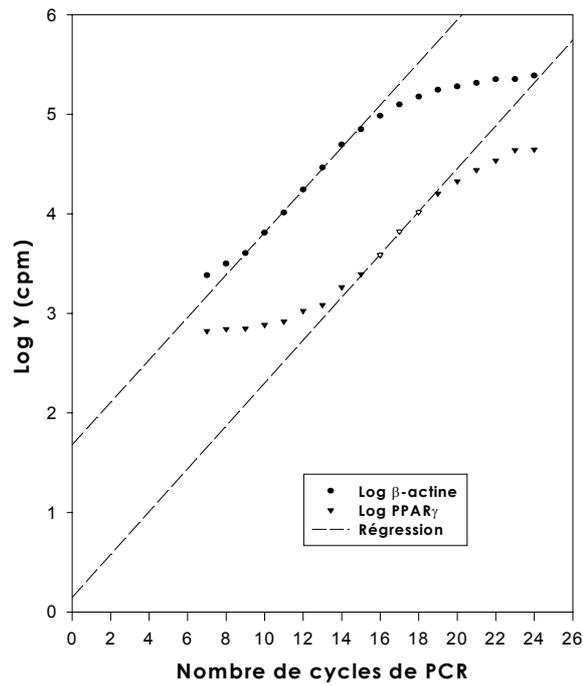


Figure 6: Exemple d'une représentation semi-logarithmique d'incorporation du dCTP α^{32} P au cours de l'amplification des fragments d'ADNc et régression linéaire de la phase exponentielle dans la muqueuse colique de rat ayant consommé le régime témoin (5% d'huile de carthame). L'efficacité de la PCR est de 78 %. (1-pente de la phase linéaire/100).

3.3.3) Quantification par RT-PCR en temps réel

3.3.3.1) Principe

L'amplification est réalisée à l'aide d'un LightCycler™ (Roche Diagnostics) qui combine le processus d'amplification à la détection en temps réel des produits de PCR. Le système LightCycler™ est composé d'une chambre thermique et d'une unité optique.

Dans la chambre thermique, les cycles de PCR sont assurés par un flux d'air pulsé dont la température est contrôlée très précisément. Ceci permet une montée ou une descente en température de 20°C/sec. La réaction d'amplification s'effectue dans des capillaires de verre borosilicaté dont le rapport surface/volume élevé permet une très rapide mise à température du milieu réactionnel. La capacité maximale du LightCycler™ est de 32 capillaires. La chambre thermique, dans laquelle chaque échantillon est chauffé grâce à de l'air rapidement distribué, contribue à une grande uniformité de températures pour tous les échantillons. Ainsi toutes les réactions sont réalisées dans des conditions identiques. Les caractéristiques générales de cet appareil permettent également de réaliser 40 cycles d'amplification en moins de 30 min.

Un bloc optique, constitué de microfluorimètres, permet de détecter les produits d'amplification par la mesure d'une émission de fluorescence dont l'intensité est directement corrélée à la quantité de produits de PCR présents à chaque nouveau cycle. Plusieurs formats de fluorescence peuvent être utilisés pour suivre la PCR. Le SYBR Green I a été utilisé pour la quantification de l'expression des gènes RXR α , PPAR γ , COX-1 et COX-2, et une sonde TaqMan, procédé beaucoup plus sensible, pour la quantification du gène RAR β dont l'expression est extrêmement faible dans la muqueuse colique.

Le SYBR Green I est un intercalant porteur d'un fluorophore, excitable à 470 nm, qui émet une fluorescence lorsqu'il est intercalé dans le double brin d'ADN. De ce fait, à chaque nouveau cycle de PCR, le SYBR Green I se fixe sur les produits d'amplification dont la présence est détectée par la mesure de leur fluorescence à 530 nm à la fin de chaque élongation. Par ailleurs, l'utilisation de ce fluorophore permet de réaliser des courbes de fusion des produits d'amplification étudiés, ce qui permet de déterminer le degré de spécificité et de sensibilité des couples d'amorces des gènes cibles choisis pour les amplifications ainsi que la présence éventuelle de dimères d'amorces.

Principe de la sonde TaqMan : la sonde est marquée en 5' par un fluorochrome (émetteur) et en 3' par un quencheur. Par transfert d'énergie FORTS (FRET), le quencheur diminue de façon sensible la fluorescence émise par l'émetteur. Lors de l'élongation, l'activité 5' exonucléasique de la Taq ADN polymérase clive la sonde. La molécule émettrice est alors dispersée dans le milieu et émet une fluorescence qui est mesurée. Il faut signaler que l'extrémité 3' de la sonde est bloquée afin qu'elle ne puisse pas servir d'amorce (Figure 7).

Quand la sonde est intacte, la proximité du quencher diminue de façon sensible la fluorescence émise par la molécule fluorescente R par transfert d'énergie Forste (FRET) (Ota *et al.*, 1997). Au cours de l'hybridation, la sonde hybridée en aval d'une des amorces est clivée par l'activité 5' nucléase de la Taq polymérase. Le clivage de la sonde sépare le quencher du rapporteur qui va alors émettre un signal de fluorescence. Le clivage détache la sonde du brin cible permettant l'élongation du produit de PCR. Plus le nombre de molécules clivées est important, plus le signal sera fort. La fluorescence est donc proportionnelle à la quantité des produits formés.

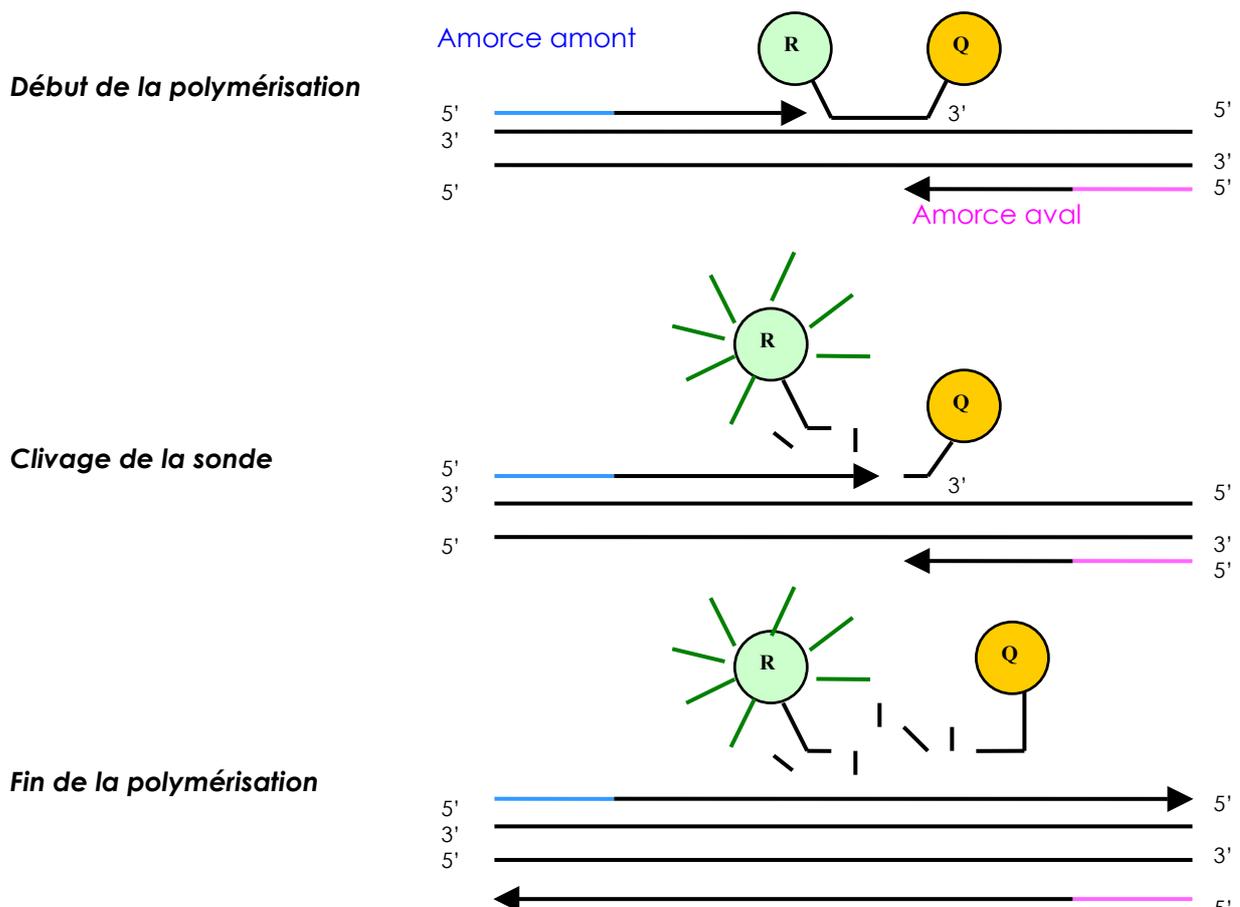


Figure 7: Principe de la sonde TaqMan

3.3.3.2) Amplification enzymatique en chaîne (PCR)

*** SYBR Green I ***

L'amplification est réalisée dans des capillaires en verre. Le volume réactionnel final est de 20 µl. Il contient l'ADNc, les amorces aval et amont (0,5 µM chacune), MgCl₂ (3 mM) et le tampon « LC FastStart DNA Master SYBR Green I » (1X) prêt à l'emploi. Le tampon LC FastStart DNA Master SYBR Green I contient du MgCl₂ (1 mM), un mélange de dNTP (10 mM), le SYBR Green I et la FastStart Taq DNA polymérase.

La FastStart Taq DNA polymérase est une forme modifiée de la Taq DNA polymérase. Elle est inactive à température ambiante car certains de ses acides aminés sont bloqués par un composé chimique sensible à la chaleur. Une étape d'activation de l'enzyme à haute température est donc nécessaire pour éliminer son groupe bloquant. Le programme thermique comprend donc une étape initiale de 10 min à 95°C suivie de 50 cycles d'amplification comprenant chacun trois étapes :

1. 8 sec à 95°C, étape de dénaturation séparant les brins d'ADN,
2. 6 sec à 60°C, étape d'hybridation des amorces avec leur séquences complémentaires,
3. 10 sec à 72°C, étape d'élongation des chaînes complémentaires des matrices d'ADN.

Afin de détecter les produits spécifiques et non spécifiques de la PCR ainsi que les dimères d'amorces, une courbe de fusion est réalisée après la PCR. A la fin des 50 cycles de PCR, les amplifiats sont chauffés à 95°C puis hybridés à 70°C (température d'hybridation +10°C). Ils sont alors chauffés lentement de 70°C à 95°C à une vitesse de montée en température de 0,2°C/sec pour obtenir la courbe de fusion.

*** Sonde TaqMan ***

L'amplification est réalisée dans des capillaires en verre. Le volume réactionnel final est de 20 µl. Il contient l'ADNc, les amorces aval et amont (0,5 µM chacune), la sonde Taqman (0,2 µM), MgCl₂ (3 mM) et le tampon « LightCycler DNA Master hybridisation Probes » (Roche Molecular Biochemicals) (1X) prêt à l'emploi. Le tampon « LightCycler DNA Master hybridisation Probes » contient du MgCl₂ (1 mM), un mélange de dNTP (10 mM) et la FastStart Taq DNA polymérase.

Le programme thermique comprend une étape initiale de 10 min à 95°C suivie de 50 cycles d'amplification comprenant chacun deux étapes:

1. 5 sec à 95°C, étape de dénaturation séparant les brins d'ADN,
2. 30 sec à 60°C, étape d'hybridation des amorces et de la sonde avec leur séquences complémentaires.

L'élongation est réalisée pendant la montée en température entre 60°C et 95°C. La température de transition est de 20°C/s pour passer de l'étape de dénaturation à l'étape d'hybridation et de 10°C/s pour passer de 60°C à 95°C. Le signal de fluorescence est détecté à la fin de l'étape d'hybridation.

Quel que soit le format de fluorescence employé, 14 µl de mélange réactionnel et 6 µl d'ADNc (≈10 ng) sont additionnés dans chaque capillaire. Le contrôle est effectué avec de l'eau seule ou avec le mélange issu d'une transcription inverse réalisée sans ARN.

Pour l'analyse des résultats, le choix de la ligne de base (Noise band) est identique pour chaque série.

3.3.3.3) Expression des résultats

Pour chaque échantillon et chaque couple d'amorces, une courbe d'amplification est réalisée, témoignant de l'augmentation de la quantité de fluorescence à chaque cycle de PCR comme décrit précédemment pour la PCR semi-quantitative traditionnelle. La réaction de PCR réalisée par le LightCycler™ peut donc être décrite par la formule suivante :

$$N_n = N_0 \times E^n$$

N_n : quantité d'ADN pour un cycle donné

N_0 : quantité initiale d'ADNc (=ARNm initial)

E : efficacité de la PCR

n : nombre de cycles de PCR

Comme décrit précédemment, Chelly *et al.*, (1990) ont montré que l'on peut calculer la proportion N_0 d'un ARNm donné par rapport à l'ARNm d'un gène de référence utilisé comme standard interne par la formule :

$$\frac{\text{No (gène cible)}}{\text{No (gène de référence)}} \times 100$$

Le LightCycler™ est équipé d'un logiciel permettant de calculer ce rapport à partir du premier cycle de PCR correspondant à la phase exponentielle de celle-ci. Pour cela une ligne de base est positionnée au-dessus de la fluorescence basale. Elle permet de déterminer, sur les courbes d'amplification, le point de départ de la phase exponentielle (crossing point, Cp) de la PCR. Le Cp représente l'intersection entre la tangente de l'amplification exponentielle et la ligne de base.

Des courbes standards sont réalisées avec un gène de ménage utilisé comme étalon interne, le gène de la GAPDH. Des dilutions sérielles de l'ADNc du gène de la GAPDH (50 ; 10 ; 2 ; 0,4 ; 0,08 ng/capillaire) donnent une série de courbes d'amplification permettant de tracer une droite représentant le cp en fonction du logarithme de la quantité initiale d'ARN (figures 8A et 8B). La pente (p) de la droite obtenue traduit l'équation de cette droite standard.

$$\mathbf{Cp = p (\log No) + \log(Nn/E)}$$

Cp : cycle de croisement

No : quantité initiale d'ADNc

Nn : quantité d'ADN pour un cycle donné

p : pente ($p = -1/\log E$)

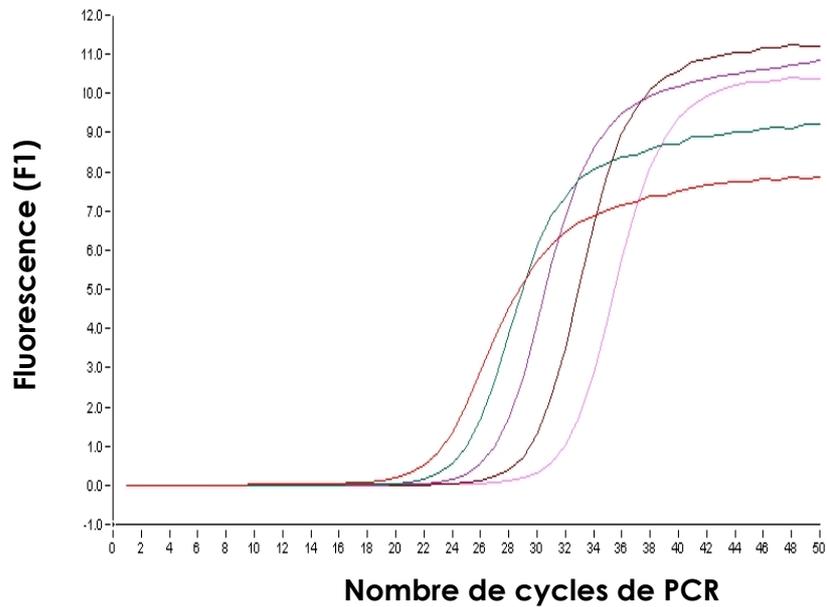
E : efficacité de la PCR

Nous avons vérifié que l'expression du gène de la GAPDH est stable dans nos différentes séries expérimentales. La semi-quantification n'est rendue possible que si les rendements de PCR des gènes de référence et d'intérêt sont identiques. Les pentes des droites standards doivent être superposables avec une erreur tolérée inférieure à 5%.

Pour mesurer le niveau d'expression du gène d'intérêt, le gène de la GAPDH et le gène d'intérêt sont coamplifiés en même temps à partir d'une même concentration initiale d'ARN (correspondant à une des concentrations de la gamme standard d'amplification du gène de la GAPDH). Les cp obtenus pour les deux gènes, reportés sur la courbe standard, permettent de déterminer leurs concentrations No.

Le niveau d'expression du gène d'intérêt est exprimé par rapport (%) à l'expression du gène de référence.

A



B

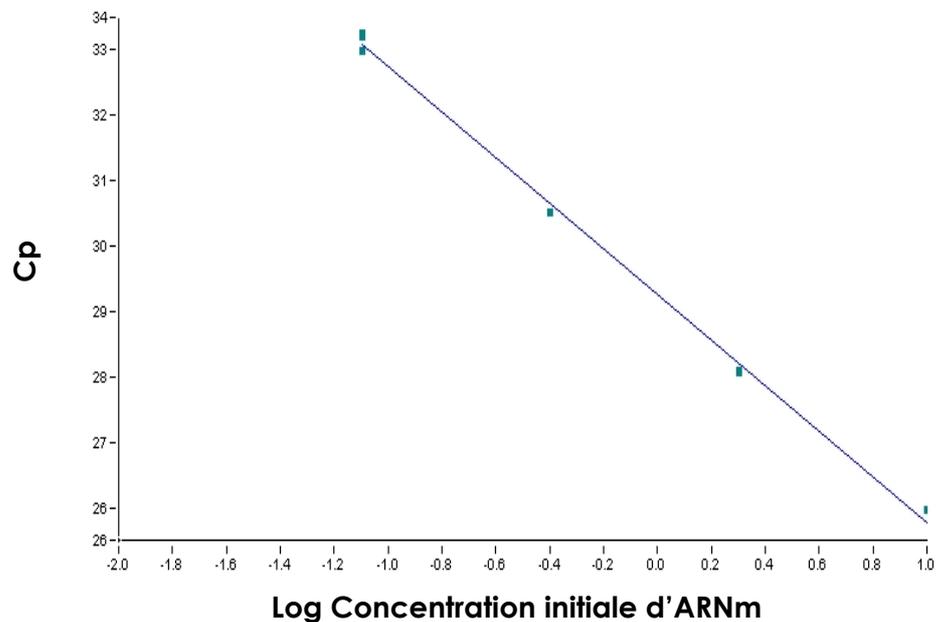


Figure 8: **A** : Courbes d'amplification de la GAPDH, gamme de dilutions au cinquième d'ADNc obtenus à partir d'ARN_{total} de muqueuse colique.

B : Droite standard de la GAPDH. Cette droite est la représentation graphique des Cp en fonction de la concentration initiale d'ARNm. La pente est de $-3,3$ et le coefficient de régression de 1.

D) Quantification de l'expression des protéines cibles par immunorévélation (Western blot).

1) Principe

Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire par électrophorèse en conditions dénaturantes, puis elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose où la protéine étudiée est révélée de façon spécifique grâce à des anticorps.

2) Extraction des protéines de la muqueuse colique de rat

L'extraction est réalisée selon les méthodes de Boolbol *et al.*, (1996), Lefebvre *et al.*, (1998) modifiées. La muqueuse colique de rat est homogénéisée avec un Ultra-Turrax T25 pendant une minute à 8000 tours/minute dans un tampon d'extraction PBS (NaCl 145 mM ; NaH₂PO₄H₂O 1,47 mM ; Na₂HPO₄anhydre 8 mM) (pH 7,4) contenant de l'Igepal CA-630 (1% ; Sigma I3021), du désoxycholate de sodium (0,5% ; Sigma D6750), du SDS (0,1 %), de l'EDTANa₂ (13,2%, Sigma E1644) et le cocktail d'inhibiteurs de protéases (1 ml pour 20 g de tissu, Sigma P8340). Le volume de tampon d'extraction utilisé est 15 fois supérieur à la masse de tissu à homogénéiser.

L'homogénat est ensuite centrifugé à 11000 g à 4 °C pendant 15 minutes, puis le surnageant est prélevé et conservé à - 80°C.

Quelques µl de surnageant sont utilisés pour doser les protéines avec le BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay Reagent (kit n° 23225 de la Pierce Chemical Company). Cette technique de dosage est dérivée de la méthode de Lowry *et al.*, (1951).

L'extraction protéique du tissu colique de trois animaux par régime (n=3) a fait l'objet de l'analyse de l'expression protéique de PPAR γ , COX-1, COX-2 et β -caténine.

3) Préparation de l'échantillon protéique

A partir de la solution protéique extraite de la muqueuse de rat, le domaine de linéarité de la méthode a été déterminé en déposant 9 quantités de protéines (2,5 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25 ; 30 ; 40 ; 50 µg). Pour les quatre protéines étudiées le domaine de linéarité correspond aux dépôts : 5 ; 10 ; 15 µg.

La solution protéique initiale est dénaturée et réduite en présence de SDS (0,4 %) et de β -mercaptoéthanol (5%) dans du tampon Tris-HCl (60 mM pH 6,8) contenant du glycérol pur (25%), du saccharose (20%) et du bleu de bromophénol, puis elle est diluée avec du PBS afin d'obtenir les échantillons protéiques à la concentration désirée. Les échantillons sont ensuite chauffés à 100°C pendant 10 minutes.

4) Séparation électrophorétique

Un volume de 15 μ l de chaque échantillon protéique est déposé dans les puits. Après concentration sur un gel de polyacrylamide à 5% (acrylamide 5% ; bisacrylamide 0,13% ; Tris 0,125 M (pH 6,8) ; SDS 0,1% ; APS 0,05% ; TEMED 0,1%) les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide à 12% (acrylamide 12% ; bisacrylamide 0,32% ; Tris 0,375 M (pH 8,8) ; SDS 0,1% ; APS 0,06 % ; TEMED 0,06%).

La migration est réalisée à 180V (voltage constant) dans le gel de concentration (environ 15 min) puis 220V dans le gel de séparation (1h 45 min) dans un tampon Tris (25 mM, pH 8,3) contenant du SDS (0,1%) et de la glycine (192 mM). Le front de migration est suivi grâce au bleu de bromophénol.

La co-migration de protéines de référence de poids moléculaires connus (Biorad 161-0305) permet d'identifier sur le gel chacune des protéines étudiées.

5) Transfert des protéines

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose (42 μ m) s'effectue en milieu semi-sec, à 24 V (voltage constant) pendant 1h 15 min. Le tampon de transfert contient du Tris (48 mM pH 9,2), de la glycine (139 mM), du méthanol (20%) et du SDS (1,3 mM).

6) Immunorévélation

Afin de bloquer les sites de liaisons non spécifiques, la membrane est incubée pendant deux heures à température ambiante dans du tampon TBS-Tween-lait composé de TBS (NaCl 100 mM; Tris base 20 mM ajusté à pH 7,4 avec HCl), de Tween 20 (1%) et de lait écrémé Régilait (5%). La membrane est ensuite incubée une nuit à 4°C avec un anticorps primaire (tableau V) dilué dans du tampon TBS-Tween-lait.

Tableau V: Références et dilutions des anticorps primaires utilisés

Anticorps primaires utilisés	Taux de dilution de l'anticorps primaire dans le TBS-Tween-lait
Anticorps de lapin anti-PPAR γ (H-100) (Santa Cruz SC-7196)	1/200
Anticorps de souris anti- β caténine (Santa Cruz SC-7963)	1/200
Anticorps de chèvre anti-cyclooxygénase 1 (Santa Cruz SC-1754)	1/1000
Anticorps de souris anti- β actine (Sigma A-5441)	1/8000

Après trois lavages de 10 min dans du TBS-Tween, la membrane de nitrocellulose est incubée pendant une heure à température ambiante avec un anticorps secondaire marqué à la peroxydase dilué dans du TBS-Tween-lait (tableau VI).

Tableau VI: Références et dilutions des anticorps secondaires utilisés.

Anticorps secondaires utilisés	Taux de dilution de l'anticorps secondaire dans le TBS-Tween-lait
Anticorps anti-immunoglobines de lapin (Sigma A 0545)	1/3000
Anticorps anti-immunoglobines de souris (Amersham Life Science NA 931)	1/3000
Anticorps anti-immunoglobines de chèvre (Sigma A 54 20)	1/3000

Trois lavages de 10 min dans du TBS-Tween sont ensuite effectués, puis la protéine est révélée en ajoutant le réactif "Chemiluminescence Renaissance Plus" (Dupont Nen Life Science Products, NEL 103) contenant le substrat de la peroxydase. La réaction de chimioluminescence est visualisée par autoradiographie (films, Kodack). L'intensité des bandes est évaluée grâce à un logiciel d'analyse d'image (Quantity One, Biorad).

Pour valider la qualité de l'extraction, du dépôt et du transfert, nous avons co-révéillé une protéine de référence, la β -actine, dont l'expression ne varie pas dans nos différentes conditions expérimentales.

E) Etude *in vitro*

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie des Cancers Coliques et Thérapeutique Expérimentale, INSERM U 419 de Nantes, dirigé par le Pr. Khaled Méflah, sous la tutelle de Jean Ménanteau, CR1.

1) Lignées et entretien des cellules

Les cellules que nous avons utilisées sont des variants isolés à partir d'un passage tardif (44^e passage) d'une culture cellulaire (DHD/K12) établie à partir de la tumeur transplantable DHD, histologiquement très proche des tumeurs coliques humaines, provenant d'un carcinome colique induit par la 1,2 diméthylhydrazine chez un rat femelle de souche BD-IX. La sélection initiale a été établie par rapport à la sensibilité ou la résistance accrue au détachement induit par la trypsine : les cellules les plus sensibles au détachement, appelées trypsine-sensibles ou TS, et les cellules les plus résistantes, appelées trypsine-résistantes ou TR, ont été sélectionnées 10 fois. Des clones ont été obtenus à partir des cellules TS et TR. Ultérieurement, compte-tenu du caractère progressif ou régressif des tumeurs obtenues, les cellules TR et leurs clones ont été dénommées PROb, les tumeurs TS et leur clones ont été dénommées REG (Martin *et al.*, 1983). Nous avons travaillé avec la lignée PROb.

La lignée des cellules épithéliales intestinales (IEC-6) est dérivée de l'intestin de rat (Quaroni *et al.*, 1978). Ces cellules ont un phénotype normal qui peut être transformé dans certaines conditions expérimentales.

Les cellules IEC-6 sont cultivées après décongélation, dans un milieu RPMI 1640 (Gibco BRL) contenant du sérum de veau fœtal (SVF) (15% v/v), de la L-glutamine (2 mM), de la pénicilline (100 U/ml), de la streptomycine (100 μ g/ml) (Gibco BRL). Puis l'entretien de ces cellules se fait avec le même milieu contenant 10% de SVF (v/v). Les cellules PROb sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 contenant 10% de SVF (v/v) comme décrit précédemment.

Les cellules se multiplient dans des boîtes de culture (Falcon, 25 cm²) à 37°C et sont gardées sous une atmosphère humide contenant 95% d'air et 5% de CO₂. Elles sont décollées de leur support à confluence par traitement avec une solution de Trypsine / EDTA (respectivement 0,025 et 0,02%, Gibco BRL) pendant 5 min à 37°C.

2) Le test de Hoescht

L'absence de contamination mycoplasmaïque est vérifiée régulièrement par le test de Hoescht 33258 (Sigma). Ce dérivé du benzimidazole se fixe préférentiellement sur les bases A et T et émet dans le bleu avec une excitation par les rayonnements UV (350 nm) (Gagne, 1980).

