

THÈSE

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
Sciences de la Vie et de la Santé

Ecole doctorale Homme Environnement Santé

EFFET DE LIGANDS DE PPAR
(Peroxisome Proliferator-Activated Receptors)
SUR L'EXPRESSION
DE DEUX MARQUEURS POTENTIELS
DE PROGRESSION DES CANCERS DE LA VESSIE :
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)
Adipocyte-Fatty Acid Binding Protein (A-FABP)

par

Guillaume BOITEUX

Soutenu publiquement le 23 décembre 2008

Thèse n° 25.08.10

Président du jury	Pr Hugues BITTARD	Université de Franche-Comté
Directeur de thèse	Dr Sylvie FAUCONNET	Université de Franche-Comté
Rapporteurs	Pr Norbert LATRUFFE	Université de Bourgogne
	Pr Jean-Louis CONNAT	Université de Bourgogne
Examineurs	Dr Abderrahim MAHFOUDI	Fluofarma
	Pr Hervé LANG	Université Louis Pasteur (Strasbourg I)

A mon père,

A mon grand-père,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude et mon respect aux membres du jury.

A **Mr le Professeur Norbert LATRUFFE**, et à **Mr le Professeur Jean-Louis CONNAT**, de l'Université de Bourgogne, pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

A **Mr le Docteur Abderrahim MAHFOUDI**, Directeur business developpement chez Fluofarma, et à **Mr le Professeur Hervé LANG**, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, et Praticien Hospitalier au CHU de Strasbourg, qui ont accepté d'examiner ce travail.

A **Mr le Professeur Hugues BITTARD** qui a suivi mon travail tout au long de ma thèse et qui a accepté d'être membre de ce jury.

Je remercie tout particulièrement **Mme le Docteur Sylvie FAUCONNET**, ma directrice de thèse, pour la confiance qu'elle m'a accordé, pour son encadrement, ses conseils, son enthousiasme. Merci également à **Mme le Docteur Isabelle LASCOMBE** pour ses conseils, son attention portée à l'écriture et la relecture des articles, de mes manuscrits de DEA et de thèse, et pour m'avoir transmis sa rigueur.

Je tiens à remercier également **Mme le Professeur Christiane MOUGIN**, directrice de l'équipe Carcinogénèse Epithéliale, et **Mr le Docteur Jean-Luc PRETET**, qui ont su tous deux me donner des conseils lors de nos réunions hebdomadaires et qui m'ont permis de goûter aux joies de l'enseignement. Mes remerciements vont aussi à **Mr le Professeur François AUBIN** pour son œil critique.

Un très grand merci à tous les membres de l'EA3181 anciens et actuels ; Marie-Laure, la boxeuse, Maëlle, l'experte de la temps réel, J-S, le « Pro de la réinstall », Mag, ma colocataire de bureau, Manue, la jeune mariée, Claudine, notre ancienne technicienne enfin de retour, Emilie, la « Pro de la microscopie », Zélie, la post-doc, Nicolas, « Léonardo speaking », Sylvain, « in tartiflette we trust », Jeff, le « photoshoper », Olivier, de retour en France, Véro, partie au pays du champagne, Lingzhao, reparti en Chine, Sophie, notre ingénieur, Anne, bientôt maman², Adeline, notre ancienne aide technique.

Merci également à tous les autres ; aux **membres de l'IBCT**, anciens et actuels, Kiki, Myriam, Virginie, Cessa, Audrey, Zohair, Pascale, Patricia, Stéphanie, Florelle, Dom, Chantal, Laurent, Kath, Rafika, Fafa, Marie-Blanche, Aliette, Nicolas, Francis, Jean-René; **personnel de l'hôpital**, Françoise, Laurence, Evelyne, Sylviane ; au personnel et étudiants du **Laboratoire d'histologie, de dermatologie, de bactériologie**, particulièrement Lucie, au personnel de **l'UFR de Médecine, de l'IFR133**, de **l'EFS** et tous les autres, Fab, Alex et Coralie.

Je remercie la Ligue contre le cancer, l'Université de Franche-Comté, l'Ecole Doctorale HES, le CIES de Lyon pour leur soutien financier et les formations qu'ils m'ont permis de réaliser.

Merci à mes amis particulièrement, Pierre et JC, qui ont su me donner des conseils et m'encourager lorsque j'en avais besoin, à ma famille, ma mère, ma sœur et à Fred ; à ma belle famille, Alain et Marie-Louise, Gilles et Agnès, Sandrine et Thomas, Lauranne et Benoît.

Enfin, je remercie de tout coeur mes enfants, Elouan et Justin, que j'ai un peu délaissé pour finir ce travail et bien sur ma chérie Florence qui a su m'épauler, me soutenir, m'encourager, partager mes doutes, m'écouter et m'aider. Sans toi, jamais je n'aurais pu accomplir ce travail, cette thèse est la tienne.

Résumé

Les tumeurs urothéliales sont divisées en trois groupes : les tumeurs superficielles de stade pTa qui récidivent souvent mais qui progressent très peu, les tumeurs invasives (stade pT2 à pT4) et les tumeurs superficielles à risque qui progressent souvent vers un phénotype agressif. L'identification de nouveaux marqueurs moléculaires paraît donc essentielle pour prévoir l'évolution tumorale des tumeurs superficielles afin d'adapter le traitement.

Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est un facteur clé de l'angiogenèse. L'étude, par northern-blotting et par RT-PCR quantitative, de l'expression des différents transcrits du *vegf*, à partir d'échantillons tumoraux de vessie, a montré que les carcinomes invasifs expriment plus de VEGF que les tumeurs urothéliales superficielles, suggérant que le VEGF serait un marqueur de progression des tumeurs urothéliales.

Dans un modèle cellulaire développé au laboratoire, il a été montré que les trois isotypes des PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) sont impliqués dans la régulation différentielle de l'expression du VEGF selon le degré de différenciation des cellules tumorales de vessie. En effet, les ligands de PPAR α , β et γ augmentent l'expression du VEGF dans les cellules RT4, dérivée d'une tumeur papillaire bien différenciée de grade I, alors que seul le ligand de PPAR β augmente son expression dans les cellules T24, dérivée d'une tumeur indifférenciée de grade III. L'absence d'effet des PPAR α et γ sur l'expression du VEGF dans les cellules T24 pourrait être due à l'absence de localisation nucléaire d'une protéine de la famille des FABP (Fatty Acid Binding Protein). Nous avons supposé que certaines de ces protéines étaient capables de réguler l'activité transcriptionnelle des PPAR, grâce à la prise en charge des ligands du cytoplasme vers le noyau. Nous avons montré que la A-FABP (Adipocyte-FABP) était présente à la fois dans le noyau et dans le cytosol des cellules RT4 et uniquement dans le cytosol des cellules T24.

La A-FABP serait un marqueur potentiel de progression des carcinomes urothéliaux. C'est pourquoi, nous avons développé une stratégie de quantification de la A-FABP ciblant l'ARNm et nous avons montré, à partir d'échantillons tumoraux de vessie, que le taux de A-FABP chutait en fonction du stade tumoral. Ces résultats suggèrent que le gène *a-fabp* est un gène suppresseur de tumeur. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle il serait possible en contrôlant son expression, de bloquer la progression tumorale des cancers de la vessie. Ainsi, des molécules pharmacologiques, comme les fibrates et les thiazolidinediones (ligands des PPAR α et γ), pourraient être envisagées dans le traitement des cancers de la vessie puisque nous avons montré que dans les cellules T24, elles augmentent l'expression de la A-FABP.

Mots clés : A-FABP – VEGF – PPAR – Cancer de la vessie – Marqueurs pronostiques

Abstract

Urothelial carcinoma is the most common solid malignancy of the bladder. Urothelial tumors can be classified into three categories: (i) tumors confined to the urothelium (pTa) which will recur at least once and progress to infiltrating or less differentiated neoplasms; (ii) muscle-invasive carcinomas (\geq pT2) and (iii) tumors confined to the lamina propria (pT1) that will progress to a poor prognosis muscle-invasive disease and are potentially lethal. The clinical outcome of stroma-invasive (pT1) bladder tumors is unpredictable, that is why novel prognostic factors, that would give information independently of classical predictors, are necessary to improve the biological assessment of the pT1 tumors.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF or VEGF-A) is considered as one of the most important angiogenic regulator in tumor angiogenesis. Northern-blotting analysis and quantitative RT-PCR revealed that VEGF transcript levels were higher in pT1 and pT2 bladder cancers than in pTa tumors, which suggested that VEGF mRNA level could serve as a prognostic indicator of progression in bladder cancer.

In a previous study, we reported that in two different human bladder cancer cell lines, RT4 (derived from grade I papillary carcinoma) and T24 (derived from grade III undifferentiated carcinoma), VEGF was differentially up-regulated by the three PPAR isotypes. Its expression was increased by PPAR α , β , and γ in RT4 cells and only by PPAR β in T24 cells. We hypothesized that the loss of nuclear localization of a protein related to the FABP family in grade III undifferentiated carcinoma-derived T24 cells could explain this difference because some isotypes of FABP could regulate the PPAR transcriptional activity through transport of PPAR agonists from cytoplasm to nucleus. We demonstrated that A-FABP is present in the cytoplasm and in the nucleus of RT4 cells and strictly in the cytoplasm of T24 cells. We reported, from clinical samples of bladder tumors, that the decrease of A-FABP transcript level is significantly linked to tumor stage and to histologic grade. A loss of A-FABP expression is observed in poor prognosis high grade pT1 tumors in comparison to good prognosis tumors suggesting that A-FABP is a tumor suppressor gene. Thus, the re-expression of A-FABP could be a putative therapeutic approach in early stage bladder cancer to prevent disease progression. We demonstrated that this marker is up-regulated by pharmacological molecules such as fibrates and thiazolidinediones (PPAR α and γ agonist). According to these results, these molecules could be used for bladder cancer treatment.

Keywords: A-FABP – VEGF – PPAR – bladder cancer – pronostic markers

SOMMAIRE

Remerciements	9
Résumé	11
Abstract	13
SOMMAIRE	15
Table des illustrations	19
Abréviations et Acronymes	21
INTRODUCTION	25
I. Le cancer de la vessie	27
I.1. Epidémiologie.....	27
I.2. Les facteurs de risque.....	27
I.3. La vessie : histologie et classification histopathologique.....	28
I.3.1. Histologie de la vessie.....	28
I.3.2. La classification TNM : le stade.....	29
I.3.3. Le grade.....	30
I.4. Classification clinique et traitement des tumeurs urothéliales.....	31
I.5. Les voies potentielles de la tumorigenèse urothéliale.....	33
II. Les PPAR	38
II.1. Généralités.....	38
II.1.1. Les différents isotypes de PPAR.....	38
II.1.2. Distribution tissulaire et rôles des différents isotypes des PPAR.....	39
II.1.3. Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs PPAR.....	40
II.2. Mode d'action des récepteurs PPAR.....	41
II.2.1. Complexe ligand/PPAR.....	41
II.2.2. Hétérodimérisation.....	44
II.2.3. Liaison à l'ADN.....	45

II.3. Mécanismes de régulation transcriptionnelle.....	46
II.3.1. Interaction avec des cofacteurs	46
II.3.2. Régulation transcriptionnelle négative par les PPAR : la transrépression	48
II.3.3. Rôle des FABP dans la modulation de l'activité transcriptionnelle des PPAR	49
II.3.4. Modifications post-traductionnelles des PPAR	50
II.4. Rôles des récepteurs PPAR dans la cancérogenèse	52
II.5. Rôles des récepteurs PPAR dans la cancérogenèse vésicale.....	54
II.6. Rôles des récepteurs PPAR dans l'angiogenèse	55
III. L'angiogenèse	58
III.1. Généralités.....	58
III.1.1. Définition et mécanisme	58
III.1.2. Les étapes de l'angiogenèse.....	58
III.1.3. Les facteurs angiogéniques	60
III.2. L'angiogenèse tumorale	61
III.3. Le VEGF	63
III.3.1. Généralités	63
III.3.2. Fonctions	69
III.3.3. Régulation de l'expression du VEGF.....	71
III.3.4. Thérapie anti-angiogénique	71
III.4. Valeur pronostique de la densité des microvaisseaux et du VEGF dans le cancer de la vessie.....	73
IV. A-FABP et E-FABP.....	77
IV.1. La famille des FABP.....	77
IV.1.1. Fonctions cellulaires.....	77
IV.1.2. Distribution tissulaire et régulation de l'expression des FABP.....	78
IV.2. A-FABP et E-FABP : généralités.....	80
IV.2.1. Gènes et séquences régulatrices.....	80
IV.2.2. Structure	82
IV.2.3. Les ligands des A- et E-FABP.....	83
IV.2.4. Rôles intracellulaires des A- et E-FABP.....	84
IV.3. Principales fonctions de la A-FABP	84
IV.4. Principales fonctions de la E-FABP	86
IV.5. A-FABP et E-FABP dans le cancer de la vessie	87
CADRE ET BUT DU TRAVAIL	89

RESULTATS.....	95
I. Rôle de ligands des PPAR sur l'expression du VEGF dans des lignées cellulaires dérivées de cancer humain de la vessie	97
II. Expression des VEGF-A et -B dans des tumeurs de la vessie (Article 1)	102
III. Expression des FABP dans les cellules RT4 et T24.....	144
IV. Analyse de l'expression des ARNm A-FABP dans les tumeurs urothéliales de différents stades et grades	146
V. Régulation de l'expression de la A-FABP par des agonistes des PPAR dans les cellules RT4 et T24.....	148
VI. Régulation de l'expression de la E-FABP par des agonistes des PPAR dans les cellules RT4 et T24.....	192
VII. Rôle de la A-FABP et de la E-FABP dans la régulation transcriptionnelle du VEGF ..	194
DISCUSSION	199
ANNEXES	213
Annexe 1 : Anticorps utilisés.....	215
Annexe 2 : Amorces utilisées et conditions de RT-PCR	217
Annexe 3 : Extraction des protéines cytosoliques et nucléaires	219
Annexe 4 : Etude de la localisation subcellulaire de la A-FABP par immunocytofluorescence	221
Annexe 5 : Liste des travaux personnels	223
Bibliographie	233

Table des illustrations

Figure 1 : Stade ou degré d'infiltration des tumeurs urothéliales selon la classification histo-pathologique (d'après www.infocancer.org)	28
Figure 2 : Deux voies divergentes dans la tumorigenèse urothéliale (d'après Wu et al, 2005.)	34
Figure 3 : Les isoformes de PPAR γ chez l'homme (Wang <i>et al.</i> , 2006b)	39
Figure 4 : Structure des PPAR (Boghog2, Wikipedia.org).....	41
Figure 5 : Ligands synthétiques et ligands naturels de PPAR α et de PPAR β (Tocris.com)	42
Figure 6 : Ligands synthétiques et naturels de PPAR γ (Yasui <i>et al.</i> , 2008)	44
Figure 7 : Interactions des PPAR avec des cofacteurs et activation de la transcription (d'après Yu et al. 2007)..	48
Figure 8 : Mécanismes de transactivation et de transrépression de la transcription par les récepteurs PPAR (d'après Feige <i>et al.</i> , 2006)	49
Figure 9 : Les étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement	59
Figure 10 : Les mécanismes de l'angiogenèse tumorale.....	62
Figure 11 : Schéma des transcrits alternatifs du VEGF humain	65
Figure 12 : Récepteurs des isoformes et isotypes du VEGF	67
Figure 13 : Voies de signalisation activées par le VEGF et fonctions physiologiques	70
Figure 14 : Fonctions cellulaires des FABP (d'après (Furuhashi et Hotamisligil, 2008))	78
Figure 15 : Structure de la A-FABP	82
Figure 16 : Schéma de l'import nucléaire de la A-FABP en présence de ligands activateurs	82
Figure 17 : Schéma de la stabilisation de la NLS de la A-FABP par les ligands activateurs	83
Figure 18 : Etude par northern-blotting de l'induction du VEGF par des ligands synthétiques de PPAR dans les lignées RT4 et T24 (Fauconnet <i>et al.</i> , 2002).....	98
Figure 19 : Etude par RTqPCR de l'induction de l'expression des isoformes 121, 165 et 189 du VEGF par les ligands spécifiques de PPAR dans les cellules RT4 et T24	100
Figure 20 : Expression des principaux membres de la famille des FABP	144
Figure 21 : Expression de la A-FABP dans des tumeurs de la vessie selon le stade et le grade (<i>Extrait de la figure 1 de l'article 2</i>).....	146
Figure 22 : Comparaison des expressions relatives de la A-FABP et des isoformes du VEGF en fonction du stade tumoral.....	147
Figure 23 : Expression des coactivateurs PBP, CITED-2 ou PGC-1 α dans les cellules RT4 et T24.....	149
Figure 24 Effet des agonistes de PPAR sur l'expression protéique de la E-FABP dans les cellules RT4 et T24.	192
Figure 25 : Etude de l'expression de la A- et de la E-FABP dans les fractions cytosolique et nucléaire des cellules RT4 et T24.....	194
Figure 26 : Localisation subcellulaire de la A-FABP par immunocytofluorescence dans les cellules RT4 et T24.	196

Abréviations et Acronymes

A-FABP	Adipocyte-Fatty Acid Binding Protein
aP2	Adipocyte P2
ARNm	ARN messenger
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
CBP	CREBP
CDK	Cyclin Dependant Kinase
C-FABP	Cutaneous-Fatty Acid Binding Protein
CIS	Carcinome <i>In Situ</i>
CKI	CDK Inhibitor
Cox-2	Cyclo-Oxygénase-2
CREBP	CAMP Response Element Binding Protein
DBD	DNA Binding Domain
E-FABP	Epidermal-Fatty Acid Binding Protein
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Ep-CAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FABP _{PM}	Plasma Membrane FABP
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR-3	Fibroblast Growth Factor Receptor-3
Flk-1	Fetal Liver Kinase-1 (VEGFR-2)
flt-1	Fms-Like Tyrosine Kinase 1 (VEGFR-1)
flt-4	Fms-Like Tyrosine Kinase 4 (VEGFR-3)
FPM	Faible Potentiel de Malignité (relatif au grade)
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HAT	Histone Acétylase
HDAC	Histone Déacétylase
HDL	High Density Lipoprotein
H-FABP	Heart-Fatty Acid Binding Protein
HIF-1 α	Hypoxy Inducting Factor-1 α
HRE	Hormone Response Element
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IL	Interleukine
iNOS	inducible Nitric Oxid Synthase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
Kd	Coefficient de dissociation
kDa	kilo dalton
KDR	Kinase insert Domain containing Receptor-human homologue (VEGFR-2)
K-FABP	Keratinocyte-Fatty Acid Binding Protein
LBD	Ligand Binding Domain
LDL	Low Density Lipoprotein
L-FABP	Liver-Fatty Acid Binding Protein
LOH	Loss Of Heterozygosity
LPL	Lipoprotéine Lipase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	Matrice Extracellulaire
MMP-9	Matrix Metallopeptidase 9
MVD	Microvessel Density

N-CoR	Nuclear Receptor Co-Repressor
NFκB	Nuclear Factor- <i>Kappa</i> B
NLS	Nuclear Localization Sequence
NO	Nitric Oxide
NRP-1	Neuropilin-1
NRP-2	Neuropilin 2
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
oxLDL	oxidized LDLreceptor 1
ox-LDL	oxidized Low-Density Lipoprotein
PA-FABP	Psoriasis-Associated Fatty Acid Binding Protein
PBP	PPAR Binding Protein
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PGC	PPAR Gamma Coactivator
PGD2	Prostaglandine D2
PI3K	PhosphoInositide 3-Kinase
PKA	Protéine Kinase A
PKB	Protéine Kinase B
PKC	Protéine Kinase C
PLCγ	Phospholipase C Gamma
PIGF	Placental Growth Factor
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acétate
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPRE	Peroxisome Proliferator Response Element
pRB	protéine du RétinoBlastome
RAR	Récepteur à l'Acide Rétinoïque
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RTqPCR	Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction
RTUV	Résection TransUrétrale de la Vessie
RXR	Retinoid X Receptor
SCC	Squamous Cell Carcinoma (carcinome épidermoïde de la vessie)
SMRT	Silencing Mediator (corepressor) for Retinoid and Thyroid-hormone receptors
SRC-1	Steroid Receptor Coactivator-1
STAT-1	Signal Transducer and Activator of Transcription-1
SUMO	Small Ubiquitin-like MOdifier
T-FABP	Testis-Fatty Acid Binding Protein
TGFα	Transforming Growth Factor alpha
TGFβ	Transforming Growth Factor beta
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
TNM	(Classification) Tumor, Node, Metastasis : tumeur, ganglion, métastases.
TSP-1	ThromboSPpondin-1
TZD	ThiaZoliDinediones
V-CAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-2	VEGF Receptor 2
VHL	Von Hippel-Lindau
VPF	Vascular Permeability Factor (VEGF)

INTRODUCTION

I. Le cancer de la vessie

I.1. Épidémiologie

Une étude de l'IARC (International Agency for Research on Cancer) réalisée en 2002 (Parkin *et al.*, 2005) classait le cancer de la vessie en onzième position au niveau mondial en termes d'incidence, avec 357 000 nouveaux cas estimés et un nombre de décès estimé de 145 000. L'incidence est plus importante dans les pays développés (Europe et USA). Ce cancer touche trois à quatre fois plus les hommes que les femmes et la mortalité par cancer de la vessie est cinq fois plus élevée chez l'homme. Il est classé au neuvième rang des causes de mortalité par cancer chez l'homme. En France, le rapport de l'Institut National de Veille Sanitaire, publié en 2003 (Grosclaude, 2003), classe le cancer de la vessie au 6^{ème} rang des cancers en termes d'incidence avec 10 700 nouveaux cas pour l'année 2000 et 4 558 décès soit 3 % de l'ensemble des décès par cancer. L'incidence augmente de façon très importante à partir de 40 ans. L'âge moyen au moment du diagnostic est de 69 ans chez l'homme et de 71 ans chez la femme (Chopin et Gattegno, 2001).

I.2. Les facteurs de risque

L'inhalation de fumée de tabac est le facteur de risque le plus important pour le cancer de la vessie, l'Odds ratio¹ est de 2,57 et le nombre de cancer lié au tabac est évalué à 40 % (Zeegers *et al.*, 2000). Ce sont essentiellement les aérosols de la fumée de tabac comportant des amines aromatiques (4-aminobiphényle et toluidine) à fort pouvoir carcinogène qui sont incriminés (Cordon-Cardo *et al.*, 1994). Le deuxième facteur de risque est lié aux expositions professionnelles qui sont à l'origine de 5 à 10 % des cancers de la vessie (Kogevinas *et al.*, 2003). Les professions exposées sont liées essentiellement à l'industrie chimique, métallurgique et automobile (Golka *et al.*, 2004). Dans ces professions, les employés sont tous en contact avec des carcinogènes contenant des amines aromatiques ou des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Des irritations chroniques de l'appareil urinaire induisent également une augmentation du risque de cancer de la vessie. Deux causes principales d'irritation chronique sont connues : l'infection urinaire chronique ou bilharziose urinaire, causée par *Schistosoma haematobium* retrouvé principalement dans la population africaine (Hodder *et al.*, 2000) et le cathétérisme vésical chronique chez les paraplégiques (Groah *et al.*, 2002). Ces irritations engendrent principalement

¹ L'Odds ratio est une mesure statistique, utilisée en épidémiologie, qui définit le facteur de risque pour un groupe A de développer une maladie par rapport à un groupe B. Dans notre exemple, un fumeur a 2,57 fois plus de risque de développer un cancer de la vessie par rapport à un non-fumeur.

des cancers urothéliaux de type épidermoïde. Certains agents chimiothérapeutiques, comme le cyclophosphamide, seraient associés à une augmentation du risque de cancer de la vessie (Knight *et al.*, 2002). Il n'existe apparemment pas de forme héréditaire. Cependant, certains polymorphismes des enzymes de détoxification comme les N-acétyltransférases (NATs), la glutathion-S-transférase (GST), les sulfotransférases (SULT) et le cytochrome P450 (CYP) pourraient contribuer à augmenter la susceptibilité inter-individuelle à ce cancer (Hung *et al.*, 2004).

I.3. La vessie : histologie et classification histopathologique

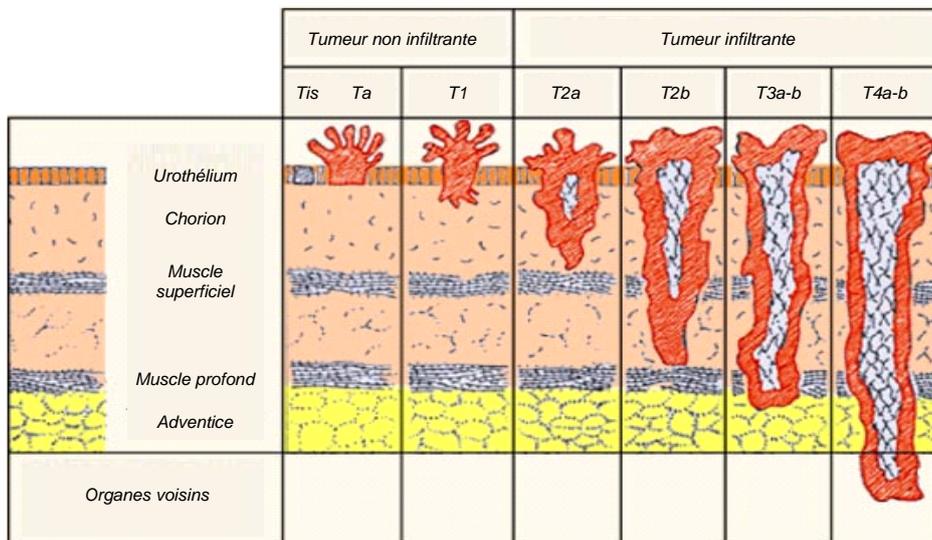


Figure 1 : Stade ou degré d'infiltration des tumeurs urothéliales selon la classification histo-pathologique (d'après www.infocancer.org)

I.3.1. Histologie de la vessie

La vessie est l'organe réservoir de l'appareil urinaire. Il est composé de trois couches : la muqueuse, la musculuse et l'adventice. La muqueuse comporte un épithélium pseudostratifié polymorphe (ou dit de transition) reposant sur un chorion (cf. Figure 1). Cet épithélium est un urothélium constitué de 3 couches de cellules superposées : une couche basale de cellules prismatiques, une zone intermédiaire et une couche superficielle ou luminale, caractérisées par la présence de *zonula occludens*. Le chorion est fait de tissu conjonctif riche en fibres élastiques et en fibres nerveuses amyéliniques ainsi qu'en vaisseaux sanguins et lymphatiques. Il ne comporte pas de glandes. La musculuse est formée par des faisceaux de cellules musculaires lisses séparées par des travées conjonctives. On distingue le muscle superficiel en contact avec le

chorion et le muscle profond qui touche l'adventice. L'adventice est composée d'un tissu conjonctif contenant des vaisseaux, des nerfs et du tissu adipeux.

Les tumeurs de vessie sont représentées à plus de 90 % par des carcinomes développés à partir de l'épithélium urothélial, et sont appelées tumeurs urothéliales. Les autres types de tumeurs représentant les 10 % restant, sont, pour la majorité, des carcinomes épidermoïdes.

Les facteurs les plus informatifs permettant d'obtenir des indications pronostiques sont le stade ou *degré d'infiltration* et le grade ou *degré d'agressivité*.

I.3.2. La classification TNM : le stade

Le stade qui correspond au degré d'infiltration pariétale est défini grâce à la classification de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) appelée classification TNM (Tumor Node Metastasis). Il se révèle très important dans l'évaluation du potentiel agressif du cancer et est essentiel au clinicien dans le choix de l'attitude thérapeutique à proposer aux patients. Cette classification a été clairement décrite en 2002 (Sobin et Wittekind, 2002).

Dans cette classification, la lettre T désigne la tumeur et en décrit l'extension observée lors de l'examen clinique (cf. Figure 1). La lettre N correspond à l'envahissement ganglionnaire. La lettre M indique la présence ou l'absence de métastases à distance (cf. Tableau 1). Pour chaque tumeur, deux classifications peuvent être données (Irani *et al.*, 2004) :

- la classification clinique TNM ou cTNM basée sur les examens cliniques (endoscopie, imagerie).
- la classification histopathologique post-opératoire ou pTNM (cf. Tableau 1). Cette deuxième classification complète la première en tenant compte des renseignements supplémentaires apportés par l'examen chirurgical et par l'étude histopathologique de la tumeur.

T Tumeur primitive	
Tx	Tumeur primitive non évaluable
T0	Tumeur primitive non retrouvée
Ta	Carcinome papillaire non invasif
Tis	Carcinome <i>in situ</i> « plan »
T1	Tumeur envahissant le chorion
T2	Tumeur envahissant la musculature
pT2a	Tumeur envahissant le muscle superficiel (moitié interne)
pT2b	Tumeur envahissant le muscle profond (moitié externe)
T3	Tumeur envahissant le tissu péri-vésical
pT3a	Envahissement microscopique
pT3b	Envahissement extra-vésical macroscopique
T4	Tumeur envahissant une structure péri-vésicale
T4a	Prostate, vagin ou utérus
T4b	Paroi pelvienne ou abdominale
N Ganglions lymphatiques régionaux	
Nx	Ganglions non évaluables
N0	Absence de métastase ganglionnaire régionale
N1	Métastase ganglionnaire unique ≤ 2 cm
N2	Métastase ganglionnaire unique > 2 cm et ≤ 5 cm
N3	Métastase(s) ganglionnaire(s) > 5 cm
M Métastases à distance	
Mx	Métastases non évaluables
M0	Absence de métastase à distance
M1	Métastase(s) à distance

Tableau 1 : Classification TNM de 2002 (Sobin et Wittekind, 2002)

I.3.3. Le grade

Le grade repose sur l'aspect architectural et le degré de différenciation cellulaire des cellules tumorales : atypie, index mitotique, conservation de la polarité, maturation urothéliale. Le grade est évalué par le médecin anatomopathologiste parallèlement au stade grâce à l'observation microscopique des prélèvements. La classification OMS de 1973 (World_Health_Organization, 1973) distinguait trois niveaux d'agressivité : grade 1, 2 et 3. Aujourd'hui, le grade histologique doit être défini selon la classification de l'OMS de 2004 (Lopez-Beltran et Montironi, 2004) qui distingue trois niveaux de malignité : la tumeur de faible potentiel de malignité (FPM), le carcinome de bas grade et le carcinome de haut grade. A notre connaissance, au CHU de Besançon, les médecins anatomo-pathologistes rendent un diagnostic de cancer de la vessie en utilisant les 2 classifications.

I.4. Classification clinique et traitement des tumeurs urothéliales

Après la détection par endoscopie d'une tumeur urothéliale, le chirurgien urologue va pratiquer l'ablation de la tumeur par les voies naturelles (voie endoscopique), c'est la résection transurétrale de la vessie (RTUV). Cette intervention chirurgicale consiste à introduire par le méat urétral un résectoscope, qui va permettre de visualiser l'intérieur de la vessie, et de réséquer la tumeur à l'aide d'une anse électrique coupante et coagulante. Grâce à l'étude histologique de la tumeur, le médecin anatomopathologiste va pouvoir déterminer son grade et son stade.

Ces tumeurs sont classées en deux groupes suivant leur invasion tissulaire :

- les tumeurs superficielles (Tis, Ta et T1) qui restent localisées dans la muqueuse (urothélium et chorion). Ces tumeurs représentent environ 70 % des tumeurs urothéliales.
- et les tumeurs invasives (de stade T2 ou supérieur) qui infiltrent la musculuse et qui représentent 30 % des tumeurs urothéliales.

Parmi les tumeurs superficielles, environ 60 % vont récidiver et 10 à 20 % vont progresser. Ces tumeurs superficielles sont elles-mêmes classées selon leur risque évolutif : faible risque, risque intermédiaire et haut risque (cf. Tableau 2). Cette classification permet de déterminer le traitement adéquat à proposer aux patients (Irani *et al.*, 2007).

Risque évolutif	Tumeurs superficielles de la vessie	Risque de progression à 5 ans
Groupe 1 : Faible risque	TaG1 unique (bas grade ou FPM), diamètre inférieur à 3 cm, non récidivé.	7,1 %
Groupe 2 : Risque intermédiaire	TaG1-G2 (bas grade ou FPM) multifocal et/ou récidivante, T1G1-G2 (bas grade ou FPM)	17,4 %
Groupe 3 : Haut risque	TaG3 (haut grade), T1 récidivante, T1G3 (haut-grade), Tis	41,6 %

Tableau 2 : Tumeurs superficielles classées selon leur risque évolutif (d'après (Irani *et al.*, 2007)et (Gattegno et Chopin, 2001))

Pour les *tumeurs superficielles à faible risque évolutif*, la RTUV est suivie d'une simple surveillance par examen cytoscopique.

Pour les *tumeurs superficielles à risque intermédiaire d'évolution*, la RTUV est suivie d'une chimiothérapie intra-vésicale et/ou d'une instillation endovésicale de BCG. Le BCG ou Bacille de Calmette et Guérin est habituellement utilisé dans la vaccination contre la tuberculose (Mahairas *et al.*, 1996). Dans le cancer de la vessie, ce bacille va agir comme un immunostimulant local. L'activation de la réponse immunitaire au BCG va se dérouler en trois phases. Tout d'abord, le bacille est phagocyté par les macrophages qui vont présenter l'antigène et permettre le démarrage de la réaction inflammatoire grâce à la sécrétion de cytokines (IL-1, IL-6 et IL-8). Puis, les antigènes bactériens sont reconnus par les cellules CD4 (TH0) qui vont se différencier en lymphocytes TH1¹. Et enfin, ces lymphocytes TH1 vont activer et recruter des cellules cytotoxiques capables d'induire la mort des cellules tumorales (Brandau et Suttman, 2007).

Les *tumeurs superficielles à haut risque* (TaG3, T1G3, Tis, cf. Tableau 2) présentent un risque de récurrence de 80 % et un taux de progression de plus de 40 %. Après RTUV, ces tumeurs sont traitées par chimiothérapie intravésicale et/ou par instillation endovésicale de BCG. En cas de récurrence précoce, la cystectomie est envisagée afin d'éviter que la tumeur n'évolue vers un phénotype invasif et métastatique. Ces tumeurs posent un problème thérapeutique pour le médecin urologue puisqu'il n'existe pas de consensus sur leur traitement. Il est donc important pour ce groupe de tumeurs de définir des critères permettant d'établir le pronostic et de guider la thérapeutique.

La plupart des tumeurs invasives (stade T2 et supérieur) et des tumeurs superficielles des groupes 2 et 3 (cf. Tableau 2) sont traitées par chimiothérapie. Pour les tumeurs superficielles, la chimiothérapie à base de mitomycine C est administrée comme le BCG par instillation endovésicale après RTUV. Elle est très souvent préconisée dans les 24 heures qui suivent la RTUV pour prévenir le risque de récurrence précoce. Pour les tumeurs invasives, elle est toujours utilisée après une cystectomie lorsque la tumeur a envahi les organes voisins et en particulier quand il existe une atteinte des ganglions lymphatiques. Dans ce cas, elle est administrée par voie intraveineuse. Les meilleurs taux de réponse et de survie ont été obtenus avec le protocole MVAC (méthotrexate, vinblastine, adriamycine, et cisplatine). D'autres protocoles sont également utilisés : le protocole CMV (cisplatine, méthotrexate et vinblastine) ou CISCA (cyclophosphamide, doxorubicine et cisplatine) (Irani *et al.*, 2007). La radiothérapie est rarement utilisée seule. Elle peut être utilisée de façon concomitante à la chimiothérapie.

¹ Lymphocyte TH1 : Lymphocyte T auxiliaire (ou helper) différencié sécrétant de l'IL-2, de l'interféron- γ (IFN- γ) et du TNF- β , cytokines impliquées dans l'immunité cellulaire.

Les tumeurs invasives sont presque toujours de grade élevé et associées à des carcinomes *in situ*¹. Leur développement engendre une augmentation de la diffusion micrométastatique et une infiltration des organes voisins de la vessie. La survie globale à 5 ans des patients présentant des tumeurs invasives est de seulement 50 % (Lebret *et al.*, 2000). Ces patients subissent une cystectomie partielle ou complète suivant l'importance de l'infiltration tumorale. Chez les femmes, la résection de la vessie signifie habituellement l'ablation de l'utérus (hystérectomie), des trompes de Fallope, des ovaires et d'une partie du vagin. Chez les hommes, la cystectomie s'accompagne souvent d'une résection de la prostate et des vésicules séminales. La cystectomie peut être précédée d'un curage ilio-obturateur, opération qui consiste à retirer les ganglions lymphatiques situés de part et d'autre de la vessie.

I.5. Les voies potentielles de la tumorigenèse urothéliale

La croissance non contrôlée des cellules de l'urothélium, observée dans le cancer de la vessie est fréquemment la conséquence d'altérations de gènes spécifiques comme les proto-oncogènes ou les gènes suppresseurs de tumeur. Ces gènes sont impliqués dans des processus moléculaires contrôlant le cycle cellulaire donc impliqués dans des mécanismes essentiels à la survie, à la prolifération des cellules et à l'apoptose. Ces altérations de gènes sont dues à des mutations, des aberrations chromosomiques (translocation, insertion, amplification ou délétion) ou à une méthylation de leurs promoteurs inhibant leur expression.

A l'heure actuelle, les voies de la cancérogenèse urothéliale ne sont pas clairement définies. Cependant grâce à la combinaison des données cliniques et à l'étude épidémiologique des mutations en fonction des données histopathologiques (stade et grade), Wu a proposé un schéma d'évolution de la tumorigenèse urothéliale (Wu, 2005).

Dans ce schéma, les tumeurs urothéliales évoluent et progressent selon deux voies distinctes : une première voie qui, suite à une hyperplasie, va générer une tumeur papillaire de bas grade qui va récidiver dans 70 % des cas ou progresser dans 15 % des cas vers une tumeur invasive de haut grade et une deuxième voie où le carcinome *in situ* (CIS) va évoluer rapidement vers un carcinome invasif (cf. Figure 2).

¹ Carcinome *in situ* : tumeur plane dont le développement reste limité à l'urothélium, de grade élevé et comportant une désorganisation architecturale des cellules.

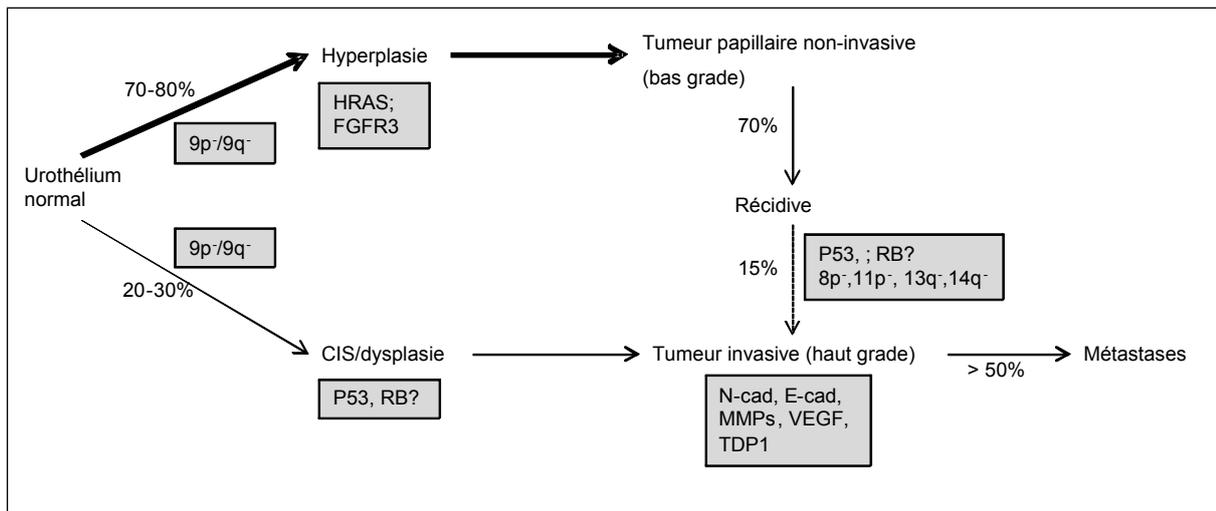


Figure 2 : Deux voies divergentes dans la tumorigenèse urothéliale (d'après Wu et al, 2005.)

Les altérations chromosomiques sont fréquentes dans les carcinomes urothéliaux, et sont caractérisées pas des aneusomies¹, et des monosomies² complètes qui touchent plus particulièrement le chromosome 9 (50 % des tumeurs urothéliales), le chromosome 11 (20 à 50 %), le chromosome 17 (40 % des cas) (Leonard *et al.*, 2002). Ces altérations chromosomiques peuvent avoir des effets même lorsqu'elles touchent un seul des 2 allèles d'un gène donné ; ce phénomène est alors appelé : perte d'hétérozygotie ou LOH (« loss of heterozygosity »). D'après Wu *et al*, la délétion des 2 bras du chromosome 9 (9p-/9q-) est l'évènement le plus précoce de la cancérogenèse urothéliale. En effet, les anomalies touchant le chromosome 9 (LOH, aneusomie et monosomie) sont surtout détectées dans les tumeurs superficielles pTa et pT1 (Spruck *et al.*, 1994). Cependant, elles sont également retrouvées dans 20 à 30 % des formes invasives des carcinomes urothéliaux (Hartmann *et al.*, 1999). Les altérations que subit le chromosome 9 peuvent conduire au phénotype tumoral, puisque sur la partie du chromosome altéré, sont situés des gènes, *p16* et *p14^{ARF}*, codant des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.

Les tumeurs urothéliales de bas grade sont le plus souvent caractérisées par la mutation des gènes *H-ras* et *fgfr3*. H-Ras est une petite protéine intracellulaire à activité GTPasique de la famille des protéines Ras, codée par le gène *H-ras*. Cette protéine fait partie de la voie de signalisation cellulaire des récepteurs à activité tyrosine kinase. Suite à l'activation du récepteur, et à l'activation subséquente de la protéine Sos *via* une protéine à domaine SH2, la protéine H-Ras

¹ aneusomie : anomalie quantitative (duplication ou délétion) partielle au niveau d'une région d'un chromosome.

² monosomie : perte d'un chromosome complet, par exemple lors d'une monosomie du chromosome 9, un seul des 2 chromosomes 9 est présent dans le génome de la cellule.

est activée et va alors déclencher une cascade de phosphorylations conduisant à une augmentation de la prolifération cellulaire. Le gène *H-ras* est le premier oncogène humain identifié dans les carcinomes urothéliaux (Capon *et al.*, 1983). Sa mutation induit la synthèse et la surexpression d'une protéine constitutivement active. Les études les plus récentes indiquent que cette mutation est retrouvée dans 30 à 40 % des carcinomes urothéliaux (Zhu *et al.*, 2004).

FGFR-3 (fibroblast growth factor receptor-3) est un récepteur à activité tyrosine kinase qui est activé par fixation d'un ligand ou qui peut être actif constitutivement après mutation dans certains cancers. Il active des voies de signalisation mitogénique. Il est muté dans 50 % des cancers urothéliaux. L'équipe du professeur D. Chopin fut une des premières à montrer que la mutation de FGFR3 était le plus souvent associée à des tumeurs urothéliales de faible grade (Billerey *et al.*, 2001). Une étude récente de Junker et collaborateurs est en accord avec ces résultats puisque sur une cohorte de 92 patients, seules les tumeurs superficielles (pTa : 69 %, pT1 : 38 %) de bas grade (G1 : 72 %, G2 : 56 %) présentent cette mutation (Junker *et al.*, 2008). D'autres études montrent que cette mutation est spécifique des tumeurs superficielles de faible grade ce qui suggère que les patients présentant une mutation de *fgfr3* ont des tumeurs de bon pronostic.

La mutation de *p53* caractérise les formes invasives. Le gène *p53* est localisé sur le bras court du chromosome 17. Il joue un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, la protéine p53, appelée encore « protéine gardienne du génome », est capable de bloquer le cycle cellulaire au point de contrôle G1/S afin de permettre à la cellule la réparation de l'ADN. Lorsque les dommages sont trop importants, p53 va orienter la cellule vers la mort cellulaire. Les mutations de p53 sont des événements fréquents (50 %) dans les tumeurs invasives de haut grade et les carcinomes *in situ* (Cordon-Cardo *et al.*, 1994 ; Orntoft et Wolf, 1998).

Sur une cohorte de 81 patients, une étude a montré que le génotype *fgfr3* muté / *p53* sauvage était le plus fréquent dans les tumeurs pTa (68 %) alors que ce génotype a été retrouvé dans 27 % des tumeurs pT1 et qu'il était absent dans les tumeurs infiltrant le muscle (pT2 à pT4) (Bakkar *et al.*, 2003). A l'inverse, le génotype *fgfr3* sauvage / *p53* muté n'a pas été observé dans les tumeurs pTa, alors qu'il est présent dans 20 % des tumeurs pT1 et dans 42 % des tumeurs pT2. La mutation de *p53* semble être un événement clé dans la tumorigenèse, puisqu'elle augmente l'instabilité génomique et permet à la cellule tumorale d'accumuler des mutations et d'évoluer vers un phénotype invasif. Enfin, le génotype *fgfr3* muté / *p53* muté est retrouvé dans un très faible nombre de tumeurs.

Ces données suggèrent que les mutations des gènes *fgfr3* et *p53* caractérisent deux groupes de tumeurs urothéliales : les tumeurs *fgfr3* muté / *p53* sauvage définiraient les tumeurs de bon

pronostic quant à leur évolution, et les tumeurs *fgfr3* sauvage / *p53* muté, les tumeurs de mauvais pronostic (Lamy *et al.*, 2006).

Parmi les tumeurs papillaires (pTa et pT1), 70 % d'entre elles vont récidiver, et 15 % vont évoluer vers un phénotype invasif. Le passage d'une forme superficielle à une forme invasive est potentiellement la conséquence de la mutation de *p53*, de *pRb*, et de la délétion des bras courts des chromosomes 8 et 11 et des bras longs des chromosomes 13 et 14.

Le gène *pRB* est muté dans 35 % des tumeurs de la vessie (Esrig *et al.*, 1994) et sa mutation est généralement associée à des tumeurs de stade avancé et de grade élevé (Cordon-Cardo *et al.*, 1997). Le gène *pRB* ou gène du rétinoblastome *RBI* joue un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire. La forme active, déphosphorylée, de pRb séquestre le facteur de transcription E2F. La phosphorylation de cette protéine par les CDK (cyclin dependent kinase) permet la libération de E2F et la transcription de gènes nécessaires à la duplication de l'ADN et à l'entrée en phase S. Lorsque pRb n'est plus exprimée, le cycle cellulaire n'est plus régulé et les cellules se divisent de manière anarchique.

Les délétions 8p⁻, 11p⁻, 13q⁻, 14q⁻ sont retrouvées dans 25 à 50 % des tumeurs urothéliales et semblent être associées aux tumeurs invasives et à la progression tumorale (Leonard *et al.*, 2002).

Le fait que la progression des tumeurs papillaires Ta de bas grade soit un évènement rare par rapport aux tumeurs pT1 de haut grade pourrait s'expliquer par la présence d'un carcinome *in situ* (CIS) précurseur dans 20 à 30 % des tumeurs pT1 et des tumeurs pT2. Les analyses moléculaires ont confirmé cette hypothèse puisque les CIS et les tumeurs invasives présentent d'emblée le même type d'altérations géniques, notamment des mutations de *p53* et de *pRB*, et certaines altérations chromosomiques.

D'autres altérations géniques ou épigénétiques sont impliquées dans la progression tumorale incluant des expressions aberrantes des protéines comme la cadhérine N et la cadhérine E, impliquées dans l'adhérence cellulaire, les métalloprotéases matricielles (MMP), des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF ou anti-angiogéniques comme la thrombospondine 1. La cadhérine E possède des propriétés inhibitrices sur l'invasion et la progression tumorales. Dans le cancer de la vessie, l'expression de la cadhérine E est diminuée au cours de la progression tumorale, et une perte de son expression est retrouvée dans 28 % des tumeurs papillaires de bas grade et 78 % des carcinomes de haut grade (Garcia del Muro *et al.*, 2000).

D'ailleurs, notre équipe a montré que l'expression de la cadhérine E est diminuée en fonction du stade (Clairotte *et al.*, 2006) et que la cadhérine N pourrait être un nouveau marqueur pronostique de progression des tumeurs urothéliales pT1 (Lascombe *et al.*, 2006).

D'autres marqueurs seraient impliqués dans la progression tumorale comme les MMP. En effet, des taux élevés de MMP, particulièrement de MMP-2 et de MMP-9, sont associés à des tumeurs de stade élevé (Kanayama, 2001). Ces enzymes protéolytiques dégradent la matrice extracellulaire et sont essentielles à l'invasion tumorale et à la formation de métastases.

Des taux élevés de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), le FGF (Fibroblast Growth Factor) ainsi que des taux faibles des inhibiteurs de l'angiogenèse comme la thrombospondine 1 sont associés aux formes invasives des tumeurs urothéliales (Campbell *et al.*, 1998). L'évaluation de l'angiogenèse tumorale (processus indispensable à la croissance et à la dissémination tumorales) semble apporter une information pronostique pour les cancers de la vessie (cf. Introduction, III.4.).

Ce sont très souvent les mutations inhibitrices des gènes suppresseurs de tumeurs ou les mutations activatrices des oncogènes qui sont décrites comme responsables de la cancérogenèse urothéliale. Cependant, des études se sont également intéressées au rôle de certains récepteurs nucléaires, et notamment à celui des PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) dans cette cancérogenèse. Possati a montré que ces récepteurs étaient exprimés dans des tumeurs urothéliales et dans différentes lignées cellulaires dérivées de cancer de la vessie (Possati *et al.*, 2000 ; Possati *et al.*, 2005). De plus, l'expression de l'isoforme γ semble être associée à la malignité de ces cellules dans des modèles de xénogreffe chez la souris (Possati *et al.*, 2005). Ces récepteurs nucléaires jouent un rôle dans l'apoptose des cellules tumorales et dans la régulation de l'angiogenèse (cf.II.6.). Une meilleure compréhension de leur rôle dans la cancérogenèse urothéliale semble essentielle pour mieux comprendre les voies moléculaires impliquées dans l'évolution des tumeurs urothéliales.

II. Les PPAR

II.1. Généralités

Les PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) sont des facteurs de transcription ligand-dépendants appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux. Activés par des ligands spécifiques, ils régulent l'expression de gènes cibles impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires et processus physiologiques (contrôle du cycle cellulaire, développement embryonnaire, différenciation cellulaire, contrôle du métabolisme lipidique, glucidique et des acides aminés) ainsi que dans un certain nombre de pathologies et désordres métaboliques (diabète, obésité, inflammation, athérosclérose et cancérogenèse).

II.1.1. Les différents isotopes de PPAR

A ce jour, trois isotopes de PPAR ont été identifiés et clonés chez les rongeurs (Issemann et Green, 1990), chez le xénope (Dreyer *et al.*, 1992) et chez l'homme (Sher *et al.*, 1993) : PPAR α (NR1C1), PPAR β (NR1C2) et PPAR γ (NR1C3) (Nuclear_Receptors_Nomenclature_Committee, 1999).

Chaque isotype est codé par un gène différent. Le gène hPPAR α est localisé sur le chromosome 22 en position 22q12-q13.1 (Sher *et al.*, 1993), le gène hPPAR γ est localisé sur le chromosome 3 en position 3p25 (Greene *et al.*, 1995) et le gène hPPAR β est situé sur le chromosome 6 en position 6p21.1-p21.2 (Yoshikawa *et al.*, 1996). La région traduite des gènes PPAR est constituée de 6 exons codants. Un exon code le domaine A/B N-terminal, deux exons codent le domaine de fixation à l'ADN ou DBD (DNA Binding Domain) – *un exon pour chaque motif en doigt de gant liant le zinc* –, un exon code la région charnière D, deux exons codent le domaine de liaison au ligand ou LBD (Ligand Binding Domain) (Desvergne et Wahli, 1999).

Le gène hPPAR γ possède en plus de ces six exons, trois exons, A1, A2 et B, situés en 5' pouvant donner par épissage alternatif quatre transcrits différents (cf. Figure 3). Ces quatre transcrits ont les six exons codants 1 à 6 en commun mais diffèrent par leur extrémité 5'. Ainsi l'ARNm codant PPAR γ 1 comprend huit exons : les exons non codants A1 et A2, en amont des exons 1 à 6. L'ARNm PPAR γ 2 est codé par sept exons : l'exon B qui contient un codon d'initiation de la traduction et qui donne une séquence amino-terminale supplémentaire spécifique de la protéine PPAR γ 2 (Fajas *et al.*, 1997 ; Zhu *et al.*, 1995). Le troisième ARNm, PPAR γ 3, est sous le contrôle d'un autre promoteur localisé dans la région flanquant l'exon A2 ; sa traduction permet la synthèse de la protéine PPAR γ 1 (Fajas *et al.*, 1998). Enfin, le site d'initiation de la transcription de l'ARNm de PPAR γ 4 se situe en amont de l'exon 1 et code la même protéine

PPAR γ 1 (Sundvold et Lien, 2001). La signification physiologique de l'existence de deux protéines différentes reste encore obscure.

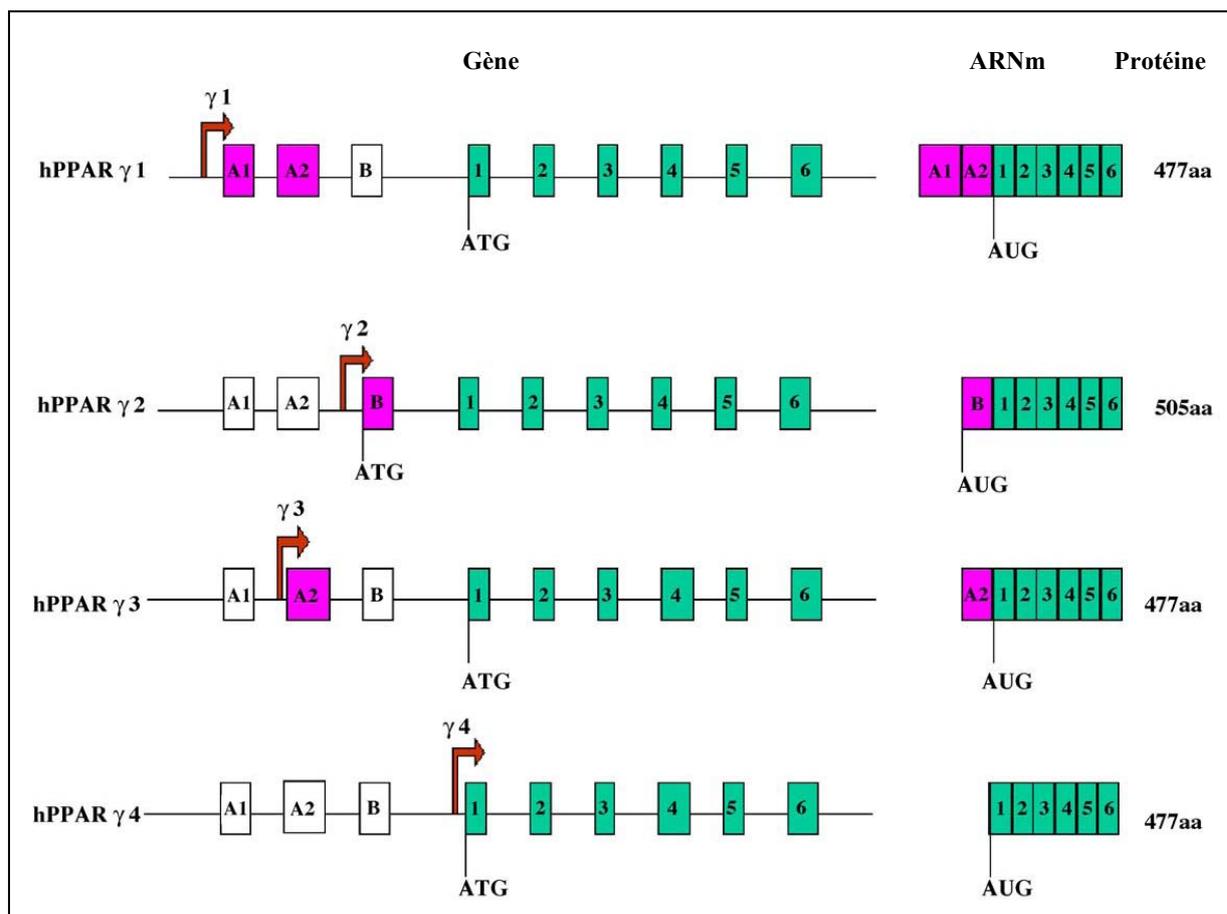


Figure 3 : Les isoformes de PPAR γ chez l'homme (Wang *et al.*, 2006b)

II.1.2. Distribution tissulaire et rôles des différents isotypes des PPAR

PPAR α est exprimé dans de nombreux tissus tels que le foie, le cœur, le cortex rénal (Guan *et al.*, 1997) et les muscles squelettiques (Ferre, 2004). Il est également retrouvé dans l'endothélium vasculaire, les monocytes et les macrophages, les lymphocytes T (Marx *et al.*, 2004) et les entérocytes de l'intestin grêle (Desvergne et Wahli, 1999). Activé, il joue un rôle majeur dans le métabolisme lipidique, l'inflammation et l'athérosclérose.

PPAR β semble être exprimé de façon ubiquitaire chez l'homme, à des niveaux généralement supérieurs aux deux autres isotypes (Vanden Heuvel, 1999) excepté dans le tissu adipeux (Youssef et Badr, 2004). Les rôles de PPAR β sont moins bien caractérisés. Toutefois, il serait impliqué dans le métabolisme lipidique au niveau du cerveau, dans le développement du placenta (implantation de l'embryon, décidualisation), dans le contrôle de la prolifération cellulaire et la différenciation des kératinocytes.

PPAR γ est principalement exprimé dans le tissu adipeux et dans une moindre mesure dans le colon (Dubuquoy *et al.*, 2000), le rein, le foie, le cœur, l'intestin grêle (Guan *et al.*, 1997), la prostate (Mueller *et al.*, 2000), les macrophages (Willson *et al.*, 2000) et le muscle squelettique (Fajas *et al.*, 1997). Il joue un rôle très important dans la différenciation adipocytaire, dans la sensibilisation à l'insuline, le métabolisme lipidique (stockage des lipides) et est impliqué dans l'inflammation, l'athérosclérose et le cancer.

II.1.3. Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs PPAR

Comme les autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, les PPARs sont organisés en plusieurs domaines fonctionnels (cf. Figure 4) :

- Un domaine A/B en région aminoterminal, peu conservé entre les différents isotypes de PPAR et possédant une fonction de transactivation ligand-indépendante nommée AF-1 capable de lier des corégulateurs (Juge-Aubry *et al.*, 1999).
- Un domaine C très conservé, comportant le domaine de fixation à l'ADN ou DBD qui est formé de deux doigts de gant liant le zinc.
- Un domaine D ou domaine charnière, impliqué dans les interactions avec les coactivateurs et les corépresseurs et contenant la séquence de localisation nucléaire (NLS).
- Un domaine E contenant le domaine de fixation du ligand ou LBD constitué de deux feuillets antiparallèles emprisonnant douze hélices α . Ce LBD exerce de multiples fonctions. En effet, en plus de son rôle dans la spécificité de fixation du ligand, il est aussi impliqué dans la dimérisation des récepteurs ainsi que dans la régulation de la transcription dépendante du ligand *via* son domaine AF-2 qui lie des corégulateurs (Activation function 2) (Michalik et Wahli, 1999).
- Un domaine F qui n'a aucune fonction connue.

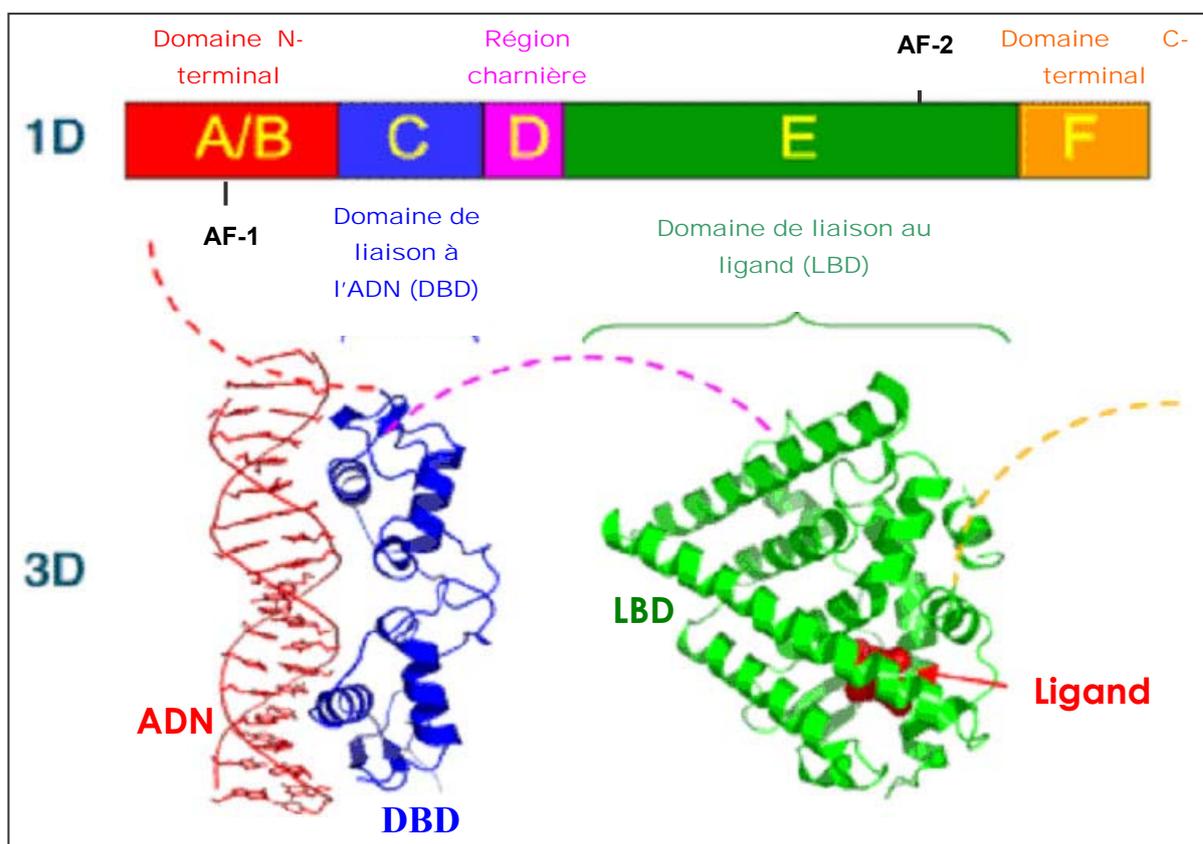


Figure 4 : Structure des PPAR (Boghog2, Wikipedia.org)

II.2. Mode d'action des récepteurs PPAR

II.2.1. Complexe ligand/PPAR

Les PPAR sont des facteurs de transcription ligand-dépendants. L'activation de leur activité transcriptionnelle et par conséquent l'activation de leurs gènes cibles dépend essentiellement de la nature du ligand lié au récepteur. Certains ligands tels que les acides gras insaturés peuvent se fixer sur les trois isotypes. D'autres sont beaucoup plus spécifiques et ont une affinité plus importante pour un isotype donné.

II.2.1.1. Les ligands de PPAR α

Les ligands naturels

PPAR α est capable de lier un grand nombre d'acides gras insaturés, dont l'acide linoléique ou l'acide arachidonique. Il peut également lier des eicosanoïdes, médiateur chimique de l'inflammation comme l'éicosanoïde 8-(S)-HETE, associé à l'inflammation induite par les esters de phorbol, le leucotriène B4 (cf. Figure 5), médiateur chimiotactique de l'inflammation. De manière générale la constante de dissociation des ligands naturels endogènes est assez faible, entre

2 et 50 μM , comparée aux autres isotypes. La faible affinité du récepteur s'expliquerait par la taille importante de son LBD qui permet la liaison de ligands lipidiques très variés (Ferre, 2004).

Les ligands synthétiques

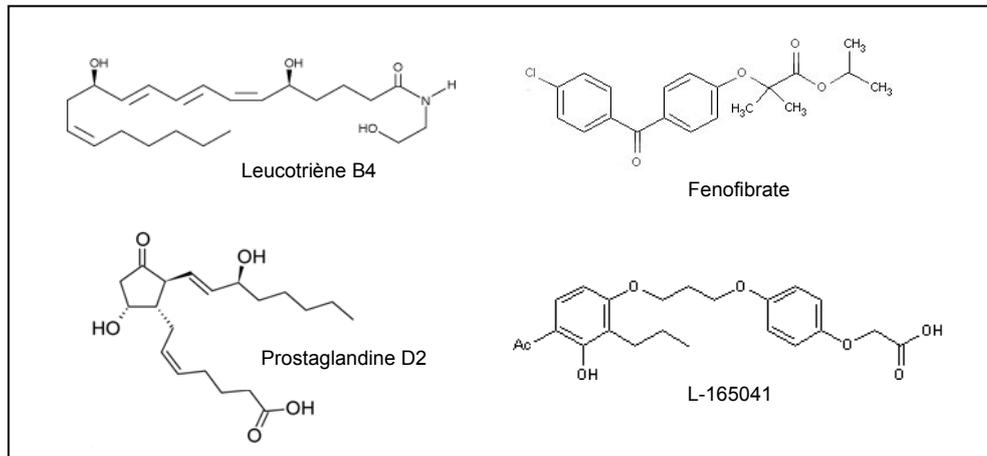


Figure 5 : Ligands synthétiques et ligands naturels de PPAR α et de PPAR β (Tocris.com)

Les ligands synthétiques de PPAR α sont des molécules thérapeutiques de la famille des fibrates (gemfibrozil, fenofibrate, bezafibrate,...). Ces molécules sont très largement prescrites dans les pays occidentaux pour le traitement des maladies cardiovasculaires associées à une augmentation des taux de triglycérides dans le sang. Elles exercent un effet hypolipidémiant en augmentant la concentration en lipoprotéines de haute densité (HDL : High Density Lipoprotein) et en diminuant celle des lipoprotéines de basse densité (LDL Low Density Lipoprotein). Des études ont pu montrer que les fibrates exerçaient leurs effets par fixation directe à PPAR α (Kliewer *et al.*, 2001). Des antagonistes spécifiques de PPAR α ont aussi été développés, comme le GW6471 (Xu *et al.*, 2002), le GW7647 (Brown *et al.*, 2001), ou le MK886 (Kehrer *et al.*, 2001).

II.2.1.2. Les ligands de PPAR β

PPAR β est aussi un récepteur pour les acides gras saturés ou insaturés. Certains acides gras polyinsaturés comme l'acide dihomog γ -linoléinique ou l'acide arachidonique ont une bonne affinité pour PPAR β , et sont capables de l'activer à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Les éicosanoïdes, comme les prostaglandines PGA2 et PGD2, sont également capable d'activer ce récepteur. Contrairement aux deux autres isotypes, il est très difficile d'identifier des ligands synthétiques efficaces et spécifiques de ce récepteur (Kliewer *et al.*, 2001 ; Willson *et al.*, 2000).

Cependant, certaines molécules pharmaceutiques ont pu être développées notamment le L-165041 (Calbiochem) que nous avons utilisé dans notre étude.

II.2.1.3. Les ligands de PPAR γ

Les ligands naturels

Les ligands naturels de PPAR γ sont des acides gras, préférentiellement des acides gras polyinsaturés comme les acides oléique, linoléique, eicosapentaénoïque et arachidonique.

Ces acides gras polyinsaturés lient et activent le récepteur à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Cependant, la plupart de ces acides gras ne sont pas des activateurs très efficaces de PPAR γ . Le plus souvent ces molécules sont transformées par la voie de la 15-lipoxygénase (15-LOX) en acide hydroxyoctadécénoïque (9-HODE et 13-HODE) et deviennent alors des agonistes efficaces de PPAR γ . Les prostaglandines dérivées de la PGD₂ ont également été identifiées comme des ligands de PPAR γ . Le métabolite terminal, la 15-d-12,14-prostaglandine J₂ (15d-PGJ₂) (cf. Figure 6) active le récepteur à des concentrations de l'ordre du micromolaire. C'est le ligand naturel le plus largement utilisé dans les expériences *in vitro* (Willson *et al.*, 2000).

Les ligands synthétiques

Les ligands synthétiques les plus décrits sont les thiazolidinediones (TZD). Ce sont des ligands spécifiques de PPAR γ avec un K_d de l'ordre de 100 nM (Lehmann *et al.*, 1995). Ces molécules pharmaceutiques ont été développées à l'origine pour leurs effets anti-diabétiques, sans aucune connaissance de leur sélectivité pour PPAR γ (Ferre, 2004). Cette nouvelle classe de molécules a été développée dans les années 1980 par la société Takeda et a été nommée glitazone (Sohda *et al.*, 1982). A l'origine ces glitazones ont été décrites comme étant capables de diminuer la glycémie chez des rongeurs résistant à l'insuline. Elles ont alors été qualifiées de "sensibilisateurs à l'insuline". La première glitazone synthétisée, la ciglitazone, possède un effet antihyperglycémiant et est capable de réduire les concentrations circulantes en insuline et en lipides, dont les triglycérides et les acides gras non estérifiés. De nouveaux membres de la famille des glitazones, plus efficaces, ont ensuite été développés : la troglitazone, la pioglitazone et la rosiglitazone (Spiegelman, 1998). La première autorisée à être prescrite, la troglitazone a été retirée du marché en raison de ses effets hépatotoxiques (Kliwer *et al.*, 2001). Les deux autres, pioglitazone et rosiglitazone, sont actuellement largement prescrites pour le traitement du diabète de type 2, sous les noms respectifs de ActosTM et AvandiaTM. Les TZD lient et activent PPAR γ à des concentrations équivalentes à celles requises pour leur activité antidiabétique chez l'homme (Spiegelman, 1998).

