



**HAL**  
open science

# Rôle du récepteur nucléaire PPARgamma dans les fonctions immuno-modulatrices de la cellule épithéliale intestinale au cours de la rectocolite hémorragique : contrôle de l'expression de l'isoforme courte de la TSLP

Anthony Martin Mena

## ► To cite this version:

Anthony Martin Mena. Rôle du récepteur nucléaire PPARgamma dans les fonctions immuno-modulatrices de la cellule épithéliale intestinale au cours de la rectocolite hémorragique : contrôle de l'expression de l'isoforme courte de la TSLP. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. NNT : 2017LIL2S047 . tel-03172394

**HAL Id: tel-03172394**

**<https://theses.hal.science/tel-03172394>**

Submitted on 17 Mar 2021

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

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

Université Droit et Santé Lille Nord de France  
École Doctorale Biologie Santé de Lille

**THÈSE**

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 2**  
Discipline : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par  
**Anthony MARTIN MENA**

Le 16 novembre 2017

---

**Rôle du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  dans les fonctions immuno-modulatrices de la cellule épithéliale intestinale au cours de la rectocolite hémorragique : contrôle de l'expression de l'isoforme courte de la TSLP**

---

Thèse dirigée par le Pr. Luc DUBREUIL et le Dr. Benjamin BERTIN

**Membres du jury :**

Dr. Daniel METZGER	Rapporteur
Dr. Rachel MARION-LETELLIER	Rapporteur
Pr. Guillaume BOUGUEN	Examineur
Pr. Benoit FOLIGNÉ	Examineur
Dr. Christophe CARNOY	Examineur
Dr. Benjamin BERTIN	Directeur de Thèse

Thèse préparée au sein du laboratoire dirigé par le Pr. Pierre Desreumaux :  
Lille Inflammation Research International Center (LIRIC)  
Équipe 1 : Maladies inflammatoires digestives – Physiopathologie et développement  
de nouvelles cibles thérapeutiques.

« La vie c'est comme une boîte de chocolat, on ne sait jamais sur quoi on va tomber. »

Forrest Gump





# Remerciements

M. le Docteur Daniel METZGER et Mme le Docteur Rachel MARION-LETELLIER pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit et d'évaluer ce travail de thèse.

M. le Professeur Guillaume BOUGUEN pour avoir accepté d'être examinateur pour ma soutenance de thèse.

M. Benoit FOLIGNÉ et M. Christophe CARNOY pour avoir participé de mes comités de suivi de thèse ainsi que d'être examinateur de mon jury de thèse.

M. le Docteur Benjamin BERTIN pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance et pour ton encadrement durant mes années de recherche en temps qu'interne. Merci pour le temps que tu m'as consacré quand j'en avais besoin et pour tes enseignements.

M. le Professeur Luc DUBREUIL pour avoir accepté d'être mon co-directeur de thèse d'Université et pour vos disponibilités.

M. le Professeur Pierre DESREUMAUX, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour votre aide pour ma recherche de financement pour ma dernière année de thèse d'Université.

Tous les membres du laboratoire UMR995 pour les 4 années que je viens de passer à vos côtés. Je ne sais pour quelle raison, ceux sont les remerciements les plus difficiles à écrire pour moi. Je garde de magnifique souvenir avec vous. Que ça soit les membres permanents : Laurent, Caroline D, Caroline G, Annie, Boualem, Samir, Virginie, Arnaud, Marie, Emilie, Cécile, Mathilde, Chantal, Aurélien, François, Mohamed (chacun sa mère), Madjid (mon baba du labo, un peu érotomane sur les bords), Silvia Blue Cruz Specca (d'ailleurs, on ne sait toujours pas pourquoi la grand-