Les cellules cultivées sur un support de verre, sont incubées 45 min avec une solution de Hoescht 33258 (5 µg/ml). Les cellules s'observent à sec après avoir été rincées au PBS.

3) Traitements des cellules

3.1) Traitement par l'acide rétinoïque *tout-trans*

L'acide rétinoïque *tout-trans* (Sigma) est dissous extemporanément dans l'éthanol absolu afin de réaliser une solution mère à 10⁴ µM. Avant de déterminer la concentration à laquelle nous devons travailler, une courbe effet-dose est réalisée. Les concentrations étudiées sont : 10 ; 5 ; 1 ; 0,1 et 0,01 µM. Les milieux de culture contiennent au maximum 0,1% d'éthanol. Afin de vérifier l'absence d'effet de l'éthanol, des cellules sont cultivées uniquement avec éthanol (0,1%) ou sans éthanol (Kaleagasioglu *et al.*, 1993 ; Mazière *et al.*, 1997 ; Shang *et al.*, 1999).

3.2) Traitement par l'acide linoléique

Une solution mère d'acide linoléique (Sigma) à 300 mM est préparée extemporanément dans l'éthanol absolu et complexée à une solution de Sérum Albumine Bovine (libre de tout acide gras, Sigma) de concentration finale 50 µM. La BSA servira de transporteur à l'acide linoléique libre afin qu'il puisse pénétrer dans les cellules. La solution est placée sous agitation à 37°C pendant 1 heure jusqu'à ce qu'elle devienne claire. Avant de déterminer la concentration à laquelle nous devons travailler, une courbe dose-effet est réalisée aux concentrations suivantes d'acide linoléique: 250 ; 100 ; 50 ; 10 et 1 µM. Les milieux de culture contiennent au maximum 0,1% d'éthanol. Afin de vérifier l'absence d'effet de l'éthanol, les cellules

sont cultivées uniquement avec éthanol (0,1%) ou sans éthanol (Hussey et Tisdale, 1994).

4) Test d'exclusion au bleu Trypan

Ce test permet de différencier les cellules vivantes des cellules mortes. Son principe repose sur le fait que les cellules vivantes ne fixent pas le bleu Trypan, alors que le cytoplasme et le noyau des cellules mortes ou endommagées se colorent en bleu.

La concentration finale du bleu Trypan doit être de 0,18%. Les cellules sont comptées sur une cellule de Malassez.

5) Test de prolifération cellulaire par incorporation de (³H)thymidine

Pour chaque expérience, les cellules sontensemencées dans des boîtes de 24 puits à raison de 10 000 cellules/3ml par puits.

La prolifération des cellules est mesurée par incorporation de thymidine tritiée (activité spécifique : 2 mmol/Ci, ICN) diluée dans le milieu de culture à la concentration de 1 µCi/ml dans chaque puits. Après incubation (5h, 37°C), les cellules sont rincées trois fois 5 min avec du tampon phosphate de sodium (pH 7,3-7,5) et fixées par du méthanol à 95% pendant 15 min, puis encore 5 min par du méthanol (95%). Les cellules sont ensuite séchées à l'air libre puis traitées 1 heure à 37°C par une solution de soude (0,1 N). Les solutions de chaque puits sont récupérées dans des fioles à scintillation, additionnées de 4 ml de liquide à scintillation (Ready Safe, Beckman). La radioactivité est mesurées au compteur β (AS 6000 de Beckman).

Un test de prolifération est effectué après 1, 2, 3 et 4 jours de traitement afin d'obtenir une courbe de croissance cellulaire.

F) Calculs statistiques

Dans nos séries expérimentales et pour chaque paramètre mesuré, nous avons calculé la moyenne arithmétique des n valeurs obtenues.

Chaque moyenne est accompagnée de son erreur standard (ESM). La comparaison des moyennes des valeurs obtenues dans les différents groupes

expérimentaux est effectuée par un test ANOVA suivi du test « t » de Student pour les séries indépendantes.

La différence entre deux moyennes est considérée comme significative lorsqu'elle est associée à une probabilité $p \leq 0,05$.

Chapitre III

Résultats et Discussion

Les données bibliographiques présentées au début de ce manuscrit, mettent en évidence des relations entre une alimentation riche en lipides et le risque de développement du cancer colorectal. Par ailleurs, la découverte récente du rôle des acides gras dans l'expression des gènes a généré un courant de recherche destiné à mieux comprendre l'intervention des acides gras dans le processus de contrôle de l'homéostasie cellulaire.

Il est aujourd'hui bien établi que l'un des mécanismes de l'action cellulaire des acides gras s'exerce par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires, les PPAR qui appartiennent à la sous famille des récepteurs nucléaires comprenant RAR et TR qui ont pour partenaire commun le RXR avec lequel ils forment des hétérodimères qui régulent l'expression de gènes. Il existe donc des interférences entre les voies de signalisation des acides gras et celles des rétinoïdes. Dans ce contexte, notre hypothèse de travail suggère qu'une alimentation riche en lipides, via l'activation des PPAR, serait susceptible d'induire des dysfonctionnements dans les voies d'action de l'acide rétinoïque.

Ainsi, notre projet de recherche avait pour objectif d'étudier les conséquences d'un apport élevé en acides gras sur l'action cellulaire de l'acide rétinoïque dans le côlon de rat et ses conséquences sur le risque de cancérogenèse colique. Notre travail a été essentiellement consacré à l'étude de l'expression de leurs récepteurs nucléaires RAR, RXR et PPAR dans ces situations d'apports élevés en lipides.

Pour les mesures d'expression des ARNm, nous avons choisi les isoformes RAR β et PPAR γ 1 et 2. Nos critères de choix sont justifiés par leur niveau d'expression dans le côlon ainsi que par leur aptitude à répondre aux variations de concentration en ligands.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet des lipides sur l'expression des récepteurs nucléaires dans la muqueuse colique. Pour cela, deux régimes différents par la qualité et la teneur en lipides ont été testés : un régime dit cafétéria, inducteur d'une obésité nutritionnelle et un régime dit hyperlipidique dont la source de lipides est l'huile de carthame (25%). Ces régimes administrés pendant un mois devaient nous permettre d'appréhender la nature et la cinétique des modifications des voies de signalisation induites par les régimes dans la muqueuse colique.

Dans un deuxième temps, une étude a été réalisée afin d'évaluer l'incidence d'une alimentation riche en lipides sur le risque de développement du cancer du côlon. Pour ce faire, nous avons mis en place un modèle permettant d'étudier l'effet d'un régime riche en lipides sur le développement des lésions néoplasiques induites par un cancérigène chimique. Ce modèle nous a également permis d'étudier l'effet d'un régime riche en lipides supplémenté en vitamine A.

Dans un troisième temps, une étude approfondie des voies de signalisation des lipides et de la vitamine A a été réalisée, sur ce même modèle, en mesurant l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires PPAR γ , RAR β et RXR α ainsi que celle de protéines exprimées précocement dans le cancer colique (les cyclooxygénases). L'expression protéique de PPAR γ , de COX-1 et la β -caténine, (autre marqueur précoce de cancérogenèse colique) a été mesurée par western blot.

Dans un dernier temps, une étude *in vitro* sur cellules épithéliales en culture. Cette dernière partie constitue une exploration préliminaire des effets de l'acide linoléique et/ou de l'acide rétinoïque sur la prolifération cellulaire et l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires.

Partie I

Effet des différents régimes riches en lipides sur le statut nutritionnel des animaux

A) Régime cafétéria

1) Consommation alimentaire

Les animaux témoins ont consommé $26,0 \pm 3,9$ g de nourriture par jour, ce qui représente $377,0 \pm 56,8$ kJ. Dans le régime témoin, 8% de l'énergie sont apportés sous forme de lipides. Les animaux « cafétéria » ont consommé $29,0 \pm 0,6$ g de nourriture par jour soit $480,0 \pm 10,0$ kJ. Dans ce régime, les lipides représentent 61% de l'énergie consommée.

2) Croissance pondérale

Après un mois de régime, la moyenne des masses corporelles des animaux nourris avec le régime cafétéria (404 ± 7 g) est légèrement plus élevée que celle des rats témoins (385 ± 5 g).

B) Régime hyperlipidique : 25% huile de carthame

1) Consommation alimentaire

Le tableau I ne met en évidence aucune différence significative dans la consommation quotidienne de nourriture entre les différents régimes quelle que soit la durée de leur consommation. Seule exception : une différence significative entre les animaux témoins (3 mois) et les animaux nourris avec le régime hyperlipidique supplémenté en vitamine A (5 mois). Ceci pourrait être dû à une surestimation de la consommation des animaux témoins (3 mois). En effet, leur alimentation est sous forme de poudre, ce qui provoque des pertes de nourriture lors de la prise alimentaire par les animaux.

Tableau I: Consommation quotidienne par animal

Consommation journalière de nourriture (g) / animal						
1 mois		3 mois		5 mois		
Témoins	25% lipides	Témoins ± DMH	25% lipides ± DMH	Témoins ± DMH	25% lipides ± DMH	25% lipides + DMH+Vit A
18,1 ± 2,8	16,6 ± 2,3	20,3 ± 1,9	17,2 ± 1,5	16,6 ± 1,3	14,3 ± 1,8	13,5 ± 1,2*

Résultats représentant la moyenne ± ESM ; 1 mois, n= 4 ; 3 mois, n= 12 ; 5 mois, n=18

* : significativement différent de la valeur des témoins ± DMH (3 mois) (p<0,01).

DMH : 1,2-diméthylhydrazine

Témoins : animaux recevant le régime à 5% de lipides

25% lipides : animaux recevant le régime à 25% d'huile de carthame

Témoins ± DMH: animaux recevant le régime à 5% de lipides induits ou non à la DMH

25% lipides ± DMH: animaux recevant le régime à 25% d'huile de carthame induits ou non à la DMH

25% lipides + DMH + vit A: animaux recevant le régime à 25% d'huile de carthame, supplémenté en vitamine A, induits ou non à la DMH

Le tableau II ne met en évidence aucune différence significative dans la consommation énergétique quotidienne entre les différents régimes quels que soient les régimes et la durée des protocoles.

Tableau II: Apports énergétiques quotidiens (kJ) par animal

Apports énergétiques journaliers (kJ) / animal						
1 mois		3 mois		5 mois		
Témoins	25% lipides	Témoins ± DMH	25% lipides ± DMH	Témoins ± DMH	25% lipides ± DMH	25% lipides + DMH+Vit A
295,0±44,8	334,0±45,4	296,8±31,6	351,5±27,2	281,4±21,9	297,8±37,5	281,1±24,2

Résultats représentant la moyenne ± ESM ; 1 mois, n= 4 ; 3 mois, n= 12 ; 5 mois, n=18

Voir légende tableau I

2) Croissance pondérale

Au cours du temps, les animaux prennent du poids régulièrement. Les moyennes des masses corporelles des rats témoins et des rats nourris avec 25% de lipides supplémentés ou non en palmitate de rétinol suivent la même évolution.

Le tableau III ne met en évidence aucune différence significative de poids quels que soient les régimes à la fin de chaque expérimentation.

Tableau III: Masses corporelles (g) des animaux

Masses corporelles (g)						
1 mois		3 mois		5 mois		
Témoins	25% lipides	Témoins ± DMH	25% lipides ± DMH	Témoins ± DMH	25% lipides ± DMH	25% lipides + DMH+Vit A
211,0±19,0	231,0±16,0	338,5±10,6	341,0±12,0	402,1±17,9	413,0±19,6	398,6±29,2

Résultats représentant la moyenne ± ESM ; 1 mois, n= 4 ; 3 mois, n= 12 ; 5 mois, n= 18
Voir légende tableau I

3) Statut vitaminique A

Dans le protocole de cancérogenèse colique qui dure 5 mois, un groupe d'animaux a consommé le régime hyperlipidique avec une supplémentation en vitamine A. Le rétinol sérique a été dosé afin de constater si la supplémentation en vitamine A faisait varier la biodisponibilité du précurseur des ligands des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR et RXR) (tableau IV).

Tableau IV : Effet du régime hyperlipidique supplémenté ou non en vitamine A et de la DMH sur le taux de rétinol sérique

Rétinol (µmol/l)				
Témoins	25% lipides	Témoins + DMH	25% lipides + DMH	25% lipides + DMH+Vit A
1,75 ± 0,065	2,10 ± 0,075**	1,91 ± 0,094	1,44 ± 0,16*#	1,59 ± 0,11

Résultats représentant la moyenne ± ESM déterminée sur 5 animaux, test t-student et ANOVA, Tukey.
* : significativement différent de la valeur des témoins DMH(p<0,04).
** : significativement différent de la valeur des témoins (p<0,02).
: significativement différent de la valeur des animaux ayant consommé le régime hyperlipidique : 25% lipides (p<0,02).

3.1) Animaux non initiés à la DMH

Le tableau IV montre que les animaux nourris avec le régime hyperlipidique ont un taux de rétinol sérique significativement augmenté de +20% par rapport aux animaux témoins.

3.2) Animaux initiés à la DMH

Le tableau IV montre que les animaux témoins induits ne présentent pas de variation significative du taux de rétinol sérique par rapport aux animaux témoins.

Cependant la DMH administrée aux animaux nourris avec le régime hyperlipidique, diminue significativement (-31%) le taux de rétinol sérique par rapport aux animaux nourris avec le régime hyperlipidique seul.

Les lipides ingérés par les animaux induits diminuent également significativement (-25%), le taux de rétinol sérique par rapport aux animaux témoins induits.

Ces données permettent de conclure qu'il y a un effet de la DMH sur le taux de rétinol sérique mais uniquement chez les animaux ayant reçu un régime hyperlipidique.

La supplémentation du régime hyperlipidique en vitamine A n'a pas permis de mettre en évidence une variation du taux de rétinol sérique par rapport aux animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique seul.

C) Discussion partielle

Dans cette première partie, le statut des animaux consommant deux régimes riches en graisses a été étudié.

Les lipides apportent 45% de l'énergie dans le cas du régime hyperlipidique et 61% avec le régime cafétéria. Ces deux régimes riches en lipides apportent donc chacun plus de 40% de l'énergie consommée, sous forme de lipides, ce qui est, selon Giovannucci (1995) et Slattery *et al.*, (1997), un facteur de risque de cancérogenèse colique.

Ces deux régimes présentent également une composition en acides gras différente l'un de l'autre et très déséquilibrée. En effet, les acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés de la série n-6 représentent respectivement 10%, 10% et 80% de l'énergie apportée sous forme de lipides dans le régime hyperlipidique contre respectivement 38%, 47% et 14% de l'énergie apportée sous forme de lipides dans le régime cafétéria (figure 1).

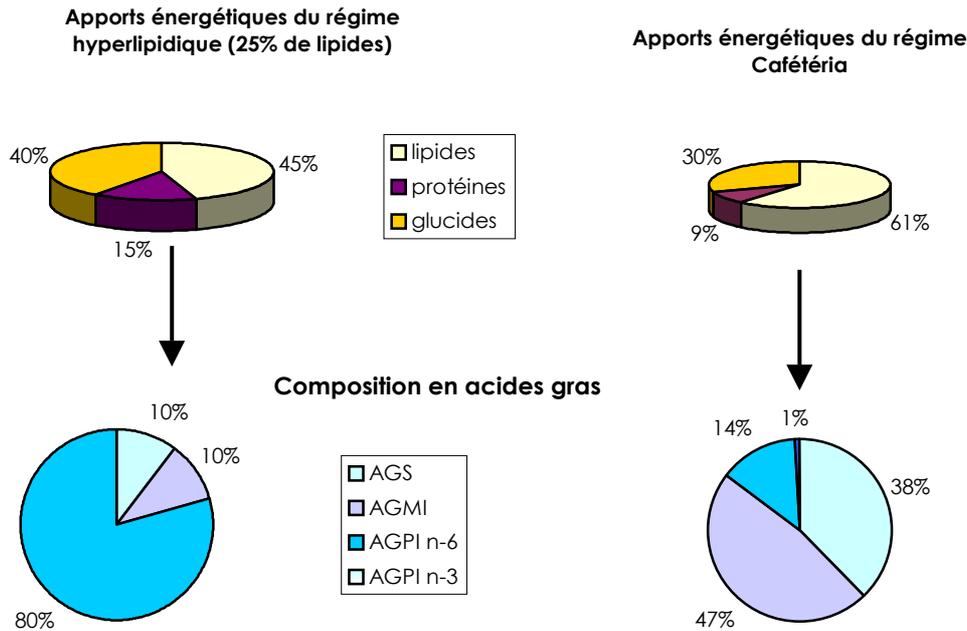


Figure 1: Apports énergétiques des différents composants consommés et composition en acides gras des régimes hyperlipidique et cafétéria

Le rapport des acides gras polyinsaturés de la série n-6 sur les acides gras polyinsaturés de la série n-3 est très différent d'un régime à l'autre. Dans le régime hyperlipidique, ce rapport est de 777 tandis que dans le régime cafétéria, il est de 15,2. Selon Bartsch *et al.*, (1999), et Greenwald *et al.*, (2001), le déséquilibre du rapport AGPI de la série n-6 sur AGPI de la série n-3 élevé serait un facteur augmentant le risque de cancer du côlon.

Le régime hyperlipidique n'induit pas de prise de poids significativement différente par rapport à celle des témoins. Ces résultats sont en accord avec ceux de Gaiva Gomes da Silva *et al.*, (1996) et Bonilla *et al.*, (2000). Ils ont montré qu'un régime supplémenté en huile n'induit pas de prise de poids significative chez les animaux par rapport à des animaux témoins. Le régime cafétéria, inducteur d'obésité, engendre une prise de poids légèrement supérieure (environ 6-7%) à celle des animaux témoins correspondant. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment rapportés par Proenza *et al.*, (1992) qui montrent une faible augmentation de poids chez des animaux nourris avec ce type d'aliments durant un mois, le surpoids ne s'installant qu'après 3 mois de régime cafétéria.

Dans la suite de notre travail, nous avons étudié l'influence de ces deux régimes, différents par la qualité et la quantité de l'apport en lipides, sur les voies de signalisation cellulaire des acides gras et des rétinoïdes dans le côlon.

Partie II

Effet de régimes riches en lipides sur l'expression des récepteurs nucléaires dans la muqueuse colique

L'objectif de ce travail est d'étudier l'influence des régimes alimentaires, « hyperlipidique » et « cafétéria », consommés pendant un mois, sur l'expression des récepteurs nucléaires des acides gras (PPAR) et de l'acide rétinoïque (RAR et RXR).

L'expression des ARNm des différents récepteurs nucléaires est mesurée par RT-PCR semi-quantitative traditionnelle (RXR α et PPAR γ) et en temps réel (RAR β).

A) Le régime cafétéria

Les résultats présentés dans le tableau V mettent en évidence une augmentation significative (+35%) de l'expression des ARNm de PPAR γ chez les animaux nourris avec le régime cafétéria, ainsi qu'une diminution significative de l'expression des ARNm de RAR β (-33%) par rapport aux animaux témoins.

L'expression des ARNm de RXR α augmente significativement de +53% par rapport aux animaux témoins.

Tableau V : Effet du régime cafétéria sur l'expression des ARNm des récepteurs RXR α , PPAR γ et RAR β dans la muqueuse colique de rat

	(%/ARNm β -actine) ¹		(%/ARNm GAPDH) ²
	RXR α	PPAR γ	RAR β (10 ⁻²)
Témoins	3,20 ± 0,10	2,00 ± 0,20	1,24 ± 0,06
Cafétéria	4,90 ± 0,20***	2,70 ± 0,20*	0,80 ± 0,12**

¹ Résultats représentant la moyenne ± ESM déterminée sur 4 pools indépendants de 2 rats, valeurs déterminées au ³²P

² Résultats représentant la moyenne ± ESM de 4 rats individuels, valeurs déterminées en sonde TaqMan

* Significativement différent de la valeur du témoin (test t-student, p<0,05).

** Significativement différent de la valeur du témoin (test t-student, p<0,02).

*** Significativement différent de la valeur du témoin (test t-student, p<0,001).

B) Le régime hyperlipidique

Les résultats présentés dans le tableau VI mettent en évidence une augmentation significative (+44%) de l'expression des ARNm de PPAR γ chez les animaux nourris avec le régime hyperlipidique par rapport aux animaux témoins, ainsi qu'une diminution significative de l'expression des ARNm de RAR β (-63%) chez ces mêmes animaux.

En revanche, l'expression des ARNm de RXR α n'est pas modifiée dans la muqueuse colique de rat après un mois de ce régime.

Tableau VI: Effet du régime hyperlipidique sur l'expression des ARNm des récepteurs RXR α , PPAR γ et RAR β dans la muqueuse colique de rat

	(%/ARNm β -actine) ¹		(%/ARNm GAPDH) ²
	RXR α	PPAR γ	RAR β (10 ⁻²)
Témoins (5%)	2,50 \pm 0,30	0,90 \pm 0,04	6,50 \pm 0,33
Hyperlipidiques : 25%	2,70 \pm 0,40	1,30 \pm 0,15*	2,35 \pm 0,17**

¹ Résultats représentant la moyenne \pm ESM déterminée sur 4 pools indépendants de 2 rats, valeurs déterminées au ³²P

² Résultats représentant la moyenne \pm ESM de 4 rats individuels, valeurs déterminées en sonde TaqMan

* Significativement différent de la valeur du témoin correspondant (test t-student, p<0,05)

** Significativement différent de la valeur du témoin correspondant (test t-student, p<0,001)

C) Discussion partielle

Quelles que soient la quantité et la qualité des lipides consommés, ces résultats montrent qu'un apport élevé en lipides induit une modification de l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires. Cela se traduit par une hyperexpression des ARNm de PPAR γ concomitante à une hypoexpression des ARNm de RAR β .

L'expression des ARNm de RXR α n'est pas modifiée par un régime riche en acides gras polyinsaturés.

De plus, il est intéressant de noter que les modifications de l'expression des ARNm de ces récepteurs nucléaires apparaissent précocement dans la muqueuse colique puisque dès un mois, il est possible de les observer.

Au laboratoire, une augmentation de l'expression des ARNm de PPAR γ et une diminution de l'expression des ARNm de RAR β avaient déjà été observées dans le tissu adipeux (où l'isoforme γ du PPAR est la plus exprimée) et dans le foie (hyperexpression de PPAR α , isoforme majoritaire dans le foie) d'animaux nourris avec le régime cafétéria (Redonnet *et al.*, 2001) ainsi que dans le foie d'animaux nourris avec le régime à 25% d'huile de carthame (Bonilla *et al.*, 2000).

Nos résultats concordent également avec ceux de Vidal-Puig *et al.*, (1996) qui ont montré une augmentation de l'expression de PPAR γ , chez l'animal, recevant un régime alimentaire riche en lipides et sa diminution lors d'un jeûne.

Il semble, en effet, que ces régimes riches en lipides induisent une activation de la voie d'action des PPAR et une hypoactivation concomitante de la voie de signalisation des rétinoïdes. Le régime cafétéria apparaît avoir une incidence plus importante sur l'expression des ARNm de RXR α .

L'intensité d'activation de la voie de signalisation des rétinoïdes dépend en grande partie de la biodisponibilité de l'acide rétinoïque dans le noyau. Cette biodisponibilité va dépendre de l'équilibre entre le stockage (sous la forme d'esters) et l'oxydation (en acide rétinoïque) du rétinol (revue dans Napoli, 1993). Un ensemble de données mettent en évidence le rôle potentiel des acides gras dans la modulation de la biodisponibilité des rétinoïdes. Les acides gras semblent, en effet, jouer un rôle dans la régulation de l'estérification du rétinol. Ce rôle a été précisé par McCloskey *et al.*, (1988). Ces auteurs ont montré que les acides gras saturés et insaturés participaient à l'augmentation du taux d'estérification du rétinol dans la lignée de macrophage J774. L'amplitude de cette estérification était fonction de la concentration en acides gras dans le milieu. Ce phénomène semble généralisable puisque ces auteurs ont aussi observé une plus forte estérification du rétinol en présence d'acides gras dans des lignées d'hépatomes humains (HepG2) ou de rats (Fu5AH), ainsi que dans la lignée de carcinome mammaire humain (MCF-7). Ces observations sont en accord avec les résultats de Randolph et Ross (1991) montrant que le statut lipidique des lignées HepG2 et MCF-7 était un paramètre clé de l'incorporation cellulaire puis de l'estérification du rétinol. La concordance des résultats obtenus sur différents types de cellules suggère fortement que les acides gras pourraient être des modulateurs de la concentration intracellulaire en rétinoïdes.

Il est aujourd'hui connu que les protéines cytoplasmiques liant les rétinoïdes (CRBPs : Cellular Retinol Binding Protein et CRABPs : Cellular Retinoic Acid Binding Protein) et les protéines cytoplasmiques liant les acides gras (FABPs) possèdent des structures et des fonctions proches, et appartiennent à une même famille de protéines dont les gènes sont bien conservés (revue dans Bass, 1993). Par ailleurs, certaines données suggèrent que ces protéines contribuent aux interférences entre le métabolisme des lipides et celui des rétinoïdes. Ainsi, Sani *et al.*, (1987) ont montré que les acides gras polyinsaturés de la série n-6 inhibaient la liaison de l'acide rétinoïque aux CRABPs. Cette inhibition, liée aux analogies de structure que présentent l'acide rétinoïque et ces acides gras (acide linoléique et acide arachidonique) pourrait être à l'origine d'une disponibilité moindre de l'acide rétinoïque dans le compartiment nucléaire. Les acides gras ont la capacité d'agir à la fois sur la synthèse et la distribution intracellulaire de l'acide rétinoïque.

La CRBP_{II}, présente dans l'intestin, peut fixer le rétinol ainsi que le rétinol. Récemment il a été montré que les acides gras insaturés induisent l'expression du gène de la CRBP_{II} dans le jejunum de rat. De plus, dans la lignée Caco-2, CRBP_{II} est induite par l'acide arachidonique et l'induction est plus importante quand l'acide arachidonique est associé à l'acide 9-*cis* rétinoïque. De plus, l'acide arachidonique pourrait réguler l'expression du gène CRBP_{II} à travers l'hétérodimère PPAR α /RXR α qui se fixe à l'élément de réponse du gène CRBP_{II} (Suruga *et al.*, 1999 a et b). La même équipe démontre *in vivo* que la CRBP_{II} est régulée par les acides gras fournis par un régime hyperlipidique (Takase *et al.*, 2000).

Ainsi l'induction de l'expression de la CRBP_{II} par les lipides alimentaires augmenterait la possibilité de stockage du rétinol (ester de rétinol). L'augmentation du stockage du rétinol sous forme estérifiée peut être envisagée dans nos conditions expérimentales. Ceci conduirait à une diminution de la biodisponibilité de l'acide rétinoïque. Ce phénomène pourrait être l'une des causes de la diminution de l'expression du RAR dans la muqueuse colique.

L'expression des ARNm de RXR α semble être modifiée selon la quantité et la qualité des lipides ingérés. En effet, dans la muqueuse colique des animaux nourris avec le régime hyperlipidique, l'expression des ARNm de RXR α n'est pas modifiée, alors que dans la muqueuse colique des animaux nourris avec le régime cafétéria,

l'expression des ARNm de RXR α augmente significativement de +63%, par rapport aux animaux témoins.

Les rats ayant consommé le régime cafétéria sont dans la phase dynamique de prise de poids induite par ce régime et la stimulation de l'expression de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α que nous observons dans le côlon, pourrait être caractéristique et probablement déterminante de cette étape. Une étude récente a, en effet, mis en évidence que l'administration à des souris d'un antagoniste de cet hétérodimère était à même de prévenir le développement de l'obésité (Yamauchi *et al.*, 2001).