D'autres agonistes synthétiques de PPAR γ ont été développés comme le GW7845 (Alarcon de la Lastra *et al.*, 2004). Ils possèdent également des effets antidiabétiques comparables, voire supérieurs à ceux des TZD dans les modèles animaux. Enfin certains anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) comme l'indométhacine, l'ibuprofène, le fénoprofène et l'acide fuflenamique, sont capables, à de fortes concentrations, de se lier et d'activer PPAR γ (Lehmann *et al.*, 1997).

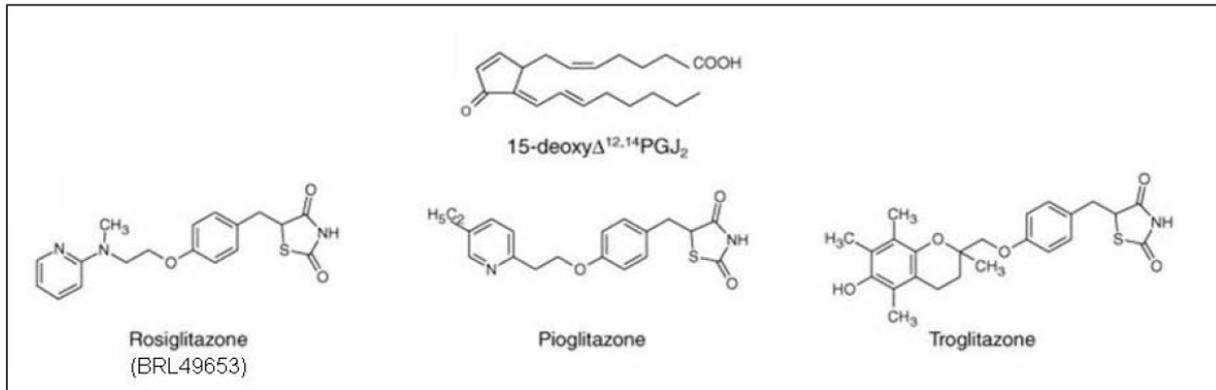


Figure 6 : Ligands synthétiques et naturels de PPAR γ (Yasui *et al.*, 2008)

En parallèle, des molécules antagonistes de PPAR γ ont également été développées comme le SR-202 (diméthyl-(diméthoxyphosphinyl)-p-chlorobenzyl phosphate) (Rieusset *et al.*, 2002), le BADGE (bisphénol A diglycidyl ether) (Wright *et al.*, 2000), le PD 068235 (Camp *et al.*, 2001), et le LG 100641 (Mukherjee *et al.*, 2000). Ces molécules permettent d'inhiber totalement ou en partie la différenciation adipocytaire *in vitro*. Récemment, une étude a montré que le GW9662, un autre antagoniste de PPAR γ , inhibait la croissance des cellules tumorales dérivées de cancer humain du sein (Seargent *et al.*, 2004).

II.2.2. Hétérodimérisation

Les PPAR sont capables de se lier à leurs éléments de réponse localisés sur leurs gènes cibles lorsqu'ils sont liés à leur partenaire unique le RXR (Retinoïd X Receptor) (Kliwer *et al.*, 1992). Il existe trois isotypes de RXR α , β et γ , codés par des gènes différents. Tous lient l'acide 9-cis rétinolique, dérivé de la vitamine A. Les trois isotypes de RXR sont capables de se dimériser avec PPAR mais des associations spécifiques avec chaque isotype semblent influencer la reconnaissance des promoteurs de gènes cibles (Juge-Aubry *et al.*, 1997). De plus, ce serait la liaison d'un RXR avec l'ADN qui semblerait importante pour la formation de l'hétérodimère PPAR/RXR et non la capacité de PPAR à reconnaître celui-ci (Temple *et al.*, 2005). L'hétérodimère PPAR/RXR est permissif, c'est-à-dire qu'il peut être activé par la liaison d'un ligand de l'un ou de l'autre des récepteurs. La liaison simultanée des deux ligands rend le

complexe plus efficace pour activer la transcription du gène cible (Ferre, 2004 ; Kliewer *et al.*, 1992). Le fait que l'hétérodimère puisse être activé par un seul des deux ligands a été en partie expliqué par le fait que chaque récepteur est capable de recruter des coactivateurs différents (Ijpenberg *et al.*, 2004). Il a été montré que la formation de l'hétérodimère PPAR/RXR ne nécessite pas la fixation du ligand ni la liaison à l'ADN (Feige *et al.*, 2005).

II.2.3. Liaison à l'ADN

Après activation, les hétérodimères PPAR/RXR régulent l'expression génique au niveau de séquences cis-régulatrices localisées dans le promoteur de gènes cibles et appelées PPRE. Ces PPRE sont constitués de la répétition d'une séquence hexanucléotidique (DR ou Direct Repeat) dont les demi-sites AGGTCA sont séparés par un nucléotide (DR-1) (Kliewer *et al.*, 1992). La structure d'un PPRE en motif DR permet la fixation des deux éléments de l'hétérodimère : PPAR interagissant avec le premier motif hexamérique AGGTCA situé en amont en 5' et RXR occupant le deuxième motif hexamérique en 3' (Ijpenberg *et al.*, 1997).

Toutefois, les éléments DR-1 sont également reconnus par les hétérodimères RAR/RXR et les homodimères des RXR, HNF-4 et COUP-TF (Mangelsdorf et Evans, 1995). La comparaison des capacités de liaison des trois isotypes de PPAR à 16 PPRE natifs a conduit à classer les PPRE en trois groupes : fort, intermédiaire et faible. Une telle étude a permis de mettre en évidence certaines particularités spécifiques aux PPRE conduisant à la liaison sélective de l'hétérodimère PPAR/RXR plutôt que des autres homo- ou hétérodimères qui reconnaissent aussi des éléments DR-1 (Juge-Aubry *et al.*, 1997). Il s'agit de la séquence située en 5' du premier motif hexamérique de l'élément DR-1, de la présence d'une adénine pour séparer les deux séquences hexamériques plutôt que d'un autre nucléotide et de la répétition imparfaite des séquences hexamériques. PPAR γ se lie plus fortement à l'ADN que les deux autres isotypes, il est donc moins dépendant de la conservation de l'extension nucléotidique en 5' du PPRE. A l'inverse, cette même séquence flanquante en 5' est essentielle pour la liaison de PPAR α (Desvergne et Wahli, 1999). C'est donc la région 5' flanquante, et plus particulièrement les 6 nucléotides flanquant le motif de répétition en 5', qui contribue à la spécificité de liaison des isotypes des PPAR au PPRE.

La liaison des PPAR à l'ADN est également modulée par l'isotype de RXR impliqué dans l'hétérodimère. En effet, la liaison PPAR/RXR à un élément de réponse fort est renforcée avec RXR γ alors que l'hétérodimérisation avec RXR α conduit plutôt à la liaison à des PPRE faibles (Murphy et Holder, 2000). Enfin, la combinaison PPAR γ /RXR α ou PPAR γ /RXR γ lie les PPRE avec plus d'affinité qu'avec PPAR α ou PPAR β (Juge-Aubry *et al.*, 1997).

II.3. Mécanismes de régulation transcriptionnelle

II.3.1. Interaction avec des cofacteurs

Les cofacteurs sont des protéines capables de réprimer (corépresseurs) ou d'augmenter (coactivateurs) l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription en modulant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et en modifiant la structure de la chromatine. Les PPAR régulent la transcription de gènes cibles grâce au recrutement de 200 cofacteurs potentiels. La fixation du ligand sur le récepteur PPAR provoque la dissociation des corépresseurs et le recrutement de différents coactivateurs transcriptionnels.

Les coactivateurs agissent selon deux principes différents soit par « ouverture » de la chromatine en acétylant les histones, soit par recrutement de la machinerie transcriptionnelle (cf. Tableau 3). Les coactivateurs interagissent directement, de manière ligand-dépendante, avec les récepteurs nucléaires possédant le motif LXXLL (où L est une leucine et X est un acide aminé quelconque) (Torchia *et al.*, 1997). Ils sont classés en trois groupes. Le premier groupe contient les coactivateurs universels. Ils incluent CBP/p300 (CREB binding protein) et SRC-1, SRC-2, SRC-3 (steroid receptor coactivator) (Zhu *et al.*, 1996). Ces coactivateurs possèdent une activité histone acétylase (HAT) qui leur permet de modifier les charges portées par les histones et ainsi de provoquer la décompaction de la structure chromatinienne nécessaire à une meilleure transcription. Le second groupe, qui contient PBP (PPAR binding protein) (Zhu *et al.*, 1997), forme un complexe de coactivateurs constitué de multiples sous-unités, appelé TRAP ou PRIC. Ces protéines ne possèdent pas d'activité enzymatique connue mais elles forment un pont entre le récepteur nucléaire et la machinerie transcriptionnelle facilitant son recrutement (Roeder, 2005). Le mécanisme d'action du troisième groupe de coactivateurs, incluant PGC-1 α , PGC-1 β (Puigserver *et al.*, 1998b) et ARA70 (Heinlein *et al.*, 1999), est encore mal connu. Vraisemblablement ce groupe recruterait des protéines possédant une activité HAT.

Gènes	Activité enzymatique	Interagit avec	Fonctions
CBP/p300	HAT	PPAR α , γ	Histone acétylation
SRC-1	HAT	PPAR α , β , γ	Histone acétylation
SRC-2	HAT	PPAR α , β , γ	Histone acétylation
SRC-3	HAT	PPAR α , β , γ	Histone acétylation
PBP	Aucune connue	PPAR α , β , γ	Recrute la machinerie transcriptionnelle
PGC-1 α	Aucune connue	PPAR α , γ	Recrute des protéines à activité HAT
PGC-1 β	Aucune connue	PPAR α , γ	Recrute des protéines à activité HAT
ARA70	Aucune connue	PPAR α , γ	Recrute des protéines à activité HAT

Tableau 3 : Principaux coactivateurs interagissant avec PPAR.

Les corépresseurs, comme SMRT (silencing mediator (co-repressor for retinoid and thyroid-hormone receptors) (Chen et Evans, 1995) et N-CoR (nuclear receptor co-repressor) (Horlein *et al.*, 1995), répriment l'activité des récepteurs nucléaires en l'absence de ligand ou en présence d'un antagoniste. Leur effet répressif est essentiellement dû au recrutement des histones déacétylases (HDAC) (Robyr *et al.*, 2000). Ces HDAC induisent une compaction de la chromatine. L'interaction entre PPAR et les corépresseurs NCoR et SMRT a été montrée *in vitro* pour les 3 isotypes de PPAR (Stanley *et al.*, 2003). De façon intéressante, l'action des corépresseurs NCoR et SMRT sur les gènes cibles de PPAR γ est promoteur spécifique. En effet, NCoR et SMRT sont associés aux promoteurs de la *glycérol kinase* et du gène *olr1* (oxidized LDL receptor 1) sous forme de complexe avec PPAR γ (Chui *et al.*, 2005). A l'inverse, ces corépresseurs sont absents du promoteur de la A-FABP (aP2) qui est constitutivement activé. En effet, dans les adipocytes murins 3T3-L1, l'hétérodimère PPAR γ /RXR peut se complexer à des coactivateurs en absence de ligand (Guan *et al.*, 2005).

D'autres classes de corépresseurs qui répriment l'activité des récepteurs nucléaires par compétition avec les coactivateurs et par recrutement d'HDAC sont également capables d'interagir avec les PPAR (White *et al.*, 2004), comme RIP140 (receptor interacting protein 140) qui peut interagir avec PPAR α et PPAR γ (Treuter *et al.*, 1998).

Lors de la fixation du ligand sur PPAR, des facteurs d'échange, comme la transducin β -like 1 (TBL-1) et la «related protein» TBL (TBLR1), s'associent au complexe récepteur nucléaire/corépresseur et facilitent le recrutement du corépresseur par le protéasome, permettant ainsi le recrutement des coactivateurs (Perissi *et al.*, 2004). Ces facteurs d'échange sont même parfois indispensables à l'activation de gènes cibles de PPAR γ , notamment dans les cellules souches embryonnaires où l'inactivation de TBL1 empêche la différenciation en adipocytes (Perissi *et al.*, 2004).

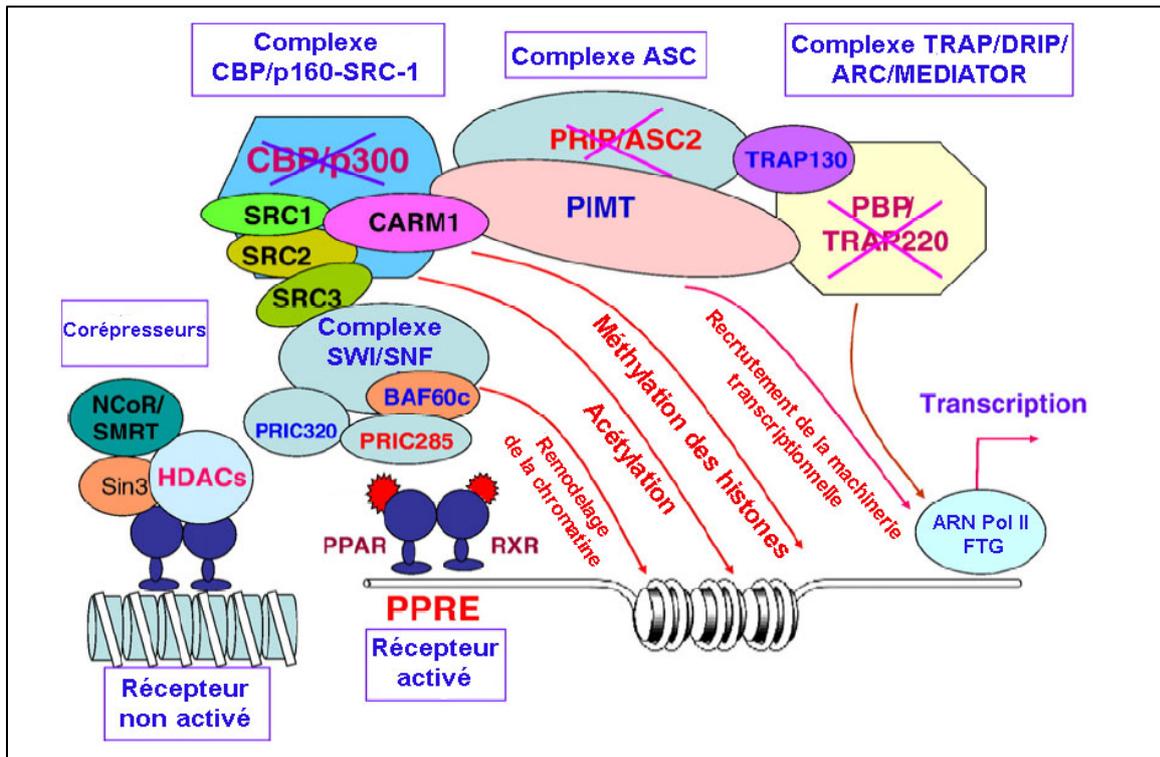


Figure 7 : Interactions des PPAR avec des cofacteurs et activation de la transcription (d'après Yu et al. 2007)

CBP/p160-SRC-1 (CREB binding protein,), ASC (activating signal cointegrator), SRC (steroid receptor coactivator), SMRT (silencing mediator (corepressor for retinoid and thyroid-hormone receptors), NcoR (nuclear receptor co-repressor), HDAC (histone deacetylase), CARM1 (coactivator-associated arginine methyltransferase 1), SWI/SNF (SWItch/Sucrose NonFermentable), PRIC (PPAR α -interacting cofactor), BAF60c (Brm-associated factor 60kDa), PIMT (PRIP interacting protein), PRIP/ASC2 (PPAR interactin protein,) PBP (PPAR binding protein), TRAP (trp RNA-binding attenuation), FTG (facteurs généraux de la transcription), ARN pol II (ARN polymérase II).

II.3.2. Régulation transcriptionnelle négative par les PPAR : la transrépression

Les PPAR sont aussi capables de réguler négativement la transcription de gènes cibles par transrépression, expliquant entre autres leurs effets anti-inflammatoires (Li et Glass, 2004). Cette transrépression permet aux PPAR d'interférer avec d'autres voies de signalisation en modulant les interactions avec des corépresseurs de façon ligand-dépendante (Marx *et al.*, 2004). Ces mécanismes de transrépression peuvent se dérouler selon deux modalités. Soit l'hétérodimère PPAR/RXR séquestre un facteur de transcription empêche sa fixation et sa transactivation au niveau de son gène cible, c'est le phénomène de "tethering" (cf. Figure 8B). Ce phénomène est observé par exemple dans les cellules T, où le facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) fixé par PPAR γ est dissocié du promoteur de l'IL-2 (Yang *et al.*, 2000). Soit PPAR/RXR séquestre les cofacteurs nécessaires à l'activité de certains facteurs de transcription,

c'est le "squelching" (cf. Figure 8C). Ce mécanisme est observé notamment pour la répression du gène *iNOS* (inducible nitric oxide synthase) où PPAR γ séquestre le cofacteur CBP et empêche ainsi la transactivation de *iNOS* par NF κ B, AP-1 et STAT-1 (Li *et al.*, 2000b ; Ricote *et al.*, 1998).

Enfin, bien que la plupart des actions des PPAR sur leurs gènes cibles seraient ligand-dépendantes, des études montrent une activité basale des récepteurs en absence de ligand. En effet, l'hétérodimère PPAR/RXR peut se former en absence de ligand (Feige *et al.*, 2005), se fixer sur la séquence PPRE de certains gènes cibles et réprimer la transcription en interagissant avec des corépresseurs (cf. Figure 8D). Ce mécanisme n'est possible que pour les isotypes α et β , puisque PPAR γ ne s'associe à des corépresseurs que sous forme soluble, non liée à l'ADN (Murphy et Holder, 2000).

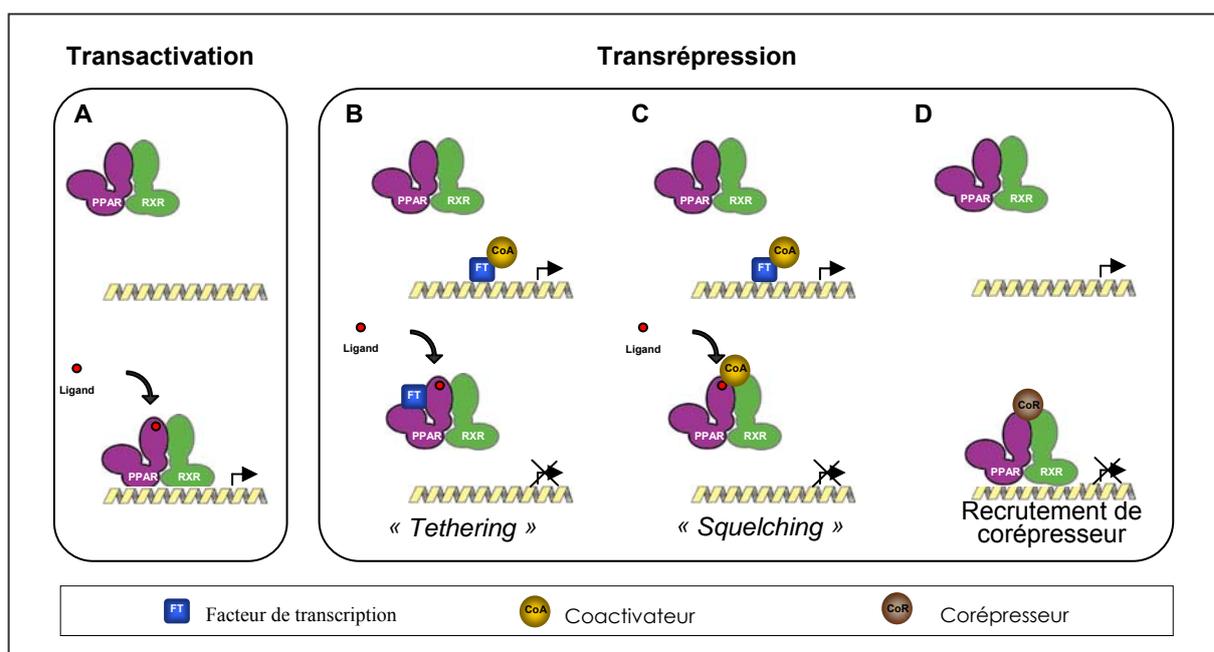


Figure 8 : Mécanismes de transactivation et de transrépression de la transcription par les récepteurs PPAR (d'après Feige *et al.*, 2006)

II.3.3. Rôle des FABP dans la modulation de l'activité transcriptionnelle des PPAR

La sélectivité des FABP (fatty acid binding protein) et des PPAR pour certains ligands suggère que ces 2 groupes de protéines coopèrent dans la régulation des activités biologiques de ces ligands. En effet, ces FABP exercent de nombreux rôles au sein de la cellule, notamment au niveau du transport des acides gras entre les organites (cf. IV.) et plusieurs membres de la famille des FABP ont été détectés dans le noyau de cellules, notamment par microscopie confocale sur

des cellules vivantes grâce à des protéines de fusion FABP/GFP (Huang *et al.*, 2004). Des interactions physiques entre A-FABP et PPAR γ et entre K-FABP et PPAR β ont été révélées par co-immunoprécipitation (Tan *et al.*, 2002). Dans des cellules COS-7, la surexpression de H-, K-, A-FABP, induite par transfection transitoire, augmente respectivement l'activité transcriptionnelle des PPAR α , β et γ en présence d'agonistes de PPAR (Helledie *et al.*, 2000 ; Tan *et al.*, 2002). Huang *et al.* ont pu observer par microscopie confocale une colocalisation de la L-FABP et de PPAR α (Huang *et al.*, 2004). Ces études indiquent que les PPAR et les FABP réalisent des interactions spécifiques et que les FABP apportent directement le ligand aux récepteurs nucléaires qui leur sont spécifiques, induisant alors une augmentation de leur activité transcriptionnelle.

II.3.4. Modifications post-traductionnelles des PPAR

II.3.4.1. Phosphorylation

De nombreuses études ont rapporté une modulation de l'activité des PPAR par phosphorylation. Ces modulations peuvent être activatrices ou inhibitrices selon l'isotype de PPAR, le résidu modifié, le stimulus, la kinase mise en jeu, le type cellulaire et le promoteur étudié. Les PPAR sont phosphorylés par de nombreuses protéines kinases comme la PKA, la PKC, les MAPK.

Il a été démontré que PPAR α est phosphorylé par la voie des MAPK en réponse à l'insuline. Cette phosphorylation induit une augmentation de son activité AF-1 (Juge-Aubry *et al.*, 1999). Dans les cardiomyocytes de rat, la protéine p38, activée par un stress ischémique, phosphoryle PPAR α et augmente son activité transcriptionnelle ligand-dépendante en renforçant ses interactions avec le coactivateur PGC-1 (Barger *et al.*, 2001). Chez la souris, PPAR α est phosphorylé par la protéine kinase A (PKA), ce qui stabilise sa liaison à l'ADN (Lazennec *et al.*, 2000). PPAR α est donc une cible pour de nombreuses voies de phosphorylation et son activité pourrait être modulée par des signaux extracellulaires liés à différents processus physiologiques (Blanquart *et al.*, 2003).

PPAR γ est également phosphorylé par différentes voies de signalisation. Mais contrairement à PPAR α , sa phosphorylation par les MAPK induit l'inhibition de son activité transcriptionnelle (Hu *et al.*, 1996). Une diminution de l'activité de PPAR γ 1 est également provoquée par la phosphorylation *via* les kinases MAPK, ERK2 et JNK (Adams *et al.*, 1997 ; Hsi *et al.*, 2001). L'effet de la phosphorylation de PPAR γ par les MAPK serait expliqué en partie par la modification d'un interdomaine du récepteur qui réduirait l'affinité du LBD pour le ligand (Shao *et al.*, 1998).

La phosphorylation des PPAR α et γ par les MAPK influence donc différemment leur activité transcriptionnelle activant PPAR α et inhibant PPAR γ (Blanquart *et al.*, 2003 ; Diradourian *et al.*, 2005).

Le contrôle post-traductionnel de PPAR β a été peu étudié contrairement aux deux autres. Il semble cependant que la PKA augmente son activité transcriptionnelle (Blanquart *et al.*, 2003).

II.3.4.2. Ubiquitinylation

L'ubiquitine est une protéine de 8 kDa fixée de façon covalente sur les protéines par des enzymes à activité ubiquitine ligase. Cette fixation induit la dégradation de la protéine ubiquitinylée par le protéasome 26S. L'ubiquitinylation et la dégradation subséquente sont liées à l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires en permettant la régulation de leur taux cellulaire (Dennis et O'Malley, 2005 ; Reid *et al.*, 2003). PPAR α comme PPAR γ peuvent être ubiquitinylés. La dégradation de PPAR γ par ubiquitinylation est augmentée par la fixation du ligand. Cette dégradation est inhibée par la fixation du corépresseur RIP-140 (Hauser *et al.*, 2000). Contrairement à PPAR γ , les agonistes de PPAR α stabilisent le récepteur (Blanquart *et al.*, 2002 ; Hirotani *et al.*, 2001). De façon intéressante, certains cofacteurs des récepteurs nucléaires comme p300 possèdent une activité ubiquitine-ligase et agiraient directement sur l'ubiquitinylation des récepteurs PPAR (Grossman *et al.*, 2003).

II.3.4.3. Sumoylation

Plus récemment, quelques études ont montré que le récepteur PPAR γ pouvait être modifiés par sumoylation. Cette modification post-traductionnelle est un processus cellulaire qui permet la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) sur un résidu lysine de la protéine cible (Ohshima *et al.*, 2004). La sumoylation régule différents mécanismes biochimiques comme la stabilité des protéines, la translocation nucléaire et la transcription de gènes (Seeler et Dejean, 2003).

La sumoylation de PPAR γ affecte sa stabilité et son activité transcriptionnelle mais pas sa localisation nucléaire (Floyd et Stephens, 2004). Des études par mutagenèse dirigée ont identifié la lysine 107 comme lysine acceptrice de la protéine SUMO-1. Ce résidu lysine se trouve dans la partie aminoterminal au niveau du domaine AF-1 et sa sumoylation régule négativement la fonction de transactivation de PPAR γ (Floyd et Stephens, 2004 ; Shimizu *et al.*, 2006 ; Yamashita

et al., 2004). Ces mêmes études ont également montré que la phosphorylation du résidu sérine 112 facilitait la sumoylation de PPAR γ .

Dans les macrophages, la sumoylation de PPAR γ inhibe l'inflammation en réprimant la transactivation des gènes de la réponse inflammatoire (Pascual *et al.*, 2005 ; Pascual *et al.*, 2007). Dans ce modèle, la sumoylation induit le recrutement de NCoR et HDAC3 et empêche l'ubiquitinylation nécessaire à la levée de l'état de répression des promoteurs des gènes cibles. Ces promoteurs restent alors à l'état réprimé et ne peuvent plus s'exprimer.

II.4. Rôles des récepteurs PPAR dans la cancérogenèse

Le rôle des PPAR dans la pathologie du cancer a été évoqué pour la première fois chez les rongeurs (Reddy et Qureshi, 1979) qui développaient des tumeurs hépatiques après ingestion de fibrates, ligand de PPAR α . Fort heureusement, chez l'homme, ces agents n'induisent pas d'hépatocarcinomes. Par contre, les ligands de PPAR α inhibent la croissance *in vitro* de plusieurs lignées cancéreuses du colon (Tanaka *et al.*, 2001), du foie (Muzio *et al.*, 2007), du sein, de l'endomètre et de la peau (Grabacka *et al.*, 2006 ; Maggiora *et al.*, 2004 ; Saidi *et al.*, 2006 ; Thuillier *et al.*, 2000). Ils inhibent également *in vitro* et *in vivo* le potentiel métastatique des cellules de mélanomes (Grabacka *et al.*, 2004 ; Grabacka *et al.*, 2006). En revanche dans des lignées humaines de cancer colorectal, PPAR α activé induit l'expression de Cox-2. Cette induction va participer à la cancérogenèse et à la progression des cellules cancéreuses colorectales (Oshio *et al.*, 2008).

Le rôle de PPAR β dans l'oncogenèse est controversé particulièrement dans le cancer du colon. Certaines études montrent que PPAR β active la tumorigenèse en augmentant la prolifération cellulaire. Le taux d'ARNm de PPAR β est augmenté dans les carcinomes colorectaux humains et murins (Gupta *et al.*, 2000 ; He *et al.*, 1999). Dans les cellules murines colorectales, la voie APC- β -caténine (APC¹ : adenomatous polyposis coli) réprime l'expression de PPAR β (Peters *et al.*, 2000). L'augmentation de l'expression de PPAR β dans le cancer colorectal semble être la conséquence d'une perte de fonction de la voie APC (He *et al.*, 1999). Une autre étude montre que PPAR β est également la cible de la voie Ras. En effet, l'expression et l'activation de PPAR β sont augmentées dans des cellules intestinales provenant de rat n'exprimant plus K-ras (K-ras -/-) (Shao *et al.*, 2002).

¹ APC : gène suppresseur de tumeur muté dans la polypose adénomateuse familiale (FAP)

A l'inverse, d'autres études montrent que l'activation de PPAR β n'augmente pas la prolifération de lignées cellulaires dérivées de cancer du colon et du foie (Hollingshead *et al.*, 2007). Plus récemment, il a été montré que l'activation de PPAR β a des effets inhibiteurs sur la cancérogenèse du colon (Hollingshead *et al.*, 2008). Des résultats contradictoires sont aussi observés dans les autres tissus. D'une part, l'activation de PPAR β par des ligands spécifiques induit une cancérogenèse mammaire chez la souris (Yin *et al.*, 2005), et stimule la prolifération de lignées cellulaires dérivées de cancer du sein et de la prostate (Stephen *et al.*, 2004), d'autre part, les agonistes de PPAR β inhibent la prolifération de lignées cellulaires de kératinocytes (Burdick *et al.*, 2007), de cancer du sein humain (MCF7) et de lignées de mélanomes (Girroi *et al.*, 2008).

PPAR γ est exprimé dans de nombreux types de cellules cancéreuses, et l'activation de cet isotype par des ligands spécifiques inhibe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose. Les agonistes de PPAR exercent des effets antiprolifératifs dans le cancer humain du colon (Sarraf *et al.*, 1998), du sein (Elstner *et al.*, 1998), de l'estomac (Takahashi *et al.*, 1999), et de la vessie (Guan *et al.*, 1999). L'activation de PPAR γ induit l'activation de la caspase-3 dans les lignées humaines de cancer du foie et réduit le taux de protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL dans les lignées humaines de cancer du colon et de l'estomac (Chen *et al.*, 2002 ; Yoshida *et al.*, 2003). Les TZD bloquent la progression dans le cycle cellulaire et inhibent la croissance des cellules HCT15 dérivées de cancer du colon (Kim *et al.*, 2002). La ciglitazone, ligands de PPAR γ , induit l'apoptose et l'expression de Cox-2 dans la lignée HT-29, dérivée de cancer du colon (Yang et Frucht, 2001). Dans d'autres études, les ligands de PPAR γ inhibent la prolifération cellulaire de plusieurs lignées de cancer du sein et le développement de tumeurs de la glande mammaire (Mehta *et al.*, 2000 ; Yin *et al.*, 2001). Les agonistes de PPAR γ peuvent également induire l'apoptose et l'arrêt en G1 de différentes lignées dérivées de carcinome épidermoïde de l'œsophage (Rumi *et al.*, 2002), de cancer gastrique (Sato *et al.*, 1998), de cancer pancréatique (Eibl *et al.*, 2001 ; Motomura *et al.*, 2000 ; Takahashi *et al.*, 1999), de carcinome hépatocellulaire (Koga *et al.*, 2001 ; Rumi *et al.*, 2001). Les effets anticarcinogènes des ligands de PPAR γ sont dus à l'induction de CKI comme p21^{Cip1/Waf1}, p27^{kip1} et p18^{Ink4c} (Kim *et al.*, 2002 ; Motomura *et al.*, 2000 ; Rumi *et al.*, 2002). Cependant, la plupart des effets biologiques de PPAR γ comme l'arrêt de cycle en G1 et l'inhibition de la croissance tumorale impliquent une voie de signalisation PPAR γ indépendante (Palakurthi *et al.*, 2001).

II.5. Rôles des récepteurs PPAR dans la cancérogenèse vésicale

Peu d'études ont décrit le rôle des PPAR dans le cancer humain de la vessie. Bien que les trois isotypes soient exprimés dans l'urothélium normal (Guan, 2002), leur fonction est inconnue.

Une analyse de l'expression des PPAR à partir d'une cohorte de 170 patients atteints de cancer de la vessie, réalisée par des méthodes de RT-PCR et d'immunohistochimie, a montré que les trois isotypes étaient exprimés dans le tissu tumoral. Néanmoins, il n'y avait pas de différence significative entre tissu sain et tissu tumoral pour l'expression des isotypes α et β . En revanche, l'isotype γ n'est pas retrouvé dans la vessie saine et était fortement exprimé dans les tumeurs vésicales et cette expression était corrélée au stade et au grade (Yoshimura *et al.*, 2003b). Une autre étude a montré, au contraire, que PPAR γ est très faiblement exprimé voire absent dans des carcinomes urothéliaux de haut grade comparativement aux tumeurs de bas grade (Nakashiro *et al.*, 2001). A partir de 75 échantillons de tumeurs vésicales de différents stades et grades, Possati *et al.* ont montré par analyse immunohistochimique que PPAR γ était plus exprimé dans les tumeurs papillaires que dans les tumeurs invasives ($>pT2$) (Possati *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'expression de PPAR γ est associée de manière significative à une faible incidence de la récurrence et de la progression tumorale.

Les trois isotypes α , β et γ sont retrouvés dans un certain nombre de lignées cellulaires dérivées de cancer de la vessie et tout particulièrement l'isotype γ (Possati *et al.*, 2005). Une analyse du polymorphisme de PPAR γ a montré que l'expression du variant Pro12Ala était associée à une diminution du risque de récurrence chez des patients atteints d'une tumeur pTa/pT1 et non traités par BCG thérapie (Leibovici *et al.*, 2005). Il est important de noter qu'un traitement par BCG induit l'expression de PPAR γ dans des lignées cellulaires dérivées de cancer vésical (Lodillinsky *et al.*, 2006).

La découverte de l'expression des PPAR dans les cellules urothéliales tumorales pose la question du rôle de ces récepteurs et de leurs ligands dans la biologie du cancer vésical.

Dans des lignées dérivées de cancer vésical, la stimulation de PPAR γ par la troglitazone ou la 15dPGJ2 inhibe la prolifération cellulaire (Yoshimura *et al.*, 2003a). A des doses élevées, les TZD inhibent la prolifération cellulaire et induisent la mort cellulaire en augmentant l'expression des CKI p21^{Cip1/Waf1} et p16^{INK4a} (Guan *et al.*, 1999). Plus récemment, l'utilisation d'une nouvelle classe d'agonistes synthétiques de PPAR γ , les 1-Bis(3'-indolyl)-1-(p-substitutedphenyl)-methanes, a montré qu'ils avaient des propriétés antitumorales puisqu'ils inhibaient la prolifération cellulaire en modulant l'expression de la cycline D1 et des CKI telles que p21 et p27

(Kassouf *et al.*, 2006). Cependant, Chaffer *et al* ont montré que l'inhibition de la prolifération induite par la troglitazone et la 15dPGJ2 était un mécanisme PPAR γ indépendant (Chaffer *et al.*, 2006). Plus récemment, une étude réalisée chez le rat a montré que la rosiglitazone augmentait de façon dose dépendante l'incidence du cancer de la vessie provoquée par un carcinogène, l'hydroxybutyl(butyl)nitrosamine (Lubet *et al.*, 2008).

De nouvelles molécules pharmacologiques agonistes des PPAR α et γ , les glitazars ont été développées récemment pour le traitement du diabète de type 2 et de dyslipidémies. L'étude de la toxicité de quelques molécules comme le naveglitazar (Long *et al.*, 2008), le muraglitazar (Dominick *et al.*, 2006 ; Tannehill-Gregg *et al.*, 2007 ; Waites *et al.*, 2007) et le ragaglitazar (Egerod *et al.*, 2005), chez le rat a montré qu'ils pouvaient induire à long terme (2 ans) et à des doses supra-pharmacologiques des carcinomes urothéliaux chez le rat.

II.6. Rôles des récepteurs PPAR dans l'angiogenèse

L'angiogenèse est définie comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Elle a lieu pendant l'embryogenèse et est nécessaire chez l'adulte pour la réparation des lésions tissulaires et pour la reproduction. Une angiogenèse excessive est observée lors de différents phénomènes pathologiques, notamment au cours de la formation de tumeurs solides et le développement de métastases (Carmeliet et Jain, 2000 ; Folkman, 1995). Cette angiogenèse est régulée par la balance entre le taux de facteurs pro-angiogéniques et celui de facteurs anti-angiogéniques (Hanahan et Folkman, 1996) (cf. III.1.1).

Les récepteurs nucléaires PPAR agissent sur l'angiogenèse vraisemblablement en modifiant la balance angiogénique et en régulant l'expression de certains facteurs angiogéniques comme le VEGF (cf.III.3.).

Peu d'études portent sur le rôle de PPAR β dans l'angiogenèse tumorale. Néanmoins, il semble être impliqué, puisque la croissance d'une tumeur syngénique et sa vascularisation sont plus importantes chez les souris sauvages que chez les souris PPAR β déficientes (Muller-Brusselbach *et al.*, 2007). Quelques travaux montrent que PPAR β pourrait jouer un rôle d'activateur de l'angiogenèse. Ainsi, le GW50156, ligand de PPAR β induit une augmentation de l'expression du VEGF dans les cellules endothéliales ainsi qu'une prolifération de ces cellules (Piqueras *et al.*, 2007). Une autre étude a montré que cette même molécule induisait la prolifération des cellules épithéliales tumorales de colon exprimant VEGFR-2, en augmentant l'expression du VEGF, activant ainsi une boucle autocrine de signalisation où PPAR β joue un rôle essentiel (Wang *et al.*, 2006a). Ces résultats sont en accord avec les travaux de notre équipe qui

montrent que le L-165041, ligand de PPAR β , induit la surexpression du VEGF dans 2 lignées cellulaires de carcinomes urothéliaux, RT4 et T24 (Fauconnet *et al.*, 2002).

Récemment, de nombreux chercheurs se sont intéressés à l'implication de PPAR α et de PPAR γ dans la régulation de l'angiogenèse et ont utilisé les fibrates et les TZD pour l'étude des propriétés angiogéniques de ces récepteurs. Les résultats obtenus sont assez controversés et diffèrent selon les études. Au niveau transcriptionnel, les agonistes de PPAR α sont capables d'inhiber l'expression du VEGFR-2 (VEGF receptor 2) (cf. III.3.1.2.) (Meissner *et al.*, 2004). Le WY 14,643 diminue l'induction du VEGF induite par le PMA (phorbol myristate acetate) dans la lignée humaine SW620, dérivée d'un carcinome du colon (Grau *et al.*, 2006). Le fénofibrate, utilisé pour traiter l'hyperlipidémie, induit une réduction significative du taux de VEGF sérique chez les patients traités par cette molécule (Blann *et al.*, 2001). Dans une autre étude, le fénofibrate et le WY 14,643 sont capables d'inhiber la sécrétion de VEGF dans les cellules de glioblastome, et dans les cellules de carcinomes pulmonaires de Lewis (Panigrahy *et al.*, 2008). Ces mêmes agonistes inhibent l'angiogenèse *in vivo* et *in vitro* (Panigrahy *et al.*, 2008). De plus, dans un modèle de xénogreffe d'une lignée de cancer ovarien, le clofibrate inhibe l'expression du VEGF et induit une réduction de l'angiogenèse, caractérisée par une diminution de la densité des microvaisseaux (MVD) dans les tumeurs solides (Shigeto *et al.*, 2007 ; Yokoyama *et al.*, 2007).

Pozzi a montré le rôle essentiel de PPAR α dans l'inhibition de l'angiogenèse grâce à des souris n'exprimant pas PPAR α (PPAR α -/-). Dans ce modèle, le WY 14,643 inhibe la prolifération cellulaire et la formation de structures capillaires des cellules endothéliales pulmonaires issues de souris sauvages, alors qu'aucun effet de ce même ligand n'est observé dans les cellules endothéliales provenant de souris PPAR α -/- (Pozzi *et al.*, 2007). D'autres études montrent que PPAR α est également capable d'activer l'angiogenèse et d'augmenter l'expression du VEGF. Ainsi Biscetti a montré que les ligands de PPAR α induisent une augmentation de l'expression du VEGF *in vitro* sur les cellules endothéliales humaines, et une néovascularisation de la cornée dans un modèle de souris (Biscetti *et al.*, 2008). Notre équipe a également montré que le WY14,643 induisait une surexpression du VEGF dans la lignée cellulaire RT4, dérivée d'un carcinome urothélial de grade 1 (Fauconnet *et al.*, 2002).

PPAR γ peut réguler l'angiogenèse tumorale directement en agissant sur la prolifération des cellules endothéliales et sur leur migration, ou indirectement en agissant sur la balance angiogénique par la régulation des facteurs pro- et anti-angiogéniques. L'activation de PPAR γ induit une inhibition de la prolifération des cellules HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) (Sheu *et al.*, 2006 ; Xin *et al.*, 1999) et stimule l'apoptose des cellules endothéliales (Bishop-Bailey et Hla, 1999). La rosiglitazone inhibe l'angiogenèse tumorale *in vitro* dans des lignées

cellulaires cancéreuses et *in vivo* chez la souris, dans des modèles de xénogreffes de cellules cancéreuses (Panigrahy *et al.*, 2002). PPAR γ agit sur la voie de signalisation VEGF/VEGFR en inhibant l'expression du VEGFR sur les cellules HUVEC stimulées par la 15d-PGJ2 (Xin *et al.*, 1999). Les ligands de PPAR γ diminuent l'expression du VEGF dans des cellules de carcinome du rein (Yuan *et al.*, 2005) et dans des cellules d'endomètre primaires et transformées (Peeters *et al.*, 2005). Une autre étude, dans la lignée A459, dérivée d'un cancer du poumon non à petites cellules, montre que la troglitazone et la pioglitazone diminuent la production des chimiokines pro-angiogéniques de la famille ELR+CXC (Keshamouni *et al.*, 2005). Les ligands de PPAR γ sont également capables d'activer l'angiogenèse. Des études ont montré que les agonistes de PPAR γ augmentaient l'expression de l'ARNm du VEGF *in vitro* et *in vivo*, dans des cellules normales telles que les cellules musculaires lisses vasculaires (Yamakawa *et al.*, 2000) et dans des lignées cancéreuses telles que PC3 et 5637, dérivées de cancer de la prostate (Haslmayer *et al.*, 2002), RT4 et T24, dérivées de carcinomes urothéliaux (Fauconnet *et al.*, 2002), et MCF-7, dérivées de cancer du sein (Haslmayer *et al.*, 2002). Une analyse immunohistochimique de différentes tumeurs humaines a révélé une association significative entre l'expression de PPAR γ et celle de plusieurs facteurs angiogéniques comme le VEGF, le bFGF, le PDEC GF (platelet-derived endothelial growth factor) (Possati *et al.*, 2000).

III. L'angiogenèse

III.1. Généralités

III.1.1. Définition et mécanisme

L'angiogenèse se définit comme un processus complexe, multi-étapes qui mène à la formation de nouveaux capillaires sanguins par l'excroissance ou le bourgeonnement de vaisseaux préexistants, capillaires ou veinules (Folkman et Shing, 1992). Au cours du développement, elle permet l'extension et le remodelage du réseau vasculaire primitif afin d'établir un système circulatoire mature et fonctionnel et d'assurer un apport nutritionnel et une expansion tissulaire. Chez l'adulte, où le réseau vasculaire est déjà en place, l'angiogenèse est un mécanisme plus rare qui survient de façon sporadique tout au long de la vie notamment lors de l'inflammation, de la cicatrisation, de la réparation osseuse. Toutefois, l'angiogenèse survient régulièrement chez la femme, lors du cycle menstruel, où elle participe à la croissance folliculaire, à la formation du corps jaune au sein des ovaires, à la régénération menstruelle de l'endomètre et pendant la grossesse où elle permet l'implantation de l'œuf et la formation du placenta.

L'angiogenèse joue un rôle dans une multitude de processus pathologiques comme l'endométriose, la rétinopathie diabétique, la polyarthrite rhumatoïde et lors de la croissance des tumeurs solides et des métastases (Folkman, 1995).

III.1.2. Les étapes de l'angiogenèse

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est un processus complexe multifactoriel qui se déroule en plusieurs étapes (cf. Figure 9).

- **Vasodilatation et perméabilité** : lors de cette première étape, des facteurs angiogéniques tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) induisent une augmentation de l'activité NO synthase (NO : monoxyde d'azote) dans les cellules endothéliales, provoquant une augmentation du taux intracellulaire en NO. Ce taux élevé de NO conduit à la vasodilatation des vaisseaux et à l'augmentation de la perméabilité vasculaire permettant l'extravasation des protéines plasmatiques, et favorisant ensuite la migration des cellules endothéliales suite au détachement des péricytes (Lakka *et al.*, 2003).

- **Dégradation de la matrice extracellulaire** : lors de l'étape suivante, suite à la sécrétion et à l'activation d'enzymes protéolytiques, comme l'activateur du plasminogène (uPa) et des métalloprotéases (MMPs), par les cellules endothéliales et les cellules lymphoïdes, il y a dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) par protéolyse qui permet aux cellules endothéliales de se détacher de la paroi vasculaire du vaisseau préexistant (Lakka *et al.*, 2003).

- **Migration et prolifération des cellules endothéliales** : lors de cette étape, l'angiopoïétine-2 (Ang-2) va participer au détachement des cellules musculaires lisses de la paroi de la structure tubulaire endothéliale et faciliter la migration des cellules endothéliales. Cette migration est permise grâce à l'expression de nombreuses intégrines. Les cellules endothéliales migrent à travers la MEC, vers la source angiogénique en formant un capillaire dépourvu de cellules péri-vasculaires. En parallèle, les cellules endothéliales vont proliférer grâce à de nombreux facteurs angiogéniques possédant une activité mitogène, comme le VEGF, le aFGF et le bFGF (acidic and basic Fibroblast Growth Factor), l'angiogénine, l'EGF (Epidermal Growth Factor), et l'IGF-1 (Insuline Growth Factor) (Serini *et al.*, 2006).

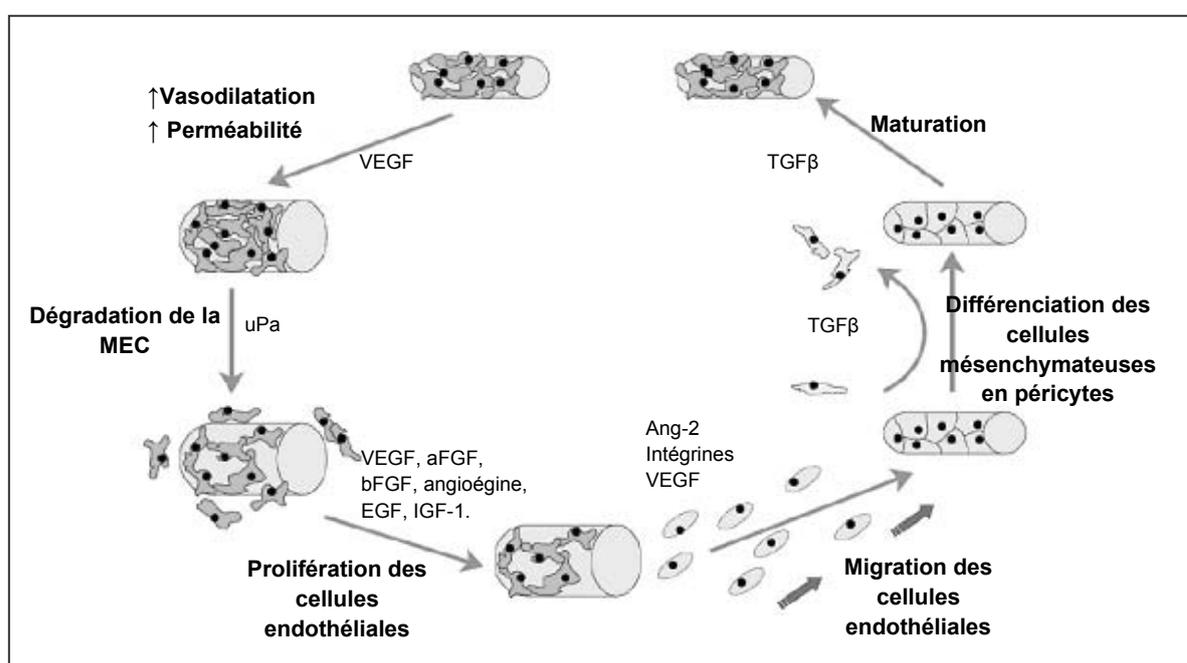


Figure 9 : Les étapes de l'angiogénèse par bourgeonnement

- **Maturation des néovaisseaux** : cette dernière étape va permettre le réarrangement des cellules qui rendra possible la formation du néovaisseau et sa maturation, aboutissant à un conduit fonctionnel pour le flux sanguin. La phase de maturation est permise par le recrutement de cellules mésenchymateuses qui vont se différencier localement en péricytes sous l'action du TGFβ (Transforming Growth Factor). Ces péricytes vont entourer le vaisseau en formation et limiter la prolifération des cellules endothéliales. Le recrutement des péricytes et des cellules musculaires lisses va ainsi permettre la stabilisation du vaisseau sanguin (Lauren *et al.*, 1998).

III.1.3. Les facteurs angiogéniques

La régulation de l'angiogenèse est un équilibre complexe entre activation et inhibition des processus impliqués. Les cellules endothéliales sont maintenues dans un état de quiescence par la présence concomitante des facteurs anti-angiogéniques et pro-angiogéniques. Cet équilibre peut basculer en faveur de l'angiogenèse par excès de facteurs angiogéniques et/ou par défaut de facteurs anti-angiogéniques, c'est le mécanisme de commutation angiogénique ou « switch angiogénique » (Hanahan et Folkman, 1996). Les inhibiteurs et activateurs de l'angiogenèse sont des cytokines et des facteurs de croissance qui agissent directement au niveau des cellules endothéliales ou indirectement *via* des cellules « accessoires » (monocytes, macrophages, mastocytes et cellules T) (Bussolino *et al.*, 1997). Les cytokines pro-angiogéniques les mieux caractérisées sont les facteurs de croissance pléiotropes : aFGF et bFGF, et le VEGF qui jouent un rôle essentiel dans la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Montesano *et al.*, 1986 ; Pepper *et al.*, 1992). De nombreux autres facteurs sont impliqués lors des différentes étapes de l'angiogenèse et peuvent être regroupés suivant leur principal rôle physiologique :

- les facteurs de croissance : PlGF (Placental Growth Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor), TGF- α et TGF- β , EGF, IGF-1, PDECGF (Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor) ;
- les médiateurs de l'inflammation : TNF- α (Tumor Necrosis Factor), IL-8, IL-3, Prostaglandines E1 et E2 ;
- les facteurs hématopoïétiques : Erythropoïétine, G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) et GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) ;
- et enfin des molécules sécrétées par le tissu environnant : l'angiopoïétine 2 (Ang-2) en présence du VEGF et l'angiopoïétine 1 (Ang-1) (Liekens *et al.*, 2001 ; Otrrock *et al.*, 2007).

Le TGF- β ainsi que le TNF- α n'ont pas d'action sur l'angiogenèse *in vitro* mais possèdent un pouvoir angiogénique *in vivo* (Klagsbrun et D'Amore, 1991 ; Pepper *et al.*, 1996).

De nombreux inhibiteurs de l'angiogenèse ont également été identifiés, la plupart inhibent la prolifération et la migration des cellules endothéliales, certains sont également capables d'induire leur apoptose. Parmi ces facteurs, nous pouvons citer : l'angiostatine, l'endostatine, la Prolactine, TSP-1 (Thrombospondin-1), la Troponin-1, l'IFN- α , - β et - γ (Interféron), l'IL-12 et l'IL-4, l'Ang-2, le TIMP-1 et le TIMP-2 (Tissue Inhibitor of MetalloProtease), le PF-4 (Platelet growth Factor), et l'IP-10 (protéine inductible par l'interféron) (Liekens *et al.*, 2001 ; Tabruyn et Griffioen, 2007).

III.2. L'angiogenèse tumorale

Depuis les travaux de Folkman en 1971 (Folkman *et al.*, 1971), il est admis que l'angiogenèse est indispensable à la croissance des tumeurs solides et à la dissémination tumorale métastatique. Dans les années 90, ce même chercheur a montré que le blocage de l'angiogenèse apparaît comme une stratégie antitumorale intéressante (Folkman, 1992). A l'heure actuelle, de nombreuses stratégies anti-angiogéniques ont été développées au niveau clinique pour le traitement des cancers, notamment l'AvastinTM, anticorps anti-VEGF (cf III.3.4. Stratégies anti-angiogéniques ciblant le VEGF).

Au sein d'un tissu, la taille d'une tumeur nonvascularisée est inférieure à 2 mm³. Ses besoins en nutriments et en oxygène sont alors assurés par diffusion simple. Puis, sous l'effet de l'accumulation d'altérations géniques, la prolifération des cellules se fait plus active, la tumeur grossit et un état hypoxique intratumoral est généré. Cet état hypoxique va induire l'expression du facteur clé de l'angiogenèse, le VEGF, par les cellules tumorales et va conduire au switch angiogénique. Les facteurs pro-angiogéniques en excès par rapport aux facteurs anti-angiogéniques vont alors activer l'angiogenèse tumorale. Dès lors, l'angiogenèse va permettre l'apport d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance de la tumeur (Li *et al.*, 2000a).

L'angiogenèse tumorale marque le début d'une phase de croissance tumorale plus rapide, et la probabilité de dissémination métastatique est alors fortement augmentée (Folkman et Klagsbrun, 1987). Les réseaux vasculaires associés aux tumeurs sont différents des réseaux capillaires normaux. Ces réseaux sont formés de vaisseaux de diamètre irrégulier, fragilisés et désorganisés. La perméabilité vasculaire est perturbée par les cellules endothéliales reposant sur une membrane basale incomplète ; les péricytes ne formant pas un manchon complet autour du vaisseau.

L'angiogenèse tumorale initiée par le phénomène de bourgeonnement semblait être le seul mécanisme permettant la vascularisation de la tumeur. Cependant, d'autres mécanismes ont également été décrits depuis, comme le recrutement d'angioblastes, la cooptation, la genèse de vaisseaux "mosaïques" et la transdifférenciation des cellules tumorales en cellules endothéliales appelée « vasculo mimétisme » (cf. Figure 10).

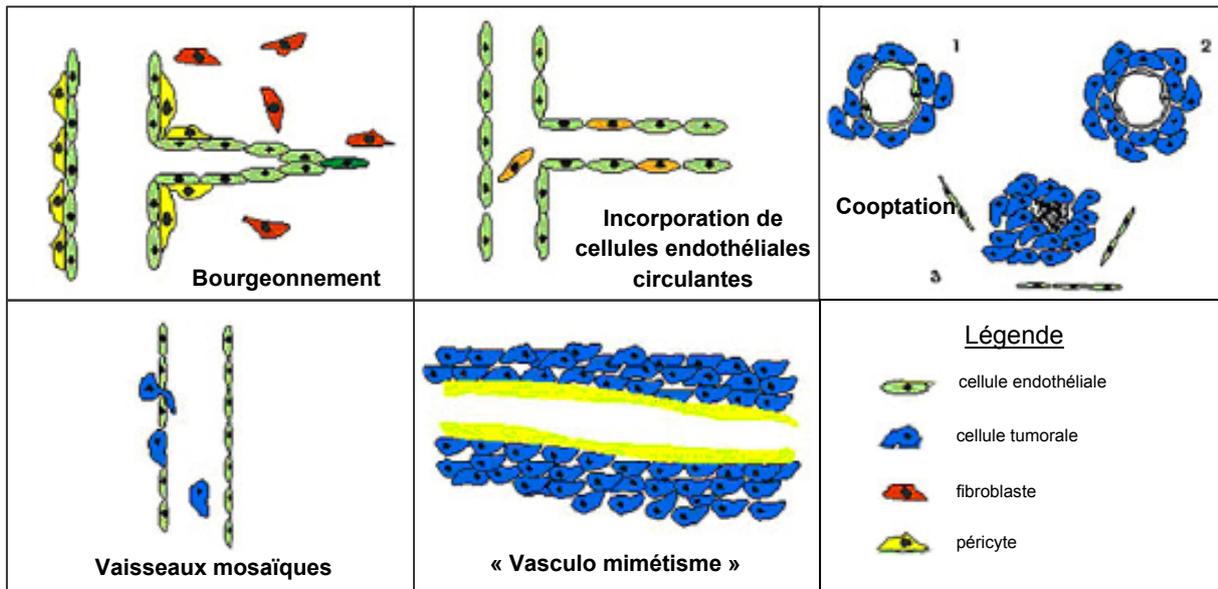


Figure 10 : Les mécanismes de l'angiogenèse tumorale

Récemment, il a été montré que des progéniteurs sanguins endothéliaux existent chez l'adulte. Ces progéniteurs, ou angioblastes, dérivés des cellules progénitrices multipotentes adultes, peuvent être recrutés au stade néoangiogénique et contribuer à la mise en place de la vascularisation de la tumeur (Rabbany *et al.*, 2003). Dans les tissus hautement vascularisés, les tumeurs développent un mécanisme particulier de vascularisation appelé cooptation (Holash *et al.*, 1999). Au cours de ce phénomène, les vaisseaux préexistants vont fusionner et diminuer en nombre, induisant une hypoxie importante. Cette hypoxie va alors conduire à une vascularisation périphérique de la tumeur.

Un autre phénomène a été décrit dans une étude de Chang *et al.* où des vaisseaux sanguins dit "mosaïques" ont été identifiés (Chang *et al.*, 2000). C'est-à-dire que 15 % des vaisseaux sanguins étaient des vaisseaux constitués de cellules endothéliales et de cellules tumorales. Ces vaisseaux sont fonctionnels mais possèdent une structure différente : la taille de leurs pores est supérieure, leur lame basale est discontinue, ils possèdent peu de péricytes et sont de ce fait très perméables. Cette perméabilité favorise le phénomène d'extravasation plasmatique, favorisant la formation de métastases à distance (Folkman, 1975).

La formation des vaisseaux mosaïques est à distinguer du mécanisme de « vasculo mimétisme » décrit par Maniotis (Maniotis *et al.*, 1999). Dans certains cancers tels que les mélanomes agressifs, les cellules cancéreuses se transdifférencient en cellules endothéliales. Ainsi, les vaisseaux intratumoraux peuvent être constitués par des cellules tumorales qui vont s'organiser en

réseau vasculaire. De plus, il y aurait une coopération entre les cellules d'origine tumorale et les vaisseaux angiogéniques (Ruf *et al.*, 2003).

Tous ces mécanismes permettent une augmentation de l'apport d'oxygène et de nutriments favorisant la croissance tumorale et la propagation des cellules tumorales dans l'organisme. Cette propagation peut se faire par différentes voies : l'invasion tissulaire locale, la voie lymphatique, et la voie sanguine. Les moyens de dissémination les plus courants sont les vaisseaux lymphatiques, qui donnent naissance à des métastases ganglionnaires.

III.3. Le VEGF

III.3.1. Généralités

Le Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) est une glycoprotéine de 34-45 kDa qui appartient à une famille de facteurs angiogéniques présentant une homologie structurale et qui comprend les VEGF-B, -C, -D, -E et le PlGF. Il a été initialement découvert par Senger et dénommé VPF (vascular permeability factor) (Senger *et al.*, 1983). Puis Ferrara et Henzel ont isolé une protéine à partir de cellules folliculo-stellaires d'hypophyse bovine et ont montré que cette dernière était un puissant facteur mitogène, spécifique des cellules endothéliales. Ils l'ont nommé VEGF (Ferrara et Henzel, 1989). Il s'est avéré par la suite que le VEGF et le VPF était la même molécule.

Le VEGF joue un rôle central dans l'angiogenèse et plus généralement dans l'ensemble des processus de formation des vaisseaux. En effet, des études d'inactivation d'un seul des deux allèles du VEGF chez la souris induit une mort embryonnaire entre le 10^{ème} et le 12^{ème} jour embryonnaire, due à des défauts de vascularisation (Carmeliet *et al.*, 1996 ; Ferrara, 1996).

III.3.1.1. Les isoformes et les isotypes du VEGF

Le gène *vegf* humain est localisé sur le chromosome 6 en position 6p21.3 et est organisé en 8 exons séparés par 7 introns (Vincenti *et al.*, 1996). L'épissage alternatif de son ARNm conduit à la formation de plusieurs isoformes, les plus communes étant constituées de 121, 145, 165, 189 et 206 acides aminés (cf. Figure 11). Le nom de chacune de ces isoformes comporte le terme VEGF suivi du nombre d'acides aminés qui constitue le monomère. Les exons 1 à 5 sont communs à toutes les isoformes du VEGF. L'exon 1 et une partie de l'exon 2 codent une séquence signal de 26 acides aminés essentiels à la sécrétion du VEGF (Siemeister *et al.*, 1998). Les exons 3 et 4 sont indispensables à sa fixation sur les récepteurs au VEGF (VEGFR-1 et VEGFR-2) (Keyt *et al.*, 1996). L'exon 5 contient les principaux sites de clivage de la protéine par la plasmine (Claffey *et al.*, 1995) et par les métalloprotéases (Lee *et al.*, 2005). Les exons 6 et 7 codent des sites de fixation aux héparanes sulfates (Park *et al.*, 1993).

Le produit de la transcription des 8 exons est le VEGF189. Le VEGF206 exprime les 8 exons et possède une séquence supplémentaire de 17 acides aminés correspondant à l'exon 6b (cf. Figure 11). Le VEGF165 ne possède pas l'exon 6, le VEGF145 est délété de l'exon 7. Le VEGF121 ne possède pas les exons 6 et 7 (Anthony *et al.*, 1994) (cf. Figure 11). L'épissage de l'exon 6 et/ou de l'exon 7 conduit à modifier les propriétés de fixation et de solubilisation de ces molécules. En effet, les exons 6 et 7 codent deux domaines de fixation aux héparanes sulfates, ce qui permet au VEGF de se fixer à la surface des cellules ou à la MEC (Park *et al.*, 1993).

Le VEGF121 qui ne se lie pas à l'héparine, diffuse librement, contrairement aux formes 189 et 206 complètement séquestrées dans la MEC. La forme 165 possède des propriétés de diffusion intermédiaires. Le VEGF121 agit principalement sur la perméabilité vasculaire alors que le VEGF165 active préférentiellement la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Zhang *et al.*, 2008). A la différence des formes 121 et 165, le VEGF189 est généralement plus faiblement exprimé (Ferrara et Davis-Smyth, 1997). Cependant son rôle serait essentiel au développement normal des cellules endothéliales (Stalmans *et al.*, 2002). La plupart des cellules expriment préférentiellement les formes 121, 165 et 189. Le VEGF145 et le VEGF206 sont, par comparaison, exprimés de façon beaucoup plus rare. L'expression du VEGF145 est restreinte au tractus génital de la femme (Poltorak *et al.*, 1997) et est prédominante dans l'endomètre humain (Charnock-Jones *et al.*, 1993). Toutes les isoformes du VEGF sont secrétées sous forme d'homodimères. Les deux monomères sont tête-bêche l'un par rapport à l'autre et liés de façon covalente par 2 ponts disulfures entre la cystéine 51 d'un monomère et la cystéine 61 de l'autre monomère (Potgens *et al.*, 1994). Le VEGF se fixe sur des récepteurs à activité tyrosine kinase, de haute affinité, de structure et de fonctions similaires au PDGF.

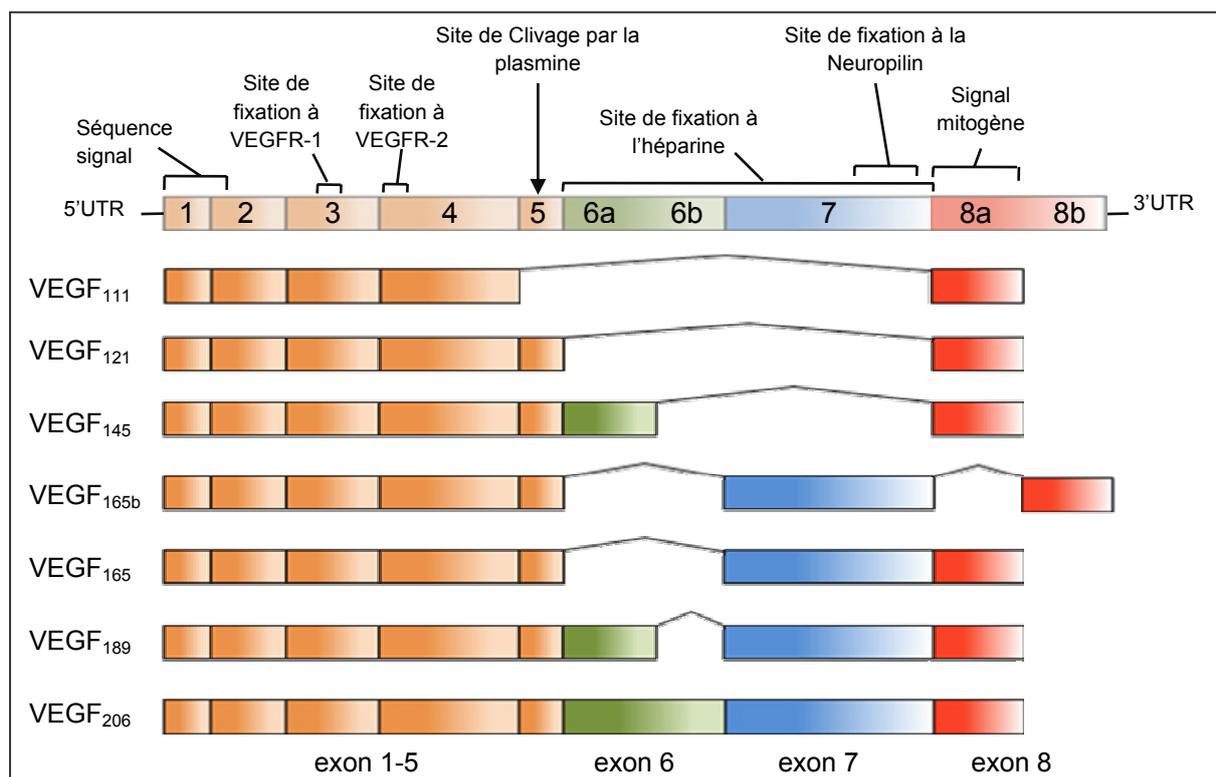


Figure 11 : Schéma des transcrits alternatifs du VEGF humain

Récemment, une autre isoforme du VEGF a été identifiée dans des carcinomes du rein : le VEGF165b (Bates *et al.*, 2002). Il possède le même nombre d'acides aminés que le VEGF165 mais comporte 6 acides aminés différents en C-terminal, région portant le signal mitogène de la molécule. Cette isoforme ne stimule pas l'angiogénèse comme les autres isoformes, mais diminue *in vitro* la prolifération et la migration des cellules endothéliales induites par le VEGF165 (Bates *et al.*, 2002), et inhibe l'angiogénèse *in vivo* (Woolard *et al.*, 2004). Dans des modèles de xéno greffe chez la souris, la surexpression de cette isoforme inhibe la croissance tumorale de carcinome de la prostate, de sarcome d'Ewings et de carcinome du rein (Rennel *et al.*, 2008).

D'autres isoformes du VEGF-A très rares ont également été détectées : les VEGF111 (Mineur *et al.*, 2007), 148, 162 et 183 (Takahashi et Shibuya, 2005). Ces isoformes sont exprimées dans certaines conditions ou dans certaines pathologies bien particulières et leurs fonctions sont encore assez mal connues. Cependant, le VEGF111, décrit par Mineur *et al.*, jouerait un rôle important dans la résistance aux chimiothérapies (Mineur *et al.*, 2007). En effet, ce nouveau variant d'épissage alternatif n'est exprimé que dans des cellules subissant des stress génotoxiques, provoqués par le rayonnement ultraviolet ou les agents chimiothérapeutiques. Il est codé par les exons 1 à 4 et par l'exon 8a. Tout en possédant des caractéristiques identiques au VEGF121, il est

plus résistant à la dégradation par la plasmine grâce à l'absence de l'exon 5 qui contient des sites de clivages protéolytiques.

Les VEGF-B, -C, -D, et -E possèdent respectivement une homologie de séquence en acides aminés de 43 %, 30 %, 31 % et 25 % avec le VEGF-A. Le VEGF-A est principalement impliqué dans l'angiogenèse alors que le VEGF-C et le VEGF-D sont des inducteurs de la lymphangiogenèse.