mère l'appelait Blue et on ne sait toujours pas non plus à qui Edward doit de l'argent...) et ses 20 personnalités, Béatrice et Audrey, qui sans toi, mes 3 années n'auront vraiment pas été pareil. Tu as été toujours présente pour me corriger, m'aider dans mes manip, me soutenir, m'écouter, rire et soutenir les Stark. Petit message que toi seul comprendra : (pazoj oin aiz dpojàz aizhiàj,q ppoi). Je voudrais également remercier les autres personnes qui sont parties ou sont moins présentes au laboratoire : mon petit Rat (Laura) qui m'a énormément aidé durant mon internat, Solène, Fifounette, Nico (As-tu réussi depuis à détecter la sérotonine par Western Blot ?), Lucifer (même si rien ne peut plus t'étonner me concernant #tricotin #tatouageloup #coeurdepirate #donald), La Princesse, Charbel, Bol de riz, Moulan, Tristopher (merci d'écouter mes recommandations sur les jeux vidéo), Jessicastophe et Thaise (Même si on a travaillé que 2 mois ensemble, c'était très agréable et surtout, tu m'as bien fait travaillé mon anglais.. !). Merci aussi à Bernadette pour les nombreux dimanches que nous avons passé ensemble durant la rédaction de la thèse et qui m'a rendu ces journées plus agréables. Je voudrais également remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire de bactériologie clinique de la faculté de pharmacie et en particulier Mme Christelle Neut et Benoit Foligné pour leur conseils mais également Séverine et Charlotte qui m'ont consacré beaucoup de temps pour mes dernières manip de thèse. Ça a été un plaisir de travailler avec vous. Merci encore à vous tous.

Tous les membres de la PUI de Creil. En arrivant à Creil, je vous avouerai que j'ai pleuré à la fin de ma première journée en temps qu'interne. Comment un breton du bout du monde pouvait se retrouver en pleine campagne picarde en novembre sans connaître personne. Mais votre accueil, votre gentillesse m'ont remonté le moral. Vous avez été tous formidables avec moi. Que ça soit les pharmaciens (Céline, Mr Tran, Ferdinand, Bénédikte, Sylvie, Mme Avot, Mr Pitré), les préparatrices/préparateurs (Samira, Isabelle, Cindy, Laetitia, Cynthia, Catherine, Léa, Jean-Marie, Frédérique, Fleur, Amar, Béa, etc), mes chers co-internes (Xavier, Ahmed et Cécile) et mes externes (Medhiment et Thanganyl). Merci infiniment de cette année. J'en garderais des souvenirs plein la tête. Je vous avouerai, que lorsque je suis parti le dernier jour, j'ai pleuré de nouveau.

Tous les membres du labo du CHGR, pour m'avoir accueilli durant 3 semestres en tant que « Faisant fonction d'interne ». Je voudrais remercier toute l'équipe en commençant par le Docteur Anne Coriton pour m'avoir accepté dans son laboratoire mais également le reste de l'équipe : le Docteur Nathalie Lafforgue ainsi que Fanny, Maryse, Catherine, Sophie et Véronique. Je garderai un magnifique souvenir des moments passés à vos côtés.

Tous les membres de laboratoire de microbiologie de CHU de Brest et en particulier le service de parasitologie. C'est durant mon stage de fin d'année d'IUT Génie biologique et biochimique que les biologistes Dorothee, Elodie et Déborah ainsi que les deux techniciennes Patricia et Chantal, m'ont fortement encouragé à poursuivre mes études et de partir en faculté de pharmacie pour tenter le concours de l'internat. J'étais très perplexe à l'idée de reprendre mes études à zéro et surtout repartir pour 5-6 ans. J'ai fini par les écouter et je ne regrette pas d'avoir fait ce choix.

M. Philippe Piras, professeur de biologie au lycée de l'Iroise de Brest. Si je suis arrivé là où j'en suis, je le dois certainement à M. Piras. Vous avez cru en moi et m'avez toujours soutenu durant mes trois années de lycée à vos côtés. Vous m'avez convaincu de faire de longues études (même si je n'ai pas fait prépa bio) et de toujours viser plus haut. Que même des enfants d'ouvriers pouvaient aller très loin, si nous en avons la volonté. Merci de m'avoir transmis cette passion de la biologie.

Tous mes amis de la faculté de pharmacie de Rennes et mes amis rennais, avec qui j'aurais passé des moments de folies entre deux cours. J'ai tellement de souvenir en tête que je ne pourrais malheureusement pas tous les écrire ici. Outre les jeudi-vendredi matin difficiles, je retiendrai les principaux : mes TP avec ma bibi adorée, écouter le répertoire de Claude François avec ma Tonynette en haut de l'amphi, les trajets en voiture avec Marie Mousset (la nana toujours au taquet sur les potins), les délires avec l'argument et le petit argument, mon baptême faluche, mes soirées faluchards, mes crits, mes 2 années au sein de la corpo avec Panpan, Vice, Lolo, Mursic, Cam (c'est la baseee), Céline, Olier, Béréééééééééé, Mr Queltier, Patoche, Peter, la petite Soiz, Somatostatine et tous les autres pharma. Je pense aussi aux carabins, dentaires et les sciences qui nous accompagnaient durant nos soirées et événements. Parmi ces personnes, Aurore, qui deviendra ma fillote de faluche !