Aujourd'hui, un ensemble de données permet de souligner le rôle central que joue le RXR dans la régulation de l'expression des récepteurs avec lesquels il se dimérise. L'existence d'un pool relativement stable de RXR dans la cellule, a conduit à formuler une hypothèse dans laquelle le « piégeage » des RXR par un type de récepteurs entraîne une sous activation d'autres voies de signalisation dépendantes de ce co-activateur.

Un argument en faveur de cette hypothèse a été apporté par Lehmann *et al.*, (1993). Leur étude a confirmé l'existence d'un réseau complexe d'interactions entre les récepteurs nucléaires de la sous-famille incluant les RAR et les TR. Ces auteurs ont montré que lorsque le RXR était en concentration limitante, les TR et les RAR entraient en compétition pour se lier au RXR. La séquestration du RXR par l'un des deux récepteurs aux dépens de l'autre conduisait à la répression de la voie de signalisation du récepteur privé de RXR.

Dans nos conditions expérimentales, cette hypothèse a également été émise aux vues des résultats obtenus dans le foie (Bonilla *et al.*, 2000 ; Redonnet *et al.*, 2001) et dans le tissu adipeux (Redonnet *et al.*, 2001). L'ensemble de ces données suggère donc que le RXR peut être un facteur limitant pour l'activation et/ou la répression de l'activité des récepteurs nucléaires dans la muqueuse colique de rat. Il est alors logique de penser que tout récepteur interagissant avec le RXR participe à ce jeu complexe de compétition/séquestration du RXR vis-à-vis des autres récepteurs nucléaires. Dans notre cas, il s'agit de PPAR γ et de RAR β .

D) Résumé

Nos résultats font apparaître qu'un apport élevé en lipides (quelle que soit la composition en acides gras), s'accompagne d'une augmentation de l'expression des ARNm du récepteur nucléaire PPAR γ et d'une diminution de l'expression des ARNm du récepteur nucléaire RAR β mesurée dans le côlon des rats. L'expression des ARNm des récepteurs RXR est dépendante du régime alimentaire.

Ainsi sur une période courte (un mois), un excès de lipides induit un déséquilibre de l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires appartenant à la voie de signalisation des rétinoïdes. L'amplitude de ce déséquilibre dépendrait de la teneur en lipides et surtout du rapport des AGPI n-6/n-3 très élevé plutôt que de l'apport énergétique.

Dans la suite de ce travail, nous nous sommes interrogés sur l'incidence des déséquilibres d'expression des récepteurs nucléaires induits par les lipides sur le risque de développement de cancer colique. Nous avons abordé cette question en étudiant l'influence du régime hyperlipidique (25% huile de carthame) sur le risque de développement de lésions néoplasiques. En effet, ce régime présente un rapport des AGPI n-6/n-3 plus élevé que celui du régime cafétéria.

La première étape a été la mise au point d'un protocole de cancérogenèse colique chimio-induite adaptée.

Partie III

Effet d'un régime hyperlipidique (25% d'AGPI n-6) sur le développement des lésions néoplasiques chimio-induites

A) Etude préliminaire des conditions d'initiation de la cancérogenèse colique

1) Rappel du protocole

Après un mois de régime (hyperlipidique ou témoin), une partie des animaux a été initiée à la cancérogenèse colique par une injection de DMH. Après cette injection, les animaux ont reçu les régimes pendant deux mois supplémentaires.

La dose de cancérigène utilisée devait avant tout nous permettre d'établir une éventuelle modulation de l'induction de lésions néoplasiques par le régime. Afin de déterminer la concentration de DMH adaptée, deux doses différentes de DMH (50 et 15 mg/kg) choisies d'après les travaux de Bird *et al.*, (1995) ont été successivement testées.

2) Résultats

Quel que soit le régime, tous les animaux induits présentaient des foyers de cryptes aberrantes (FCA), précurseurs des adénomes et des adénocarcinomes (Bird, 1987). Les animaux non induits n'avaient développé aucun FCA.

Les résultats obtenus chez les animaux induits à 50 mg/kg de DMH (tableau VII) ne montrent pas de différence significative entre le nombre de FCA dans la muqueuse colique des rats nourris avec le régime hyperlipidique et celui des rats témoins. Le nombre total de CA par côlon augmente chez les animaux nourris avec le régime hyperlipidique par rapport aux animaux témoins mais cette augmentation n'est pas significative. Les FCA à deux et trois CA sont les plus fréquents, puis leur nombre diminue avec l'augmentation de la multiplicité indépendamment du régime. Ainsi aucune variation significative n'a été mise en évidence chez les animaux nourris avec le régime hyperlipidique, induits à 50 mg/kg par rapport aux animaux témoins.

Nous avons ensuite réalisé une induction avec une quantité plus faible de DMH (15 mg/kg). Les résultats sont présentés dans le tableau VII.

Tableau VII: Effet d'un régime hyperlipidique sur le développement des foyers de cryptes aberrantes après 3 mois de régime

Induction	Régimes	Incidence ¹	Nombre de FCA/côlon	Nombre de CA/côlon	FCA/CA	Multiplicité	
						1 à 3 CA	4 à 6 CA
50 mg/kg	Témoins	6/6	39,83 ± 4,40	81,00 ± 16,00	2,48 ± 0,11	11,11 ± 1,40	2,17 ± 0,56
	25%	6/6	39,33 ± 3,40	103,50 ± 18,00	2,60 ± 0,08	9,07 ± 0,97	2,04 ± 0,62
15 mg/kg	Témoins	6/6	29,33 ± 5,90	69,17 ± 16,00	2,31 ± 0,18	8,39 ± 1,10	1,39 ± 0,46
	25%	6/6	22,83 ± 7,30	60,00 ± 18,00	2,79 ± 0,24	5,94 ± 1,30	1,67 ± 0,46

¹ nombre de côlons présentant des FCA sur le nombre total de côlons observés
 Résultats représentant la moyenne ± ESM déterminée sur 6 animaux, test t-student et ANOVA, Tukey.

Le tableau VII montre qu'il n'y a pas de variation significative du nombre total de FCA et CA par côlon chez les animaux nourris avec le régime hyperlipidique induits à 15 mg/kg par rapport aux animaux témoins correspondants. L'augmentation de CA non significative, mise en évidence avec 50 mg/kg de DMH n'est plus observable avec cette dose plus faible.

3) Discussion

Cette étude préliminaire n'a pas permis de mettre en évidence de variations significatives dans le développement de FCA chez les animaux nourris avec le régime hyperlipidique. Ces résultats sont par ailleurs en accord avec ceux de Nicholson *et al.*, (1990) et Klurfeld et Bull, (1997) qui avaient montré que les AGPI de la série n-6 n'augmentaient pas le risque de cancérogenèse colique.

Le fait que nos résultats ne soient pas significatifs, en particulier avec 50 mg/kg, pourrait être dû à un nombre insuffisant de rats et à la grande variabilité de réponse des animaux. D'après Bird et Lafave (1995), les régimes hyperlipidiques exercent un effet variable sur l'apparition des FCA qui dépendrait de la dose de cancérogène utilisé. Selon eux, plus la dose employée est faible, plus elle permet de mettre en évidence l'effet des AG sur le développement des FCA. C'est pourquoi pour la suite de la démonstration de notre hypothèse de travail, le choix de l'induction s'est porté sur la dose de 15 mg/kg.

L'absence de différences significatives quant au nombre de FCA en fonction de l'apport en AGPI de la série n-6 dans les régimes, pourrait par ailleurs être due à la durée de notre protocole. A ce sujet, les données de la littérature sont divergentes.

D'après les études les plus récentes, la durée pertinente d'un protocole expérimental destiné à mettre en évidence une association positive entre l'alimentation lipidique et le risque de cancer du côlon par dénombrement des FCA se situe entre trois et cinq mois. En effet, les durées de régime vont de trois mois avec des régimes hyperlipidiques (AGPI des séries n-6 et n-3) (Good *et al.*, 1998) à cinq mois avec des régimes dont 5% de l'énergie sont apportés par des lipides dont la qualité diffère (AGPI des séries n-3 ; n-6 ou n-9) (Bartoli *et al.*, 2000).

Ainsi pour continuer ce travail, nous avons choisi d'induire les animaux avec une dose de DMH faible (15 mg/kg) mais en augmentant sensiblement la durée du protocole puisque nous avons administré le régime pendant cinq mois. De plus, nous avons, dans le même temps étudié l'effet de la vitamine A en l'administrant à certains animaux conjointement au régime hyperlipidique.

B) Effet d'un régime hyperlipidique et d'une supplémentation en vitamine A sur le développement de lésions néoplasiques chimio-induites

1) Rappel du protocole

Trois séries de rats ont été mises en place pendant cinq mois. Les animaux ont reçu un régime contenant soit 5% de lipides soit 25 % de lipides supplémentés ou non en palmitate de rétinol (200 UI/g de régime). Après un mois de régime, un groupe d'animaux de chaque lot a été induit avec 15 mg/kg de DMH.

2) Résultats

Le tableau VIII montre que le régime hyperlipidique augmente le nombre de FCA/côlon et surtout le nombre de CA par côlon (+57% et 84% respectivement) mais cette augmentation n'est pas significative. Cependant les FCA comprenant entre 4 et 6 CA ainsi que ceux comprenant 7 à 12 CA sont significativement plus nombreux chez les animaux nourris avec le régime hyperlipidique que chez les animaux témoins (+134%, $p < 0,01$ et +300%, $p < 0,054$) respectivement.

Tableau VIII: Effet d'un régime hyperlipidique enrichi ou non en vitamine A sur le développement des foyers de cryptes aberrantes après 5 mois de régime (15 mg/kg)

Régimes	Incidence ¹	Nombre de FCA/côlon	Nombre de CA/côlon	FCA/CA	Multiplicité		
					1 à 3 CA	4 à 6 CA	7 à 12 CA
Témoins	7/7	21,29±1,80	61,86±5,70	2,92±0,16	5,05±0,63	1,81±0,33	0,10±0,06
25%	7/7	33,43±9,40	113,86±29,00	3,46±0,25	6,29±1,20	4,24±0,75#	0,30±0,09 !
25%+VitA	9/9	13,22±2,60*	42,67±7,60**	3,41±0,29	2,56±0,49***	1,63±0,40***	0,13±0,05

¹ nombre de côlon de rats possédant des FCA divisé par le nombre total de côlons observés
 Résultats représentant la moyenne ± ESM déterminée sur n animaux, test t-student et ANOVA, Tukey.
 #: significativement différent des animaux ayant reçu le régime témoin (5%) (p<0,01).
 ! : limite de la signification par rapport aux animaux ayant reçu le régime témoin (5%) (p<0,054).
 * : significativement différent des animaux ayant reçu le régime hyperlipidique (25%) (p<0,04).
 ** : significativement différent des animaux ayant reçu le régime hyperlipidique (25%) (p<0,02).
 *** : significativement différent des animaux ayant reçu le régime hyperlipidique (25%) (p<0,01).

Les animaux recevant le régime hyperlipidique supplémenté en vitamine A présentent significativement moins de FCA et de CA par côlon (≈-60%) que les animaux ne recevant que le régime hyperlipidique. De plus la multiplicité des FCA développés est significativement moins importante puisque les FCA comprenant une à trois CA diminuent de -60% et les FCA composés de 4 à 6 CA diminuent de -61%.

3) Discussion

Nos résultats mettent en évidence une augmentation significative de la multiplicité des FCA chez les animaux nourris avec le régime hyperlipidique par rapport aux animaux témoins. Des études suggèrent qu'il existe un fort degré de corrélation entre le nombre de CA qui composent les foyers de cryptes aberrantes et les conséquences de l'apparition des tumeurs coliques (McLellan *et al.*, 1991 ; Bird, 1995). Ainsi, les animaux soumis au régime hyperlipidique développent plus de « gros » FCA qui, à long terme, pourront donner naissance à des tumeurs coliques. Ces résultats sont en accord avec ceux de Rao *et al.*, (2001) montrant qu'un régime mixte (≈12,5% AGS et ≈12,5% AGPI de la série n-6) affecte la multiplicité des FCA contenant quatre ou plus de quatre CA par foyer dans le côlon.

La vitamine A apportée dans le régime induit une diminution du nombre des lésions néoplasiques. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études menées

dans le laboratoire, qui ont montré que l'administration de vitamine A, pendant ou après un traitement avec un cancérigène chimique pouvait atténuer l'initiation ou la progression tumorale de la cancérogenèse colique (Cassand *et al.*, 1997, Mazière *et al.*, 1998).

D'autres équipes ont également mis en évidence l'action de différents métabolites de la vitamine A sur la cancérogenèse colique. Ainsi Stopera et Bird, (1993) ont montré que l'acide rétinoïque *tout-trans*, métabolite actif de la vitamine A, diminue le nombre, la multiplicité des FCA et le développement de tumeurs chez le rat (Narahara *et al.*, 2000). L'acide 9-*cis* rétinoïque (autre métabolite actif de la vitamine A) diminue le développement des FCA ainsi que le taux de prolifération cellulaire dans les adénomes formés (Pereira *et al.*, 1999) et diminue l'apparition de tumeurs coliques chez des rats chimio-induits par l'AOM (Zheng *et al.*, 1999).

C) Discussion partielle

La distribution des foyers de cryptes aberrantes le long de tous les côlons étudiés est identique pour tous les animaux: le nombre de FCA observés dans le côlon distal est toujours supérieur au nombre de foyers dans les autres segments du côlon (observations non quantifiées). Ces résultats sont corrélés aux observations faites chez l'Homme où les tumeurs coliques se développent principalement dans le côlon distal (Seed, 1998).

Ce travail a permis de mettre en évidence la modulation par un régime hyperlipidique (riche en AGPI de la série n-6) du développement de CA et de FCA chimio-induits. Rappelons que le régime étudié apporte 45% de l'énergie consommée sous forme de lipides et que le rapport des AGPI de la série n-6 sur les AGPI de la série n-3 est très important (777). Ces résultats sont corrélés aux données bibliographiques déjà citées dans le chapitre I qui indiquent une relation entre d'une part des apports élevés en énergie (+30%) due aux lipides, d'autre part, un rapport AGPI de la série n-6 sur AGPI de la série n-3 élevé et le risque de cancer du côlon. Nos travaux semblent également montrer que les AGPI de la série n-6 augmentent le risque de cancer colique. Cependant le régime utilisé dans cette étude contenait une infime quantité d'AGPI de la série n-3 qui sont rapportés dans la littérature comme diminuant le risque de cancer colique chez le rat chimio-induit (Paulsen *et*

al., 1997 ; Collett *et al.*, 2001). L'effet du régime hyperlipidique sur le développement de lésions néoplasiques que nous avons observé pourrait être également attribué à l'absence d'AGPI de la série n-3.

En accord avec Rao *et al.*, (2001), nos résultats montrent que la durée d'exposition aux acides gras est aussi importante que la quantité et la qualité des lipides consommés.

Notre étude a également permis de mettre en évidence un effet antagoniste de la vitamine A par rapport aux lipides vis-à-vis du développement des lésions néoplasiques. Ces résultats sont à corrélés avec ceux de (Newberne *et al.*, 1990). Ces auteurs ont, en effet, montré les relations entre des acides gras et la vitamine A dans la cancérogenèse colique. Selon eux, un régime riche en lipides (24% d'huile de maïs) carencé en vitamine A favorise le développement des FCA ainsi que la progression tumorale contrairement au même régime supplémenté ou non en vitamine A.

Il faut, cependant, noter que tous les groupes d'animaux ayant consommé le régime hyperlipidique seul, présentent une grande variabilité de développement de lésions néoplasiques en réponse au régime alimentaire. L'ajout de vitamine A dans le régime hyperlipidique diminue considérablement cette dispersion. La réponse des animaux dans ces conditions est très homogène, ce qui augmente la signification des résultats et traduit un effet important de la vitamine A. Le nombre de FCA/côlon et de CA/côlon diminue même significativement par rapport aux animaux témoins (-38% et -31% respectivement).

Ces résultats mettent en évidence l'existence d'une modulation du risque de cancérogenèse colique par l'alimentation.

Devant les résultats obtenus après dénombrement des FCA dans nos différentes conditions expérimentales, il semblerait qu'il y ait une interaction entre les acides gras et la vitamine A. Afin de savoir si cette interaction est médiée par la voie de signalisation des rétinoïdes, nous nous sommes intéressés aux récepteurs nucléaires impliqués dans cette voie.

D) Résumé

L'objectif de ce travail était d'étudier l'influence d'un régime hyperlipidique (riche en AGPI de la série n-6) supplémenté ou non en vitamine A sur l'apparition de FCA. Après une étude préliminaire des conditions d'initiation (trois mois de régime, 50 ou 15 mg/kg de DMH), un protocole d'une durée de cinq mois a été mis en place.

Les résultats de cette étude font apparaître que le régime hyperlipidique (25% huile de carthame) augmente l'incidence des FCA dans le côlon des rats et surtout leur multiplicité. Les foyers présentant plus de trois cryptes aberrantes ont une grande probabilité d'évolution en adénocarcinome (Reddy *et al.*, 1991; Pretlow *et al.*, 1992). Le régime hyperlipidique semble donc favoriser le risque de cancer colique.

La vitamine A, quant à elle, a un effet antagoniste à celui des lipides sur le développement des FCA.

L'ensemble de ces résultats met en évidence la possibilité d'une modulation du risque de cancer par l'alimentation, sa composition en lipides, en vitamine A.

Dans la suite de notre travail, nous nous sommes attachés à étudier l'implication des voies de signalisation des acides gras et des rétinoïdes dans la modulation du risque de cancer. Pour ce faire, nous avons mesuré l'expression des ARNm de PPAR γ , RAR β et RXR α dans nos différentes conditions. Nous avons également étudié l'expression de gènes, marqueurs précoces de la cancérogenèse, les cyclooxygénases et la β -caténine, pour déterminer si les différentes conditions alimentaires étaient susceptibles d'influencer leur expression.

Partie IV

Effet d'un régime hyperlipidique et d'une supplémentation en vitamine A sur l'expression de gènes dans le côlon de rats.

Des études épidémiologiques ont montré qu'une alimentation riche en lipides favorisait le risque de cancer du côlon. Les acides gras ont la capacité de moduler certaines fonctions du noyau ainsi que l'expression de gènes impliqués dans les processus de prolifération ou de différenciation cellulaire via un récepteur nucléaire : le PPAR. Nos travaux ont montré que les lipides alimentaires régulaient positivement l'expression de PPAR γ dans la muqueuse colique ainsi que le développement de FCA chimio-induits, participant ainsi à l'augmentation du risque de développement de cancer du côlon. Dans un premier temps, nous avons étudié le profil d'expression des récepteurs nucléaires PPAR γ , RAR β et RXR α dans la muqueuse colique d'animaux nourris avec un régime hyperlipidique administré pendant cinq mois et induits à la DMH ainsi qu'une supplémentation en vitamine A. Dans un deuxième temps, nous avons étudié des marqueurs précoces de cancérogenèse qui devaient nous renseigner sur la modulation du risque de cancer colique par nos différentes conditions expérimentales. Pour ce faire, nous avons mis en place un protocole dans lequel après un mois de régime, une partie des animaux a été initiée à la cancérogenèse colique par la DMH (15 mg/kg). Les animaux ont ensuite été soumis aux régimes pendant quatre mois supplémentaires. Le profil d'expression des récepteurs nucléaires et des cyclooxygénases a été élaboré en mesurant l'expression des ARNm par RT-PCR semi-quantitative en temps réel dans la muqueuse colique de rat. L'expression des protéines PPAR γ , COX-1 et β -caténine a également été déterminée par western-blot.

A) Expression des récepteurs nucléaires

1) Expression des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes : PPAR γ

1.1) Expression des ARNm de PPAR γ

Tableau IX: Effet du régime hyperlipidique supplémenté ou non en vitamine A et de la DMH sur l'expression des ARNm de PPAR γ dans la muqueuse colique de rat

(% expression ARNm PPAR γ / ARNm GAPDH)				
Témoins	25% lipides	Témoins + DMH	25% lipides + DMH	25% lipides + DMH+Vit A
1,31 \pm 0,33	3,85 \pm 0,16***	3,65 \pm 0,25***	5,77 \pm 0,45*#	2,91 \pm 0,21**

Résultats représentant la moyenne \pm ESM déterminée sur 4 animaux, test t-student et ANOVA, Tukey.

: significativement différent des animaux ayant reçu le régime hyperlipidique (25%) ($p < 0,01$).

* : significativement différent des animaux ayant reçu le régime témoin + DMH (5% + DMH) ($p < 0,01$).

** : significativement différent des animaux ayant reçu le régime hyperlipidique + DMH (25%+DMH) ($p < 0,001$).

*** : significativement différent des animaux ayant reçu le régime témoin (5%) ($p < 0,001$).

1.1.1) Animaux non initiés à la DMH

Les résultats présentés dans le tableau IX mettent en évidence une augmentation significative (+194%) de l'expression des ARNm de PPAR γ chez les animaux nourris avec le régime hyperlipidique par rapport aux animaux témoins. Il y a donc un effet du régime hyperlipidique sur l'expression des ARNm du récepteur nucléaire PPAR γ dans la muqueuse du côlon.

1.1.2) Animaux initiés à la DMH

L'administration de DMH entraîne une augmentation significative (+179%) du taux des ARNm de PPAR γ chez les animaux témoins par rapport aux animaux témoins non induits. De même, les animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique présentent une augmentation significative (+50%) de l'expression des ARNm de PPAR γ par rapport aux animaux non induits ayant consommé le régime hyperlipidique. Ces données permettent de conclure que l'injection de DMH induit une augmentation de l'expression des ARNm de PPAR γ quel que soit le régime.

Chez les animaux induits, une alimentation quotidienne riche en lipides augmente significativement (+58%), le taux d'ARNm de PPAR γ par rapport aux animaux témoins induits. Ces résultats permettent de conclure qu'il y a un effet du régime hyperlipidique sur l'expression des ARNm de PPAR γ chez les animaux induits à la DMH.

Si on compare l'effet du régime hyperlipidique administré chez les animaux induits ou non, on constate une augmentation moins importante de PPAR γ chez les animaux induits.

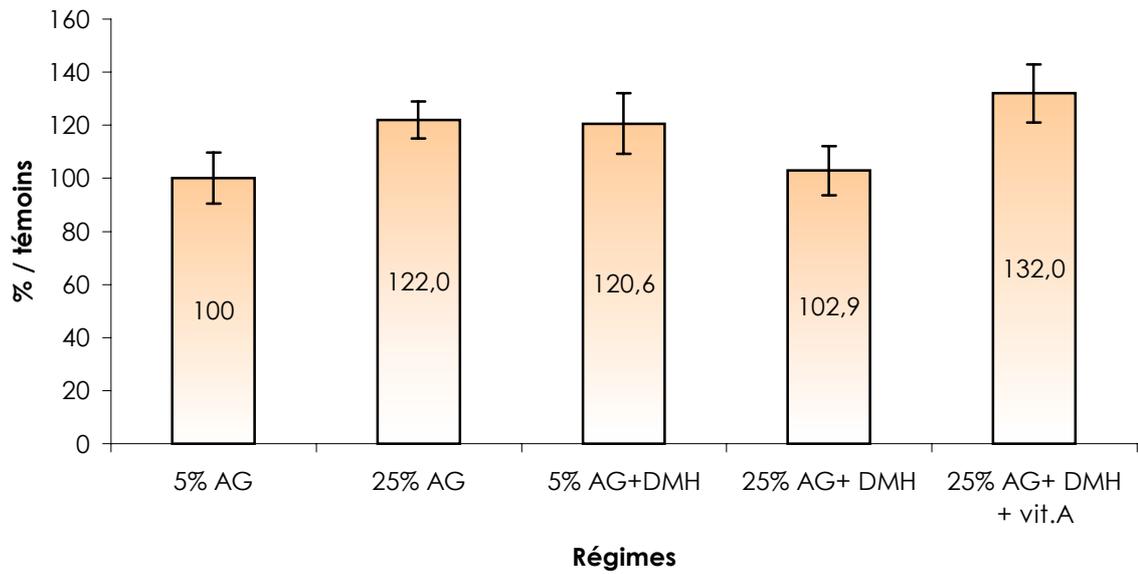
Lorsque l'on supplémente le régime hyperlipidique avec de la vitamine A, on observe une augmentation de l'expression des ARNm de PPAR γ par rapport aux animaux témoins non induits. Cette augmentation est induite par les lipides mais l'effet du régime hyperlipidique est moins important sur l'augmentation de l'expression de PPAR γ . La vitamine A semble avoir un effet antagoniste à celui du régime hyperlipidique et de la DMH sur l'expression des ARNm de PPAR γ .

1.2) Expression de la protéine PPAR γ

Pour compléter l'étude de l'expression de PPAR γ dans nos différentes conditions expérimentales, nous avons étudié son expression protéique par western blot. Les résultats sont présentés dans la figure 2. Ils sont exprimés en fonction des rats témoins (5% de lipides).

Un exemple d'autoradiographie, obtenue par la technique de western blot réalisée pour révéler la protéine PPAR γ (co-révélee avec une protéine de référence, la β -actine) est présenté sur la figure 3. Cette autoradiographie représente la variation de l'expression de la protéine PPAR γ dans le tissu colique de rats dans nos différentes conditions expérimentales.

Quel que soit le régime, aucune différence significative de l'expression de la protéine PPAR γ n'est observée chez ces animaux par rapport à leurs témoins correspondants (figure 2 et 3).



Résultats représentant la moyenne \pm ESM déterminée sur 3 animaux.

Figure 2: Effet des régimes sur l'expression de la protéine PPAR γ , dans le tissu colique de rats.

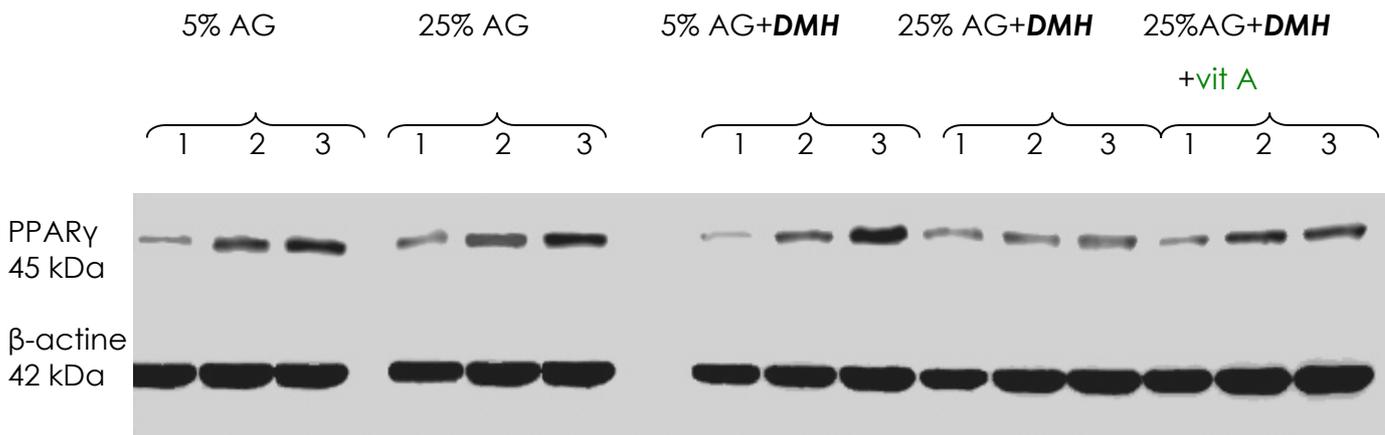


Figure 3: Autoradiographie des protéines PPAR γ et β -actine

Quantité de protéines déposées dans chaque puits pour chacun des régimes: (1) 5 μ g; (2) 10 μ g; (3) 15 μ g

2) Expression des récepteurs de l'acide rétinoïque *tout-trans* : **RAR β**

Tableau X: Effet du régime hyperlipidique supplémenté ou non en vitamine A et de la DMH sur l'expression des ARNm de RAR β dans la muqueuse colique de rat

(% expression ARNm RAR β / ARNm GAPDH) x10 ⁻²				
Témoins	25% lipides	Témoins + DMH	25% lipides + DMH	25% lipides DMH+Vit A
5,00 ± 0,55	1,30 ± 0,15**	2,40 ± 0,19**	0,60 ± 0,11***	1,00 ± 0,12*

Résultats représentant la moyenne ± ESM déterminée sur 4 animaux, test t-student et ANOVA, Tukey.