Le VEGF-B a été cloné et caractérisé en 1996 (Olofsson *et al.*, 1996). Le gène *vegfb* humain est localisé sur le chromosome 11 en position q13 (Paavonen *et al.*, 1996) et contient 7 exons. Deux isoformes de 167 (VEGF-B 167) et de 186 (VEGF-B 186) acides aminés, très similaires au VEGF165 (Olofsson *et al.*, 1996), sont produites par épissage alternatif. Le VEGF-B 167 est une forme diffusible alors que le VEGF-B 186 resterait lié à la membrane cellulaire et à la MEC (Olofsson *et al.*, 1996). Le VEGF-B est principalement exprimé dans les muscles cardiaques et squelettiques. Les 2 isoformes du VEGF-B sont sécrétées sous forme d'une protéine précurseur de 52 kDa dont le clivage produit un fragment amino-terminal de 30 kDa et un fragment carboxy-terminal de 27 kDa (Hu *et al.*, 1997). Le VEGF-B se fixe sur le VEGFR-1 ainsi que sur la neuropiline-1.

Le VEGF-C a été cloné à partir d'une lignée cellulaire de cancer humain de la prostate PC3 (Joukov *et al.*, 1997). Le gène *vegfc* humain est localisé sur le chromosome 4q34 (Paavonen *et al.*, 1996), il code un précurseur inactif de 61 kDa qui deviendra actif après clivage protéolytique de la partie N-terminale (Joukov *et al.*, 1997). Il peut se fixer sur le VEGFR-2 et sur le VEGFR-3 et induire leur phosphorylation (Joukov *et al.*, 1996).

Le gène *vegfd* humain est localisé sur le chromosome Xp22.31 et code une protéine de 354 acides aminés. Comme le VEGF-C, le VEGF-D se fixe et active les récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3. De même, c'est sous forme d'un précurseur inactif qu'il est synthétisé et devra être activé par protéolyse aux extrémités N- et C-terminales (Stacker *et al.*, 1999). Les VEGF-C et -D jouent un rôle important dans la lymphangiogenèse (Achen *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 1996 ; Makinen *et al.*, 2001). Le VEGF-C est également impliqué dans l'angiogenèse (Witzenbichler *et al.*, 1998).

Le VEGF-E, découvert en 1994 par Lyttle est un homologue viral du VEGF (Lyttle *et al.*, 1994). Il est codé par le génome du virus Orf, et est structurellement similaire au VEGF-A. Le VEGF-E se fixe sur le VEGFR-2 et active uniquement ce récepteur. Il aurait un rôle similaire au VEGF165 car il stimulerait la prolifération des cellules endothéliales (Meyer *et al.*, 1999).

III.3.1.2. Les récepteurs du VEGF

Le VEGF exerce son activité biologique par l'intermédiaire de récepteurs à activité tyrosine kinase principalement situés à la surface des cellules endothéliales. Les différents isotypes et isoformes du VEGF se fixent et activent trois récepteurs à activité tyrosine kinase :

- Flt-1 (fms-like tyrosine kinase 1) (VEGFR-1) (Shibuya *et al.*, 1990),
- Flk-1/KDR (fetal liver kinase-1/Kinase insert Domain containing Receptor-human homologue) (VEGFR-2) (Terman *et al.*, 1991 ; Terman *et al.*, 1992)
- Flt-4 (fms-like tyrosine kinase 4) (VEGFR-3) (Aprelikova *et al.*, 1992)

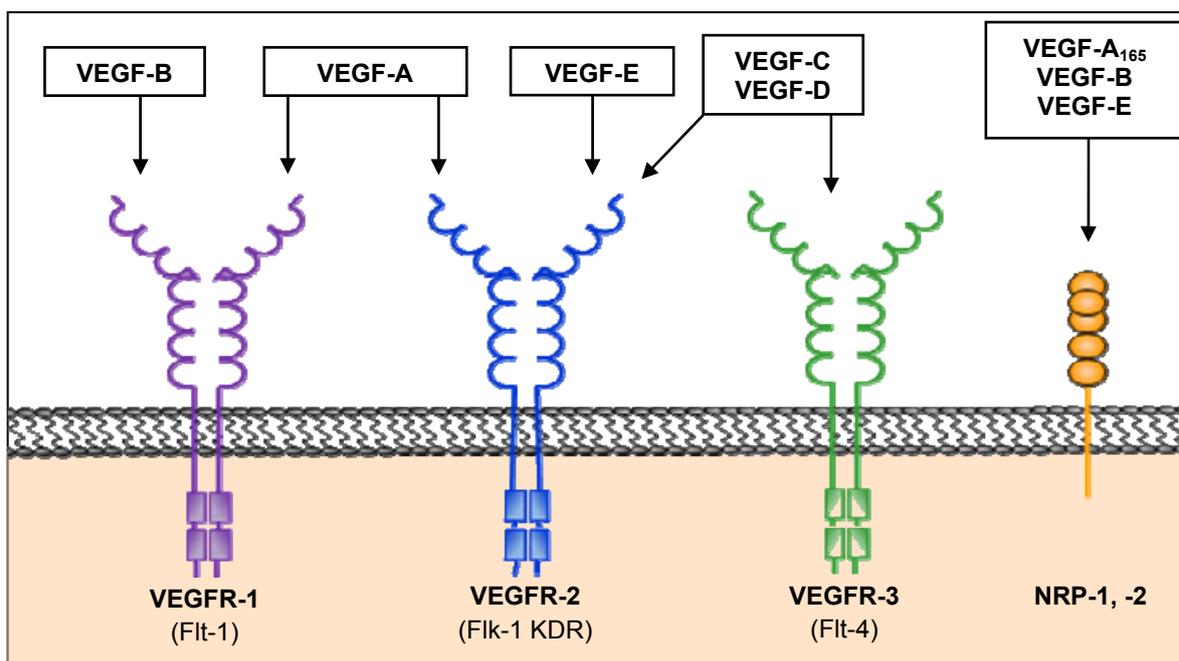


Figure 12 : Récepteurs des isoformes et isotypes du VEGF

Les récepteurs au VEGF font partie de la famille des récepteurs "tyrosine kinase". Ce sont des protéines transmembranaires qui possèdent une région extracellulaire comportant sept boucles "immunoglobulin-like" impliquées dans la reconnaissance du ligand, une seule chaîne polypeptidique transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase conduisant à l'activation d'une voie de signalisation (cf. Figure 13). Le VEGF ou ces isoformes vont se fixer sur ces récepteurs sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère et conduire à leur phosphorylation (Shibuya *et al.*, 1990 ; Terman *et al.*, 1991).

VEGFR-1 (flt-1) est une glycoprotéine transmembranaire de 180 kDa capable de fixer le VEGF-A, le PlGF et le VEGF-B. Le VEGF-A possède une très haute affinité pour ce récepteur (Kd : 10-30 pM) (de Vries *et al.*, 1992). Une forme soluble appelée s-flt-1 ou s-VEGFR-1 a été identifiée et serait inhibitrice de l'activité VEGF (Tanaka *et al.*, 1997). Le VEGFR-1 est exprimé à la surface

des cellules endothéliales et des péricytes (Nomura *et al.*, 1995) mais aussi des monocytes et des macrophages (Barleon *et al.*, 1996), des cellules dendritiques (Dikov *et al.*, 2005), des ostéoblastes (Byun *et al.*, 2007), des cellules souches hématopoïétiques (Kaplan *et al.*, 2005), des cellules vasculaires du muscle lisse (Grosskreutz *et al.*, 1999) et il est également exprimé par des cellules tumorales colorectales (Fan *et al.*, 2005) et les cellules de carcinome de la vessie (Brown *et al.*, 1993 ; Sato *et al.*, 1998).

VEGFR-2 (Flk-1/KDR) est une glycoprotéine de 230 kDa capable de fixer le VEGF-A, le VEGF-C et le VEGF-D. Le VEGF-A possède une plus faible affinité pour ce récepteur (Kd 75-760 pM) (Terman *et al.*, 1992). Ce récepteur est exprimé par les cellules endothéliales mais également par les cellules souches hématopoïétiques, les cellules neuronales, les ostéoblastes, les cellules pancréatiques, les mégakaryocytes (Matsumoto et Claesson-Welsh, 2001) et les cellules vasculaires du muscle lisse (Grosskreutz *et al.*, 1999). Récemment, il a été montré que différentes lignées cellulaires tumorales dérivées de cancer humain du sein (Price *et al.*, 2001), des neuroblastomes (Meister *et al.*, 1999), de cancer gastrique (Zhang *et al.*, 2002), et de carcinomes urothéliaux (Xia *et al.*, 2006) exprimaient le VEGFR-2.

Le VEGF se lie au VEGFR-1 avec une affinité dix fois supérieur (Kd : 10-30 pM) à celle qu'il a pour le VEGFR-2. Cependant l'activité tyrosine kinase qui en résulte est dix fois inférieure à celle obtenue avec le VEGFR-2. Les fonctions de ces récepteurs apparaissent différentes et complémentaires puisque le VEGFR-1 est impliqué dans la migration des cellules endothéliales alors que le VEGFR-2 est principalement impliqué dans la prolifération (Fong *et al.*, 1995 ; Shalaby *et al.*, 1995), la migration, la perméabilisation, la survie des cellules endothéliales donc dans l'induction de l'angiogenèse (Gille *et al.*, 2001). Les récepteurs monomériques VEGFR-1 comme VEGFR-2 sont activés par la fixation d'un dimère de VEGF. Cette fixation va induire une dimérisation de ces récepteurs et leur activation par transphosphorylation (Fuh *et al.*, 1998 ; Wiesmann *et al.*, 1997).

VEGFR-3 (flt-4) est un récepteur à haute affinité pour le VEGF-C et le VEGF-D. C'est le principal récepteur impliqué dans la lymphangiogenèse (Taipale *et al.*, 1999). Ce récepteur est exprimé par les cellules endothéliales embryonnaires. Cependant au cours du développement, son expression va ensuite se limiter aux vaisseaux lymphatiques chez l'adulte (Kaipainen *et al.*, 1995). La neuropiline-1 (NRP-1), initialement décrite comme étant un récepteur de la famille semaphorines/collapsine, a également été identifiée comme un récepteur spécifique du VEGF165 (Soker *et al.*, 1998) et du VEGF-B (Migdal *et al.*, 1998). Ce récepteur ne possède pas d'activité "tyrosine-kinase" et agit comme un corécepteur du VEGF en augmentant la fixation du VEGF sur le VEGFR-1 (Fuh *et al.*, 2000) et sur le VEGFR-2 (Whitaker *et al.*, 2001) renforçant ainsi l'efficacité du signal de transduction de ces récepteurs. L'intervention de NRP-1 pourrait ainsi

expliquer le potentiel mitogène plus important du VEGF165 par rapport à celui du VEGF121 puisque NRP-1 reconnaît le VEGF165 et mais pas le VEGF121 (Soker *et al.*, 1998).

La neuropiline-2 (NRP-2) exprimée par les vaisseaux lymphatiques, a été identifiée comme un corécepteur du VEGF-C (Karkkainen *et al.*, 2001).

Les héparanes sulfates ou héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) sont des macromolécules ubiquitaires de nature glycoprotéique associées à la matrice extracellulaire (MEC) et aux membranes plasmiques de la plupart des cellules. Ce sont des cofacteurs nonspécifiques, essentiels à certains mécanismes biologiques comme l'adhérence cellule-MEC, les interactions cellules/cellules, et les interactions facteurs de croissance/récepteurs (Vlodavsky *et al.*, 1996). Leur faible affinité pour le VEGF assure le stockage des isoformes du VEGF possédant des sites de fixation à l'héparine (Houck *et al.*, 1992).

III.3.2. Fonctions

Suite à la liaison du VEGF, le récepteur est dimérisé, les résidus tyrosine du domaine intra-cellulaire sont phosphorylés ce qui conduit à la transmission des signaux intracellulaires (cf. Figure 13).

III.3.2.1. Migration

Le VEGF stimule la migration des cellules par la voie FAK (focal adhesion kinase) et PI3K/Akt (PhosphoInositide 3-Kinase) (cf. Figure 13). Suite à la liaison du VEGF sur le VEGFR-2, la protéine adaptatrice Shb se lie au VEGFR-2 et conduit à l'activation de FAK et de la PI3K (Holmqvist *et al.*, 2004). Une voie faisant intervenir p38/MAPK aurait également des effets sur la migration (Rousseau *et al.*, 1997). Seul le récepteur VEGFR-2 serait impliqué dans la migration des cellules endothéliales (Gille *et al.*, 2001). Cependant, certaines études sembleraient impliquer aussi le récepteur VEGFR-1 (Jonca *et al.*, 1997).

III.3.2.2. Prolifération

Le VEGF stimule la prolifération des cellules endothéliales *via* VEGFR-2. Ce récepteur, une fois phosphorylé suite à la fixation du VEGF, conduit à l'activation de la voie MAPK ERK1/2 (Takahashi *et al.*, 2001). La PLC γ active la PKC *via* la formation de diacylglycerol (DAG) et l'augmentation de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire (cf. Figure 13). La voie PI3-Kinase (PI3K) (Vinals *et al.*, 1999) est également impliquée dans la prolifération des cellules endothéliales.

III.3.2.3. Survie

Le VEGF joue un rôle important dans la survie des cellules endothéliales (Alon *et al.*, 1995). *In vitro*, le VEGF protège les cellules endothéliales de l'apoptose induite par le TNF α (Spyridopoulos *et al.*, 1997) ou les radiations ionisantes (Kato *et al.*, 1995). Dans des conditions de stress comme une dépletion sérique, le VEGF se fixe sur le VEGFR-2, active la voie PI3K et la phosphorylation de la protéine Akt/PKB (Protein kinase B) (cf. Figure 13). La protéine Akt/PKB phosphorylée va inhiber des protéines pro-apoptotiques telles que Bad. De plus, la survie des cellules peut être due à la régulation positive de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 (Gerber *et al.*, 1998). Un autre mécanisme par lequel le VEGF peut maintenir la survie des cellules endothéliales serait la phosphorylation de FAK (Zachary et Glikli, 2001).

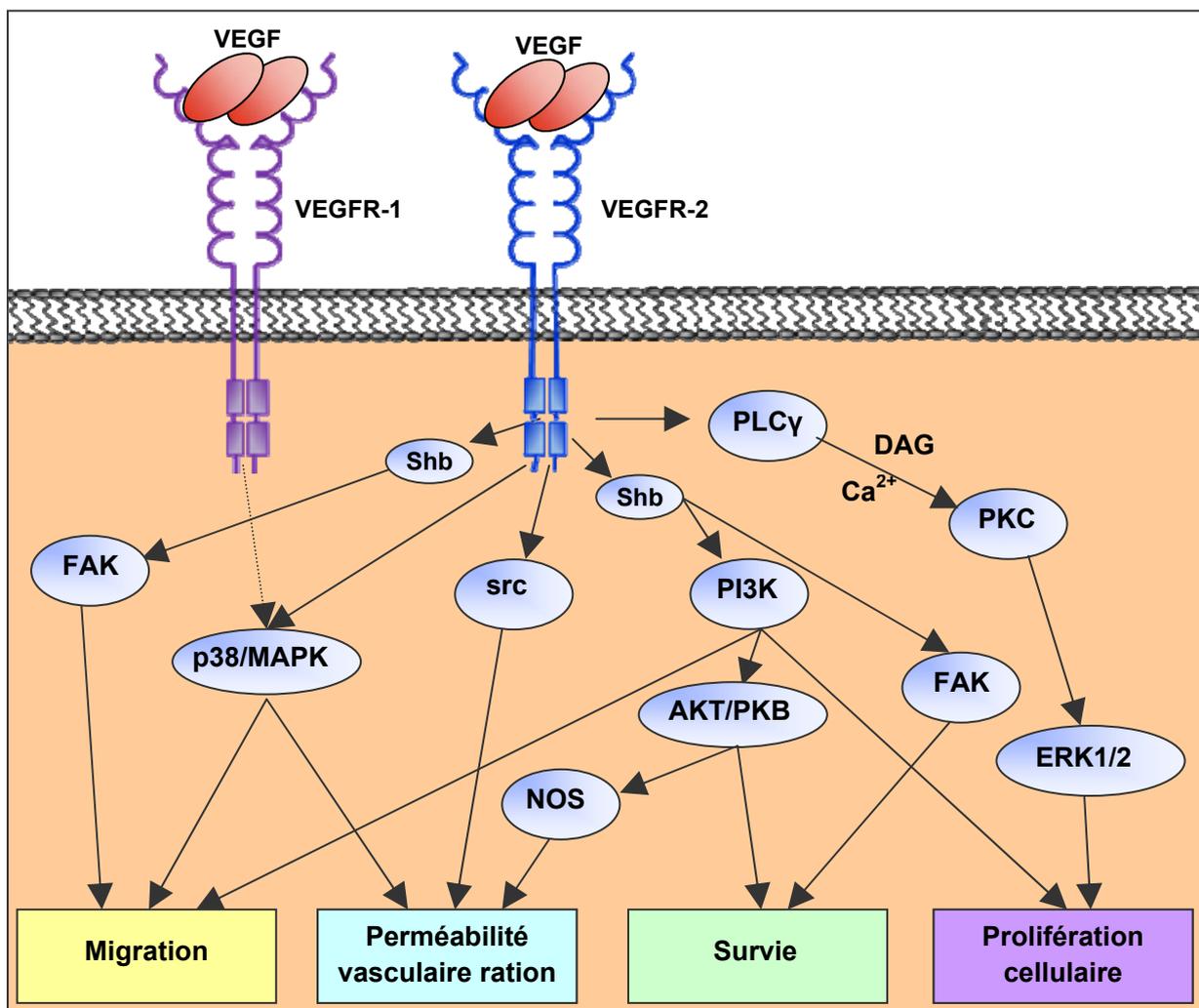


Figure 13 : Voies de signalisation activées par le VEGF et fonctions physiologiques

III.3.2.4. Perméabilité vasculaire

Le VEGF augmente la perméabilité vasculaire des microvaisseaux aux macromolécules (Lange *et al.*, 2003). En effet, le VEGFR-2 activé par le VEGF augmente l'activité de la NO synthase *via* la voie PI3K/Akt, provoquant la production de NO (Dimmeler *et al.*, 1999 ; Fulton *et al.*, 1999). Le NO, activateur de la perméabilité vasculaire, provoque l'extravasation de protéines plasmatiques comme la fibrine. Il se constitue alors un gel de fibrine extracellulaire qui forme un substrat pour la migration endothéliale vasculaire. La voie p38 MAPK semble également impliquée dans la perméabilité vasculaire (Issbrucker *et al.*, 2003).

III.3.3. Régulation de l'expression du VEGF

Le VEGF est produit par les cellules tumorales mais également par les cellules endothéliales, les macrophages et un grand nombre de types cellulaires. Le VEGF est régulé par une variété de stimuli dont le plus efficace est l'hypoxie. Ce mécanisme fait intervenir le facteur de transcription HIF (Hypoxia Inducing Factor), hétérodimère composé de deux sous-unités, HIF-1 α et HIF-1 β . En conditions normoxiques, les taux d'HIF-1 α sont faibles. En effet, la prolyl-4-hydroxylase (PHD), lie l'oxygène moléculaire et le fixe sur des résidus de proline du HIF-1 α . HIF-1 α oxydé se fixe alors sur la protéine de von Hippel-Lindau (VHL). Le complexe ainsi formé est ensuite ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. En conditions hypoxiques, ce processus de dégradation de HIF-1 α est ralenti, le taux d'HIF-1 α augmente la translocation dans le noyau de HIF-1 α et va permettre son association avec HIF-1 β . Le facteur HIF ainsi formé va se fixer sur une séquence cible HRE (HIF-responsive element) au niveau du promoteur du gène *veg*f et augmenter sa transcription (Wang *et al.*, 1995).

De nombreux facteurs de croissance et cytokines tels que le PDGF, le FGF, le TNF, et l'IL-1, peuvent également induire la synthèse du VEGF (Ferrara, 2004). Certaines hormones sont également des régulateurs de l'expression du VEGF selon le type cellulaire étudié, entre autre les estrogènes (Kodama *et al.*, 2004) et la progestérone (Hyder et Stancel, 2002). Au laboratoire, nous sommes particulièrement intéressés au rôle des récepteurs nucléaires PPAR (α , β et γ) sur la régulation du VEGF (Fauconnet *et al.*, 2002).

III.3.4. Thérapie anti-angiogénique

C'est Juda Folkman qui énonça le premier le concept de molécules anti-angiogéniques (Folkman, 1992). En effet la croissance des tumeurs au-delà d'un diamètre supérieur à quelques millimètres, n'est pas possible sans une néovascularisation. Puisque l'angiogénèse est initiée suite

à la sécrétion de facteurs de croissance tels que le VEGF (facteur clé de l'angiogenèse), de nombreuses stratégies consistant à neutraliser le VEGF ont été développées : soit en diminuant sa sécrétion par les cellules tumorales, par exemple en bloquant l'activation du récepteur à l'EGF (gefitinib, ZD-1839/Iressa, Astra Zeneca) (Ueda *et al.*, 2006) ou en utilisant des oligonucléotides antisens qui neutralisent l'ARNm du VEGF (Hotz *et al.*, 2005 ; Levine *et al.*, 2006) ; soit en inhibant son rôle biologique par l'utilisation d'analogues, de petites molécules inhibitrices comme le SU5416, le SU1126, le PTK787:ZK222584 (VEGF Trap), et des ribozymes comme l'angiozyme (Bergsland, 2004). Cependant, les stratégies permettant d'interférer sur la liaison du VEGF avec les récepteurs semblent les plus prometteuses. Nous pouvons citer l'AvastinTM, anticorps anti-VEGF (Bevacizumab, Genetech Inc) qui est un anticorps monoclonal de souris humanisé de type IgG1 qui lie toutes les isoformes actives du VEGF et qui neutralise leur liaison avec les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 (Presta *et al.*, 1997). De nombreux essais cliniques, de phase II et III, associant chimiothérapie et AvastinTM ont déjà été proposés à des patients atteints de cancers colorectaux (Hurwitz *et al.*, 2004), de cancers du poumon non à petites cellules (NSCLC : non-small cell lung cancer) (Sandler *et al.*, 2005) et de cancer du sein (Heinemann, 2008). Ces traitements ont montré leur efficacité. En effet, l'association de l'AvastinTM aux traitements traditionnels augmente la réponse au traitement permettant une survie sans progression et augmente même la survie globale des patients atteints de cancers colorectaux et de cancer du poumon NSCLC. En 2004, l' AvastinTM a reçu l'AMM (autorisation de mise sur le marché) de la « Food and Drug Administration » (FDA).

En France, depuis janvier 2005, l' AvastinTM est indiqué pour le traitement du cancer métastatique du colon ou du rectum en association avec des traitements chimiothérapeutiques conventionnels. Il est indiqué pour le traitement du cancer du sein métastatique depuis avril 2007, pour le traitement du cancer bronchique non à petites cellules chez les patients non-opérables depuis août 2007 et enfin très récemment pour le cancer du rein avancé et/ou métastatique. D'autres essais cliniques sont actuellement en cours pour le traitement d'autres types de cancer : cancer de l'estomac, cancer ORL, tumeur de l'ovaire, tumeur péritonéale, lymphome et mélanome (Heron, 2008). En ce qui concerne le traitement du cancer de la vessie, des essais cliniques de phase II utilisant le gemcitabine-cisplatine (GC), le méthotrexate/vinblastine/doxorubicin/cisplatine (MVAC) et l'AvastinTM en première ligne sont en cours sur des patients atteints de carcinomes invasifs (Sonpavde *et al.*, 2008). Récemment, un premier résultat, tout à fait prometteur, a fait état d'une réponse positive à l'AvastinTM chez un patient atteint de cancer urothélial métastatique (Osai *et al.*, 2008).

III.4. Valeur pronostique de la densité des microvaisseaux et du VEGF dans le cancer de la vessie

La valeur pronostique du VEGF semble bien établie dans de nombreux cancers, en revanche il n'y a pas de consensus dans le cancer de la vessie.

L'activité angiogénique d'une tumeur peut être évaluée par la mesure de la densité des microvaisseaux (MVD), ou par la quantification de facteurs angiogéniques (protéines ou ARNm) tels que le VEGF (VEGF-A), le VEGF-C, le VEGF-D et le bFGF dans le tissu tumoral vésical ou dans les milieux biologiques (sang et urine).

Pour dénombrer les vaisseaux sanguins, un marquage immunohistochimique des cellules endothéliales en utilisant des anticorps ciblant des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales (CD31 ou CD34) est nécessaire. Le calcul du nombre de vaisseaux apparaît comme un facteur prédictif de la récurrence tumorale et de la survie dans les cancers de la vessie (Bochner *et al.*, 1995 ; Dickinson *et al.*, 1994). De plus, une étude sur 126 résections transurétrales de cancer de la vessie nonmétastatique montre qu'une MVD élevée serait un facteur de mauvais pronostic de survie (Miyata *et al.*, 2006).

Dans la plupart des études, l'analyse de la MVD est complétée par la quantification de l'expression du VEGF. Le VEGF est surexprimé dans la majorité des tumeurs humaines comme dans le rein et la vessie (Brown *et al.*, 1993). Cependant, l'étude de l'expression du VEGF sur une série de 185 échantillons provenant de résections de tumeurs superficielles (pTa/pT1) montre que l'expression du VEGF n'est pas corrélée au risque de récurrence et à la survie des patients (Chow *et al.*, 1999). Par contre, une étude sur une série de 66 tumeurs superficielles pT1 montre qu'une expression élevée du VEGF dans les tumeurs pT1G2 est un marqueur pronostic de survie sans récurrence (Santos *et al.*, 2003). Une autre étude, sur des échantillons provenant d'une série de 161 patients montre que le VEGF est un marqueur de progression et de récurrence (Yang *et al.*, 2004). Une étude immunohistochimique sur 112 biopsies de tumeurs vésicales montre une expression élevée du VEGF dans les formes agressives comparativement aux formes superficielles (Liu *et al.*, 2008). Les différentes études suggèrent que le VEGF est un facteur de récurrence et de progression des tumeurs urothéliales. Cependant, une étude sur une large cohorte de 127 patients démontre que l'expression du VEGF n'est corrélée ni au grade, ni au stade, ni à la récurrence. Les auteurs concluent que le VEGF n'est pas un facteur prédictif de récurrence et de progression dans les cancers superficiels de la vessie (Stavropoulos *et al.*, 2004). Il semble donc qu'il n'y ait pas de consensus sur la valeur prédictive de l'augmentation du VEGF dans le cancer de la vessie. Les

différences de méthodologie utilisées pour mettre en évidence la valeur pronostique du VEGF pourraient être une explication.

L'activité angiogénique d'une tumeur vésicale peut être quantifiée par d'autres méthodes. Ainsi, des techniques d'hybridation *in situ* sur des coupes histologiques de tissu obtenues à partir d'une série de 77 patients, montrent une expression élevée du VEGF dans cette série. L'auteur de cette étude a pu observer une expression plus importante du VEGF dans les formes invasives comparativement aux formes superficielles et aux carcinomes *in situ* (CIS), suggérant que le VEGF est surexprimé au stade tardif du développement des tumeurs urothéliales (Izawa *et al.*, 2001). De plus, une étude portant sur 55 biopsies vésicales et 51 tumeurs infiltrantes traitées par chimiothérapie et cystectomie montre que les expressions du VEGF et du bFGF sont corrélées au risque de récurrence et d'apparition de métastases après traitement (Inoue *et al.*, 2000).

La détermination du taux d'ARN du VEGF, en utilisant une technique de RNase protection, montre que l'expression de l'ARNm VEGF est significativement plus élevée dans les carcinomes comparativement aux tissus sains et que l'expression de l'ARNm VEGF dans les tumeurs superficielles est 4 fois plus élevée que dans les tumeurs invasives (O'Brien *et al.*, 1995). Par RT-PCR en temps réel, le taux d'expression du VEGF est faible dans les tissus sains et un taux plus élevé est retrouvé dans les tumeurs superficielles (pT1 bas grade et haut grade, pT1 haut grade), comparativement à celui des tumeurs invasives (pT2, pT3, pT4) (Pignot *et al.*, 2008).

Le VEGF serait un facteur de récurrence puisqu'il a été montré que les tumeurs superficielles récidivantes (pT1G1 pT1G2) expriment 4 fois plus de VEGF que les tumeurs qui ne récidivent pas (O'Brien *et al.*, 1995). En effet, une étude utilisant des techniques de cDNAarray et de RT-PCR en temps réel montre que le VEGF serait effectivement un facteur de récurrence des tumeurs superficielles (Choi *et al.*, 2007).

Le VEGF est donc un marqueur pronostique indépendant de récurrence des tumeurs superficielles (pT1). Cependant il serait aussi un marqueur de progression des tumeurs superficielles.

Pourtant, dans une étude récente en utilisant une méthode de RT-PCR en temps réel, aucune valeur pronostique du VEGF dans les cancers de la vessie n'a été établie (Pignot *et al.*, 2008). Seule une analyse univariée a établi que la surexpression du VEGF est associée à un mauvais pronostic de survie sans progression (Pignot *et al.*, 2008).

Cependant, lorsque le taux des différents transcrits est étudié et non le taux du VEGF total, l'étude de l'expression des isoformes du VEGF pourrait apporter des éléments importants, puisque les taux du VEGF₂₀₆ et du VEGF₁₈₉ semblent plus élevés dans les tumeurs invasives comparativement aux tumeurs superficielles (Li *et al.*, 2000c). Cependant, une étude récente portant sur l'analyse de l'expression des différentes isoformes du VEGF (VEGF₁₂₁, 145, 148,

165, 183, 189, et 206) à partir de 157 échantillons cryoconservés ne montre pas de différence pour les isoformes spécifiquement surexprimées entre les tissus sains et les tissus tumoraux. En effet, la proportion des différentes isoformes est similaire entre les tissus sains et les tissus tumoraux avec une forte proportion d'ARNm du VEGF121 et du VEGF165 dans les deux types de tissus (Pignot *et al.*, 2008).

D'autres études ont analysé la valeur pronostique du VEGF à partir d'échantillons biologiques tels que le sérum et les urines. La mesure du taux de VEGF à partir d'échantillons urinaires de 261 patients atteints de cancer de la vessie de tous stades et grades confondus dont 108 patients témoins montre qu'un taux significativement élevé de VEGF urinaire est retrouvé uniquement chez les patients atteints de cancer de la vessie. L'analyse statistique a révélé qu'un taux élevé de VEGF était corrélé au taux de récurrence (Crew *et al.*, 1999).

Une étude récente a montré à partir d'une cohorte de 120 patients qu'un taux urinaire élevé de VEGF est associé uniquement aux tumeurs superficielles (Eissa *et al.*, 2007).

Enfin, le dosage sérique du VEGF semble prometteur puisque des taux élevés de VEGF permettraient de définir ce facteur de croissance comme un marqueur indépendant de récurrence et de progression chez des patients atteints de cancers superficiels de la vessie (Miyake *et al.*, 1999).

Une étude réalisée au laboratoire sur une cohorte de 58 patients, montre que le taux sérique du VEGF est corrélé au stade, au grade, à la présence de carcinomes *in situ* associés et surtout qu'un taux élevé de VEGF sérique permet d'identifier des cancers de la vessie métastatiques (Bernardini *et al.*, 2001).

L'expression d'autres isotypes du VEGF a été étudiée tels que le VEGF-C et le VEGF-D. La production de VEGF-C et de VEGF-D par les cellules tumorales induit la lymphangiogénèse qui favorise la dissémination tumorale lymphatique.

Trois études se sont attachées à décrire la valeur pronostique du VEGF-C dans les tumeurs urothéliales. Toutes les études ont montré que le VEGF-C n'était pas exprimé par l'urothélium normal. Deux d'entre elles montrent qu'un taux élevé de VEGF-C semble associé au stade, au grade, à la MVD et à la présence de métastases ganglionnaires (Suzuki *et al.*, 2005 ; Zu *et al.*, 2006). En revanche, la troisième rapporte que l'expression du VEGF-C est très faible dans les stades élevés (Mylona *et al.*, 2006).

En ce qui concerne l'expression du VEGF-D et de son récepteur Flt-4 (VEGFR-2), une étude montre que le VEGF-D serait un marqueur de la progression tumorale (Herrmann *et al.*, 2007).

Les récepteurs au VEGF (VEGFR-1 et VEGFR-2), préférentiellement exprimés à la surface des cellules endothéliales, sont également exprimés par des cellules tumorales urothéliales (Brown *et al.*, 1993 ; Sato *et al.*, 1998 ; Xia *et al.*, 2006). Une étude concomitante a montré que l'expression

du VEGFR-2 est un marqueur de progression tumorale (Xia *et al.*, 2006). Le taux élevé du VEGF associé à l'expression du VEGFR-2 dans les cellules dérivées de cancer humain de la vessie suggère l'existence d'une boucle d'activation autocrine de la prolifération des cellules tumorales urothéliales (Wu *et al.*, 2003).

Il semblerait donc qu'il n'y ait pas de consensus quant à la valeur pronostique du VEGF-A, cependant dans certains modèles de culture cellulaire, il a été montré que la surexpression du VEGF, semble être associée à un taux élevé d'une protéine intracellulaire de la famille des FABP (fatty acid binding protein) et à l'acquisition du potentiel métastatique (cf IV.FABP). En effet, une surexpression de la C-FABP (Cutaneous-Fatty Acid Binding Protein) conduit à l'acquisition du potentiel métastatique des cellules mammaires de Rat, et à une surexpression du VEGF. De plus, l'inhibition de l'expression de cette C-FABP est associée à une diminution du taux de VEGF et à la perte du potentiel métastatique des cellules (Adamson *et al.*, 2003).

Ces résultats suggèrent que, pour valider le concept du VEGF comme marqueur de progression du cancer de la vessie, il serait intéressant d'associer son expression à un autre facteur qui pourrait être une protéine de la famille des FABP.

IV. A-FABP et E-FABP

La A-FABP (Adipocyte-Fatty Acid Binding Protein), et la E-FABP (Epidermal-Fatty Acid Binding Protein) font partie de la famille des fatty acid binding protein (FABP), protéines intracellulaires capables de transporter des acides gras.

La A-FABP, appelée également FABP4 ou aP2, a été initialement décrite dans les adipocytes constituant le tissu adipeux (Hunt *et al.*, 1986 ; Spiegelman, 1998). La E-FABP, également appelée FABP5, psoriasis-associated FABP (PA-FABP), keratinocyte-FABP (K-FABP), cutaneous-FABP (C-FABP) ou mall1 est exprimée préférentiellement dans les cellules de la peau (Krieg *et al.*, 1993).

IV.1. La famille des FABP

Les fatty acid binding protein (FABP) appartiennent à la famille des lipid binding protein (LBP) et sont des petites protéines d'environ 14 à 15 kDa. Ces protéines sont nécessaires à la solubilisation des acides gras et coordonnent leur transport au sein de la cellule. Elles jouent un rôle important dans le métabolisme des acides gras. Elles sont capables de fixer de façon réversible avec une forte affinité de nombreux ligands hydrophobes, comme des acides gras à longues chaînes saturées ou insaturées, ou des éicosanoïdes (Coe et Bernlohr, 1998 ; Zimmerman et Veerkamp, 2002).

IV.1.1. Fonctions cellulaires

Les fonctions biologiques et les mécanismes d'action de ces protéines sont encore assez mal connus. Cependant, ces protéines sont chargées de diriger les acides gras vers les gouttelettes lipidiques où ils seront stockés, vers le réticulum endoplasmique où ils interviennent dans la synthèse de la membrane cellulaire, vers la mitochondrie ou le peroxysome où ils seront oxydés, vers les enzymes cytosoliques afin de réguler leur activité, vers le noyau où ils interviendraient dans la régulation transcriptionnelle par les PPAR ou vers l'extérieur de la cellule (Chmurzynska, 2006) (cf. Figure 14).

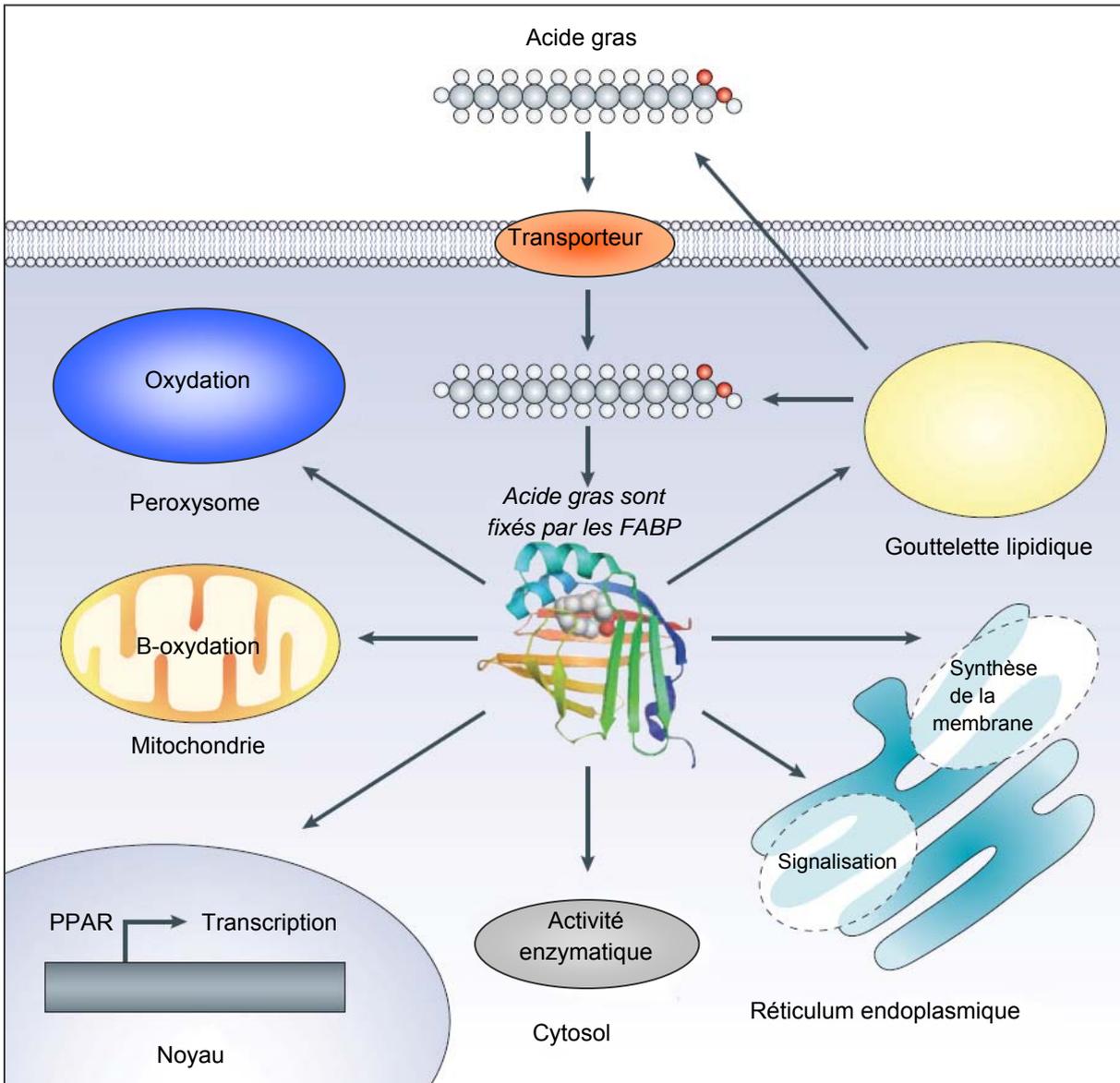


Figure 14 : Fonctions cellulaires des FABP (d'après (Furuhashi et Hotamisligil, 2008))

IV.1.2. Distribution tissulaire et régulation de l'expression des FABP

Depuis leur découverte en 1972 (Ockner *et al.*, 1972), neuf membres de la famille des FABP ont été identifiés. Ils portent le nom de l'organe dans lequel ils ont été initialement découverts : L-FABP (liver), I-FABP (intestinal), H-FABP (heart), A-FABP (adipocyte), E-FABP (epidermal) Il-FABP (ileal), B-FABP (brain), T-FABP (testis) et M-FABP (myelin P2) (cf. Tableau 4). Les différentes FABP ne sont vraisemblablement pas spécifiques du tissu dans lequel elles ont été initialement isolées. Ainsi des taux élevés de L-FABP sont retrouvés dans le foie (Ockner *et al.*, 1982) et des taux faibles sont détectés dans l'intestin, les reins, les poumons, et le

pancréas ; I-FABP est confinée au tractus digestif (Sweetser *et al.*, 1987) ; H-FABP (Heuckeroth *et al.*, 1987) et E-FABP (Krieg *et al.*, 1993) sont ubiquitaires ; A-FABP est détectée dans les adipocytes (Amri *et al.*, 1991), mais aussi dans les macrophages, les cellules dendritiques et dans les cellules urothéliales de la vessie (Celis *et al.*, 1996).

Protéine	Nom alternatif	Expression tissulaire	Localisation chromosomique
L-FABP (liver)	FABP1	Foie, intestin, pancréas, rein, poumon, estomac	2p11
I-FABP (intestinal)	FABP2	Intestin	4q25-q31
H-FABP (heart)	FABP3, MDGI	Cœur, muscle squelettique, cerveau, rein, poumon, estomac, testicule, aorte, glande surrénale, glande mammaire, placenta, ovaire, tissu adipeux brun	1p32-p33
A-FABP (adipocyte)	FABP4, aP2	Adipocyte, macrophage, cellule dendritique, vessie	8q21
E-FABP (epidermal)	FABP5, PA-FABP, mal1, C-FABP	Peau, langue, adipocyte, macrophage, cellule dendritique, glande mammaire, cerveau, intestin, rein, foie, poumon, cœur, muscle squelettique, testicule, rétine, cristallin, rate, vessie	8q21.13
II-FABP (ileal)	FABP6, I-BABP, gastrotropin	Iléon, ovaire, glande surrénale, estomac	5q33.3-q34
B-FABP (brain)	FABP7, MRG	Cerveau, cellule gliale, rétine, glande mammaire	6q22-q23
M-FABP (myelin)	FABP8, My-FABP, PMP2	Système nerveux périphérique, cellule de Schwann	8q21.3-q22.1
T-FABP (testis)	FABP9	Testicule, glande salivaire, glande mammaire	8q21.13

Tableau 4 : Famille des fatty acid-binding protéin (FABP)

Les FABP sont en général fortement exprimées dans les tissus métaboliquement actifs notamment dans les hépatocytes, les adipocytes et les cardiomyocytes où le taux de protéines correspond à 1 voire 5 % du total des protéines solubles cytosoliques (Haunerland et Spener, 2004). Les gènes *fabp* sont composés de 3 introns et de 4 exons de tailles différentes et possèdent tous une séquence canonique TATA, ou TATA box, située entre 23 et 30 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription (Kurtz *et al.*, 1994) et (Hunt *et al.*, 1986 ; Kurtz *et al.*, 1994 ; Sweetser *et al.*, 1987 ; Sweetser *et al.*, 1986). Les gènes de la A-FABP et de la L-FABP possèdent des séquences PPRE dans leur promoteur (Issemann et Green, 1990 ; Tontonoz *et al.*, 1994). L'expression des FABP est contrôlée par des séquences activatrices tissu-spécifiques, notamment, la L-FABP qui présente une séquence de fixation à HNF1 (hepatic nuclear factor 1) (Simon *et al.*, 1993) et la H-FABP qui comporte un site atypique MEF2-binding (myocyte enhancer-binding factor 2) (Qian *et al.*, 1999).

IV.2. A-FABP et E-FABP : généralités

IV.2.1. Gènes et séquences régulatrices

Le gène humain de la A-FABP est situé sur le chromosome 8 en position 8p21 (Prinsen *et al.*, 1997), il est constitué de quatre exons séparés par trois introns. Son ARNm de 619 paires de bases est traduit en une protéine de 132 acides aminés dont la masse moléculaire relative est de 14,719 kDa. Peu de choses sont connues sur les sites de régulation de l'expression de la A-FABP humaine bien qu'elle soit hautement régulée dans les adipocytes où elle interviendrait dans leur différenciation. De nombreuses études ont été réalisées chez la souris et ont permis d'identifier des sites régulateurs sur le promoteur du gène A-FABP. Le facteur de transcription c-fos/c-jun, en se fixant sur un site FSE-2 (fat specific element) appelé encore site AP-1, situé en position -122/-116 du gène murin *a-fabp*, régule négativement l'expression de ce gène (Rauscher *et al.*, 1988). Un élément de réponse aux glucocorticoïdes a été identifié sur le promoteur ce gène en position -393 à -385 (Cook *et al.*, 1988). Un site de fixation du facteur de transcription C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) a également été identifié en position -159/-129 (Christy *et al.*, 1989). C/EBP est un inducteur majeur de l'expression de A-FABP dans les cellules adipocytaires (Christy *et al.*, 1989). Le promoteur du gène murin *a-fabp* contient aussi une séquence PPRE fonctionnelle de type DR-1 située en position -5220 à -5199 (Ross *et al.*, 1990 ; Tontonoz *et al.*, 1994). L'hétérodimère PPAR γ 2/RXR α se fixe sur cette séquence PPRE ce qui conduit à la transactivation de la transcription du gène *a-fabp* (Schachtrup *et al.*, 2004 ; Tontonoz *et al.*, 1994). Dans la lignée cellulaire 3T3, il a été montré que la troglitazone et la pioglitazone augmentent l'expression de l'ARNm A-FABP (Harris et Kletzien, 1994). Les acides gras, oléate, palmitate, palmitoléate et stéarate, augmentent la transcription de *a-fabp* dans les préadipocytes mais pas dans les adipocytes matures (Distel *et al.*, 1992). L'insuline ainsi que l'IGF-1 augmentent l'expression de l'ARNm de A-FABP dans les préadipocytes (Blake et Clarke, 1990).

Peu d'études ont porté sur le promoteur du gène humain de la A-FABP et, à la différence du promoteur murin, aucune séquence PPRE n'a été identifiée dans le promoteur du gène humain *a-fabp* (Liu *et al.*, 2007). Cependant, des ligands de PPAR γ (rosiglitazone et pioglitazone) activent la transcription d'un gène rapporteur *luciférase* placé sous le contrôle du promoteur du gène humain *a-fabp* (Rival *et al.*, 2004), suggérant ainsi la présence d'un PPRE dans ce promoteur.

Le gène humain *e-fabp* se situe également sur le chromosome 8 en position 8p21.13 à proximité du gène *a-fabp* (Bleck *et al.*, 1998). Il possède la même structure que la A-FABP avec 4 exons et 3 introns. Son ARNm de 662 paires de bases est traduit en une protéine de 14 kDa comportant 135 acides aminés. Dans les cellules adipocytaires, la A-FABP est la forme majoritaire alors que la E-FABP est minoritaire. Dans une lignée murine dont le gène *a-fabp* a été

invalidé, l'absence de A-FABP est partiellement compensée par une augmentation de l'expression de la E-FABP (Hotamisligil *et al.*, 1996).

Peu de travaux ont été réalisés sur le promoteur humain de *e-fabp*. Le clonage et le séquençage du gène murin de *e-fabp* ont permis d'identifier plusieurs séquences « enhancers » connues, une TATA box, localisée en position -40 et une CAAT box en position -80 (Bleck *et al.*, 1998). Une recherche d'identité du promoteur avec des séquences « enhancers » connues a permis d'identifier plusieurs sites de fixation à MyoD – *facteur de transcription spécifique du muscle* –, à C/EBP, à HNF-1 – *facteur de transcription spécifique du foie* –. Un site AP1 (Eckert *et al.*, 1997) et des sites de fixation aux facteurs de transcription MZF1 et GATA1 impliqués dans la régulation des gènes érythropoïétiques ont aussi été retrouvés (Hromas *et al.*, 1991 ; Pevny *et al.*, 1991). De plus, Schachtrup a identifié, une séquence apparentée à une séquence PPRE en position -5220 à -5199. Cependant, cette séquence ne permet pas la transactivation d'un gène rapporteur par les trois isotypes de PPAR (Schachtrup *et al.*, 2004).

L'antigène Ep-CAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) est une glycoprotéine transmembranaire dont l'augmentation de l'expression est associée au grade et à la dysplasie des tumeurs mammaires. L'augmentation de l'expression de Ep-CAM induit la surexpression du proto-oncogène *c-myc* et de nombreuses autres protéines dont la E-FABP (Munz *et al.*, 2005).

IV.2.2. Structure

Les FABP possèdent une structure tridimensionnelle composée de dix feuillets β antiparallèles formant une structure en tonneau et deux hélices α (Chmurzynska, 2006). La A-FABP peut former un homodimère en présence ou en absence de ligands.

Aucune séquence de localisation nucléaire (NLS) n'a été identifiée sur la séquence primaire de la A-FABP, cependant l'étude de la structure tridimensionnelle a montré la présence d'une séquence signal (Ayers *et al.*, 2007 ; Sessler et Noy, 2005). Cette séquence correspond à 3 résidus basiques, la lysine 21 (K21), l'arginine 30 (R30) et l'arginine 31 (R31), localisés dans le motif hélice-boucle-hélice de la protéine. Lors de la fixation d'un acide gras, il y a

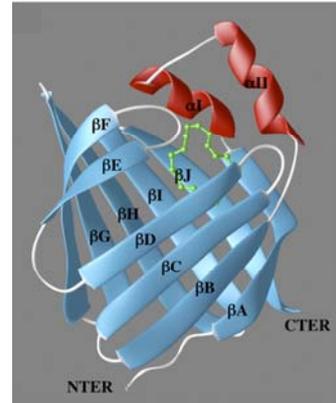


Figure 15 : Structure de la A-FABP

un changement d'orientation et stabilisation de l'hélice portant la « NLS » (cf. Figure 16) (Ayers *et al.*, 2007) ce qui permet la reconnaissance de cette « NLS » par les karyophérines, qui vont ensuite recruter les nucléoporines FG. Ce complexe, une fois formé, va pénétrer dans le noyau par l'intermédiaire d'un pore nucléaire. Dans le noyau, RanGTP se fixe sur les karyophérines et permet la dissociation du complexe libérant la A-FABP (Gorlich *et al.*, 1997). La A-FABP complexée au ligand va alors se lier au récepteur PPAR γ , lui céder son ligand et permettre son hétérodimérisation avec RXR et la transcription de gènes cibles (cf Figure 16).

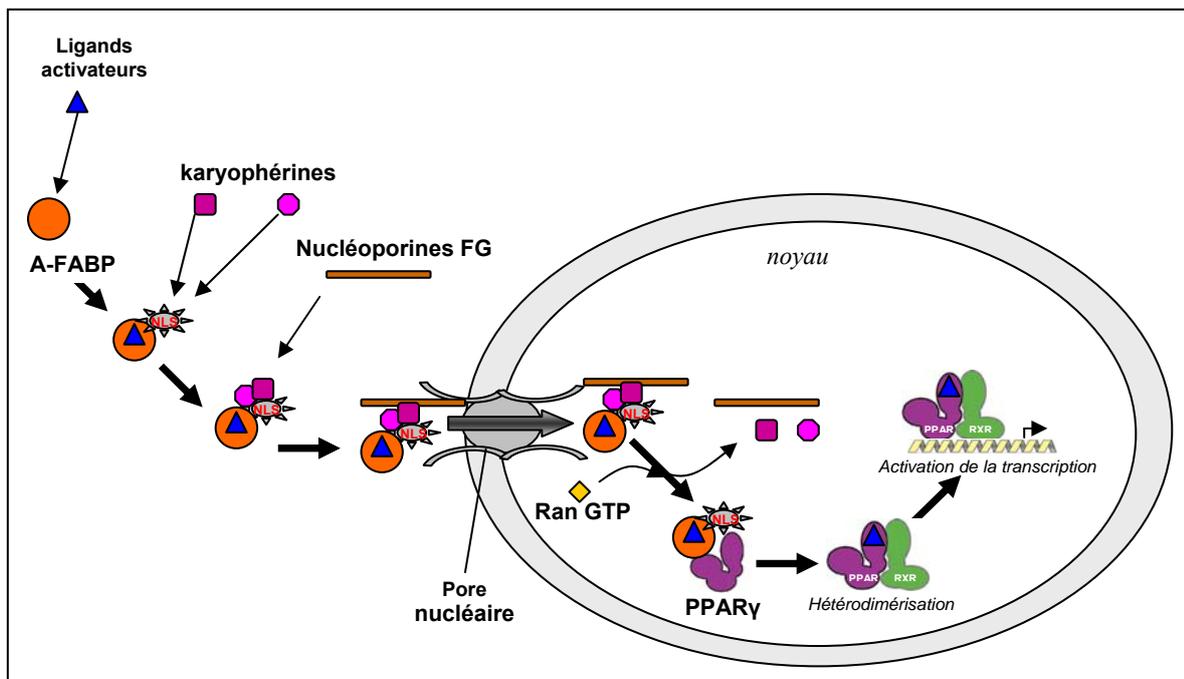


Figure 16 : Schéma de l'import nucléaire de la A-FABP en présence de ligands activateurs

Selon la nature du ligand, la protéine A-FABP présentera des changements conformationnels différents, suggérant l'existence de ligands « activateurs » (linoléate, TZD) et de ligands « non activateurs » (oléate) (Ayers *et al.*, 2007). Les ligands non activateurs n'induisent pas de translocation nucléaire du complexe, contrairement à ce qui est obtenu avec les ligands activateurs. En effet, la chaîne latérale contenant la phénylalanine 57 (F57) peut subir une légère rotation vers l'intérieur de la poche de fixation ou vers l'extérieur de la protéine grâce à la proline 38 (P38) qui agit comme une charnière. Les ligands activateurs interagissent avec la F57 et bloquent ce résidu vers l'intérieur de la poche de fixation (cf. Figure 17). Cette interaction permet la stabilisation de la protéine et de la séquence « NLS », ce qui conduira à l'import nucléaire du complexe A-FABP/ligand.

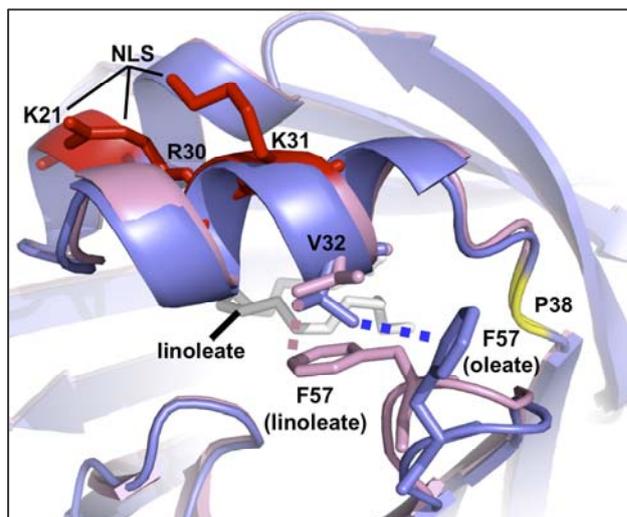


Figure 17 : Schéma de la stabilisation de la NLS de la A-FABP par les ligands activateurs

Aucune « NLS » n'a été identifiée ni dans la séquence primaire ni dans la structure tridimensionnelle de la E-FABP.

IV.2.3. Les ligands des A- et E-FABP

Les FABP lient les acides gras et plus spécifiquement les acides gras à longues chaînes. Chaque protéine, A- ou E-FABP, lie et séquestre à l'intérieur de sa cavité un seul ligand hydrophobe à la fois contrairement à d'autres FABP telles que la L-FABP (Veerkamp et Maatman, 1995). L'affinité des FABP pour les acides gras dépend de la longueur de leur chaîne, et pour ce qui concerne la E-FABP de leur degré de saturation (Richieri *et al.*, 1994). La A- et la E-FABP peuvent lier des lipides oxydés comme l'acide hydroxy- et l'hydroperoxy-eicosatétraénoïque (HETE, et HPETE), mais leur affinité pour les leukotriènes et les prostaglandines est faible (Kane *et al.*, 1996). La A- et la E-FABP peuvent aussi lier des molécules pharmacologiques telles que les TZD (ex : troglitazone). Par contre, la fixation du WY14,643 par la A-FABP est négligeable et n'a pas été mesurée pour la E-FABP (Wolfrum *et al.*, 2001). Des molécules fluorescentes, interagissant avec les domaines hydrophobes des

protéines et pouvant également se fixer sur les FABP, notamment le 1-anilino-8-naphtalènesulfonate (1,8-ANS) (Kane *et al.*, 1996), et l'acide cis-parinarique (cPA) (Myers-Payne *et al.*, 1996 ; Sha *et al.*, 1993) sont très utilisées pour évaluer l'affinité et la spécificité des FABP pour leurs ligands naturels. Globalement, l'affinité des FABP pour les acides gras est comprise entre 10 et 1000 nM.

IV.2.4. Rôles intracellulaires des A- et E-FABP

Dans la circulation sanguine, les acides gras sont véhiculés sous forme de lipoprotéines et sont principalement associés à l'albumine (Spector, 1986). Ces acides gras pénètrent dans la cellule soit par diffusion passive ou « flip-flop » (Zakim, 1996), soit par des protéines spécifiques comme les FABP_{PM} (plasma membrane FABP) (Stremmel *et al.*, 1985), les FAT (fatty acid transporter) (Ibrahimi *et al.*, 1996) et les FATP (Schaffer et Lodish, 1994). Une fois dans la cellule, les acides gras sont liés par les FABP, ce qui leur permettra d'augmenter leur solubilité et de faciliter leur transport de la membrane plasmique vers leurs sites d'oxydation (mitochondrie, peroxyosomes), d'estérification en triacylglycérols ou phospholipides, ou encore vers le noyau pour réguler la transcription.

IV.3. Principales fonctions de la A-FABP

L'isotype A-FABP est le mieux caractérisé des membres de la famille des FABP. Son expression est hautement régulée durant la différenciation des adipocytes et la transcription de son ARNm est régulée par les acides gras, les agonistes de PPAR γ et par l'insuline (Hauerland et Spener, 2004 ; Makowski et Hotamisligil, 2005).

La différenciation des monocytes en macrophages par les agonistes de PPAR γ et les LDL oxydés (« low density lipoprotein ») est associée à une augmentation de l'expression de la A-FABP (Makowski et Hotamisligil, 2005 ; Pelton *et al.*, 1999).

Lors de l'accumulation de lipides dans les préadipocytes 3T3-L1, durant le stade précoce de la différenciation des préadipocytes en adipocytes, une étude par northern-blotting a montré une augmentation du taux de PPAR γ (Kajimoto *et al.*, 2005).

Des travaux montrent un taux faible de A-FABP dans les préadipocytes, et une augmentation croissante de l'expression de cette protéine en fonction du degré de différenciation dans les adipocytes (Weaver *et al.*, 2008). La différenciation adipocytaire semble être contrôlée par la transcription du gène *a-fabp*, elle-même contrôlée par le facteur de transcription C/EBP β – protéine impliquée dans la différenciation terminale des adipocytes –. En effet, lorsque la

différenciation adipocytaire des préadipocytes 3T3-L1 est bloquée par l'inhibition de la phosphorylation de C/EBP β , cela conduit à une inhibition de l'expression de PPAR γ 2 et de A-FABP (Bezy *et al.*, 2007).

La A-FABP aurait un rôle dans l'apoptose des follicules ovariens chez la souris. En effet, une expression de la A-FABP a été observée dans les cellules apoptotiques (Nourani *et al.*, 2005). De plus, la A-FABP interviendrait dans l'apoptose des lymphocytes induite par la dexaméthasone (Abdelwahab *et al.*, 2007). La surexpression de la A-FABP conduit à l'apoptose des cellules cancéreuses de prostate DU145, en diminuant l'expression des facteurs de croissance autocrines et en augmentant l'expression des facteurs pro-apoptotiques (De Santis *et al.*, 2004).

La A-FABP aurait un rôle à jouer dans le processus inflammatoire. En effet, des cellules dendritiques issues de souris dont le gène *a-fabp* a été invalidé (A-FABP *-/-*), activent moins efficacement les lymphocytes T CD8⁺, et sécrètent moins de cytokines IL-12, de TNF et d'IFN- γ (Rolph *et al.*, 2006). La A-FABP serait un acteur indispensable de la différenciation et de l'activation des monocytes en macrophages (Fu *et al.*, 2000 ; Kazemi *et al.*, 2005 ; Makowski et Hotamisligil, 2005 ; Pelton *et al.*, 1999). Dans les macrophages dont le gène *a-fabp* a été invalidé (A-FABP *-/-*), il n'y a plus de synthèse de cytokines telles que le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6 et MCP1 (Protéine Chimioattractante des Monocytes) ni de synthèse d'enzymes pro-inflammatoires tels que iNOS et COX2 (Balendiran *et al.*, 2000).

Lors de l'asthme, en réponse aux cytokines IL-4 et IL-13, produites par les lymphocytes TH2, les cellules humaines épithéliales des bronches expriment un taux important de A-FABP (Shum *et al.*, 2006).

En plus de son rôle dans la différenciation adipocytaire, la A-FABP joue un rôle majeur dans les fonctions adipocytaires impliquées dans le développement du syndrome métabolique (Maeda *et al.*, 2003). Le terme syndrome métabolique définit un ensemble de perturbations métaboliques qui prédisposent à différentes pathologies telles que le diabète de type 2, l'hypertension, la dyslipidémie, et les maladies cardiovasculaires (Bonow et Gheorghide, 2004 ; Grundy, 2004). Des souris dont le gène *a-fabp* a été invalidé (A-FABP *-/-*) et dont le régime est riche en graisse, montrent une diminution de la résistance à l'insuline (Hotamisligil *et al.*, 1996). Il a été observé dans un modèle murin d'athérogenèse¹ (souris ApoE*-/-*) dont le gène *a-fabp* a été invalidé (A-FABP *-/-*) et suite à un régime riche en graisse, une diminution des plaques

¹ Athérogenèse : formation de plaques d'athérome au sein des artères par accumulation d'acide gras, de cholestérol, de dépôts calcaires, de fibrinogène, et de plaquettes. Cette pathologie augmente de façon importante le risque de maladie cardiovasculaire.

d'athérome (Boord *et al.*, 2004). Un inhibiteur chimique de la A-FABP, le BMS309403, protège les souris hypercholestérolémiques (ApoE^{-/-}) du développement d'un syndrome métabolique (Furuhashi *et al.*, 2007). Cette molécule pourrait prochainement être utilisée chez l'homme pour le traitement du diabète et des maladies cardiovasculaires. Les individus porteurs d'un polymorphisme de la A-FABP (variant T-87C¹), présentent un taux de triglycérides plus faible, ce qui réduit les risques de maladies cardiovasculaires, et semble protéger ces individus contre le diabète de type 2 induit par l'obésité (Tuncman *et al.*, 2006).

A l'heure actuelle, le dosage de la A-FABP dans le sérum permettrait d'établir un diagnostic clinique de l'obésité dû à un syndrome métabolique (Stejskal et Karpisek, 2006 ; Tso *et al.*, 2007 ; Xu *et al.*, 2007 ; Xu *et al.*, 2006) et serait un marqueur du diabète de type 2 (Tso *et al.*, 2007).

IV.4. Principales fonctions de la E-FABP

A l'heure actuelle, la fonction de la E-FABP n'est pas clairement établie. D'après sa similarité en acides aminés avec la A-FABP (52 %), la E-FABP lie vraisemblablement les acides gras et certains ligands synthétiques avec une affinité similaire à celle de la A-FABP (Hauerland et Spener, 2004). Dans les adipocytes de souris, le taux de A-FABP est très supérieur à celui de la E-FABP suggérant un rôle secondaire de la E-FABP (Simpson *et al.*, 1999). Cependant, l'expression de la E-FABP est augmentée très fortement dans les adipocytes de souris dont le gène *a-fabp* a été invalidé (A-FABP ^{-/-}) (Hotamisligil *et al.*, 1996 ; Makowski *et al.*, 2001) ce qui laisse supposer que lorsqu'il y a déficit en A-FABP, la E-FABP prend le relais.

Dans les adipocytes, la E-FABP semble être impliquée dans la lipolyse et dans la sensibilité à l'insuline (Hertzel *et al.*, 2002). En effet, des souris, dont le tissu adipeux surexprime spécifiquement la E-FABP et nourries avec un régime riche en graisse, sont moins sensibles à l'insuline (Maeda *et al.*, 2003). Les adipocytes des souris dont le gène *e-fabp* a été invalidé (E-FABP ^{-/-}) montrent une augmentation de leur capacité de transport du glucose dépendant de l'insuline.

Dans l'épiderme constituant la peau, la présence des acides gras dans la membrane des cellules est essentielle au maintien de la perméabilité à l'eau. La perte de l'expression de la E-FABP dans ces cellules, n'altère pas la composition en acide gras de la membrane cellulaire et n'altère que de façon mineure sa fonction de barrière à l'eau (Owada *et al.*, 2002).

¹ Variant T-87C : la thréonine 87 est remplacée par une cystéine.

Par contre, la E-FABP semble jouer un rôle important dans la différenciation des cellules de l'épiderme puisque son expression varie en fonction du stade de différenciation des kératinocytes (Siegenthaler *et al.*, 1994). En effet, elle a été initialement détectée dans la peau psoriasique, où elle est très fortement exprimée (Madsen *et al.*, 1992).

La surexpression de la E-FABP dans une lignée cellulaire mammaire nonmétastatique de rat est associée à une surexpression du VEGF et à l'acquisition du potentiel métastatique (Jing *et al.*, 2001). Comme nous l'avons décrit précédemment (cf. II.3.3), la E-FABP interagit avec le PPAR β et augmente son activité transcriptionnelle (Tan *et al.*, 2002). De même la protéine de liaison de l'acide rétinoïque (CRABP-II) véhicule le ligand jusqu'à son récepteur RAR contrôlant ainsi son activité transcriptionnelle (Budhu *et al.*, 2001 ; Budhu et Noy, 2002).

Dans les cellules, selon que le taux de CRABP-II est supérieur ou inférieur à celui de la E-FABP, la réponse cellulaire sera différente. En effet, lorsqu'il y a plus de CRABP-II que de E-FABP, la cellule sera conduite vers la mort cellulaire et lorsque le taux de E-FABP est supérieur à celui de CRABP-II, c'est la survie cellulaire qui sera augmentée. Ces deux effets opposés du même ligand s'expliquent par l'activation d'un récepteur nucléaire différent, CRABP-II activant RAR, facteur de transcription pro-apoptotique, et E-FABP activant PPAR β , facteur de transcription augmentant la survie cellulaire. E-FABP favoriserait la survie cellulaire par l'intermédiaire du récepteur PPAR β (Schug *et al.*, 2007).

IV.5. A-FABP et E-FABP dans le cancer de la vessie

Les FABP semblent exercer un rôle primordial dans l'acquisition du potentiel métastatique. En effet, un taux élevé de la H-FABP dans les cancers gastriques est associé à l'agressivité tumorale, à l'acquisition du potentiel métastatique et à un mauvais pronostic de survie des patients (Hashimoto *et al.*, 2004). Dans les astrocytomes, un taux élevé de la B-FABP est associé aux régions d'infiltration tumorale et à la récurrence (Mita *et al.*, 2007). Dans les cancers du rein, la B-FABP serait un marqueur tumoral (Teratani *et al.*, 2007). Un taux élevé de la L-FABP semble être associé aux cancers du poumon (Kawamura *et al.*, 2005). Dans d'autres cas, c'est la perte d'expression d'une FABP qui est associée à l'acquisition du potentiel métastatique. Ainsi, la perte d'expression de la L-FABP est associée aux cancers colorectaux (Lawrie *et al.*, 2004). Enfin, le taux de A-FABP est moins important dans les lignées cellulaires dérivées de cancer du sein comparativement aux lignées cellulaires non pathogéniques (Hammamieh *et al.*, 2005).

Dans les cancers de la vessie, une perte d'expression de la A-FABP est associée à la progression des tumeurs urothéliales (Celis *et al.*, 1996 ; Ohlsson *et al.*, 2005). Par ailleurs, le pourcentage de

tumeurs exprimant la A-FABP est très élevé dans les lésions de bas grade et diminue drastiquement dans les néoplasies de grade III et IV.

Une analyse, par électrophorèse à deux dimensions, par microséquençage et par spectrométrie de masse des protéines issues de cellules urothéliales normales ou de cellules urothéliales tumorales, montre que la A-FABP est plus exprimée dans le tissu normal que tumoral. De plus, le taux de A-FABP est plus élevé dans les lésions de bas grade comparativement aux tumeurs de grades 3 et 4 (Celis *et al.*, 1996).

Gromova a étudié l'expression de la A-FABP par RT-PCR et par électrophorèse bidimensionnelle. Il a montré une association entre la diminution du taux des ARNm et la diminution du taux protéique de la A-FABP dans les lésions de haut grade (Gromova *et al.*, 1998) ce qui suggère une régulation au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel.

L'étude de l'expression de certains marqueurs de différenciation dans les carcinomes épidermoïdes de la vessie (SCC) (cf I.3.) montre que le taux de la E-FABP est plus élevé dans les formes très différenciées et kératinisées, exprimant les kératines 5, 6, 10, 14, 16,17 et 20, et l'involucrine, que dans les formes peu différenciées (Ostergaard *et al.*, 1997).

Le profil d'expression génique de tumeurs urothéliales de vessie a été analysé en utilisant des puces à ADN. Cette étude a montré une surexpression de la A-FABP dans les tumeurs superficielles qui progressent comparativement à celles qui ne progressent pas (Wild *et al.*, 2005).

La quantification de la A-FABP et de la E-FABP dans les tumeurs urothéliales superficielles pourrait donc permettre d'identifier les tumeurs superficielles qui vont progresser.