J'aurais passé avec toi, durant mes premiers mois de 4<sup>ème</sup> année pharma, les soirées et certains moments les plus ouf de ma vie étudiante ! Et je ne t'oublie pas ma petite vache (Kimmy) et tous les moments qu'on a vécu ensemble, on s'est tout de suite entendu dès les premiers jours de notre 2<sup>ème</sup> année même si lors de notre rencontre, tu saignais du nez et tu as réussi à m'en mettre sur ma veste blanche. Je vous remercie vous tous. Vous m'avez fait passé peut-être les 5 années les plus folles de ma vie. Je remercierai également tous mes amis des autres facultés de pharmacie de France que j'ai pu rencontrer lors de congrès ou d'assemblée générale, je pense à Alex de Poitiers, Julie, Dylan de PXI (même si je ne comprends toujours pas le rapport entre Dylan et Kevin, ton vrai nom), les Rouennais, les Grenoblois, les Clermontois, les Marseillais, les Nancéens, les Lillois (Florentin le premier !), les Nantais, les parisiens et enfin Bambi, mon petit amienois (#regardnoir) et sa femme Marie. Je remercie tout ce que j'aurais oublié... Merci à tous, pour tous ses souvenirs que je vais garder toute ma vie en tête ! Je terminerai par remercier **Julie Haybard** à moitié. Soi-disant je l'avais oublié dans mes remerciements de mon manuscrit de thèse de Pharmacie donc là, c'est fait de manière bien visible..! ;)

Tus mes amis de Brest : Bubu (YoannB), Tib (Canarticho), Mick, Anna, London, Jean-Phi, Ju, Audrey, Céd, Gwen, Manône, Micka, Nico mon coach, Claire, All, Jeanker (Jean Pierre pur les intimes), Ophé, Jérém, Ben, Gobi, Freyjo, Anthony, Amélie, Tanguy sans oublier le petit Grégory qui m'ont soutenu durant toutes ces années. Malgré la distance et le fait que je ne suis pas le meilleur pur donner de mes nouvelles, lorsque je rentre à Brest, je sais que c'est à bras ouverts qu'ils vont m'accueillir. Ils sont très certainement les personnes qui me connaissent le mieux et durant toutes mes années d'études, je pense que la question la plus fréquente qu'ils m'ont posé est : « Non mais en gros, tu en as pur combien d'années encore ? ». Je pense pouvoir vous répondre maintenant : encore une année et j'en ai fini des études... Enfin je l'espère ! (S'il manque des « o » dans ce paragraphe, c'est normal..!)

Je remercie également Sharkman, Tijibus, KiimastO, Komodor (ou Matador selon la situation de stress), Pedro, Nico et Guaouen avec qui nous formons « La J&MT », mon escouade de gardiens (ou de victime selon les personnes) et avec qui j'ai passé un nombre incalculable d'heure sur Destiny à sauver l'Univers de la menace des ténèbres..! Merci Gardiens..!

Guewen et Élodie, je pense que je me dois de vous faire des remerciements à part. L'un comme l'autre, je vous ai connu durant notre première année d'IUT à Brest, Guewen en tant que binôme de TP et Élo, en tant que voisine d'amphi. De là, deux amitiés très fortes se sont faites. Deux amitiés qui font parties des plus importantes à mes yeux encore aujourd'hui. De garder encore de vos nouvelles, 12 ans après nos rencontres, me remplissent de joie. Vous êtes la parfaite définition de l'amitié à mes yeux. Guewen, nous nous sommes convaincus mutuellement de faire pharma après l'IUT, nous avons vécu les mêmes galères durant les deux concours, mais nous avons vécu d'excellents moments dont nos parties interminables à « Crash Team Racing »... Élo, notre amitié est également l'une des choses les plus précieuses pour moi. La vie a fait que nous nous sommes éloignés mais uniquement en distance. Je vous remercie d'être là pour moi.