* : significativement différent des animaux ayant reçu le régime hyperlipidique + DMH (25%+DMH) ($p < 0,05$).

** : significativement différent des animaux ayant reçu le régime témoin (5%) ($p < 0,01$).

*** : significativement différent des animaux ayant reçu le régime témoin + DMH (5%+DMH) ($p < 0,001$).

2.1) Animaux non initiés à la DMH

Les résultats présentés dans le tableau X mettent en évidence une diminution significative (-74%) du taux des ARNm de RAR β chez les animaux nourris avec le régime hyperlipidique par rapport aux animaux témoins. Il y a donc un effet du régime hyperlipidique sur l'expression des ARNm de RAR β dans la muqueuse du côlon.

2.2) Animaux initiés à la DMH

L'administration de DMH entraîne une diminution significative (-52%) du taux des ARNm de RAR β chez les animaux témoins par rapport aux animaux témoins non induits. Ces données permettent de conclure que l'injection de DMH induit une diminution de l'expression des ARNm du récepteur nucléaire RAR β chez les animaux témoins.

Chez les animaux induits, une alimentation quotidienne riche en lipides diminue significativement (-75%) le taux d'ARNm de RAR β par rapport aux animaux témoins induits. Ces résultats permettent de conclure qu'il y a un effet du régime hyperlipidique sur l'expression des ARNm de RAR β chez les animaux induits à la DMH.

Si on compare l'effet du régime hyperlipidique administré chez les animaux induits ou non, on constate une diminution identique du taux d'ARNm de RAR β .

Lorsque l'on supplémente le régime hyperlipidique avec de la vitamine A, on observe une diminution de l'expression des ARNm de RAR β par rapport aux animaux témoins induits. Cette diminution est induite par les lipides mais l'effet du régime hyperlipidique est moins important sur la diminution de l'expression de RAR β par rapport aux animaux témoins induits ou non. La vitamine A semble avoir un effet antagoniste à celui du régime hyperlipidique et de la DMH sur l'expression des ARNm de RAR β .

3) Expression des récepteurs de l'acide 9-cis rétinoïque : **RXR α**

Tableau XI : Effet du régime hyperlipidique supplémenté ou non en vitamine A et de la DMH sur l'expression des ARNm de RXR α dans la muqueuse colique de rat

(% expression ARNm RXR α / ARNm GAPDH)				
Témoins	25% lipides	Témoins + DMH	25% lipides + DMH	25% lipides + DMH+Vit A
6,80 \pm 0,75	6,13 \pm 0,65	5,35 \pm 0,60	2,74 \pm 0,42*#	11,93 \pm 0,74**

Résultats représentant la moyenne \pm ESM déterminée sur 4 animaux, test t-student et ANOVA, Tukey.

* : significativement différent des animaux ayant reçu le régime témoin + DMH (5% + DMH) ($p < 0,01$).

** : significativement différent des animaux ayant reçu le régime hyperlipidique + DMH (25% + DMH) ($p < 0,001$).

: significativement différent des animaux ayant reçu le régime hyperlipidique (25%) ($p < 0,01$).

3.1) Animaux non initiés à la DMH

Le tableau XI montre qu'après cinq mois de régime hyperlipidique, il n'y a pas de modification de l'expression de RXR α .

3.2) Animaux initiés à la DMH

Les animaux témoins ayant reçu une injection de DMH ne présentent aucune variation significative de l'expression des ARNm de RXR α par rapport aux animaux témoins non induits. Tandis que chez les animaux nourris avec le régime hyperlipidique, l'administration de DMH entraîne une diminution significative (-55%)

du taux d'ARNm de RXR α . Ces données permettent de conclure qu'il y a un effet de la DMH sur l'expression des ARNm du récepteur nucléaire RXR α .

Chez les animaux induits, une alimentation quotidienne riche en lipides diminue significativement (-49%), le taux d'ARNm de RXR α par rapport aux animaux témoins induits. Ces résultats permettent de conclure qu'il y a un effet du régime hyperlipidique sur l'expression des ARNm de RXR α chez les animaux induits à la DMH.

Lorsque l'on supplémente le régime hyperlipidique avec de la vitamine A, on observe une augmentation significative (+335%) de l'expression des ARNm de RXR α par rapport aux animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique seul. Cette augmentation est induite par la vitamine A. La vitamine A semble donc avoir un effet antagoniste à celui du régime hyperlipidique et de la DMH sur l'expression des ARNm de RXR α .

4) Discussion partielle

4.1) Régimes hyperlipidiques et expression du récepteur nucléaire **PPAR γ**

Après cinq mois de régime hyperlipidique, l'expression des ARNm du récepteur nucléaire PPAR γ augmente significativement. Il y a donc une régulation positive de l'expression des ARNm du récepteur nucléaire PPAR γ par les lipides.

L'administration d'un cancérogène à des animaux consommant quotidiennement un régime riche en lipides, accentue l'hyperexpression du taux des ARNm de PPAR γ . Il semble avoir une synergie des effets du régime hyperlipidique et de la DMH sur l'expression des ARNm de PPAR γ .

Ces résultats confortent le rôle potentiel du récepteur nucléaire PPAR γ et de ses ligands naturels dans la cancérogenèse du côlon. En effet, les résultats de cette étude menée *in vivo* sont en accord avec les données bibliographiques. Des données épidémiologiques ont montré une forte corrélation entre l'augmentation du risque de cancer colique et la consommation d'acides gras polyinsaturés qui sont des ligands de PPAR γ (Giovanucci *et al.*, 1994 ; Wasan *et al.*, 1997), et la réduction du risque de cancer par la prise d'AINS dont les mécanismes sont mal connus, mais pourraient être médiés par une diminution de la production de PGJ2, activateurs de PPAR γ .

L'expression des ARNm de PPAR γ chez les animaux induits à la DMH suit la même évolution que le développement des FCA. En effet, chez les animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique, le nombre total de FCA et de CA par côlon

augmente et la multiplicité des FCA constitués de quatre à six CA est significativement plus importante (+134%) par rapport aux animaux témoins induits. Parallèlement, le taux des ARNm de PPAR γ augmente significativement chez les animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique par rapport aux animaux témoins induits.

La littérature montre que chez l'Homme, comme chez la souris, l'ARNm et la protéine PPAR γ sont fortement exprimés dans les adénomes et les adénocarcinomes de côlon (Mansén *et al.*, 1996 ; Fajas *et al.*, 1997 ; Hafraoui *et al.*, 1999 ; Lefebvre *et al.*, 1999). Plus particulièrement, deux études réalisées par deux groupes différents ont montré que l'activation de PPAR γ peut promouvoir le développement de polypes (Saez *et al.*, 1998) et d'adénocarcinomes coliques chez la souris C57BL/6J-APC^{Min/+} (Lefebvre *et al.*, 1998), modèle animal proche cliniquement de la polypose adénomateuse familiale et du cancer colique sporadique chez l'Homme (Su *et al.*, 1992 ; Nishisho *et al.*, 1991). Dans ces études, l'activation de PPAR γ par deux ligands synthétiques différents augmente la fréquence et la taille des tumeurs du côlon (Lefebvre *et al.*, 1998 ; Saez *et al.*, 1998). De plus, dans différents modèles animaux, le développement du cancer colorectal est influencé par les prostaglandines, ligands naturels de PPAR γ .

D'autres études, en revanche, vont à l'encontre de celles citées précédemment. En effet, Kohno *et al.*, (2001) et Tanaka *et al.*, (2001) ont montré que le troglitazone, ligand synthétique de PPAR γ , administré pendant les trois premières semaines du protocole (12 semaines), pouvait inhiber la formation des FCA par l'AOM (40 mg/kg) chez le rat. De plus, Desreumaux *et al.*, (2001) ont montré que les pathologies inflammatoires coliques étaient atténuées grâce à des ligands, activateurs de l'hétérodimère PPAR γ /RXR.

Dans nos conditions expérimentales, nos résultats concernant l'expression de la protéine PPAR γ ne montrent aucune variation significative contrairement à l'expression des ARNm. Cette étude pour être approfondie devrait utiliser une autre technique plus fine de quantification des récepteurs nucléaires: le retard sur gel.

L'administration de vitamine A dans le régime hyperlipidique des rats permet de diminuer significativement le nombre total de FCA et de CA par rapport aux animaux, induits nourris avec le régime hyperlipidique seul. Il en est de même du taux des ARNm de PPAR γ (-50%). Il semblerait donc qu'il existe un lien entre la

diminution de l'expression des ARNm de PPAR γ et la baisse du nombre de FCA développés donc que la diminution du risque de développer un cancer colique chez ces mêmes animaux.

A notre connaissance, c'est la première fois qu'il est montré un effet de la vitamine A sur l'expression du PPAR γ . Cet effet serait-il dû à l'interaction des voies de signalisation des récepteurs nucléaires (RAR, RXR et PPAR) activés par les acides gras ou activés par l'acide rétinoïque?

4.2) Régimes hyperlipidiques et expression du récepteur nucléaire **RAR β**

Après cinq mois de régime hyperlipidique, on constate une diminution significative du taux des ARNm du récepteur nucléaire RAR β . Ces résultats mettent donc en évidence l'incidence d'un régime hyperlipidique sur l'expression des ARNm de RAR β . Ces résultats confortent ceux trouvés antérieurement dans le laboratoire. En effet, un régime riche en lipides, quelles que soient la qualité et la teneur en acides gras, diminue le taux d'ARNm de RAR β dans le foie et le tissu adipeux (Bonilla *et al.*, 2000 ; Redonnet *et al.*, 2001).

L'administration d'un cancérogène à des animaux consommant quotidiennement un régime riche en lipides, accentue l'hypoexpression du taux des ARNm de RAR β . Il semble y avoir une synergie des effets du régime hyperlipidique et de la DMH sur l'expression des ARNm de RAR β dans la muqueuse colique de rat.

L'expression des ARNm de RAR β chez les animaux induits à la DMH varie à l'inverse du développement des FCA. En effet, chez les animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique, le nombre total de FCA par côlon augmente ainsi que la multiplicité des FCA par rapport aux animaux témoins induits. Parallèlement, l'expression des ARNm du récepteur nucléaire RAR β diminue significativement chez les animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique.

Le gène RAR β est un gène suppresseur de tumeur (revue dans Altucci et Gronemeyer, 2001). Son hypoexpression dans la muqueuse colique de rats ayant consommé un régime riche en lipides peut en partie expliquer pourquoi les régimes riches en graisses augmentent le risque de cancer du côlon. Cependant le ou les mécanismes par lesquels les acides gras agissent sur l'expression de RAR β ne sont pas clairs.

Nos résultats montrent une diminution précoce de l'expression des ARNm du récepteur nucléaire RAR β . Ces résultats sont à corrélés avec ceux de Houle et Bradley (1993). Ces auteurs ont montré l'absence d'expression de RAR β dans les lignées dérivées de polypes intestinaux qui constituent des lésions pré-cancéreuses. Ceci laisse à penser que l'inactivation de RAR β constitue un événement qui se produit tôt au cours de la progression néoplasique. De plus, la plupart des lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinomes du côlon n'expriment pas ce gène. Ces auteurs ont également montré que la perte de l'expression du récepteur nucléaire RAR β est associée à la progression tumorale.

La supplémentation du régime hyperlipidique en vitamine A induit l'expression des ARNm de RAR β et augmente significativement son expression de +66% par rapport aux animaux induits consommant le régime hyperlipidique seul.

Chez ces mêmes animaux, le nombre total de FCA et de CA diminue également significativement par rapport aux animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique seul. Il semblerait qu'il existe un lien négatif entre l'hypoexpression des ARNm de RAR β et le développement des FCA induits par la DMH, donc avec le risque de cancer du côlon.

A notre connaissance, c'est la première fois que l'hypoexpression des ARNm de RAR β concomitante à l'hyperexpression du taux des ARNm de PPAR γ est mise en évidence dans la muqueuse colique de rat et associée au développement de FCA dans une situation d'alimentation riche en lipides.

L'interaction des voies de signalisation des acides gras et de la vitamine A passe par le RXR α qui joue un rôle central dans l'hétérodimérisation des récepteurs nucléaires. A ce titre, l'action cellulaire de PPAR γ ou de RAR β dépendra de la biodisponibilité de ce co-activateur. Qu'en est-il de son expression dans nos conditions expérimentales ?

4.3) Régimes hyperlipidiques et expression du récepteur nucléaire **RXR α**

Le régime hyperlipidique ainsi que la DMH, diminuent significativement le taux des ARNm de RXR α dans la muqueuse colique de rat induits.

La supplémentation du régime hyperlipidique en vitamine A induit l'expression des ARNm de RXR α et augmente significativement son expression de +335% par rapport aux animaux induits consommant le régime hyperlipidique seul.

L'expression des ARNm de RXR α ainsi que celle de RAR β chez les animaux induits à la DMH varie à l'inverse du développement des FCA. Il semblerait qu'il existe une relation entre le taux des ARNm de RXR α et le développement des FCA ce qui pourrait augmenter le risque de cancer colique.

Dans certaines conditions et par synergie avec les rétinoïdes, les ligands du récepteur nucléaire RXR, appelés rexinoïdes, peuvent être requis aussi bien pour l'induction de l'apoptose que pour inhiber la croissance cellulaire. Le RXR est donc devenu non seulement un partenaire silencieux d'autres récepteurs nucléaires mais également un transducteur actif de signaux suppresseurs de tumeurs (pour revue Altucci et Gronemeyer, 2001). Ainsi, son expression induite par la vitamine A pourrait expliquer la diminution du développement des FCA chez les animaux dont le régime est supplémenté en vitamine A par rapport aux animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique seul.

Ces résultats permettent d'associer un déséquilibre d'expression des ARNm des récepteurs nucléaires PPAR γ , RAR β et RXR α avec le développement de FCA dans un contexte d'alimentation riche en lipides. Dans ces conditions expérimentales, quelle est l'expression des cyclooxygénases et de la β -caténine, marqueurs précoces de cancérogenèse colique ?

B) Expression de marqueurs précoces de cancérogenèse colique

1) Expression de la cyclooxygénase 1 : COX-1

Les acides gras polyinsaturés sont à l'origine d'une cascade de réactions d'oxydation qui donnent lieu à des métabolites très actifs. Ces métabolites, en particulier les prostaglandines et les éicosanoïdes, semblent impliqués dans les différentes phases de la cancérogenèse (Eschwège *et al.*, 2001). Leur synthèse met en jeu une cyclooxygénase dont l'isoforme COX-1 est constitutive dans beaucoup de tissus, tandis que l'isoforme COX-2 est inductible, entre autres, par les cytokines, les facteurs de croissance, les promoteurs de tumeurs ou d'autres agents après l'initiation d'événements physiologiques spécifiques (Kliwer *et al.*, 1998). De plus, l'isoforme COX-2 est surexprimée dans 85 à 90% des cancers humains colorectaux (ShattuckBrandt *et al.*, 1999).

1.1) Expression des ARNm de COX-1

Tableau XII : Effet du régime hyperlipidique supplémenté ou non en vitamine A et de la DMH sur l'expression des ARNm de COX-1 dans la muqueuse colique de rat

(% expression ARNm COX-1/ ARNm GAPDH)				
Témoins	25% lipides	Témoins + DMH	25% lipides + DMH	25% lipides DMH+Vit A
17,83 ± 1,96	13,68 ± 1,09	13,68 ± 1,12	16,37 ± 1,22	20,10 ± 1,64

Résultats représentant la moyenne ± ESM déterminée sur 4 animaux.

Quelles que soient les conditions expérimentales, aucune différence significative dans l'expression des ARNm de la protéine COX-1 n'a été mesurée (tableau XII).

1.2) Expression de la protéine COX-1

Les résultats concernant l'expression de la protéine COX-1 dans les différentes conditions expérimentales, présentés sur la figure 4, sont exprimés en fonction des rats témoins recevant 5% de lipides.

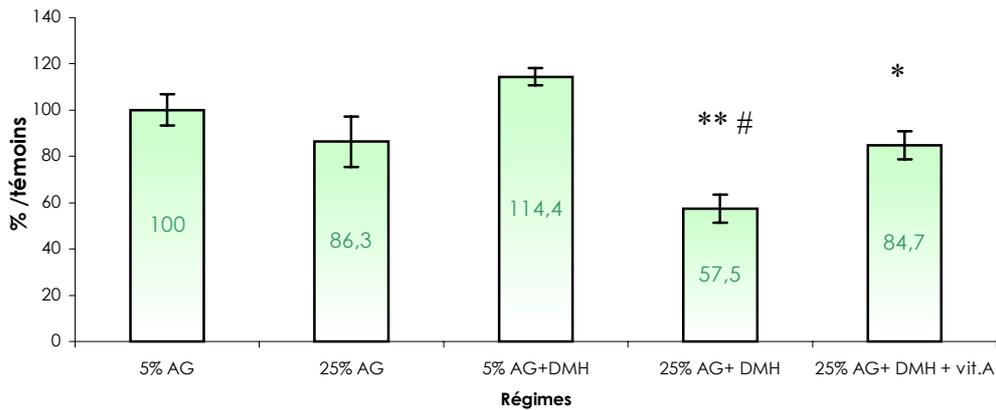


Figure 4: Effet des régimes sur l'expression de la protéine COX-1, dans le tissu colique de rats

Résultats représentant la moyenne \pm ESM déterminée sur 3 animaux, test t-student et ANOVA, Tukey.

* : significativement différent des animaux ayant reçu le régime hyperlipidique + DMH (25%+DMH) ($p < 0,02$).

** : significativement différent des animaux ayant reçu le régime témoin + DMH (5% + DMH) ($p < 0,01$).

: significativement différent des animaux ayant reçu le régime hyperlipidique (25%) ($p < 0,05$).

Un exemple d'autoradiographie, obtenue par la technique de Western Blot sur la protéine COX-1 co-révélee avec une protéine de référence, la β -actine, est présenté sur la figure 5. Cette autoradiographie représente la variation de l'expression de la protéine COX-1 dans le tissu colique de rats dans les différentes conditions.

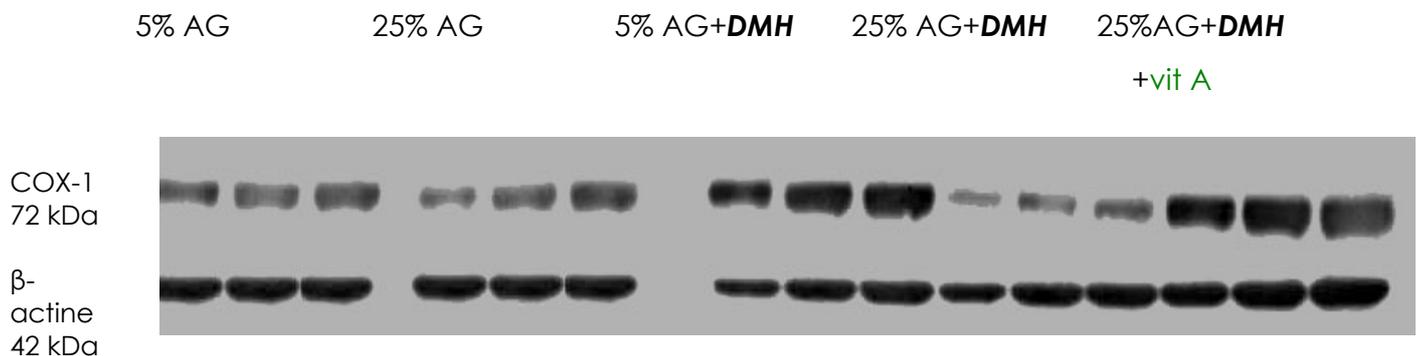


Figure 5: Autoradiographie des protéines COX-1 et β -actine

Quantité de protéines déposées dans chaque puits pour chacun des régimes: (1) 5 μ g; (2) 10 μ g; (3) 15 μ g

1.2.1) Animaux non initiés à la DMH

Aucune différence significative de l'expression de la protéine COX-1 n'a été mise en évidence chez les rats nourris avec un régime hyperlipidique par rapport aux animaux témoins. Dans nos conditions de mesure, nous n'avons pas mis en évidence d'effet du régime hyperlipidique sur l'expression protéique de COX-1.

1.2.2) Animaux initiés à la DMH

L'administration de DMH aux animaux nourris avec le régime hyperlipidique entraîne une diminution de l'expression protéique COX-1 (-33% par rapport aux animaux non induits). Ces données permettent de conclure qu'il y a un effet de la DMH sur l'expression de la protéine COX-1 chez les animaux nourris avec le régime hyperlipidique.

Chez les animaux induits, une alimentation quotidienne riche en lipides diminue significativement (-50%), le taux protéique de COX-1 par rapport aux animaux témoins induits. Ces données permettent de conclure qu'il y a un effet du régime hyperlipidique sur l'expression de la protéine COX-1 chez les animaux induits à la DMH.

Quand on supplémente le régime hyperlipidique avec de la vitamine A, on observe une diminution de l'expression protéique de COX-1 par rapport aux animaux témoins induits. Cette diminution est induite par les lipides mais l'effet du régime hyperlipidique est moins important dans cette condition sur la baisse de l'expression de la protéine COX-1. La vitamine A semble avoir un effet antagoniste à celui du régime hyperlipidique et de la DMH sur l'expression protéique de COX-1.

2) Expression des ARNm de la cyclooxygénase 2 : **COX-2**

Tableau XIII : Effet du régime hyperlipidique supplémenté ou non en vitamine A et de la DMH sur l'expression des ARNm de COX-2 dans la muqueuse colique de rat

(% expression ARNm COX-2/ ARNm GAPDH)				
Témoins	25% lipides	Témoins + DMH	25% lipides + DMH	25% lipides DMH+Vit A
6,47 ± 0,45	8,35 ± 0,75*	14,94 ± 0,94***	12,67 ± 1,20**##	9,35 ± 0,98#

Résultats représentant la moyenne ± ESM déterminée sur 3 animaux, test t-student et ANOVA, Tukey.

*: significativement différent des animaux ayant reçu le régime témoin (5%) (p<0,05).

**: significativement différent des animaux ayant reçu le régime témoin + DMH (5% + DMH) (p<0,01).

*** : significativement différent des animaux ayant reçu le régime témoin (5%) (p<0,001).

: significativement différent des animaux ayant reçu le régime hyperlipidique + DMH (25% + DMH) (p<0,05).

: significativement différent des animaux ayant reçu le régime hyperlipidique (25%) (p<0,02).

2.1) Animaux non initiés à la DMH

Les résultats présentés dans le tableau XIII mettent en évidence une augmentation significative (+29%) des ARNm de COX-2 par rapport aux animaux témoins. Il y a donc un effet du régime hyperlipidique sur l'expression des ARNm de COX-2 dans la muqueuse du côlon.

2.2) Animaux initiés à la DMH

L'administration de DMH entraîne une augmentation significative (+130%) du taux des ARNm de COX-2 chez les animaux témoins par rapport aux animaux témoins non induits. De même, les animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique présentent une augmentation significative (+52%) de l'expression des ARNm de COX-2 par rapport aux animaux non induits ayant consommé le régime hyperlipidique. Ces données permettent de conclure que l'injection de DMH induit une augmentation de l'expression des ARNm de COX-2 quel que soit le régime.

Chez les animaux induits, une alimentation quotidienne riche en lipides diminue significativement (-15%), le taux d'ARNm de COX-2 par rapport aux animaux témoins induits. Ces résultats permettent de conclure qu'il y a un effet du régime

hyperlipidique sur l'expression des ARNm de COX-2 chez les animaux induits à la DMH.

Lorsque l'on supplémente le régime hyperlipidique avec de la vitamine A, on observe une diminution de l'expression des ARNm de COX-2 par rapport aux animaux témoins non induits. Cette diminution est induite par les lipides mais l'effet du régime hyperlipidique est moins important sur la diminution de l'expression de COX-2. La vitamine A semble avoir un effet antagoniste à celui du régime hyperlipidique et de la DMH sur l'expression des ARNm de COX-2.

3) Discussion partielle

3.1) Régimes hyperlipidiques et expression de la protéine **cyclooxygénase-1**

L'induction à la DMH, le régime hyperlipidique tout comme la vitamine A, n'affectent pas le taux des ARNm de la protéine COX-1 dans nos conditions expérimentales.

Chez les animaux induits, le régime hyperlipidique diminue significativement (-50%) l'expression protéique de COX-1 tandis que la vitamine A rétablit partiellement cette expression (+47%) par rapport aux animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique seul.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Cianchi *et al.*, (2001) montrant que l'expression de la protéine COX-1 est diminuée dans 12 des 15 tumeurs humaines de côlon étudiées, comparées au tissu normal. Ainsi, bien qu'il existe peu de données bibliographiques sur les relations entre les régimes riches en lipides ou la cancérogenèse colique et la protéine COX-1, une diminution de l'expression de COX-1 pourrait être associée à la cancérogenèse colique dans certaines conditions.

Il faut souligner que c'est à notre connaissance, la première fois que l'action de la vitamine A sur l'expression protéique de COX-1 est mise en évidence dans la muqueuse colique de rat.

3.2) Régimes hyperlipidiques et expression de la protéine **cyclooxygénase-2**

Après cinq mois de régime hyperlipidique, on constate une augmentation significative de la quantité des ARNm de COX-2.

Cependant, le régime hyperlipidique diminue significativement cette expression chez les animaux induits par rapport aux animaux témoins induits.

La vitamine A, administrée conjointement aux lipides, diminue significativement l'expression des ARNm de COX-2 par rapport aux animaux induits ayant reçu le régime hyperlipidique ou témoin.

Par ailleurs, nos résultats font apparaître que l'administration de DMH entraîne également une augmentation des taux des ARNm de COX-2, que ces rats aient reçu ou non le régime hyperlipidique.

Les données bibliographiques concernant le rôle de la cyclooxygénase-2 dans la cancérogenèse colique divergent. Nos résultats devraient être approfondis par une étude de l'expression protéique de la protéine COX-2 (celle que nous avons menée ne fut pas concluante) ainsi qu'une étude de son activité enzymatique par rapport à celle de COX-1. L'augmentation de l'activité de COX-2 est liée à la cancérogenèse du côlon (Tsuji *et al.*, 1997 ; Kinzler et Vogelstein, 1996 ; Oschima *et al.*, 1996 ; Levy 1997). Les auteurs rapportent que cette enzyme altère le cycle cellulaire, influence la croissance cellulaire, augmente le potentiel métastatique et inhibe l'apoptose.

Nos résultats sont à rapprocher de ceux de Lefebvre *et al.*, (1998) qui montrent, chez des souris C57BL/6J-APC^{Min/+} traitées avec un agoniste du PPAR (le BRL49,653), présentant une hyperactivation de ce récepteur nucléaire, développant des polypes et des tumeurs coliques de taille supérieure aux souris non traitées, aucune modification de l'expression protéique de COX-2.