Plus récemment, Ohlsson a étudié l'expression de la A-FABP d'une part, sur 153 échantillons de vessie par analyse protéomique et par immunohistochimie, et d'autre part, sur 1 849 patients atteints de cancer de la vessie par la technique de tissue microarray. Cette étude montre une forte diminution de l'expression de la A-FABP dans les tumeurs invasives. De plus, cette baisse d'expression de la A-FABP n'est pas associée à une diminution de l'expression de PPAR γ (Ohlsson *et al.*, 2005).

La A-FABP, et dans une moindre mesure la E-FABP, semblent donc jouer un rôle essentiel dans la cancérogenèse de l'urothélium.

CADRE ET BUT DU TRAVAIL

En terme de fréquence, les tumeurs vésicales représentent le second cancer des voies urogénitales. Avec plus de 10 000 nouveaux cas et 4 500 décès annuel en France, cette pathologie est un véritable enjeu de santé publique. Les tumeurs de type urothélial représentent 95% des tumeurs vésicales et se répartissent en deux grands groupes : les tumeurs dites superficielles (70%) et les tumeurs infiltrant le plan musculaire (30%). Le terme de « tumeurs superficielles » a été introduit par les urologues, il y a une trentaine d'années, pour définir l'ensemble des tumeurs urothéliales confinées à la muqueuse vésicale. Il regroupe en réalité trois catégories tumorales bien distinctes, dans leur morphologie, leur potentiel évolutif et vraisemblablement leur mode de cancérogenèse. Il s'agit de tumeurs papillaires non infiltrantes (pTa), des carcinomes papillaires infiltrant le chorion (pT1) et du carcinome *in situ* (CIS). Les tumeurs papillaires pTa et pT1 font l'objet d'un intérêt particulier elles sont plus que toutes autres concernées par le problème de la fiabilité des données histopathologiques car le traitement repose entièrement sur le grade et le stade. Si les carcinomes infiltrant le muscle sont en effet classés sans difficulté et requièrent un traitement chirurgical radical par cystectomie, les tumeurs pTa et pT1 sont, pour la plupart, traitées par résection endoscopique associée ou non à des instillations endovésicales de Bacille Calmette-Guérin (BCG). Leur évolution est capricieuse, dominée par les risques de récurrence et de progression vers l'invasion musculaire : ces risques sont corrélés à la fois au stade et au grade. Les tumeurs pTa ont un risque de récurrence à 5 ans de 30 à 50% selon le grade ; le taux de progression est de 5% pour les pTaG1 et atteint 50% pour les pTaG3 (Lebret *et al.*, 2000). Quant aux tumeurs pT1, elles constituent un ensemble très hétérogène à haut risque : si certaines d'entre elles peuvent être contrôlées par un traitement conservateur, plus de 50% évoluent vers l'invasion du plan musculaire et nécessitent une cystectomie totale (Soloway *et al.*, 2002).

Donc le problème posé par les tumeurs superficielles de la vessie est de savoir si elles resteront superficielles ou si elles deviendront infiltrantes et envahissantes. Actuellement les facteurs les plus informatifs permettant d'obtenir des indications pronostiques d'une tumeur de vessie sont le stade et le grade. Ainsi, il apparaît de plus en plus nécessaire de compléter l'analyse anatomopathologique conventionnelle par des marqueurs moléculaires d'agressivité tumorale.

L'identification de nouveaux marqueurs d'agressivité du cancer vésical est l'une des thématiques du Groupe de Recherche en Urologie de l'EA3181. Une meilleure caractérisation de cette pathologie hétérogène, au pronostic variable et imprévisible, a pour objectif de proposer de nouvelles voies thérapeutiques dans le traitement de cette maladie et de permettre ainsi une meilleure prise en charge des patients.

Notre intérêt s'est, entre autre, porté sur l'angiogenèse. En effet, la croissance et la dissémination métastatique des tumeurs solides dépendent de l'angiogenèse qui est un phénomène complexe, multi-étapes, hautement régulé qui conduit à la formation de nouveaux capillaires

sanguins à partir de l'excroissance ou du bourgeonnement de vaisseaux préexistants, capillaires ou veinules. L'angiogenèse tumorale est initiée par des facteurs angiogéniques dont le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est un régulateur clé. Ainsi, l'évaluation de l'angiogenèse à travers l'expression du facteur angiogénique VEGF et une meilleure connaissance des voies de régulation de ce facteur de croissance sont des paramètres essentiels qui devraient permettre de mieux appréhender le devenir biologique du cancer de la vessie.

Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont montré d'une part que le taux sérique de VEGF est augmenté chez des patients atteints d'une tumeur de vessie et corrélé au stade et au grade, d'autre part qu'un dosage du VEGF d'une valeur supérieure à 400 pmol/ml permet d'identifier des cancers vésicaux métastatiques (Bernardini *et al.*, 2001). Compte-tenu de l'importance de ce facteur de croissance dans l'angiogenèse, de sa valeur pronostique potentielle dans le devenir des tumeurs urothéliales superficielles et de l'importance des récepteurs nucléaires PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) dans la tumorigenèse, nous avons étudié la régulation du gène *vegf* par ces récepteurs dans un modèle *in vitro*. Les PPAR sont particulièrement intéressants car ils sont activés par des molécules d'un grand intérêt pharmacologiques tels que les fibrates (utilisés dans le traitement des dyslipidémies) et les thiazolidinediones (utilisées dans le traitement du diabète de type 2).

Nos travaux ont été réalisés sur des lignées cellulaires humaines dérivées de cancer de la vessie, RT4 et T24. La lignée RT4 dérivée d'une tumeur papillaire bien différenciée de grade I, est représentative d'une tumeur superficielle de bon pronostic et la lignée T24 dérivée d'un carcinome de vessie, indifférencié de grade III, est représentative d'une tumeur à potentiel métastatique.

Les premiers résultats obtenus ont montré que le VEGF (ARNm et protéine) est surexprimé de manière différentielle par des ligands synthétiques de PPARs, le WY 14,643 (fibrate qui est un ligand de PPAR α), le L-165041 (ligand de PPAR β) et le BRL 49653 (thiazolidinedione qui est un ligand de PPAR γ). En effet, l'expression de ce gène est augmentée par l'activation des trois isotypes des PPARs dans les cellules RT4 et uniquement par l'activation de PPAR β dans les cellules T24. Cette surexpression met en jeu un mécanisme indirect d'activation transcriptionnelle et pourrait impliquer un membre de la famille des FABP, la A-FABP (Fauconnet *et al.*, 2002).

Selon les données de la littérature, certaines FABPs auraient un rôle dans l'acquisition du potentiel agressif, invasif et métastatique d'une tumeur et apparaîtraient comme de nouveaux marqueurs de progression tumorale. Cependant, dans certains types de cancers, ce n'est pas une induction ou une augmentation d'expression des FABPs qui est observée mais une perte d'expression.

En ce qui concerne le cancer de la vessie, peu d'études ont porté sur l'expression des FABPs. Néanmoins, un groupe de recherche a montré que l'expression de la E-FABP serait diminuée en fonction du degré de différenciation des cancers urothéliaux (Ostergaard *et al.*, 1997). Mais, ce qui a particulièrement retenu notre attention, c'est qu'ils ont observé une forte expression de la A-FABP dans le tissu urothélial normal et une perte d'expression de cette dernière en fonction du stade de la tumeur (Celis *et al.*, 1996). Ces différents travaux suggèrent que la perte d'expression de la A-FABP serait associée à la progression des tumeurs urothéliales (Celis *et al.*, 1996 ; Ohlsson *et al.*, 2005).

Compte-tenu de l'ensemble de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle une surexpression du VEGF dans les tumeurs urothéliales de stade et grade élevés pourrait être associée à la perte d'expression de la A-FABP. Par ailleurs, une tumeur vésicale superficielle caractérisée par une forte expression de la A-FABP, serait de bon pronostic et *a contrario*, la capacité invasive d'une tumeur de vessie pourrait être évaluée par la perte expression de cette FABP.

Dans le cadre de notre travail de thèse, nous avons eu plusieurs objectifs :

- Etudier la régulation des différentes isoformes du VEGF par les PPAR pour déterminer s'il existe une régulation différentielle d'une isoforme donnée (isoforme soluble ou isoforme piégée dans la matrice extracellulaire) en fonction du phénotype agressif des cellules urothéliales.
- Analyser la valeur pronostique de l'expression du VEGF tissulaire et de ses isoformes au niveau génique par différentes techniques de biologie moléculaire (northern-blotting, southern-blotting et RT-PCR en temps réel). En effet, selon les données de la littérature, l'étude de l'expression du VEGF tissulaire (ARNm ou protéine) conduit à des résultats contradictoires. Il n'y a pas de consensus quant à la valeur pronostique du VEGF dans les tumeurs de vessie.
- Analyser la valeur pronostique de l'expression de la A-FABP dans des tumeurs de la vessie de différents stade et grade et déterminer s'il existe une corrélation avec les critères anatomopathologiques classiques.
- Analyser quelles sont les FABP exprimées dans les lignées cellulaires de vessie RT4 et T24 pour déterminer si l'expression du VEGF est associée à la surexpression ou à la perte d'expression d'une FABP et plus particulièrement de la A-FABP.
- Etudier la régulation de la A-FABP par les PPAR pour identifier les ligands capables d'augmenter son expression.

- Enfin, déterminer si une FABP pourrait avoir un rôle dans la régulation transcriptionnelle du VEGF par les PPAR.

RESULTATS

I. Rôle de ligands des PPAR sur l'expression du VEGF dans des lignées cellulaires dérivées de cancer humain de la vessie

Les PPAR sont des récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme lipidique, l'inflammation, la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire. Ces récepteurs sont activés par des ligands de nature lipidique, acides gras à longues chaînes, saturés et insaturés, mais également par des ligands synthétiques comme les fibrates et les thiazolidinediones. L'activation des PPAR provoque leur hétérodimérisation avec RXR, leur fixation sur une séquence spécifique PPRE localisée sur le promoteur de gènes cibles. Ces récepteurs sont exprimés dans la plupart des tumeurs solides et jouent un rôle important dans la cancérogenèse et dans l'angiogenèse tumorale. Selon les données de la littérature, PPAR β augmente l'expression du VEGF dans les cellules endothéliales, alors que PPAR α et PPAR γ augmentent ou diminuent l'expression du VEGF selon le modèle cellulaire (cf Introduction, II.6.). Peu d'études ont décrit le rôle des PPAR dans le cancer humain de la vessie, bien que l'urothélium normal ou tumoral exprime les trois isotypes.

Dans une précédente étude (Fauconnet *et al.*, 2002), notre équipe a montré que le VEGF était régulé de façon différentielle par les PPAR dans des lignées cellulaires dérivées de cancer de la vessie : la lignée RT4 issue d'un carcinome urothélial papillaire récidivant de grade I, représentative d'une tumeur non agressive et la lignée T24, établie à partir d'un carcinome urothélial indifférencié de grade III, représentative d'une tumeur agressive à haut potentiel métastatique.

Cette étude a montré, suite à une analyse par northern-blotting, que l'activation des trois isotypes de PPAR augmentait l'expression des différents transcrits du VEGF dans les cellules RT4 alors que seul l'isotype β augmentait son expression dans les cellules T24 (cf. Figure 18). Dans cette expérience, l'hybridation de la sonde VEGF permet de détecter trois bandes de 5,2 4,5 et 1,7 kb, correspondant à différents transcrits alternatifs du VEGF.

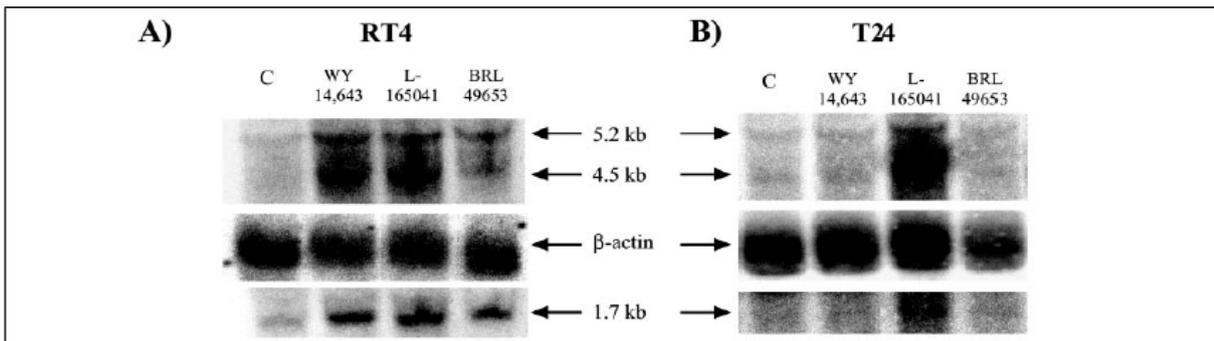


Figure 18 : Etude par northern-blotting de l'induction du VEGF par des ligands synthétiques de PPAR dans les lignées RT4 et T24 (Fauconnet *et al.*, 2002)

De plus, par une technique de Southern-blotting, il a été montré que les isoformes 121, 165 et 189 sont exprimées dans les cellules RT4 et T24 ((Chabannes *et al.*, 2001), article 1). C'est pourquoi, en utilisant une technique de RT-PCR en temps réel, nous avons étudié quels étaient les niveaux d'expression des différents transcrits du VEGF suite à l'activation des PPAR. Cette technique de RT-PCR en temps réel utilise trois couples d'amorces spécifiques des ARNm des VEGF121, 165 et 189 et une sonde taqman commune, et permet de quantifier le taux d'expression de chacune des isoformes du VEGF.

Les résultats de cette étude montrent que dans les cellules RT4 et T24, le VEGF121 est la forme majoritaire (60 %) (cf. Figure 19), que le VEGF165 est moins exprimé (30 %), et que le VEGF189 est la forme minoritaire (10 %). Dans les cellules RT4, le WY14,643 (ligand de PPAR α), le L-165041 (ligand de PPAR β) et la rosiglitazone (ou BRL 49653, ligand de PPAR γ) augmentent l'expression des isoformes 121, 165 et 189 du VEGF. En revanche, dans les cellules T24, seul le L-165041 augmente l'expression des trois isoformes du VEGF. L'expression du VEGF est augmentée de façon différente selon le ligand et la dose utilisée.

Dans les cellules RT4, le ligand de PPAR β augmente l'expression des VEGF121 et 165 à partir de 10 μ M, avec une augmentation maximale d'un facteur 6,5 pour une concentration de 25 μ M. Par contre, seule une concentration de 25 μ M de ce ligand augmente l'expression du VEGF189. Le ligand de PPAR α augmente l'expression du VEGF121 d'un facteur 4 pour des concentrations de 25 et 50 μ M, alors que dès une concentration de 5 μ M le VEGF165 est augmenté d'un facteur 2,5 et que le VEGF189 est très faiblement augmenté.

Le ligand de PPAR γ augmente dès 5 μ M l'expression du VEGF121, avec une augmentation maximale d'un facteur 3 pour une concentration de 20 μ M alors que l'expression du VEGF 165 est augmentée dès 1 μ M, et l'augmentation est maximale pour une concentration de 20 μ M, De même, le VEGF189 est très faiblement augmenté.

Dans les cellules T24, les ligands de PPAR α et γ ne modifient pas le taux d'expression des trois isoformes du VEGF quelle que soit la dose utilisée. Par contre, le ligand de PPAR β augmente l'expression des trois isoformes du VEGF. En effet, l'expression des VEGF121 et 165 est augmentées à partir de 2 μ M de ligand et l'augmentation maximale, d'un facteur 15 pour le VEGF121 et d'un facteur 20 pour le VEGF165 est observée avec une concentration de 25 μ M. Par contre, le taux d'expression du VEGF189 bien qu'augmenté reste très inférieure à celui des deux autres isoformes.

Nous montrons que, dans les cellules RT4, les ligands de PPAR augmentent préférentiellement les VEGF121 et 165 comparativement au VEGF189. Ce qui revient à dire que les ligands de PPAR régulent préférentiellement les formes solubles, formes qui sont le plus rapidement disponibles pour l'activation de l'angiogenèse.

Les résultats de RT-PCR en temps réel confirment que dans les cellules RT4 les ligands de PPAR α , β et γ , augmentent l'expression des trois isoformes du VEGF alors que dans les cellules T24, seul le ligand de PPAR β , augmente l'expression des trois isoformes du VEGF.

Les cellules utilisées dans cette étude, RT4 et T24, possèdent deux phénotypes différents. En effet, les cellules RT4 sont représentatives d'une tumeur superficielle bien différenciée et de bon pronostic puisqu'elle possède le gène h-ras et p53 sauvage et qu'elle exprime le marqueur épithélial cadhérine E. Par contre, les cellules T24 sont représentatives d'une tumeur invasive indifférenciée de mauvais pronostic puisqu'elles possèdent le gène h-ras et p53 muté et expriment le marqueur mésenchymateux cadhérine N.

Ces résultats suggèrent que l'expression du VEGF serait régulée de façon différente par les PPAR selon le potentiel d'agressivité des tumeurs urothéliales, puisque les PPAR augmenteraient l'expression du VEGF dans les formes superficielles et n'auraient pas d'effet – *pour les PPAR α et γ* – dans les formes invasives.

Les ligands de PPAR sont donc des molécules angiogéniques puisqu'ils régulent l'expression du VEGF. Il nous semble donc important de poser la question de la valeur pronostique du VEGF dans les tumeurs de vessie.

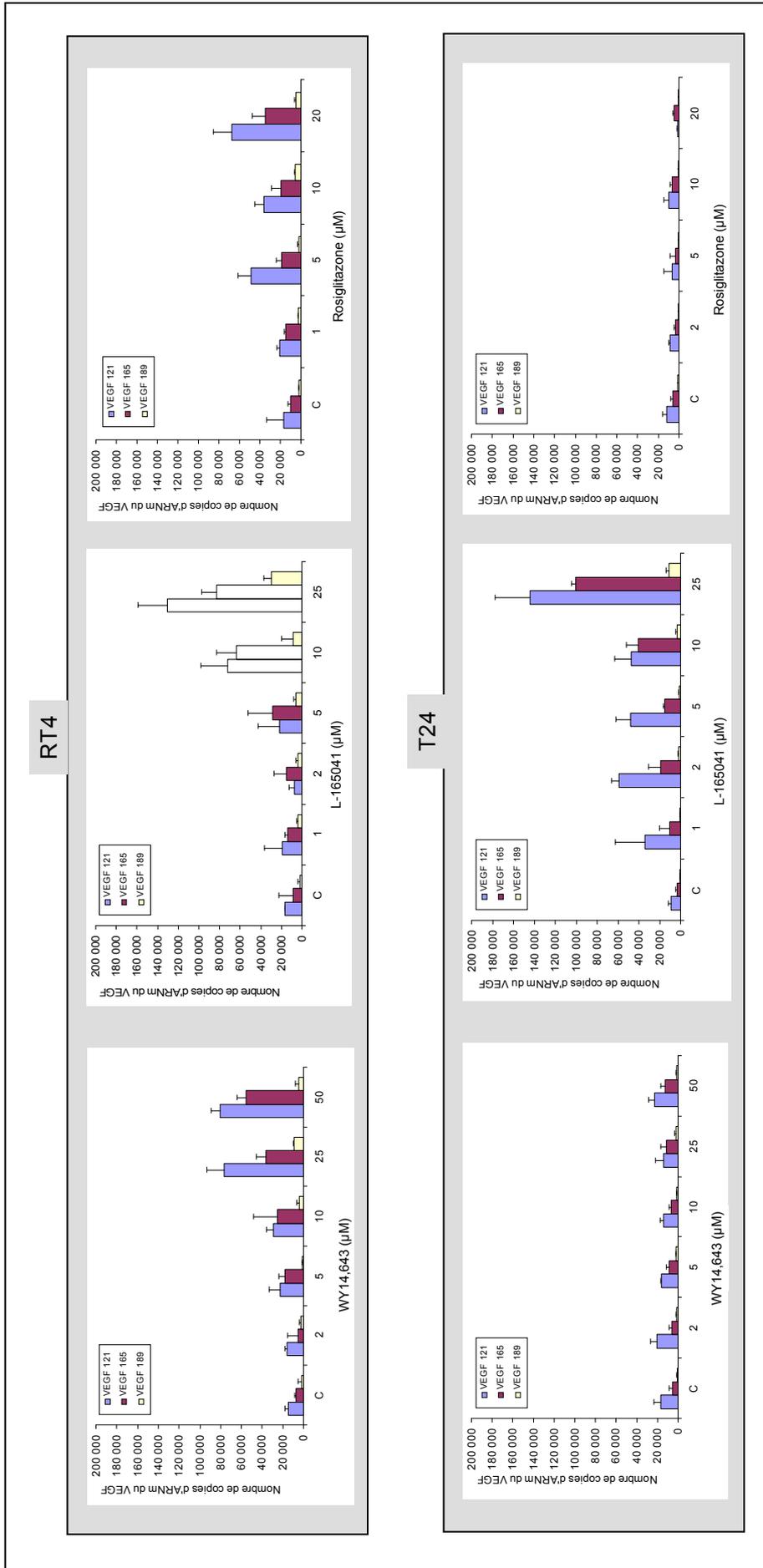


Figure 19 : Etude par RTqPCR de l'induction de l'expression des isoformes 121, 165 et 189 du VEGF par les ligands spécifiques de PPAR dans les cellules RT4 et T24

Les cellules ont été incubées dans du milieu Mc COY's 5a dépourvu de sérum puis stimulées ou non (cellules témoins) en présence de WY14,643, de L-165041 ou de Rosiglitazone aux concentrations indiquées. L'expression des ARNm des isoformes 121, 165 et 189 du VEGF a été analysée par RT-PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ATP5β. Le facteur d'induction de chaque échantillon a été calculé par rapport à l'échantillon témoin grâce à la méthode de comparaison des CT décrite par Pfaffl (Pfaffl, 2001) (cf Materials and methods, article 1). En parallèle, à partir d'une série de dilutions d'un plasmide, de concentration connue, contenant l'ADNc du VEGF121, nous avons obtenu la droite d'étalonnage du CT en fonction du log (nombre de copies d'ADNc du VEGF121). Grâce à l'équation de cette droite d'étalonnage, nous avons ensuite calculé le nombre de copies par µl d'ADNc des trois isoformes de chaque échantillon témoin, puis nous avons multiplié le facteur d'induction de chaque échantillon par la concentration de l'échantillon témoin correspondant. Ainsi, nous connaissons la concentration en nombre de copies d'ARNm du VEGF par µl d'ADNc pour chaque échantillon. Ces expériences sont représentatives de trois expériences réalisées sur trois déterminations.

Dans le cancer de la vessie, le VEGF serait un facteur de récurrence et de progression des tumeurs superficielles pT1. Cependant selon les auteurs, soit l'expression du VEGF est plus importante dans les tumeurs superficielles (pTa, pT1) comparativement aux tumeurs invasives (pT2-pT4), soit l'expression du VEGF est plus importante dans les tumeurs invasives que dans les tumeurs superficielles. C'est pourquoi, dans la suite de notre travail, nous avons étudié l'expression du VEGF et du VEGF-B en fonction des critères histopathologiques.

II. Expression des VEGF-A et -B dans des tumeurs de la vessie (Article 1)

Dans le cancer de la vessie, l'angiogenèse tumorale joue un rôle essentiel dans la progression de la maladie et l'acquisition du potentiel métastatique. A l'heure actuelle, le rôle du VEGF (VEGF-A) dans l'angiogenèse a été largement étudié, cependant celui d'un autre isotype du VEGF, le VEGF-B est moins bien connu. Le VEGF-B est capable de se fixer et d'activer le récepteur VEGFR-1 donc possède des activités angiogéniques. Le VEGF-B est exprimé dans les carcinomes du sein, les mélanomes et les fibrosarcomes (Gunningham *et al.*, 2001 ; Mylona *et al.*, 2007 ; Salven *et al.*, 1998) mais à notre connaissance aucune étude n'a décrit l'expression du VEGF-B dans les cancers de la vessie.

Selon les données de la littérature, l'expression du VEGF (VEGF-A) augmente dans les tumeurs urothéliales comparativement à l'urothélium normal. Par contre, les études comparant l'expression du VEGF dans les tumeurs superficielles (pTa et pT1) et les tumeurs invasives (\geq pT2) sont contradictoires. En effet, O'Brien montre par RNase protection que le *vegf* est plus exprimé dans les tumeurs pT1 comparativement aux tumeurs invasives (\geq pT2) (O'Brien *et al.*, 1995). Pignot obtient des résultats similaires par RTqPCR en montrant que les tumeurs superficielles (pTa et pT1) expriment plus de *vegf* que les tumeurs invasives (\geq pT2) (Pignot *et al.*, 2008), alors que Sato montre par northern-blotting que les tumeurs invasives expriment plus de VEGF que les tumeurs superficielles (Sato *et al.*, 1998).

Pour déterminer la valeur pronostique du VEGF, nous avons analysé l'expression des VEGF-A et -B à partir d'ARN extraits d'échantillons tumoraux de différents stades et grades.

Notre étude a porté sur 37 échantillons de tumeurs de vessie dont 15 sont de stade pTa, 7 de stade pT1 et 15 de stade pT2-T4. Après détermination anatomo-pathologique du grade tumoral, 9 sont de grade 1 (7 pTa, 1 pT1, 1 pT2-T4), 13 de grade 2 (7 pTa, 3 pT1, 3 pT2-T4) et 15 de grade 3 (1 pTa, 3 pT1, 11 pT2-T4).

L'analyse par northern-blotting montre que l'ARNm du *vegf-B* n'est exprimé ni dans l'urothélium normal ni dans les tumeurs vésicales. En revanche, trois transcrits du VEGF (VEGF-A) de taille 5,2, 4,5 et 1,7 kb ont été détectés. Les taux des trois transcrits sont plus élevés dans les échantillons tumoraux comparativement au tissu sain. L'analyse statistique montre que le taux des trois transcrits du VEGF est significativement plus élevé dans les tumeurs pT2-T4 par rapport aux tumeurs pTa et pT1, suggérant que l'expression du VEGF est corrélée à un stade tumoral élevé.

De plus, cette étude révèle que seule l'augmentation des transcrits de 5,2 et 1,7 kb est corrélée au grade tumoral et à la présence d'un carcinome *in situ*.

Le taux de transcrit de 5,2 kb (ou 4,5 ou 1,7 kb) d'une valeur supérieure au taux moyen d'expression de ce transcrit apparaît comme un facteur de mauvais pronostic. C'est-à-dire que les tumeurs qui ont progressé au cours du suivi des patients surexpriment plus de transcrits de 5,2 kb (4,5 et 1,7 kb) comparativement à celles qui n'ont pas progressé.

Donc, nous montrons que le taux des différents transcrits du *veg*f a une valeur pronostique de progression des tumeurs urothéliales. Néanmoins, la technique de northern-blotting ne permet pas d'attribuer à un transcrit donné une isoforme donnée. En effet, l'ARNm du VEGF subit un épissage alternatif qui conduit à la synthèse de différentes isoformes (cf. III.3.1.1) Dans notre étude, trois isoformes du VEGF-A ont été détectées par southern-blotting : les VEGF121, 165 et 189. Cependant, cette méthode n'est pas quantitative. C'est pourquoi, pour évaluer la valeur pronostique des différentes isoformes nous avons quantifié le taux d'expression de chacune des isoformes par une technique de RT-PCR quantitative. Ainsi, le taux d'expression des VEGF121, 165 et 189 a été évalué à partir d'ARN extraits d'échantillons tumoraux provenant d'une cohorte récente de 20 patients (8 pTa, 7 pT1, 7 pT2).

Les VEGF121 et 165 sont exprimés à des taux similaires, alors que le VEGF189 est minoritaire. L'analyse statistique des taux d'expression des trois isoformes du VEGF en fonction du stade tumoral montre que :

- Le taux de VEGF121 est plus élevé dans les tumeurs pT1 et pT2 comparativement aux tumeurs pTa.
- Le taux d'ARNm du VEGF165 est plus élevé dans les tumeurs pT2 comparativement aux tumeurs pTa et pT1.
- Il n'y a pas de différence du taux de VEGF165 entre les tumeurs pTa et pT1.
- Le taux de VEGF189 est significativement plus élevé uniquement dans les tumeurs pT2 comparativement aux tumeurs pTa.

L'analyse statistique en fonction du grade montre que :

- Le VEGF121 est significativement plus exprimé dans les tumeurs de grade 3 par rapport aux tumeurs de grade 1.
- Le VEGF165 est significativement plus élevé dans les tumeurs de grade 3 comparativement aux tumeurs de grade 1 et de grade 2.

- Le taux de VEGF189 n'est pas corrélé au grade tumoral.

Les trois isoformes sont ainsi significativement plus exprimées dans les tumeurs pT1 et pT2 par rapport aux tumeurs pTa.

Globalement, le VEGF total (analysé par northern blotting ou RT-PCR en temps réel) est plus exprimé dans les tumeurs infiltrant le muscle profond (pT2) ou le chorion (pT1) comparativement aux tumeurs superficielles pTa.

Pour conclure, nous avons montré que le VEGF-B n'est exprimé ni dans la vessie saine ni dans les tumeurs urothéliales. Cette isoforme ne semble pas impliquée dans la cancérogenèse épithéliale. En revanche, nous avons montré que l'expression du VEGF (VEGF-A) pourrait être un marqueur diagnostique de progression du cancer vésical.

Article 1

**Expression analysis of vascular endothelial growth factor A
and B and their relationship with clinicopathologic
parameters in bladder cancer.**

FAUCONNET S, BERNARDINI S, LASCOMBE I, **BOITEUX G**, CLAIROTTE A,
MONNIEN F, CHABANNES E, BITTARD H.

Accepté définitivement le 4 décembre 2008, pour publication

dans Oncology Report

Expression analysis of VEGF-A and VEGF-B and their relationship with clinicopathologic parameters in bladder cancer

SYLVIE FAUCONNET^{1,2}, STEPHANE BERNARDINI², ISABELLE LASCOMBE¹, GUILLAUME BOITEUX¹, ANNE CLAIROTTE³, FRANK MONNIEN³, ERIC CHABANNES² and HUGUES BITTARD²

S. Fauconnet and S. Bernardini contributed equally to this article.

¹Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, EA 3181 – IBCT - IFR N°133, Université de Franche – Comté, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 19 rue Ambroise Paré, 25041 Besançon Cedex 3, France.

²Service d'Urologie et d'Andrologie, CHU de Besançon, Hôpital St Jacques, 2 place St Jacques, 25000 Besançon, France.

³Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU de Besançon, Hôpital Jean Minjoz, 3 boulevard Fleming, 25000 Besançon, France.

Correspondence to: Dr. Sylvie Fauconnet

EA3181 – IBCT – IFR N°133, Université de Franche – Comté, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 19 rue Ambroise Paré, 25041 Besançon Cedex 3, France.

Tel: 00 33 3 63 08 22 28 ; Fax: 00 33 3 81 52 64 80.

E-mail: sylvie.fauconnet@univ-fcomte.fr

Key words : bladder cancer, prognostic marker, VEGF-A, VEGF-B, isoforms, mRNA

Running title : VEGF-A and VEGF-B in bladder cancer

Abstract

The present investigation was conducted first to determine whether correlation exists between VEGF-A and -B mRNA levels and clinicopathologic parameters and to assess their prognostic value in bladder cancer, then to clarify the expression level and biological significance of VEGF-A isoforms. Total RNA was isolated from 37 specimens of bladder cancer. Northern-blotting analysis revealed that VEGF-B mRNA was expressed neither in normal urothelium nor in bladder cancer and detected three VEGF-A transcripts of 5.2, 4.5 and 1.7 kb in length respectively. The VEGF-A transcripts levels were greater in cancer tissues than in normal urothelium. They were significantly higher in pT2-T4 than in pTa and pT1 urothelial tumors and thus, were correlated to the pathologic stage. Contrary to the 4.5 kb transcript, elevated expression of the 5.2 and 1.7 kb transcripts was correlated with the histologic grade and the presence of carcinoma *in situ*. Patients with higher VEGF-A mRNA levels had a significantly shorter survival without progression compared to those with lower levels. Three VEGF-A splice variants were detected by southern-blotting namely, VEGF121, 165 and 189. The expression intensity of each isoform was evaluated by quantitative real time RT-PCR in 20 new fresh frozen recent tumors. VEGF121 and VEGF165 were expressed at the similar level. On the contrary, they were significantly more expressed than VEGF189 ($p < 0.05$). The three isoforms were higher expressed in pT2 bladder cancers than in pTa tumors ($p < 0.05$). There was only a significant correlation between the increased expression level of VEGF121 and 165 and the histological grade of the lesion ($p < 0.05$). To conclude, VEGF-A mRNA level could serve as a prognostic indicator of progression in bladder cancer as well as the expression level of the different VEGF-A splice variants.

Introduction

Urothelial carcinoma is the most common solid malignancy of the bladder. Eighty percent of all newly diagnosed cases are non-invasive and stroma-invasive tumors confined to the urothelium (pTa) or the lamina propria (pT1) respectively and the other 20% are muscle-invasive carcinomas (\geq pT2). More than 60% of pTa tumors will recur at least once and progress to infiltrating or less differentiated neoplasms in 5% to 10% of cases (1). The recurrence rate of pT1 bladder tumors is high (80%) after transurethral resection (TUR) (2) and 40% of them will progress to a poorer prognosis muscle-invasive disease and are therefore potentially lethal (3). Muscle invasive tumors have a poorer prognosis (4) since 50% of these patients will relapse with metastatic disease within 2 years of treatment (5). Since the clinical outcome of stroma-invasive (pT1) bladder tumors is relatively unpredictable, search for novel prognostic factors that could give information independent of classical predictors to improve the biological assessment of the pT1 tumors could be of great clinical value for taking charge of the patients.

Tumor vascularization plays a fundamental role in neoplastic processes and is essential for tumor progression and metastatic spread of solid tumors. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF or VEGF-A) is considered to be one of the most important angiogenic regulator in tumor angiogenesis (6).

To date, several different isoforms have been isolated resulting from an alternative splicing of VEGF-A mRNA between exons 5 and 8 (7), namely two larger variants, VEGF189 and VEGF206 and smaller forms, VEGF121, VEGF145 and VEGF165.

The isoform 145 of VEGF-A is observed preferentially in carcinomas of the female reproductive system (8). Each isoform is predicted to have a characteristic extracellular localization based on biochemical differences. The larger isoforms bind neuropilin, matrix,

and cell surface heparin proteoglycans, and are thought to act locally. The smaller isoforms do not display the heparin proteoglycan binding region and may diffuse to sites distant from the site of synthesis (9). The most frequent isoform is VEGF165 which is expressed in most tissues (10) and although it is a diffusible protein, a significant fraction remains cell and extracellular-matrix associated (11). There are data in the literature concerning the detection of a less frequent spliced form VEGF183 (12).

Several VEGF-related genes, including VEGF-B (13) have also been isolated. VEGF-B is expressed as two isoforms produced by alternative splicing both of which are very similar to VEGF165 (13, 14). VEGF binds to high affinity tyrosine kinase receptors, VEGFR-1/Flt1 and VEGFR-2/KDR (12) whereas VEGF-B can compete with VEGF-A only for binding to VEGFR-1 (15).

At present the role of VEGF-B has not been completely clarified. VEGF-B is a weak mitogen for endothelial cells (13). Most importantly, nothing is known about its expression in bladder cancer.

On the contrary, several reports described increased expression of VEGF-A in bladder cancer tissue, compared with normal urothelium (16, 17), as well as in biological fluids (serum and urine) of patients with bladder cancer. Nevertheless, conflicting studies have questioned the prognostic value of VEGF-A within the tumor. O'Brien et al. (17) reported that an average expression level of the *vegf-A* gene in non-invasive (pTa and pT1) tumors was higher than in invasive tumors and in normal tissue while Sato et al. (18) study demonstrated that invasive TCC expressed more *vegf-A* gene than non-invasive TCC.

The aim of the present investigation was 1) to examine the expression of VEGF-A and VEGF-B mRNA in bladder cancer by northern-blotting and to analyse the correlation between both VEGF subtypes expression pattern and the clinicopathologic criteria of the disease, 2) to quantify by real time RT-PCR the expression of VEGF-A isoforms in bladder

tumors, and to study their relative expression and their relationship with pathologic stage and histologic grade.

Materials and methods

Patients and sample collection. Bladder tumor samples from transurethral resection (TUR) or cystectomy specimens were obtained from two cohort of patients. Thus, VEGF-A and -B expression was evaluated by Northern-blotting in 37 cases with TCC of the bladder who underwent TUR of a primary bladder tumor between December 1996 and December 1999. VEGF-A isoform transcript levels were determined by real time RT-PCR analysis in an independent tumor set of 20 new fresh frozen specimens. Informed consent was obtained from all patients. Total resected tissue specimens were supplied by the Department of Urology (University Hospital, Besançon, France). A part was collected for histopathologic evaluation and the remainder was immediately frozen in liquid nitrogen for total RNA extraction. The rapid freezing of bladder tumor samples immediately after TUR in liquid nitrogen is a favourable process to abolish hypoxia, which is known to increase VEGF-A expression. This avoids to overestimate the expression of this growth factor. Specimens of 5 normal bladder mucosa were obtained from bladder biopsies taken from benign prostatic hyperplasias patients who underwent transurethral surgeries. Histology features, grade, stage and presence of carcinoma *in situ* (CIS) were determined by pathologic examination of the TUR specimens. We assigned the bladder tumors a grade according to the WHO classification. The depth of invasion was recorded according to the 1997 tumor-node-metastasis (TNM) staging system guidelines. In all cases, muscularis propria was available for evaluation. Of the 37 patients for the northern-blotting analysis, 22 had non-invasive and stroma-invasive urothelial tumors (15 pTa, 7 pT1) and 15 had muscle-invasive carcinomas (pT2-T4). Nine patients had grade 1 tumor (7 pTa, 1 pT1, 1 pT2-T4), 13 grade 2 tumor (7 pTa, 3 pT1, 3 pT2-T4) and 15 grade 3 tumor (1 pTa, 3 pT1, 11 pT2-T4). Ten patients presented also a carcinoma *in situ*. The median patient follow-up was 20 months (range, 6-60

months). Within the cohort of 20 patients used for the real time RTqPCR analysis, 15 had non-invasive and stroma-invasive urothelial tumors (8 pTa, 7 pT1) and 5 had muscle-invasive carcinomas (pT2). Seven patients had grade 1 tumor (pTa), 4 grade 2 tumor (1 pTa, 3 pT1) and 9 grade 3 tumor (4 pT1, 5 pT2).

Cell line and culture conditions. RT4 and T24 bladder cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Biovalley, Conches, France). RT4 and T24 cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in phenol red-free Mc COY's 5a medium. Media were supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 1% antibiotic antimycotic mixture (10 mg/ml streptomycin, 10,000 U/ml penicillin, 25 µg/ml amphotericin B) (Sigma, St Quentin Fallavier, France), 2 mM Glutamine and 15 mM HEPES (Invitrogen). Cell lines were tested for the absence of mycoplasma before RNA extraction.

Northern-blotting. The commercially available kit RNeasy (Qiagen, Courtaboeuf, France) was used according to the manufacturer's guidelines for RNA isolation from bladder tumor specimens and from normal bladder mucosa. Total RNA (30µg) was size-fractionated by electrophoresis on a 1.2% agarose gel and transferred to a nylon membrane (Zeta-Probe GT Genomic, BioRad) using vacuum blotting system. The filters were prehybridized for 5 min at 42°C in a solution containing 50% formamide, 0.25 M NaCl, 7% SDS, 0.12 M Na₂HPO₄ (pH=7.2). The hybridizations were performed for 48 h in the same solution at 42°C with the VEGF-A (19) or VEGF-B (20) cDNA probe labelled with [α -³²P]-dCTP (NEN Life Science) using the random hexamer labelling method (Prime-a-gene Labelling System, Promega). After a rapid wash in 2 SSC solution at room temperature, two washes were performed for 15 min at room temperature in 2 SSC, 0.1% SDS and 0.5 SSC, 0.1% SDS, respectively. The final

wash was performed for 15 min at 55°C in 0.1 SSC, 0.1% SDS. Blots were stripped (0.1% SSC ; 0.5% SDS) between each hybridization. Total RNA samples on each blot have been adjusted to obtain a consistent signal for a housekeeping gene across all lanes. Equal loading of total RNA on the blots was checked by probing with the respective mouse β -actin probe (1200 bp) labelled with [α -³²P]-dCTP to normalize the experiments. The same blot was hybridized with VEGF-A or VEGF-B or mouse β -actin probes. For each probe, blots were exposed at the same time and thus could be compared among themselves. The VEGF-A, VEGF-B, and β -actin mRNA were quantified using PhosphoImager analysis (Molecular Imager^R System, GS-505, Biorad).

Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Southern-blotting for VEGF-A isoform detection. RT4 and T24 cells were seeded in 12 or 6-well plates at a concentration of 8×10^5 or 4×10^5 cells per well respectively in Mc COY's 5a medium supplemented with 5% FCS. Confluent cells were incubated in serum-free Mc COY's 5a medium for 24 h. After this period, total RNA was isolated using the commercially available kit TRI Reagent (Molecular Research Center, Euromedex, Souffelwyersheim, France) according to the manufacturer's recommendations. The commercially available kit RNeasy (Qiagen) was used according to the manufacturer's guidelines for RNA isolation from bladder tumor specimens and from normal bladder mucosa. Contaminating genomic DNA was removed with a RNase-free DNase I treatment (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (5 μ g) was then reverse-transcribed with a random hexamer as a primer and 50 U of MMLV RT (Promega, Lyon, France) for 1 h at 37°C and amplified by PCR with VEGF-A-specific primers, upstream (5'-CACATAGGAGAGATGAGCTTC-3') and downstream (5'-CACCGCCTCGGCTTGTCACAT-3') localized on exons 4 and 8, respectively. After 30 cycles (1 min at 95°C, 1 min at 62°C, and 2 min at 72°C), 6 μ l of the

PCR products were electrophoresed through a 2% agarose gel (MetaPhor, Tebu, Le Perray en Yvelines, France) for 5 h at 100 V and transferred to a nylon membrane (Zeta-Probe GT Genomic, BioRad, Marnes-la-Coquette, France), which was subsequently hybridized with a [α - 32 P]-dCTP (NEN Life Science, Paris, France)-labelled cDNA VEGF-A probe (19). Probes were prepared by the random-hexamer labelling method (Prime-a-gene Labelling System, Promega) according to the manufacturer's protocol. Filters were analysed using a PhosphoImager (Molecular Imager System, GS-505, BioRad).

TaqMan RT-PCR assay. The real-time PCR assays were carried using a LightCycler 1.0 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) with Taqman technology in 20 μ l of a reaction mixture containing 1x LightCycler Fast Start DNA Master HybProbe (Roche diagnostics) and 5 μ l of cDNA diluted 1:20. *ATP5 β* (ATP synthase β polypeptide) RTqPCR was carried out with 4 mM MgCl₂, 500 nM of each primer and 300 nM of probe. The following oligonucleotide primers and probe were used for PCR amplification of *ATP5 β* : *ATP5 β* forward: 5'-TACTGTCGCGTGCCATTGCT-3', *ATP5 β* reverse: 5'-CACGGGCAACATCGTAATGC-3', *ATP5 β* probe (5'Fam, 3'BHQ1) 5'-ATCCCAACATTGTTGGCAGT-3'. Samples were heated for 10 min at 95°C and subjected to 40 cycles of amplification (denaturation at 95°C for 10 s, annealing and elongation at 60°C for 20 s). Amplifications of cDNA encoding *vegfa* transcripts were performed using 2 μ l of reverse-transcribed mixture. To reach high conformity of the PCR kinetics for the VEGF-A splice variants, a common forward primer *ex3fo* (5'-CCCTGATGAGATCGAGTACATCTT-3') located in exon 3 was designed. Amplification of each splice variant was performed exclusively with specific reverse primers spanning the variant exon boundaries: *ex5/8re*: 5'-ACCGCCTCGGCTTGTCAC-3' for VEGF121, spanning the boundaries of exons 5 and 8 ; *ex5/7re*: 5'-AACGCTCCAGGACTTATACCG-3' for VEGF165, spanning the boundaries of

exons 5 and 7 ; *ex 6re*: 5'- AGCAAGGCCACAGGGATTT-3' for VEGF189, located in exon 6. Quantification of the mRNA encoding for different VEGF-A isoforms was performed using the specific fluorescent hydrolyzation probe (5'- ATCCTGTGTGCCCTGATGCGATGCGGT-3'). Quantitative PCR was performed in a total volume of 20 µl containing 0.25 µM of each oligonucleotide primer, 0.1 µM of specific probe and 2 µl of cDNA according to the QuantiTect® probe PCR kit procedure (Qiagen). The cycling parameters were 95°C for 15 min and then 60 cycles of denaturation at 95°C for 8 s, annealing at 68°C for 12 s and extension at 72°C for 20 s. A sequence detection program calculated a threshold cycle number (CT) at which the probe cleavage-generated fluorescence exceeded the background signal (21).

Measurement of relative RNA expression level. We calculated the relative RNA expression level using a comparative CT method (21). Identified as the best normalization gene in human bladder cancer (22), ATP5β was used for the reference gene. The normalized relative expression level of a target gene in an individual sample was calculated using the following formula:

$$\frac{\left(E_{\text{target}}\right)^{\text{ACT target (calibrator - sample)}}}{\left(E_{\text{reference}}\right)^{\text{ACT reference (calibrator - sample)}}$$

in which the real-time PCR efficiency of the target gene transcript is denoted by E_{target} and that of the reference gene transcript, by $E_{\text{reference}}$ (21). Thus, the relative RNA expression level of a gene is a unitless number relative to that of the calibrator sample.

Statistical analysis. Data are presented as mean ± SEM. Differences in total VEGF-A mRNA and VEGF-A isoform transcript expression levels according to the patient and cancer characteristics were assessed by the non parametric Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis

tests. Survival without progression was studied on the entire group of cases (pTa, pT1, pT2-T4 tumors). According to patient and cancer characteristics, curves were built and compared using the Kaplan-Meier procedure and the log-rank test. To determine the major isoform expressed in bladder tumors, comparison of means on three repeated values from 20 patients were assessed by the non parametric Friedmann and Wilcoxon tests for paired series. A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

VEGF-A and VEGF-B mRNA expression in TCC of the bladder and correlation with the pathologic stage. Northern-blotting analysis revealed three VEGF-A transcripts of 5.2, 4.5 and 1.7 kb respectively in all samples studied. Fig. 1 is representative of the results obtained with the normal urothelium and with one specimen of each TNM stage. Table I summarizes the results of VEGF-A transcripts expression in pTa, pT1 and pT2-T4 bladder lesions. The level of VEGF-A mRNA expression was higher in bladder tumors compared with the normal urothelium. The 5.2, 4.5 and 1.7 kb VEGF-A transcripts levels were compared according to the TNM stage. The statistical analysis revealed that no significant difference was observed between pTa and pT1 tumors for the three transcripts ($p=0.38$ for 5.2 kb transcript ; $p=0.94$ for 4.5 kb transcript ; $p=0.12$ for 1.7 kb transcript). On the other hand, the difference was statistically significant between pTa and pT2-T4 tumors ($p=0.0006$ for the 5.2 kb transcript, $p=0.007$ for the 4.5 kb transcript, and $p=0.002$ for the 1.7 kb transcript). In the same way, the difference was statistically significant between pT1 and pT2-T4 tumors for the three transcripts ($p=0.015$ for the 5.2 kb transcript ; $p<0.05$ for the 4.5 kb transcript ; $p=0.004$ for the 1.7 kb transcript).

The expression pattern of VEGF-B was completely different. Indeed, VEGF-B mRNA was not expressed. It was detected neither in normal urothelium nor in bladder cancer tissue. Overall, our results indicate that the expression level of VEGF-A mRNA is higher in invasive bladder carcinomas. On the contrary, within superficial tumors, VEGF-A mRNA level did not discriminate tumors invading the lamina propria.

Correlation between the expression of the VEGF-A transcripts and the histologic grade of the TCC of the bladder. The comparison of the VEGF-A transcripts expression according to the

grade (Table I) revealed that for the 5.2 kb transcript, the difference was statistically significant between grade 1 and grade 2 ($p=0.04$), between grade 1 and grade 3 ($p=0.01$), and between grade 2 and grade 3 ($p<0.05$). For the 1.7 kb transcript, the difference was only statistically significant between grade 1 and grade 3 ($p=0.02$). No significant difference was observed between grade 1 and grade 2 ($p=0.28$) and between grade 2 and grade 3 ($p=0.13$) for this transcript. For the 4.5 kb transcript, the expression level was not associated to tumor grade ($p=0.29$).

Correlation between the expression of the VEGF-A transcripts and the presence of carcinoma in situ. Unlike the 4.5 kb transcript, the 5.2 and 1.7 kb transcripts were correlated with associated carcinoma *in situ* ($p=0.14$, $p=0.002$ and $p=0.007$ respectively) (Table I).

Relationship between VEGF-A mRNA level and progression-free survival. The progression-free survival analysis has been performed on the entire group of 37 patients without distinguishing non-invasive and stroma-invasive urothelial tumors and muscle-invasive carcinomas. The purpose was to determine whether the evaluation of VEGF-A mRNA expression in the tumor could predict the tumor progression and the patient outcome. Thus, within the entire group of cases, the mean value of VEGF-A was 0.031 for the 5.2 kb transcript, 0.039 for the 4.5 kb transcript and 0.037 for the 1.7 kb transcript. Patients were therefore classified into two groups (high VEGF-A expression group and low VEGF-A expression group) based on a cutoff value corresponding to the mean value of VEGF-A calculated for each transcript. The progression-free survival curves for patients with high or low VEGF-A transcripts levels are shown in Fig. 2. There was evidence that survival without progression was shortened in patients with a VEGF-A mRNA level higher than the cutoff value previously defined (0.031 for the 5.2 kb transcript, 0.039 for the 4.5 kb transcript, and

0.037 for the 1.7 kb transcript) ($p=0.03$, $p=0.006$ and $p=0.04$ respectively) compared with patients expressing lower VEGF-A mRNA levels than this cutoff value. The progression-free survival analysis revealed that after a follow-up of 25 months, the overexpression of the 5.2 and 1.7 kb transcripts led to the progression of the disease in 62% and 60% of cases respectively. In return, the overexpression of the 4.5 kb transcript led to the progression of the disease in 80% of cases.

VEGF-A isoforms expression in urothelial tumors and bladder cancer cell lines. As demonstrated above, the different VEGF-A transcripts have a prognostic value. Thus, we analysed the VEGF-A isoform expression pattern. As shown in Fig. 3, RT-PCR assay followed by a Southern-blotting analysis revealed three bands with 303, 234 and 99 bp in size corresponding respectively to VEGF189, VEGF165 and VEGF121 in pT1 and pT2 bladder tumors and in RT4 and T24 bladder cancer cell lines. RT4 cells are derived from a well differentiated grade 1 papillary tumor and T24 cells are derived from an undifferentiated grade 3 carcinoma. These isoforms were also observed in normal urothelium and in pTa tumors (data not shown) whereas VEGF206 expression was absent in all cases. Results obtained from RT4 cells confirmed those previously observed (23). These data revealed the existence of three VEGF-A isoforms (121, 165 and 189) in bladder cancer. Nevertheless, the southern-blotting is not a quantitative method. That is why we used the real time RT-PCR, a highly sensitive and accurate technique, to really quantify each isoform in the following experiments.

Quantitative analysis of the different VEGF-A isoform expression in non-invasive and invasive bladder cancer samples using RTqPCR. We examined VEGF-A isoform transcript levels in 8 pTa, 7 pT1 and 5 pT2 tumors by real-time RT-PCR. VEGF121 and VEGF165

were expressed at the similar level. On the contrary, both isoforms were significantly more expressed than VEGF189 (Friedmann and Wilcoxon tests; $p < 0.001$). VEGF121, VEGF165 and VEGF189 were higher expressed in pT1 or pT2 bladder cancers than in pTa tumors ($p = 0.003$, $p = 0.017$, $p = 0.025$ respectively (Fig.4).

Correlation between VEGF-A isoform expression level and clinicopathological features. We evaluated the possible correlation between the expression pattern of VEGF-A splice variants and the pathological stage and the histological grade (Fig. 5). The variance among the three subgroups of patients with different tumor stage lesions was significant (Kruskal – Wallis test; $p = 0.006$ for VEGF121, $p = 0.011$ for VEGF165, $p = 0.019$ for VEGF189). Paired comparison of the various groups revealed that levels of VEGF121 transcripts significantly increased in pT1 tumors ($p < 0.05$) and in pT2 tumors ($p < 0.05$) compared to pTa tumors. There was no statistically significant difference between pT1 and pT2 tumors for this isoform. The VEGF165 transcripts were significantly increased in pT2 tumors compared to pTa and pT1 tumors ($p < 0.05$) but there was no statistically significant difference between pTa and pT1 tumors for this isoform. The expression level of VEGF189 was significantly increased in muscle-invasive carcinomas compared to pTa tumors ($p < 0.05$) but there was no difference between pTa and pT1 tumors and between pT1 and pT2 tumors. The whole patient group was then subdivided into G1, G2 and G3 grade tumors and the respective VEGF-A isoforms transcript levels were compared to those found in G1 grade lesions. The variance among the subgroups of patients with different grade lesions was only significant for VEGF121 and VEGF165 (Kruskal – Wallis test; $p = 0.020$ for VEGF121, $p = 0.008$ for VEGF165, $p = 0.057$ for VEGF189). An increase of VEGF121 transcript level was observed in G3 grade bladder cancers in comparison with G1 grade lesions ($p < 0.05$). Patients with G1 lesions did not significantly differ in their VEGF121 mRNA levels from patients with G2 tumors. VEGF165

transcript level was significantly increased in high grade G3 tumors compared to G1 and G2 lesions ($p < 0.05$). As for VEGF121, patients with G1 lesions did not significantly differ in their VEGF165 mRNA levels from patients with G2 tumors.

Discussion

To get insights into the molecular-genetic pathways and the biological role of angiogenesis in urothelial carcinogenesis, several studies investigated VEGF-A expression at both the mRNA and protein levels. But the reported findings are controversial. Moreover, to date, there are no data with regard to the expression of VEGF-B in bladder cancer. Its function is unclear since it is not required for angiogenesis. However, VEGF-B expression has been detected in a wide variety of tumors such as breast carcinoma, melanoma and fibrosarcoma (24-26), neuroblastomas (27), colorectal cancer (28), oral squamous cell carcinomas (29), and often in conjunction with VEGF-A and other angiogenic factors. Moreover, its ability to activate VEGFR1 and neuropilin-1 indicates that it represents a potential anti-cancer target. Up to the present time, its clinical relevance in bladder cancer remains to be established. In our study, we did not detect VEGF-B mRNA in urothelial tumors suggesting the absence of this VEGF family member in pathologic bladder. Thus, it seems that VEGF-B does not supplement the role of VEGF-A in promoting tumor angiogenesis in the course of urothelial carcinogenesis.

VEGF-A mRNA is markedly up-regulated in the majority of human tumors (12). But finally, few studies have been performed on VEGF-A expression at the mRNA level in bladder cancer. From 30 patients with TCC of the urinary bladder, Sato et al. (18) detected by Northern blot hybridization analysis three VEGF-A transcripts of 5.5 kb, 4.4 kb and 3.7 kb. The same transcripts have also been observed in human colon carcinoma cells (30). In the present work, we explored by Northern-blotting the VEGF-A mRNA expression in bladder tumors and analysed its relationship to the tumor stage and grade. As already reported (18, 30), we displayed two VEGF-A transcripts of 5.2, 4.5 kb. On the contrary, we did not reveal the 3.7 kb transcript and we detected for the first time to our knowledge in bladder cancer samples a shorter transcript of 1.7 kb in length. These three transcripts of 5.5, 4.5 and 1.7 kb

had been already observed in a previous work performed in RT4 and T24 bladder cancer cell lines (31). This 1.7 kb transcript could be another VEGF-A isoform. Our Southern-blotting analysis revealed the expression of VEGF121, VEGF165, VEGF189 in both bladder cancer cell lines (RT4, T24) and bladder cancer tissues whatever the tumor stage. We detected neither VEGF145 nor VEGF206. Computer analysis indicates that the size of the known transcript VEGF-A isoform was between 3.5 kb and 5.5 kb. This argues for the detection of a putative new isoform of 1.7 kb. This new transcript was revealed by Northern-blotting since the probe is a 610 bp cDNA fragment (19) which hybridizes near the atg transcription initiation site. Thus, this probe is able to detect all VEGF-A transcripts. On the contrary, the 1.7 kb transcript was not detected in Southern-blotting. The upstream and downstream specific primers used to analyse the different VEGF-A isoforms are localized on exons 4 and 8 respectively. The putative new VEGF-A splice variant could have a truncated exon 8 or no exon 8. In these conditions, it could be visualized by northern-blotting but undetectable by southern-blotting since there would have no amplification by RT-PCR. More recently, an inhibitor splice variant of VEGF165, named VEGF165b, was described with a truncated exon 8, increasing the complexity of VEGF-A signaling. VEGF165b inhibits VEGF165-mediated endothelial cell proliferation and migration (32, 33).

The prognostic value of VEGF-A expression within the bladder tumor remains to be clearly established. O' Brien et al. (17) reported that the expression of VEGF-A predominates in pT1 tumors and is 10 times greater than in normal bladder and 4 times more expressed than in invasive tumors (\geq pT2) according to RNase protection assay. In a study of 55 patients presenting pT1G1 and pT1G2 tumors, it has been noted that superficial bladder cancer (pTa and pT1) with higher VEGF-A mRNA levels appeared to have earlier recurrence, a greater risk of stage progression and a shortened disease-free survival. Thus, VEGF-A mRNA appeared to be an independent prognostic indicator for both recurrence and stage progression

of pT1 bladder cancer (34). Using real-time RTqPCR, Quentin et al. (35) demonstrated that low-stage superficial TCC expressed VEGF-A mRNA at a significantly higher level than high-stage muscle-invasive carcinomas. On the contrary, Sato et al. (18) demonstrated that pT2-T4 TCC showed greater VEGF-A gene expression than did pT1 tumors. Using a colorimetric *in situ* hybridization technique, Izawa et al. (36) observed that VEGF-A expression was increased in muscle-invasive disease compared to pTa tumors and CIS. Slaton and colleagues (37) found that high expression of VEGF-A is a strong predictor of disease specific survival in patients with locally advanced TCC. Pignot et al. (38) demonstrated by quantitative real time RT-PCR that VEGF-A was significantly overexpressed in tumor samples compared to normal bladder tissue. In addition, VEGF-A was increased in pTa and pT1 tumors versus muscle-invasive bladder carcinomas. For invasive tumors, VEGF-A overexpression at a 13-month median follow-up was associated in univariate analysis with poor outcome and in multivariate analysis as an independent prognostic factor in both overall and disease-free survival.

In the present work, we showed in the same way of Sato et al. (18) that the expression of the three VEGF-A transcripts was greater in TCC compared to normal bladder tissue and muscle-invasive carcinomas had higher levels of VEGF-A than pTa and pT1 urothelial tumors. Furthermore, we noted that patients with TCC of the bladder expressing high VEGF-A mRNA levels (above a cutoff value) appeared to have a shortened progression-free survival for the three transcripts detected. Both 5.2 and 1.7 kb transcripts were correlated to the pathologic stage, the histologic grade and the presence of carcinoma *in situ*. On the other hand, the 4.5 kb transcript was only correlated to the pathologic stage. Kaplan-Meier survival analysis demonstrated that the 4.5 kb transcript overexpression was associated with a poorer prognosis of disease progression compared to the other two transcripts. On these bases,

further prospective studies may be undertaken to establish whether closer follow-up might be beneficial in patients with bladder cancer that express high levels of 4.5 kb transcript.

The controversy in the status of the *vegf-A* gene expression between all these studies could lie in sampling procedure. Non-invasive pTa and pT1 bladder tumors are usually protruding intraluminally and can be obtained by TUR without contamination by surrounding normal mucosa and smooth muscle. Samples obtained by TUR from invasive tumors could be contaminated by normal tissue. VEGF-A expression has been reported to be much lower in the smooth muscle cells and the fibroblasts than in the epithelial cells (39). Thus, a tissue sample contaminated with the smooth muscle possibly expresses less VEGF-A. In our study, invasive TCC are obtained from surgical specimens of total cystectomy under direct vision in order to exclude underlying or surrounding smooth muscle layer. Thus, we believe that our results reported the real VEGF-A expression in each tissue specimen.

With all these investigations, we realized that the prognostic value of VEGF-A in bladder cancer is not convincingly established. That is why we take great interest in the expression of its isoforms. Several studies showed that some VEGF-A splice variants expression was related to tumor progression. VEGF189 expression is correlated with poor prognosis in colon cancer, oesophageal cancer, and non-small cell lung cancer (40-42). VEGF121 mRNA expression level in lung cancer presenting lymph node metastasis was higher than in cancer without metastasis (43). Few studies have focused on the expression of VEGF-A isoforms in bladder cancer.

In our study, we detected three VEGF-A splice variants namely VEGF189, VEGF165 and VEGF121 by Southern-blotting and quantify each of them by RTqPCR methodology. The VEGF206 was absent. These results are in agreement with those previously obtained by Crew and co.workers (34). On the contrary, they are different from those published by O'Brien et al. (17) who displayed only VEGF121 and VEGF165 isoforms with the VEGF121

as the major one. In the same way, Li et al. (44) have detected mRNA expression of four VEGF-A isoforms namely VEGF121, 165, 189 and 206. The levels of VEGF206 and VEGF189 in pT2 tumors were significantly lower than those in pTa and pT1 tumors. In contrast, the levels of VEGF121 in pT2 tumors tended to be higher than those in pTa and pT1 tumors. The differences observed in the different studies could be due to the methodology used. A study revealed by RTqPCR the expression of six isoforms from 157 urothelial tumor bladder samples: VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF165, VEGF183, and VEGF189 (38). All isoforms were significantly overexpressed in tumor samples as compared to normal bladder tissue. Overexpression of VEGF121, VEGF148 , VEGF183, and VEGF189 was statistically significant in high grade pT1 versus pT2 tumors. Overexpression of VEGF121, VEGF148 , VEGF165, VEGF183, and VEGF189 was statistically significant in pTa and pT1 versus pT2 tumors.

Our results revealed that VEGF121, 165 and 189 were overexpressed in pT1-pT2 tumors versus pTa tumors. We did not detect VEGF148 and VEGF183 splice variants. The expression of the three detected isoforms increased according to the tumor stage and grade. VEGF121 and 165 were expressed to the same extent whatever the tumor stage and the histologic grade. VEGF189 was the lowest expressed isoform in pTa, pT1 and pT2 tumors as in G1, G2 and G3 tumors. On the whole, the results suggested that the distribution of VEGF-A splice variants might play a role in tumor progression of bladder cancer. Interestingly, it is worth noting that in bladder cancer the major isoforms are the secreted soluble isoforms which are in fact the more rapidly available forms to allow tumor growth.

At the protein level, studies on the prognostic value of VEGF-A are also contradictory. Whatever the technique used, the immunohistochemistry (45, 46) or the measurement of VEGF-A in biological fluids by ELISA (47, 48) the controversy in the status of VEGF-A in bladder cancer remains unresolved. However, in a previous study, we noted that elevated

serum level of VEGF-A was associated with the progression of pT1 tumors. Most importantly, it was associated with bladder cancer metastasis. With a cutoff of 400 pg/ml it was possible to differentiate patients with and without metastatic disease. Although VEGF-A did not remain an independent prognostic factor, the level of VEGF-A might be a valuable angiogenic marker for identifying metastatic bladder cancer (49).

In conclusion, the current data indicate that high VEGF-A mRNA level might be a prognostic indicator of progression as well as the expression level of the different VEGF-A splice variants. However, further investigations on larger cohorts are required to validate our preliminary results relating to the expression pattern of VEGF-A isoforms.

Acknowledgements

We thank Catherine Vial for her technical assistance. This work was supported by grants from a « Programme régional Hospitalier de Recherche Clinique» (Besançon, France), the « Ligue Nationale Contre le Cancer (Comités du Doubs et du Jura, Besançon, France)».

References

1. Dalesio O, Schulman CC, Sylvester R, De Pauw M, Robinson M, Denis L, Smith P and Viggiano G: Prognostic factors in superficial bladder tumors. A study of the European Organization for Research on Treatment of Cancer: Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group. *J Urol* 129: 730-733, 1983.
2. Heney NM, Proppe K, Prout GR, Jr., Griffin PP and Shipley WU: Invasive bladder cancer: tumor configuration, lymphatic invasion and survival. *J Urol* 130: 895-897., 1983.
3. Levi F, La Vecchia C, Randimbison L and Franceschi S: Incidence of infiltrating cancer following superficial bladder carcinoma. *Int J Cancer* 55: 419-421, 1993.
4. Lee R and Droller MJ: The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. *Urol Clin North Am* 27: 1-13, vii, 2000.
5. Droller MJ: Markers in bladder cancer--issues to consider. *J Urol* 160: 2009-2010, 1998.
6. Ferrara N: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25: 581-611, 2004.
7. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC and Abraham JA: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266: 11947-11954., 1991.
8. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, Keshet E and Neufeld G: VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 272: 7151-7158, 1997.
9. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S and Poltorak Z: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 13: 9-22., 1999.

10. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M and Dvorak AM: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146: 1029-1039, 1995.
11. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J and Ferrara N: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267: 26031-26037, 1992.
12. Ferrara N and Davis-Smyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18: 4-25, 1997.
13. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K and Eriksson U: Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2576-2581, 1996.
14. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, Del Vecchio S, Lei KJ, Chou JY and Persico MG: Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 8: 925-931, 1993.
15. Karamysheva AF: Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 73: 751-762, 2008.
16. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF and Senger DR: Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 143: 1255-1262, 1993.
17. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R and Harris AL: Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res* 55: 510-513, 1995.
18. Sato K, Sasaki R, Ogura Y, Shimoda N, Togashi H, Terada K, Sugiyama T, Kakinuma H, Ogawa O and Kato T: Expression of vascular endothelial growth factor gene and its receptor (flt-1) gene in urinary bladder cancer. *Tohoku J Exp Med* 185: 173-184, 1998.

19. Chin K, Kurashima Y, Ogura T, Tajiri H, Yoshida S and Esumi H: Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 15: 437-442, 1997.
20. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K and Eriksson U: Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11709-11714, 1998.
21. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 2003-2007, 2001.
22. Andersen CL, Jensen JL and Orntoft TF: Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64: 5245-5250, 2004.
23. Chabannes E, Fauconnet S, Bernardini S, Wallerand H, Adessi G and Bittard H: Protein kinase C signalling pathway is involved in the regulation of vascular endothelial growth factor expression in human bladder transitional carcinoma cells. *Cell Signal* 13: 585-591, 2001.
24. Gunningham SP, Currie MJ, Han C, Robinson BA, Scott PA, Harris AL and Fox SB: VEGF-B expression in human primary breast cancers is associated with lymph node metastasis but not angiogenesis. *J Pathol* 193: 325-332, 2001.
25. Mylona E, Alexandrou P, Giannopoulou I, Liapis G, Sofia M, Keramopoulos A and Nakopoulou L: The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. *Gynecol Oncol* 104: 557-563, 2007.

26. Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, Jaaskela-Saari H, Enholm B, Aase K, von Euler G, Eriksson U, Alitalo K and Joensuu H: Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 153: 103-108, 1998.
27. Eggert A, Ikegaki N, Kwiatkowski J, Zhao H, Brodeur GM and Himelstein BP: High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 6: 1900-1908, 2000.
28. Kawakami M, Furuhashi T, Kimura Y, Yamaguchi K, Hata F, Sasaki K and Hirata K: Expression analysis of vascular endothelial growth factors and their relationships to lymph node metastasis in human colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 22: 229-237, 2003.
29. Shintani S, Li C, Ishikawa T, Mihara M, Nakashiro K and Hamakawa H: Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 40: 13-20, 2004.
30. Koura AN, Liu W, Kitadai Y, Singh RK, Radinsky R and Ellis LM: Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon carcinoma cells by cell density. *Cancer Res* 56: 3891-3894, 1996.
31. Fauconnet S, Lascombe I, Chabannes E, Adessi GL, Desvergne B, Wahli W and Bittard H: Differential regulation of vascular endothelial growth factor expression by peroxisome proliferator-activated receptors in bladder cancer cells. *J Biol Chem* 277: 23534-23543, 2002.
32. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D and Harper SJ: VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 62: 4123-4131, 2002.
33. Cui TG, Foster RR, Saleem M, Mathieson PW, Gillatt DA, Bates DO and Harper SJ: Differentiated human podocytes endogenously express an inhibitory isoform of vascular

endothelial growth factor (VEGF165b) mRNA and protein. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F767-773, 2004.

34. Crew JP, O'Brien T, Bradburn M, Fuggle S, Bicknell R, Cranston D and Harris AL: Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res* 57: 5281-5285., 1997.

35. Quentin T, Schlott T, Korabiowska M, Kathei N, Zoller G, Glaser F and Kunze E: Alteration of the vascular endothelial growth factor and angiopoietins-1 and -2 pathways in transitional cell carcinomas of the urinary bladder associated with tumor progression. *Anticancer Res* 24: 2745-2756, 2004.

36. Izawa JI, Slaton JW, Kedar D, Karashima T, Perrotte P, Czerniak B, Grossman HB and Dinney CP: Differential expression of progression-related genes in the evolution of superficial to invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Rep* 8: 9-15, 2001.