Je voudrais maintenant remercier mes parents, mes 3 sœurs (Caroline, Virginie, Amandine), mon parrain Christian, mes deux beaux-frères (Cédric et Romain), ma filleule Alicia, ma nièce Nina, mon neveu Esteban ainsi que le reste de ma famille pour avoir cru en moi. Si mes parents avaient dû parier sur un de leurs poulains pour savoir qui fera de longues études, il est certain qu'ils n'auraient jamais parié sur moi... J'étais loin d'être le plus doué à l'école parmi nous 4 ! Mais me voilà, 12 ans d'étude supérieure plus tard... Je ne pourrai jamais les remercier suffisamment pour ce qu'ils ont fait pour moi. Ce que je suis devenu, je le leur dois. Le monde de la pharmacie me vaut le droit à de belles « discussions » avec ma maman, partisane anti-vaccin, pour lesquelles je prends toujours autant de plaisir à lui donner tort ! Je remercie également la famille de Morgane, ses parents (Sylvie et Philippe), ses frères et sœurs (Nadège, Anne-Lyse et Pierre-Aymeric) pour leur soutien et leur présence durant toutes ces années.

Enfin je terminerai par remercier les deux êtres qui me tiennent le plus aux cœurs, Morgane et Rafael, mes deux piliers, toujours présents pour moi, pour me changer les idées, pour accompagner lors des moments de joies comme durant mes difficultés. Voilà 2 ans que nous formons une famille et qu'ils me font comprendre que la chose la plus importante dans ce monde se trouve juste devant moi. Le bonheur ne se trouve pas ou ne se gagne pas, non, le bonheur se construit jour après jour et ils sont présents pour cimenter chaque jour ce bonheur.

# Curriculum vitae

## FORMATION

- Septembre 2016 : **Soutenance de la thèse d'exercice de pharmacie (directeur : Dr Benjamin Bertin)**

*Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Lille 2 (59)*

- Titre de la thèse d'exercice : *Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (PPAR $\gamma$ )* régule l'expression de l'isoforme 2 de la *Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)* dans les cellules épithéliales intestinales du colon
- Mention Très Bien avec les félicitations du jury

- 2014 - 2017 : **Thèse de sciences, Ecole doctorale Lille 2 (directeur de thèse : Dr. Benjamin Bertin ; Co-directeur de thèse : Luc Dubreuil)**

*Laboratoire Inserm UMR995, Equipe 1, Université de Lille 2 (59)*

- 2013 - 2014 : **Master 2 Recherche Biologie Santé (directeur : Dr Benjamin Bertin)**

*Laboratoire Inserm UMR995, Equipe 1, Université de Lille 2 (59)*

- Titre du mémoire : Rôle de PPAR $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma*) sur l'expression de la TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*) dans les cellules épithéliales intestinales
- Mention Bien

- 2012 - 2013 : **Master 1 « Interaction moléculaire et thérapeutiques » (Pr. Saïd Kamel)**

*Université de Picardie Jules Verne, Amiens (80)*

- UE Immunologie et pathologie
- UE Technique de recherche d'emploi
- Mémoire de recherche "L'intérêt du régorafénib dans le traitement du cancer colorectal métastatique"

- Novembre 2012 - Octobre 2014 : **Validation des Unités d'Enseignement de Pharmacie Hospitalière**

*Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Lille 2 (59)*

- UE Préparations et contrôles
- UE Assurance qualité
- UE Économie de la santé
- UE Vigilance
- UE Pharmacie clinique
- UE Dispositifs médicaux

- 2012 - 2016 : **Internat en Pharmacie, D.E.S Innovation Pharmaceutique et Recherche (IPR)**

- Juin 2012 : **Concours de l'internat de Pharmacie, classé poste interne IPR**

- Octobre 2010 : **Externe en pharmacie :**

*Centre Hospitalier Guillaume Régnier de Rennes (35)*

- 2007 - 2012 : **2<sup>ème</sup> - 6<sup>ème</sup> année de pharmacie**

*Faculté de pharmacie de Rennes*

- UE officine « Anti-infectieux » en 3<sup>ème</sup> année
- UE Préparation à l'internat en 4<sup>ème</sup> année

- 2006 - 2007 : **Concours de pharmacie première année**

*Faculté de pharmacie de Rennes*

- 2004 - 2006 : **DUT Génie Biologique, option Analyse Biologique et Biochimique**

*IUT de Brest (29)*

- Technique d'analyse en biochimie, hématologie, bactériologie, parasitologie

## EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

- Novembre 2016 : **Lauréat de pharmacie** (médaille d'or) du CHRU de Lille

*Inserm UMR995 Équipe 1, Pierre Desreumaux, Lille*

- 3<sup>ème</sup> année de thèse de science

- Novembre 2013 - Octobre 2016 : **Interne en pharmacie IPR**

*Inserm UMR995 Équipe 1, Pierre Desreumaux, Lille*

- Stage de Master 2 Recherche Biologie santé Lille 2
- 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> année de thèse de science