Par ailleurs, nos résultats vont dans le même sens que ceux de Yang *et al.*, (2001) montrant sur la lignée Caco-2, que l'activation de PPAR γ par des ligands spécifiques provoque une diminution de l'expression de COX-2. Si les auteurs ajoutent de l'acide 9-cis rétinolique, la baisse d'expression de COX-2 est accentuée.

4) Expression protéique de la β -caténine

Un des marqueurs reconnus de la prolifération cellulaire est la β -caténine (pour revue Hunter, 1997). Cette protéine cytoplasmique intervient principalement dans les mécanismes de l'adhésion cellulaire avec la E-cadherine, mais elle est également exprimée lors de la transformation de cellules normales en cellules tumorales. Dans ce contexte, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme puis pénètre dans le

noyau où elle s'associe à des facteurs de transcription nucléaires tels que LEF ou TCF (Korinek *et al.*, 1997 ; Morin *et al.*, 1997) et active la transcription de certains gènes impliqués dans la cancérogenèse colique.

Les résultats concernant l'expression de la protéine β -caténine dans les différentes conditions, présentés sur la figure 6, sont exprimés en fonction des rats témoins (5% de lipides).

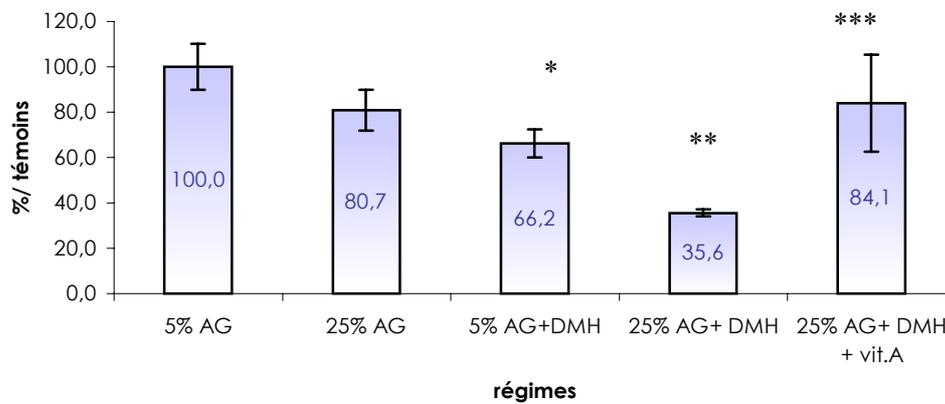


Figure 6: Effet des régimes sur l'expression de la protéine β -caténine, dans le tissu colique de rats

Résultats représentant la moyenne \pm ESM déterminée sur 3 animaux, test t-student et ANOVA, Tukey.

*: significativement différent des animaux ayant reçu le régime témoin (5%) ($p < 0,05$).

** : significativement différent des animaux ayant reçu le régime témoin + DMH (5% + DMH) ($p < 0,01$).

*** : significativement différent des animaux ayant reçu le régime hyperlipidique + DMH (25% + DMH) ($p < 0,001$).

Un exemple d'autoradiographie, obtenue par la technique de Western Blot sur la protéine β -caténine co-révélee avec une protéine de référence, la β -actine, est présenté sur la figure 7. Cette autoradiographie représente la variation de l'expression de la protéine β -caténine dans le tissu colique de rats suivant différentes conditions.

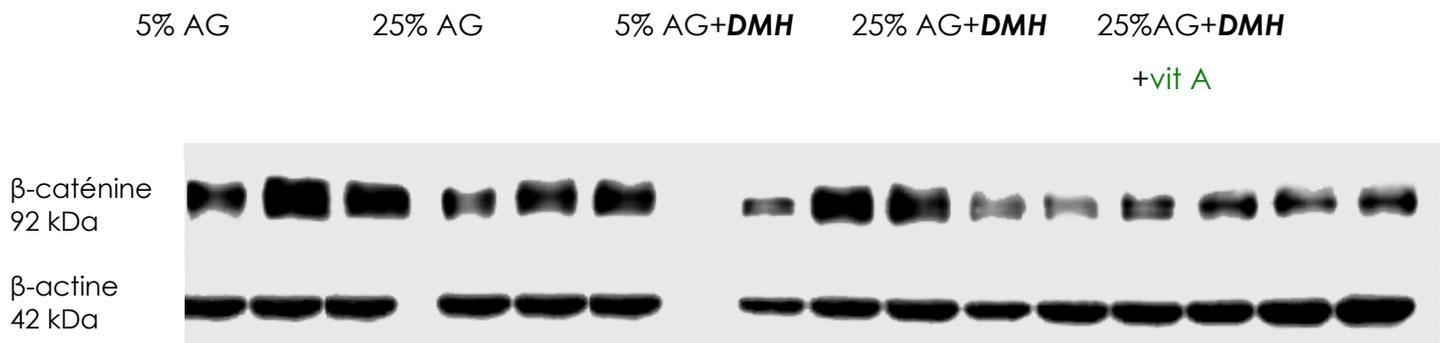


Figure 7: Autoradiographie des protéines β -caténine et β -actine.

Quantité de protéines déposées dans chaque puits pour chacun des régimes: (1) 5 μ g; (2) 10 μ g; (3) 15 μ g

4.1) Animaux non initiés à la DMH

Les animaux recevant le régime hyperlipidique ne présentent pas de variation significative de l'expression de la β -caténine au niveau protéique.

4.2) Animaux initiés à la DMH

Quel que soit le régime, l'administration de DMH entraîne une diminution significative de l'expression protéique de la β -caténine (-34% chez les animaux témoins induits par rapport aux animaux non induits). Cette diminution est très accentuée chez les animaux qui reçoivent aussi le régime hyperlipidique (-66%) par rapport aux animaux nourris avec le régime hyperlipidique seul.

Le régime hyperlipidique entraîne une importante diminution de β -caténine chez les animaux induits (-46%) par rapport aux animaux témoins induits.

Enfin, la vitamine A coadministrée avec le régime hyperlipidique empêche très significativement la baisse d'expression de la β -caténine observée chez les animaux induits qui ne reçoivent que le régime hyperlipidique.

4.3) Discussion partielle

Dans nos conditions expérimentales, la DMH et le régime hyperlipidique semblent avoir des conséquences qui vont dans le même sens sur l'expression de la β -caténine, c'est-à-dire une diminution de cette expression.

De plus, leurs effets respectifs semblent s'additionner parce que l'expression la plus basse est mise en évidence chez les animaux qui ont reçu le régime hyperlipidique et la DMH. En revanche, il apparaît que la vitamine A administrée dans le régime hyperlipidique limite, voire empêche, l'effet des lipides et de la DMH.

Enfin, le profil protéique que nous avons obtenu dans nos différentes conditions, est contraire à celui que nous attendions.

En effet :

- la β -caténine est sousexprimée dans les tissus de rats induits nourris avec un régime hyperlipidique, qui présentent pourtant une importante augmentation des FCA par rapport aux témoins,
- son expression chez les animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique enrichi en vitamine A, chez lesquels le développement de FCA est significativement atténué, est identique à celle des témoins.

Des travaux récents, Yamada *et al.*, (2000) ont montré d'une part, que toutes les cryptes aberrantes ne présentaient pas une accumulation de β -caténine, d'autre part que lorsqu'elle s'accumule dans les cryptes, la β -caténine est mutée. D'après Takahashi *et al.*, (1998), 75% des rats induits à la DMH présentent des mutations dans le gène de la β -caténine. Dans les tumeurs colorectales où il n'y a pas de mutation du gène APC, des altérations géniques de la β -caténine sont très souvent détectées (Morin *et al.*, 1997 ; Sparks *et al.*, 1998). Dans la majorité des cas, il s'agit de mutations ponctuelles sur les résidus sérine/thréonine du domaine N-terminal potentiellement phosphorylé par GSK3 β . Ces altérations rendraient la phosphorylation de la β -caténine et sa dégradation par le protéasome impossible et conduiraient à son accumulation aux niveaux cytoplasmique et nucléaire. Des délétions de l'exon 3 du gène de la β -caténine éliminant toute la partie régulatrice phosphorylée par GSK3 β ont également été mises en évidence sur plusieurs séries de tumeurs coliques sans mutation d'APC (Iwao *et al.*, 1998). Une situation similaire a été reproduite sur un modèle de souris transgénique : les animaux qui expriment un gène β -caténine

déléété de l'exon 3 développent des polypes adénomateux dans l'intestin et des microadénomes dans le côlon (Harada *et al.*, 1999).

A la lumière de ces données bibliographiques, nos résultats pourraient s'expliquer par le fait qu'une mutation pourrait être à l'origine d'un problème de reconnaissance spécifique de la protéine par l'anticorps employé. Ainsi, nous pouvons supposer que plus les CA et FCA sont nombreux, plus la β -caténine mutée s'accumule et moins il nous est possible de la mettre en évidence avec l'anticorps utilisé. Nous observons moins de β -caténine chez les animaux recevant le régime hyperlipidique, développant plus de CA, et plus de β -caténine chez les animaux induits recevant la vitamine A et développant moins de CA. En d'autre terme, nos résultats, bien qu'ils laissent apparaître une hypoexpression de la β -caténine, pourraient être cohérents avec son accumulation dans la cellule coïncidant avec sa mutation.

Les résultats que nous avons obtenus sont contraires à ceux de Lefebvre *et al.*, (1998) qui montrent que l'activation du PPAR γ entraîne une augmentation de la β -caténine, indépendamment de l'environnement tumoral rencontré *in vivo*, dans le côlon de souris C57BL/6J-APC^{Min/+} ainsi que dans les cellules HT-29 de carcinome colique.

Cependant, il est important de noter que l'expression de la β -caténine suit celle des ARNm de RAR β . D'après Paulsen et Lützow-Holm (2000), l'acide rétinoïque pourrait diminuer la formation du complexe β -caténine/Tcf (*T cell factor*), (complexe qui active l'expression de c-Myc), en faveur du complexe β -caténine/RAR par accrochage compétitif de Tcf avec la β -caténine.

De plus, Easwaran *et al.*, (1999) ont montré que la β -caténine aurait un élément de réponse au RAR (RARE) dans son promoteur et serait régulée par l'homodimère RAR/RAR. Ceci expliquerait pourquoi l'expression protéique de la β -caténine (1) diminue comme l'expression des ARNm du récepteur nucléaire RAR β chez les animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique, (2) augmente comme l'expression des ARNm du récepteur nucléaire RAR β chez les animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique enrichi en vitamine A.

B) Discussion de la quatrième partie

Notre hypothèse de travail suggère qu'une alimentation riche en acides gras provoque, via la suractivation de la voie de signalisation du PPAR, un déséquilibre d'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque et notamment RAR β , connu pour être un gène suppresseur de tumeur.

Les résultats de nos travaux mettent en évidence des modifications concomitantes de l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires PPAR γ et RAR β dans une situation d'alimentation riche en lipides. Ceci se traduit par une hyperexpression de PPAR γ et dans un même temps une hypoexpression de RAR β . Ce déséquilibre d'expression est corrélé au développement de FCA chimio-induits dans le côlon des animaux. En effet, les animaux nourris avec le régime hyperlipidique développent plus de FCA dont la multiplicité est importante et présentent le déséquilibre d'expression des récepteurs nucléaires.

Lorsque ce régime hyperlipidique est supplémenté en vitamine A, le profil d'expression des ARNm des récepteurs nucléaires est beaucoup moins modifié et parallèlement les animaux développent significativement moins de FCA.

C'est à notre connaissance, la première fois qu'une hypoactivation de la voie de signalisation des rétinoïdes est mise en évidence dans la muqueuse colique de rat en réponse à un apport lipidique important. Cette hypoexpression de la voie des rétinoïdes est associée au développement de FCA en réponse à l'administration de DMH.

La protéine COX-2 est un candidat potentiel de marqueurs de cancérogénèse (Dimberg *et al.*, 1999). Selon la littérature, la protéine COX-2 pourrait être régulée par PPAR parce qu'il a été identifié un PPRE dans la région promotrice du gène de la protéine COX-2 dans les cellules épithéliales (Meade *et al.*, 1999). De plus Inoue *et al.*, (2000) et Bakhle (2001) ont suggéré une régulation de la protéine COX-2 par feed-back positif en induisant COX-2 par les ligands du PPAR.

D'après Howe *et al.*, (1999), COX-2 est un gène cible du complexe T-cf/LEF-1. Ceci suggère que le complexe β -caténine/T-cf pourrait réguler l'expression de COX-2 (Dempke *et al.*, 2001 ; Dimberg *et al.*, 2001).

D'autres travaux mettent en évidence une relation entre les protéines β -caténine et COX-2. Ainsi, des rats induits à l'AOM (45 mg/kg d'AOM pendant 7 semaines) présentent une accumulation de la β -caténine dans les FCA. En donnant à ces animaux un inhibiteur de COX-2 (le celecoxib), l'accumulation de la β -caténine est diminuée dans les FCA (Yamada *et al.*, 2001).

Par ailleurs, les médicaments antiinflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs) ayant des conséquences variables sur l'activité de COX-1 et COX-2, modifient la localisation de la β -caténine dans les tumeurs colorectales de rats chimio-induits. En effet, les auteurs observent moins de β -caténine dans le cytoplasme (Brown *et al.*, 2001).

Nos résultats sont en accord avec ces données bibliographiques puisque nous observons une diminution de l'expression des ARNm de COX-2 ainsi que de l'expression de la protéine β -caténine chez les animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique par rapport aux animaux témoins à l'exception des animaux induits nourris avec le régime hyperlipidique enrichi en vitamine A où l'expression des ARNm de COX-2 continue de diminuer tandis que la diminution de l'expression protéique de la β -caténine est empêchée par la vitamine A. Selon Easwaran *et al.*, (1999), la β -caténine serait régulée par l'homodimère RAR/RAR donc directement régulée par la vitamine A. Ce qui n'est pas le cas de la transcription de COX-2.

Par contre, comme il a été décrit plus haut, l'expression des ARNm de COX-2 serait régulée par le récepteur nucléaire PPAR, lui-même agissant par l'intermédiaire de l'hétérodimère PPAR/RXR. La voie d'action du PPAR aurait des relations avec celle des rétinoïdes par l'intermédiaire du partenaire commun d'hétérodimérisation : le RXR.

La diminution de l'expression de RAR β , gène suppresseur de tumeur, dans une situation d'alimentation riche en lipides est d'autant plus accentuée par la DMH. Il existerait donc une étroite relation entre l'activation ou l'inhibition de la transcription de ce gènes ainsi que des marqueurs précoces de la cancérogenèse colique qui serait médiée en partie par la voie de signalisation des rétinoïdes donc par la vitamine A et les acides gras. Ainsi, le risque de développer le cancer du côlon pourrait être par un terrain de déséquilibre des voies de signalisation des rétinoïdes.

C) Résumé

L'objectif de ce travail était de mettre en relation l'expression des récepteurs nucléaires avec le développement des FCA chez les animaux soumis à une alimentation riche en lipides pendant cinq mois. Les résultats de cette étude mettent en évidence la modulation de l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires PPAR γ et RAR β par le régime. Il se traduit par une hyperexpression de PPAR γ et de façon concomitante une hypoexpression de RAR β . Ce déséquilibre généré par les lipides est accentué par l'induction à la DMH et parfaitement corrélé au développement excessif des FCA.

L'addition de vitamine A dans le régime hyperlipidique empêche de manière significative les modifications du profil d'expression des récepteurs nucléaires et le développement du nombre de FCA induits par les lipides.

Le risque de cancer du côlon pourrait être influencé par le déséquilibre des voies de signalisation des rétinoïdes et donc modulé par l'alimentation tout comme l'expression des marqueurs précoces de cancérogenèse coliques étudiés : les cyclooxygénases et la β -caténine.

Partie V

Etude *in vitro* : Effets de l'acide linoléique et/ou de l'acide rétinoïque sur les cellules IEC-6 et PROb

Résultats préliminaires

A partir des résultats obtenus *in vivo*, il nous a semblé nécessaire de réaliser une approche *in vitro* sur des cultures de cellules épithéliales coliques de rat (IEC-6, phénotype normal) et sur une lignée cellulaire colique (PROb, phénotype cancéreux), qui vise à étudier *in vitro* les effets de l'acide linoléique et/ou de l'acide rétinoïque sur la prolifération cellulaire et l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires.

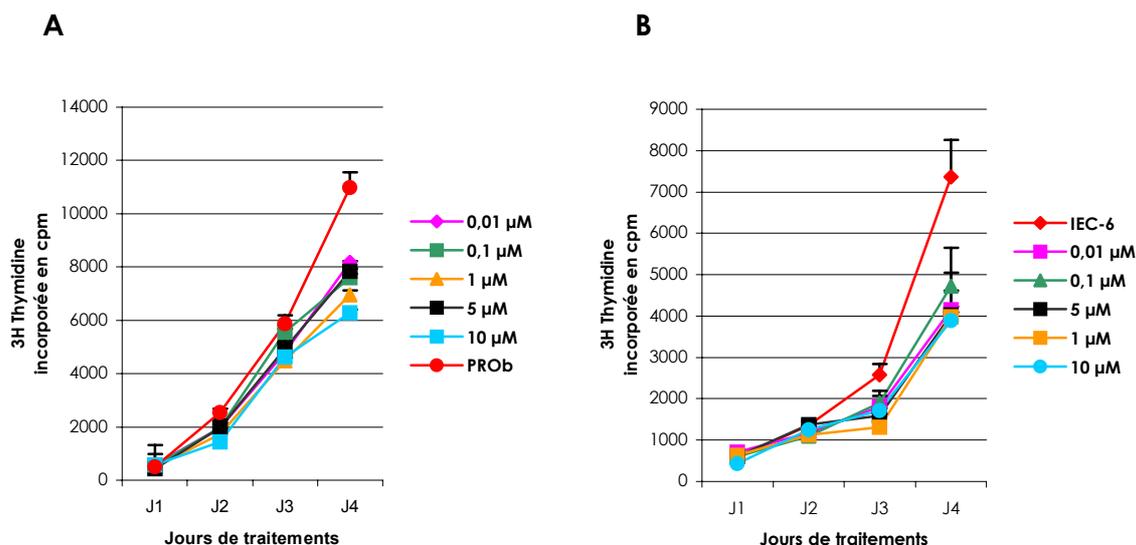
Ces deux types de cellules permettent de comparer l'action de l'acide linoléique et de l'acide rétinoïque *tout-trans* sur la prolifération des cellules normales et cancéreuses.

A) Effet sur la prolifération cellulaire

1) Effet de la concentration en acide rétinoïque *tout-trans* sur la prolifération des cellules IEC-6 et PROb

Nous avons étudié l'effet de différentes concentrations (0,01 ; 0,1 ; 1 ; 5 ; 10 μ M) d'acide rétinoïque *tout-trans* sur la prolifération des cellules IEC-6 et PROb.

Les résultats sont reportés dans la figure 8.



Résultats représentant la moyenne ± ES déterminée sur 4 mesures

Figure 8: Effet de la concentration en acide rétinoïque *tout-trans* sur la prolifération des cellules IEC-6 (A) et PROb (B) cultivées pendant 4 jours

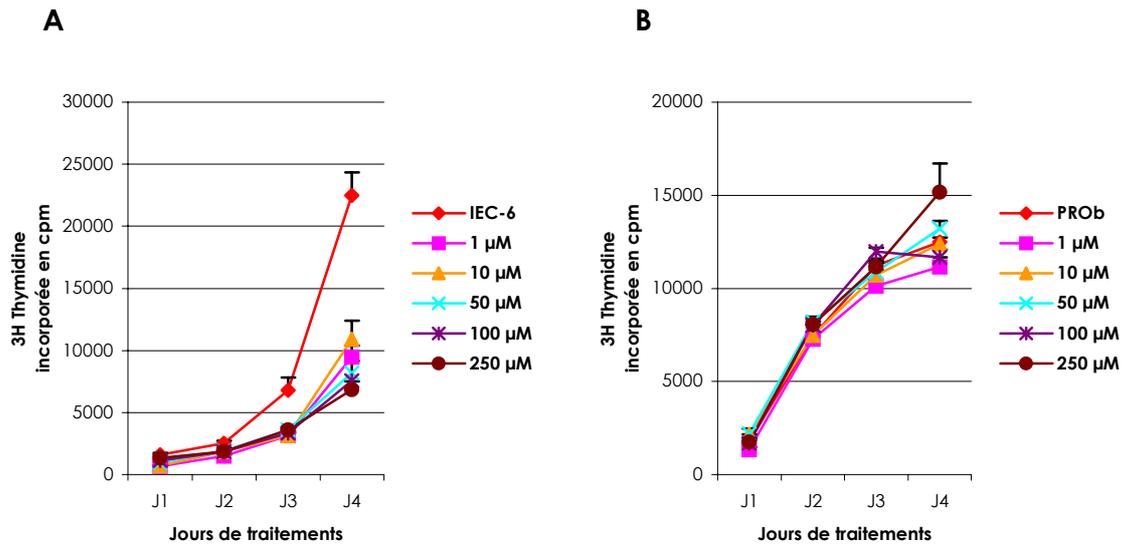
Il n'y a aucun effet de la concentration en acide rétinoïque sur la prolifération des cellules IEC-6 ni sur la prolifération de la lignée PROb. La prolifération minimale pour les cellules IEC-6 est obtenue dès 0,01 μM d'acide rétinoïque.

Dans la suite de cette étude, nous avons choisi de travailler avec 1 μM en acide rétinoïque *tout-trans* qui est une concentration couramment employée dans les études concernant l'effet des rétinoïdes sur les lignées cellulaires (Plateroti *et al.*, 1993 ; Nagpal *et al.*, 1995 ; Mazière *et al.*, 1997 ; Wan *et al.*, 1998 ; Suruga *et al.*, 1999 b).

2) Effet de la concentration en acide linoléique sur la prolifération des cellules IEC-6 et PROb

Nous avons étudié l'effet de différentes concentrations (1 ; 10 ; 50 ; 100 ; 250 μM) d'acide linoléique sur la prolifération des cellules IEC-6 et PROb.

Les résultats sont reportés dans la figure 9.



Résultats représentant la moyenne \pm ES déterminée sur 4 mesures

Figure 9: Effet de la concentration en acide linoléique sur la prolifération des cellules IEC-6 **(A)** et PROb **(B)** cultivées pendant 4 jours

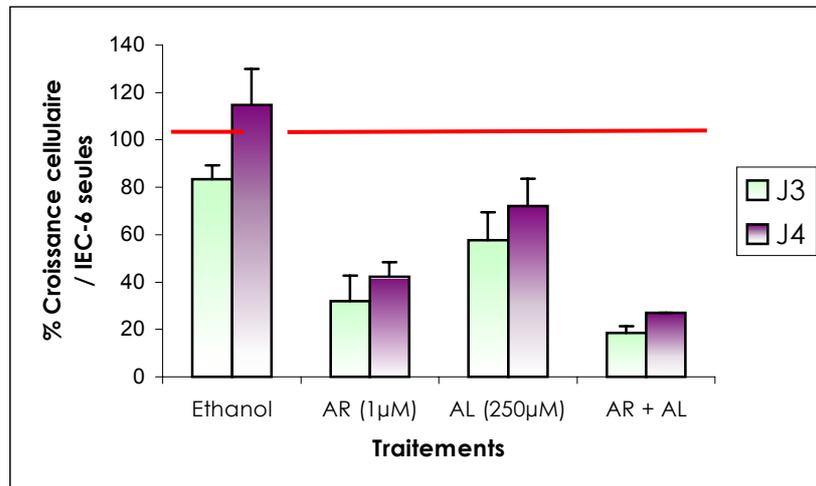
Il n'y a aucun effet de la concentration en acide linoléique sur la prolifération des cellules IEC-6 ni sur la prolifération de la lignée PROb. Cependant, après quatre jours de traitements, on observe une augmentation de +46% de la prolifération cellulaire à la concentration 250 μ M par rapport aux cellules cultivées en conditions standards.

Dans la suite de ce travail, la concentration en acide linoléique choisie est 250 μ M puisqu'il faut atteindre cette concentration pour observer un effet de l'acide linoléique sur la prolifération des cellules PROb.

De plus, nous avons porté notre attention sur les temps de traitement 3 et 4 jours. En effet, c'est à partir de trois jours de traitement que la majorité des concentrations étudiées commence son effet sur la prolifération des cellules.

3) Effet de l'acide linoléique et/ou de l'acide rétinoïque *tout-trans* sur la prolifération des cellules **IEC-6 et PROb**

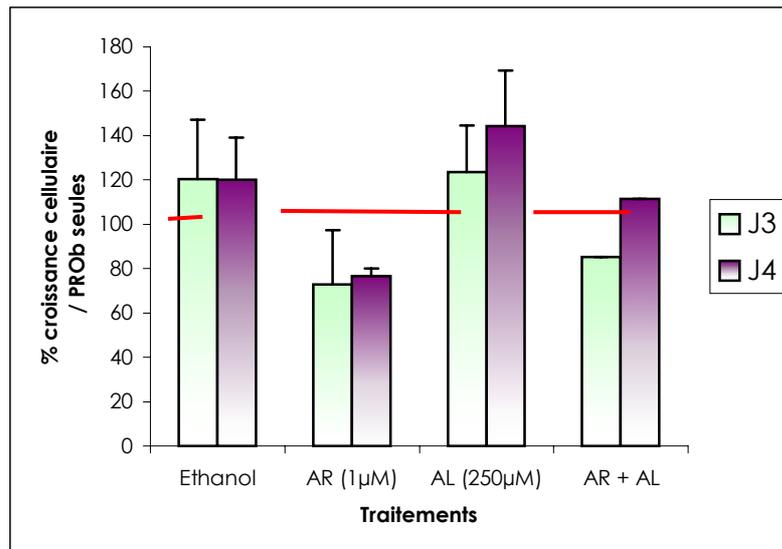
L'effet de l'acide linoléique et de l'acide rétinoïque *tout-trans* coadministrés ou non sur la prolifération des cellules IEC-6 ou PROb est représenté dans les figures 10 et 11.



Résultats représentant la moyenne \pm ES déterminée sur 4 mesures

Figure 10: Effet de l'acide linoléique et/ou de l'acide rétinoïque *tout-trans* sur la croissance des cellules IEC-6 cultivées pendant 3 et 4 jours

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas d'effet du solvant (éthanol) puisque 0,1% d'éthanol dans le milieu de culture des IEC-6 ne génère pas de variations brutales de la prolifération par rapport aux cellules cultivées dans les conditions standards. L'acide rétinoïque *tout-trans* diminue de plus de 50% la prolifération des cellules IEC-6. L'acide linoléique diminue également la prolifération (\approx -30%). De plus, dès trois jours de traitement, lorsque les deux nutriments sont associés dans le milieu de culture, une synergie des effets est observée avec une diminution de -73% (J4) de la prolifération des cellules IEC-6 par rapport aux cellules cultivées dans les conditions standards.



Résultats représentant la moyenne \pm ES déterminée sur 4 mesures

Figure 11: Effet de l'acide linoléique et/ou de l'acide rétinoïque *tout-trans* sur la prolifération de la lignée PROb cultivée pendant 3 et 4 jours

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas d'effet du solvant (éthanol) puisque 0,1% d'éthanol dans le milieu de culture des PROb ne génère pas de variations de la prolifération par rapport aux cellules cultivées dans les conditions standards. L'acide rétinoïque *tout-trans* diminue d'environ -25% la prolifération des cellules PROb et l'acide linoléique augmente la prolifération des cellules PROb ($\approx +40\%$) par rapport aux cellules cultivées en conditions standards.