37. Slaton JW, Millikan R, Inoue K, Karashima T, Czerniak B, Shen Y, Yang Y, Benedict WF and Dinney CP: Correlation of metastasis related gene expression and relapse-free survival in patients with locally advanced bladder cancer treated with cystectomy and chemotherapy. *J Urol* 171: 570-574, 2004.

38. Pignot G, Bieche I, Vacher S, Guet C, Vieillefond A, Debre B, Lidereau R and Amsellem-Ouazana D: Large-scale Real-time Reverse Transcription-PCR Approach of Angiogenic Pathways in Human Transitional Cell Carcinoma of the Bladder: Identification of VEGFA as a Major Independent Prognostic Marker. *Eur Urol*, 2008.

39. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF and Senger DR: Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 3: 211-220, 1992.

40. Oshika Y, Nakamura M, Tokunaga T, Ozeki Y, Fukushima Y, Hatanaka H, Abe Y, Yamazaki H, Kijima H, Tamaoki N and Ueyama Y: Expression of cell-associated isoform of

vascular endothelial growth factor 189 and its prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 12: 541-544, 1998.

41. Tokunaga T, Kijima H, Oshika Y, Fukushima Y, Abe Y, Ohnishi Y, Yamazaki H, Tsuchida T, Makuuchi H, Tamaoki N, Ueyama Y and Nakamura M: Aberrant isoform of vascular endothelial growth factor 189 expression is correlated with xenotransplantability of human esophageal cancer. *Oncol Rep* 5: 1115-1118, 1998.

42. Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Sadahiro S, Kijima H, Tsuchida T, Yamazaki H, Ueyama Y, Tamaoki N and Nakamura M: Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer* 77: 998-1002, 1998.

43. Ohta Y, Watanabe Y, Murakami S, Oda M, Hayashi Y, Nonomura A, Endo Y and Sasaki T: Vascular endothelial growth factor and lymph node metastasis in primary lung cancer. *Br J Cancer* 76: 1041-1045, 1997.

44. Li N, Kanda K, Fukumori T, Inoue Y, Nishitani M, Kanayama H and Kagawa S: Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and platelet-derived endothelial cell growth factor in bladder cancer. *Urol Oncol* 6: 10-15, 2000.

45. Chow NH, Liu HS, Chan SH, Cheng HL and Tzai TS: Expression of vascular endothelial growth factor in primary superficial bladder cancer. *Anticancer Res* 19: 4593-4597, 1999.

46. Stavropoulos NE, Bouropoulos C, Ioachim IE, Michael M, Hastazeris K, Tsimaris I, Kalogeras D, Liamis Z, Stefanaki S and Agnantis NI: Prognostic significance of angiogenesis in superficial bladder cancer. *Int Urol Nephrol* 36: 163-167, 2004.

47. Crew JP, O'Brien T, Bicknell R, Fuggle S, Cranston D and Harris AL: Urinary vascular endothelial growth factor and its correlation with bladder cancer recurrence rates. *J Urol* 161: 799-804., 1999.

48. Miyake H, Hara I, Yamanaka K, Gohji K, Arakawa S and Kamidono S: Elevation of serum level of vascular endothelial growth factor as a new predictor of recurrence and disease progression in patients with superficial urothelial cancer. *Urology* 53: 302-307., 1999.
49. Bernardini S, Fauconnet S, Chabannes E, Henry PC, Adessi G and Bittard H: Serum levels of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor in bladder cancer. *J Urol* 166: 1275-1279., 2001.

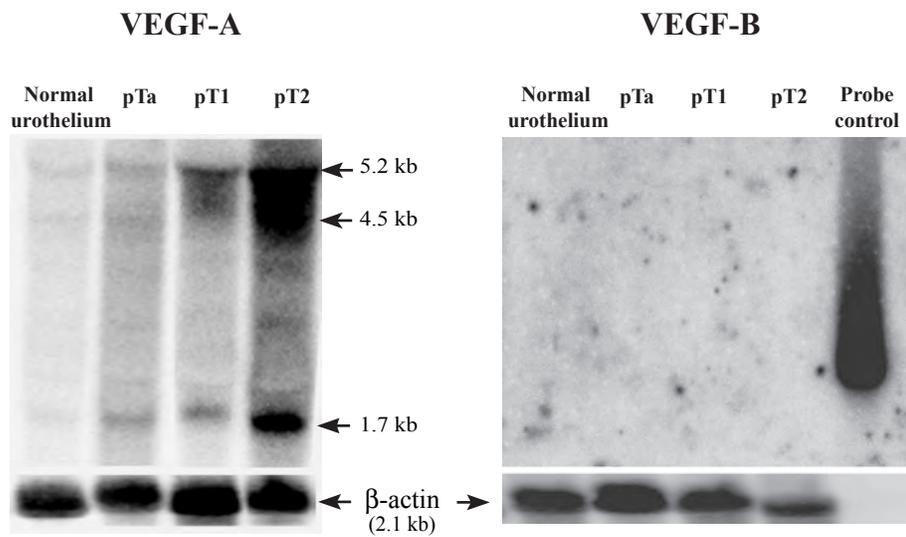
Table I. Association of VEGF-A transcript levels with pathologic stage, histologic grade and presence of carcinoma *in situ*.

	VEGF-A mRNA level		
	5.2 kb transcript	4.5 kb transcript	1.7 kb transcript
Pathologic stage			
pTa	0.0180 ± 0.008	0.0235 ± 0.010	0.0226 ± 0.010
pT1	0.0157 ± 0.014 ^b	0.0245 ± 0.014 ^b	0.0204 ± 0.009 ^b
pT2-T4	0.0622 ± 0.017 ^a	0.0684 ± 0.014 ^a	0.0668 ± 0.012 ^a
Histologic grade			
G1	0,0130 ± 0,006	0,0236 ± 0,0093	0,0183 ± 0,005
G2	0,0243 ± 0,0013 ^a	0,0373 ± 0,015	0,0280 ± 0,011
G3	0,0486 ± 0,0023 ^{a,c}	0,0494 ± 0,005	0,0555 ± 0,027 ^a
CIS			
No	0.0202 ± 0.011	0.0322 ± 0.014	0.0263 ± 0.010
Yes	0.0579 ± 0.017 ^d	0.0547 ± 0.015	0.0614 ± 0.012 ^d

CIS, carcinoma *in situ*.

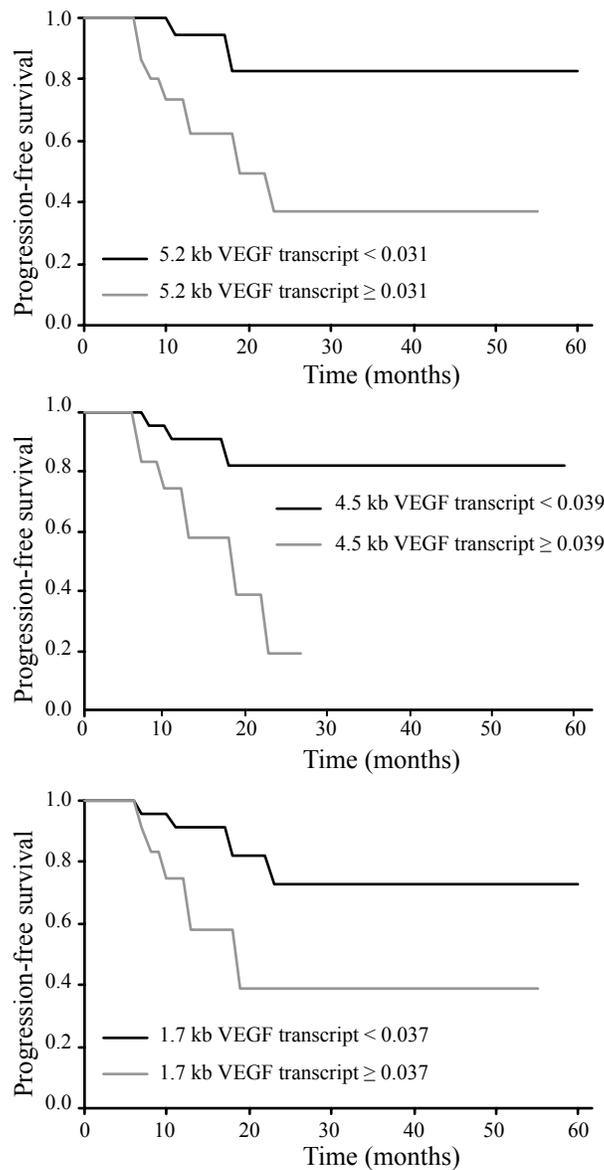
Compared with pTa tumors or G1 tumors, ^ap<0.05; ^bp>0.05. Compared with G2 tumors, ^cp<0.05. Compared with the presence of CIS, ^dp<0.05.

Figure 1



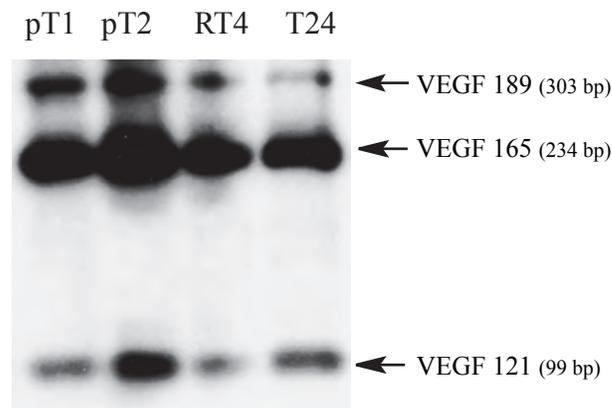
Expression of VEGF-A and VEGF-B mRNA in normal urothelium and bladder cancer tissues. Total RNA was isolated from normal urothelium and from one specimen of pTa, pT1 or pT2 bladder tumor. Thirty μg of RNA were subjected to Northern-blotting analysis performed with [α - ^{32}P]-dCTP-labelled probes for VEGF-A, VEGF-B, and β -actin as described in detail in Materials and methods. The probe control corresponds to the migration of the non-labelled VEGF-B cDNA probe.

Figure 2



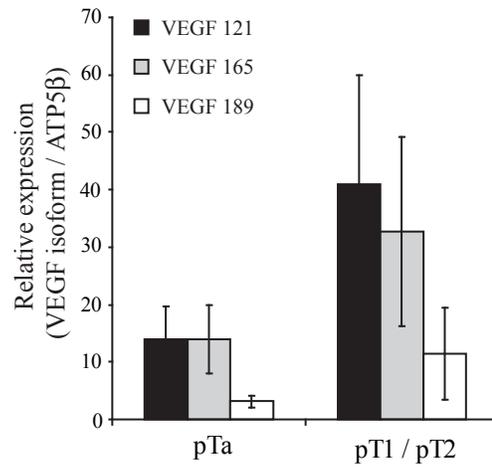
Kaplan-Meier progression-free survival curves in patients with TCC of different pathologic stage. (A) Relationship between progression-free patient survival and 5.2 kb VEGF-A mRNA levels above and below the cutoff value of 0.031 ; (B) Relationship between progression-free patient survival and 4.5 kb VEGF-A mRNA levels above and below the cutoff value of 0.039 ; (C) Relationship between progression-free patient survival and 1.7 kb VEGF-A mRNA levels above and below the cutoff value of 0.037.

Figure 3



Expression of different VEGF-A isoforms by Southern-blotting analysis. Total RNA was isolated from one specimen of pT1 or pT2 bladder tumor, and from RT4 and T24 cells. RT-PCR assay using specific primers for VEGF-A was performed as described in Materials and methods. The PCR products were electrophoresed on a 2% agarose gel and transferred onto a nylon membrane which was subsequently hybridized with a [α - 32 P]-dCTP-labelled cDNA VEGF-A probe. Filters were analysed using a PhosphoImager (Molecular Imager^RSystem, GS-505, Biorad).

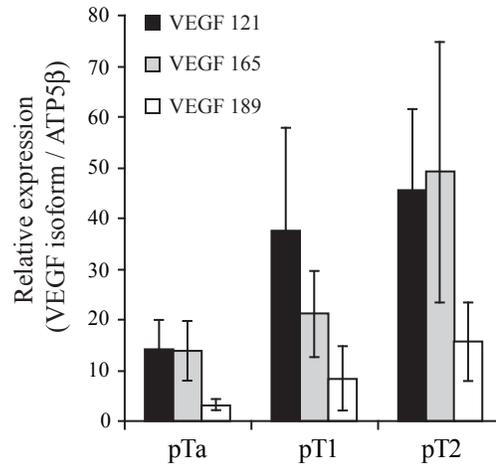
Figure 4



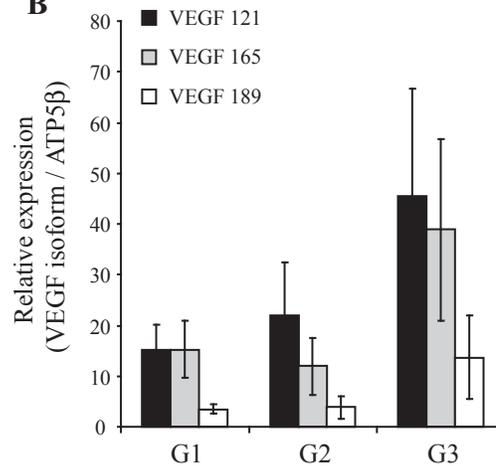
Quantitative analysis of VEGF-A isoform expression in non-invasive (pTa) versus invasive (pT1-T2) urothelial tumors. Total RNA was isolated from 8 pTa, 7 pT1 and 5 pT2 bladder tumors. VEGF-A isoforms transcript levels were measured by real-time RT-PCR and normalized to ATP5 β . Data are presented as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, Mann-Whitney U test.

Figure 5

A



B



Quantitative analysis of VEGF-A isoform expression according to the pathologic stage (A) and to the histologic grade (B). Total RNA was isolated from 8 pTa, 7 pT1 and 5 pT2 bladder tumors. VEGF-A isoforms transcript levels were measured by real-time RT-PCR and normalized to ATP5 β . Data are presented as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, compared to pTa or G1 tumor, Mann-Whitney U test. ** $p < 0.05$, compared to pT1 or G2 tumor, Mann-Whitney U test.

Dans l'étude présentée dans l'article n° 1, nous montrons donc que le taux d'ARNm du VEGF-A peut être un indicateur pronostique de progression des tumeurs de la vessie apportant ainsi un argument supplémentaire en faveur du rôle clé du VEGF dans la cancérogenèse vésicale et dans l'acquisition du potentiel métastatique des cellules urothéliales.

Des études ont montré que dans des cellules Rama 37 de Rat, l'acquisition du potentiel métastatique des cellules était due à la surexpression d'une protéine de la famille des FABP (la C-FABP, Cutaneous-Fatty Acid Binding Protein) associée à une surexpression du VEGF (Jing *et al.*, 2001). Cette même équipe a montré que dans des cellules dérivées de cancer de la prostate, l'inhibition de l'expression de la C-FABP par une stratégie antisens était associée à une diminution du taux de VEGF. De plus, ces cellules perdaient leur potentiel "métastatique" (Adamson *et al.*, 2003).

Compte tenu de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la surexpression du VEGF dans les tumeurs urothéliales invasives pourrait être corrélée à la surexpression d'une protéine de la famille des FABP.

III. Expression des FABP dans les cellules RT4 et T24

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons dans un premier temps déterminé qu'elles étaient les FABP exprimées par les cellules RT4 et T24. Pour cela, à partir d'ARN issus de ces cellules, nous avons étudié l'expression de différents membres de la famille des FABP (A-, E-, L-, H-, B- et Myelin-FABP) par une méthode de RT-PCR. Nous avons aussi extrait les ARN de différents tissus humains utilisés comme témoins positifs de l'expression des différentes FABP : le tissu adipeux pour la A-FABP, les kératinocytes pour la E-FABP, le foie pour la L-FABP, le cerveau pour la B-FABP et la myelin-FABP. Les résultats sont présentés dans la Figure 20.

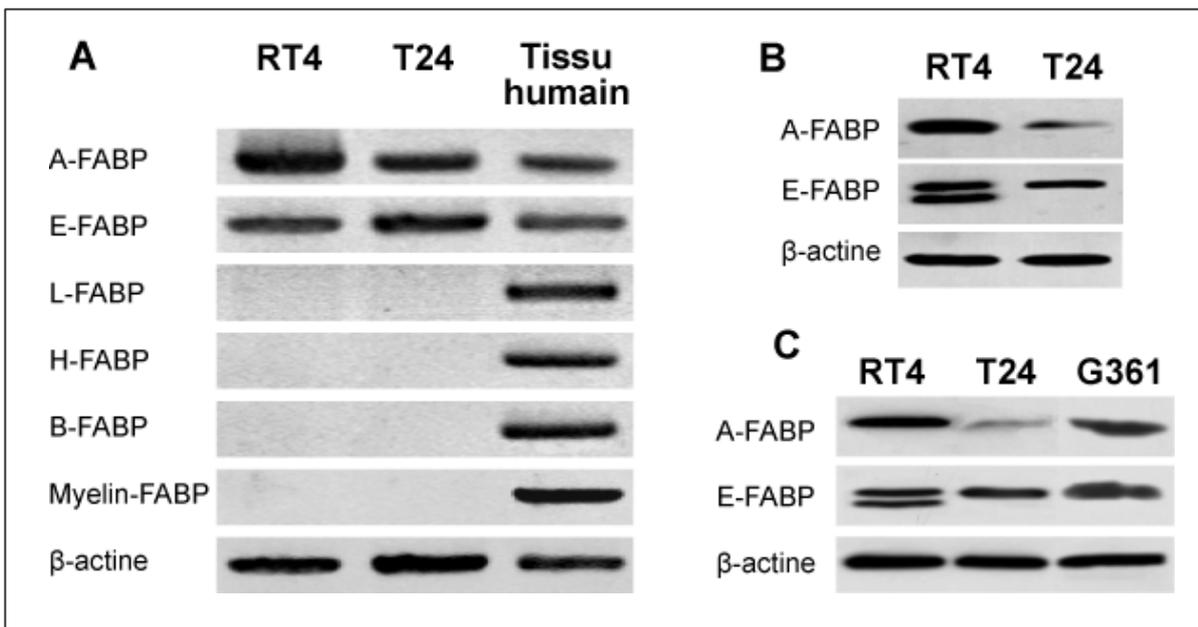


Figure 20 : Expression des principaux membres de la famille des FABP

L'expression des ARNm a été analysée par RT-PCR dans les cellules RT4 et T24 (A). Des tissus humains ont été utilisés comme témoins positifs de l'expression des FABP : le tissu adipeux pour la A-FABP, les kératinocytes, pour la E-FABP, le foie pour la L-FABP, le cœur pour la H-FABP, le cerveau pour la B-FABP et la Myelin-FABP. La β -actine a été utilisée comme gène de référence. Le taux de protéine E-FABP a été déterminé par western-blotting (B) dans les cellules RT4 et T24 grâce à un anticorps anti-E-FABP (cf Annexe 1). La possible réaction croisée de l'anticorps anti-E-FABP a été évaluée en réalisant une hybridation des anticorps anti-A-FABP et anti-E-FABP sur les lignées RT4, T24 et G631 (dérivées de mélanome humain). Dans les expériences de western-blotting, la β -actine a été utilisée comme témoin de dépôt d'une quantité équivalente de protéines dans chaque puits. Les gels présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes réalisées sur 4 déterminations.

L'analyse par RT-PCR montre que seuls les transcrits de la A-FABP et de la E-FABP sont exprimés dans les cellules RT4 et T24 (cf. Figure 20 A).

L'étude par western-blotting montre que la A-FABP est beaucoup plus exprimée dans les cellules RT4 comparativement aux cellules T24 (cf. Figure 20B). La E-FABP est exprimée dans les deux lignées cellulaires. Cependant deux bandes sont détectées dans les cellules RT4 alors qu'une seule

est détectée dans les cellules T24. La A- et la E-FABP présentent 52,3 % d'identité de séquence en acides aminés (Chmurzynska, 2006). C'est pourquoi nous avons supposé que l'anticorps dirigé contre la E-FABP détecte aussi la A-FABP. Bien que l'anticorps dirigé contre la E-FABP soit décrit comme ne présentant pas de réaction croisée avec les autres membres de la famille des FABP, nous avons testé la spécificité de cet anticorps sur des extraits protéiques de cellules G361, dérivées d'un mélanome humain. Ces cellules expriment à la fois la A- et la E-FABP et en quantité équivalente. Dans ces cellules, une seule bande est détectée pour chaque protéine confirmant l'absence de réactivité croisée entre l'anticorps E-FABP et la protéine A-FABP (cf. Figure 20C).

Nos résultats permettent de conclure que seule la A- et la E-FABP sont exprimées dans les cellules RT4 et T24, avec un taux très faible de A-FABP dans les cellules T24, cellules représentatives d'une tumeur à potentiel métastatique. Ces résultats remettraient en cause notre hypothèse selon laquelle un fort taux de VEGF serait associé à un taux important d'un membre de la famille des FABP dans des tumeurs de la vessie de stade et de grade élevé. De plus, selon les données de la littérature, dans les cancers de la vessie, une perte d'expression de la A-FABP est associée à la progression des tumeurs urothéliales. C'est pourquoi, nous avons étudié l'expression de l'ARNm de la A-FABP dans les échantillons tumoraux pour lesquels nous avons quantifié les différentes isoformes du VEGF.

IV. Analyse de l'expression des ARNm A-FABP dans les tumeurs urothéliales de différents stades et grades

Dans un premier temps, nous avons mis au point une technique de RT-PCR en temps réel, en utilisant la technologie Taqman® ciblant l'ARNm de la A-FABP et le messager du gène de référence ATP5 β . Grâce à la recherche des conditions optimales pour ces deux PCR (concentration des réactifs et choix des séquences des amorces et des sondes), nous avons développé une méthode de quantification relative des ARNm de la A-FABP, précise, reproductible et sensible.

Les résultats obtenus montrent une diminution significative du taux d'ARNm A-FABP à la fois dans les tumeurs invasives pT2-T4 et pT1 comparativement aux tumeurs pTa, et dans les tumeurs de grade G2 et G3 comparativement aux tumeurs de grade G1 (cf. Figure 21).

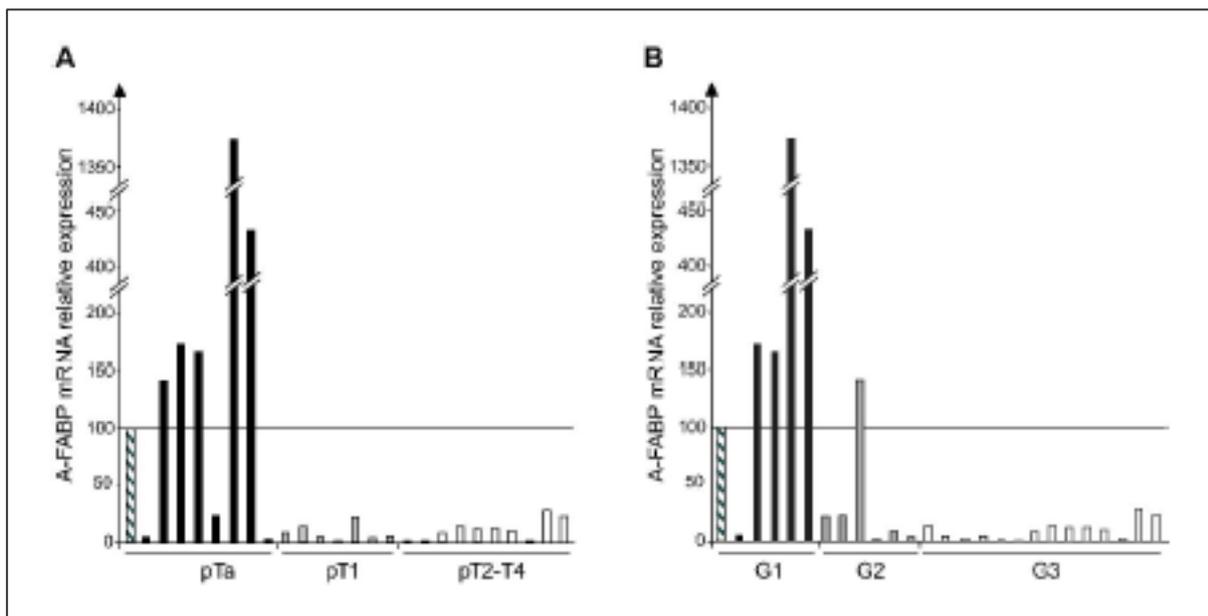


Figure 21 : Expression de la A-FABP dans des tumeurs de la vessie selon le stade et le grade (Extrait de la figure 1 de l'article 2).

Nos résultats montrent une chute de l'expression des ARNm de la A-FABP dès le stade pT1 et le grade 2 suggérant que la présence de la A-FABP dans les tumeurs superficielles pTa de bas grade pourrait être un facteur de bon pronostic.

Sur une même cohorte de patients, lorsque les taux d'ARNm du VEGF et les taux d'ARNm de la A-FABP sont comparés (cf. Figure 22), nous observons que les tumeurs de stade pTa expriment un taux faible d'ARNm des différentes isoformes du VEGF et un taux élevé d'ARNm de la A-FABP. En revanche, les tumeurs de stade pT1/pT2 expriment un taux important d'ARNm du VEGF et un taux faible d'ARNm de la A-FABP.

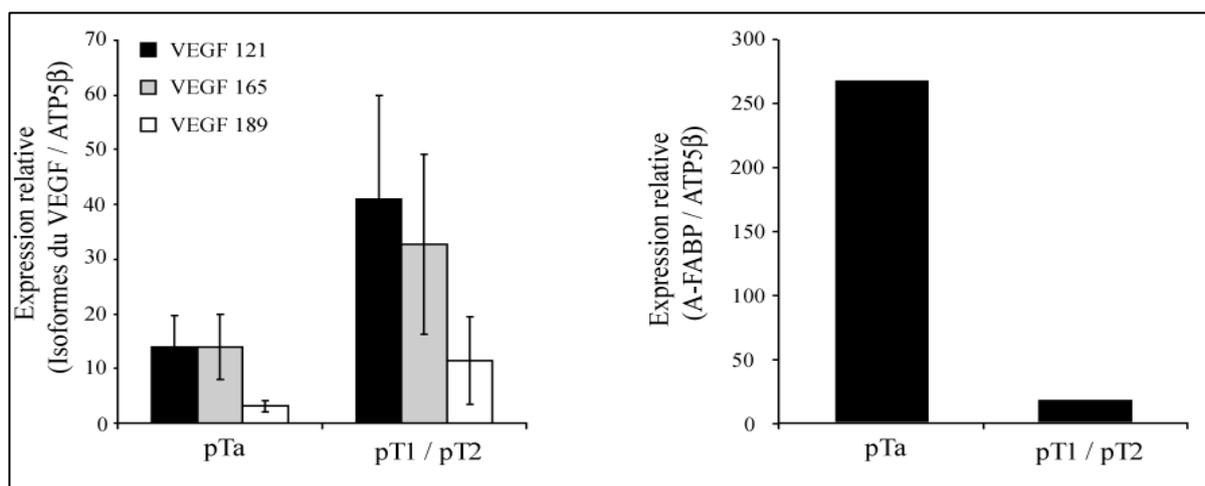


Figure 22 : Comparaison des expressions relatives de la A-FABP et des isoformes du VEGF en fonction du stade tumoral

Ainsi la progression tumorale et l'acquisition du potentiel métastatique des tumeurs urothéliales pourraient être déterminées par une augmentation du VEGF (donc de l'angiogenèse) et une chute de l'expression de la A-FABP.

La A-FABP pourrait donc être un gène suppresseur de tumeur puisque la perte d'expression de cette dernière est concomitante à la progression tumorale. Nous pouvons donc supposer que la réinduction de cette protéine dans les tumeurs de stade et de grade élevés permettrait de stopper l'invasion tumorale.

De nombreuses études ont montré que la A-FABP était un gène cible de PPAR γ et que des agonistes naturels (15dPGJ2) et synthétiques (thiazolidinediones) augmentaient l'expression des ARNm de la A-FABP dans des lignées monocytaires humaines (Pelton *et al.*, 1999).

Nous avons donc étudié la régulation transcriptionnelle de la A-FABP par les agonistes de PPAR dans les lignées RT4 et T24 (cf. article 2).

V. Régulation de l'expression de la A-FABP par des agonistes des PPAR dans les cellules RT4 et T24

Dans notre étude, les ligands des PPAR α , β et γ augmentent fortement l'expression de la *a-fabp* dans les cellules T24 alors que seul le ligand synthétique de PPAR β régule la *a-fabp* dans les cellules RT4. L'augmentation de l'expression de la *a-fabp* dans les cellules T24 n'est pas due à une stabilisation des ARNm suggérant une régulation au niveau transcriptionnel et nécessite une synthèse *de novo* de protéines. Enfin, l'utilisation d'antagonistes spécifiques des différents récepteurs α , β et γ , nous a permis de conclure que la régulation de la A-FABP nécessitait l'activation des récepteurs.

En résumé, les ligands des PPAR α et γ régulent l'expression de la A-FABP uniquement dans les cellules T24. Les résultats présentés par d'autres équipes laissent supposer que la présence de certains coactivateurs tels que CITED-2, PBP et PGC-1 α permettrait l'activation de la transcription de gènes cibles par les PPAR α et γ (Puigserver *et al.*, 1998b ; Tien *et al.*, 2004 ; Zhu *et al.*, 1997). C'est pourquoi, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle, dans les cellules RT4, l'absence d'activation de la transcription de la A-FABP par les agonistes des PPAR α et γ serait due à une perte d'expression ou d'activité des coactivateurs CITED-2, PBP ou PGC-1 α .

Nous avons alors étudié par RT-PCR l'expression des coactivateurs CITED-2, PBP et PGC-1 α dans les cellules RT4 et T24. Les coactivateurs PBP et CITED-2 sont exprimés dans les 2 lignées cellulaires RT4 et T24 (cf. Figure 23A).

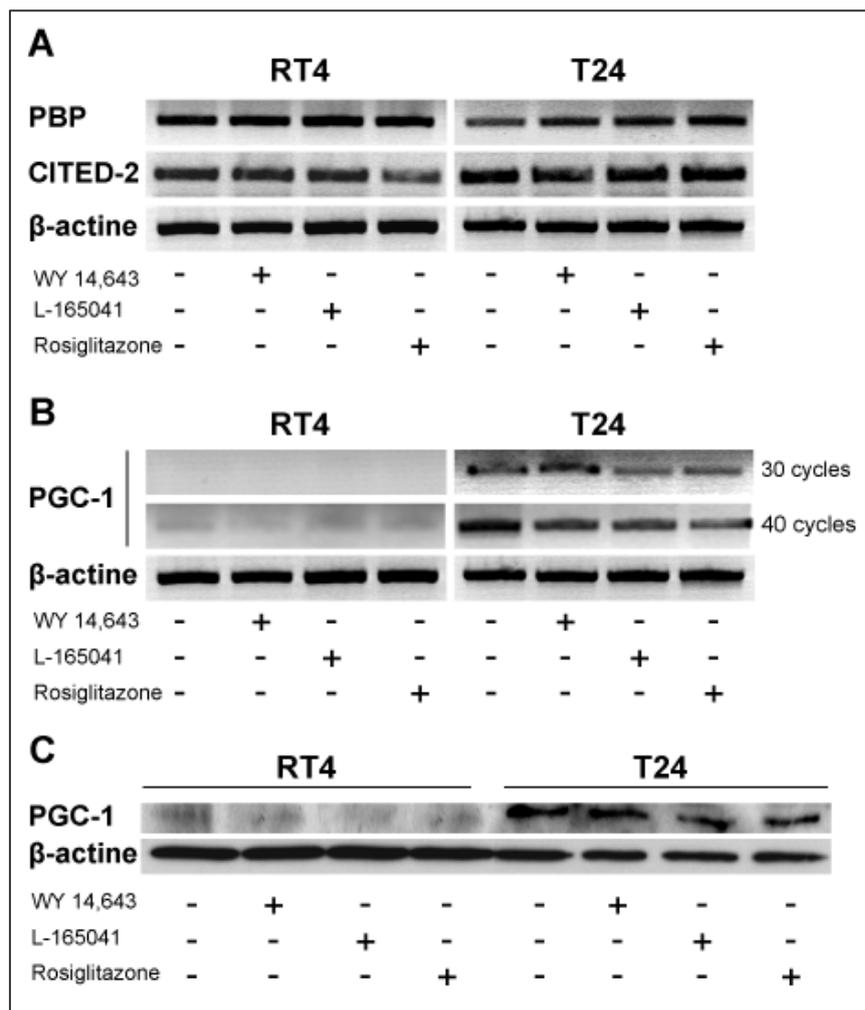


Figure 23 : Expression des coactivateurs PBP, CITED-2 ou PGC-1 α dans les cellules RT4 et T24.

Les cellules ont été incubées dans un milieu Mc COY's 5a dépourvu de sérum puis stimulées ou non par les ligands de PPAR (25 μ M WY14,643, 10 μ M L-165041 ou 1 μ M rosiglitazone) pendant 24 h. Les ARN totaux ont été extraits puis amplifiés par RT-PCR pour détecter les ARNm des coactivateurs PBP, CITED-2 (A) et PGC-1 α (B) (cf. Annexe 2). La β -actine a été utilisée comme gène de référence. L'expérience présentée est représentative de trois expériences réalisées sur trois déterminations. (C) Le taux protéique de PGC-1 α a été déterminé par western-blotting grâce à un anticorps anti-PGC-1 α (cf Annexe 1). La β -actine a été utilisée comme témoin de dépôt d'une quantité équivalente de protéines dans chaque puits. Cette expérience est représentative de trois expériences réalisées sur trois déterminations.

L'ARNm du coactivateur PGC-1 α est exprimé dans les cellules T24 après 30 cycles d'amplification par PCR. En revanche, dans les cellules RT4, les transcrits de PGC-1 α ne sont détectés qu'après 40 cycles d'amplification (cf. Figure 23 B). De plus, l'analyse de la protéine PGC-1 α par western-blotting montre qu'elle est très peu exprimée dans les cellules RT4 comparativement aux cellules T24 (cf. Figure 23 C). Vraisemblablement, les ligands des PPAR α , β et γ ne régulent pas l'expression de PGC-1 α dans ces cellules. Ces résultats suggèrent que l'absence d'effet des ligands de PPAR α et γ sur l'expression de la A-FABP dans les cellules RT4 serait due à une trop faible expression du coactivateur PGC-1 α .

Article 2

A-FABP, a candidate progression marker of human transitional cell carcinoma of the bladder, is differentially regulated by PPAR in urothelial cancer cells

BOITEUX G, LASCOMBE I, ROCHE E, PLISSONNIER ML, CLAIROTTE A, BITTARD H, FAUCONNET.

2008, Int J Cancer, In press

A-FABP, a candidate progression marker of human transitional cell carcinoma of the bladder, is differentially regulated by PPAR in urothelial cancer cells

Guillaume Boiteux¹, Isabelle Lascombe¹, Emmanuelle Roche¹, Marie-Laure Plissonnier¹, Anne Clairotte², Hugues Bittard³, Sylvie Fauconnet^{1,3,*}

¹Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, EA 3181 – IBCT - IFR N°133, Université de Franche – Comté, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 19 rue Ambroise Paré, 25041 Besançon Cedex 3, France.

²Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU de Besançon, Hôpital Jean Minjoz, 3 boulevard Fleming, 25000 Besançon, France.

³Service d'Urologie et d'Andrologie, CHU de Besançon, Hôpital St Jacques, 2 place St Jacques, 25000 Besançon, France.

Guillaume Boiteux and Isabelle Lascombe contributed equally to this work.

***Correspondence to :** Sylvie Fauconnet, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, EA 3181 – IFR N°133, Université de Franche – Comté, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 19 rue Ambroise Paré, 25041 Besançon Cedex 3, France. Phone: 00 33 3 63 08 22 28 ; Fax: 00 33 3 63 08 22 80. E-mail: sylvie.fauconnet@univ-fcomte.fr

Keywords: bladder cancer, adipocyte-fatty acid binding protein, A-FABP, FABP4, transcriptional regulation, PPAR.

Abbreviations: A-FABP, adipocyte-fatty acid binding protein; B-FABP, brain-fatty acid binding protein; CHX, cycloheximide; E-FABP, epidermal- fatty acid binding protein; H-FABP, heart-fatty acid binding protein; L-FABP, liver- fatty acid binding protein; LXR, liver X receptor; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PPRE, peroxisome proliferators response element; RXR, retinoid X receptor; SREBP, sterol-regulatory element binding protein; TCC, transitional cell carcinoma.

Appropriate journal category: Cancer cell biology

Statements describing the novelty and impact of the paper:

Superficial pT1 bladder tumors are characterized by a high risk of recurrence and progression in grade and stage. In poor prognosis high grade pT1 tumors there is a loss of A-FABP mRNA expression compared to good prognosis tumors suggesting that re-expression of A-FABP could be a therapeutic approach in early stage bladder cancer to prevent cancer progression. The novelty of our work is that A-FABP is up-regulated by the three PPAR isotype pharmacological ligands in high stage and grade bladder cancer-derived cells. The increase of A-FABP expression is a possible new approach to inhibit the malignant progression of bladder cancer.

ABSTRACT

Superficial pT1 bladder tumors are characterized by a high risk of recurrence and progression in grade and stage. Few studies provided evidence that loss of adipocyte-fatty acid binding protein (A-FABP) expression was associated with bladder cancer progression. A-FABP is a lipid binding protein playing a role in intracellular lipid transport and metabolism, as well as in signal transduction. We reported from bladder tumors that decrease of A-FABP transcript level significantly correlated to tumor stage and to histologic grade ($p < 0.05$). Namely, in poor prognosis high grade pT1 tumors there was a loss of A-FABP expression compared to good prognosis tumors suggesting that re-expression of A-FABP could be a therapeutic approach in early stage bladder cancer to prevent disease progression. We demonstrated for the first time that this marker is up-regulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) α , β and γ in T24 cells (derived from an undifferentiated grade III carcinoma) and only by PPAR β in RT4 cells (derived from a well differentiated grade I papillary tumor). This effect occurred through a PPAR-dependent transcriptional mechanism without modifying mRNA stability and interestingly required *de novo* protein synthesis. Data as a whole suggest a prognostic significance of A-FABP in bladder cancer outcome and the potential utility of overexpression of this protein by PPAR agonists open up new perspectives in the treatment of bladder cancer.

Introduction

Over 90% of bladder cancers are transitional cell carcinoma (TCC). At the first time of diagnosis, 75% of TCC present as superficial bladder cancer confined to the mucosa (pTa disease) or lamina propria (pT1). In the remaining 25% of cases, tumors present as muscle invasive disease (\geq pT2) with no history of superficial disease. Non muscle invasive bladder tumors are a heterogeneous group of cancers with a markedly diverse prognosis. While low-grade pTa tumors are characterized by a high risk of recurrence (70%) and infrequent progression to muscle-invasive tumors, high-grade pTa and pT1 tumors display a high risk of progression.¹ Since the clinical outcome of superficial bladder tumors is relatively unpredictable, new molecular prognostic markers for the prediction of tumor recurrence and progression are urgently needed to improve our understanding, diagnosis and management of bladder cancer. Early detection within pT1 tumors of a subgroup that will progress may successfully identify potentially lethal lesions before they become muscle invasive and this in order to identify patients who might benefit from a surgery to avoid vesical muscle invasion and consequently metastasis spreading.

Using a combination of proteomic technologies, the examination of protein expression profiles of fresh TCC provided evidence that loss or decrease of A-FABP (adipocyte-fatty acid binding protein or FABP4) expression was observed in high-grade lesions compared to low-grade tumors and non malignant urothélium.^{2,3} The loss of A-FABP protein expression has been associated with bladder cancer progression and could have a significant prognostic value.⁴ These data suggest that A-FABP could be a novel marker with potential clinical utility to select patients that are more likely to develop aggressive disease.

FABP are members of the superfamily of lipid-binding protein. So far nine different FABP, with tissue-specific distribution, have been identified among them A-FABP. The primary role of all FABP is the regulation of fatty acid uptake and intracellular transport. A-FABP

impacts glucose and lipid metabolism,⁵ plays a role in signal transduction,⁶⁻⁸ and could contribute to cell proliferation and apoptotic processes.⁹ In addition, FABP function as cytoplasmic shuttle proteins for ligand activation of PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor). It has been shown that A-FABP physically and functionally cooperates with PPAR γ . It regulates the transcriptional activity of PPAR γ agonists by targeting them in the nucleus, thereby enabling this PPAR isotype to exert its biological functions.¹⁰

PPARs (α , β and γ) are nuclear receptors associated with RXR (Retinoid X Receptor) to form heterodimers that bind to a PPRE (PPAR-response element) located in the promoter region of target genes and act as ligand-inducible transcription factors.¹¹ Consensus PPREs are direct repeats (DR) of AGGTCA separated by one nucleotide (DR-1) with a 5' extension of AACT for an increased specificity.¹² Some PPAR γ agonists (*e.g.* the thiazolidinediones which are antidiabetic drugs) have exhibited anti-neoplastic effects with anti-proliferative, pro-apoptotic and differentiation promoting activities.¹³

Expression of mouse A-FABP is regulated by PPAR agonists such as fatty acids and thiazolidinediones, and its messenger is transcriptionally controlled *via* a DR-1 element during differentiation of adipocytes.¹⁴ Nothing is known about PPAR-regulated expression of human A-FABP in bladder cancer cells. Because A-FABP may have a good prognostic value in bladder cancer and since PPAR are involved in carcinogenesis, we studied A-FABP regulation by these nuclear receptors. In the present study, first we show that *a-fabp* gene expression significantly decreased in bladder tumor samples according to the tumor stage and to the histologic grade, and then we reported for the first time that PPAR α , β and γ agonists up-regulated A-FABP in a bladder cancer cell line derived from a high-grade tumor in which this protein is poorly expressed. Our results suggest that PPAR agonists could increase A-FABP expression in pT1 tumors to prevent cancer progression and could be an attractive therapeutic option for treating superficial bladder tumors that exhibit decrease or loss of A-FABP. A-FABP could be a novel

molecular marker for the diagnosis, prognosis and the monitoring of bladder cancer during therapy as well as a potential therapeutic target.

Accepted Preprint

Materials and Methods

Reagents

The hypolipidemic drug WY 14,643 was obtained from Chemsyn Science Laboratories (Campro Scientific, Veenendaal, The Netherlands). The antidiabetic drugs thiazolidinediones (Ciglitazone, Rosiglitazone, Pioglitazone, Troglitazone), 15d-PGJ2 and the PPAR γ antagonist GW9662 were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). L-165041 was provided by Calbiochem (San Diego, CA, USA). PPAR α and β antagonists (GW6471 and Sulindac sulfide), actinomycin D and cycloheximide (CHX) were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France).

Patient samples

A total of 26 samples of transitional cell carcinoma of the bladder from clinical stages pTa to pT4 were obtained from transurethral resection or cystectomy specimens (Table I). Informed consent was obtained from every patient. Histology, grade and stage were determined by pathologic examination of the transurethral resection or cystectomy and were confirmed by blinded rereview of the original cystoscopic biopsy slides. Tumors were staged according to the 1997 tumor-node-metastasis (TNM) staging system guidelines¹⁵ and graded according to the 1973 World Health Organization (WHO) classification and the most recent classification system proposed in 2004¹⁶ which basically corresponds to the 1998 WHO/ISUP (World Health Organization/International Society of Urological Pathology) classification. Biopsies were immediately frozen in liquid nitrogen for later analyses.

Cell lines and culture conditions

RT4 and T24 human bladder cancer cell lines were obtained from ATCC (Biovalley, Conches, France). The cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in Mc COY's 5a medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen), 1% antibiotic antimycotic mixture (10 mg/ml streptomycin, 10,000 units/ml penicillin, 25 µg/ml amphotericin B), 2 mM glutamine, and 15 mM Hepes (Sigma). The cells were tested for the absence of mycoplasma before total RNA and protein extraction.

Reverse transcription, PCR and real-time PCR

Total RNA was isolated and purified from human fresh frozen tissues using the commercially available Qiagen RNA/DNA kit (Qiagen SA, Courtaboeuf, France) and from RT4 and T24 cells using TRI-Reagent (Molecular Research Center, Euromedex, Mundelsheim, France) according to the manufacturer's guidelines. Three µg of RNA were reverse transcribed using MMLV-RT (Invitrogen) and oligo(dT)₁₂₋₁₈ primers (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Subsequent amplifications were performed using 2 µl of cDNA, Taq DNA recombinant polymerase (Invitrogen) and specific primers as follows: A-FABP sense, 5'-GAAACTTGCTCTCCAGTGAAAAC-3' and antisense, 5'-GGGAGAAAATTACT-3' ; β-actin sense, 5'-TGCTATCCAGGCTGTGCTAT-3' and antisense, 5'-GATGGAGTTGAAGG-3'. The expected sizes of PCR products for A-FABP and β-actin were 449 and 359 base pairs respectively. The PCR mixtures were subjected to 30 cycles of amplification by denaturation (30 s at 94°C), hybridization (30 s at 55°C for A-FABP and 50°C for β-actin), and elongation (20 s at 72°C). Samples were then incubated for an additional 10 minutes at 72°C as a final extension step. The real-time PCR assays were carried out in quadruplicate using a LightCycler 1.0 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) with Taqman technology in 20 µl of a reaction

mixture containing 1x LightCycler Fast Start DNA Master HybProbe (Roche diagnostics) and 5 μ l of cDNA diluted 1:20. *A-FABP* RTqPCR was performed with 3.5 mM MgCl₂, 850 nM of each primer and 50 nM of probe. *ATP5 β* (ATP synthase β polypeptide) RTqPCR was carried out with 4 mM MgCl₂, 500 nM of each primer and 300 nM of probe. The following oligonucleotide primers and probes were used for PCR amplification: *A-FABP* forward: 5'-CTGGTGGTGGGAATGCGTCATGA-3', *A-FABP* reverse: 5'-CAACGTCCTTGGCTTATGCTCTCT-3', *A-FABP* probe (5'Fam, 3'Tamra) 5'-AGGCGTCACTTCCACGAGAGTTT-3'; *ATP5 β* forward: 5'-TACTGTGCGGTGCCATTGCT-3', *ATP5 β* reverse: 5'-CACGGGCAACATCGTAATGC-3', *ATP5 β* probe (5'Fam, 3'BHQ1) 5'-ATCCCAACATTGTTGGCAGT-3'. Samples were heated for 10 min at 95°C and subjected to 40 cycles of amplification (denaturation at 95°C for 10 s, annealing and elongation at 60°C for 20 s). A sequence detection program calculated a threshold cycle number (CT) at which the probe cleavage-generated fluorescence exceeded the background signal.¹⁷

Measurement of relative RNA expression level

We calculated the relative RNA expression level using a comparative CT method.¹⁷ Identified as the best normalization gene in human bladder cancer,¹⁸ *ATP5 β* was used for the reference gene. The normalized relative expression level of a target gene in an individual sample was calculated using the following formula:

$$\frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CT}_{\text{target}}(\text{calibrator} - \text{sample})}}{(E_{\text{reference}})^{\Delta\text{CT}_{\text{reference}}(\text{calibrator} - \text{sample})}}$$

in which the real-time PCR efficiency of the target gene transcript is denoted by E_{target} and that of the reference gene transcript, by $E_{\text{reference}}$.¹⁷ Thus, the relative RNA expression level of a gene is a unit less number relative to that of the calibrator sample.

Protein extraction and Western blotting analysis

Proteins from cultured cells were extracted using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS) supplemented with protease inhibitor cocktail (Complete™, Roche Diagnostics). The protein concentration was determined using a protein assay according to the Bradford method (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Protein extracts (10 µg for RT4 cells or 15 µg for T24 cells) were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions, electro-transferred to Hybond-P PVDF membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and non specific binding was blocked in TBS-Tween buffer (0.5 mM Tris-HCl, 45 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) containing 5% nonfat milk. Blots were probed for 1 h at room temperature with the primary antibodies anti-mouse A-FABP (#AF1443, R&D Systems, Abingdon, UK ; 1:1000), or monoclonal anti-β-actin (clone AC-15, Sigma ; 1:8000). Bound antibodies were detected using HRP-conjugated secondary antibodies : anti-goat IgG (Chemicon, Temecula, CA, USA ; 1:10000) for A-FABP, or anti-mouse IgG (BD PharMingen ; 1:40000) for β-actin. Proteins were visualized by using enhanced chemiluminescence detection method (GE Healthcare).

Statistical analysis

For experiments on bladder tumor samples, an assumption of normal distribution was not possible in the different groups, so the statistical analysis was performed using non-parametric tests (Kruskal – Wallis and Mann – Whitney *U*-tests). A *p*-value of <0.05 was considered significant. To test the effect of PPAR agonist treatment on A-FABP expression, two-tailed and unpaired Student's *t* tests were conducted to calculate the *p* values. Data were expressed as means ± SD. Differences were considered significant at *p* < 0.05.

Results

Association of decreased A-FABP mRNA expression with high stage and grade bladder cancers

Using a combination of proteomic technologies, few studies have reported that A-FABP expression is decreased in invasive bladder cancer in comparison with low-stage tumors suggesting that this protein could be a molecular marker of progression in bladder cancer.⁴ We evaluated and compared A-FABP transcript levels by real-time RT-PCR from 26 bladder cancer patients according to the tumor stage and to the histologic grade. We chose as reference a non-invasive low-grade pTa tumor expressing the epithelial marker E-cadherin but not the mesenchymal marker N-cadherin.^{19, 20} The A-FABP mRNA level detected in this tumor was used as reference and set at 100% relative expression. Of 9 pTa tumors, 6 cases (66.6%) presented a high A-FABP expression. The variance among the three subgroups of patients with different tumor stage lesions was significant (Kruskal – Wallis test; $p = 0.042$). Paired comparison of the various groups revealed that levels of A-FABP mRNA significantly decreased from pT1 tumors ($n = 7$; $p = 0.037$) and in invasive pT2-T4 tumors ($n = 10$; $p = 0.026$) compared to pTa tumors (Fig. 1a). The whole patient group was then subdivided into G1 ($n = 6$), G2 ($n = 6$) and G3 ($n = 14$) grade tumors, and the respective A-FABP mRNA levels were compared to those found in G1 grade lesions (Fig. 1b). The variance among the subgroups of patients with different grade lesions was significant (Kruskal – Wallis test; $p = 0.026$). A drastically decrease of A-FABP transcripts levels was observed in G2 and G3 grade bladder cancer patients in comparison with G1 grade lesions (G1 vs G3; $p = 0.012$). Patients with G1 lesions did not significantly differ in their A-FABP mRNA levels from patients with G2 tumors. Nevertheless, the difference was nearly significant (G1 vs G2; $p = 0.068$). The International Society of Urological Pathology (ISUP) and the World Health Organization (WHO) have

proposed new criteria for new classifications in 1998 and 1999 respectively and very recently in 2004. In this context, our serie of 26 patients originally diagnosed according to the 1973 WHO classification was regraded by the revised (2004) WHO/ISUP system. The overall results obtained for *a-fabp* expression were not significantly different according to both classifications. Our data argue for the putative prognostic value of A-FABP in bladder cancer progression. We then analyzed A-FABP expression in two bladder cancer-derived cell lines RT4 (derived from a well differentiated grade I papillary tumor) and T24 (derived from an undifferentiated grade III carcinoma) at the mRNA (Fig. 1c) and protein level (Fig. 1d). As expected, A-FABP was expressed in both cell lines but to a lesser extent in T24 cells.

A-FABP expression is differentially up-regulated by PPAR α , β and γ agonists in RT4 and T24 cells

A-FABP expression (mRNA and protein) was then investigated in RT4 and T24 cells after PPAR α , β and γ activation. Cells were treated with different concentrations of WY 14,643 (PPAR α activator), L-165041 (PPAR β activator) or PPAR γ activators rosiglitazone, ciglitazone, pioglitazone, troglitazone and 15d-PGJ2. In RT4 cells, WY 14,643, rosiglitazone, and 15d-PGJ2 did not alter A-FABP expression both at the mRNA and protein level (Fig. 2a and b). Similar results were obtained with the other PPAR γ activators (data not shown). On the other hand, the PPAR β agonist L-165041 significantly increased A-FABP transcripts level in a dose-dependent manner from 1 μ M with a maximal 12.7-fold induction at a concentration of 10 μ M (Fig. 2a). Western-blotting assay revealed a weak induction at the protein level (Fig. 2b). Densitometric analysis of immunoblotting assay showed a 2-fold increase of A-FABP from 1 μ M L-165041 (data not shown). In T24 cells, A-FABP mRNA level (Fig. 3a) was increased from 5 μ M WY 14,643 with a maximal 22-fold induction at a concentration of 25 μ M. The PPAR α activator significantly increased A-FABP protein level from 5 μ M with a maximal 2-fold induction at 25

μM (Fig. 3b). As observed in RT4 cells, A-FABP expression was increased in T24 cells treated with L-165041 in comparison with control cells. This effect was observed from 1 μM at the mRNA and protein level with a maximal 32-fold induction at the mRNA level at 2 μM (Fig. 3a) and a 4-fold induction at the protein level at 1 μM (Fig. 3b). Specific PPAR γ agonists up-regulated A-FABP to a larger extent than PPAR α and β activators. Maximal effect was observed at the mRNA level at concentrations of 5 - 10 μM with a 35-fold induction with rosiglitazone and troglitazone, a 45-fold induction with ciglitazone, a 57-fold induction with pioglitazone and a 4-fold induction with 15d-PGJ2 (Fig. 3a). At the protein level, A-FABP expression was increased from 0.5 - 1 μM according to PPAR γ activators (Fig. 3b). Thus, A-FABP expression was only induced by PPAR β in well-differentiated RT4 cells and by the three PPAR isotypes in undifferentiated T24 cells.

PPAR ligands have no effect on A-FABP mRNA half-life

To assess whether A-FABP was post-transcriptionally regulated by PPAR ligands, we analysed the effect of WY 14,643 (25 μM), L-165041 (10 μM) or rosiglitazone (10 μM) on A-FABP mRNA stability. T24 cells were treated or not with PPAR activators and then transcription was inhibited with actinomycin D at different times. A-FABP mRNA decayed rapidly in untreated cells with a half-life of 8 h. In the presence of PPAR ligands there was no increase of A-FABP mRNA half-life in comparison with the control cells suggesting that PPAR agonists did not modify A-FABP mRNA stability and that PPAR regulate the *a-fabp* gene at the transcriptional level (Fig. 4).

PPAR agonist-mediated induction of A-FABP mRNA expression in T24 cells requires protein synthesis

To determine whether *de novo* protein synthesis is required for the regulation of A-FABP mRNA transcription by PPAR, cells were treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ CHX (an inhibitor of protein synthesis) for 30 min. Then, cells were washed and stimulated or not by PPAR agonists for an additional 24 h (Fig. 5). PPAR α , β and γ activation significantly increased A-FABP mRNA expression as previously demonstrated. Treatment with CHX completely prevented PPAR ligand-mediated up-regulation of A-FABP transcripts indicating that stimulation of A-FABP mRNA expression by synthetic PPAR agonists required increased synthesis of proteins such as regulatory proteins.

PPAR agonist-mediated induction of A-FABP involves a PPAR-dependent mechanism in RT4 and T24 cells

To explore whether the effects of PPAR ligands were really mediated through the activation of PPAR, RT4 and T24 cells were treated with specific PPAR isotype antagonists namely GW6471 for PPAR α , sulindac sulfide for PPAR β and GW9662 for PPAR γ . The effect of L-165041 was abolished in the presence of sulindac sulfide in both RT4 (Fig. 6a) and T24 cells (Fig. 6c). GW6471 inhibited the effects of WY 14,643 (Fig. 6b), and GW9662 abolished the thiazolidinediones (Fig. 6d) and 15d-PGJ2 action (data not shown) in T24 cells. These data suggest that A-FABP overexpression was mediated through PPAR α , PPAR β and PPAR γ -dependent signal transduction pathway.

To strengthen these results, cells were treated either with WY 14,643 in the presence of PPAR β or PPAR γ antagonists (Fig. 6e), or with L-165041 in the presence of PPAR α or PPAR γ antagonists (Fig. 6f) or with rosiglitazone in the presence of PPAR α or PPAR β antagonists (Fig.

6g). Whatever the conditions used, each PPAR ligand mediated its effects through only its specific receptor because the up-regulation of A-FABP by the different PPAR agonists was recovered in each case.

Accepted Preprint

Discussion

Several studies have demonstrated differential expression patterns of FABP in various cancers and in some cases, FABP could be used as tumor markers. For example, high H-FABP expression in human gastric carcinoma is associated with tumor aggressiveness, metastasis and poor patient survival.²¹ In astrocytomas, expression of B-FABP is associated with regions of tumor infiltration and recurrence.²² B-FABP is reported to be a specific marker for renal cell carcinomas.²³ L-FABP protein may play a key role in invasion and metastasis spreading in human breast cancer since it is significantly elevated in ductal infiltrating breast carcinoma.²⁴ On the other hand, loss of L-FABP occurs at the adenoma stage of colorectal tumor development, indicating that L-FABP could be a marker of colorectal cancer differentiation.²⁵ E-FABP expression is increased in drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas.²⁶ It is suggested to be a metastasis-inducing gene in prostate cancer through *veg*f (vascular endothelial growth factor) gene up-regulation.^{27, 28} With regard to A-FABP, the protein on which we have focused our attention, its expression is also down-regulated in breast cancer cell lines in comparison with breast normal cell lines.²⁹

Meantime, there have been few studies on FABP family members' expression in bladder cancer. Less-differentiated bladder tumors were characterized by a decreased expression of E-FABP protein³⁰ and low-grade tumors expressed A-FABP to a higher extent than their high-grade counterparts.³ Loss of A-FABP protein has been convincingly identified as a marker of progression of human bladder TCC.⁴ Most of the published data are related to A-FABP protein expression using a combination of proteomic technologies. In the present work, after optimizing a method of A-FABP mRNA quantification by real-time RT-PCR, we demonstrated a significant decrease of A-FABP mRNA levels according to the tumor stage and the histologic grade of bladder TCC. Our study was carried out within a little cohort of patients. Nevertheless, in agreement with Celis *et al.* studies,²⁻⁴ our data demonstrate a good prognostic value of A-

FABP in bladder cancer. Thus, A-FABP could be considered as a tumor suppressor gene. We think that a high A-FABP expression could be required to avoid bladder cancer progression. That is why we focused our attention on the regulation of the *a-fabp* gene in order to identify molecules able to induce its expression.

According to the literature, *A-fabp* is a PPAR γ target gene. Indeed, both natural (15d-PGJ2) and synthetic PPAR γ agonists (rosiglitazone and troglitazone) increased A-FABP mRNA in both primary human monocytes and the monocytic cell line, THP-1.³¹ In addition, a study showed that the treatment of bladder cancer T24 cell line with the PPAR γ agonist troglitazone induced A-FABP.³² In this context, the present investigation was initiated to evaluate the role of PPAR in A-FABP regulation in bladder cancer cells since PPAR have been shown to play critical role in carcinogenesis. We hypothesized that PPAR γ as well as PPAR α and PPAR β could regulate A-FABP expression in bladder cancer cells. We examined A-FABP expression (mRNA and protein) after the three PPAR isotype activation in T24 cells, derived from a grade III undifferentiated carcinoma and in RT4 cells, derived from a grade I well-differentiated bladder papillary tumor to compare results. In a previous study, we demonstrated that all PPAR are not only expressed but also functional in RT4 and T24 cells.³³

In the present work, contrary to previous studies in which A-FABP was not detected in T24 cells, we detected by western blotting analysis a very low quantity of A-FABP. As expected, A-FABP was expressed to a higher extent in RT4 cells than in T24 cells. The lower expression of A-FABP in T24 cells was not due to deregulated expression of PPAR γ (data not shown). In well differentiated RT4 cells, PPAR α and PPAR γ activation did non affect A-FABP mRNA and protein expression whereas PPAR β synthetic agonist (L-165041) slightly increased A-FABP expression (mRNA and protein). In contrast, in T24 cells, we have established, for the first time to our knowledge, a PPAR α - and PPAR β - mediated up-regulation of A-FABP expression and the effect of different PPAR γ agonists. Nevertheless, the PPAR γ natural agonist 15d-PGJ2 increased faintly A-FABP mRNA and protein expression compared to other PPAR γ

activators. The concentrations of PPAR γ agonists in this study were much higher than the Kds for binding which are, for example, in order of 700 nM for troglitazone and 40 nM for rosiglitazone.^{34, 35} The natural agonist 15d-PGJ2 has much lower affinity for the receptor with a Kd>1 μ M.^{36, 37}

Several studies reported that PPAR ligand effects, and more especially thiazolidinedione action, could be mediated through PPAR-independent signaling pathways at high concentrations. Here, we demonstrated that the effects of all PPAR activators were mediated through a PPAR-dependent pathway since specific PPAR antagonists inhibited their action on A-FABP expression.

The absence of PPAR α and γ effects on A-FABP expression in RT4 cells is not due to a persistent effect of endogenous ligands in control cells since A-FABP level is not decreased in the presence of PPAR antagonists (data not shown). In the one hand, the differential regulation of A-FABP by PPAR could depend on the differentiated state of the cells. Indeed, in the well-differentiated RT4 cells, the mesenchymal marker N-cadherin is not expressed whereas the epithelial marker E-cadherin is detected. Inversely, in poorly differentiated T24 cells, E-cadherin is absent and replaced by N-cadherin.²⁰ On the other hand, coregulator proteins can dramatically influence the activity of nuclear receptors and other transcription factors, thereby influencing cell fate.³⁸ RT4 cells could be deficient for a specific PPAR α and γ coactivator or characterized by the overexpression of a corepressor protein.

We showed that A-FABP mRNA half-life was estimated at 8 h and there was no stabilization of A-FABP transcripts after PPAR activation suggesting a regulation at the transcriptional level.

The highest induction of human A-FABP by PPAR γ synthetic agonists could be explained by a differential affinity of PPAR γ for the promoter as previously described for the murine homologue.³⁹ However, the molecular mechanism for the up-regulation of A-FABP by PPAR γ has not been addressed and functional PPRE has not been identified in the promoter of

human A-FABP. Sequence analysis showed that there was no PPRE-like motif in human A-FABP promoter.⁴⁰ Rival et al. all the same have characterized a functional promoter of the human *a-fabp* gene and showed that rosiglitazone and pioglitazone displayed a high efficacy on reporter-gene assays in COS-7 cells cotransfected by a human A-FABP promoter-based Luc reporter vector and full-length human PPAR expression plasmids. Surprisingly, in these experiments, a selective PPAR α agonist (BM-17.1744) did not stimulate the human A-FABP-PPAR α promoter reporter-gene assay.⁴¹ In the same way, in RAW 264.7 cells, agents such as clofibrate or WY 14,643 which are ligands for the related receptor PPAR α , also had no effect on the induction of A-FABP.³¹ In our cellular model, the PPAR α activator WY 14,643 significantly increased A-FABP mRNA (22-fold) and protein (2-fold) level in T24 cells whereas it had no effect in RT4 cells.

In addition, our experiments in the presence of the protein synthesis inhibitor CHX, suggest that the up-regulation of A-FABP mRNA expression by PPAR agonists requires the synthesis of new proteins which are labile proteins with a short half-life since a 30 min CHX treatment abolished PPAR effect. PPAR are still present (data not shown) at this time. Besides, the estimated half-life of PPAR proteins is about 2 h.⁴² These results indicate an indirect molecular mechanism of *a-fabp* gene regulation by PPARs in our cellular model.

Altogether, these data evoke that the dogma establishing that PPAR-regulated genes contain one or more PPRE or DR-1 motifs in their promoter and respond *via* PPAR activation directly through nuclear receptor binding to the promoter is not so clear. Our results provided evidence that this scheme is probably not so simple since an intermediary protein is needed for PPAR agonist-mediated A-FABP transcriptional regulation.

Thus, in our cellular model, a regulatory protein could be induced by PPAR and then interact with the promoter of the *a-fabp* gene. This intermediary regulatory protein could be a regulator of lipid metabolism such as LXR α (Liver X receptor alpha). LXR α is a member of the nuclear hormone receptor superfamily that forms obligatory heterodimer with RXR and can be activated

by both RXR and LXR ligands. RXR/LXR heterodimers activate their target genes by binding to a LXR Response element (LXRE) located in the promoter. LXR has been shown to regulate the expression of a number of genes involved in cholesterol and triglyceride metabolism. The accumulation of fatty acids and cholesterol has been described for a number of solid tumors.⁴³⁻⁴⁵ Tobin et al. suggest that several potential PPRE like sequences are located throughout the LXR α 5' flanking region.⁴⁶ Furthermore, rosiglitazone has been shown to induce LXR α mRNA expression in macrophages through PPAR γ .⁴⁷ In addition, A-FABP has been recently described as a novel LXR target gene in THP-1 cells and macrophages.⁴⁰ Thus, LXR could regulate A-FABP directly *via* the promoter and indirectly since LXR is also a transcriptional regulator of SREBP (Sterol-Regulatory Element Binding Protein) such as SREBP-1c (also termed ADD1). LXR ligands have been shown to activate SREBP-1c expression by inducing binding of LXR to binding sites on the promoter.⁴⁸ SREBP-1c has been described as a factor involved in adipocyte differentiation.⁴⁹ It has been postulated that deregulation of SREBP controlled gene expression could contribute to cell transformation and tumor development.⁵⁰ SREBP bind to DNA sequences that contain a direct repeat of 5'-PyCAPy-3', designed as the sterol regulatory element (SRE). SREBP is a known transcriptional activator of PPAR γ ⁵¹ and is a suggested activator of A-FABP.

Further experiments are required to clarify the complex molecular mechanism involved in PPAR-mediated up-regulation of A-FABP in undifferentiated bladder cancer cells.

To conclude, A-FABP is a potential candidate as a predictor of infiltrating or invasive bladder cancer. In the present work, we demonstrated for the first time a differential PPAR-mediated up-regulation of A-FABP expression in human bladder cancer cells according to the differentiation state of the cells that involves an intermediary protein and appears through an indirect molecular mechanism. In pT1 superficial tumors for which A-FABP is no more expressed, pharmacological agents such as fibrates and thiazolidinediones which are PPAR

agonists may provide an exciting novel therapeutic strategy by inducing A-FABP expression to avoid tumor progression.

Acknowledgments

We thank Dr S. Monnier-Benoit for his expertise to optimize RTqPCR assays, Adeline Lavoignat for technical assistance and Franck Monnier for statistical analyses. This work was supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (comités du Doubs et du Jura) and Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC).

Accepted Preprint

References

1. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1435-48.
2. Celis A, Rasmussen HH, Celis P, Basse B, Lauridsen JB, Ratz G, Hein B, Ostergaard M, Wolf H, Orntoft T, Celis JE. Short-term culturing of low-grade superficial bladder transitional cell carcinomas leads to changes in the expression levels of several proteins involved in key cellular activities. *Electrophoresis* 1999;20:355-61.
3. Celis JE, Ostergaard M, Basse B, Celis A, Lauridsen JB, Ratz GP, Andersen I, Hein B, Wolf H, Orntoft TF, Rasmussen HH. Loss of adipocyte-type fatty acid binding protein and other protein biomarkers is associated with progression of human bladder transitional cell carcinomas. *Cancer Res* 1996;56:4782-90.
4. Ohlsson G, Moreira JM, Gromov P, Sauter G, Celis JE. Loss of expression of the adipocyte-type fatty acid-binding protein (A-FABP) is associated with progression of human urothelial carcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:570-81.
5. Wolfrum C. Cytoplasmic fatty acid binding protein sensing fatty acids for peroxisome proliferator activated receptor activation. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:2465-76.
6. Glatz JF, Borchers T, Spener F, van der Vusse GJ. Fatty acids in cell signalling: modulation by lipid binding proteins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1995;52:121-7.
7. Glatz JF, Vork MM, van der Vusse GJ. Significance of cytoplasmic fatty acid-binding protein for the ischemic heart. *Mol Cell Biochem* 1993;123:167-73.
8. Spitsberg VL, Matitashvili E, Gorewit RC. Association and coexpression of fatty-acid-binding protein and glycoprotein CD36 in the bovine mammary gland. *Eur J Biochem* 1995;230:872-8.

9. De Santis ML, Hammamieh R, Das R, Jett M. Adipocyte-fatty acid binding protein induces apoptosis in DU145 prostate cancer cells. *J Exp Ther Oncol* 2004;4:91-100.
10. Tan NS, Shaw NS, Vinckenbosch N, Liu P, Yasmin R, Desvergne B, Wahli W, Noy N. Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol* 2002;22:5114-27.
11. Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995;83:841-50.
12. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999;20:649-88.
13. Wang T, Xu J, Yu X, Yang R, Han ZC. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;58:1-14.
14. Hertzel AV, Bernlohr DA. Regulation of adipocyte gene expression by polyunsaturated fatty acids. *Mol Cell Biochem* 1998;188:33-9.
15. Sobin LH, Fleming ID. TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 1997;80:1803-4.
16. Lopez-Beltran A, Montironi R. Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. *Eur Urol* 2004;46:170-6.
17. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:2003-7.
18. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004;64:5245-50.
19. Clairotte A, Lascombe I, Fauconnet S, Mauny F, Felix S, Algros MP, Bittard H, Kantelip B. Expression of E-cadherin and alpha-, beta-, gamma-catenins in patients with bladder

cancer: identification of gamma-catenin as a new prognostic marker of neoplastic progression in T1 superficial urothelial tumors. *Am J Clin Pathol* 2006;125:119-26.

20. Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S, Bernardini S, Wallerand H, Kantelip B, Bittard H. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clin Cancer Res* 2006;12:2780-7.