Dès trois jours de traitement, lorsque les deux nutriments sont associés dans le milieu de culture, on n'observe pas de modification de la prolifération des cellules PROb.

Nous venons de mettre en évidence une augmentation de la prolifération cellulaire de la lignée PROb traitée par l'acide linoléique (250 μ M) ainsi qu'un retour à l'état basal de prolifération lorsque le milieu contenant l'acide gras était supplémenté avec l'acide rétinoïque *tout-trans* (1 μ M) dès le début du traitement. *In vivo*, nos résultats ont montré un effet similaire de ces deux nutriments. En effet, le régime riche en lipides (25% d'huile de carthame) consommé par les animaux pendant cinq mois, augmente significativement le nombre de FCA et CA chimio-induits tandis que la supplémentation en vitamine A de ce régime hyperlipidique, fait diminuer significativement les lésions préneoplasiques.

Chez ces animaux, nous avons mesuré un déséquilibre d'expression des récepteurs nucléaires associé au profil de FCA obtenu. En est-il de même *in vitro* et tout particulièrement dans les cellules PROb?

B) Expression des récepteurs nucléaires des cellules PROb

1) Expression des ARNm du récepteur nucléaire RAR β

Aucun signal d'amplification des ARNm de RAR β n'a pu être détecté dans la lignée PROb cultivée dans les conditions standards. En revanche quand les cellules sont traitées par l'acide rétinoïque *tout-trans*, il y a mise en évidence d'une expression des ARNm de RAR β qui bien que détectable, n'a pu être quantifiée.

2) Expression des ARNm du récepteur nucléaire PPAR γ

Tableau XIV: Effet de l'acide rétinoïque *tout-trans* (AR) et/ou de l'acide linoléique (AL) sur l'expression des ARNm du récepteur PPAR γ dans la lignée PROb, après 4 jours de traitement

(% expression ARNm PPAR γ / ARNm GAPDH)			
PROb seules	+ AR (1 μ M)	+ AL (250 μ M)	+AR (1 μ M) +AL (250 μ M)
0,81 \pm 0,01*	0,64 \pm 0,05**	23,88 \pm 0,35*	18,00 \pm 0,32*

Résultats représentant la moyenne \pm ESM déterminée sur 3 boîtes de culture, test t-student et ANOVA, Tukey.

* : Tous les résultats sont significativement différents les uns des autres ($p < 0,001$) sauf :

** : significativement différent des cellules PROb seules ($p < 0,05$).

Les résultats présentés dans le tableau XIV montrent une diminution significative de -21% de l'expression des ARNm du récepteur nucléaire PPAR γ chez les cellules traitées avec 1 μ M d'acide rétinoïque *tout-trans* par rapport aux cellules PROb seules.

Quand les cellules PROb sont traitées avec 250 μ M d'acide linoléique, l'expression des ARNm du récepteur nucléaire PPAR γ est très augmentée par rapport aux cellules PROb seules.

Lorsque les deux nutriments sont associés dans le milieu de culture, on observe une augmentation significative de l'expression des ARNm du récepteur nucléaire

PPAR γ par rapport aux cellules PROb seules ou traitées avec l'AR. Cette augmentation est moins importante que celle observée par le traitement de l'acide linoléique seul.

3) Expression des ARNm du récepteur nucléaire RXR α

Tableau XV: Effet de l'acide rétinoïque *tout-trans* (AR) et/ou de l'acide linoléique (AL) sur l'expression des ARNm des récepteurs RXR α dans la lignée PROb, après 4 jours de traitement

(% expression ARNm RXR α / ARNm GAPDH)			
PROb seules	+ AR (1 μ M)	+ AL (250 μ M)	+AR (1 μ M) +AL (250 μ M)
0,96 \pm 0,04*	2,31 \pm 0,36**	26,52 \pm 0,04*	10,16 \pm 0,09*

Résultats représentant la moyenne \pm ESM déterminée sur 3 boîtes de culture, test t-student et ANOVA, Tukey.

* : Tous les résultats sont significativement différents les uns des autres ($p < 0,001$) sauf :

** : significativement différent des cellules PROb seules ($p < 0,02$).

Les résultats présentés dans le tableau XV montrent une augmentation significative de +140% de l'expression des ARNm du récepteur nucléaire RXR α chez les cellules traitées avec 1 μ M d'acide rétinoïque *tout-trans* par rapport aux cellules PROb seules.

Quand les cellules PROb sont traitées avec 250 μ M d'acide linoléique, l'expression des ARNm du récepteur nucléaire RXR α est multiplié par un facteur 2600 par rapport aux cellules PROb seules.

Lorsque les deux nutriments sont associés dans le milieu de culture, on observe une augmentation significative de l'expression des ARNm du récepteur nucléaire RXR α par rapport aux cellules seules ou traitées par l'acide rétinoïque *tout-trans*. Cette augmentation est moins importante que celle observée par le traitement de l'acide linoléique seul.

C) Discussion

Dans cette partie, nous avons réalisé une approche *in vitro* sur des cultures de cellules épithéliales intestinales de rat (IEC-6, phénotype bénin) et sur une lignée cellulaire colique (PROb, phénotype malin), qui visait à mieux comprendre les effets de l'acide linoléique et/ou de l'acide rétinoïque sur la prolifération cellulaire, ainsi que sur l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires de la lignée PROb.

Nos résultats font apparaître que l'acide rétinoïque *tout-trans*, diminue la prolifération des deux types de cellules étudiés, tandis que l'acide linoléique diminue la prolifération des cellules IEC-6 et augmente celle de la lignée PROb. L'acide rétinoïque et l'acide linoléique ont des effets antagonistes quand ils sont présents ensemble dans le milieu de culture des PROb. Parallèlement, dans cette même lignée, cet acide gras active l'expression de PPAR γ . Il a été également montré que cette lignée n'exprimait pas RAR β , gène suppresseur de tumeur.

1) Effet des acides gras sur la prolifération cellulaire

Les résultats obtenus sur les lignées IEC-6 et PROb traitées par l'acide linoléique (250 μ M) semblent montrer que la cellule doit avoir acquis le programme de prolifération induisant la progression tumorale pour que cet acide gras soit promoteur.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Hussey et Tisdale (1994) montrant que les acides linoléique et arachidonique stimulent la croissance de deux lignées cellulaires d'adénocarcinomes de souris (MAC 26 et MAC 13) dans un milieu déplété en sérum.

Cependant, nos travaux divergent de ceux de Nano *et al.*, (2002) montrant que 100 μ M d'acide linoléique, dans le milieu de culture de la lignée Caco-2, provoquent l'inhibition de la prolifération cellulaire, l'augmentation de la fluidité membranaire, la peroxydation des lipides ainsi que l'apoptose. Les auteurs concluent alors que les acides gras insaturés sont capables d'inhiber la prolifération des cellules Caco-2 par un processus d'apoptose. Cet effet semble corrélé aux modifications physico-chimiques induits par ces acides gras au niveau membranaire.

2) Effet de l'acide rétinoïque sur la prolifération cellulaire

L'acide rétinoïque *tout-trans* (10^{-8} à 10^{-6} M) n'induit pas de changements morphologiques chez les cellules PROb mais diminue légèrement la prolifération cellulaire (72h) (Labarrière *et al.*, 1993). Nos résultats confortent ces travaux puisque l'acide rétinoïque *tout-trans* (10^{-6} M) induit une diminution de la prolifération cellulaire des cellules PROb et IEC-6.

Ainsi l'utilisation de modèles *in vitro* a permis de confirmer les effets antiprolifératifs des rétinoïdes sur les lignées cancéreuses du côlon (Mazière *et al.*, 1997 ; Stewart *et al.*, 1997).

L'acide rétinoïque *tout-trans* induit également l'inhibition de la croissance cellulaire et l'apoptose des lignées DLD-1, HT-29, Colo 201 ainsi que WiDr et HCT-15. Cette induction pourrait être médiée par le récepteur nucléaire, RAR β (Lee *et al.*, 2000). Les auteurs ont également montré que WiDr et HCT-15 sont sensibles à l'acide rétinoïque car elles expriment RAR β quand l'acide rétinoïque est ajouté dans leur milieu de culture.

3) Expression des récepteurs nucléaires

3.1) Expression du récepteur nucléaire **RAR β**

L'expression de RAR β est induite dans la lignée PROb par adjonction d'acide rétinoïque *tout-trans* dans le milieu de culture.

Ce phénomène a déjà été observé par d'autres équipes sur d'autres modèles cellulaires. Ainsi les données obtenues sur la lignée Caco-2 montrent que l'acide rétinoïque réactive l'expression de RAR β et simultanément inhibe la prolifération et stimule la différenciation de ces cellules (Mc Cormack *et al.*, 1996). L'expression des ARNm de RAR β est également réduite dans la lignée FTC-238 et diminuée dans la lignée C-643 ainsi que dans des biopsies de tumeurs de la thyroïde (Schmutzler *et al.*, 1998). L'incubation avec l'acide rétinoïque *tout-trans* pendant 24h augmente de façon sélective la concentration des ARNm de RAR β dans la lignée HT-29 (sensibles aux rétinoïdes) tandis que le taux d'ARNm de RAR α et RAR γ reste inchangé. Au contraire, l'incubation avec l'acide rétinoïque *tout-trans* n'a pas d'effet sur la concentration des ARNm de RAR β sur la lignée Lovo (résistante aux rétinoïdes) (Nicke *et al.*, 1999). Les lignées de côlon diffèrent dans leur aptitude à répondre à l'acide

rétinoïque *tout-trans* et *9-cis*. Les différences d'expression des isoformes de RAR pourraient expliquer les différences de réponses.

3.2) Expression du récepteur nucléaire **PPAR γ**

Nos résultats montrent que l'acide linoléique induit non seulement la prolifération des cellules PROb mais également une hyperexpression des ARNm du récepteur nucléaire PPAR γ .

Nos résultats sont en total désaccord avec la littérature. En effet, le rôle de PPAR γ dans la prolifération cellulaire a aussi été étudié *in vitro* à partir de différentes lignées de cellules malignes : cellules de liposarcome (Tontonoz *et al.*, 1997), de cancer du sein (Elstner *et al.*, 1998 ; Mueller *et al.*, 1998), de la prostate (Kuboto *et al.*, 1998), de cancer gastrique (Takahashi *et al.*, 1999) et colique (Brockman *et al.*, 1998). Dans ces différents modèles, les ligands de PPAR γ inhibent la prolifération cellulaire et induisent des phénomènes d'apoptose sur les cellules de cancer du sein et de la prostate (Elstner *et al.*, 1998 ; Mueller *et al.*, 1998). De plus, les administrations de rétinoïdes ou de troglitazone, activateurs de l'hétérodimère PPAR γ /RXR, permettent respectivement la régression du carcinome mammaire chez les rongeurs et du cancer de la prostate chez l'Homme (Mueller *et al.*, 1998). L'utilisation d'agonistes de PPAR γ pourrait ainsi, selon ces auteurs représenter une nouvelle approche thérapeutique prometteuse pour le traitement de certains cancers chez l'Homme.

Dans nos conditions expérimentales, l'addition d'acide rétinoïque *tout-trans* dans le milieu de culture contenant l'acide linoléique empêche le taux des ARNm de PPAR γ d'augmenter autant que lorsque le milieu contient l'acide linoléique seul. Ceci correspond également à une diminution de la prolifération cellulaire. Ainsi, tout comme les données obtenues *in vivo*, nos résultats font apparaître que la vitamine A possède un effet positif sur la diminution de l'expression des ARNm de PPAR γ .

3.3) Expression du récepteur nucléaire **RXR α**

Dans nos conditions expérimentales, l'ajout d'acide rétinoïque *tout-trans* dans le milieu, diminue la prolifération des cellules et augmente considérablement l'expression des ARNm de RXR α par rapport aux PROb seules. De plus, cela

empêche le taux des ARNm de RXR α d'augmenter par rapport aux conditions de culture où le milieu contient l'acide linoléique seul.

Dans les conditions de culture avec l'acide gras seul, on peut supposer que l'hétérodimère PPAR γ /RXR α serait favorisé et relié à l'augmentation de la prolifération de ces cellules. Lorsque les deux nutriments sont réunis, la formation de l'homodimère RXR/RXR pourrait être favorisée. Selon Wan *et al.*, (1998), l'homodimère RXR/RXR conduit, lorsqu'il est activé, à une inhibition de la croissance cellulaire.

C'est la première fois, qu'une telle association de nutriments est étudiée in vitro. La majorité des études faites avec des acides gras polyinsaturés, ont tendance à associer les acides gras avec de la vitamine E afin de pallier l'effet cytotoxique des radicaux libres formés au cours de la peroxydation des acides gras dans le milieu de culture. Toutes les tentatives effectuées dans ce sens dans notre étude ont échoué. De nouvelles expériences seront élaborées au laboratoire.

D) Résumé

L'objectif de cette étude était de comparer l'action de l'acide linoléique et de l'acide rétinoïque tout-trans sur la prolifération des cellules normales et cancéreuses.

Pour cela, deux types de cellules ont été choisis : des cellules épithéliales intestinales de rats (IEC-6, phénotype normal) et la lignée PROb (cellules tumorales coliques de rat). Dans les deux types de cellules, l'acide rétinoïque *tout-trans* diminue la prolifération cellulaire.

Après trois jours de traitement, lorsque les deux nutriments sont associés dans le milieu de culture, une synergie des effets est observée avec 73% (J4) de diminution de la prolifération des cellules IEC-6. Dans les mêmes conditions, on observe un retour à l'état basal de prolifération des cellules PROb. Ces cellules, en effet, proliféraient de façon très importante (+40%) lorsque l'acide linoléique était ajouté seul dans le milieu de culture.

Les cellules PROb présentent un déséquilibre d'expression des ARNm des récepteurs nucléaires. PPAR γ est exprimé dans cette lignée tandis que RAR β ne l'est plus. L'ajout d'acide linoléique, d'une part, augmente l'expression des ARNm du récepteur nucléaire PPAR γ . D'autre part, l'addition d'acide linoléique et d'acide

rétinoïque *tout-trans* rétablit que très partiellement l'équilibre puisque l'acide rétinoïque *tout-trans* permet de réactiver l'expression des ARNm du récepteur nucléaire RAR β mais cette expression n'est pas quantifiable.

Cette étude permet de conclure que le déséquilibre de la voie de signalisation des rétinoïdes est associée, entre autre, à un programme de prolifération anarchique dans la cellule colique.

Chapitre IV

Discussion générale et Conclusions

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans les recherches en Nutrition dont l'objectif est d'établir de nouvelles données scientifiques nécessaires à une meilleure compréhension des relations entre l'alimentation et le cancer. Aujourd'hui, l'implication d'une alimentation riche en lipides dans le développement du cancer du côlon est bien argumentée. Par contre, les mécanismes par lesquels les acides gras contribuent au contrôle de l'homéostasie cellulaire restent à préciser. Une orientation récente des recherches dans ce domaine privilégie l'action des acides gras via l'activation des récepteurs nucléaires PPAR qui sont des facteurs de transcription inductibles par leurs ligands. On sait également que ces récepteurs nucléaires interagissent avec d'autres récepteurs nucléaires, notamment avec les récepteurs de l'acide rétinoïque. Cette interaction s'exerce en particulier via le RXR (récepteur de l'acide 9-*cis* rétinoïque) qui est le partenaire commun de dimérisation de nombreux récepteurs nucléaires de la même famille. Le RXR se dimérise en particulier, avec le récepteur de l'acide rétinoïque *tout-trans* (RAR). Dans ce contexte, notre hypothèse de travail suggérait que l'exposition à un régime alimentaire riche en lipides pouvait conduire à des modifications de l'expression de récepteurs nucléaires et notamment ceux de l'acide rétinoïque (métabolite actif de la vitamine A) et augmenter le risque de cancer du côlon. Afin d'éprouver cette hypothèse, nous avons utilisé une approche expérimentale, mettant en oeuvre un modèle animal soumis à des régimes riches en lipides, et sur lequel la cancérogenèse colique a été induite.

Nous avons mis en évidence des modifications précoces (après un mois de régime riche en lipides) des profils d'expression des ARNm des récepteurs nucléaires dans la muqueuse colique des animaux. Ces modifications se traduisent par une hyperexpression des ARNm du récepteur nucléaire PPAR γ et une hypoexpression des ARNm du récepteur nucléaire RAR β quel que soit le régime riche en lipides consommés. En effet, deux régimes ont été testés : un régime dit cafétéria connu pour induire une obésité nutritionnelle et un régime dit hyperlipidique dont la source de lipides est l'huile de carthame (25%). Ce régime présente un rapport des AGPI de la série n-6 sur AGPI de la série n-3 très important (777). Ces deux facteurs sont reconnus par la littérature pour favoriser le risque de cancer du côlon. Aux vues de ces résultats, nous avons nourris des animaux avec ce régime sur une période de

cinq mois. Après ce délai, le déséquilibre d'expression observé précédemment est toujours présent dans la muqueuse du côlon.

Chez les animaux induits par un cancérigène chimique : la DMH, nous avons mis en évidence des modifications de l'expression des récepteurs nucléaires PPAR γ et RAR β , semblables à celles induites par les lipides seuls, mais de plus grande amplitude. Ces modifications sont très accentuées lorsque les animaux reçoivent la DMH et le régime hyperlipidique. Il semble donc y avoir une synergie des effets du régime hyperlipidique et de l'initiation de la cancérogenèse colique. Le déséquilibre d'expression des récepteurs nucléaires observé, dans cette situation, s'accompagne d'un développement plus important de FCA dont la multiplicité est plus importante.

Lorsque ce même régime hyperlipidique est supplémenté en vitamine A, l'équilibre des récepteurs nucléaires est partiellement atténué et parallèlement le nombre de FCA et de CA développés est significativement moins important que chez les animaux induits nourris avec le régime hypelipidique. Ainsi, la modulation de l'expression de ces récepteurs nucléaires pourrait être un des événements importants qui augmente le risque de cancérogenèse colique en réponse à une alimentation riche en lipides.

A la lumière de ces résultats, il était donc intéressant d'étudier l'effet de l'acide linoléique (acide gras majoritaire composant l'huile de carthame) et de l'acide rétinoïque *tout-trans* sur la prolifération de deux modèles cellulaires : les IEC-6 (cellules épithéliales intestinales de rats, phénotype normal) et les PROb (cellules de tumeurs coliques de rats) afin d'observer leur action directe sur le devenir des cellules et en même temps sur l'expression des récepteurs nucléaires. Les principaux résultats de cette étude préliminaire sur le modèle cellulaire nous ont permis de constater que l'acide linoléique favorisait la prolifération cellulaire de la lignée PROb, associé à une hyperexpression des ARNm de PPAR γ . Les cellules n'expriment pas RAR β .

Nos travaux menés *in vivo* et *in vitro* nous permettent de conclure qu'un régime riche en lipides conduit à l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ dans la muqueuse colique. *In vivo*, les données épidémiologiques chez l'Homme et

expérimentales chez l'animal suggèrent que l'activation de ce récepteur pourrait avoir un rôle au cours de la cancérogenèse colique. Nos résultats *in vitro* divergent des données bibliographiques. En effet, dans les lignées cellulaires, PPAR γ a un rôle anticancéreux puisque son activation semble associée à une diminution de la prolifération cellulaire et à une augmentation de la différenciation des cellules ainsi que de l'apoptose (figure 1).

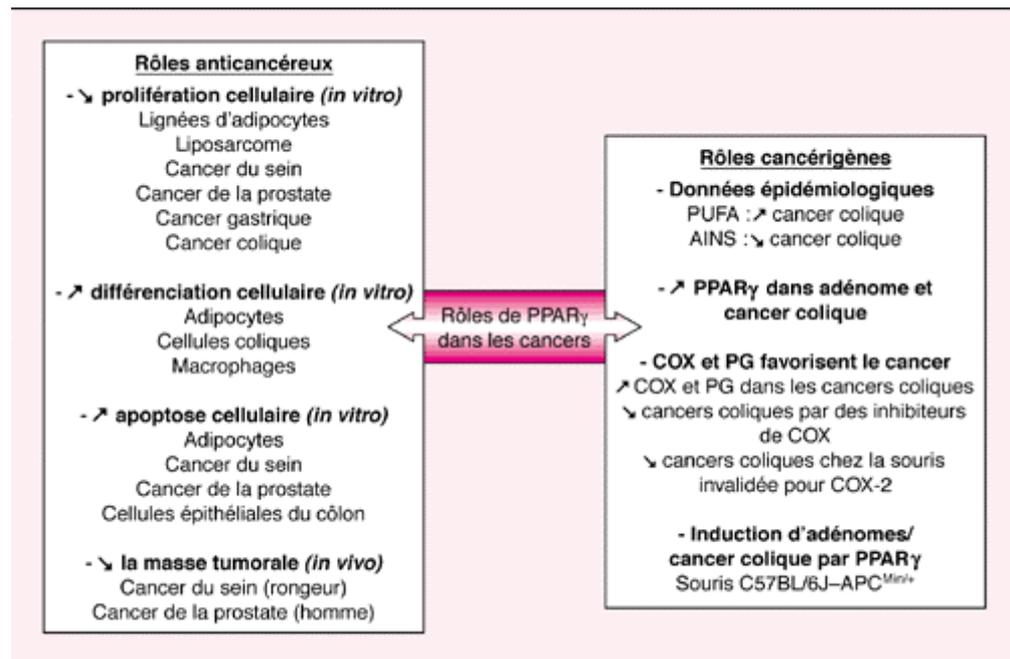


Figure 1: Rôle paradoxal du PPAR γ dans les cancers. PUFA : acides gras poly-insaturés ; PG : prostaglandines (Dubuquoy *et al.*, 1999).

Les études *in vitro* ont été réalisées sur des lignées cellulaires qui sont toutes des cellules transformées et qui ne tiennent pas compte des effets des facteurs environnementaux rencontrés *in vivo*.

Ces résultats obtenus sur des lignées cellulaires nécessitent d'être interprétés avec beaucoup de précautions, et ne peuvent être généralisés à tous les cancers. En effet, rappelons seulement les deux principales études qui ont montré que l'activation de PPAR γ peut promouvoir le développement de polypes (Saez *et al.*, 1998) et d'adénocarcinomes coliques chez la souris C57BL/6J-APC^{Min/+} (Lefebvre *et al.*, 1998). Cependant, les événements moléculaires impliqués dans le développement des tumeurs coliques et secondaires à l'activation de PPAR γ ne sont pas entièrement connus.

Clay *et al.*, (2001) ont montré que l'activation de PPAR γ engendre d'importants mais contradictoires changements dans les cellules néoplasiques, qui dépendent du taux d'activation du PPAR γ . Ceci pourrait expliquer, en partie, les résultats divergents trouvés *in vivo* et *in vitro*.

La formation des tumeurs du côlon se produit lors de circonstances particulières nécessitant l'intervention de facteurs génétiques et environnementaux. Le PPAR γ pourrait intervenir dans les effets promoteurs de tumeurs du côlon entraînés par les alimentations riches en lipides et pauvres en fibres, par exemple, dans les pays industrialisés.

Nos travaux ont également mis en évidence un effet antagoniste de la vitamine A vis-à-vis de la transcription de PPAR γ . Cette interrelation des acides gras et de la vitamine A se jouerait au niveau de la voie de signalisation des rétinoïdes puisque la vitamine A diminue la transcription de PPAR γ et augmente celle de RAR β . Les interactions entre les voies de signalisation des acides gras et de la vitamine A sont aussi dus au récepteur nucléaire RXR qui se dimérise avec PPAR γ et RAR β . Aujourd'hui, un ensemble de données permet de souligner le rôle central que joue le RXR dans la régulation de l'expression des récepteurs nucléaires avec lesquels il se dimérise. Par ailleurs, l'existence d'un pool relativement stable de RXR dans la cellule (qui n'est pas modifié lorsque les animaux ne reçoivent que le régime hyperlipidique), a conduit à formuler une hypothèse selon laquelle le « piégeage » des RXR par un type de récepteurs entraîne une sous activation d'autres voies de signalisation dépendantes de ce co-activateur. Il existe un grand nombre d'arguments en faveur de cette hypothèse. Parmi ceux-ci, certains soulignent le rôle essentiel du RXR dans l'établissement du profil d'expression des récepteurs nucléaires et la régulation de leur expression génique. Ainsi Polly *et al.*, (1997) ont décrit sur des cultures de fibroblastes de souris une transrépression de la voie de signalisation des rétinoïdes résultant de la séquestration du RXR liée à la surexpression des VDR (récepteurs de la vitamine D). D'autres résultats démontrent l'aptitude des VDR à séquestrer les RXR et par conséquent à diminuer la formation des complexes RAR/RXR nécessaires à la régulation du gène RAR β 2 (Jimenez-Lara et Aranda, 1999). De même, les acides gras ont été décrits comme régulant la transcription du gène pour le RXR dans des cellules hépatiques de rats (Steineger *et al.*, 1998). L'ensemble de ces données suggère que le RXR peut être un facteur limitant pour l'activation et

/ou la répression de l'activité des récepteurs nucléaires. De plus, l'activité anti-tumorale des rétinoïdes est très abondamment rapportée dans la littérature (pour revu Altucci et Gronemeyer, 2001). La forme RAR β paraît être essentielle dans ces processus et la baisse de son expression, souvent associée à une progression tumorale. Il est aujourd'hui connu que ce récepteur nucléaire, en réprimant constitutivement le complexe AP-1, bloque la promotion de tumeurs (Chen *et al.*, 1995). La diminution de sa transcription comme observée chez les animaux nourris avec le régime hyperlipidique, qu'ils soient induits ou non à la DMH, va donc faire basculer la cellule dans un programme de prolifération. C'est ce que nous avons mis en évidence chez les animaux induits puisqu'ils développent plus de FCA comprenant plus de quatre CA. Ces FCA sont beaucoup plus susceptibles d'évoluer en tumeurs coliques à plus longue échéance.

Dans la quatrième partie du chapitre Résultats et Discussion, nous avons essayé de mettre en évidence des modifications de marqueurs précoces de cancérogenèse colique, les cyclooxygénases et la β -caténine, qui pourraient être directement ou indirectement modulées par la voie de signalisation des rétinoïdes. Cependant les mécanismes impliqués dans ces régulations sont encore obscurs.

Nous avons mesuré le rétinol sérique afin d'établir un lien entre la fonctionnalité de la vitamine A, le risque de cancer du côlon et cet indicateur. Dans la littérature, en effet, un ensemble de données montre que le taux de rétinol sérique est significativement diminué chez les patients atteints d'un cancer colorectal (Ostrowski *et al.*, 1987 ; Rumi *et al.*, 1999) ou d'un cancer digestif (Charpiot *et al.*, 1989). Le taux de rétinol sérique ne reflète pas le déséquilibre d'expression des récepteurs nucléaires dans nos conditions expérimentales. De plus, nos résultats ne montrent pas d'effet significatif et systématique du régime hyperlipidique, de la DMH et/ou de la vitamine A sur le taux de rétinol sérique. Schober *et al.*, (1987) ne mettent en évidence aucune association entre le taux de rétinol dans le sérum et le risque de développer un cancer du côlon.

Nous avons donc principalement observé dans des conditions physiologiques, des modulations de l'expression des gènes de PPAR γ et des récepteurs de l'acide rétinoïque en fonction du statut lipidique.