21. Hashimoto T, Kusakabe T, Sugino T, Fukuda T, Watanabe K, Sato Y, Nashimoto A, Honma K, Kimura H, Fujii H, Suzuki T. Expression of heart-type fatty acid-binding protein in human gastric carcinoma and its association with tumor aggressiveness, metastasis and poor prognosis. *Pathobiology* 2004;71:267-73.

22. Mita R, Coles JE, Glubrecht DD, Sung R, Sun X, Godbout R. B-FABP-expressing radial glial cells: the malignant glioma cell of origin? *Neoplasia* 2007;9:734-44.

23. Teratani T, Domoto T, Kuriki K, Kageyama T, Takayama T, Ishikawa A, Ozono S, Nozawa R. Detection of transcript for brain-type fatty Acid-binding protein in tumor and urine of patients with renal cell carcinoma. *Urology* 2007;69:236-40.

24. Li H, Lu Q, Dong LH, Xue H, Zhou HY, Yang HJ. [Expression of fatty acid binding protein in human breast cancer tissues]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2007;23:312-6.

25. Lawrie LC, Dundas SR, Curran S, Murray GI. Liver fatty acid binding protein expression in colorectal neoplasia. *Br J Cancer* 2004;90:1955-60.

26. Sinha P, Hutter G, Kottgen E, Dietel M, Schadendorf D, Lage H. Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3-sigma (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas. *Electrophoresis* 1999;20:2952-60.

27. Adamson J, Morgan EA, Beesley C, Mei Y, Foster CS, Fujii H, Rudland PS, Smith PH, Ke Y. High-level expression of cutaneous fatty acid-binding protein in prostatic carcinomas and its effect on tumorigenicity. *Oncogene* 2003;22:2739-49.

28. Jing C, Beesley C, Foster CS, Chen H, Rudland PS, West DC, Fujii H, Smith PH, Ke Y. Human cutaneous fatty acid-binding protein induces metastasis by up-regulating the expression of vascular endothelial growth factor gene in rat Rama 37 model cells. *Cancer Res* 2001;61:4357-64.
29. Hammamieh R, Chakraborty N, Barmada M, Das R, Jett M. Expression patterns of fatty acid binding proteins in breast cancer cells. *J Exp Ther Oncol* 2005;5:133-43.
30. Ostergaard M, Rasmussen HH, Nielsen HV, Vorum H, Orntoft TF, Wolf H, Celis JE. Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation. *Cancer Res* 1997;57:4111-7.
31. Pelton PD, Zhou L, Demarest KT, Burris TP. PPARgamma activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:456-8.
32. Guan YF, Zhang YH, Breyer RM, Davis L, Breyer MD. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human transitional bladder cancer and its role in inducing cell death. *Neoplasia* 1999;1:330-9.
33. Fauconnet S, Lascombe I, Chabannes E, Adessi GL, Desvergne B, Wahli W, Bittard H. Differential regulation of vascular endothelial growth factor expression by peroxisome proliferator-activated receptors in bladder cancer cells. *J Biol Chem* 2002;277:23534-43.
34. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 1995;270:12953-6.
35. Willson TM, Cobb JE, Cowan DJ, Wiethe RW, Correa ID, Prakash SR, Beck KD, Moore LB, Kliewer SA, Lehmann JM. The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J Med Chem* 1996;39:665-8.

36. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995;83:803-12.
37. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995;83:813-9.
38. Puigserver P, Ribot J, Serra F, Gianotti M, Bonet ML, Nadal-Ginard B, Palou A. Involvement of the retinoblastoma protein in brown and white adipocyte cell differentiation: functional and physical association with the adipogenic transcription factor C/EBPalpha. *Eur J Cell Biol* 1998;77:117-23.
39. Schachtrup C, Emmler T, Bleck B, Sandqvist A, Spener F. Functional analysis of peroxisome proliferator response element motifs in genes of fatty acid binding proteins. *Biochem J* 2004;382:239-45.
40. Liu QY, Quinet E, Nambi P. Adipocyte fatty acid-binding protein (aP2), a newly identified LXR target gene, is induced by LXR agonists in human THP-1 cells. *Mol Cell Biochem* 2007;302:203-13.
41. Rival Y, Stennevin A, Puech L, Rouquette A, Cathala C, Lestienne F, Dupont-Passelaigue E, Patoiseau JF, Wurch T, Junquero D. Human adipocyte fatty acid-binding protein (aP2) gene promoter-driven reporter assay discriminates nonlipogenic peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311:467-75.
42. Waite KJ, Floyd ZE, Arbour-Reily P, Stephens JM. Interferon-gamma-induced regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and STATs in adipocytes. *J Biol Chem* 2001;276:7062-8.
43. Alo PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer* 1996;77:474-82.

44. Pizer ES, Lax SF, Kuhajda FP, Pasternack GR, Kurman RJ. Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma: correlation with cell proliferation and hormone receptors. *Cancer* 1998;83:528-37.
45. Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgraum LZ, Zahurak M, Pasternack GR, Kuhajda FP, Hamilton SR. Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 1997;150:201-8.
46. Tobin KA, Steineger HH, Alberti S, Spydevold O, Auwerx J, Gustafsson JA, Nebb HI. Cross-talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 2000;14:741-52.
47. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 2001;7:161-71.
48. Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Hastay AH, Matsuzaka T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, et al. Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol Cell Biol* 2001;21:2991-3000.
49. Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol* 1993;13:4753-9.
50. Swinnen JV, Heemers H, van de Sande T, de Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G. Androgens, lipogenesis and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;92:273-9.
51. Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:4333-7.

Figure Legends

FIGURE 1 - Expression of A-FABP in bladder tumors and in cancer cell lines. A-FABP transcript levels were measured by real-time RT-PCR and normalized to ATP5 β in bladder tumors (n=26) as described under Materials and Methods section. Patients were subdivided according to tumor stage (*a*) and histologic grade (*b*). Values represent fold difference compared to A-FABP transcript level in one pTaG1 tumor expressing the epithelial marker E-cadherin but not the mesenchymal marker N-cadherin and used as reference. (*c*) RT-PCR analysis of A-FABP expression in RT4 and T24 bladder cancer derived-cell lines. (*d*) Whole protein levels of A-FABP determined by western-blot analysis in RT4 and T24 cells and β -actin was used as loading control.

FIGURE 2 - Effect of PPAR agonists on A-FABP (mRNA and protein) expression in RT4 cells. Cells were stimulated in serum-free Mc COY's 5a medium with WY14,643 (PPAR α ligand), L-165041 (PPAR β ligand), rosiglitazone, ciglitazone, pioglitazone, troglitazone or 15d-PGJ2 (PPAR γ ligands) at the indicated concentrations or vehicle for 24 h. The mRNA expression of A-FABP was analysed by quantitative real time RT-PCR (*a*). Fold induction represents comparison with vehicle-treated cells (set at 1) in the absence of PPAR agonist. Values are means \pm SDs of three independent experiments in quadruplicates. The significance of the data was determined using Student's *t*-test (two-tailed). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs corresponding vehicle control. Total cellular protein level of A-FABP was determined by immunoblot analysis and β -actin was used as loading control (*b*).

FIGURE 3 - Effect of PPAR agonists on A-FABP (mRNA and protein) expression in T24 cells. Cells were stimulated in serum-free Mc COY's 5a medium with WY14,643 (PPAR α ligand), L-165041 (PPAR β ligand), rosiglitazone, ciglitazone, pioglitazone, troglitazone or 15d-

PGJ2 (PPAR γ ligands) at the indicated concentrations or vehicle for 24 h. The mRNA expression of A-FABP was analysed by quantitative real time RT-PCR (a). Fold induction represents comparison with vehicle-treated cells (set at 1) in the absence of PPAR agonist. Values are means \pm SDs of three independent experiments in quadruplicates. The significance of the data was determined using Student's *t*-test (two-tailed). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs corresponding vehicle control. Total cellular protein level of A-FABP was determined by immunoblot analysis and β -actin was used as loading control (b).

FIGURE 4 - Effect of PPAR agonists on the stability of A-FABP mRNA. Confluent T24 cells were incubated with or without 25 μ M WY14,643, or 10 μ M L-165041, or 10 μ M rosiglitazone for 16 h and subsequently treated with 5 μ g/ml actinomycin D. Total RNA was extracted at the indicated times after the transcription inhibitor addition and assayed for quantitative real time RT-PCR. Indicated percentages represent A-FABP mRNA in PPAR ligand-treated cells or untreated cells relative to the appropriate control (vehicle or PPAR ligands at time 0) in the absence of actinomycin D. Data represent one experiment in quadruplicates for each treatment and the experiment has been repeated twice with similar results.

FIGURE 5 - Effect of a protein synthesis inhibitor in PPAR-mediated induction of A-FABP expression in T24 cells. Cells were pre-treated in serum-free Mc COY's 5a medium with 10 μ M cycloheximide (CHX) for 30 min. Then, cells were washed and stimulated with vehicle or with 25 μ M WY14,643, 10 μ M L-165041, 10 μ M rosiglitazone, for 24 h. The mRNA expression of A-FABP was analysed by quantitative real time RT-PCR. Fold induction represents comparison with vehicle-treated cells (set at 1) in the absence of PPAR agonist. Values are means \pm SDs of three independent experiments in quadruplicates.

FIGURE 6 - Effect of PPAR inhibition on A-FABP expression in RT4 and T24 cells. Cells were stimulated in serum-free Mc COY's 5a medium with the respective compounds at the indicated concentrations or vehicle for 24 h. (a) RT4 cells were stimulated with 10 μ M L-165041 in the absence or presence of 50 μ M sulindac sulfide (PPAR β specific competitive inhibitor). (b) T24 cells were stimulated with 25 μ M WY14,643 in the absence or presence of 10 μ M GW6471 (PPAR α specific competitive inhibitor). (c) T24 cells were stimulated with 10 μ M L-165041 in the absence or presence of 50 μ M sulindac sulfide. (d) T24 cells were stimulated with 1 μ M thiazolidinedione (rosiglitazone, ciglitazone, pioglitazone, troglitazone) in the absence or presence of 10 μ M GW9662 (PPAR γ specific competitive inhibitor). (e) T24 cells were treated with or without 25 μ M WY 14,643 in the presence of 50 μ M PPAR β or 10 μ M PPAR γ antagonists. (f) T24 cells were treated with or without 10 μ M L-165041 in the presence of 10 μ M PPAR α or 10 μ M PPAR γ antagonists. (g) T24 cells were treated with or without 1 μ M rosiglitazone in the presence of 10 μ M PPAR α or 50 μ M PPAR β antagonists. Total cellular protein level of A-FABP was determined by immunoblot analysis. B-actin was used as loading control. Gels are representative of two independent experiments in triplicates.

TABLE I - Clinicopathologic features of patients ($N=26$)
with bladder cancer included in this molecular study

Characteristics	Values
Age (y)	
Median (range)	67 (38 – 95)
Sex	
Male	17
Female	9
Pathologic stage	
pTa	9
pT1	7
pT2 – T4	10
Histologic grade	
1973 WHO	
G1	6
G2	6
G3	14
2004 WHO	
Low malignant potential	1
Low grade	12
High grade	13

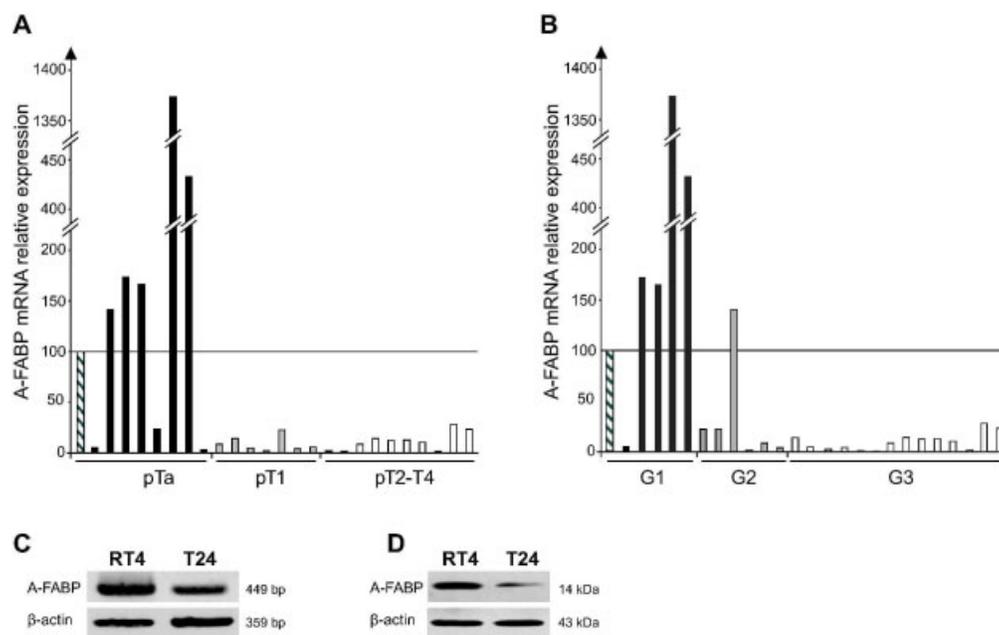


FIGURE 1 - Expression of A-FABP in bladder tumors and in cancer cell lines. A-FABP transcript levels were measured by real-time RT-PCR and normalized to ATP5 β in bladder tumors (n=26) as described under Materials and Methods section. Patients were subdivided according to tumor stage (a) and histologic grade (b) (see Table II for more details). Values represent fold difference compared to A-FABP transcript level in one pTaG1 tumor expressing the epithelial marker E-cadherin but not the mesenchymal marker N-cadherin and used as reference. (c) RT-PCR analysis of A-FABP expression in RT4 and T24 bladder cancer derived-cell lines. (d) Whole protein levels of A-FABP determined by western-blot analysis in RT4 and T24 cells and β -actin was used as loading control.
163x103mm (600 x 600 DPI)

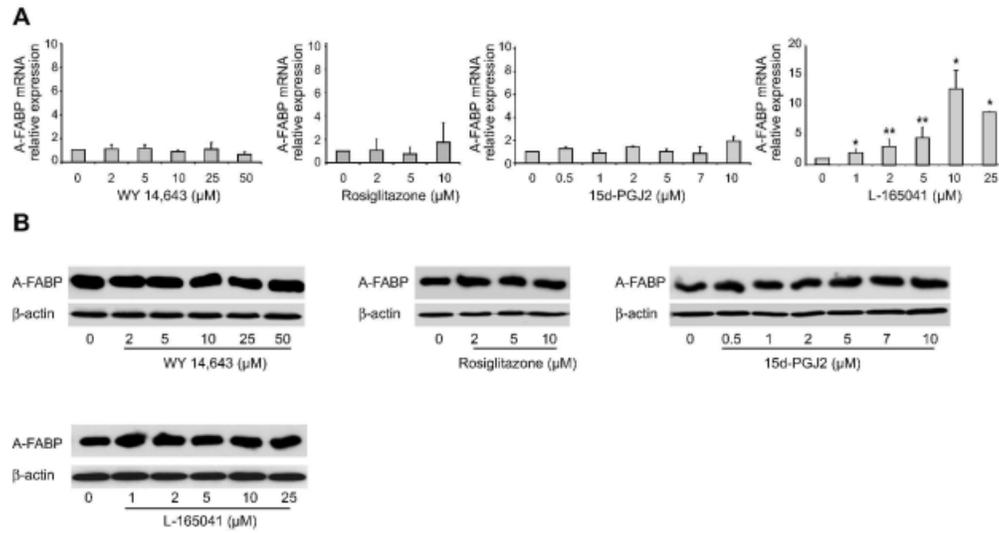


FIGURE 2 - Effect of PPAR agonists on A-FABP (mRNA and protein) expression in RT4 cells. Cells were stimulated in serum-free Mc COY's 5a medium with WY14,643 (PPAR α ligand), L-165041 (PPAR β ligand), rosiglitazone, ciglitazone, pioglitazone, troglitazone or 15d-PGJ2 (PPAR γ ligands) at the indicated concentrations or vehicle for 24 h. The mRNA expression of A-FABP was analysed by quantitative real time RT-PCR (a). Fold induction represents comparison with vehicle-treated cells (set at 1) in the absence of PPAR agonist. Values are means \pm SDs of three independent experiments in quadruplicates. The significance of the data was determined using Student's t-test (two-tailed). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs corresponding vehicle control. Total cellular protein level of A-FABP was determined by immunoblot analysis and β -actin was used as loading control (b).
173x92mm (600 x 600 DPI)

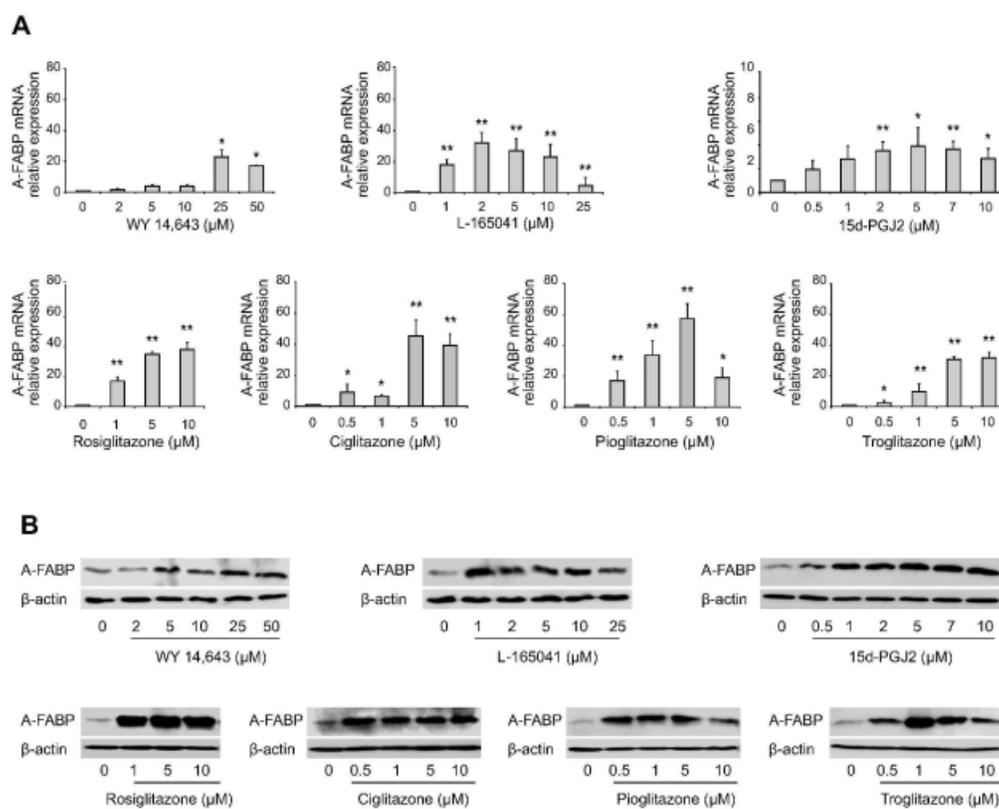


FIGURE 3 - Effect of PPAR agonists on A-FABP (mRNA and protein) expression in T24 cells. Cells were stimulated in serum-free Mc COY's 5a medium with WY14,643 (PPAR α ligand), L-165041 (PPAR β ligand), rosiglitazone, ciglitazone, pioglitazone, troglitazone or 15d-PGJ2 (PPAR γ ligands) at the indicated concentrations or vehicle for 24 h. The mRNA expression of A-FABP was analysed by quantitative real time RT-PCR (a). Fold induction represents comparison with vehicle-treated cells (set at 1) in the absence of PPAR agonist. Values are means \pm SDs of three independent experiments in quadruplicates. The significance of the data was determined using Student's t-test (two-tailed). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs corresponding vehicle control. Total cellular protein level of A-FABP was determined by immunoblot analysis and β -actin was used as loading control (b).

161x129mm (600 x 600 DPI)

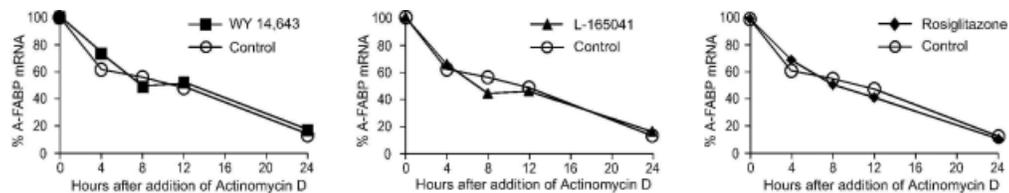


FIGURE 4 - Effect of PPAR agonists on the stability of A-FABP mRNA. Confluent T24 cells were incubated with or without 25 μ M WY14,643, or 10 μ M L-165041, or 10 μ M rosiglitazone for 16 h and subsequently treated with 5 μ g/ml actinomycin D. Total RNA was extracted at the indicated times after the transcription inhibitor addition and assayed for quantitative real time RT-PCR. Indicated percentages represent A-FABP mRNA in PPAR ligand-treated cells or untreated cells relative to the appropriate control (vehicle or PPAR ligands at time 0) in the absence of actinomycin D. Data represent one experiment in quadruplicates for each treatment and the experiment has been repeated twice with similar results.
172x32mm (600 x 600 DPI)

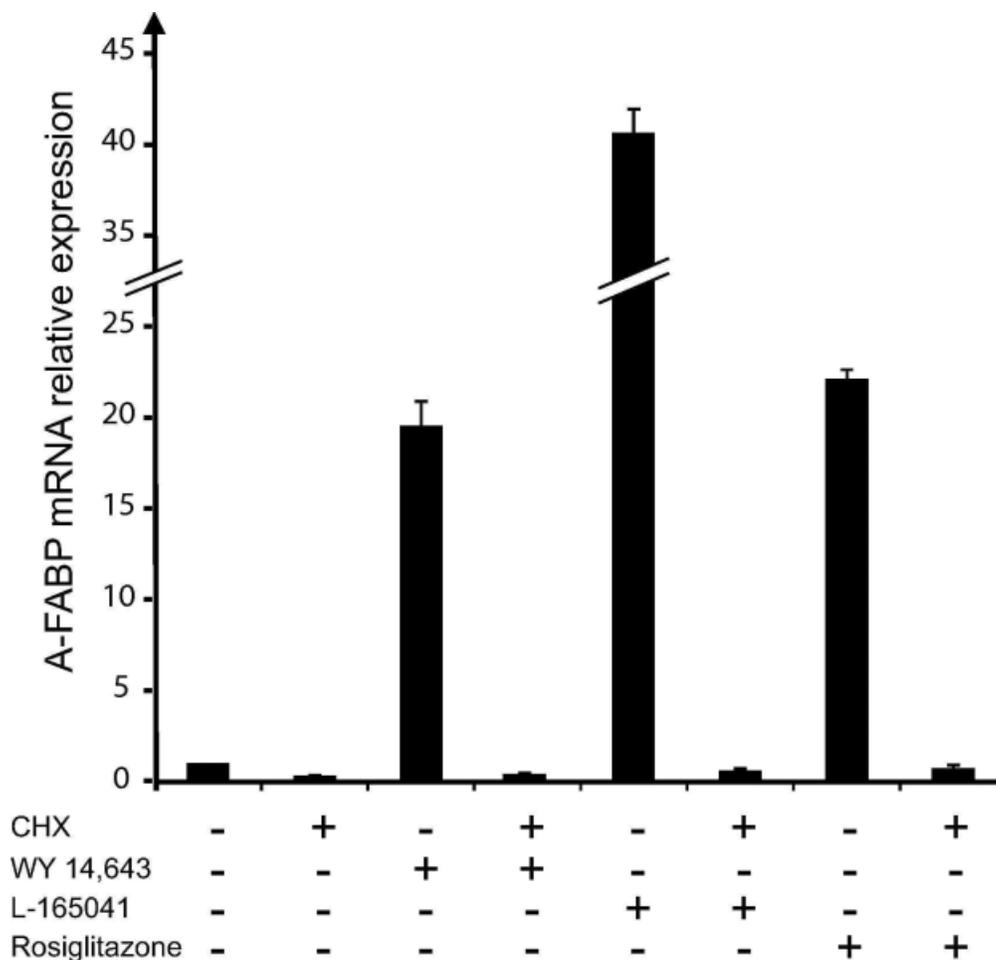


FIGURE 5 - Effect of a protein synthesis inhibitor in PPAR-mediated induction of A-FABP expression in T24 cells. Cells were pre-treated in serum-free Mc COY's 5a medium with 10 μ M cycloheximide (CHX) for 30 min. Then, cells were washed and stimulated with vehicle or with 25 μ M WY14,643, 10 μ M L-165041, 10 μ M rosiglitazone, for 24 h. The mRNA expression of A-FABP was analysed by quantitative real time RT-PCR. Fold induction represents comparison with vehicle-treated cells (set at 1) in the absence of PPAR agonist. Values are means \pm SDs of three independent experiments in quadruplicates.

73x71mm (600 x 600 DPI)

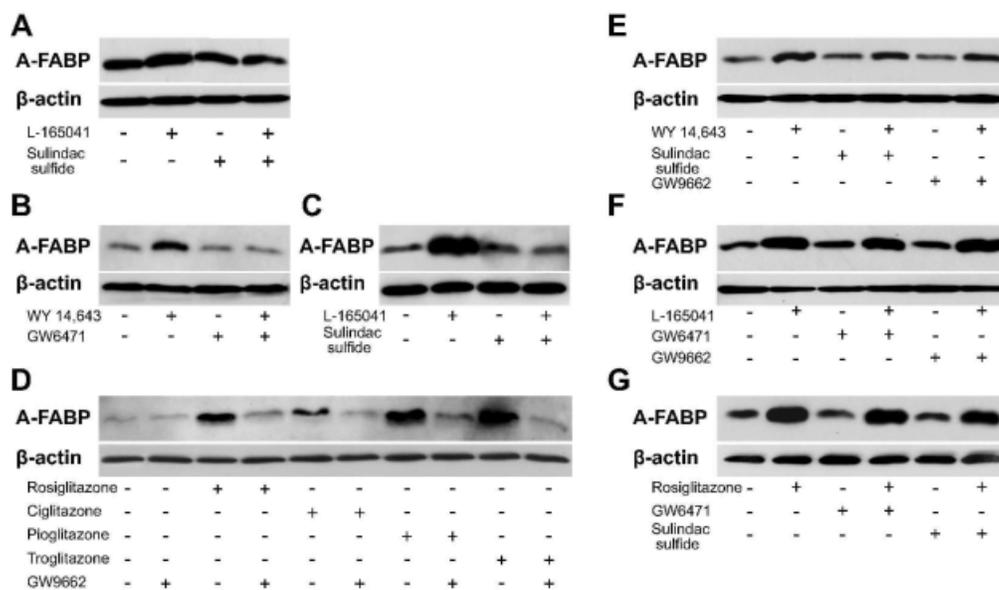


FIGURE 6 - Effect of PPAR inhibition on A-FABP expression in RT4 and T24 cells. Cells were stimulated in serum-free McCoy's 5a medium with the respective compounds at the indicated concentrations or vehicle for 24 h. (a) RT4 cells were stimulated with 10 μ M L-165041 in the absence or presence of 50 μ M sulindac sulfide (PPAR β specific competitive inhibitor). (b) T24 cells were stimulated with 25 μ M WY14,643 in the absence or presence of 10 μ M GW6471 (PPAR α specific competitive inhibitor). (c) T24 cells were stimulated with 10 μ M L-165041 in the absence or presence of 50 μ M sulindac sulfide. (d) T24 cells were stimulated with 1 μ M thiazolidinedione (rosiglitazone, ciglitazone, pioglitazone, troglitazone) in the absence or presence of 10 μ M GW9662 (PPAR γ specific competitive inhibitor). (e) T24 cells were treated with or without 25 μ M WY 14,643 in the presence of 50 μ M PPAR β or 10 μ M PPAR γ antagonists. (f) T24 cells were treated with or without 10 μ M L-165041 in the presence of 10 μ M PPAR α or 10 μ M PPAR γ antagonists. (g) T24 cells were treated with or without 1 μ M rosiglitazone in the presence of 10 μ M PPAR α or 50 μ M PPAR β antagonists. Total cellular protein level of A-FABP was determined by immunoblot analysis. β -actin was used as loading control. Gels are representative of two independent experiments in triplicates.

139x82mm (600 x 600 DPI)

Nous avons donc montré que les ligands des PPAR régulent l'expression d'un marqueur potentiel de progression des tumeurs de la vessie, la A-FABP. Un autre membre de la famille des FABP est aussi exprimé dans les cellules RT4 et T24, il s'agit de la E-FABP. Nous avons donc étudié l'effet des agonistes des PPAR α , β et γ sur l'expression protéique de la E-FABP.

VI. Régulation de l'expression de la E-FABP par des agonistes des PPAR dans les cellules RT4 et T24

Les cellules RT4 et T24 ont été stimulées par différentes concentrations de ligands synthétiques des PPAR α , β et γ (WY 14,643, L-165041 et rosiglitazone) et différentes concentrations d'un ligand naturel de PPAR γ (15dPGJ2).

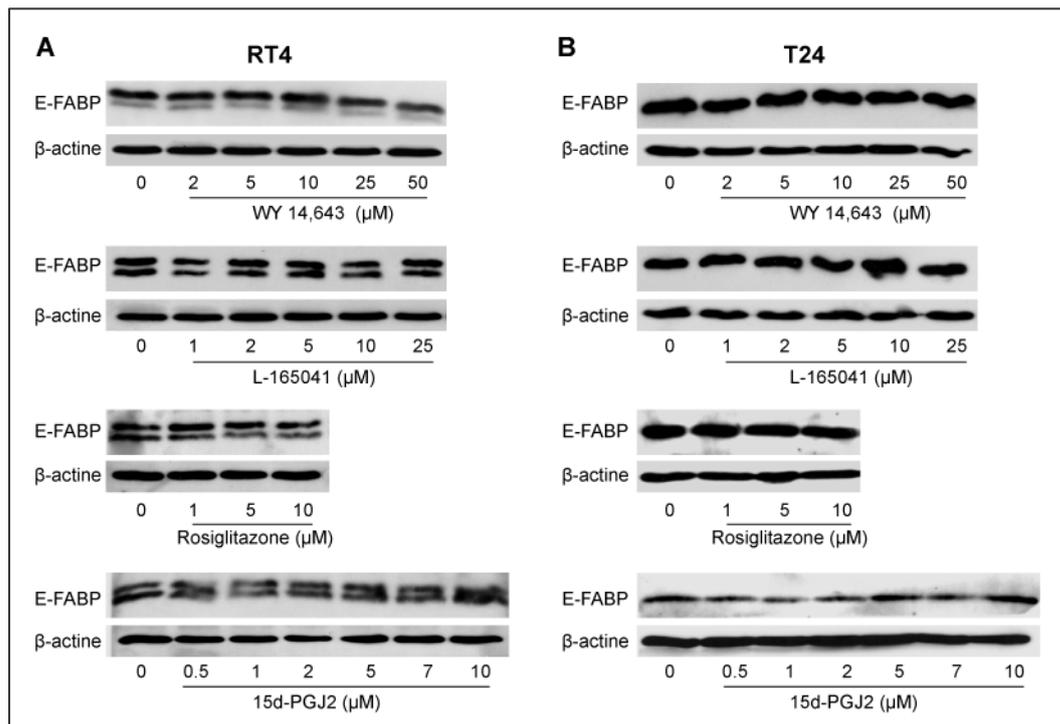


Figure 24 Effet des agonistes de PPAR sur l'expression protéique de la E-FABP dans les cellules RT4 et T24.

Les cellules RT4 (A) et T24 (B) ont été incubées dans un milieu Mc COY's 5a dépourvu de sérum puis stimulées ou non par les ligands de PPAR, WY14,643, L-165041, Rosiglitazone ou 15d-PGJ2 aux concentrations indiquées. Le taux protéique de E-FABP a été déterminé par western-blotting grâce à un anticorps anti-E-FABP (cf Annexe 1). La β -actine a été utilisée comme témoin de dépôt d'une quantité équivalente de protéines dans chaque puits. Ces expériences sont représentatives de trois expériences réalisées sur trois déterminations.

Confirmant nos résultats présentés précédemment, l'analyse par western-blotting de l'expression de la E-FABP montre deux bandes dans les cellules RT4 et une seule bande dans les cellules T24. Dans les deux lignées cellulaires, quelle que soit la concentration en agonistes utilisée, aucune variation de l'expression de la E-FABP n'est observée entre les cellules témoins et les cellules traitées (cf. Figure 24).

Ainsi, la E-FABP n'est pas régulée par les agonistes des PPAR α , β et γ dans les cellules RT4 et T24.

Dans notre modèle de lignées cellulaires dérivées de cancer de la vessie, nous montrons que la E-FABP n'est pas régulée par les ligands de PPAR dans les deux lignées étudiées. Par ailleurs, dans les cellules T24, les ligands des trois isotypes des PPAR augmentent l'expression de la A-FABP, alors que dans les cellules RT4, seul le ligand de PPAR β augmente l'expression de la A-FABP. Le traitement de patients atteints de tumeur papillaire à haut risque de progression, par instillation endovésicale d'un ligand de PPAR pourrait être envisagé. Dans ce contexte, la réinduction de l'expression de la A-FABP pourrait bloquer la progression tumorale. Si nous considérons, d'une part que la protéine A-FABP est l'expression d'un gène suppresseur de tumeur, et d'autre part qu'il est possible de contrôler son expression, ce traitement pourrait être proposé puisque des molécules, ligand de PPAR, sont à notre disposition comme les thiazolidinediones, utilisées dans le traitement du diabète de type II.

Il serait possible de réinduire un gène suppresseur de tumeur, sans pour autant créer de l'angiogenèse tumorale puisque les ligands de PPAR γ ne modifient pas l'expression du VEGF dans les cellules représentatives d'une tumeur de mauvais pronostic.

Certes, à l'heure actuelle, nous ne connaissons pas le rôle exact de la A-FABP dans nos cellules. Cependant, un des rôles bien connu de cette protéine est de véhiculer les acides gras donc de véhiculer des ligands de PPAR du cytoplasme vers le noyau, là où se localisent les récepteurs PPAR. D'ailleurs, des études ont montré que les FABP sont capables de transporter les ligands de PPAR du cytosol au noyau (Huang *et al.*, 2004), de céder ces ligands aux PPAR grâce à des interactions spécifiques et ainsi d'augmenter l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs (Helledie *et al.*, 2000 ; Tan *et al.*, 2002).

Si, dans notre modèle cellulaire, la A- ou la E-FABP véhicule les ligands de PPAR jusqu'au noyau, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle la A- ou la E-FABP pourrait avoir un rôle dans la régulation du VEGF puisque dans les cellules RT4, les ligands des PPAR α , β et γ augmentent l'expression du VEGF et que dans les cellules T24, seul le ligand de PPAR β augmente le VEGF.

C'est pourquoi dans la suite de notre travail, nous avons tenté de répondre à la question suivante : les protéines A- et E-FABP interviennent-elles dans la régulation du VEGF par les PPAR ?

VII. Rôle de la A-FABP et de la E-FABP dans la régulation transcriptionnelle du VEGF

Les cellules RT4 et T24 sont stimulées ou non pendant 24 h par 50 μ M de WY14,643 (ligand de PPAR α), 25 μ M de L-165041 (ligand de PPAR β) ou 10 μ M de rosiglitazone (ou BRL49653, ligand de PPAR γ). Les fractions protéiques, cytosoliques et nucléaires, ont été extraites selon le protocole décrit en Annexe 3 et analysées par western-blotting à l'aide d'anticorps dirigés contre la A-FABP, la E-FABP, PPAR α , PPAR β , PPAR γ , HDAC-3 et β -actine (cf. Annexe 1).

L'analyse des western-blotts montre que la E-FABP est présente dans le cytosol des cellules RT4

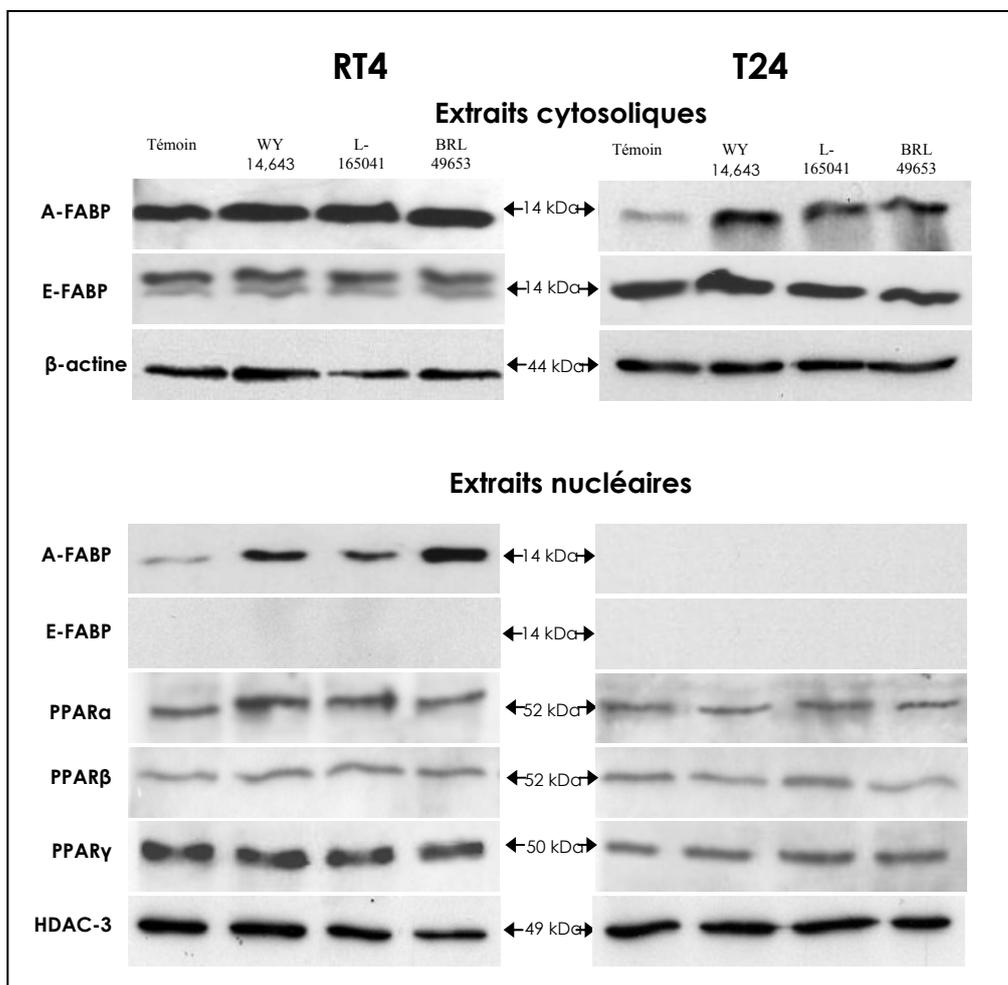


Figure 25 : Etude de l'expression de la A- et de la E-FABP dans les fractions cytosolique et nucléaire des cellules RT4 et T24.

Les cellules RT4 et T24 ont été incubées dans du milieu Mc COY's 5a dépourvu de sérum puis stimulées ou non (cellules témoins) pendant 24 h en présence de WY 14,643 (50 μ M), de L-165041 (25 μ M), ou de BRL49653 (10 μ M). Les protéines cytosoliques et nucléaires ont été extraites selon la méthode de Thuillier (Thuillier *et al.*, 1998, cf. Annexe 3) et les taux protéiques ont été déterminés par western-blotting grâce aux anticorps dirigés contre la A-FABP, la E-FABP, PPAR α , PPAR β , PPAR γ , HDAC-3 et la β -actine (cf. Annexe 1). La β -actine et HDAC-3 ont été utilisées, respectivement pour la fraction cytosolique et la fraction nucléaire, comme contrôle de dépôt d'une quantité équivalente de protéines dans chaque puits. Ces expériences sont représentatives de trois expériences réalisées sur trois déterminations.

et T24 et que son taux est identique que les cellules soient stimulées ou non par les ligands de PPAR (cf. Figure 25). Par contre, la E-FABP n'est pas détectée dans la fraction nucléaire des deux types cellulaires que les cellules soient traitées ou non par les ligands de PPAR. La E-FABP ne semble donc pas impliquée dans l'activité transcriptionnelle des PPAR sur l'expression du VEGF.

Dans les cellules RT4, la A-FABP est présente dans la fraction cytosolique et dans la fraction nucléaire. Dans la fraction cytosolique, le taux de la A-FABP ne varie pas suite à la stimulation des cellules par les ligands de PPAR. En revanche, le taux nucléaire de la A-FABP est plus élevé lorsque les cellules sont stimulées par les ligands (cf. Figure 25). Ce taux est d'ailleurs plus important avec le BRL49653, activateur de PPAR γ qu'avec le WY 14,643 et le L-165041, agonistes des PPAR α et γ respectivement. Dans ces cellules, dans la fraction nucléaire, nous avons mis en évidence la présence des PPAR α , β et γ . Ces résultats suggèrent que dans les cellules RT4, la A-FABP étant co-localisée avec les isotopes α , β et γ des PPAR, véhiculerait les ligands du cytosol vers ces récepteurs permettant leur activation transcriptionnelle et *in fine* l'induction du VEGF.

Par contre dans les cellules T24 (cf. Figure 25), la A-FABP est présente dans la fraction cytosolique et est augmentée par les agonistes des PPAR. Néanmoins, cette protéine est absente de la fraction nucléaire. Les PPAR α , β et γ sont bien localisés dans le noyau des cellules T24 (cf. Figure 25). Ces résultats permettent de conclure que, même en présence des ligands de PPAR, la A-FABP, dans les cellules T24, ne se localise pas dans le noyau de ces cellules. Cela est en faveur de notre hypothèse selon laquelle l'absence d'effet des PPAR α et γ sur l'expression du VEGF pourrait être due à l'absence de localisation nucléaire de la A-FABP.

Pour confirmer les résultats obtenus en western-blotting sur la localisation subcellulaire de la A-FABP, une étude en immunocytofluorescence a été réalisée. Pour cette expérience, les cellules ont été cultivées sur un support spécifique LABTEK, et stimulées par les différents ligands de PPAR (cf. Annexe 4). La localisation subcellulaire de la A-FABP a été mise en évidence grâce à un anticorps anti-A-FABP reconnu par un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome FITC. Les résultats obtenus étant identiques quel que soit le stimulus utilisé, seuls les immunomarquages des cellules stimulées par l'agoniste de PPAR γ sont présentés dans la Figure 26.

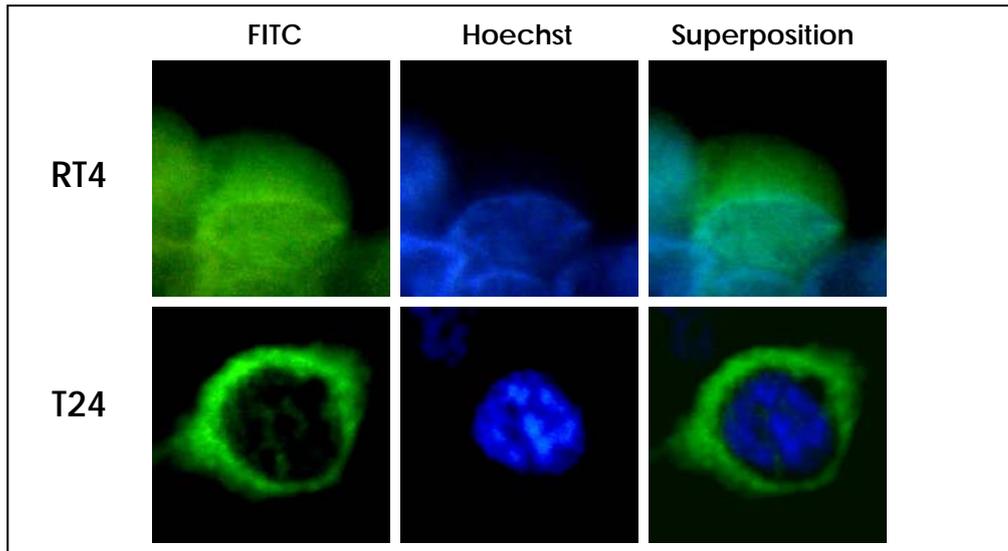


Figure 26 : Localisation subcellulaire de la A-FABP par immunocytofluorescence dans les cellules RT4 et T24.

Après un lavage au PBS 1X, les cellules RT4 et T24 sont fixées au méthanol. Les cellules sont ensuite mises en présence de l'anticorps anti-A-FABP (cf. Annexe 4). L'anticorps primaire est alors révélé par un anticorps secondaire conjugué à la FITC (cf. Annexe 1), et les noyaux des cellules sont marqués par du Hoechst. Les cellules sont observées au microscope à épifluorescence ce qui permet de différencier l'immunomarquage de la protéine FABP (FITC), de la coloration du noyau (Hoechst) et de les superposer (superposition). Ces expériences sont représentatives de deux expériences réalisées sur trois déterminations.

Ainsi dans les cellules RT4, un marquage FITC est observé dans le cytoplasme et dans le noyau, alors que dans les cellules T24 seul le cytoplasme est marqué (cf Figure 26).

L'étude de la localisation subcellulaire de la E-FABP a également été réalisée grâce à la même technique d'immunocytofluorescence (résultats non présentés). Elle a montré comme en western-blotting que la E-FABP n'était pas présente dans le noyau des cellules RT4 et T24 que les cellules soient stimulées ou non.

Nos résultats permettent de conclure que dans les cellules RT4 et T24, la E-FABP ne serait pas impliquée dans la modulation de l'activité transcriptionnelle des PPAR. En effet, dans les cellules RT4 et T24, la E-FABP n'est pas capable de se localiser dans le noyau, elle ne peut donc pas transporter le ligand de PPAR β du cytosol vers le noyau afin d'augmenter l'activité transcriptionnelle du PPAR β comme cela a pu être décrit dans certains autres modèles cellulaires.

Ainsi, dans nos cellules RT4 et T24, le transport nucléaire se fait, soit par diffusion passive du ligand et est suffisante pour l'activation de PPAR β nécessaire à l'augmentation de l'expression du VEGF, soit c'est une autre protéine possédant un rôle similaire qui permet le transport nucléaire du ligand de PPAR β .

Donc, dans les cellules RT4 et T24, la E-FABP n'est pas impliquée dans l'augmentation de l'expression du VEGF induite par les ligands de PPAR.

Par contre, la A-FABP pourrait avoir un rôle sur l'augmentation du VEGF induite par les PPAR. En effet, la A-FABP ne se localise pas dans le noyau des cellules T24, alors qu'elle est présente dans le noyau des cellules RT4. Donc vraisemblablement dans les cellules RT4, la A-FABP transporterait les ligands de PPAR α et γ du cytosol vers le noyau et permettrait aux PPAR d'augmenter l'expression du VEGF en augmentant l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs. Dans les cellules T24, la A-FABP n'est plus capable de se localiser dans le noyau, elle ne peut donc pas apporter les ligands aux PPAR α et γ et augmenter leur activité transcriptionnelle. L'activité transcriptionnelle des PPAR α et γ n'étant pas suffisante, l'expression du VEGF ne pourrait être augmentée par les agonistes de PPAR.

Ainsi dans les cellules T24, l'absence de localisation nucléaire de la A-FABP pourrait expliquer l'absence d'induction du VEGF par les ligands de PPAR α et γ .

Cependant pour démontrer ce rôle de la A-FABP dans l'activité transcriptionnelle des PPAR sur la surexpression du VEGF, il serait nécessaire de bloquer son expression dans les cellules RT4, et d'étudier l'effet de cette inhibition sur l'induction du VEGF par les PPAR α et γ . Les nouvelles techniques d'interférence à l'ARN pourraient permettre de réaliser ce type d'étude en inhibant l'expression de la A-FABP.

DISCUSSION

Les tumeurs urothéliales sont divisés en trois groupes : les tumeurs superficielles de stade pTa qui récidivent souvent mais qui progressent très peu, les tumeurs invasives (stade pT2 à pT4), et les tumeurs superficielles pT1 qui récidivent peu et progressent souvent vers un phénotype agressif. Selon le devenir imprévisible de ces tumeurs, il semble donc important pour le chirurgien urologue de pouvoir distinguer les tumeurs superficielles qui vont simplement récidiver de celles qui vont récidiver et progresser afin d'adapter le traitement proposé aux patients présentant une tumeur de vessie.

C'est pourquoi, un des objectifs de notre groupe est d'une part, l'identification de nouveaux marqueurs moléculaires prédictifs du phénotype agressif des tumeurs urothéliales, et d'autre part, la compréhension des mécanismes moléculaires régulant ces facteurs permettant ainsi d'établir d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour une meilleure prise en charge des patients.

L'angiogenèse tumorale est un processus clé dans la croissance et la dissémination métastatique des tumeurs solides, qui dépend principalement du VEGF. Dans le cancer de la vessie, le VEGF serait un facteur pronostique indépendant de récurrence et de progression tumorale, notamment dans les tumeurs superficielles pT1. Compte tenu de l'importance du VEGF et de sa valeur pronostique dans les tumeurs superficielles, nous avons étudié, dans des cellules humaines dérivées de cancer de la vessie, sa régulation par des facteurs de transcription que sont les PPAR. En effet, les récepteurs nucléaires PPAR sont exprimés dans la plupart des tumeurs solides et exerceraient un rôle important dans la cancérogenèse et dans l'angiogenèse tumorale.

Dans notre laboratoire, une étude publiée en 2002 dans la revue « Journal of Biological Chemistry » a montré que les trois isotypes des PPAR étaient impliqués dans le processus angiogénique à travers la régulation différentielle de l'expression du VEGF selon le degré de différenciation des cellules tumorales de vessie (Fauconnet *et al.*, 2002). Cette étude réalisée à partir de deux lignées cellulaires, la lignée RT4, représentative des tumeurs superficielles de bon pronostic, et la lignée T24, représentative des tumeurs infiltrantes à potentiel métastatique, a montré que l'expression du VEGF (ARNm et protéine) est augmentée par l'activation des trois isotypes de PPAR dans les cellules RT4 et uniquement par l'isotype β dans les cellules T24. Cette étude réalisée par northern-blotting, a permis de détecter trois bandes de 5,2 4,5 et 1,7 kb, correspondant à différents transcrits alternatifs du VEGF, mais elle n'a pas permis d'identifier à quelles isoformes correspondaient ces différentes bandes.

Cependant, une expérience de Southern-blotting a permis d'identifier les différents transcrits du VEGF exprimés dans les cellules RT4 et T24 (cf. article 1) (Chabannes *et al.*, 2001). Il s'agit des VEGF121, 165 et 189.

Lors de mon travail de thèse, j'ai étudié, suite à l'activation des PPAR, les niveaux d'expression des différents transcrits du VEGF par une technique de RT-PCR en temps réel.

La quantification des différentes isoformes du VEGF confirme les résultats précédemment obtenus, à savoir que les ligands de PPAR α , β et γ augmentent l'expression des VEGF121, 165 et 189 dans les cellules RT4 alors que dans les cellules T24, seul le ligand de PPAR β , augmente l'expression de ces trois isoformes. Cette quantification permet de montrer que les ligands de PPAR augmentent préférentiellement les VEGF121 et 165, ce qui suggère que les ligands de PPAR régulent préférentiellement la transcription des formes qui sont le moins piégées dans la matrice extra-cellulaire, donc les plus disponibles pour activer l'angiogenèse tumorale.

L'effet différent des PPAR sur la régulation du VEGF en fonction du type cellulaire utilisé est intéressant. En effet, le choix de ces deux lignées cellulaires a été conditionné par le phénotype de ces cellules. En effet, la lignée RT4 est dérivée d'une tumeur bien différenciée de grade I et la lignée T24 est dérivée d'une tumeur indifférenciée de grade 3. De plus, dans la lignée T24, le gène *p53* est muté comme dans la majorité des tumeurs urothéliales de haut grade (Cordon-Cardo *et al.*, 1994 ; Orntoft et Wolf, 1998) ainsi que le gène *H-ras* alors que dans la lignée RT4, ces deux gènes ne sont pas mutés. Enfin, notre équipe a montré récemment qu'à la différence des cellules RT4, qui expriment le marqueur épithélial cadhérine E, les cellules T24 expriment le marqueur mésenchymateux cadhérine N et n'expriment plus la cadhérine E (Lascombe *et al.*, 2006).

Dans notre modèle de culture, l'effet des PPAR sur l'expression du VEGF varie en fonction du potentiel agressif des cellules. Ces résultats suggèrent que les ligands de PPAR α et γ augmentent l'expression du VEGF dans les tumeurs superficielles et n'auraient pas d'effet – *pour les PPAR α et γ* – dans les formes invasives. Ce qui suggérerait que les ligands de PPAR α et γ augmenteraient l'expression du VEGF dans les tumeurs superficielles et n'auraient pas d'effet dans les tumeurs invasives. Ainsi, dans un modèle de culture de cellules urothéliales, nous montrons que les ligands de PPAR α et γ sont des molécules angiogéniques.

Compte tenu de la contradiction qui existe quant à la valeur pronostique du VEGF dans les cancers de la vessie, nous avons étudié l'expression des ARNm VEGF en fonction des critères histopathologiques des tumeurs urothéliales.

Par northern-blotting, nous avons détecté, à partir d'ARNm extraits de tissu sain, ou de tumeurs urothéliales de stade et de grade différents, trois transcrits de 5,2 4,5 et 1,7 kb. Nous avons obtenu trois transcrits d'une taille identique à ceux qui avaient été identifiés dans les cellules RT4 et T24 (Fauconnet *et al.*, 2002). Une étude, utilisant une technique similaire à la nôtre, à partir d'ARNm extraits de tumeurs urothéliales de différents stades a permis de détecter trois transcrits de 5,5 kb, 4,4 kb et 3,7 kb (Sato *et al.*, 1998).

Dans notre étude, nous détectons deux transcrits de 5,2 kb et de 4,5 kb qui vraisemblablement selon leur taille serait équivalents aux transcrits de 5,5 et 4,4 kb détectés par Sato. Cependant, nous ne détectons pas le transcrit de 3,7 kb. Ces divergences pourraient s'expliquer par le choix de la sonde utilisée pour détecter ces transcrits.

Par contre, nous avons détecté, et ce pour la première fois à notre connaissance, un transcrit plus petit de 1,7 kb.

Ce transcrit de 1,7 kb pourrait être un nouveau transcrit du VEGF non encore identifié donc non répertorié dans la base de donnée GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/)

Dans les cellules RT4 et T24, et dans les échantillons sains et tumoraux, les VEGF121, 165 et 189 sont exprimés mais pas les VEGF 145 et 206.

La base de données GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/) qui répertorie tous les transcrits identifiés du VEGF indique que la taille des VEGF est comprise entre 3,5 kb et 5,5 kb, ce qui suggère que le transcrit de 1,7 kb pourrait correspondre à une nouvelle isoforme du VEGF.

Ce nouveau transcrit a été révélé par northern-blotting grâce à une sonde de 610 pb obtenue à partir d'un fragment d'ADNc (Chin *et al.*, 1997) et qui s'hybride en 3' à côté de l'ATG d'initiation de la transcription. Les conditions d'hybridation et la stringence utilisée pour les lavages lors du northern-blotting conditionnent la révélation des différents transcrits du VEGF, et ces conditions nous permettent de détecter toutes les isoformes du VEGF. Lors du southern-blotting, le transcrit de 1,7 kb n'a vraisemblablement pas été détecté. Dans cette technique, les amorces sens et antisens utilisées pour l'amplification par PCR des différentes isoformes du VEGF sont localisées respectivement sur l'exon 4 et l'exon 8. Le transcrit 1,7 kb pourrait ne pas posséder l'exon 4 ou l'exon 8 ou avoir une forme tronquée d'un de ces 2 exons. Ainsi, il serait visualisé par northern-blotting mais ne le serait pas par Southern-blotting.

Récemment, un transcrit alternatif du VEGF165, nommé VEGF165b, a été décrit et il présente un exon 8 tronqué (cf. III.3.1.1). Cette nouvelle isoforme antagonise l'effet du VEGF165. Par exemple, il inhibe la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF165 (Bates *et al.*, 2002 ; Cui *et al.*, 2004). Cette isoforme serait détectée dans les tumeurs de la vessie (Das *et al.*,

2007). Ainsi ce transcrit de 1,7 kb pourrait correspondre au transcrit du VEGF165b, cependant des études complémentaires sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

La valeur pronostique de l'expression du VEGF dans les tumeurs de vessie n'est pas encore clairement établie (cf. introduction, III.4.). En effet, certaines études montrent que les tumeurs urothéliales pTa et pT1 expriment le VEGF à un niveau significativement plus élevé que les carcinomes invasives (\geq pT2) (O'Brien *et al.*, 1995 ; Pignot *et al.*, 2008 ; Quentin *et al.*, 2004), alors que, Sato *et al.* ont montré que les tumeurs urothéliales invasives (\geq pT2) expriment plus de VEGF que les tumeurs superficielles (Sato *et al.*, 1998).

Dans ce travail, nous montrons que les trois transcrits du VEGF sont plus exprimés dans les carcinomes urothéliaux superficiels que dans l'urothélium normal, que les carcinomes invasifs expriment plus de VEGF que les tumeurs urothéliales superficielles (pTa et pT1) et que l'expression d'un taux élevé d'ARNm VEGF conditionne une survie sans progression plus faible. Nos résultats suggèrent que le VEGF serait un facteur de progression de la maladie, comme le suggère l'équipe de Sato. Les différents résultats obtenus sur l'expression du gène *veg*f pourraient être liés à la technique utilisée pour le recueillement des échantillons. En effet, les échantillons issus de tumeurs noninvasives (pTa et pT1) sont obtenus suite à la résection transurétrale des polypes sans contamination par la muqueuse normale et le muscle lisse. Alors que les échantillons obtenus par résection dans des tumeurs invasives peuvent être contaminés par du tissu normal. Puisque le VEGF est plus faiblement exprimé dans le muscle lisse et dans les fibroblastes que dans les cellules épithéliales (Berse *et al.*, 1992), les échantillons contaminés par du muscle lisse exprimeraient potentiellement moins de VEGF. Dans notre étude, les échantillons de carcinomes invasifs ont été obtenus à partir de cystectomie totale, et le prélèvement de la masse tumorale a été réalisé par vision directe des tissus permettant d'exclure la couche de muscle lisse sous-jacente et entourant la tumeur.

Les études utilisant des échantillons de carcinomes invasifs obtenus par résection détecteront donc une expression du VEGF plus élevée qu'elle ne l'est réellement au sein de la tumeur, et conclueront de façon erronée à une expression plus élevée dans les tumeurs pT2 comparativement aux tumeurs pT1.

Ainsi, nous pouvons supposer que nos résultats rapportent l'expression réelle du VEGF de chaque échantillon tumoral.

Dans notre étude, en plus de la technique de northern-blotting, nous avons utilisé une technique de RT-PCR en temps réel.

Par Southern blotting, trois variants d'épissage du VEGF, à savoir les VEGF189, 165 et 121 ont été détectés. Connaissant les tailles des différents isoformes du VEGF exprimées dans nos extraits tumoraux, nous les avons quantifiés par une technique de RTqPCR. Le VEGF206 n'a pas été détecté, cette isoforme n'a également pas été détectée dans des extraits tumoraux par d'autres équipes (Crew *et al.*, 1997). Quant à O'Brien, il détecte seulement le VEGF121 et VEGF165 (O'Brien *et al.*, 1995). Li *et al.* ont détecté l'expression de quatre isoformes, le VEGF121, 165, 189 et 206. Dans ces études, les taux de VEGF206 et de VEGF189 dans les tumeurs pT2 sont significativement plus faibles que ceux retrouvés dans les tumeurs pTa et pT1. Par contre, le taux de VEGF121 dans les tumeurs pT2 semble plus important que celui des tumeurs pTa et pT1.

Par une technique de RTqPCR, les VEGF121, 145, 148, 165, 183 et 189 ont été quantifiés dans 157 échantillons de tumeurs urothéliales (Pignot *et al.*, 2008). Toutes ces isoformes sont surexprimées dans les échantillons tumoraux comparativement au tissu vésical normal. Le taux des VEGF121, 148, 183 et 189 est plus élevé dans les tumeurs pT1 de haut grade comparativement à celui exprimé dans les tumeurs pT2. Les VEGF121, 148, 165, 183 et 189 sont significativement plus exprimés dans les tumeurs pTa et pT1 comparativement aux tumeurs pT2.

Dans notre étude, nous montrons que le VEGF121 est la forme majoritaire (60%), que le VEGF165 est moins exprimé (30%), et que le VEGF189 est la forme minoritaire (10%). Le taux de VEGF121, 165 et 189 est plus élevé dans les tumeurs pT1 et pT2 que dans les tumeurs pTa. Les transcrits du VEGF148 et 183 n'ont pas été détectés. L'expression des trois isoformes augmente en fonction du stade et du grade. Le taux des VEGF121 et le 165 est exprimé de façon sensiblement identique et ce quel que soit le stade tumoral ou le grade histologique. Le VEGF189 est l'isoforme la plus faiblement exprimée dans les tumeurs de stade pTa, pT1 et pT2 comme dans les tumeurs de grade G1, G2 et G3.

Ces résultats suggèrent qu'il serait pertinent de quantifier seulement une isoforme soit le VEGF121, soit le VEGF165 afin d'établir leur valeur pronostique dans les cancers de la vessie. D'ailleurs, cela semble être le cas pour les isoformes 189 ou 121 selon le tissu étudié. Si nous nous référons à la littérature, l'expression du VEGF189 est corrélée à un mauvais pronostic dans le cancer du colon, le cancer de l'œsophage et dans le cancer du poumon non à petites cellules (Oshika *et al.*, 1998 ; Tokunaga *et al.*, 1998a ; Tokunaga *et al.*, 1998b). Le taux d'ARNm du VEGF121 dans les cancers du poumon présentant des métastases au niveau des ganglions lymphatiques est plus élevé que dans les cancers sans métastases (Ohta *et al.*, 1997).

Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées à l'expression du VEGF (VEGF-A) et de ces isoformes (ARNm et protéine) afin de comprendre son rôle biologique dans l'angiogenèse. Cependant à l'heure actuelle, aucune donnée n'a été publiée sur l'expression du VEGF-B dans le cancer de la vessie alors qu'il a été détecté dans une large variété de tumeurs comme le

carcinome du sein, le mélanome et le fibrosarcome (Gunningham *et al.*, 2001 ; Mylona *et al.*, 2007 ; Salven *et al.*, 1998), les neuroblastomes (Eggert *et al.*, 2000), les cancers colorectaux (Kawakami *et al.*, 2003). Cette isoforme du VEGF possède comme le VEGF-A des propriétés angiogéniques et est capable de se fixer sur le VEGFR-1 et de l'activer. Avant cette étude, l'intérêt clinique du VEGF-B dans le cancer de la vessie restait à établir.

Dans notre étude, nous n'avons pas détecté d'ARNm du VEGF-B dans les tumeurs urothéliales suggérant que l'absence de VEGF-B dans le cancer de la vessie.

Nos résultats montrent que le VEGF (VEGF-A) est un marqueur de progression des tumeurs urothéliales. Cependant, il nous a semblé pertinent, afin qu'il n'y ait pas d'ambiguïté sur la valeur pronostique du VEGF d'associer son expression à un autre marqueur potentiel de progression dans les tumeurs urothéliales : la A-FABP.

Selon les données de la littérature, dans les carcinomes urothéliaux, une perte d'expression de la A-FABP est associée à la progression des tumeurs urothéliales (Celis *et al.*, 1996 ; Ohlsson *et al.*, 2005). Par ailleurs, le pourcentage de tumeurs exprimant la A-FABP est très élevé dans les lésions de bas grade et diminue drastiquement dans les néoplasies de grade III et IV.

Notre première démarche a été de déterminer qu'elles étaient les FABP exprimées dans notre modèle cellulaire. Dans les cellules RT4 et T24, seule la A-FABP et la E-FABP sont exprimées.

La A-FABP est plus exprimée dans les cellules différenciées RT4 que dans les cellules peu différenciées « à potentiel agressif » T24. De plus, à la différence de ce qui a été montré dans le cancer du sein et de la prostate, la faible expression de la A-FABP dans les cellules T24 n'est pas compensée par l'augmentation de l'expression d'autres FABP (Hammamieh *et al.*, 2005 ; Hammamieh *et al.*, 2004).

La valeur pronostique de la A-FABP dans les tumeurs urothéliales a été déterminé en utilisant des techniques histologiques ou des techniques d'électrophorèse bidimensionnelle, nous avons donc choisi pour déterminer la valeur pronostique de la A-FABP de développer une méthode de RT-PCR quantitative en temps réel.

Notre étude porte sur une petite cohorte de patients, mais nous permet de montrer une chute du taux d'ARNm A-FABP en fonction du stade tumoral et du grade histologique. Nos résultats sont en accord avec ceux décrits par Celis *et al.* (Celis *et al.*, 1999 ; Celis *et al.*, 1996 ; Ohlsson *et al.*, 2005) et suggèrent que la A-FABP serait un marqueur de bon pronostic.

La quantification de l'ARNm A-FABP a été réalisée à partir de la même cohorte de patients pour lesquels nous avons quantifié les isoformes du VEGF (cf. Résultats II). L'ensemble de nos

résultats montrent que les tumeurs de stade pTa expriment un taux faible d'ARNm du VEGF et un taux élevé d'ARNm de la A-FABP alors que les tumeurs de stade pT1/pT2 expriment un taux important d'ARNm VEGF et un taux faible d'ARNm A-FABP. Ces résultats suggèrent que lors de la progression tumorale des tumeurs urothéliales, l'expression du VEGF augmente et l'expression de la A-FABP chute.

Ces résultats nous permettent de supposer que dans le cancer de la vessie pour empêcher la progression tumorale, il serait nécessaire de bloquer la synthèse du VEGF et d'augmenter l'expression de la A-FABP.

Nous pensons qu'une expression importante de la A-FABP permettrait de bloquer la progression des cancers de la vessie. C'est pourquoi, nous avons étudié la régulation du gène *a-fabp* afin d'identifier des molécules capables d'augmenter l'expression de cette protéine. Selon les données de la littérature, *a-fabp* est un gène cible de PPAR γ . En effet, l'agoniste naturel, 15d-PGJ2, et les agonistes synthétiques, rosiglitazone et troglitazone, augmentent l'expression des ARNm de la A-FABP dans les monocytes primaires humains (Pelton *et al.*, 1999). De plus la troglitazone (agoniste synthétique) induit l'expression de la A-FABP dans les cellules T24 (Guan *et al.*, 1999). C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse selon laquelle PPAR γ mais également PPAR α et PPAR β pouvaient réguler l'expression de la A-FABP dans notre modèle cellulaire.

Dans les cellules T24 nous montrons et ce pour la première fois, que l'activation des PPAR α et β augmente l'expression de la A-FABP, et nous confirmons que l'activation de γ augmente l'expression de la A-FABP. Quel que soit l'agoniste de PPAR γ utilisé, nous obtenons les mêmes résultats. Cependant, l'agoniste naturel de PPAR γ , le 15d-PGJ2, augmente plus faiblement l'expression des ARNm et de la protéine A-FABP. Les effets différents des ligands de PPAR γ sur l'expression de la A-FABP peuvent facilement s'expliquer par l'affinité différente des ligands pour le récepteur γ . En effet, la constante de dissociation (Kd) est de 700 nM pour la troglitazone et de 40 nM pour la rosiglitazone (Lehmann *et al.*, 1995 ; Willson *et al.*, 1996) alors qu'il est supérieur à 1 μ M pour la 15d-PGJ2 (Forman *et al.*, 1995 ; Kliewer *et al.*, 1995). Nous montrons, en utilisant les agonistes des récepteurs PPAR seuls ou combinés à des antagonistes spécifiques, que l'effet des ligands de PPAR est spécifique de leurs récepteurs.

Dans notre modèle cellulaire, le temps de demi-vie de l'ARNm de la A-FABP est de 8 h. Suite à l'activation des PPAR, il n'y a pas de stabilisation des ARNm de la A-FABP suggérant une régulation au niveau transcriptionnel. Les expériences en présence d'un inhibiteur de synthèse protéique, la cycloheximide (CHX), suggèrent que l'augmentation de l'expression des ARNm de

la A-FABP par les agonistes de PPAR requiert la synthèse de nouvelles protéines. D'après nos résultats, ces protéines intermédiaires ont vraisemblablement une demi-vie inférieure à 30 minutes puisque 30 minutes de traitement avec la CHX inhibent totalement les effets des agonistes de PPAR sur l'expression de la A-FABP. De plus, après 30 minutes de traitement, les PPAR sont toujours présents dans ces cellules étant donné que la demi-vie de ces récepteurs est estimée à 2 h (Waite *et al.*, 2001). Ainsi, dans notre modèle cellulaire, la régulation du gène *a-fabp* par les PPAR se fait par un mécanisme moléculaire indirect.

Nous supposons que la protéine intermédiaire pourrait être une protéine impliquée dans le métabolisme lipidique et nous avons supposé que cette protéine serait la LXR α (Liver X receptor alpha). LXR α est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux. LXR α forme un hétérodimère avec son partenaire obligatoire RXR suite à l'activation par les ligands de RXR ou de LXR. L'hétérodimère RXR/LXR ainsi formé se fixe sur un élément de réponse à LXR (LRE) localisé dans le promoteur de gènes cibles. Un certain nombre d'arguments nous ont permis de supposer que LXR pouvait être la protéine intermédiaire. En effet, LXR régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et des triglycérides, et dans de nombreuses tumeurs, l'accumulation des acides gras et du cholestérol a été décrite (Alo *et al.*, 1996 ; Pizer *et al.*, 1998 ; Rashid *et al.*, 1997). Plusieurs séquences PPRE potentielles seraient localisées dans la région flanquante 5' de LXR α (Tobin *et al.*, 2000), ce qui expliquerait pourquoi la rosiglitazone, induirait l'expression de l'ARNm LXR α dans les macrophages (Chawla *et al.*, 2001). Enfin, récemment, dans les cellules THP-1 et les macrophages, la A-FABP a été décrite comme un nouveau gène cible de LXR (Liu *et al.*, 2007). Par conséquent, nous pouvons supposer que LXR régule directement le gène *a-fabp* via son promoteur.