Il est aujourd'hui connu que le rôle des acides gras, en tant que modulateurs de l'expression génique, ne se cantonne plus aux seuls gènes impliqués dans le

métabolisme des lipides. En effet, la palette connue des gènes régulés par les acides gras s'élargit sans cesse et concerne aussi bien des gènes des facteurs de croissance (Kaminski *et al.*, 1993) que des cytokines (Robinson *et al.*, 1996) ou encore des gènes impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire (Sellmayer *et al.*, 1996). Récemment Gupta *et al.*, (2001) ont mis en évidence des gènes cibles de PPAR γ dans le côlon. Ces gènes cibles sont impliqués dans la régulation de la croissance, la maturation des cellules épithéliales du côlon et la modulation immunitaire. Les données relatives aux effets de PPAR γ sur la différenciation et la prolifération cellulaires, l'apoptose et la cancérogenèse imposent de nouvelles études pour mieux définir le rôle de PPAR γ dans la survenue de cancer du côlon en réponse à une alimentation riche en lipides chez l'Homme.

Ainsi, les conséquences potentielles des modifications du profil d'expression des récepteurs nucléaires sont nombreuses et peuvent avoir des conséquences sur les processus de contrôle du cycle cellulaire.

Nous avons montré que l'exposition à un régime hyperlipidique inducteur d'obésité (entrée dans la phase dynamique de prise de poids) s'accompagne d'une modification du profil d'expression des récepteurs nucléaires dans le côlon des animaux. Cette modification se caractérise par une activation de PPAR γ et, au contraire, par une baisse d'expression de RAR β . Un résultat identique avait été obtenu dans le tissu adipeux.

Pour ce qui concerne le côlon, il a été mis en évidence une forte corrélation entre l'absorption d'acides gras d'origine animale et le développement du cancer du côlon (Giovanucci *et al.*, 1997 ; Wasan *et al.*, 1997). D'autre part, le PPAR γ est exprimé de manière aberrante dans le cancer du côlon (DuBois *et al.*, 1998, b) et les activateurs de PPAR γ induisent la formation de polypes coliques (Saez *et al.*, 1998 ; Lefebvre *et al.*, 1998).

En revanche, l'activité anti-tumorale des rétinoïdes est très abondamment rapportée dans la littérature (pour revue Altucci et Gronemeyer, 2001). La forme RAR β paraît être essentielle à une progression tumorale. De plus l'induction de RAR β est bien corrélée avec les effets inhibiteurs de l'acide rétinoïque sur des tumeurs solides. Les liens moléculaires sont aujourd'hui mieux appréhendés. En effet, il a été montré que RAR β réprime constitutivement le complexe AP-1 et bloque la promotion de tumeurs (Chen *et al.*, 1995).

Au plan théorique, un ensemble de données cohérentes montre que les RAR et les RXR, en interférant avec d'autres voies de signalisation (PPAR...), jouent des rôles clés dans la régulation de gènes impliqués dans les programmes de développement. De ce fait, une meilleure connaissance de leur expression, notamment en réponse à des excès d'apports énergétiques, devrait nous permettre de mieux appréhender les liens moléculaires entre la prise alimentaire et ses conséquences sur les processus cellulaires qui sous-tendent la plasticité tissulaire à la fois dans le côlon mais aussi dans le tissu adipeux.

Dans la suite de ce travail, il sera donc intéressant d'étudier l'expression de certains gènes, marqueurs moléculaires des processus de prolifération ou de différenciation cellulaire, dont on sait par ailleurs que leur activité est corrélée à l'expression des récepteurs nucléaires.

Dans le côlon, c'est notamment le cas des gènes précoces du complexe AP-1 ou bien de la β -caténine (Easwaran *et al.*, 1999). En ce qui concerne cette protéine, il sera opportun d'étudier sa distribution subcellulaire par immunohistochimie.

Enfin, cette approche devra être complétée par un travail sur des lignées de cellules coliques sur lesquelles il pourra être intéressant d'étudier les effets de l'acide rétinoïque et/ou des acides gras polyinsaturés de la série n-6 (notamment l'acide linoléique), sur l'induction de la différenciation, de la prolifération et de l'apoptose.

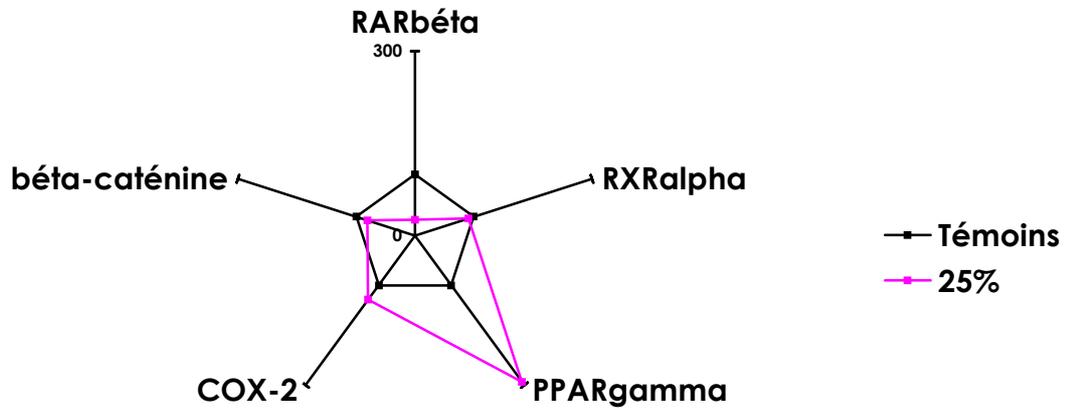
Parallèlement, l'évolution de l'expression des récepteurs nucléaires (PPAR, RAR et RXR) ainsi que des marqueurs moléculaires déjà cités (β -caténine et AP-1) sera suivie au cours des phases de croissance et différenciation cellulaire en fonction des différents traitements.

En conclusion, des modifications des profils d'expression de ces récepteurs nucléaires peuvent favoriser le risque de cancer du côlon. Ainsi, de meilleures connaissances des interactions et des régulations de ces voies de signalisations cellulaires pourraient contribuer à mieux comprendre le rôle de la nutrition dans le maintien de l'homéostasie cellulaire ou, au contraire, dans le développement de pathologies telle que la maladie du cancer.

Ainsi les modifications du profil des gènes cibles observés quand l'animal reçoit un régime hyperlipidique ainsi que de la DMH (augmentation du taux des ARNm de PPAR et diminution du taux des ARNm de RAR) est associé au développement des CA et semble donc pertinent d'une augmentation du risque de cancer. Un profil analogue observé chez les animaux ne recevant que le régime hyperlipidique

semble significatif d'une augmentation du risque de cancer associé à ce type d'alimentation (Figure 2).

A



B

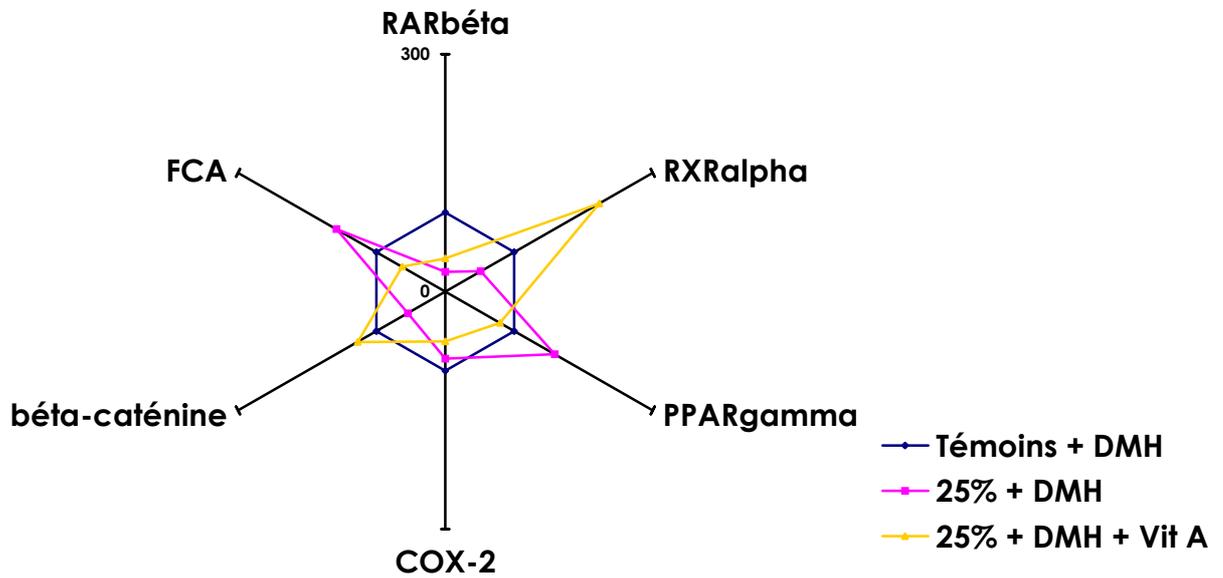


Figure 2 : Profil des déséquilibres observés chez les animaux recevant le régime hyperlipidique seul **(A)** ou induits à la DMH **(B)**

Références bibliographiques

- Alabaster O, Tang Z, Frost A, Shivapurkar N.** Effect of β -carotene and wheat bran fiber on colonic aberrant crypt and tumor formation in rats exposed to azoxymethane and high dietary fat. *Carcinogenesis*. **1995** ; 16(1): 127-132.
- Alltonen LA, Peltomaki P, Leach FS.** Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. **1993** ; 260: 812-816.
- Altucci L, Gronemeyer H.** Nuclear receptors in cell life and death. *Trends Endocrinol Metab*. **2001** ;12(10): 460-468. Review.
- Bakhle YS.** COX-2 and cancer: a new approach to an old problem. *Br J Pharmacol*. **2001** ; 134(6): 1137-1150. Review.
- Bartoli R, Fernandez-Banares F, Navarro E, Catella E, Mane J, Alvarez M, Pastor C, Cabre E, Gassull MA.** Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats : modulations of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E₂ synthesis. *Gut*. **2000** ; 46: 191-199.
- Bartsch H, Jagadeesan N, 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): 2209-2218.
- Bass NM.** Cellular binding proteins for fatty acids and retinoids: similar or specialized functions? *Mol Cell Biochem*. **1993** ; 123: 191-202.
- Berenblum I.** The mechanism of carcinogenesis. A study of the significance of cocarcinogenic action and related phenomena. *Cancer Res*. **1941** ; 1: 44-48.
- Berraondo B, Marti A, Duncan JS, Trayhurn P, Martinez JA.** Up-regulation of muscle UCP2 gene expression by a new β -adrenoceptor agonist, trectadrine, in obese (cafeteria) rodents, but down-regulation in lean animals. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **2000** ; 24(2): 156-163.
- Bird RP.** Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon. *Cancer Letters*. 1987 ; 37: 147-151.
- Bird RP.** Role of aberrant crypt foci understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Letters*. **1995** ; 93: 55-71.
- Bird RP, Lafave LM.** Varying effect of dietary lipids and azoxymethane on early stages of colon carcinogenesis: enumeration of aberrant crypt foci and proliferative indices. *Cancer Detect Prev*. **1995** ; 19(4): 308-315.
- Bishop-Bailey D, Hla T.** Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J₂. *J Biol Chem*. **1999** ; 274(24): 17042-17048.
- Bonilla S, Redonnet A, Noel-Suberville C, Pallet V, Garcin H, Higuere P.** High-fat diets affect the expression of nuclear retinoic acid receptor in rat liver. *Br J Nutr*. **2000** ; 83(6): 665-671.
- Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburn A, Martucci C, Guo XJ, Ramonetti JT, Abreu-Goris M, Newmark HL, Lipkin ML, DeCosse JJ, Bertagnolli MM.** Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Res*. **1996** ; 56(11): 2556-2560.
- Botterweck AA, van den Brandt PA, Goldbohm RA.** Vitamins, carotenoids, dietary fiber, and the risk of gastric carcinoma: results from a prospective study after 6.3 years of follow-up. *Cancer*. **2000** ; 88(4): 737-748.
- Brendel C, Gelman L, Auwerx J, Rocchi S.** Les PPAR, des récepteurs nucléaires à fonction multiples, implication dans l'inflammation et le cancer. *La Recherche*. **2000** ; 2: 9-20.
- Brockman JA, Gupta RA, DuBois RN.** Activation of PPAR γ leads to inhibition of anchorage-independant growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology*. **1998** ; 115: 1049-1055.

- 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): 2314-2321.
- Bruce WR, Archer MC, Corpet DE, Medline A, Minkin S, Stamp D, Yin Y, Zhang XM.** Diet, aberrant crypt foci and colorectal cancer. *Mutation Res.* **1993** ; 290: 111-118.
- Byers S, Pishvaian M, Crockett C, Peer C, Tozeren A, Sporn M, Anzano M, Lechleider R.** Retinoids increase cell-cell adhesion strength, β -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): 3265-3273.
- Cadigan KM, Nusse R.** Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* **1997** ; 11(24): 3286-305. Review.
- 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.
- Chambon P.** A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **1996** ; 10: 940-954.
- Charpiot P, Calaf R, Di-Costanzo J, Romette J, Rotily M, Durbec JP, Garcon D.** Vitamin A, vitamin E, retinol binding protein (RBP), and prealbumin in digestive cancers. *Int J Vita Nutr Res.* **1989** ; 59(4): 323-328.
- Chelly J, Montarras D, Pinset C, Berwald-Netter Y, Kaplan JC, Kahn A.** Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *Eur J Biochem.* **1990** ; 187(3): 691-698.
- Chen JY, Penco S, Ostrowski J, Balaguer P, Pons M, Starrett JE, Reczek P, Chambon P, Gronemeyer H.** RAR-specific agonist/antagonist which dissociate transactivation and AP1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation. *EMBO J.* **1995** ; 14(6): 1187-1197.
- Chien A, Edgar DB, Trela JM.** Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* **1976** ; 127(3): 1550-1557.
- Chomczynski P, Sacchi N.** Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **1987** ; 162: 156-159.
- 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.** Bases de données WHO Cancer Mortality Databank **1998** ; et Globocan 2000, **2000** ; Consultables sur le site du CIRC : www-dep.iarc.fr
- Clarke SD, Jump DB.** Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Ann Rev Nut.* **1994** ; 14: 83-98.
- Clay CE, Namen AM, Atsumi G, Trimboli AJ, Fonteh AN, High KP, Chilton FH.** Magnitude of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation is associated with important and seemingly opposite biological responses in breast cancer cells. *J Investig Med.* **2001** ; 49(5): 413-420.
- Collett ED, Davidson LA, Fan YY, Lupton JR, Chapkin RS.** n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2001** ; 280(5): C1066-C1075.

- Considine RV, Nyce MR, Morales LM, Magosin SA, Sinha MK, Bauer TL, Rosato EL, Colberg J, Caro JF.** Paracrine stimulation of preadipocyte-enriched cell cultures by mature adipocytes. *Am J Physiol.* **1996** ; 270: E895-899.
- Côté S, Momparler RL.** Activation of the retinoic acid receptor β gene by 5-aza-2'-deoxycytidine in human DLD-1 colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs.* **1997** ; 8(1): 56-61.
- Côté S, Sinnett D, Momparler RL.** Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoter region of the retinoic acid receptor β gene in human colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs.* **1998** ; 9(9): 743-750.
- Decloître, F, Puiseux-Dao S.** Mécanismes épigénétiques de la cancérogenèse. Dans *Cancérogenèse, Aspects génétiques et épigénétiques, Mécanismes et méthodes d'évaluation.* Eds, F. Decloître et Y. Moulé, Association Toxicologie-CNAM, Paris, **1993** ; 53-93.
- Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ.** Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol.* **2001** ; 127(7): 411-7. Review.
- 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 γ (PPAR γ) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med.* **2001** ; 193(7): 827-838.
- Dimberg J, Hugander A, Sirsjö A, Söderkvist P.** Enhanced expression of cyclooxygenase-2 and nuclear β -catenin are related to mutations in the APC gene in human colorectal cancer. *Anticancer Res.* **2001** ; 20: 911-916.
- Dimberg J, Samuelsson A, Hugander A, Soderkvist P.** Differential expression of cyclooxygenase-2 in human colorectal cancer. *Gut.* **1999** ; 45(5): 730-732.
- 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(6): 1191-1308. Review.
- Dong-Yeon K, Kyeong-Hee C, Jung-Hee L.** Stimulatory effects of high-fat diets on colon cell proliferation depend on the type of dietary fat and site of the colon. *Nut Cancer.* **1998** ; 30(2) : 118-123.
- DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE.** Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* **1998** ;12(12): 1063-1073. Review. (a)
- 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(1): 49-53. (b)
- Dubuquoy L, Desreumaux P, Cortot A, Colombel JF, Auwerx J.** PPAR γ et intestin. *Hépatogastro.* **1999** ; 6 (6) : 463-469.
- Easwaran V, Pishvaian M, Salimuddin, Byers S.** Cross-regulation of β -catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr Biol.* **1999** ; 9(23): 1415-1418.
- Elstner E, Muller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Shintaku P, Said JW, Heber D, Koeffler HP.** Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BXN mice. *PNAS U S A.* **1998** ; 95(15): 8806-8811.
- Eschwège P, de Ledinghen V., Camili T, Kulkarni S, Dalbagni G, Droupy S, Jardin A.** Les cyclooxygénases. *Presse Med.* **2001** ; 30: 511-514.
- 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 PPAR γ gene. *J Biol Chem.* **1997** ; 272(30): 18779-18789.
- Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Chanmugam P, Soyoola E, Wilson CB, Hwang D.** Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys.* **1993** ; 307(2): 361-368.
- Fiala ES.** Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane. *Cancer.* **1977** ; 40(5 Suppl): 2436-2445.
- Forman BM, Umesono K, Chen J, Evans R.** Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell.* **1995** ; 81: 541-550.
- Gagne R.** Obtaining "R" bands by incorporation of BUDR and staining with Hoescht 33258 and Giemsa stains. *Union Med Can.* **1980** ; 109(4): 552-556.
- Gaiva Gomes da Silva MH, Pithon TC, Oller do Nascimento CM.** Effect of saturated and polyunsaturated fatty acids rich diets on hepatic and adipose tissue lipid metabolism in rats, *Internat. J Vit Res.* **1996** ; 66 : 258-262.
- Gearing KL, Gottlicher M, Teboul M, Widmark E, Gustafsson JA.** Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *PNAS U S A.* **1993** ; 90(4): 1440-1444.
- Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz G, Stampfer M, Willet WC.** Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med.* **1995** ; 122: 327-334.
- Giovannucci E, Goldin B.** The role of fat, fatty acids, and total energy intake in the aetiology of human colon cancer. *Am J Clin Nut.* **1997** ; 66 (S): 1564S-1571S.
- Giovannucci E, Rimm EB, Chute CG, Kawachi I, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC.** Obesity and benign prostatic hyperplasia. *Am J Epidemiol.* **1994** ; 140(11): 989-1002.
- Giovannucci E, Willet WC.** Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med.* **1994** ; 26: 443-52.
- Giovannucci E.** Insulin and colon cancer. *Cancer Cause Control.* **1995** ; 6 : 164-179.
- Glinghammar B, Rafter J.** Colonic luminal contents induce cyclooxygenase-2 transcription in human colon carcinoma cells. *Gastroenterology.* **2001** ; 120: 401-410.
- Good CK, Lasko CM, Adam J, Bird RP.** Diverse effect of fish oil on the growth of aberrant crypt foci and tumor multiplicity in F344 rats. *Nut Cancer.* **1998** ; 31(3): 204-211.
- Goppelt-Struebe M.** Regulation of prostaglandin endoperoxidase synthase (cyclooxygenase) isoenzyme expression. *Prost Leu Ess Fat Acids.* **1995** ; 52: 213-222.
- Greenwald P, Clifford CK, Milner JA.** Diet and cancer prevention. *Eur J Cancer.* **2001** ; 37(8): 948-965. Review.
- 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, Brockman JA, Sarraf P, Willson TM, DuBois RN.** Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor γ in colorectal cancer cells. *J Biol Chem.* **2001** ; 276(32): 29681-29687.
- Gupta RA, Tan J, Krause WF, Geraci MW, Willson TM, Dey SK, DuBois RN.** Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ in colorectal cancer. *PNAS U S A.* **2000** ; 97(24): 13275-13280.

- Hafraoui S, Lefebvre AM, Geboes K, Cortot A, Auwerx J, Colombel JF.** Ulcerative colitis is associated with a mucosal deficit in PPAR γ . *Gastroenterology*. **1999** ; 116: G3001.
- Hahn M, Saeger HD, Schackert HK.** Hereditary colorectal cancer: clinical consequences of predictive molecular testing. *Int J Colorectal Dis*. **1999** ; 14(4-5): 184-193. Review.
- Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, Sauer B, Takaku K, Oshima M, Taketo MM.** Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the β -catenin gene. *EMBO J*. **1999** ; 18(21): 5931-5942.
- He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW.** PPAR δ is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*. **1999** ; 99(3): 335-345.
- Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki K, Nakamura S, Ogawa M, Mitsudomi T, Sugiura T, Takahashi T.** Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res*. **1998** ; 58(17): 3761-3764.
- Hill C, Doyon F.** Epidemiology of cancers. *Bull Cancer*. **1997** ; 84(9): 917-918.
- Hill MJ, Morson BC, Bussey HJR.** Aetiology of adenoma-carcinoma sequence in large bowel. *Lancet*. **1978** ; 1: 245-247
- Houle B, Bradley WEC.** Cancer du poumon, rétinoides et RAR β . *Médecine et Sciences*. **1993** ; 9: 528-533.
- Howe JR, Ringold JC, Hughes JH, Summers RW.** Direct genetic testing for Smad4 mutations in patients at risk for juvenile polyposis. *Surgery*. **1999** ; 126(2): 162-70.
- 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): 189-191.
- Hunter T.** Oncoprotein Networks. *Cell*. **1997** ; 88: 333-346
- Hussey HJ, Tisdale MJ.** Effect of polyunsaturated fatty acids on the growth of murine colon adenocarcinomas *in vitro* and *in vivo*. *Br J Cancer*. **1994** ; 70: 6-10.
- Inoue H, Tanabe T, Umesono K.** Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPAR γ . *J Biol Chem*. **2000** ; 275(36): 28028-28032.
- Iwao K, Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Kinoshita M, Fukui T, Ishiguro S, Nakamura Y, Miyoshi Y.** Activation of the β -catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations. *Cancer Res*. **1998** ; 58(5): 1021-1026.
- Jacoby RF, Marshall DJ, Newton MA, Novakovic K, Tutsch K, Cole CE, Lubet RA, Kelloff GJ, Verma A, Moser AR, Dove WF.** Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the Apc Min mouse model by the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam. *Cancer Res*. **1996** ; 56(4): 710-714.
- Jimenez-Lara AM, Aranda A.** Vitamin D represses retinoic acid-dependent transactivation of the retinoic acid receptor- β 2 promoter: the AF-2 domain of the vitamin D receptor is required for transrepression. *Endocrinology*. **1999** ; 140(6): 2898-2907.
- Jimi S, Shono T, Tanaka M, Kono A, Yamada Y, Shudo K, Kuwano M.** Effect of retinoic acid on morphological changes of human pancreatic cancer cells on collagen gels: a possible association with the metastatic potentials. *Oncol Res*. **1998** ; 10(1): 7-14.
- Jouzeau JY, Terlain B, Abid A, Nedelec E, Netter P.** Cyclooxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs*. **1997** ; 53(4): 563-82. Review.

- Kaleagasioglu F, Doepner G, Biesalski HK, Berger MR.** Antiproliferative activity of retinoic acid and some novel retinoid derivatives in breast and colorectal cancer cell lines of human origin. *Drug Res.* **1993** ; 43: 487-490.
- Kaminski MS, Yolton DP, Jordan WT, Yolton RL.** Evaluation of dietary antioxidant levels and supplementation with ICAPS-Plus and OcuVite. *J Am Optom Assoc.* **1993** ; 64(12): 862-870.
- Kane KF, Langman MJS, Williams GR.** Antiproliferative responses of two human colon cancer cell lines to vitamin D₃ are differentially modified by 9-*cis* retinoic acid. *Cancer research.* **1996** ; 56: 623-632.
- Kanekura T, Higashi Y, Kanzaki T.** Inhibitory effects of 9-*cis*-retinoic acid and pyrrolidinothiocarbamate on cyclooxygenase (COX)-2 expression and cell growth in human skin squamous carcinoma cells. *Cancer Letters.* **2000** ; 161: 177-183.
- Kastner P, Messaddeq N, Mark M, Wendling O, Grondona JM, Ward S, Ghyselinck N, Chambon P.** Vitamin A deficiency and mutations of RXR α , RXR β and RAR α lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. *Development.* **1997** ; 124(23): 4749-4758.
- Kinzler KW, Vogelstein B.** Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* **1996** ; 87: 159-70.
- Kliwer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterstrom RH, Perlmann T, Lehmann JM.** An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signalling pathway. *Cell.* **1998** ; 92(1): 73-82
- Kliwer SA, Umeson K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM.** Convergence of 9-*cis* retinoic acid and peroxisome proliferator signaling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature.* **1992** ; 358: 771-774.
- Klurfeld DM, Bull AW.** Fatty acids and colon cancer in experimental models, *Am J Clin Nutr.* **1997** ; 66 (supplément): 1530S-1538S.
- Kohno H, Yoshitani S, Takashima S, Okumura A, Hosokawa M, Yamaguchi N, Tanaka T.** Troglitazone, a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ , inhibits chemically-induced aberrant crypt foci in rats. *Jpn J Cancer Res.* **2001** ; 92(4): 396-403.
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, Van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H.** Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science.* **1997** ; 275: 1752-1753.
- Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, Takahashi E, Tanabe T.** Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem.* **1994** ; 221(3): 889-897.
- Kuboto T, Koshizuka K, Williamson IA, Asou H, Said JW, Holden S.** Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (troglitazone) has potent anti-tumor effects against human prostate cancer both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* **1998** ; 58: 3344-3352.
- Kurokawa R, DiRenzo J, Boehm M, Sugarman J, Gloss B, Rosenfeld MG, Heyman RA, Glass CK.** Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature.* **1994** ; 371: 528-531.
- Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, Mc Donald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC.** Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature.* **1996** ; 384: 644-648.
- Labarriere N, Piau JP, Zennadi R, Blanchardie P, Denis M, Lustenberger P.** Retinoic acid modulation of alpha(1-->2) fucosyltransferase activity and sensitivity of

- tumor cells to LAK-mediated cytotoxicity. *In Vitro Cell Dev Biol.* **1993** ; 29A(2): 140-144.
- 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 β . *Biochem Pharmacol.* **2000** ; 59(5): 485-496.
- 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 γ promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med.* **1998** ; 4(9): 1053-1057.
- Lefebvre AM, Paulweber B, Fajas L, Woods J, McCrary C, Colombel JF, Najib J, Fruchart JC, Datz C, Vidal H, Desreumaux P, Auwerx J.** Peroxisome proliferator-activated receptor γ is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J Endocrinol.* **1999** ; 162(3): 331-340.
- Lehmann JM, Zhang XK, Graupner G, Lee MO, Hermann T, Hoffmann B, Pfahl M.** Formation of retinoid X receptor homodimers leads to repression of T3 response: hormonal cross talk by ligand-induced squelching. *Mol Cell Biol.* **1993** ;13(12): 7698-7707.
- Leid M, Kastner P, Chambon P.** Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sciences.* **1992** ; 17: 427-433.
- Levi F, Pasche C, La Vecchia C, Lucchini F, Franceschi S.** Food groups and colorectal cancer risk. *Br J Cancer.* **1999** ; 79 (7/8): 1283-1287.
- Levy GN.** Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *FASEB J.* **1997** ; 11(4): 234-247. Review.
- Li XS, Shao ZM, Sheikh MS, Eiseman JL, Sentz D, Jetten AM, Chen JC, Dawson MI, Aisner S, Rishi AK.** Retinoic acid nuclear receptor β inhibits breast carcinoma anchorage independent growth. *J Cell Physiol.* **1995** ; 165: 449-458.
- Lipkin M, Reddy B, Newmark H, Lamprecht SA.** Dietary factors in human colorectal cancer. *Annu Rev Nutr.* **1999** ; 19: 545-86. Review.
- Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dolle P, Dierich A, Gorry P, Gansmuller A, Chambon P.** Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development.* **1994** ; 120(10): 2723-2748.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **1951** ; 193: 265-275.
- Luong C, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C, Browner MF.** Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol.* **1996** ; 3: 927-933.
- Ma XJ, Salati LM, Ash SE, Mitchell DA, Kantley SA, Fantozzi DA, Goodridge AG.** Nutritional regulation and tissue specific expression of the malic enzyme gene in the chicken. *J Biol Chem.* **1990** ; 265: 18435-18441.
- Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, Kkakizuka A, Evans RM.** Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes and Dev.* **1992** ; 6: 329-344.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark E, Chambon P, Evans RM.** The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* **1995** ; 83: 835-839.
- Mansen A, Guardiola-Diaz H, Rafter J, Branting C, Gustafsson JA.** Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in the mouse colonic mucosa. *Biochem Biophys Res Commun.* **1996** ; 222 (3): 844-851.