Cependant, nous ne pouvons pas exclure que la régulation de la A-FABP pourrait faire intervenir un autre intermédiaire protéique puisque LXR est un régulateur transcriptionnel de SREBP (Sterol-Regulatory Element Binding Protein) et de SREBP-1c (appelé aussi ADD1) (Yoshikawa *et al.*, 2001). SREBP-1c est décrit comme un facteur impliqué dans la différenciation des adipocytes (Tontonoz *et al.*, 1993). De plus, il a été décrit que SREBP se fixe sur des séquences d'ADN contenant des répétitions directes 5'-PyCAPy-3' appelées séquences SRE (sterol regulatory element).

Pour conclure, d'autres expériences seront nécessaires afin d'élucider le mécanisme moléculaire de la régulation de l'expression de la A-FABP par les PPAR dans notre modèle cellulaire.

Par contre, si les trois ligands de PPAR régulent l'expression de la A-FABP dans les cellules T24, seul le ligand synthétique de PPAR β , le L-165041, augmente faiblement l'expression de la A-FABP (ARNm et protéine) dans les cellules RT4. Plusieurs explications peuvent être proposées pour comprendre ces résultats.

Nous pouvons supposer que cela pourrait dépendre du phénotype des cellules, il conviendrait de reproduire ces expériences à partir d'autres lignées cellulaires.

Nous pouvons supposer que dans ces cellules, certains coactivateurs ne seraient plus exprimés ou que certains corépresseurs seraient surexprimés. C'est pourquoi, l'expression de différents coactivateurs (PBP, CITED-2 et PGC-1 α) a été étudié dans les cellules RT4 et T24.

Nous montrons que PBP et CITED-2 sont exprimés de façon équivalente dans les deux types cellulaires. Par contre, si PGC-1 α est fortement exprimé dans les cellules T24 (ARNm et protéine), les analyses de RT-PCR et de western-blotting montrent qu'il est très peu exprimé dans les cellules RT4. PGC-1 α est un coactivateur de PPAR α (Vega *et al.*, 2000) et de PPAR γ (Puigserver *et al.*, 1998a). Ces résultats nous permettent donc de supposer que si il n'y pas d'induction de la A-FABP par les agonistes des PPAR α et γ dans les cellules RT4, c'est parce qu'il n'y a pas de PGC-1 α dans ces cellules. Des expériences d'interférence à l'ARN de PGC-1 α sont envisagées afin de vérifier notre hypothèse.

Dans notre modèle cellulaire, nous avons mis en évidence la A-FABP mais pas seulement. Une autre FABP est exprimée par les cellules RT4 et T24, la E-FABP. Cette E-FABP est exprimé dans une forme particulière de tumeurs de la vessie, les tumeurs épidermoïdes. (Ostergaard *et al.*, 1997). Dans les tumeurs urothéliales de la vessie, aucune étude n'a conclu sur la valeur pronostique de l'expression de la E-FABP. Cependant, suite à la mise en culture de cellules issues de carcinomes urothéliaux de bas grade, une étude a montré une diminution concomitante de la A-FABP et de la E-FABP suggérant que ces deux protéines joueraient un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Celis *et al.*, 1999).

Lorsque nous étudions la régulation de la E-FABP par les ligands de PPAR, nous avons remarqué qu'à la différence de la A-FABP, la E-FABP n'est régulée par aucun des trois isotypes de PPAR. Ces résultats peuvent s'expliquer d'une part par la présence d'un PPRE non fonctionnel dans le promoteur du gène E-FABP puisque Schachtrup *et al* ont montré que la séquence apparentée à une séquence PPRE, située dans le promoteur murin de *e-fabp*, ne permet pas la transactivation de ce gène par aucun des trois isotypes de PPAR (Schachtrup *et al.*, 2004). D'autre part, à la différence de ce que nous supposons pour la A-FABP, le gène E-FABP n'a jamais été décrit comme un gène cible de LXR.

Dans les cellules RT4, nous montrons par western-blotting, deux bandes protéiques qui correspondent à la protéine E-FABP. Nous avons démontré que la révélation de la deuxième bande n'était pas due à une réaction croisée de l'anticorps anti-E-FABP avec la A-FABP. Nous avons supposé que la seconde bande pourrait être une autre isoforme de la E-FABP. En effet, une analyse par microarray a identifié, à partir d'extraits de foie de souris, quatre nouvelles isoformes de la E-FABP (Hoekstra *et al.*, 2006). Ces isoformes présentaient entre 75 et 98 % d'homologie entre elles. Dans les cellules T24, une seule bande E-FABP a été détectée. Ces résultats suggèrent que lors de l'acquisition du phénotype agressif, il y aurait une perte d'expression d'une isoforme de la E-FABP. Bien évidemment, d'autres expériences seront nécessaires pour expliquer ces résultats.

Cependant, nos résultats laissent supposer que la A- et la E-FABP auraient un rôle important à jouer dans l'acquisition du phénotype agressif des tumeurs urothéliales.

Mais n'oublions pas que la A-FABP et la E-FABP sont connues pour moduler l'activité transcriptionnelle des récepteurs PPAR. En effet, la A-FABP et la E-FABP prennent en charge les ligands de PPAR afin de les transporter jusqu'au noyau où elles cèdent leurs ligands aux récepteurs. N'oublions pas non plus, que les ligands de PPAR régulent l'expression du VEGF dans nos cellules. Donc, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la A- ou la E-FABP pourrait avoir un rôle dans la régulation du VEGF.

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons montré que la A-FABP est présente à la fois dans le cytosol et dans le noyau des cellules RT4. Par contre, dans les cellules T24, elle n'est présente que dans le cytosol. Ces résultats permettent de conclure que la A-FABP ne peut pas se localiser dans le noyau des cellules T24. L'impossibilité de la A-FABP de se retrouver dans le compartiment nucléaire de ces cellules permettrait d'expliquer l'absence d'effet des PPAR α et γ sur l'expression du VEGF dans les cellules T24.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer pourquoi la A-FABP ne se localise pas dans le noyau des cellules T24.

En général, les petites protéines (inférieure à 50 kDa) pénètrent dans le noyau par simple diffusion. Cependant, dans les cellules RT4, il y a plus de A-FABP dans le noyau des cellules stimulées que dans le noyau des cellules non stimulées. La translocation nucléaire de la A-FABP serait donc ligand-dépendante. Le faible taux de A-FABP dans le noyau des cellules témoins pourrait être expliqué par la présence de ligands endogènes de PPAR dans ces cellules.

Un autre mécanisme pourrait être envisagé. En effet, la localisation nucléaire des protéines est le plus souvent permise par une séquence spécifique d'acides aminés, la séquence NLS ou «nuclear localisation signal». Une séquence NLS est constituée de plusieurs acides aminés basiques tels que la lysine et l'arginine. L'étude de la séquence primaire en acides aminés de la A-FABP n'a pas permis d'identifier de séquence NLS. Récemment plusieurs études s'attachant à comprendre le phénomène de localisation nucléaire ligand-dépendant de la A-FABP ont développé une hypothèse intéressante. D'après ces études, la séquence NLS serait constituée de résidus lysine et arginine situés sur un motif hélice-boucle-hélice et qui lors de la fixation du ligand, serait exposée à l'extérieur de la protéine. Le « démasquage » de la NLS ne serait possible qu'avec certains ligands dits « activateurs » comme le linoléate et les thiazolidinediones (TZD).

Ainsi, le taux élevé de la A-FABP dans le noyau des cellules RT4 suite à la stimulation par le ligand de PPAR γ (BRL49653 qui est une TZD) pourrait être due au démasquage de la NLS. Ceci nous permet de supposer que le faible taux de A-FABP retrouvé dans le noyau, suite à la stimulation par les ligands de PPAR α et β , serait dû à un démasquage moins efficace de la NLS. Enfin, le faible taux de la A-FABP observé dans le noyau des cellules RT4 témoins, pourrait s'expliquer par la présence de ligands endogènes permettant un démasquage beaucoup moins efficace de la NLS.

Une mutation sur un des trois résidus constituant la NLS pourrait expliquer pourquoi aucune FABP n'a été mise en évidence dans le noyau des cellules T24.

Si nous considérons cette dernière hypothèse comme étant l'explication pour le transfert de la A-FABP dans le noyau des cellules, alors cela signifierait qu'il devrait y avoir une mutation de la séquence correspondant aux résidus K21, R30 et R31, qui portent la NLS. A notre connaissance, aucune étude n'a décrit une protéine A-FABP présentant des mutations. Seule un polymorphisme de cette protéine a été décrit sur le résidu thréonine 87 (T87) qui peut être substitué par une cystéine (C) (Tuncman et al., 2006) mais ces acides aminés ne correspondent pas à ceux qui constituent la NLS.

Nos différents résultats montrent que la A-FABP pourrait intervenir dans l'effet des PPAR sur l'expression du VEGF uniquement dans les cellules RT4. D'autre part, la E-FABP n'intervient pas dans l'action des PPAR α γ et β sur la surexpression du VEGF, puisque cette dernière ne se localise ni dans le noyau des cellules RT4 ni dans le noyau des cellules T24.

Pourtant une étude a décrit dans les kératinocytes qu'une interaction protéines/protéines entre E-FABP et PPAR β permettrait l'activité transcriptionnelle du récepteur (Tan *et al.*, 2002). L'effet de PPAR β sur la surexpression du VEGF n'impliquerait donc pas la E-FABP mais un autre mécanisme.

L'ensemble de nos résultats ne nous permet pas de conclure sur l'implication de la A-FABP dans l'effet des PPAR sur l'expression du VEGF. Cependant, nous avons montré que la A-FABP serait un marqueur potentiel de la progression tumorale des tumeurs de vessie et qu'il nous était possible de contrôler son expression. C'est pourquoi, nous pourrions envisager d'utiliser les TZD comme nouveau traitement dans les cancers de la vessie.

ANNEXES

Annexe 1 : Anticorps utilisés

Anticorps	Clone	Animal d'origine	Dilution ⁹	Fournisseur
<i>Primaires</i>				
β -actine	AC-15 (monoclonal)	souris	1/8000 (WB)	Sigma
A-FABP	AF1443 (polyclonal)	chèvre	1/1 000 (WB) 1/100 (ICF)	R&D Systems
E-FABP	AF1476 (polyclonal)	chèvre	1/1 000 (WB)	R&D Systems
HDAC 3	06-890 (polyclonal)	lapin	1/1 000 (WB)	Euromedex
PGC-1 α	H-300 (polyclonal)	lapin	1/40 000 (WB)	Santa Cruz
PPAR α	H-98 (polyclonal)	lapin	1/200 (WB)	Tebu
PPAR β	H-74 (polyclonal)	lapin	1/200 (WB)	Santa Cruz
PPAR γ	E-8 (monoclonal)	souris	1/200 (WB)	Tebu
<i>Secondaires</i>				
Anti-IgG de chèvre HRP conjugué	Ref. AP106P	lapin	1/10.000 (WB)	AbCys
Anti-IgG de lapin HRP conjugué	Ref. P0448	chèvre	1/5.000 (WB)	Dako
Anti-IgG de souris HRP conjugué	Ref. P0260	lapin	1/40.000 (WB)	Dako
Anti-IgG de chèvre FITC conjugué	Ref. P0260	lapin	1/500 (WB)	Dako

⁹ Dilution utilisée en western-blotting (WB) ou en immunocytofluorescence (ICF).

Annexe 2 : Amorces utilisées et conditions de RT-PCR

Messageur	N° d'accension	Amorces sens (S) et antisens (AS) (5'-3')	Température d'hybridation	Taille de l'amplifiat
A-FABP	NM_001442	(S) gaaacttgctccagtgaaaac (AS) gggagaaaattacttgcttg	55°C	449 pb
CITED 2	NM_006079	(S) Tgagctgttgactcgatcgaa (AS) gaaaggagtaaaaacaacaacga	60°C	300 pb
B-FABP	NM_001446	(S) Cgctcctgtctctaaagagggg (AS) tgggcaagttgcttgagtaac	56°C	551 pb
E-FABP	NM_001444	(S) Ccgacgcagaccctctc (AS) gatccgagtacaggtgacattgttc	56°C	392 pb
H-FABP	NM_004102	(S) Attcggcacgaggtagcttc (AS) agaggaagaatgaggcaatg	58°C	483 pb
L-FABP	NM_001443	(S) Ctctattgccaccatgagtttc (AS) gctgattctcttgaagacaatctg	55°C	339 pb
Myelin-FABP	D16181	(S) Aattgagctatttctaattttcggc (AS) gcatgtgtatacacacacgcacata	65°C	458 pb
PBP	NM_004774	(S) Tatggactccaaacgatcagtcacat (AS) ccaactgtttcctc	55°C,	300 pb
PGC-1a	NM_013261	(S) Tgcttcgctgcaaaaaacag (AS) tcagtcctcactggt	50°C	348 pb
β-actine	E00829	(S) Tgctatccaggctgtgctat (AS) gatggagttgaaggtagttt	50°C	359 pb

Annexe 3 : Extraction des protéines cytosoliques et nucléaires

L'extraction des protéines est réalisée d'après le protocole de Thuillier (Thuillier *et al.*, 1998). Des flasques de culture de 75 cm² sont rincés avec du PBS 1X à 4°C. Les cellules sont prélevées à l'aide d'un grattoir dans 1 ml de PBS 1X puis centrifugées (1.000 g, 10 minutes, 4°C). Le culot est ensuite repris dans 1 ml de tampon A (Hepes 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 0,25 mM, NaF 50 mM, Na métavanadate 2 mM) et homogénéisé grâce à un potter puis centrifugé (10.000 g, 10 minutes, 4°C). Le surnageant contenant les protéines cytosoliques est transféré dans un cryotube puis conservé à -80°C. Le culot est lavé 2 fois dans 500 µl de tampon A contenant 250 mM de sucrose, centrifugé à chaque fois (1.000 g, 10 minutes, 4°C), repris dans 1 ml de tampon A contenant 500 mM de NaCl, vortexé et incubé pendant 1 heure à 4°C. La solution est alors centrifugée (8.000 g, 30 minutes, 4°C) et le surnageant contenant les protéines nucléaires est récupéré dans un cryotube et stocké à -80°C jusqu'à l'analyse.

Annexe 4 : Etude de la localisation subcellulaire de la A-FABP par immunocytofluorescence

Les cellules RT4 et T24 sontensemencées à raison de 40.000 cellules/puits dans des LABTEK (Nunc, Naperville, IL). A confluence, elles sont stimulées ou non par des ligands de PPAR pendant 24 h. Les cellules sont ensuite fixées pendant 10 minutes dans du méthanol 100 % à -20°C, rincées, réhydratées avec du PBS 1X et incubées pendant 1 heure à température ambiante avec du PBS 1X, additionné de BSA 5 %, afin de saturer les sites aspécifiques. Après 3 lavages de 5 minutes dans du PBS 1X contenant de la BSA 0,1 %, les cellules sont incubées 1 heure à température ambiante et en atmosphère humide avec l'anticorps primaire anti-A-FABP au 1/100 (R&D systems, Minneapolis, MN). Après 3 lavages de 5 minutes dans du PBS 1X (0,1 % de BSA), elles sont à nouveau incubées 1 heure à température ambiante et en atmosphère humide à la fois avec l'anticorps secondaire anti-IgG de Chèvre couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (Dako, Glostrup, Danemark) diluée au 1/500 et avec 1µg/ml de réactif de Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, MO). Le Hoechst 33342 est un agent intercalant de l'ADN qui émet une fluorescence bleue (excitation à 350 nm et émission à 460 nm) et qui permet la visualisation des noyaux cellulaires. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois dans du PBS 1X puis sont observées au microscope à fluorescence (Leitz, Aristoplan, Allemagne).

Annexe 5 : Liste des travaux personnels

Publications

BOITEUX G, LASCOMBE I, ROCHE E, PLISSONNIER ML, CLAIROTTE A, BITTARD H, FAUCONNET.

A-FABP, a candidate progression marker of human transitional cell carcinoma of the bladder, is differentially regulated by PPAR in urothelial cancer cells.

International Journal of Cancer, sous presse.

FAUCONNET S, BERNARDINI S, LASCOMBE I, **BOITEUX G**, CLAIROTTE A, MONNIEN F, CHABANNES E, BITTARD H.

Expression analysis of vascular endothelial growth factor A and B and their relationship with clinicopathologic parameters in bladder cancer.

Soumis pour publication à Oncology Report

Communications orales

BOITEUX G, LASCOMBE I, PLISSONNIER ML, BITTARD H, FAUCONNET S.

A-FABP, marqueur potentiel de progression des tumeurs superficielles de la vessie, est régulé différenciellement par les PPAR dans les cancers de vessie.

Société de Médecine de Franche-Comté et Société de Biologie de Besançon, novembre 2007, Besançon.

PLISSONNIER ML, FAUCONNET S, **BOITEUX G**, BITTARD H, LASCOMBE I.

Effets des thiazolidinediones, agents anti-diabétiques, sur la prolifération et/ou l'apoptose des cellules dérivées de cancer de vessie.

Société de Biologie de Besançon, décembre 2006, Besançon

BOITEUX G, LASCOMBE I, BITTARD H, FAUCONNET S.

Rôle de la A-FABP (Adipocyte-Fatty Acid Binding Protein) sur l'activité des PPAR α et γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) dans la régulation du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) dans des lignées cellulaires dérivées de cancer de vessie.

XI Forum des jeunes chercheurs, juin 2005, Dijon.

Communication affichées

BOITEUX G, LASCOMBE I, BITTARD H, FAUCONNET S.

A-FABP, a potential biomarker of bladder transitional cell carcinoma progression, is differentially regulated by PPAR in bladder cancer cell lines.

1er Forum du Canceropôle Grand-Est, Vittef, 19 octobre 2007

LASCOMBE I, **BOITEUX G**, BITTARD H, FAUCONNET S.

Differential regulation of vascular endothelial growth factor expression by peroxisome proliferator-activated receptors *via* adipocyte-fatty acid binding protein in bladder cancer cells.

International Scientific Congress "Cell Signaling World", 2005, Luxembourg.

A-FABP, a potential biomarker of bladder transitional cell carcinoma progression, is differentially regulated by PPAR in bladder cancer cell lines.

BOITEUX G, LASCOMBE I, BITTARD H, FAUCONNET S.

1er Forum du Canceropôle Grand-Est, Vittel, 19 octobre 2007

A-FABP, a potential biomarker of bladder transitional cell carcinoma progression, is differentially regulated by PPAR γ in bladder cancer cell lines



G. Boiteux¹, I. Lascombe¹, H. Bittard^{1,2} and S. Fauconnet^{1,2}

1- IFR 133/EA 3181 «Carcinogénèse épithéliale», UFR SMP, 25030 Besançon, France
2- Service d'Urologie et d'Andrologie, CHU St Jacques, 25030 Besançon, France



Introduction

The clinical course of superficial bladder transitional cell carcinoma (TCC) is characterized by a high risk of recurrence and a propensity to progress in grade or stage. Few studies provide evidence that loss of adipocyte-fatty acid binding protein (A-FABP) expression is associated with progression of human bladder TCC and suggest that it could be a putative marker of progression of the disease. A-FABP is involved in adipocyte differentiation and is known to be regulated by the nuclear receptor, peroxisome

proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) *via* PPRE sequence located in the promoter. PPAR γ can be activated by a number of ligands either natural such as 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J₂, or synthetic such as antidiabetic thiazolidinediones (TZD) which exhibit antiproliferative, differentiation and apoptotic activities on different cancer cells.

The aim of the study is to investigate whether PPAR γ agonists could increase A-FABP expression in early stage bladder tumors to prevent cancer progression.

Experimental design

Bladder cancer cell lines:

- RT4, derived from grade I papillary carcinoma.
- T24, derived from grade III undifferentiated carcinoma.

Cell stimulation for 24h:

- **natural PPAR** agonist: d15-PGJ₂.
- **synthetic PPAR agonists**, thiazolidinediones (TZD): ciglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, troglitazone.
- **specific PPAR γ antagonist**: GW9662.

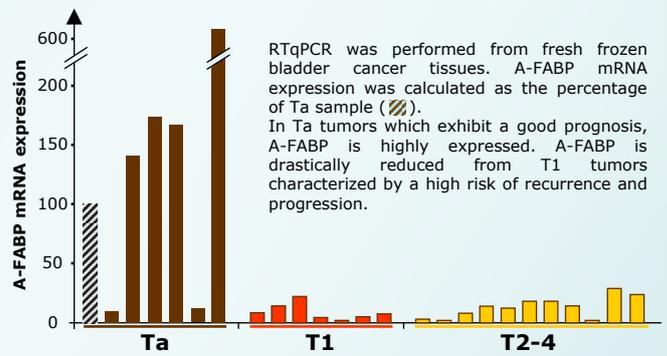
Western-blotting:

- Antibodies: A-FABP (R&D Systems) ; β -actin (Ac15, Sigma).

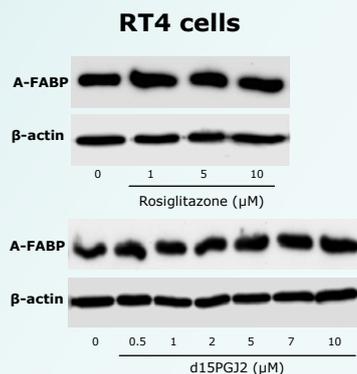
RTqPCR (Lightcycler 1.0®, Roche) with TaqMan® technology and specific primers for A-FABP and ATP5B (reference gene).

RT-PCR with specific primers for PBP, PGC-1 and β -actin.

1 A-FABP mRNA expression decreases from T1 bladder tumors

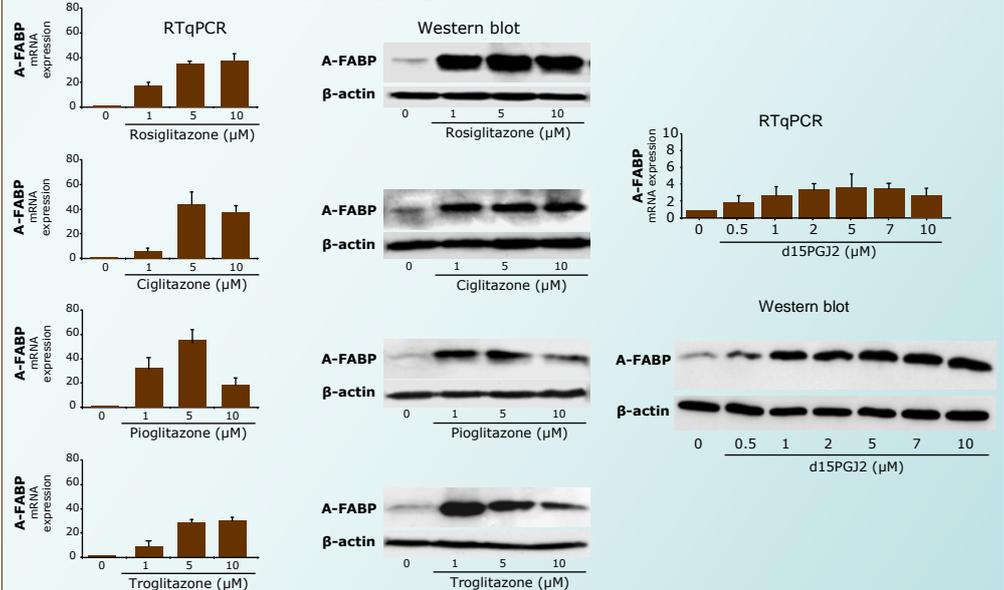


2 A-FABP (protein) expression is not regulated by PPAR γ agonists (TZD and natural) in bladder cancer cells representative of a good prognosis disease: RT4 cells

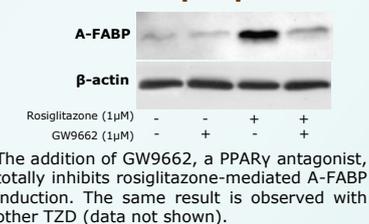


RTqPCR analyses show that A-FABP mRNA is not regulated by Rosiglitazone and d15PGJ₂ in RT4 cells (data not shown). In the same way, ciglitazone, troglitazone, pioglitazone do not modify A-FABP (mRNA and protein) expression (data not shown).

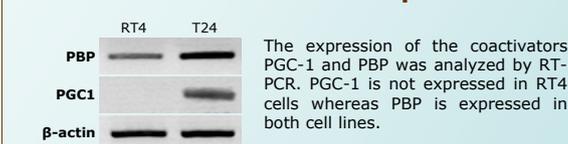
3 A-FABP (mRNA and protein) expression is increased by PPAR γ agonists (TZD and natural) in bladder cancer cells representative of a poor prognosis disease: T24 cells



4 A-FABP regulation in T24 cells is PPAR γ dependent



5 In RT4 cells, there is no PPAR γ -mediated effect on A-FABP probably due to the absence of PGC-1 coactivator expression



Conclusion

These data suggest that PPAR γ agonists may provide an exciting novel therapeutic strategy by inducing A-FABP expression in order to inhibit bladder cancer progression.

Differential regulation of vascular endothelial growth factor expression by peroxisome proliferator-activated receptors via adipocyte-fatty acid binding protein in bladder cancer cells.

LASCOMBE I, BOITEUX G, BITTARD H, FAUCONNET S.

International Scientific Congress "Cell Signaling World", 2005, Luxembourg.

Introduction

Angiogenesis is an essential component of the bladder tumor growth and the metastatic pathway. It is regulated by the production of angiogenic stimulators including the vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF expression is regulated by many growth factors, environmental factors and cytokines. Recently, several studies demonstrated that angiogenesis is regulated by nuclear receptors such as Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) in different cell types. The transcriptional activity of these receptors is modulated by Fatty Acid Binding Protein (FABP). Indeed, FABP have been shown to govern the transcriptional activity of their ligands by targeting them to cognate PPARs in the nucleus, thereby enabling PPARs to exert their biological functions. Furthermore, Adipocyte-FABP, a member of the FABP family, exhibits a decreased expression in high grade bladder tumors and could be a prognostic marker of tumor progression. Our study was performed in RT4 bladder cancer cells derived from a well differentiated and non aggressive tumor and in T24 cells derived from a tumor harboring a metastatic potential. PPARs are expressed in both cell lines. We hypothesize that VEGF expression could be regulated by PPARs in these bladder cancer cells and this regulation could be modulated by proteins such as FABP.

Materials and methods

Bladder cancer cell lines

- RT4 : derived from grade I papillary carcinoma.
- T24 : derived from grade III indifferetiated carcinoma.

Cell stimulation for 24 h

- WY 14,643: PPAR α ligand ; L-165041: PPAR β ligand ; BRL49653: PPAR γ ligand.

Northern-blotting

- VEGF cDNA probe (Chin *et al.*, 1997).
- Mouse β -actin probe was used to normalize the experiments. The VEGF and β -actin mRNA were quantitated using PhosphorImager analysis.

ELISA test

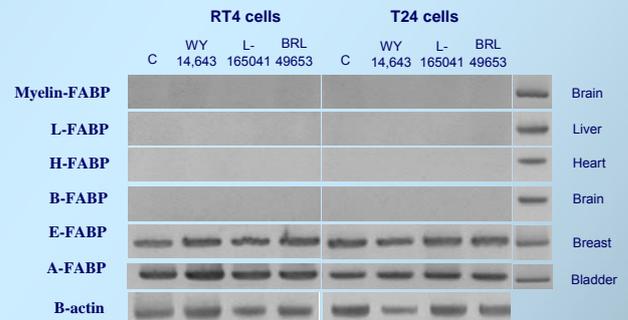
- VEGF protein levels in cell-conditioned media were determined by ELISA, using Human VEGF Immunoassay.

RT-PCR with specific primers for different members of the FABP family.

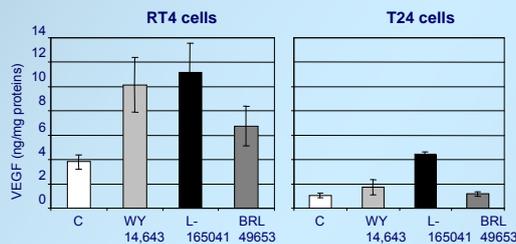
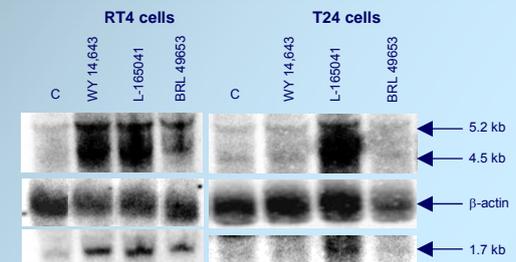
Western-blotting / Immunocytofluorescence

- Antibodies: human A-FABP, A-FABP-FITC, β -actin, HDAC-3, PPAR α , γ

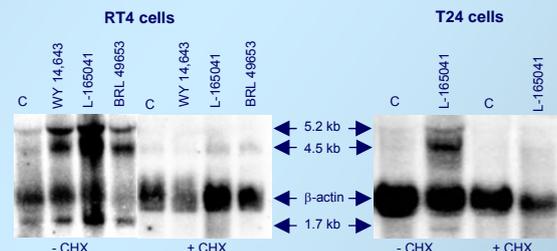
Results



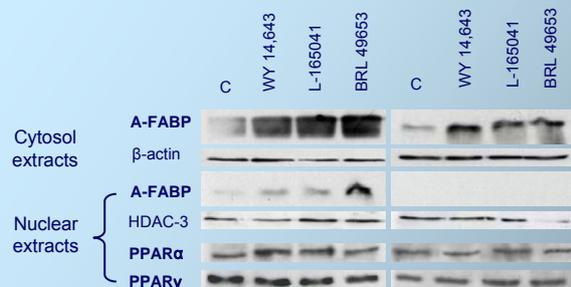
3. Expression analysis of different FABP in RT4 and T24 cells by RT-PCR : A-FABP and E-FABP are expressed in both bladder cancer cell lines suggesting that the absence of effect of PPAR α and PPAR γ activation on VEGF expression is not due to an absence of the expression of these proteins.



1. Regulation of *vegf* gene by PPARs in bladder cancer cell lines RT4 and T24 : VEGF (mRNA analysis by Northern-blotting and protein level determination by ELISA test) is differentially up-regulated by the three PPAR isotypes in bladder cancer cell lines RT4 and T24. Its expression is increased by PPAR α and γ in RT4 cells and only by PPAR β in T24 cells.



2. Regulation of *vegf* expression involves an indirect molecular mechanism: in human bladder cancer cell lines RT4 and T24, the treatment with cycloheximide (CHX) completely inhibits PPAR ligand-induced VEGF mRNA expression. These data demonstrate that the stimulation of VEGF mRNA expression by synthetic PPAR ligands is induced by the increased synthesis of new proteins such as regulatory proteins.

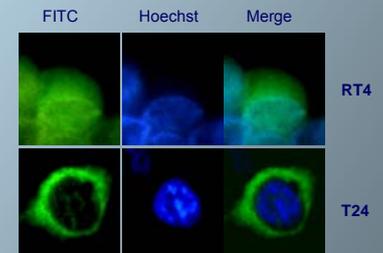


4. Subcellular localization of A-FABP

In RT4 cells : A-FABP is present in the cytosol and in the nucleus.
In T24 cells : A-FABP is exclusively present in the cytosol. A-FABP is not localized in the nucleus.

5. Immunocytofluorescence detection of A-FABP

In RT4 cells : A-FABP immunostaining is detected in the cytosol and in the nucleus.
In T24 cells : A-FABP is exclusively detected in the cytosol. A-FABP is not localized in the nucleus. This result confirms those obtained by Western-blotting.



Conclusion

The absence of effect of PPAR α and PPAR γ activation on VEGF expression in T24 cell line could be due to the absence of A-FABP protein in the nucleus of the cells. Further experiments in the presence of A-FABP siRNA are in progress to confirm this hypothesis.

Bibliographie

- Abdelwahab, S. A., Owada, Y., Kitanaka, N., Adida, A., Sakagami, H., Ono, M., Watanabe, M., Spener, F. and Kondo, H. (2007) Enhanced expression of adipocyte-type fatty acid binding protein in murine lymphocytes in response to dexamethasone treatment. *Mol Cell Biochem*, **299**: 99-107.
- Achen, M. G., Jeltsch, M., Kukk, E., Makinen, T., Vitali, A., Wilks, A. F., Alitalo, K. and Stackner, S. A. (1998) Vascular endothelial growth factor d (vegfd) is a ligand for the tyrosine kinases vegf receptor 2 (flk1) and vegf receptor 3 (flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 548-553.
- Adams, M., Reginato, M. J., Shao, D., Lazar, M. A. and Chatterjee, V. K. (1997) Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem*, **272**: 5128-5132.
- Adamson, J., Morgan, E. A., Beesley, C., Mei, Y., Foster, C. S., Fujii, H., Rudland, P. S., Smith, P. H. and Ke, Y. (2003) High-level expression of cutaneous fatty acid-binding protein in prostatic carcinomas and its effect on tumorigenicity. *Oncogene*, **22**: 2739-2749.
- Alarcon de la Lastra, C., Sanchez-Fidalgo, S., Villegas, I. and Motilva, V. (2004) New pharmacological perspectives and therapeutic potential of ppar-gamma agonists. *Curr Pharm Des*, **10**: 3505-3524.
- Alo, P. L., Visca, P., Marci, A., Mangoni, A., Botti, C. and Di Tondo, U. (1996) Expression of fatty acid synthase (fas) as a predictor of recurrence in stage i breast carcinoma patients. *Cancer*, **77**: 474-482.
- Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J. and Keshet, E. (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med*, **1**: 1024-1028.
- Amri, E. Z., Bertrand, B., Ailhaud, G. and Grimaldi, P. (1991) Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the ap2 gene expression. *J Lipid Res*, **32**: 1449-1456.
- Anthony, F. W., Wheeler, T., Elcock, C. L., Pickett, M. and Thomas, E. J. (1994) Short report: Identification of a specific pattern of vascular endothelial growth factor mrna expression in human placenta and cultured placental fibroblasts. *Placenta*, **15**: 557-561.
- Aprelikova, O., Pajusola, K., Partanen, J., Armstrong, E., Alitalo, R., Bailey, S. K., McMahon, J., Wasmuth, J., Huebner, K. and Alitalo, K. (1992) Flt4, a novel class iii receptor tyrosine kinase in chromosome 5q33-qter. *Cancer Res*, **52**: 746-748.
- Ayers, S. D., Nedrow, K. L., Gillilan, R. E. and Noy, N. (2007) Continuous nucleocytoplasmic shuttling underlies transcriptional activation of ppargamma by fabp4. *Biochemistry*, **46**: 6744-6752.
- Bakkar, A. A., Wallerand, H., Radvanyi, F., Lahaye, J. B., Pissard, S., Lecerf, L., Kouyoumdjian, J. C., Abbou, C. C., Pairon, J. C., Jaurand, M. C., Thiery, J. P., Chopin, D. K. and de Medina, S. G. (2003) Fgfr3 and tp53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*, **63**: 8108-8112.
- Balendiran, G. K., Schnutgen, F., Scapin, G., Borchers, T., Xhong, N., Lim, K., Godbout, R., Spener, F. and Sacchetti, J. C. (2000) Crystal structure and thermodynamic analysis of human brain fatty acid-binding protein. *J Biol Chem*, **275**: 27045-27054.
- Barger, P. M., Browning, A. C., Garner, A. N. and Kelly, D. P. (2001) P38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha: A potential role in the cardiac metabolic stress response. *J Biol Chem*, **276**: 44495-44501.
- Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H. A., Mantovani, A. and Marme, D. (1996) Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (vegf) is mediated via the vegf receptor flt-1. *Blood*, **87**: 3336-3343.
- Bates, D. O., Cui, T. G., Doughty, J. M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J. D., Peat, D., Gillatt, D. and Harper, S. J. (2002) Vegf165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res*, **62**: 4123-4131.
- Bergsland, E. K. (2004) Update on clinical trials targeting vascular endothelial growth factor in cancer. *Am J Health Syst Pharm*, **61**: S12-20.
- Bernardini, S., Fauconnet, S., Chabannes, E., Henry, P. C., Adessi, G. and Bittard, H. (2001) Serum levels of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor in bladder cancer. *J Urol*, **166**: 1275-1279.
- Berse, B., Brown, L. F., Van de Water, L., Dvorak, H. F. and Senger, D. R. (1992) Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell*, **3**: 211-220.
- Bezy, O., Vernochet, C., Gestá, S., Farmer, S. R. and Kahn, C. R. (2007) Trb3 blocks adipocyte differentiation through the inhibition of c/ebpalpha transcriptional activity. *Mol Cell Biol*, **27**: 6818-6831.
- Billerey, C., Chopin, D., Aubriot-Lorton, M. H., Ricol, D., Gil Diez de Medina, S., Van Rhijn, B., Bralet, M. P., Lefrere-Belda, M. A., Lahaye, J. B., Abbou, C. C., Bonaventure, J., Zafrani, E. S., van der Kwast, T., Thiery, J. P. and Radvanyi, F. (2001) Frequent fgfr3 mutations in papillary non-invasive bladder (pta) tumors. *Am J Pathol*, **158**: 1955-1959.
- Biscetti, F., Gaetani, E., Flex, A., Aprahamian, T., Hopkins, T., Straface, G., Pecorini, G., Stigliano, E., Smith, R. C., Angelini, F., Castellot, J. J., Jr. and Pola, R. (2008) Selective activation of peroxisome proliferator-activated receptor (ppar)alpha and ppar gamma induces neoangiogenesis through a vascular endothelial growth factor-dependent mechanism. *Diabetes*, **57**: 1394-1404.
- Bishop-Bailey, D. and Hla, T. (1999) Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (ppar) ligand 15-deoxy-delta12, 14-prostaglandin j2. *J Biol Chem*, **274**: 17042-17048.
- Blake, W. L. and Clarke, S. D. (1990) Induction of adipose fatty acid binding protein (a-fabp) by insulin-like growth factor-1 (igf-1) in 3t3-l1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **173**: 87-91.
- Blann, A. D., Belgore, F. M., Constans, J., Conri, C. and Lip, G. Y. (2001) Plasma vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1 in patients with hyperlipidemia and atherosclerosis and the effects of fluvastatin or fenofibrate. *Am J Cardiol*, **87**: 1160-1163.
- Blanquart, C., Barbier, O., Fruchart, J. C., Staels, B. and Glineur, C. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (pparalpha) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes. *J Biol Chem*, **277**: 37254-37259.
- Blanquart, C., Barbier, O., Fruchart, J. C., Staels, B. and Glineur, C. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors: Regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **85**: 267-273.
- Bleck, B., Hohoff, C., Binas, B., Rustow, B., Dixkens, C., Hameister, H., Borchers, T. and Spener, F. (1998) Cloning and chromosomal localisation of the murine epidermal-type fatty acid binding protein gene (fabpe). *Gene*, **215**: 123-130.
- Bochner, B. H., Cote, R. J., Weidner, N., Groshen, S., Chen, S. C., Skinner, D. G. and Nichols, P. W. (1995) Angiogenesis in bladder cancer: Relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst*, **87**: 1603-1612.
- Bonow, R. O. and Gheorghiane, M. (2004) The diabetes epidemic: A national and global crisis. *Am J Med*, **116 Suppl 5A**: 2S-10S.
- Boord, J. B., Maeda, K., Makowski, L., Babaev, V. R., Fazio, S., Linton, M. F. and Hotamisligil, G. S. (2004) Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation*, **110**: 1492-1498.
- Brandau, S. and Suttman, H. (2007) Thirty years of bcg immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: A success story with room for improvement. *Biomed Pharmacother*, **61**: 299-305.
- Brown, L. F., Berse, B., Jackman, R. W., Tognazzi, K., Manseau, E. J., Dvorak, H. F. and Senger, D. R. (1993) Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol*, **143**: 1255-1262.

- Brown, P. J., Stuart, L. W., Hurley, K. P., Lewis, M. C., Winegar, D. A., Wilson, J. G., Wilkison, W. O., Ittoop, O. R. and Willson, T. M. (2001) Identification of a subtype selective human pparalpha agonist through parallel-array synthesis. *Bioorg Med Chem Lett*, **11**: 1225-1227.
- Budhu, A., Gillilan, R. and Noy, N. (2001) Localization of the rar interaction domain of cellular retinoic acid binding protein-ii. *J Mol Biol*, **305**: 939-949.
- Budhu, A. S. and Noy, N. (2002) Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein ii and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol*, **22**: 2632-2641.
- Burdick, A. D., Bility, M. T., Girroir, E. E., Billin, A. N., Willson, T. M., Gonzalez, F. J. and Peters, J. M. (2007) Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta(pparbeta/delta) inhibits cell growth of human n/tert-1 keratinocytes. *Cell Signal*, **19**: 1163-1171.
- Bussolino, F., Mantovani, A. and Persico, G. (1997) Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci*, **22**: 251-256.
- Byun, J. H., Park, B. W., Kim, J. R. and Lee, J. H. (2007) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors after mandibular distraction osteogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg*, **36**: 338-344.
- Camp, H. S., Chaudhry, A. and Leff, T. (2001) A novel potent antagonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks adipocyte differentiation but does not revert the phenotype of terminally differentiated adipocytes. *Endocrinology*, **142**: 3207-3213.
- Campbell, S. C., Volpert, O. V., Ivanovich, M. and Bouck, N. P. (1998) Molecular mediators of angiogenesis in bladder cancer. *Cancer Res*, **58**: 1298-1304.
- Capon, D. J., Chen, E. Y., Levinson, A. D., Seeburg, P. H. and Goeddel, D. V. (1983) Complete nucleotide sequences of the t24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature*, **302**: 33-37.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoecq, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. and Nagy, A. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single vegf allele. *Nature*, **380**: 435-439.
- Carmeliet, P. and Jain, R. K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, **407**: 249-257.
- Celis, A., Rasmussen, H. H., Celis, P., Basse, B., Lauridsen, J. B., Ratz, G., Hein, B., Ostergaard, M., Wolf, H., Orntoft, T. and Celis, J. E. (1999) Short-term culturing of low-grade superficial bladder transitional cell carcinomas leads to changes in the expression levels of several proteins involved in key cellular activities. *Electrophoresis*, **20**: 355-361.
- Celis, J. E., Ostergaard, M., Basse, B., Celis, A., Lauridsen, J. B., Ratz, G. P., Andersen, I., Hein, B., Wolf, H., Orntoft, T. F. and Rasmussen, H. H. (1996) Loss of adipocyte-type fatty acid binding protein and other protein biomarkers is associated with progression of human bladder transitional cell carcinomas. *Cancer Res*, **56**: 4782-4790.
- Chabannes, E., Fauconnet, S., Bernardini, S., Wallerand, H., Adessi, G. and Bittard, H. (2001) Protein kinase c signalling pathway is involved in the regulation of vascular endothelial growth factor expression in human bladder transitional carcinoma cells. *Cell Signal*, **13**: 585-591.
- Chaffer, C. L., Thomas, D. M., Thompson, E. W. and Williams, E. D. (2006) Ppargamma-independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma. *BMC Cancer*, **6**: 53.
- Chang, Y. S., di Tomaso, E., McDonald, D. M., Jones, R., Jain, R. K. and Munn, L. L. (2000) Mosaic blood vessels in tumors: Frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 14608-14613.
- Charnock-Jones, D. S., Sharkey, A. M., Rajput-Williams, J., Burch, D., Schofield, J. P., Fountain, S. A., Boocock, C. A. and Smith, S. K. (1993) Identification and localization of alternately spliced mrnas for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod*, **48**: 1120-1128.
- Chawla, A., Boisvert, W. A., Lee, C. H., Laffitte, B. A., Barak, Y., Joseph, S. B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P. A., Curtiss, L. K., Evans, R. M. and Tontonoz, P. (2001) A ppar gamma-lxr-abc1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*, **7**: 161-171.
- Chen, G. G., Lee, J. F., Wang, S. H., Chan, U. P., Ip, P. C. and Lau, W. Y. (2002) Apoptosis induced by activation of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma is associated with bcl-2 and nf-kappab in human colon cancer. *Life Sci*, **70**: 2631-2646.
- Chen, J. D. and Evans, R. M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, **377**: 454-457.
- Chin, K., Kurashima, Y., Ogura, T., Tajiri, H., Yoshida, S. and Esumi, H. (1997) Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene*, **15**: 437-442.
- Chmurzynska, A. (2006) The multigene family of fatty acid-binding proteins (fabps): Function, structure and polymorphism. *J Appl Genet*, **47**: 39-48.
- Choi, Y. D., Cho, N. H., Ahn, H. S., Cho, K. S., Cho, S. Y. and Yang, W. J. (2007) Matrix metalloproteinase expression in the recurrence of superficial low grade bladder transitional cell carcinoma. *J Urol*, **177**: 1174-1178.
- Chopin, D. and Gattegno, B. (2001) Epidémiologie descriptive des tumeurs superficielles de la vessie. *Prog Urol*, **11**: 955-960.
- Chow, N. H., Liu, H. S., Chan, S. H., Cheng, H. L. and Tzai, T. S. (1999) Expression of vascular endothelial growth factor in primary superficial bladder cancer. *Anticancer Res*, **19**: 4593-4597.
- Christy, R. J., Yang, V. W., Ntambi, J. M., Geiman, D. E., Landschulz, W. H., Friedman, A. D., Nakabeppu, Y., Kelly, T. J. and Lane, M. D. (1989) Differentiation-induced gene expression in 3t3-l1 preadipocytes: Ccaat/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes. *Genes Dev*, **3**: 1323-1335.
- Chui, P. C., Guan, H. P., Lehrke, M. and Lazar, M. A. (2005) Ppargamma regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized ldl receptor 1. *J Clin Invest*, **115**: 2244-2256.
- Claffey, K. P., Senger, D. R. and Spiegelman, B. M. (1995) Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of vpf/vegf. *Biochim Biophys Acta*, **1246**: 1-9.
- Clairotte, A., Lascombe, I., Fauconnet, S., Mauny, F., Algros, M. P., Bittard, H. and Kantelip, B. (2006) Expression of e-cadherin and alpha-, beta-, gamma-catenins in patients with bladder cancer: Identification of gamma-catenin as a new prognostic marker of neoplastic progression in t1 superficial urothelial tumors. *Am J Clin Pathol*, **125**: 119-126.
- Coe, N. R. and Bernlohr, D. A. (1998) Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1391**: 287-306.
- Cook, J. S., Lucas, J. J., Sibley, E., Bolanowski, M. A., Christy, R. J., Kelly, T. J. and Lane, M. D. (1988) Expression of the differentiation-induced gene for fatty acid-binding protein is activated by glucocorticoid and camp. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**: 2949-2953.
- Cordon-Cardo, C., Dalbagni, G., Saez, G. T., Oliva, M. R., Zhang, Z. F., Rosai, J., Reuter, V. E. and Pellicer, A. (1994) P53 mutations in human bladder cancer: Genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer*, **56**: 347-353.
- Cordon-Cardo, C., Zhang, Z. F., Dalbagni, G., Drobnjak, M., Charytonowicz, E., Hu, S. X., Xu, H. J., Reuter, V. E. and Benedict, W. F. (1997) Cooperative effects of p53 and prb alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Res*, **57**: 1217-1221.

- Crew, J. P., O'Brien, T., Bicknell, R., Fuggle, S., Cranston, D. and Harris, A. L. (1999) Urinary vascular endothelial growth factor and its correlation with bladder cancer recurrence rates. *J Urol*, **161**: 799-804.
- Crew, J. P., O'Brien, T., Bradburn, M., Fuggle, S., Bicknell, R., Cranston, D. and Harris, A. L. (1997) Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res*, **57**: 5281-5285.
- Cui, T. G., Foster, R. R., Saleem, M., Mathieson, P. W., Gillatt, D. A., Bates, D. O. and Harper, S. J. (2004) Differentiated human podocytes endogenously express an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor (vegfl65b) mrna and protein. *Am J Physiol Renal Physiol*, **286**: F767-773.
- Das, K., Zhao, Y., Sugiono, M., Lau, W., Tan, P. H. and Cheng, C. (2007) Differential expression of vascular endothelial growth factor165b in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Oncol*, **25**: 317-321.
- De Santis, M. L., Hammamieh, R., Das, R. and Jett, M. (2004) Adipocyte-fatty acid binding protein induces apoptosis in du145 prostate cancer cells. *J Exp Ther Oncol*, **4**: 91-100.
- de Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. and Williams, L. T. (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, **255**: 989-991.
- Dennis, A. P. and O'Malley, B. W. (2005) Rush hour at the promoter: How the ubiquitin-proteasome pathway polices the traffic flow of nuclear receptor-dependent transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **93**: 139-151.
- Desvergne, B. and Wahli, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, **20**: 649-688.
- Dickinson, A. J., Fox, S. B., Persad, R. A., Hollyer, J., Sibley, G. N. and Harris, A. L. (1994) Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol*, **74**: 762-766.
- Dikov, M. M., Ohm, J. E., Ray, N., Tchekneva, E. E., Burlison, J., Moghanaki, D., Nadaf, S. and Carbone, D. P. (2005) Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J Immunol*, **174**: 215-222.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. and Zeiher, A. M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by akt-dependent phosphorylation. *Nature*, **399**: 601-605.
- Diradourian, C., Girard, J. and Pegorier, J. P. (2005) Phosphorylation of ppars: From molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie*, **87**: 33-38.
- Distel, R. J., Robinson, G. S. and Spiegelman, B. M. (1992) Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem*, **267**: 5937-5941.
- Dominick, M. A., White, M. R., Sanderson, T. P., Van Vleet, T., Cohen, S. M., Arnold, L. E., Cano, M., Tannehill-Gregg, S., Moehlenkamp, J. D., Waites, C. R. and Schilling, B. E. (2006) Urothelial carcinogenesis in the urinary bladder of male rats treated with muraglitazar, a ppar alpha/gamma agonist: Evidence for urolithiasis as the inciting event in the mode of action. *Toxicol Pathol*, **34**: 903-920.
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. and Wahli, W. (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, **68**: 879-887.
- Dubuquoy, L., Bourdon, C., Peuchmaur, M., Leibowitz, M. D., Nutten, S., Colombel, J. F., Auwerx, J. and Desreumaux, P. (2000) [peroxisome proliferator-activated receptor (ppar) gamma: A new target for the treatment of inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol Clin Biol*, **24**: 719-724.
- Eckert, R. L., Crish, J. F., Banks, E. B. and Welter, J. F. (1997) The epidermis: Genes on - genes off. *J Invest Dermatol*, **109**: 501-509.
- Egerod, F. L., Nielsen, H. S., Iversen, L., Thorup, I., Storgaard, T. and Oleksiewicz, M. B. (2005) Biomarkers for early effects of carcinogenic dual-acting ppar agonists in rat urinary bladder urothelium in vivo. *Biomarkers*, **10**: 295-309.
- Eggert, A., Ikegaki, N., Kwiatkowski, J., Zhao, H., Brodeur, G. M. and Himelstein, B. P. (2000) High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res*, **6**: 1900-1908.
- Eibl, G., Wente, M. N., Reber, H. A. and Hines, O. J. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces pancreatic cancer cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **287**: 522-529.
- Eissa, S., Salem, A. M., Zohny, S. F. and Hegazy, M. G. (2007) The diagnostic efficacy of urinary tgf-beta1 and vegf in bladder cancer: Comparison with voided urine cytology. *Cancer Biomark*, **3**: 275-285.
- Elstner, E., Muller, C., Koshizuka, K., Williamson, E. A., Park, D., Asou, H., Shintaku, P., Said, J. W., Heber, D. and Koeffler, H. P. (1998) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in bnx mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 8806-8811.
- Erig, D., Elmajian, D., Groshen, S., Freeman, J. A., Stein, J. P., Chen, S. C., Nichols, P. W., Skinner, D. G., Jones, P. A. and Cote, R. J. (1994) Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med*, **331**: 1259-1264.
- Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A. M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J. C., Deeb, S., Vidal-Puig, A., Flier, J., Briggs, M. R., Staels, B., Vidal, H. and Auwerx, J. (1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human ppargamma gene. *J Biol Chem*, **272**: 18779-18789.
- Fajas, L., Fruchart, J. C. and Auwerx, J. (1998) Ppargamma3 mrna: A distinct ppargamma mrna subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett*, **438**: 55-60.
- Fan, F., Wey, J. S., McCarty, M. F., Belcheva, A., Liu, W., Bauer, T. W., Somcio, R. J., Wu, Y., Hooper, A., Hicklin, D. J. and Ellis, L. M. (2005) Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene*, **24**: 2647-2653.
- Fauconnet, S., Lascombe, I., Chabannes, E., Adessi, G. L., Desvergne, B., Wahli, W. and Bittard, H. (2002) Differential regulation of vascular endothelial growth factor expression by peroxisome proliferator-activated receptors in bladder cancer cells. *J Biol Chem*, **277**: 23534-23543.
- Feige, J. N., Gelman, L., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W. and Desvergne, B. (2005) Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid x receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J Biol Chem*, **280**: 17880-17890.
- Ferrara, N. (1996) Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer*, **32A**: 2413-2422.
- Ferrara, N. (2004) Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, **25**: 581-611.
- Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, **18**: 4-25.
- Ferrara, N. and Henzel, W. J. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **161**: 851-858.
- Ferre, P. (2004) The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: Relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*, **53 Suppl 1**: S43-50.
- Floyd, Z. E. and Stephens, J. M. (2004) Control of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 stability and activity by sumoylation. *Obes Res*, **12**: 921-928.

- Folkman, J. (1975) Tumor angiogenesis: A possible control point in tumor growth. *Ann Intern Med*, **82**: 96-100.
- Folkman, J. (1992) The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol*, **3**: 65-71.
- Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, **1**: 27-31.
- Folkman, J. and Klagsbrun, M. (1987) Angiogenic factors. *Science*, **235**: 442-447.
- Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C. and Williams, G. (1971) Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*, **133**: 275-288.
- Folkman, J. and Shing, Y. (1992) Angiogenesis. *J Biol Chem*, **267**: 10931-10934.
- Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M. and Breitman, M. L. (1995) Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, **376**: 66-70.
- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M. and Evans, R. M. (1995) 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin j2 is a ligand for the adipocyte determination factor ppar gamma. *Cell*, **83**: 803-812.
- Fu, Y., Luo, N. and Lopes-Virella, M. F. (2000) Oxidized ldl induces the expression of albp/ap2 mrna and protein in human thp-1 macrophages. *J Lipid Res*, **41**: 2017-2023.
- Fuh, G., Garcia, K. C. and de Vos, A. M. (2000) The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem*, **275**: 26690-26695.
- Fuh, G., Li, B., Crowley, C., Cunningham, B. and Wells, J. A. (1998) Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, **273**: 11197-11204.
- Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A. and Sessa, W. C. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase akt. *Nature*, **399**: 597-601.
- Furuhashi, M. and Hotamisligil, G. S. (2008) Fatty acid-binding proteins: Role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, **7**: 489-503.
- Furuhashi, M., Tuncman, G., Gorgun, C. Z., Makowski, L., Atsumi, G., Vaillancourt, E., Kono, K., Babaev, V. R., Fazio, S., Linton, M. F., Sulsky, R., Robl, J. A., Parker, R. A. and Hotamisligil, G. S. (2007) Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein ap2. *Nature*, **447**: 959-965.
- Garcia del Muro, X., Torregrosa, A., Munoz, J., Castellsague, X., Condom, E., Vignes, F., Arance, A., Fabra, A. and Germa, J. R. (2000) Prognostic value of the expression of e-cadherin and beta-catenin in bladder cancer. *Eur J Cancer*, **36**: 357-362.
- Gattegno, B. and Chopin, D. (2001) Prise en charge des tumeurs superficielles de la vessie. *Prog Urol*, **11**: 1159-1174.
- Gerber, H. P., Dixit, V. and Ferrara, N. (1998) Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins bcl-2 and a1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, **273**: 13313-13316.
- Gille, H., Kowalski, J., Li, B., LeCouter, J., Moffat, B., Zioncheck, T. F., Pelletier, N. and Ferrara, N. (2001) Analysis of biological effects and signaling properties of flt-1 (vegfr-1) and kdr (vegfr-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem*, **276**: 3222-3230.
- Girroir, E. E., Hollingshead, H. E., Billin, A. N., Willson, T. M., Robertson, G. P., Sharma, A. K., Amin, S., Gonzalez, F. J. and Peters, J. M. (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (pparbeta/delta) ligands inhibit growth of uacc903 and mcf7 human cancer cell lines. *Toxicology*, **243**: 236-243.
- Golka, K., Wiese, A., Assennato, G. and Bolt, H. M. (2004) Occupational exposure and urological cancer. *World J Urol*, **21**: 382-391.
- Gorlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F. R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S. and Izaurralde, E. (1997) A novel class of rangtp binding proteins. *J Cell Biol*, **138**: 65-80.
- Grabacka, M., Placha, W., Plonka, P. M., Pajak, S., Urbanska, K., Laidler, P. and Slominski, A. (2004) Inhibition of melanoma metastases by fenofibrate. *Arch Dermatol Res*, **296**: 54-58.
- Grabacka, M., Plonka, P. M., Urbanska, K. and Reiss, K. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation decreases metastatic potential of melanoma cells in vitro via down-regulation of akt. *Clin Cancer Res*, **12**: 3028-3036.
- Grau, R., Punzon, C., Fresno, M. and Iniguez, M. A. (2006) Peroxisome-proliferator-activated receptor alpha agonists inhibit cyclo-oxygenase 2 and vascular endothelial growth factor transcriptional activation in human colorectal carcinoma cells via inhibition of activator protein-1. *Biochem J*, **395**: 81-88.
- Greene, M. E., Blumberg, B., McBride, O. W., Yi, H. F., Kronquist, K., Kwan, K., Hsieh, L., Greene, G. and Nimer, S. D. (1995) Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: Expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr*, **4**: 281-299.
- Groah, S. L., Weitzenkamp, D. A., Lammertse, D. P., Whiteneck, G. G., Lezotte, D. C. and Hamman, R. F. (2002) Excess risk of bladder cancer in spinal cord injury: Evidence for an association between indwelling catheter use and bladder cancer. *Arch Phys Med Rehabil*, **83**: 346-351.
- Gromova, I., Gromov, P., Wolf, H. and Celis, J. E. (1998) Protein abundance and mrna levels of the adipocyte-type fatty acid binding protein correlate in non-invasive and invasive bladder transitional cell carcinomas. *Int J Oncol*, **13**: 379-383.
- Grosclaude, P. (2003). Vessie, *Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en france de 1978 à 2000.*, InVS, 131-136.
- Grosskreutz, C. L., Anand-Apte, B., Duplax, C., Quinn, T. P., Terman, B. I., Zetter, B. and D'Amore, P. A. (1999) Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc Res*, **58**: 128-136.
- Grossman, S. R., Deato, M. E., Brignone, C., Chan, H. M., Kung, A. L., Tagami, H., Nakatani, Y. and Livingston, D. M. (2003) Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science*, **300**: 342-344.
- Grundy, S. M. (2004) Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**: 2595-2600.
- Guan, H. P., Ishizuka, T., Chui, P. C., Lehrke, M. and Lazar, M. A. (2005) Corepressors selectively control the transcriptional activity of ppargamma in adipocytes. *Genes Dev*, **19**: 453-461.
- Guan, Y. (2002) Targeting peroxisome proliferator-activated receptors (ppars) in kidney and urologic disease. *Minerva Urol Nefrol*, **54**: 65-79.
- Guan, Y., Zhang, Y., Davis, L. and Breyer, M. D. (1997) Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in urinary tract of rabbits and humans. *Am J Physiol*, **273**: F1013-1022.
- Guan, Y. F., Zhang, Y. H., Breyer, R. M., Davis, L. and Breyer, M. D. (1999) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (ppargamma) in human transitional bladder cancer and its role in inducing cell death. *Neoplasia*, **1**: 330-339.
- Gunningham, S. P., Currie, M. J., Han, C., Robinson, B. A., Scott, P. A., Harris, A. L. and Fox, S. B. (2001) Vegf-b expression in human primary breast cancers is associated with lymph node metastasis but not angiogenesis. *J Pathol*, **193**: 325-332.

- Gupta, R. A., Tan, J., Krause, W. F., Geraci, M. W., Willson, T. M., Dey, S. K. and DuBois, R. N. (2000) Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 13275-13280.
- Hammamieh, R., Chakraborty, N., Barmada, M., Das, R. and Jett, M. (2005) Expression patterns of fatty acid binding proteins in breast cancer cells. *J Exp Ther Oncol*, **5**: 133-143.
- Hammamieh, R., Chakraborty, N., Das, R. and Jett, M. (2004) Molecular impacts of antisense complementary to the liver fatty acid binding protein (fabp) mrna in du 145 prostate cancer cells in vitro. *J Exp Ther Oncol*, **4**: 195-202.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, **86**: 353-364.
- Harris, P. K. and Kletzien, R. F. (1994) Localization of a pioglitazone response element in the adipocyte fatty acid-binding protein gene. *Mol Pharmacol*, **45**: 439-445.
- Hartmann, A., Moser, K., Kriegmair, M., Hofstetter, A., Hofstaedter, F. and Knuechel, R. (1999) Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am J Pathol*, **154**: 721-727.
- Hashimoto, T., Kusakabe, T., Sugino, T., Fukuda, T., Watanabe, K., Sato, Y., Nashimoto, A., Honma, K., Kimura, H., Fujii, H. and Suzuki, T. (2004) Expression of heart-type fatty acid-binding protein in human gastric carcinoma and its association with tumor aggressiveness, metastasis and poor prognosis. *Pathobiology*, **71**: 267-273.
- Haslmayer, P., Thalhammer, T., Jager, W., Aust, S., Steiner, G., Ensinger, C. and Obrist, P. (2002) The peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand 15-deoxy-delta2,14-prostaglandin j2 induces vascular endothelial growth factor in the hormone-independent prostate cancer cell line pc 3 and the urinary bladder carcinoma cell line 5637. *Int J Oncol*, **21**: 915-920.
- Haunerland, N. H. and Spener, F. (2004) Fatty acid-binding proteins—insights from genetic manipulations. *Prog Lipid Res*, **43**: 328-349.
- Hauser, S., Adelmant, G., Sarraf, P., Wright, H. M., Mueller, E. and Spiegelman, B. M. (2000) Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem*, **275**: 18527-18533.
- He, T. C., Chan, T. A., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1999) Ppardelta is an apc-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*, **99**: 335-345.
- Heinemann, V. (2008) Review of bevacizumab in the treatment of metastatic breast cancer. *EJC suppl*, **6**: 13-18.
- Heinlein, C. A., Ting, H. J., Yeh, S. and Chang, C. (1999) Identification of ara70 as a ligand-enhanced coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*, **274**: 16147-16152.
- Helledie, T., Antonius, M., Sorensen, R. V., Hertz, A. V., Bernlohr, D. A., Kolvraa, S., Kristiansen, K. and Mandrup, S. (2000) Lipid-binding proteins modulate ligand-dependent trans-activation by peroxisome proliferator-activated receptors and localize to the nucleus as well as the cytoplasm. *J Lipid Res*, **41**: 1740-1751.
- Heron, J. F. (2008) Bevacizumab, Centre François Baclesse, <http://www.oncoprof.net/>.
- Herrmann, E., Eltze, E., Bierer, S., Kopke, T., Gorge, T., Neumann, J., Hertle, L. and Wulfing, C. (2007) Vegf-c, vegf-d and flt-4 in transitional bladder cancer: Relationships to clinicopathological parameters and long-term survival. *Anticancer Res*, **27**: 3127-3133.
- Hertz, A. V., Bennaars-Eiden, A. and Bernlohr, D. A. (2002) Increased lipolysis in transgenic animals overexpressing the epithelial fatty acid binding protein in adipose cells. *J Lipid Res*, **43**: 2105-2111.
- Heuckeroth, R. O., Birkenmeier, E. H., Levin, M. S. and Gordon, J. I. (1987) Analysis of the tissue-specific expression, developmental regulation, and linkage relationships of a rodent gene encoding heart fatty acid binding protein. *J Biol Chem*, **262**: 9709-9717.
- Hirotsani, M., Tsukamoto, T., Bourdeaux, J., Sadano, H. and Osumi, T. (2001) Stabilization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by the ligand. *Biochem Biophys Res Commun*, **288**: 106-110.
- Hodder, S. L., Mahmoud, A. A., Sorenson, K., Weinert, D. M., Stein, R. L., Ouma, J. H., Koech, D. and King, C. H. (2000) Predisposition to urinary tract epithelial metaplasia in schistosoma haematobium infection. *Am J Trop Med Hyg*, **63**: 133-138.
- Hoekstra, M., Stitzinger, M., van Wanrooij, E. J., Michon, I. N., Kruijt, J. K., Kamphorst, J., Van Eck, M., Vreugdenhil, E., Van Berkel, T. J. and Kuiper, J. (2006) Microarray analysis indicates an important role for fabp5 and putative novel fabps on a western-type diet. *J Lipid Res*, **47**: 2198-2207.
- Holash, J., Maisonpierre, P. C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C. R., Zagzag, D., Yancopoulos, G. D. and Wiegand, S. J. (1999) Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and vegf. *Science*, **284**: 1994-1998.
- Hollingshead, H. E., Borland, M. G., Billin, A. N., Willson, T. M., Gonzalez, F. J. and Peters, J. M. (2008) Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (pparbeta/delta) and inhibition of cyclooxygenase 2 (cox2) attenuate colon carcinogenesis through independent signaling mechanisms. *Carcinogenesis*, **29**: 169-176.
- Hollingshead, H. E., Killins, R. L., Borland, M. G., Girroir, E. E., Billin, A. N., Willson, T. M., Sharma, A. K., Amin, S., Gonzalez, F. J. and Peters, J. M. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (pparbeta/delta) ligands do not potentiate growth of human cancer cell lines. *Carcinogenesis*, **28**: 2641-2649.
- Holmqvist, K., Cross, M. J., Rolny, C., Hagerkvist, R., Rahimi, N., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L. and Welsh, M. (2004) The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (vegf) receptor-2 and regulates vegf-dependent cellular migration. *J Biol Chem*, **279**: 22267-22275.
- Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K. and et al. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, **377**: 397-404.
- Hotamisligil, G. S., Johnson, R. S., Distel, R. J., Ellis, R., Pappaioanou, V. E. and Spiegelman, B. M. (1996) Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in ap2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science*, **274**: 1377-1379.
- Hotz, H. G., Hines, O. J., Masood, R., Hotz, B., Foitzik, T., Buhr, H. J., Gill, P. S. and Reber, H. A. (2005) Vegf antisense therapy inhibits tumor growth and improves survival in experimental pancreatic cancer. *Surgery*, **137**: 192-199.
- Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J. and Ferrara, N. (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*, **267**: 26031-26037.
- Hromas, R., Collins, S. J., Hickstein, D., Raskind, W., Deaven, L. L., O'Hara, P., Hagen, F. S. and Kaushansky, K. (1991) A retinoic acid-responsive human zinc finger gene, mzf-1, preferentially expressed in myeloid cells. *J Biol Chem*, **266**: 14183-14187.
- Hsi, L. C., Wilson, L., Nixon, J. and Eling, T. E. (2001) 15-lipoxygenase-1 metabolites down-regulate peroxisome proliferator-activated receptor gamma via the mapk signaling pathway. *J Biol Chem*, **276**: 34545-34552.
- Hu, E., Kim, J. B., Sarraf, P. and Spiegelman, B. M. (1996) Inhibition of adipogenesis through map kinase-mediated phosphorylation of ppargamma. *Science*, **274**: 2100-2103.
- Hu, J. S., Hastings, G. A., Cherry, S., Gentz, R., Ruben, S. and Coleman, T. A. (1997) A novel regulatory function of proteolytically cleaved vegf-2 for vascular endothelial and smooth muscle cells. *Faseb J*, **11**: 498-504.

- Huang, H., Starodub, O., McIntosh, A., Atshaves, B. P., Woldegiorgis, G., Kier, A. B. and Schroeder, F. (2004) Liver fatty acid-binding protein colocalizes with peroxisome proliferator activated receptor alpha and enhances ligand distribution to nuclei of living cells. *Biochemistry*, **43**: 2484-2500.
- Hung, R. J., Boffetta, P., Brennan, P., Malaveille, C., Hautefeuille, A., Donato, F., Gelatti, U., Spaliviero, M., Placidi, D., Carta, A., Scotto di Carlo, A. and Porru, S. (2004) Gst, nat, sult1a1, cyp1b1 genetic polymorphisms, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk in a high-risk population. *Int J Cancer*, **110**: 598-604.
- Hunt, C. R., Ro, J. H., Dobson, D. E., Min, H. Y. and Spiegelman, B. M. (1986) Adipocyte p2 gene: Developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**: 3786-3790.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R. and Kabbinavar, F. (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, **350**: 2335-2342.
- Hyder, S. M. and Stancel, G. M. (2002) Inhibition of progesterone-induced vegf production in human breast cancer cells by the pure antiestrogen icl 182,780. *Cancer Lett*, **181**: 47-53.
- Ibrahimi, A., Sfeir, Z., Magharaie, H., Amri, E. Z., Grimaldi, P. and Abumrad, N. A. (1996) Expression of the cd36 homolog (fat) in fibroblast cells: Effects on fatty acid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 2646-2651.
- Ijpenberg, A., Jeannin, E., Wahli, W. and Desvergne, B. (1997) Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (ppar)/retinoid x receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene ppar response element. *J Biol Chem*, **272**: 20108-20117.
- Ijpenberg, A., Tan, N. S., Gelman, L., Kersten, S., Seydoux, J., Xu, J., Metzger, D., Canaple, L., Chambon, P., Wahli, W. and Desvergne, B. (2004) In vivo activation of ppar target genes by rxr homodimers. *Embo J*, **23**: 2083-2091.
- Inoue, K., Slaton, J. W., Karashima, T., Yoshikawa, C., Shuin, T., Sweeney, P., Millikan, R. and Dinney, C. P. (2000) The prognostic value of angiogenesis factor expression for predicting recurrence and metastasis of bladder cancer after neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy. *Clin Cancer Res*, **6**: 4866-4873.
- Irani, J., Bernardini, S., Bonnal, J. L., Chauvet, B., Colombel, M., Davin, J. L., Laurent, G., Leuret, T., Maidenberg, M., Mazerolles, C., Pfister, C., Roupert, M., Roy, C., Rozet, F., Saint, F. and Theodore, C. (2007) [urothelial tumors]. *Prog Urol*, **17**: 1065-1098.
- Irani, J., Bernardini, S., Bonnal, J. L., Coloby, P., Colombel, M., Davin, J. L., Laurent, G., Leuret, T., Maidenberg, M., Mazerolles, C., Pariente, J. L., Pfister, C., Roy, C., Saint, F. and Theodore, C. (2004) Tumeurs urothéliales. *Prog Urol*, **14**: 957-996.
- Issbrucker, K., Marti, H. H., Hippenstiel, S., Springmann, G., Voswinkel, R., Gaumann, A., Breier, G., Drexler, H. C., Suttrop, N. and Clauss, M. (2003) P38 map kinase--a molecular switch between vegf-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *Faseb J*, **17**: 262-264.
- Issermann, I. and Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, **347**: 645-650.
- Izawa, J. I., Slaton, J. W., Kedar, D., Karashima, T., Perrotte, P., Czerniak, B., Grossman, H. B. and Dinney, C. P. (2001) Differential expression of progression-related genes in the evolution of superficial to invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Rep*, **8**: 9-15.
- Jing, C., Beesley, C., Foster, C. S., Chen, H., Rudland, P. S., West, D. C., Fujii, H., Smith, P. H. and Ke, Y. (2001) Human cutaneous fatty acid-binding protein induces metastasis by up-regulating the expression of vascular endothelial growth factor gene in rat rama 37 model cells. *Cancer Res*, **61**: 4357-4364.
- Jonca, F., Ortega, N., Gleizes, P. E., Bertrand, N. and Plouet, J. (1997) Cell release of bioactive fibroblast growth factor 2 by exon 6-encoded sequence of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, **272**: 24203-24209.
- Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N. and Alitalo, K. (1996) A novel vascular endothelial growth factor, vegf-c, is a ligand for the flt4 (vegfr-3) and kdr (vegfr-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J*, **15**: 1751.
- Joukov, V., Sorsa, T., Kumar, V., Jeltsch, M., Claesson-Welsh, L., Cao, Y., Saksela, O., Kalkkinen, N. and Alitalo, K. (1997) Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of vegf-c. *Embo J*, **16**: 3898-3911.
- Juge-Aubry, C., Pernin, A., Favez, T., Burger, A. G., Wahli, W., Meier, C. A. and Desvergne, B. (1997) DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem*, **272**: 25252-25259.
- Juge-Aubry, C. E., Hammar, E., Siegrist-Kaiser, C., Pernin, A., Takeshita, A., Chin, W. W., Burger, A. G. and Meier, C. A. (1999) Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent transactivating domain. *J Biol Chem*, **274**: 10505-10510.
- Junker, K., van Oers, J. M., Zwarthoff, E. C., Kania, I., Schubert, J. and Hartmann, A. (2008) Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder tumors correlate with low frequency of chromosome alterations. *Neoplasia*, **10**: 1-7.
- Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van Hinsbergh, V. W., Fang, G. H., Dumont, D., Breitman, M. and Alitalo, K. (1995) Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**: 3566-3570.
- Kajimoto, K., Terada, H., Baba, Y. and Shinohara, Y. (2005) Essential role of citrate export from mitochondria at early differentiation stage of 3t3-l1 cells for their effective differentiation into fat cells, as revealed by studies using specific inhibitors of mitochondrial di- and tricarboxylate carriers. *Mol Genet Metab*, **85**: 46-53.
- Kanayama, H. (2001) Matrix metalloproteinases and bladder cancer. *J Med Invest*, **48**: 31-43.
- Kane, C. D., Coe, N. R., Vanlandingham, B., Krieg, P. and Bernlohr, D. A. (1996) Expression, purification, and ligand-binding analysis of recombinant keratinocyte lipid-binding protein (mal-1), an intracellular lipid-binding found overexpressed in neoplastic skin cells. *Biochemistry*, **35**: 2894-2900.
- Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D. D., Jin, D. K., Shido, K., Kerns, S. A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J. L., Altorki, N., Port, E. R., Ruggero, D., Shmelkov, S. V., Jensen, K. K., Raffii, S. and Lyden, D. (2005) Vegfr1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, **438**: 820-827.
- Karkkainen, M. J., Saaristo, A., Jussila, L., Karila, K. A., Lawrence, E. C., Pajusola, K., Bueler, H., Eichmann, A., Kauppinen, R., Kettunen, M. I., Yla-Herttuala, S., Finegold, D. N., Ferrell, R. E. and Alitalo, K. (2001) A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 12677-12682.
- Kassouf, W., Chintharlapalli, S., Abdelrahim, M., Nelkin, G., Safe, S. and Kamat, A. M. (2006) Inhibition of bladder tumor growth by 1,1-bis(3'-indolyl)-1-(p-substitutedphenyl)methanes: A new class of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Cancer Res*, **66**: 412-418.
- Katoh, O., Tauchi, H., Kawaishi, K., Kimura, A. and Satow, Y. (1995) Expression of the vascular endothelial growth factor (vegf) receptor gene, kdr, in hematopoietic cells and inhibitory effect of vegf on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res*, **55**: 5687-5692.

- Kawakami, M., Furuhashi, T., Kimura, Y., Yamaguchi, K., Hata, F., Sasaki, K. and Hirata, K. (2003) Expression analysis of vascular endothelial growth factors and their relationships to lymph node metastasis in human colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, **22**: 229-237.
- Kawamura, T., Kanno, R., Fujii, H. and Suzuki, T. (2005) Expression of liver-type fatty-acid-binding protein, fatty acid synthase and vascular endothelial growth factor in human lung carcinoma. *Pathobiology*, **72**: 233-240.
- Kazemi, M. R., McDonald, C. M., Shigenaga, J. K., Grunfeld, C. and Feingold, K. R. (2005) Adipocyte fatty acid-binding protein expression and lipid accumulation are increased during activation of murine macrophages by toll-like receptor agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**: 1220-1224.
- Kehrer, J. P., Biswal, S. S., La, E., Thuillier, P., Datta, K., Fischer, S. M. and Vanden Heuvel, J. P. (2001) Inhibition of peroxisome-proliferator-activated receptor (ppar)alpha by mk886. *Biochem J*, **356**: 899-906.
- Keshamouni, V. G., Arenberg, D. A., Reddy, R. C., Newstead, M. J., Anthwal, S. and Standiford, T. J. (2005) Ppar-gamma activation inhibits angiogenesis by blocking elr+cxcl chemokine production in non-small cell lung cancer. *Neoplasia*, **7**: 294-301.
- Keyt, B. A., Berleau, L. T., Nguyen, H. V., Chen, H., Heinsohn, H., Vandlen, R. and Ferrara, N. (1996) The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem*, **271**: 7788-7795.
- Kim, J. A., Park, K. S., Kim, H. I., Oh, S. Y., Ahn, Y., Oh, J. W. and Choi, K. Y. (2002) Troglitazone activates p21cip/waf1 through the erk pathway in hct15 human colorectal cancer cells. *Cancer Lett*, **179**: 185-195.
- Klagsbrun, M. and D'Amore, P. A. (1991) Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol*, **53**: 217-239.
- Kliwer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Patel, I., Morris, D. C. and Lehmann, J. M. (1995) A prostaglandin j2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*, **83**: 813-819.
- Kliwer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A. and Evans, R. M. (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, **358**: 771-774.
- Kliwer, S. A., Xu, H. E., Lambert, M. H. and Willson, T. M. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors: From genes to physiology. *Recent Prog Horm Res*, **56**: 239-263.
- Knight, A., Askling, J. and Ekbom, A. (2002) Cancer incidence in a population-based cohort of patients with Wegener's granulomatosis. *Int J Cancer*, **100**: 82-85.
- Kodama, I., Niida, S., Sanada, M., Yoshiko, Y., Tsuda, M., Maeda, N. and Ohama, K. (2004) Estrogen regulates the production of vegf for osteoclast formation and activity in op/op mice. *J Bone Miner Res*, **19**: 200-206.
- Koga, H., Sakisaka, S., Harada, M., Takagi, T., Hanada, S., Taniguchi, E., Kawaguchi, T., Sasatomi, K., Kimura, R., Hashimoto, O., Ueno, T., Yano, H., Kojiro, M. and Sata, M. (2001) Involvement of p21(waf1/cip1), p27(kip1), and p18(ink4c) in troglitazone-induced cell-cycle arrest in human hepatoma cell lines. *Hepatology*, **33**: 1087-1097.
- Kogevinas, M., t Mannetje, A., Cordier, S., Ranft, U., Gonzalez, C. A., Vineis, P., Chang-Claude, J., Lynge, E., Wahrendorf, J., Tzonou, A., Jockel, K. H., Serra, C., Porru, S., Hours, M., Greiser, E. and Boffetta, P. (2003) Occupation and bladder cancer among men in western Europe. *Cancer Causes Control*, **14**: 907-914.
- Krieg, P., Feil, S., Furstenberger, G. and Bowden, G. T. (1993) Tumor-specific overexpression of a novel keratinocyte lipid-binding protein. Identification and characterization of a cloned sequence activated during multistage carcinogenesis in mouse skin. *J Biol Chem*, **268**: 17362-17369.
- Kurtz, A., Zimmer, A., Schnutgen, F., Bruning, G., Spener, F. and Muller, T. (1994) The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development*, **120**: 2637-2649.
- Lakka, S. S., Gondi, C. S., Yanamandra, N., Dinh, D. H., Olivero, W. C., Gujrati, M. and Rao, J. S. (2003) Synergistic down-regulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in snb19 glioblastoma cells efficiently inhibits glioma cell invasion, angiogenesis, and tumor growth. *Cancer Res*, **63**: 2454-2461.
- Lamy, A., Gobet, F., Laurent, M., Blanchard, F., Varin, C., Moulin, C., Andreou, A., Frebourg, T. and Pfister, C. (2006) Molecular profiling of bladder tumors based on the detection of fgfr3 and tp53 mutations. *J Urol*, **176**: 2686-2689.
- Lange, T., Guttmann-Raviv, N., Baruch, L., Machluf, M. and Neufeld, G. (2003) Vegf162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. *J Biol Chem*, **278**: 17164-17169.
- Lascombe, I., Clairotte, A., Fauconnet, S., Bernardini, S., Wallerand, H., Kantelip, B. and Bittard, H. (2006) N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clin Cancer Res*, **12**: 2780-2787.
- Lauren, J., Gunji, Y. and Alitalo, K. (1998) Is angiopoietin-2 necessary for the initiation of tumor angiogenesis? *Am J Pathol*, **153**: 1333-1339.
- Lawrie, L. C., Dundas, S. R., Curran, S. and Murray, G. I. (2004) Liver fatty acid binding protein expression in colorectal neoplasia. *Br J Cancer*, **90**: 1955-1960.
- Lazennec, G., Canaple, L., Saugy, D. and Wahli, W. (2000) Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (ppars) by their ligands and protein kinase a activators. *Mol Endocrinol*, **14**: 1962-1975.
- Lebre, T., Herve, J. M., Yonneau, L., Barre, P., Lugagne, P. M., Butreau, M., Molinie, V. and Botto, H. (2000) Étude de la survie après cystectomie pour cancer de vessie. À propos de 504 cas. *Prog Urol*, **10**: 553-560.
- Lee, J., Gray, A., Yuan, J., Luoh, S. M., Avraham, H. and Wood, W. I. (1996) Vascular endothelial growth factor-related protein: A ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor flt4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 1988-1992.
- Lee, S., Jilani, S. M., Nikolova, G. V., Carpizo, D. and Iruela-Arispe, M. L. (2005) Processing of vegf-a by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol*, **169**: 681-691.
- Lehmann, J. M., Lenhard, J. M., Oliver, B. B., Ringold, G. M. and Kliwer, S. A. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*, **272**: 3406-3410.
- Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkison, W. O., Willson, T. M. and Kliwer, S. A. (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (ppar gamma). *J Biol Chem*, **270**: 12953-12956.
- Leibovici, D., Grossman, H. B., Dinney, C. P., Millikan, R. E., Lerner, S., Wang, Y., Gu, J., Dong, Q. and Wu, X. (2005) Polymorphisms in inflammation genes and bladder cancer: From initiation to recurrence, progression, and survival. *J Clin Oncol*, **23**: 5746-5756.
- Leonard, C., Huret, J. L. and Gfco (2002) De la cytogénétique à la cytogénomique des cancers de la vessie. *Bull Cancer*, **89**: 166-173.
- Levine, A. M., Tulpule, A., Quinn, D. I., Gorospe, G., 3rd, Smith, D. L., Hornor, L., Boswell, W. D., Espina, B. M., Groshen, S. G., Masood, R. and Gill, P. S. (2006) Phase I study of antisense oligonucleotide against vascular endothelial growth factor: Decrease in plasma vascular endothelial growth factor with potential clinical efficacy. *J Clin Oncol*, **24**: 1712-1719.
- Li, A. C. and Glass, C. K. (2004) Ppar- and lxr-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J Lipid Res*, **45**: 2161-2173.

- Li, C. Y., Shan, S., Huang, Q., Braun, R. D., Lanzen, J., Hu, K., Lin, P. and Dewhirst, M. W. (2000a) Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: Evaluation via skin window chambers in rodent models. *J Natl Cancer Inst*, **92**: 143-147.
- Li, M., Pascual, G. and Glass, C. K. (2000b) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol*, **20**: 4699-4707.
- Li, N., Kanda, K., Fukumori, T., Inoue, Y., Nishitani, M., Kanayama, H. and Kagawa, S. (2000c) Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and platelet-derived endothelial cell growth factor in bladder cancer. *Urol Oncol*, **6**: 10-15.
- Liekens, S., De Clercq, E. and Neyts, J. (2001) Angiogenesis: Regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, **61**: 253-270.
- Liu, L., Zhu, D., Gao, R. and Guo, H. (2008) Expression of vascular endothelial growth factor, receptor kdr and p53 protein in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Int*, **81**: 72-76.
- Liu, Q. Y., Quinet, E. and Nambi, P. (2007) Adipocyte fatty acid-binding protein (ap2), a newly identified lxr target gene, is induced by lxr agonists in human thp-1 cells. *Mol Cell Biochem*, **302**: 203-213.
- Lodillinsky, C., Umerez, M. S., Jasnis, M. A., Casabe, A., Sandes, E. and Eijan, A. M. (2006) Bacillus calmette-guerin induces the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bladder cancer cells. *Int J Mol Med*, **17**: 269-273.
- Long, G. G., Reynolds, V. L., Lopez-Martinez, A., Ryan, T. E., White, S. L. and Eldridge, S. R. (2008) Urothelial carcinogenesis in the urinary bladder of rats treated with naveglitazar, a gamma-dominant ppar alpha/gamma agonist: Lack of evidence for urolithiasis as an inciting event. *Toxicol Pathol*, **36**: 218-231.
- Lopez-Beltran, A. and Montironi, R. (2004) Non-invasive urothelial neoplasms: According to the most recent who classification. *Eur Urol*, **46**: 170-176.
- Lubet, R. A., Fischer, S. M., Steele, V. E., Juliana, M. M., Desmond, R. and Grubbs, C. J. (2008) Rosiglitazone, a ppar gamma agonist: Potent promoter of hydroxybutyl(butyl)nitrosamine-induced urinary bladder cancers. *Int J Cancer*, **123**: 2254-2259.
- Lyttle, D. J., Fraser, K. M., Fleming, S. B., Mercer, A. A. and Robinson, A. J. (1994) Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol*, **68**: 84-92.
- Madsen, P., Rasmussen, H. H., Leffers, H., Honore, B. and Celis, J. E. (1992) Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [pa-fabp]) that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins. *J Invest Dermatol*, **99**: 299-305.
- Maeda, K., Uysal, K. T., Makowski, L., Gorgun, C. Z., Atsumi, G., Parker, R. A., Bruning, J., Hertzler, A. V., Bernlohr, D. A. and Hotamisligil, G. S. (2003) Role of the fatty acid binding protein mal1 in obesity and insulin resistance. *Diabetes*, **52**: 300-307.
- Maggiora, M., Bologna, M., Ceru, M. P., Possati, L., Angelucci, A., Cimini, A., Miglietta, A., Bozzo, F., Margiotta, C., Muzio, G. and Canuto, R. A. (2004) An overview of the effect of linoleic and conjugated-linoleic acids on the growth of several human tumor cell lines. *Int J Cancer*, **112**: 909-919.
- Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C. and Stover, C. K. (1996) Molecular analysis of genetic differences between mycobacterium bovis bcg and virulent m. Bovis. *J Bacteriol*, **178**: 1274-1282.
- Makinen, T., Veikkola, T., Mustjoki, S., Karpanen, T., Catimel, B., Nice, E. C., Wise, L., Mercer, A., Kowalski, H., Kerjaszki, D., Stacker, S. A., Achen, M. G. and Alitalo, K. (2001) Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the vegf-c/d receptor vegfr-3. *Embo J*, **20**: 4762-4773.
- Makowski, L., Boord, J. B., Maeda, K., Babaev, V. R., Uysal, K. T., Morgan, M. A., Parker, R. A., Suttles, J., Fazio, S., Hotamisligil, G. S. and Linton, M. F. (2001) Lack of macrophage fatty-acid-binding protein ap2 protects mice deficient in apolipoprotein e against atherosclerosis. *Nat Med*, **7**: 699-705.
- Makowski, L. and Hotamisligil, G. S. (2005) The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, **16**: 543-548.
- Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M. (1995) The rxr heterodimers and orphan receptors. *Cell*, **83**: 841-850.
- Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M., Pe'er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S. and Hendrix, M. J. (1999) Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: Vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*, **155**: 739-752.
- Marx, N., Duez, H., Fruchart, J. C. and Staels, B. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: Regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res*, **94**: 1168-1178.
- Matsumoto, T. and Claesson-Welsh, L. (2001) Vegf receptor signal transduction. *Sci STKE*, **2001**: RE21.
- Mehta, R. G., Williamson, E., Patel, M. K. and Koeffler, H. P. (2000) A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, retinoids, and prevention of preneoplastic mammary lesions. *J Natl Cancer Inst*, **92**: 418-423.
- Meissner, M., Stein, M., Urbich, C., Reisinger, K., Suske, G., Staels, B., Kaufmann, R. and Gille, J. (2004) Pparalpha activators inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 expression by repressing sp1-dependent DNA binding and transactivation. *Circ Res*, **94**: 324-332.
- Meister, B., Grunebach, F., Bautz, F., Brugger, W., Fink, F. M., Kanz, L. and Mohle, R. (1999) Expression of vascular endothelial growth factor (vegf) and its receptors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer*, **35**: 445-449.
- Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H. G., Ziche, M., Lanz, C., Buttner, M., Rziha, H. J. and Dehio, C. (1999) A novel vascular endothelial growth factor encoded by orf virus, vegf-e, mediates angiogenesis via signalling through vegfr-2 (kdr) but not vegfr-1 (flt-1) receptor tyrosine kinases. *Embo J*, **18**: 363-374.
- Michalik, L. and Wahli, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: Three isotypes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol*, **10**: 564-570.
- Migdal, M., Huppertz, B., Tessler, S., Comforti, A., Shibuya, M., Reich, R., Baumann, H. and Neufeld, G. (1998) Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem*, **273**: 22272-22278.
- Mineur, P., Colige, A. C., Deroanne, C. F., Dubail, J., Kesteloot, F., Habraken, Y., Noel, A., Voo, S., Waltenberger, J., Lapiere, C. M., Nusgens, B. V. and Lambert, C. A. (2007) Newly identified biologically active and proteolysis-resistant vegf-a isoform vegf11 is induced by genotoxic agents. *J Cell Biol*, **179**: 1261-1273.
- Mita, R., Coles, J. E., Glubrecht, D. D., Sung, R., Sun, X. and Godbout, R. (2007) B-fabp-expressing radial glial cells: The malignant glioma cell of origin? *Neoplasia*, **9**: 734-744.
- Miyake, H., Hara, I., Yamanaka, K., Gohji, K., Arakawa, S. and Kamidono, S. (1999) Elevation of serum level of vascular endothelial growth factor as a new predictor of recurrence and disease progression in patients with superficial urothelial cancer. *Urology*, **53**: 302-307.
- Miyata, Y., Kanda, S., Ohba, K., Nomata, K., Hayashida, Y., Eguchi, J., Hayashi, T. and Kanetake, H. (2006) Lymphangiogenesis and angiogenesis in bladder cancer: Prognostic implications and regulation by vascular endothelial growth factors-a, -c, and -d. *Clin Cancer Res*, **12**: 800-806.

- Montesano, R., Vassalli, J. D., Baird, A., Guillemin, R. and Orci, L. (1986) Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**: 7297-7301.
- Motomura, W., Okumura, T., Takahashi, N., Obara, T. and Kohgo, Y. (2000) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27kip1 in human. Pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res*, **60**: 5558-5564.
- Mueller, E., Smith, M., Sarraf, P., Kroll, T., Aiyer, A., Kaufman, D. S., Oh, W., Demetri, G., Figg, W. D., Zhou, X. P., Eng, C., Spiegelman, B. M. and Kantoff, P. W. (2000) Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 10990-10995.
- Mukherjee, R., Hoener, P. A., Jow, L., Bilakovics, J., Klausning, K., Mais, D. E., Faulkner, A., Croston, G. E. and Paterniti, J. R., Jr. (2000) A selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (ppargamma) modulator blocks adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*, **14**: 1425-1433.
- Muller-Bruselbach, S., Komhoff, M., Rieck, M., Meissner, W., Kaddatz, K., Adamkiewicz, J., Keil, B., Klose, K. J., Moll, R., Burdick, A. D., Peters, J. M. and Muller, R. (2007) Deregulation of tumor angiogenesis and blockade of tumor growth in pparbeta-deficient mice. *Embo J*, **26**: 3686-3698.
- Munz, M., Zeidler, R. and Gires, O. (2005) The tumour-associated antigen epcam upregulates the fatty acid binding protein e-fabp. *Cancer Lett*, **225**: 151-157.
- Murphy, G. J. and Holder, J. C. (2000) Ppar-gamma agonists: Therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci*, **21**: 469-474.
- Muzio, G., Maggiora, M., Oraldi, M., Trombetta, A. and Canuto, R. A. (2007) Pparalpha and pp2a are involved in the proapoptotic effect of conjugated linoleic acid on human hepatoma cell line sk-hep-1. *Int J Cancer*, **121**: 2395-2401.
- Myers-Payne, S. C., Hubbell, T., Pu, L., Schnutgen, F., Borchers, T., Wood, W. G., Spener, F. and Schroeder, F. (1996) Isolation and characterization of two fatty acid binding proteins from mouse brain. *J Neurochem*, **66**: 1648-1656.
- Mylona, E., Alexandrou, P., Giannopoulou, I., Liapis, G., Sofia, M., Keramopoulos, A. and Nakopoulou, L. (2007) The prognostic value of vascular endothelial growth factors (vegfs)-a and -b and their receptor, vegfr-1, in invasive breast carcinoma. *Gynecol Oncol*, **104**: 557-563.
- Mylona, E., Magkou, C., Gorantonakis, G., Giannopoulou, I., Nomikos, A., Zarogiannos, A., Zervas, A. and Nakopoulou, L. (2006) Evaluation of the vascular endothelial growth factor (vegf)-c role in urothelial carcinomas of the bladder. *Anticancer Res*, **26**: 3567-3571.
- Nakashiro, K. I., Hayashi, Y., Kita, A., Tamatani, T., Chlenski, A., Usuda, N., Hattori, K., Reddy, J. K. and Oyasu, R. (2001) Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its ligands in non-neoplastic and neoplastic human urothelial cells. *Am J Pathol*, **159**: 591-597.
- Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Hayashi, Y., Yamashita, T., Yamashita, J. and Yamamoto, H. (1995) Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem*, **270**: 28316-28324.
- Nourani, M. R., Owada, Y., Kitanaka, N., Sakagami, H., Hoshi, H., Iwasa, H., Spener, F. and Kondo, H. (2005) Occurrence of immunoreactivity for adipocyte-type fatty acid binding protein in degenerating granulosa cells in atretic antral follicles of mouse ovary. *J Mol Histol*, **36**: 491-497.
- Nuclear_Receptors_Nomenclature_Committee (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, **97**: 161-163.
- O'Brien, T., Cranston, D., Fuggle, S., Bicknell, R. and Harris, A. L. (1995) Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res*, **55**: 510-513.
- Ockner, R. K., Manning, J. A. and Kane, J. P. (1982) Fatty acid binding protein. Isolation from rat liver, characterization, and immunochemical quantification. *J Biol Chem*, **257**: 7872-7878.
- Ockner, R. K., Manning, J. A., Poppenhausen, R. B. and Ho, W. K. (1972) A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*, **177**: 56-58.
- Ohlsson, G., Moreira, J. M., Gromov, P., Sauter, G. and Celis, J. E. (2005) Loss of expression of the adipocyte-type fatty acid-binding protein (a-fabp) is associated with progression of human urothelial carcinomas. *Mol Cell Proteomics*, **4**: 570-581.
- Ohshima, T., Koga, H. and Shimotohno, K. (2004) Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by sumo-1 modification. *J Biol Chem*, **279**: 29551-29557.
- Ohta, Y., Watanabe, Y., Murakami, S., Oda, M., Hayashi, Y., Nonomura, A., Endo, Y. and Sasaki, T. (1997) Vascular endothelial growth factor and lymph node metastasis in primary lung cancer. *Br J Cancer*, **76**: 1041-1045.
- Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R. F., Alitalo, K. and Eriksson, U. (1996) Vascular endothelial growth factor b, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 2576-2581.
- Orntoft, T. F. and Wolf, H. (1998) Molecular alterations in bladder cancer. *Urol Res*, **26**: 223-233.
- Osai, W. E., Ng, C. S. and Pagliaro, L. C. (2008) Positive response to bevacizumab in a patient with metastatic, chemotherapy-refractory urothelial carcinoma. *Anticancer Drugs*, **19**: 427-429.
- Oshika, Y., Nakamura, M., Tokunaga, T., Ozeki, Y., Fukushima, Y., Hatanaka, H., Abe, Y., Yamazaki, H., Kijima, H., Tamaoki, N. and Ueyama, Y. (1998) Expression of cell-associated isoform of vascular endothelial growth factor 189 and its prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*, **12**: 541-544.
- Oshio, H., Abe, T., Onogawa, T., Ohtsuka, H., Sato, T., Ii, T., Fukase, K., Muto, M., Katayose, Y., Oikawa, M., Rikiyama, T., Egawa, S. and Unno, M. (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates cyclooxygenase-2 gene transcription through bile acid transport in human colorectal cancer cell lines. *J Gastroenterol*, **43**: 538-549.
- Ostergaard, M., Rasmussen, H. H., Nielsen, H. V., Vorum, H., Orntoft, T. F., Wolf, H. and Celis, J. E. (1997) Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: Identification of markers that define their degree of differentiation. *Cancer Res*, **57**: 4111-4117.
- Otrock, Z. K., Mahfouz, R. A., Makarem, J. A. and Shamseddine, A. I. (2007) Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis*, **39**: 212-220.
- Owada, Y., Suzuki, I., Noda, T. and Kondo, H. (2002) Analysis on the phenotype of e-fabp-gene knockout mice. *Mol Cell Biochem*, **239**: 83-86.
- Paavonen, K., Horelli-Kuitunen, N., Chilov, D., Kukk, E., Pennanen, S., Kallioniemi, O. P., Pajusola, K., Olofsson, B., Eriksson, U., Joukov, V., Palotie, A. and Alitalo, K. (1996) Novel human vascular endothelial growth factor genes vegf-b and vegf-c localize to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively. *Circulation*, **93**: 1079-1082.
- Palakurthi, S. S., Aktas, H., Grubisich, L. M., Mortensen, R. M. and Halperin, J. A. (2001) Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res*, **61**: 6213-6218.

- Panigrahy, D., Kaipainen, A., Huang, S., Butterfield, C. E., Barnes, C. M., Fannon, M., Laforme, A. M., Chaponis, D. M., Folkman, J. and Kieran, M. W. (2008) Pparalpha agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**: 985-990.
- Panigrahy, D., Singer, S., Shen, L. Q., Butterfield, C. E., Freedman, D. A., Chen, E. J., Moses, M. A., Kilroy, S., Duensing, S., Fletcher, C., Fletcher, J. A., Hlatky, L., Hahnfeldt, P., Folkman, J. and Kaipainen, A. (2002) Ppargamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest*, **110**: 923-932.
- Park, J. E., Keller, G. A. and Ferrara, N. (1993) The vascular endothelial growth factor (vegf) isoforms: Differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound vegf. *Mol Biol Cell*, **4**: 1317-1326.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, **55**: 74-108.
- Pascual, G., Fong, A. L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A. C., Perissi, V., Rose, D. W., Willson, T. M., Rosenfeld, M. G. and Glass, C. K. (2005) A sumoylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by ppar-gamma. *Nature*, **437**: 759-763.
- Pascual, G., Sullivan, A. L., Ogawa, S., Gamliel, A., Perissi, V., Rosenfeld, M. G. and Glass, C. K. (2007) Anti-inflammatory and antidiabetic roles of ppargamma. *Novartis Found Symp*, **286**: 183-196; discussion 196-203.
- Peeters, L. L., Vigne, J. L., Tee, M. K., Zhao, D., Waite, L. L. and Taylor, R. N. (2005) Ppargamma represses vegf expression in human endometrial cells: Implications for uterine angiogenesis. *Angiogenesis*, **8**: 373-379.
- Pelton, P. D., Zhou, L., Demarest, K. T. and Burris, T. P. (1999) Ppargamma activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **261**: 456-458.
- Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L. and Montesano, R. (1992) Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **189**: 824-831.
- Pepper, M. S., Mandriota, S. J., Vassalli, J. D., Orci, L. and Montesano, R. (1996) Angiogenesis-regulating cytokines: Activities and interactions. *Curr Top Microbiol Immunol*, **213 (Pt 2)**: 31-67.
- Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C. K., Rose, D. W. and Rosenfeld, M. G. (2004) A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell*, **116**: 511-526.
- Peters, J. M., Lee, S. S., Li, W., Ward, J. M., Gavrilova, O., Everett, C., Reitman, M. L., Hudson, L. D. and Gonzalez, F. J. (2000) Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol*, **20**: 5119-5128.
- Pevny, L., Simon, M. C., Robertson, E., Klein, W. H., Tsai, S. F., D'Agati, V., Orkin, S. H. and Costantini, F. (1991) Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor gata-1. *Nature*, **349**: 257-260.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. *Nucleic Acids Res*, **29**: 2003-2007.
- Pignot, G., Bieche, I., Vacher, S., Guet, C., Vieillefond, A., Debre, B., Lidereau, R. and Amsellem-Ouazana, D. (2008) Large-scale real-time reverse transcription-pcr approach of angiogenic pathways in human transitional cell carcinoma of the bladder: Identification of vegfa as a major independent prognostic marker. *Eur Urol*.
- Piqueras, L., Reynolds, A. R., Hodivala-Dilke, K. M., Alfranca, A., Redondo, J. M., Hatae, T., Tanabe, T., Warner, T. D. and Bishop-Bailey, D. (2007) Activation of pparbeta/delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**: 63-69.
- Pizer, E. S., Lax, S. F., Kuhajda, F. P., Pasternack, G. R. and Kurman, R. J. (1998) Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma: Correlation with cell proliferation and hormone receptors. *Cancer*, **83**: 528-537.
- Poltorak, Z., Cohen, T., Sivan, R., Kandelis, Y., Spira, G., Vlodavsky, I., Keshet, E. and Neufeld, G. (1997) Vegf145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem*, **272**: 7151-7158.
- Possati, L., Rocchetti, R., Talevi, S., Beatrici, V., Margiotta, C., Ferrante, L., Calza, R., Sagrini, D. and Ferri, A. (2000) The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bladder cancer in relation to angiogenesis and progression. *Gen Pharmacol*, **35**: 269-275.
- Possati, L., Talevi, S., Rocchetti, R., Calza, R., Margiotta, C. and Ferri, A. (2005). Chapter 5 : Expression of peroxisome proliferator activated receptors in human bladder cancer cell lines and correlation with tumorigenicity and malignancy, *Progress in bladder cancer research*, Nova Science Publisher, **6**, 123-145.
- Potgens, A. J., Lubsen, N. H., van Altena, M. C., Vermeulen, R., Bakker, A., Schoenmakers, J. G., Ruiter, D. J. and de Waal, R. M. (1994) Covalent dimerization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from cys to ser mutations. *J Biol Chem*, **269**: 32879-32885.
- Pozzi, A., Ibanez, M. R., Gatica, A. E., Yang, S., Wei, S., Mei, S., Falck, J. R. and Capdevila, J. H. (2007) Peroxisomal proliferator-activated receptor-alpha-dependent inhibition of endothelial cell proliferation and tumorigenesis. *J Biol Chem*, **282**: 17685-17695.
- Presta, L. G., Chen, H., O'Connor, S. J., Chisholm, V., Meng, Y. G., Krummen, L., Winkler, M. and Ferrara, N. (1997) Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res*, **57**: 4593-4599.
- Price, D. J., Miralem, T., Jiang, S., Steinberg, R. and Avraham, H. (2001) Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ*, **12**: 129-135.
- Prinsen, C. F., de Bruijn, D. R., Merks, G. F. and Veerkamp, J. H. (1997) Assignment of the human adipocyte fatty acid-binding protein gene (fabp4) to chromosome 8q21 using somatic cell hybrid and fluorescence in situ hybridization techniques. *Genomics*, **40**: 207-209.
- Puigserver, P., Ribot, J., Serra, F., Gianotti, M., Bonet, M. L., Nadal-Ginard, B. and Palou, A. (1998a) Involvement of the retinoblastoma protein in brown and white adipocyte cell differentiation: Functional and physical association with the adipogenic transcription factor c/ebpalpha. *Eur J Cell Biol*, **77**: 117-123.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M. and Spiegelman, B. M. (1998b) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, **92**: 829-839.
- Qian, Q., Kuo, L., Yu, Y. T. and Rottman, J. N. (1999) A concise promoter region of the heart fatty acid-binding protein gene dictates tissue-appropriate expression. *Circ Res*, **84**: 276-289.
- Quentin, T., Schlott, T., Korabiowska, M., Kathei, N., Zoller, G., Glaser, F. and Kunze, E. (2004) Alteration of the vascular endothelial growth factor and angiopoietins-1 and -2 pathways in transitional cell carcinomas of the urinary bladder associated with tumor progression. *Anticancer Res*, **24**: 2745-2756.
- Rabbany, S. Y., Heissig, B., Hattori, K. and Rafii, S. (2003) Molecular pathways regulating mobilization of marrow-derived stem cells for tissue revascularization. *Trends Mol Med*, **9**: 109-117.
- Rashid, A., Pizer, E. S., Moga, M., Milgraum, L. Z., Zahurak, M., Pasternack, G. R., Kuhajda, F. P. and Hamilton, S. R. (1997) Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol*, **150**: 201-208.

- Rauscher, F. J., 3rd, Sambucetti, L. C., Curran, T., Distel, R. J. and Spiegelman, B. M. (1988) Common DNA binding site for fos protein complexes and transcription factor ap-1. *Cell*, **52**: 471-480.
- Reddy, J. K. and Qureshi, S. A. (1979) Tumorigenicity of the hypolipidaemic peroxisome proliferator ethyl-alpha-p-chlorophenoxyisobutyrate (clofibrate) in rats. *Br J Cancer*, **40**: 476-482.
- Reid, G., Hubner, M. R., Metivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J. and Gannon, F. (2003) Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded α on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell*, **11**: 695-707.
- Rennel, E., Waine, E., Guan, H., Schuler, Y., Leenders, W., Woolard, J., Sugiono, M., Gillatt, D., Kleinerman, E., Bates, D. and Harper, S. (2008) The endogenous anti-angiogenic vegf isoform, vegf165b inhibits human tumour growth in mice. *Br J Cancer*, **98**: 1250-1257.
- Richieri, G. V., Ogata, R. T. and Kleinfeld, A. M. (1994) Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe adifab. *J Biol Chem*, **269**: 23918-23930.
- Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J. and Glass, C. K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, **391**: 79-82.
- Rieusset, J., Touri, F., Michalik, L., Escher, P., Desvergne, B., Niesor, E. and Wahli, W. (2002) A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol Endocrinol*, **16**: 2628-2644.
- Rival, Y., Stennevin, A., Puech, L., Rouquette, A., Cathala, C., Lestienne, F., Dupont-Passelaigue, E., Patoiseau, J. F., Wurch, T. and Junquero, D. (2004) Human adipocyte fatty acid-binding protein (ap2) gene promoter-driven reporter assay discriminates nonlipogenic peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *J Pharmacol Exp Ther*, **311**: 467-475.
- Robyr, D., Wolffe, A. P. and Wahli, W. (2000) Nuclear hormone receptor coregulators in action: Diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol*, **14**: 329-347.
- Roeder, R. G. (2005) Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett*, **579**: 909-915.
- Rolph, M. S., Young, T. R., Shum, B. O., Gorgun, C. Z., Schmitz-Peiffer, C., Ramshaw, I. A., Hotamisligil, G. S. and Mackay, C. R. (2006) Regulation of dendritic cell function and t cell priming by the fatty acid-binding protein ap2. *J Immunol*, **177**: 7794-7801.
- Ross, S. R., Graves, R. A., Greenstein, A., Platt, K. A., Shyu, H. L., Mellovitz, B. and Spiegelman, B. M. (1990) A fat-specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte p2 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**: 9590-9594.
- Rousseau, S., Houle, F., Landry, J. and Huot, J. (1997) P38 map kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*, **15**: 2169-2177.
- Ruf, W., Seftor, E. A., Petrovan, R. J., Weiss, R. M., Gruman, L. M., Margaryan, N. V., Seftor, R. E., Miyagi, Y. and Hendrix, M. J. (2003) Differential role of tissue factor pathway inhibitors 1 and 2 in melanoma vasculogenic mimicry. *Cancer Res*, **63**: 5381-5389.
- Rumi, M. A., Sato, H., Ishihara, S., Kawashima, K., Hamamoto, S., Kazumori, H., Okuyama, T., Fukuda, R., Nagasue, N. and Kinoshita, Y. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, **84**: 1640-1647.
- Rumi, M. A., Sato, H., Ishihara, S., Ortega, C., Kadowaki, Y. and Kinoshita, Y. (2002) Growth inhibition of esophageal squamous carcinoma cells by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands. *J Lab Clin Med*, **140**: 17-26.
- Saidi, S. A., Holland, C. M., Charnock-Jones, D. S. and Smith, S. K. (2006) In vitro and in vivo effects of the ppar-alpha agonists fenofibrate and retinoic acid in endometrial cancer. *Mol Cancer*, **5**: 13.
- Salven, P., Lymboussaki, A., Heikkila, P., Jaaskela-Saari, H., Enholm, B., Aase, K., von Euler, G., Eriksson, U., Alitalo, K. and Joensuu, H. (1998) Vascular endothelial growth factors vegf-b and vegf-c are expressed in human tumors. *Am J Pathol*, **153**: 103-108.
- Sandler, A., Gray, R., Brahmer, J., Dowlati, A., Schiller, J. H., Perry, M. C. and Johnson, D. H. (2005) Randomized phase ii/iii trial of paclitaxel (p) plus carboplatin (c) with or without bevacizumab (nsc #704865) in patients with advanced non-squamous non-small cell lung cancer (nsccl): An eastern cooperative oncology group (ecog) trial - e4599. *J Clin Oncol*, **23**: 2s.
- Santos, L., Costa, C., Pereira, S., Koch, M., Amaro, T., Cardoso, F., Guimaraes, T., Bento, M. J., Lobo, F., Pinto, S. and Lopes, C. (2003) Neovascularisation is a prognostic factor of early recurrence in t1/g2 urothelial bladder tumours. *Ann Oncol*, **14**: 1419-1424.
- Sarraf, P., Mueller, E., Jones, D., King, F. J., DeAngelo, D. J., Partridge, J. B., Holden, S. A., Chen, L. B., Singer, S., Fletcher, C. and Spiegelman, B. M. (1998) Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through ppargamma. *Nat Med*, **4**: 1046-1052.
- Sato, K., Sasaki, R., Ogura, Y., Shimoda, N., Togashi, H., Terada, K., Sugiyama, T., Kakinuma, H., Ogawa, O. and Kato, T. (1998) Expression of vascular endothelial growth factor gene and its receptor (flt-1) gene in urinary bladder cancer. *Tohoku J Exp Med*, **185**: 173-184.
- Schachtrup, C., Emmler, T., Bleck, B., Sandqvist, A. and Spener, F. (2004) Functional analysis of peroxisome proliferator response element motifs in genes of fatty acid binding proteins. *Biochem J*, **382**: 239-245.
- Schaffer, J. E. and Lodish, H. F. (1994) Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*, **79**: 427-436.
- Schug, T. T., Berry, D. C., Shaw, N. S., Travis, S. N. and Noy, N. (2007) Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell*, **129**: 723-733.
- Seargent, J. M., Yates, E. A. and Gill, J. H. (2004) Gw9662, a potent antagonist of ppargamma, inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the ppargamma agonist rosiglitazone, independently of ppargamma activation. *Br J Pharmacol*, **143**: 933-937.
- Seeler, J. S. and Dejean, A. (2003) Nuclear and unclear functions of sumo. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**: 690-699.
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S. and Dvorak, H. F. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, **219**: 983-985.
- Serini, G., Valdembri, D. and Bussolino, F. (2006) Integrins and angiogenesis: A sticky business. *Exp Cell Res*, **312**: 651-658.
- Sessler, R. J. and Noy, N. (2005) A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-ii. *Mol Cell*, **18**: 343-353.
- Sha, R. S., Kane, C. D., Xu, Z., Banaszak, L. J. and Bernlohr, D. A. (1993) Modulation of ligand binding affinity of the adipocyte lipid-binding protein by selective mutation. Analysis in vitro and in situ. *J Biol Chem*, **268**: 7885-7892.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L. and Schuh, A. C. (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in flk-1-deficient mice. *Nature*, **376**: 62-66.
- Shao, D., Rangwala, S. M., Bailey, S. T., Krakow, S. L., Reginato, M. J. and Lazar, M. A. (1998) Interdomain communication regulating ligand binding by ppar-gamma. *Nature*, **396**: 377-380.
- Shao, J., Sheng, H. and DuBois, R. N. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptors modulate k-ras-mediated transformation of intestinal epithelial cells. *Cancer Res*, **62**: 3282-3288.

- Sher, T., Yi, H. F., McBride, O. W. and Gonzalez, F. J. (1993) Cdna cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*, **32**: 5598-5604.
- Sheu, W. H., Ou, H. C., Chou, F. P., Lin, T. M. and Yang, C. H. (2006) Rosiglitazone inhibits endothelial proliferation and angiogenesis. *Life Sci*, **78**: 1520-1528.
- Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, H. and Sato, M. (1990) Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, **5**: 519-524.
- Shigeto, T., Yokoyama, Y., Xin, B. and Mizunuma, H. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands inhibit the growth of human ovarian cancer. *Oncol Rep*, **18**: 833-840.
- Shimizu, M., Yamashita, D., Yamaguchi, T., Hirose, F. and Osumi, T. (2006) Aspects of the regulatory mechanisms of ppar functions: Analysis of a bidirectional response element and regulation by sumoylation. *Mol Cell Biochem*, **286**: 33-42.
- Shum, B. O., Mackay, C. R., Gorgun, C. Z., Frost, M. J., Kumar, R. K., Hotamisligil, G. S. and Rolph, M. S. (2006) The adipocyte fatty acid-binding protein ap2 is required in allergic airway inflammation. *J Clin Invest*, **116**: 2183-2192.
- Siegenthaler, G., Hotz, R., Chatellard-Gruaz, D., Didierjean, L., Hellman, U. and Saurat, J. H. (1994) Purification and characterization of the human epidermal fatty acid-binding protein: Localization during epidermal cell differentiation in vivo and in vitro. *Biochem J*, **302** (Pt 2): 363-371.
- Siemeister, G., Marme, D. and Martiny-Baron, G. (1998) The alpha-helical domain near the amino terminus is essential for dimerization of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, **273**: 11115-11120.
- Simon, T. C., Roth, K. A. and Gordon, J. I. (1993) Use of transgenic mice to map cis-acting elements in the liver fatty acid-binding protein gene (fabpl) that regulate its cell lineage-specific, differentiation-dependent, and spatial patterns of expression in the gut epithelium and in the liver acinus. *J Biol Chem*, **268**: 18345-18358.
- Simpson, M. A., LiCata, V. J., Ribarik Coe, N. and Bernlohr, D. A. (1999) Biochemical and biophysical analysis of the intracellular lipid binding proteins of adipocytes. *Mol Cell Biochem*, **192**: 33-40.
- Sobin, L. H. and Wittekind, C. (2002). Tnm classification of malignant tumours., *6th Edition Wiley*. 264.
- Sohda, T., Mizuno, K., Imamiya, E., Tawada, H., Meguro, K., Kawamatsu, Y. and Yamamoto, Y. (1982) Studies on antidiabetic agents. Iii. 5-arylthiazolidine-2,4-diones as potent aldose reductase inhibitors. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **30**: 3601-3616.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G. and Klagsbrun, M. (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, **92**: 735-745.
- Soloway, M. S., Sofer, M. and Vaidya, A. (2002) Contemporary management of stage t1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, **167**: 1573-1583.
- Sonpavde, G., Ross, R., Powles, T., Sweeney, C. J., Hahn, N., Hutson, T. E., Galsky, M. D., Lerner, S. P. and Sternberg, C. N. (2008) Novel agents for muscle-invasive and advanced urothelial cancer. *BJU Int*, **101**: 937-943.
- Spector, A. A. (1986) Structure and lipid binding properties of serum albumin. *Methods Enzymol*, **128**: 320-339.
- Spiegelman, B. M. (1998) Ppar-gamma: Adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*, **47**: 507-514.
- Spruck, C. H., 3rd, Ohneseit, P. F., Gonzalez-Zulueta, M., Esrig, D., Miyao, N., Tsai, Y. C., Lerner, S. P., Schmutte, C., Yang, A. S., Cote, R. and et al. (1994) Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*, **54**: 784-788.
- Spyridopoulos, I., Brogi, E., Kearney, M., Sullivan, A. B., Cetrulo, C., Isner, J. M. and Losordo, D. W. (1997) Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha: Balance between growth and death signals. *J Mol Cell Cardiol*, **29**: 1321-1330.
- Stacker, S. A., Stenvers, K., Caesar, C., Vitali, A., Domagala, T., Nice, E., Roufail, S., Simpson, R. J., Moritz, R., Karpanen, T., Alitalo, K. and Achen, M. G. (1999) Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-d involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem*, **274**: 32127-32136.
- Stalmans, I., Ng, Y. S., Rohan, R., Fruttiger, M., Bouche, A., Yuce, A., Fujisawa, H., Hermans, B., Shani, M., Jansen, S., Hicklin, D., Anderson, D. J., Gardiner, T., Hammes, H. P., Moons, L., Dewerchin, M., Collen, D., Carmeliet, P. and D'Amore, P. A. (2002) Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing vegf isoforms. *J Clin Invest*, **109**: 327-336.
- Stanley, T. B., Leesnitzer, L. M., Montana, V. G., Galardi, C. M., Lambert, M. H., Holt, J. A., Xu, H. E., Moore, L. B., Blanchard, S. G. and Stimmel, J. B. (2003) Subtype specific effects of peroxisome proliferator-activated receptor ligands on corepressor affinity. *Biochemistry*, **42**: 9278-9287.
- Stavropoulos, N. E., Bouropoulos, C., Ioachim, I. E., Michael, M., Hastazeris, K., Tsimaris, I., Kalogeras, D., Liamis, Z., Stefanaki, S. and Agnantis, N. I. (2004) Prognostic significance of angiogenesis in superficial bladder cancer. *Int J Urol Nephrol*, **36**: 163-167.
- Stejskal, D. and Karpisek, M. (2006) Adipocyte fatty acid binding protein in a caucasian population: A new marker of metabolic syndrome? *Eur J Clin Invest*, **36**: 621-625.
- Stephen, R. L., Gustafsson, M. C., Jarvis, M., Tatoud, R., Marshall, B. R., Knight, D., Ehrenborg, E., Harris, A. L., Wolf, C. R. and Palmer, C. N. (2004) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines. *Cancer Res*, **64**: 3162-3170.
- Stremmel, W., Strohmeier, G., Borchard, F., Kochwa, S. and Berk, P. D. (1985) Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**: 4-8.
- Sundvold, H. and Lien, S. (2001) Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (ppar) gamma promoter in man and transactivation by the nuclear receptor roralphal. *Biochem Biophys Res Commun*, **287**: 383-390.
- Suzuki, K., Morita, T. and Tokue, A. (2005) Vascular endothelial growth factor-c (vegfc) expression predicts lymph node metastasis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Urol*, **12**: 152-158.
- Sweetser, D. A., Birkenmeier, E. H., Klisak, I. J., Zollman, S., Sparkes, R. S., Mohandas, T., Lusic, A. J. and Gordon, J. I. (1987) The human and rodent intestinal fatty acid binding protein genes. A comparative analysis of their structure, expression, and linkage relationships. *J Biol Chem*, **262**: 16060-16071.
- Sweetser, D. A., Lowe, J. B. and Gordon, J. I. (1986) The nucleotide sequence of the rat liver fatty acid-binding protein gene. Evidence that exon 1 encodes an oligopeptide domain shared by a family of proteins which bind hydrophobic ligands. *J Biol Chem*, **261**: 5553-5561.
- Tabruyn, S. P. and Griffioen, A. W. (2007) Molecular pathways of angiogenesis inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, **355**: 1-5.
- Taipale, J., Makinen, T., Arighi, E., Kukku, E., Karkkainen, M. and Alitalo, K. (1999) Vascular endothelial growth factor receptor-3. *Curr Top Microbiol Immunol*, **237**: 85-96.
- Takahashi, H. and Shibuya, M. (2005) The vascular endothelial growth factor (vegfc)/vegfc receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, **109**: 227-241.

- Takahashi, N., Okumura, T., Motomura, W., Fujimoto, Y., Kawabata, I. and Kohgo, Y. (1999) Activation of ppargamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FEBS Lett*, **455**: 135-139.
- Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K. and Shibuya, M. (2001) A single autophosphorylation site on kdr/flk-1 is essential for vegf-a-dependent activation of plc-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *Embo J*, **20**: 2768-2778.
- Tan, N. S., Shaw, N. S., Vinckenbosch, N., Liu, P., Yasmin, R., Desvergne, B., Wahli, W. and Noy, N. (2002) Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol*, **22**: 5114-5127.
- Tanaka, K., Yamaguchi, S., Sawano, A. and Shibuya, M. (1997) Characterization of the extracellular domain in vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1 tyrosine kinase). *Jpn J Cancer Res*, **88**: 867-876.
- Tanaka, T., Kohno, H., Yoshitani, S., Takashima, S., Okumura, A., Murakami, A. and Hosokawa, M. (2001) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res*, **61**: 2424-2428.
- Tannehill-Gregg, S. H., Sanderson, T. P., Minnema, D., Voelker, R., Ulland, B., Cohen, S. M., Arnold, L. L., Schilling, B. E., Waites, C. R. and Dominick, M. A. (2007) Rodent carcinogenicity profile of the antidiabetic dual ppar alpha and gamma agonist muraglitazar. *Toxicol Sci*, **98**: 258-270.
- Temple, K. A., Cohen, R. N., Wondisford, S. R., Yu, C., Deplewski, D. and Wondisford, F. E. (2005) An intact DNA-binding domain is not required for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (ppargamma) binding and activation on some ppar response elements. *J Biol Chem*, **280**: 3529-3540.
- Teratani, T., Domoto, T., Kuriki, K., Kageyama, T., Takayama, T., Ishikawa, A., Ozono, S. and Nozawa, R. (2007) Detection of transcript for brain-type fatty acid-binding protein in tumor and urine of patients with renal cell carcinoma. *Urology*, **69**: 236-240.
- Terman, B. I., Carrion, M. E., Kovacs, E., Rasmussen, B. A., Eddy, R. L. and Shows, T. B. (1991) Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, **6**: 1677-1683.
- Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D. and Bohlen, P. (1992) Identification of the kdr tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, **187**: 1579-1586.
- Thuillier, P., Anchiraico, G. J., Nickel, K. P., Maldve, R. E., Gimenez-Conti, I., Muga, S. J., Liu, K. L., Fischer, S. M. and Belury, M. A. (2000) Activators of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha partially inhibit mouse skin tumor promotion. *Mol Carcinog*, **29**: 134-142.
- Thuillier, P., Baillie, R., Sha, X. and Clarke, S. D. (1998) Cytosolic and nuclear distribution of ppargamma2 in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J Lipid Res*, **39**: 2329-2338.
- Tien, E. S., Davis, J. W. and Vanden Heuvel, J. P. (2004) Identification of the creb-binding protein/p300-interacting protein cited2 as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha coregulator. *J Biol Chem*, **279**: 24053-24063.
- Tobin, K. A., Steineger, H. H., Alberti, S., Spydevold, O., Auwerx, J., Gustafsson, J. A. and Nebb, H. I. (2000) Cross-talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver x receptor-alpha. *Mol Endocrinol*, **14**: 741-752.
- Tokunaga, T., Kijima, H., Oshika, Y., Fukushima, Y., Abe, Y., Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Tsuchida, T., Makuuchi, H., Tamaoki, N., Ueyama, Y. and Nakamura, M. (1998a) Aberrant isoform of vascular endothelial growth factor 189 expression is correlated with xenotransplantability of human esophageal cancer. *Oncol Rep*, **5**: 1115-1118.
- Tokunaga, T., Oshika, Y., Abe, Y., Ozeki, Y., Sadahiro, S., Kijima, H., Tsuchida, T., Yamazaki, H., Ueyama, Y., Tamaoki, N. and Nakamura, M. (1998b) Vascular endothelial growth factor (vegf) mrna isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer*, **77**: 998-1002.
- Tontonoz, P., Graves, R. A., Budavari, A. I., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Hu, E., Tempst, P. and Spiegelman, B. M. (1994) Adipocyte-specific transcription factor arf6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, ppar gamma and rxr alpha. *Nucleic Acids Res*, **22**: 5628-5634.
- Tontonoz, P., Kim, J. B., Graves, R. A. and Spiegelman, B. M. (1993) Add1: A novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol*, **13**: 4753-4759.
- Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (1997) The transcriptional co-activator p/cip binds cbp and mediates nuclear-receptor function. *Nature*, **387**: 677-684.
- Treuter, E., Albrektsen, T., Johansson, L., Leers, J. and Gustafsson, J. A. (1998) A regulatory role for rip140 in nuclear receptor activation. *Mol Endocrinol*, **12**: 864-881.
- Tso, A. W., Xu, A., Sham, P. C., Wat, N. M., Wang, Y., Fong, C. H., Cheung, B. M., Janus, E. D. and Lam, K. S. (2007) Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: A 10-year prospective study in a chinese cohort. *Diabetes Care*, **30**: 2667-2672.
- Tuncman, G., Erbay, E., Hom, X., De Vivo, I., Campos, H., Rimm, E. B. and Hotamisligil, G. S. (2006) A genetic variant at the fatty acid-binding protein ap2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**: 6970-6975.
- Ueda, S., Basaki, Y., Yoshie, M., Ogawa, K., Sakisaka, S., Kuwano, M. and Ono, M. (2006) Pten/akt signaling through epidermal growth factor receptor is prerequisite for angiogenesis by hepatocellular carcinoma cells that is susceptible to inhibition by gefitinib. *Cancer Res*, **66**: 5346-5353.
- Vanden Heuvel, J. P. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: A critical link among fatty acids, gene expression and carcinogenesis. *J Nutr*, **129**: 575S-580S.
- Veerkamp, J. H. and Maatman, R. G. (1995) Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: Their structure and genes. *Prog Lipid Res*, **34**: 17-52.
- Vega, R. B., Huss, J. M. and Kelly, D. P. (2000) The coactivator pgc-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol*, **20**: 1868-1876.
- Vinals, F., Chambard, J. C. and Pouyssegur, J. (1999) P70 s6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*, **274**: 26776-26782.
- Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M. and Persico, G. (1996) Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, **93**: 1493-1495.
- Vlodavsky, I., Miao, H. Q., Medalion, B., Danagher, P. and Ron, D. (1996) Involvement of heparan sulfate and related molecules in sequestration and growth promoting activity of fibroblast growth factor. *Cancer Metastasis Rev*, **15**: 177-186.
- Waite, K. J., Floyd, Z. E., Arbour-Reilly, P. and Stephens, J. M. (2001) Interferon-gamma-induced regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and stats in adipocytes. *J Biol Chem*, **276**: 7062-7068.
- Waites, C. R., Dominick, M. A., Sanderson, T. P. and Schilling, B. E. (2007) Nonclinical safety evaluation of muraglitazar, a novel pparalpha/gamma agonist. *Toxicol Sci*, **100**: 248-258.

- Wang, D., Wang, H., Guo, Y., Ning, W., Katkuri, S., Wahli, W., Desvergne, B., Dey, S. K. and DuBois, R. N. (2006a) Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and vegf stimulates cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**: 19069-19074.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. and Semenza, G. L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-pas heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**: 5510-5514.
- Wang, T., Xu, J., Yu, X., Yang, R. and Han, Z. C. (2006b) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases. *Crit Rev Oncol Hematol*, **58**: 1-14.
- Weaver, R. E., Donnelly, D., Wabitsch, M., Grant, P. J. and Balmforth, A. J. (2008) Functional expression of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptors is coupled to differentiation in a human adipocyte model. *Int J Obes (Lond)*.
- Whitaker, G. B., Limberg, B. J. and Rosenbaum, J. S. (2001) Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of vegf(165) and vegf(121). *J Biol Chem*, **276**: 25520-25531.
- White, J. H., Fernandes, L., Mader, S. and Yang, X. J. (2004) Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors. *Vitam Horm*, **68**: 123-143.
- Wiesmann, C., Fuh, G., Christinger, H. W., Eigenbrot, C., Wells, J. A. and de Vos, A. M. (1997) Crystal structure at 1.7 Å resolution of vegf in complex with domain 2 of the flt-1 receptor. *Cell*, **91**: 695-704.
- Wild, P. J., Herr, A., Wissmann, C., Stoeckl, R., Rosenthal, A., Zaak, D., Simon, R., Knuechel, R., Pilarsky, C. and Hartmann, A. (2005) Gene expression profiling of progressive papillary noninvasive carcinomas of the urinary bladder. *Clin Cancer Res*, **11**: 4415-4429.
- Willson, T. M., Brown, P. J., Sternbach, D. D. and Henke, B. R. (2000) The ppar γ : From orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem*, **43**: 527-550.
- Willson, T. M., Cobb, J. E., Cowan, D. J., Wiethe, R. W., Correa, I. D., Prakash, S. R., Beck, K. D., Moore, L. B., Kliever, S. A. and Lehmann, J. M. (1996) The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J Med Chem*, **39**: 665-668.
- Witzenbichler, B., Asahara, T., Murohara, T., Silver, M., Spyridopoulos, I., Magner, M., Principe, N., Kearney, M., Hu, J. S. and Isner, J. M. (1998) Vascular endothelial growth factor-c (vegf-c/vegfr-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol*, **153**: 381-394.
- Wolfrum, C., Borrmann, C. M., Borchers, T. and Spener, F. (2001) Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: A signaling path to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 2323-2328.
- Woolard, J., Wang, W. Y., Bevan, H. S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R. O., Cui, T. G., Sugiono, M., Waine, E., Perrin, R., Foster, R., Digby-Bell, J., Shields, J. D., Whittles, C. E., Mushens, R. E., Gillatt, D. A., Ziche, M., Harper, S. J. and Bates, D. O. (2004) Vegf165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: Mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res*, **64**: 7822-7835.
- World Health Organization (Geneva, 1973) Histological typing of urinary bladder tumours. *International histological classification of tumours*.
- Wright, H. M., Clish, C. B., Mikami, T., Hauser, S., Yanagi, K., Hiramatsu, R., Serhan, C. N. and Spiegelman, B. M. (2000) A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **275**: 1873-1877.
- Wu, W., Shu, X., Hovsepian, H., Mosteller, R. D. and Broek, D. (2003) Vegf receptor expression and signaling in human bladder tumors. *Oncogene*, **22**: 3361-3370.
- Wu, X. R. (2005) Urothelial tumorigenesis: A tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer*, **5**: 713-725.
- Xia, G., Kumar, S. R., Hawes, D., Cai, J., Hassanieh, L., Groshen, S., Zhu, S., Masood, R., Quinn, D. I., Broek, D., Stein, J. P. and Gill, P. S. (2006) Expression and significance of vascular endothelial growth factor receptor 2 in bladder cancer. *J Urol*, **175**: 1245-1252.
- Xin, X., Yang, S., Kowalski, J. and Gerritsen, M. E. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, **274**: 9116-9121.
- Xu, A., Tso, A. W., Cheung, B. M., Wang, Y., Wat, N. M., Fong, C. H., Yeung, D. C., Janus, E. D., Sham, P. C. and Lam, K. S. (2007) Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: A 5-year prospective study. *Circulation*, **115**: 1537-1543.
- Xu, A., Wang, Y., Xu, J. Y., Stejskal, D., Tam, S., Zhang, J., Wat, N. M., Wong, W. K. and Lam, K. S. (2006) Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem*, **52**: 405-413.
- Xu, H. E., Stanley, T. B., Montana, V. G., Lambert, M. H., Shearer, B. G., Cobb, J. E., McKee, D. D., Galardi, C. M., Plunket, K. D., Nolte, R. T., Parks, D. J., Moore, J. T., Kliever, S. A., Willson, T. M. and Stimmel, J. B. (2002) Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by ppar α . *Nature*, **415**: 813-817.
- Yamakawa, K., Hosoi, M., Koyama, H., Tanaka, S., Fukumoto, S., Morii, H. and Nishizawa, Y. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists increase vascular endothelial growth factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **271**: 571-574.
- Yamashita, D., Yamaguchi, T., Shimizu, M., Nakata, N., Hirose, F. and Osumi, T. (2004) The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is negatively regulated by sumo conjugation in the amino-terminal domain. *Genes Cells*, **9**: 1017-1029.
- Yang, C. C., Chu, K. C. and Yeh, W. M. (2004) The expression of vascular endothelial growth factor in transitional cell carcinoma of urinary bladder is correlated with cancer progression. *Urol Oncol*, **22**: 1-6.
- Yang, W. L. and Frucht, H. (2001) Activation of the ppar pathway induces apoptosis and cox-2 inhibition in ht-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, **22**: 1379-1383.
- Yang, X. Y., Wang, L. H., Chen, T., Hodge, D. R., Resau, J. H., DaSilva, L. and Farrar, W. L. (2000) Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (ppargamma) agonists. Ppargamma co-association with transcription factor nfat. *J Biol Chem*, **275**: 4541-4544.
- Yasui, Y., Kim, M. and Tanaka, T. (2008) Ppar ligands for cancer chemoprevention. *PPAR Res*, **2008**: 548919.
- Yin, F., Wakino, S., Liu, Z., Kim, S., Hsueh, W. A., Collins, A. R., Van Herle, A. J. and Law, R. E. (2001) Troglitazone inhibits growth of mcf-7 breast carcinoma cells by targeting g1 cell cycle regulators. *Biochem Biophys Res Commun*, **286**: 916-922.
- Yin, Y., Russell, R. G., Dettin, L. E., Bai, R., Wei, Z. L., Kozikowski, A. P., Kopelovich, L. and Glazer, R. I. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma agonists differentially alter tumor differentiation and progression during mammary carcinogenesis. *Cancer Res*, **65**: 3950-3957.
- Yokoyama, Y., Xin, B., Shiget, T., Umamoto, M., Kasai-Sakamoto, A., Futagami, M., Tsuchida, S., Al-Mulla, F. and Mizunuma, H. (2007) Clofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha ligand, inhibits growth of human ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*, **6**: 1379-1386.

- Yoshida, K., Tanabe, K., Fujii, D., Oue, N., Yasui, W. and Toge, T.** (2003) Induction mechanism of apoptosis by troglitazone through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in gastric carcinoma cells. *Anticancer Res*, **23**: 267-273.
- Yoshikawa, T., Brkanac, Z., Dupont, B. R., Xing, G. Q., Leach, R. J. and Detera-Wadleigh, S. D.** (1996) Assignment of the human nuclear hormone receptor, nucl1 (ppard), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics*, **35**: 637-638.
- Yoshikawa, T., Shimano, H., Amemiya-Kudo, M., Yahagi, N., Hasty, A. H., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Kimura, S., Ishibashi, S. and Yamada, N.** (2001) Identification of liver x receptor-retinoid x receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol Cell Biol*, **21**: 2991-3000.
- Yoshimura, R., Matsuyama, M., Hase, T., Tsuchida, K., Kuratsukuri, K., Kawahito, Y., Sano, H., Segawa, Y. and Nakatani, T.** (2003a) The effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand on urological cancer cells. *Int J Mol Med*, **12**: 861-865.
- Yoshimura, R., Matsuyama, M., Segawa, Y., Hase, T., Mitsuhashi, M., Tsuchida, K., Wada, S., Kawahito, Y., Sano, H. and Nakatani, T.** (2003b) Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (ppars) in human urinary bladder carcinoma and growth inhibition by its agonists. *Int J Cancer*, **104**: 597-602.
- Youssef, J. and Badr, M.** (2004) Role of peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Biomed Biotechnol*, **2004**: 156-166.
- Yuan, J., Takahashi, A., Masumori, N., Uchida, K., Hisasue, S., Kitamura, H., Itoh, N. and Tsukamoto, T.** (2005) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma have potent antitumor effect against human renal cell carcinoma. *Urology*, **65**: 594-599.
- Zachary, I. and Gliki, G.** (2001) Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res*, **49**: 568-581.
- Zakim, D.** (1996) Fatty acids enter cells by simple diffusion. *Proc Soc Exp Biol Med*, **212**: 5-14.
- Zeegers, M. P., Tan, F. E., Dorant, E. and van Den Brandt, P. A.** (2000) The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: A meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer*, **89**: 630-639.
- Zhang, H., Wu, J., Meng, L. and Shou, C. C.** (2002) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors kdr and flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol*, **8**: 994-998.
- Zhang, Y., Furumura, M. and Morita, E.** (2008) Distinct signaling pathways confer different vascular responses to vegf 121 and vegf 165. *Growth Factors*, **26**: 125-131.
- Zhu, D., Xing, D., Shen, X. and Liu, J.** (2004) A method to quantitatively detect h-ras point mutation based on electrochemiluminescence. *Biochem Biophys Res Commun*, **324**: 964-969.
- Zhu, Y., Qi, C., Calandra, C., Rao, M. S. and Reddy, J. K.** (1996) Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (msrc-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Gene Expr*, **6**: 185-195.
- Zhu, Y., Qi, C., Jain, S., Rao, M. S. and Reddy, J. K.** (1997) Isolation and characterization of pbp, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem*, **272**: 25500-25506.
- Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J. R., Chen, X. N., Noya, D., Rao, M. S. and Reddy, J. K.** (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mppar gamma) gene: Alternative promoter use and different splicing yield two mppar gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**: 7921-7925.
- Zimmerman, A. W. and Veerkamp, J. H.** (2002) New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci*, **59**: 1096-1116.
- Zu, X., Tang, Z., Li, Y., Gao, N., Ding, J. and Qi, L.** (2006) Vascular endothelial growth factor-c expression in bladder transitional cell cancer and its relationship to lymph node metastasis. *BJU Int*, **98**: 1090-1093.

PERMIS D'IMPRIMER

**THESE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Thèse n° 25.08.10

Présentée par Monsieur Guillaume BOITEUX

Né(e) le 10/05/1980



et ayant pour titre :

**EFFET DE LIGANDS DE PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors)
SUR L'EXPRESSION DE DEUX MARQUEURS POTENTIELS DE PROGRESSION DES
CANCERS DE LA VESSIE : Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Adipocyte-Fatty
Acid Binding Protein (A-FABP).**

Vu et permis d'imprimer,

Besançon, le *31/10/09*

Le Directeur de Thèse,

Guillaume Boiteux

Le Président de l'Université
et par délégation,
Le Directeur de l'UFR SMP

Le Professeur E. SAMAIN