- Martin F, Caignard A, Jeannin JF, Leclerc A, Martin M.** Selection by trypsin of two sublines of rat colon cancer cells forming progressive or regressive tumors. *Int J Cancer*. **1983** ; 32(5): 623-627.
- Mazière S, Cassand P, Narbonne JF, Meflah K.** Vitamin A and apoptosis in colonic tumor cells. *Int J Vit Nut Res*. **1997** ; 67(4): 237-241.
- Mazière S, Meflah K, Tavan E, Champ M, Narbonne JF, Cassand P.** Effect of resistant starch and / or fat soluble vitamins A and E on initiation stade of aberrant crypts in rat colon. *Nutr. Cancer*. **1998** ; 31(3): 168-178.
- Mc Closkey HM, Glick JM, Ross AC, Rothblat GH.** Effect of fatty acid supplementation on cholesterol and retinol esterification in J774 macrophages. *Biochim Biophys Acta*. **1988** ; 963(3): 456-647.
- Mc Cormack SA, Viar MJ, Tague L, Johnson LR.** Altered distribution of nuclear receptor RAR β accompanies proliferation and differentiation changes caused by retinoic acid in Caco-2 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Animal*. **1996** ; 32: 53-61.
- Mc Lellan EA, Medline A, Bird RP.** Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions in rat colon. *Carcinogenesis*. **1991** ; 12(11): 2093-2098.
- Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM.** Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem*. **1999** ; 274(12): 8328-8334.
- Medhurst AD, Harrison DC, Read SJ, Campbell CA, Robbins MJ, Pangalos MN.** The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J Neuros Meth*. **2000** ; 98: 9-20.
- Mendelsohn C, Lohnes D, Decimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, Mark M.** Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development*. **1994** ; 120(10): 2749-2771.
- Menegoz F, Black RJ, Arveux P, Magne V, Ferlay J, Buemi A, Carli PM, Chapelain G, Faivre J, Gignoux M, Grosclaude P, Mace-Lesec'h J, Raverdy N, Schaffer P.** Cancer incidence and mortality in France in 1975-95. *Eur J Cancer Prev*. **1997** ; 6(5): 442-466.
- 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 Letters*. **2001** ; 164: 15-23.
- Miyakita A, Okuno S, Watanabe TK, Oga K, Tsuji A, Hishigaki H, Suto T, Nakagawa K, Nakahara Y, Higashi K.** Molecular cloning of rat PPAR γ gene, Published only in DataBase, **1998**.
- 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.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW.** Activation of β -catenin-Tcf signalling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science*. **1997** ; 275(5307): 1787-1790.
- 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 γ . *Mol Cell*. **1998** ; 1(3): 465-470.
- Nagpal S, Athanikar J, Chandraratna RA.** Separation of transactivation and AP1 antagonism functions of retinoic acid receptor α . *J Biol Chem*. **1995** ; 270(2): 923-927.

- Nano JL, Nobili C, Girard-Pipeau F, Rampal P.** Effet des acides gras sur les cellules Caco-2. Communication orale Club d'Etude des Cellules Epithéliales et Digestives Barcelone **2002**.
- Napoli JL.** Prostaglandin E and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate are negative modulators of retinoic acid synthesis. *Arch Biochem Biophys.* **1993** ; 300(2): 577-581.
- Narahara H, Tatsuta M, Lishi 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): 157-161.
- Newberne PM, Bueche D, Riengropitak S, Schragger TF.** The influence of dietary levels of vitamin A and fat on colon cancer. *Nut Cancer.* **1990** ; 13(4): 235-242.
- Newberne PM, Rogers AE.** Princess Takamatsu Symp. **1985** ; 16: 205-22. Review.
- Nicholson ML, Neoptolemos JP, Clayton HA, Talbot IC, Bell PR.** Inhibition of experimental colorectal carcinogenesis by dietary ω -6 polyunsaturated fats. *Carcinogenesis.* **1990** ; 11(12): 2191-2197.
- Nicke B, Riecken AO, Rosewicz S.** Induction of retinoic acid receptor β mediates growth inhibition in retinoid resistant human colon carcinoma cells. *Gut.* **1999** ; 45: 51-57.
- 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.
- Nudel U, Zakut R, Shani M, Neuman S, Levy Z, Yaffe D.** The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic β -actine gene. *Nucl Ac Res.* **1983** ; 11: 1759-1771.
- Onogi N, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Fukutomi Y, Moriwaki H, Muto Y, Kojima S.** Antiproliferative effect of carotenoids on human colon cancer cells without conversion to retinoic acid. *Nut Cancer.* **1998** ; 32(1) : 20-24.
- Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM.** Suppression of intestinal polyposis in Apc δ 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Cell.* **1996** ; 87(5): 803-809.
- Ostrowski J, Janik P, Nowacki M, Janczewska I, Przybyszewska M, Szaniawska B, Bartnik W, Butruk E.** Serum retinol level in patients with colorectal premalignant and malignant lesions. *Br J Cancer.* **1987** ; 55(2): 203-205.
- Ota N, Hirano K, Warashina M, Andrus A, Mullah B, Hatanaka K, Taira K.** Structural analysis of nucleic acids by using fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Nucleic Acids Symp Ser.* **1997** ; (37): 207-208.
- Park BH, Vogelstein B, Kinzler KW.** Genetic disruption of PPAR δ decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells. *PNAS U S A.* **2001** ; 98(5): 2598-2603.
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J.** Cancer Incidence in Five Continents. Vol VII, IARC Scientific Publication n $^{\circ}$ 143, Lyon, **1997**.
- Paulsen JE, Elvsaaas IK, Steffensen IL, Alexander J.** A fish oil derived concentrate enriched in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as ethyl ester suppresses the formation and growth of intestinal polyps in the Min mouse. *Carcinogenesis.* **1997** ; 18(10): 1905-1910.
- Paulsen JE, Lützow-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): 3485-3489.
- Pereira MA.** Prevention of colon cancer and modulation of aberrant crypt foci, cell proliferation, and apoptosis by retinoids and NSAIDs. *Adv Exp Med Biol.* **1999** ; 470: 55-63. Review.

- Pfahl M.** Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev.* **1993** ; 14(5): 651-658. Review.
- Plateroti M, Sambuy Y, Nobili F, Bises G, Perozzi G.** Expression of epithelial markers and retinoid-binding proteins in retinol- or retinoic acid-treated intestinal cells *in vitro*. *Exp Cell Res.* **1993** ; 208(1): 137-147.
- Poirier H, Niot I, Besnard P.** Regulation of gene expression by fatty acids : special reference to fatty acid-binding protein (FABP). *Biochimie.* **1997** ; 79: 129-133.
- Polakis P.** Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* **2000** ; 14(15): 1837-1851. Review.
- Polly P, Carlberg C, Eisman JA, Morrison NA.** 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 receptor as a mediator of transrepression of retinoid signaling. *J Cell Biochem.* **1997** ; 67(3): 287-296.
- Potier de Courcy G, Durand G, Abraham J, Gueguen L.** Recommendations sur les conditions d'alimentation des animaux de laboratoire (rats et souris). *Sci Alim.* **1989** ; 9 : 209-217.
- Potter JD.** Nutrition and colorectal cancer. *Cancer Causes and Control.* **1996** ; 7: 127-146.
- Prescott SM, Fitzpatrick FA.** Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochem Biophys Acta.* **2000** ; 1470: M69-M78.
- Pretlow TP, O'Riordan 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.
- Proenza AM, Llado I, Serra F, Pico C, Pons A, Palou A.** Tissue composition in persistent dietary obesity after early and adulthood overfeeding in the rat. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* **1992** ; 100(2): 147-154.
- Quaroni A, Isselbacher KJ, Ruoslahti E.** Fibronectin synthesis by epithelial crypt cells of rat small intestine. *PNAS U S A.* **1978** ; 75(11): 5548-5552.
- Randolph RK, Ross C.** Regulation of retinol uptake and esterification in MCF-7 and HepG2 cells by exogenous fatty acids. *J Lipid Res.* **1991** ; 32: 809-820.
- 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: 1927-1933.
- Rao CV, Simi B, Hirose Y, Upadhyaya P, El-Bayoumy K, Reddy BS.** Mechanisms in the chemoprevention of colon cancer: modulation of protein kinase C, tyrosine protein kinase and diacylglycerol kinase activities by 1,4-phenylenebis-(methylene)selenocyanate and impact of low-fat diet. *Int J Oncol.* **2000** ; 16(3): 519-527.
- Reddy BS, Buril C, Rigotty J.** Effects of diets high in ω -3 and ω -6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Research.* **1991** ; 51: 487-491.
- Redonnet A, Groubet R, Noel-Suberville C, Bonilla S, Martinez A, Higeret 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.* **2001** ; 50(10): 1161-1167.
- Reilly KJ, Frankel WL, Rombeau JL.** Short chain fatty acids and postoperative intestinal adaptation. In *Short Chain Fatty Acids*. Eds, HJ Binder, J. Cummings, K. Soergel, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. **1994** ; 161-179.
- Riboli E, Declôte F, Collet-Ribbing C.** Alimentation et cancer - Evaluation des données scientifiques, Edition Lavoisier, Tec et Doc, Paris. **1996**.
- Riboli E.** Panorama épidémiologique du thème alimentation et cancer. Réseau NACRe, *Nutrition Alimentation Cancer Recherche Nantes*, 29 septembre. **2000**.

- Robinson DR, Urakase M, Huang R, Taki H, Sugiyama E, Knoell CT, Xu L, Yeh ET, Auron PE.** Dietary marine lipids suppress the continuous expression of interleukin-1B gene by fatty acids. *Lipids*. **1996** ; 31: S23- S31.
- Roy HK, Karoski WJ, Ratashak A, Smyrk TC.** Chemoprevention of intestinal tumorigenesis by nabumetone: induction of apoptosis and Bcl-2 downregulation. *Br J Cancer*. **2001** ; 84(10): 1412-1416.
- Rumi G Jr, Szabo I, Vincze A, Matus Z, Toth G, Rumi G, Mozsik, G.** Decrease in serum levels of vitamin A and zeaxanthin in patients with colorectal polyp. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. **1999** ;11(3): 305-308.
- Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, Alvarez JG, Ming UT, Baird SM, Thomazy VA, Evans RM.** Activators of the nuclear receptor PPAR γ enhance colon polyp formation. *Nat Med*. **1998** ; 4(9): 1058-1061.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. **1988** ; 239(4839): 487-91.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning. A laboratory manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. **1989**.
- Sani BP, Allen RD, Moorer CM, McGee BW.** Interference or retinoic acid binding to its binding protein by ω -6 fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*. **1987** ; 147: 25-30.
- 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(6): 799-804.
- Schmutzler C, Brtko J, Winzer R, Jakobs TC, Meissner-Weigl J, Simon D, Goretzki PE, Kohrle J.** Functional retinoid and thyroid hormone receptors in human thyroid-carcinoma cell lines and tissues. *Int J Cancer*. **1998** ; 76(3): 368-376.
- Schober SE, Comstock GW, Helsing KJ, Salkeld RM, Morris JS, Rider AA, Brookmeyer R.** Serologic precursors of cancer. I. Prediagnostic serum nutrients and colon cancer risk. *Am J Epidemiol*. **1987** ; 126(6): 1033-1041.
- Seed B.** PPAR γ and colorectal carcinoma : Conflicts in a nuclear family. *Nature Medicine*. **1998** ; 4: 1004-1009.
- Sellmayer A, Danesch U, Weber PC.** Effects of different polyunsaturated fatty acids on growth-related early gene expression and cell growth. *Lipids*. **1996** ; 31 Suppl: S37-40.
- Shang Y, Baumrucker CR, Green MH.** The induction and activation of STAT1 by all-*trans*-retinoic acid are mediated by RAR β signalling pathways in breast cancer cells. *Oncogene*. **1999** ; 18: 6725-6732.
- ShattuckBrandt RL, Lamps LW, Goss KJH.** Differential expression of matrisylin and cyclooxygenase-2 in intestinal and colorectal neoplasm. *Molecular Carcinogenesis*. **1999** ; 24: 177-187.
- Siveira ER, Moreno F.** Natural retinoids and β -carotene : from food to their actions on gene expression. *J Nutr Biochem*. **1998** ; 9 : 446-456.
- 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): 670-677.
- Smith WL, Marnett LJ.** Prostaglandin endoperoxide synthase : structure and catalysis. *Biochem Biophys Acta*. **1991** ; 1083: 1-17.
- Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW.** Mutational analysis of the APC/ β -catenin/ Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Research*. **1998** ; 58: 1130-1134.

- Stanley L.** Molecular aspects of chemical carcinogenesis: the roles of oncogenes and tumor suppressor genes. *Toxicology*. **1995** ; 96 : 173-194.
- Steiniger HH, Arntsen BM, Spydevold O, Sorensen HN.** Gene transcription of the retinoid X receptor α (RXR α) is regulated by fatty acids and hormones in rat hepatic cells. *J Lipid Res*. **1998** ; 39(4): 744-754.
- Stewart LMV, Thomas ML.** Retinoids differentially regulate the proliferation on colon cancer cell lines. *Expe. Cell Res*. **1997** ; 233: 321-329.
- 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: 798-804.
- 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, Zakim D, Weksler BB, Dannenberg AJ.** Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med*. **1997** ; 216(2): 201-210. Review.
- Suruga K, Mochizuki K, Kitagawa M, Goda T, Horie N, Takeishi K, Takase S.** Transcriptional regulation of cellular retinol-binding protein, type II gene expression in small intestine by dietary fat. *Arch Biochem Biophys*. **1999** ; 362(1): 159-166. (a)
- Suruga K, Mochizuki K, Suzuki R, Goda T, Takase S.** Regulation of cellular retinol-binding protein type II gene expression by arachidonic acid analogue and 9-cis retinoic acid in Caco-2 cells. *Eur J Biochem*. **1999** ; 262(1): 70-78. (b)
- Suzuki K, Muto T, Shinozaki M, Yokoyama T, Matsuda K, Masaki T.** Differential diagnosis of dysplasia-associated lesion or mass and coincidental adenoma in ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum*. **1998** ; 41(3): 322-327.
- Takahashi M, Fukuda K, Sugimura T, Wakabayashi K.** B-catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. *Cancer Res*. **1998** ; 58(1): 42-46.
- Takahashi N, Okumura T, Motomura M, Kohgo Y.** Growth inhibition of gastric cancer cells by troglitazone, a ligand for peroxisome proliferated receptor γ . *Gastroenterology*. **1999** ; 116: G2257.
- Takase S, Suruga K, Goda T.** Regulation of vitamin A metabolism-related gene expression. *Br J Nutr*. **2000** ; 84 Suppl 2: S217-221.
- Tanaka T, Kohno H, Yoshitani S, Takashima S, Okumura A, Murakami A, Hosokawa M.** Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and γ inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res*. **2001** ; 61(6): 2424-2428.
- Thorling EB.** Obesity, fat intake, energy balance, exercise and cancer risk. A review. *Nutr Res*. **1996** ; 16: 315-368.
- Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW.** Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med*. **1991** ; 325: 1593-1596.
- Thune I, Lund E.** Physical activity and risk of colon cancer in men and women. *Br J Cancer*. **1996** ; 73: 1134-1140.
- Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CD, Brun RP, Mueller E, Allik S, Oppenheim H, Evans RM, Spiegelman BM.** Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and the retinoid X receptor. *PNAS U S A*. **1997** ; 94(1): 237-241.

- Trichopoulos D, Li FP, Hunter DJ.** What causes cancer? *Sci Am.* **1996** ; 275(3) :80-87. Review.
- Tsuji M, Kawano S, DuBois RN.** Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *PNAS U S A.* **1997** ; 94(7): 3336-3340.
- 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): 1447-1453.
- Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS, Moller DE.** Regulation of PPAR γ gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest.* **1996** ; 97(11): 2553-2561.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL.** Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med.* **1988** ; 319: 525-532.
- Vogelstein B, Kinzler KW.** The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics.* **1993** ; 4: 138-141.
- Wächtershauser A, Loitsch SM, Stein J.** PPAR γ is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate. *Biochem Biophys Res Commun.* **2000** ; 272(2): 380-385.
- Wan H, Dawson MI, Hong WK, Lotan R.** Overexpressed activated retinoid X receptors can mediate growth inhibitory effects of retinoids in human carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry.* **1998** ; 273(41): 26915-26922.
- Wan YJ.** Retinoic acid and its receptors. *Am J Surg.* **1993** ; 166(1): 50-53. Review.
- Wasan HS, Novelli M, Bee J, Bodmer WF.** Dietary fat influences on polyp phenotype in multiple intestinal neoplasia mice. *PNAS USA.* **1997** ; 94: 3308-3313.
- Weber RV, Stein DE, Scholes J, Kral JG.** Obesity potentiates AOM-induced colon cancer. *Dig Dis Sci.* **2000** ; 45(5): 890-895.
- Weinberg RA.** How cancer arises. *Sci Am.* **1996** ; 275(3): 62-70. Review.
- Whittemore AS, Wu-Williams AH, Lee M, Shu Z, Gallagher RP, Deng-Ao J.** Diet, physical activity, and colorectal cancer among Chinese in North America and China. *J Natl Cancer Inst.* **1990** ; 82: 815-826.
- World Cancer Research Fund.** Food, nutrition and the prevention of cancer : a global perspective. In American Institute for Cancer Research. Ed, G. Cannon, Washington. **1997** ; 13-17 ; 23-26 ; 216-251.
- Yamada Y, Yoshimi N, Hirose Y, Hara A, Shimizu M, Kuno T, Katayama M, Qiao Z, Mori H.** Suppression of occurrence and advancement of β -catenin-accumulated crypts, possible premalignant lesions of colon cancer, by selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib. *Jpn J Cancer Res.* **2001** ; 92(6): 617-623.
- Yamada Y, Yoshimi N, Hirose Y, Kawabata K, Matsunaga K, Shimizu M, Hara A, Mori H.** Frequent β -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): 3323-3327.
- Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Miki H, Kubota N, Terauchi Y, Tsuchida A, Tsuboyama-Kasaoka N, Yamauchi N, Ide T, Hori W, Kato S, Fukayama M, Akanuma Y, Ezaki O, Itai A, Nagai R, Kimura S, Tobe K, Kagechika H, Shudo K, Kadowaki T.** Inhibition of RXR and PPAR γ ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest.* **2001** ; 108(7): 1001-1013.
- 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): 1379-1383.
- Zelent A, Krust A, Petkovich M, Kastner P, Chambon P.** Cloning of murine α and β retinoic acid receptors and a novel receptor γ predominantly expressed in skin. *Nature.* **1989** ; 339(6227): 714-717.

- Zheng Y, Kramer PM, Lubet RA, Steele VE, Kellof JG, Pereira MA.** Effect of retinoids on AOM-induced colon cancer in rats : modulation of cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci. *Carcinogenesis*. **1999** ; 20(2) : 255-260.
- Zock PL, Katan MB.** Linoleic acid intake and cancer risk: a review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. **1998** ; 68(1): 142-53.

Annexes

ANNEXES

Durée du régime : trois mois

Induction : 50 mg/kg

Tableau I: Nombre de FCA à n CA par animal consommant le régime témoin pendant 3 mois (DMH : 50 mg/kg)

Témoins : 5 % de lipides

1 CA	2 CA	3 CA	4 CA	5 CA	6 CA
6	16	9	5	1	0
8	29	15	2	1	0
6	8	7	4	0	0
10	17	11	6	2	0
1	11	10	7	2	1
10	17	9	6	2	0

Tableau II: Nombre de FCA à n CA par animal consommant le régime hyperlipidique pendant 3 mois (DMH : 50 mg/kg)

Hyperlipidiques : 25 % de lipides

1 CA	2 CA	3 CA	4 CA	5 CA	6 CA	7 CA
5	17	8	2	3	0	0
4	14	20	8	1	0	0
5	13	7	3	0	0	0
7	12	17	11	2	1	0
7	13	8	11	1	0	1
2	16	11	6	0	0	0

Durée du régime : trois mois

Induction : 15 mg/kg

Tableau III: Nombre de FCA à n CA par animal consommant le régime témoin pendant 3 mois (DMH : 15 mg/kg)

Témoins : 5 % de lipides

1 CA	2 CA	3 CA	4 CA	5 CA	6 CA
16	17	14	6	2	0
6	12	13	3	2	2
7	8	3	2	0	0
11	5	5	1	0	0
1	8	8	6	1	0
5	9	3	0	0	0

Tableau IV: Nombre de FCA à n CA par animal consommant le régime hyperlipidique pendant 3 mois (DMH : 15 mg/kg)

Hyperlipidiques : 25 % de lipides

1 CA	2 CA	3 CA	4 CA	5 CA
1	2	1	1	1
6	6	7	0	0
3	6	2	3	4
9	19	18	6	3
2	1	2	3	1
6	13	3	4	4

Durée du régime : cinq mois

Induction : 15 mg/kg

Témoins : 5 % de lipides

Tableau V: Nombre de FCA à n CA par animal consommant le régime témoin pendant 5 mois (DMH : 15 mg/kg)

1 CA	2 CA	3 CA	4 CA	5 CA	6 CA	7 CA	8 CA	9 CA
4	10	4	2	1	0	0	0	0
5	3	10	2	1	0	0	0	0
1	6	5	1	2	0	1	0	1
7	9	3	4	2	2	0	1	0
2	11	4	5	4	0	0	0	0
4	4	5	3	2	2	2	0	0
1	5	3	4	1	0	0	0	0

Hyperlipidiques : 25 % de lipides

Tableau VI: Nombre de FCA à n CA par animal consommant le régime hyperlipidique pendant 5 mois (DMH : 15 mg/kg)

1 CA	2 CA	3 CA	4 CA	5 CA	6 CA	7 CA	8 CA	9 CA	10 CA	11 CA	12 CA
20	17	19	12	10	8	1	0	0	1	0	0
2	10	4	2	1	1	0	0	1	0	0	0
4	4	6	9	1	2	3	1	0	0	0	0
6	5	1	2	2	0	1	0	0	0	0	0
4	5	9	8	7	2	1	0	0	0	0	0
1	5	2	5	2	2	0	0	1	0	0	0
1	4	3	5	4	4	1	0	1	0	0	1

Hyperlipidiques : 25% de lipides + Vitamine A

Tableau VII: Nombre de FCA à n CA par animal consommant le régime hyperlipidique supplémenté en vitamine A pendant 5 mois (DMH : 15 mg/kg)

1 CA	2 CA	3 CA	4 CA	5 CA	6 CA	7 CA	8 CA	9 CA
2	10	3	5	1	1	0	0	0
1	2	0	6	2	0	0	0	0
5	9	3	5	2	1	1	0	0
0	1	1	1	0	1	1	2	0
4	5	0	0	0	2	0	0	0
0	2	0	1	2	0	0	0	0
1	1	2	0	1	0	0	1	0
3	3	4	8	3	0	0	0	1
3	4	0	1	1	0	1	0	0

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans les recherches en Nutrition dont l'objectif est d'établir de nouvelles données scientifiques nécessaires à une meilleure compréhension des relations entre l'alimentation et le cancer.

L'objectif de ce travail était d'étudier les conséquences d'une alimentation riche en lipides sur la cancérogenèse colique ainsi que les interactions moléculaires entre les acides gras et la vitamine A en mesurant l'expression des récepteurs nucléaires et de marqueurs intermédiaires de cancérogenèse colique (FCA).

Nous avons mis en évidence des modifications précoces des profils d'expression des ARNm des récepteurs nucléaires dans la muqueuse colique des animaux (après un mois de régime cafétéria, connu pour induire une obésité nutritionnelle, et un régime hyperlipidique dont la source de lipides est l'huile de carthame (25% dont 80% d'acide linoléique)). Ces modifications se traduisent par une hyperexpression des ARNm du récepteur nucléaire PPAR γ et une hypoexpression des ARNm du récepteur nucléaire RAR β quel que soit le régime consommé. Elles sont maintenues après cinq mois de régime. Le régime hyperlipidique provoque une augmentation du développement de foyers de cryptes aberrantes chimio-induits.

Par ailleurs, la vitamine A donnée en supplément au régime hyperlipidique consommé pendant cinq mois, présente un effet antagoniste à celui des lipides sur l'expression de PPAR γ . L'interrelation des acides gras et de la vitamine A se jouerait au niveau de la voie de signalisation des rétinoïdes puisque la vitamine A augmente l'expression de RAR β et induit une diminution de celle de PPAR γ . Le déséquilibre d'expression de la voie de signalisation des rétinoïdes est associé à une augmentation des lésions chimio-induites dans le côlon et à une forte prolifération, *in vitro*, des cellules coliques tumorales. Ainsi, nous avons principalement observé dans des conditions physiologiques, des modulations de l'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque et des acides gras qui semble significatives d'une augmentation du risque de cancer colorectal associé à une consommation élevée en lipides.

TITRE : Study of vitamin A action on colon cancer risk related to lipidic overload

SUMMARY

The purpose of this work was to study the consequences of hyperlipidic diet on colon carcinogenesis and the molecular interactions between fatty acids and vitamin A by measuring nuclear receptor expression and intermediate markers of colon carcinogenesis (ACF).

One month of a cafeteria diet (inducer of nutritional obesity) or an hyperlipidic diet (25% safflower oil containing 80% linoleic acid) induces modifications of nuclear receptors mRNA expression in rats colonic mucosa:

- hyperexpression of PPAR γ mRNA
- hypoexpression of RAR β mRNA

These modifications are maintained after five months of hyperlipidic diet. Otherwise the supplementation of vitamin A in the hyperlipidic diet fed for five months induces a lipids antagonist effect on PPAR γ expression.

As vitamin A is able to increase RAR β and to decrease PPAR γ mRNA expression, the signalling retinoids pathway could be responsible to the relationship between fatty acids and vitamin A.

The unbalance of retinoids signaling pathway expression has been associated with an *in vivo* decrease of chemically induced preneoplastic lesions in the colon and an *in vitro* proliferation of tumorous colon cells.

So, in physiological conditions, we have mainly observed, modulations of retinoic acids and fatty acids receptors expression. They seem significant of an increase in colon cancer risk associated with hyperlipidic diets.

DISCIPLINE - SPECIALITE DOCTORALE : Sciences des Aliments et Nutrition

MOTS-CLES

Vitamine A – Acides gras – Cancérogenèse colique – Récepteurs nucléaires

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE

**Unité Nutrition et Signalisation Cellulaire, ISTAB, Université Bordeaux 1
Avenue des Facultés, 33 405 Talence Cedex**