- Novembre 2012 - Octobre 2013 : **Interne en pharmacie**

*Pharmacie à usage intérieur de Mr Pitré, GHPSO, site de Creil*

- Validation d'ordonnance informatique (DJIN)
- Responsable des pharmacovigilances entre novembre 2012 et avril 2013
- Pharmacie clinique (service de gériatrie) entre mai 2013 et octobre 2013
- Responsable des demandes et renouvellements d'ATU

- Novembre 2010 - Octobre 2011, Mai 2012 - Octobre 2012 : **Faisant Fonction d'Interne**

*Laboratoire de Madame Coriton, Pôle médico-technique, Centre Hospitalier Guillaume Régnier de Rennes*

- Paillasse de bactériologie (divers prélèvements) et parasitologie
- Paillasse d'hémostase
- Hygiène (Contrôles légionnelle et fontaines)
- Dosage du lithium (érythrocytaire et intra-érythrocytaire)

- Aout-septembre 2010 : **Remplacement d'été en pharmacie**

Pharmacie Le Treut-Fosset à Rennes

- Délivrance au comptoir
- Rangement et mise en rayon des médicaments

- Aout 2010 : **Remplacement d'été de 3 semaines au laboratoire d'hématologie**  
C.H.U Pontchaillou de Rennes

- Etiquetage des tubes
- Réalisation des VS
- Réalisation des tests Kleihauer

- Juillet 2010 : **Remplacement d'été de 3 semaines au laboratoire de bactériologie**  
C.H.U Pontchaillou de Rennes

- Etiquetage des prélèvements (hémocultures, urines, liquides d'ascite)
- Ensemencement des hémocultures

- Été 2006, 2007 et 2009 : **Remplacement d'été de 10 semaines au laboratoire de microbiologie**

C.H.U Morvan de Brest

- Analyse de divers prélèvements microbiologiques
- Utilisation d'automate (l'Architect®, le Vidas®)
- Mycologie, parasitologie, bactériologie, sérologie virale et bactérienne

## PUBLICATIONS

### Publications écrites

- **A. Martin Mena**, A. Langlois, S. Specca, L. Schneider, P. Desreumaux, L. Dubuquoy, B. Bertin

*The expression of the short isoform of TSLP in the colon is regulated by the nuclear receptor PPAR $\gamma$  and is impaired during ulcerative colitis.* (Frontiers in Immunology, Septembre 2017).

### Communications affichées

- **A. Martin Mena**, A. Langlois, S. Specca, M. Djouina, P. Desreumaux, L. Dubuquoy, B. Bertin

*The nuclear receptor PPAR $\gamma$  controls the expression of the short isoform of TSLP in the colon.* Société Française d'Immunologie (SFI), Lille, 4-6 novembre 2014.

- **A. Martin Mena**, A. Langlois, S. Specca, P. Desreumaux, L. Dubuquoy, B. Bertin

*The expression of the short isoform of TSLP in the colon is regulated by the nuclear receptor PPAR $\gamma$  and is impaired during ulcerative colitis.* Digestive Disease Week (DDW), San Diego, 21-24 mai 2016.

# Liste des Matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>1</b>
<b>Curriculum vitae</b> .....	<b>6</b>
<b>Liste des Matières</b> .....	<b>9</b>
<b>Tables des figures</b> .....	<b>13</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>16</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>19</b>
<b>La rectocolite hémorragique</b> .....	<b>19</b>
I. Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'intestin .....	19
II. La rectocolite hémorragique .....	23
A. Généralités.....	23
B. Manifestations cliniques.....	23
1. Manifestations digestives .....	24
2. Manifestations extra-digestives.....	25
C. Evolution et complications de la RCH .....	26
1. Evolution de la RCH .....	26
2. Complication de la RCH .....	26
D. Diagnostic de la RCH .....	27
1. Examens biologiques.....	27
Analyses des selles .....	27
Analyses sanguines .....	28
2. Imagerie médicale / examens endoscopiques.....	28
3. Classement de gravité de la RCH .....	29
E. Traitements de la RCH .....	30
1. Les traitements anti-inflammatoires .....	30
Les dérivés salicylés .....	30
Les corticoïdes .....	31
2. Les autres traitements .....	32
Les immunomodulateurs .....	32
Les biothérapies .....	33
L'inhibiteur de JAK .....	34
Les traitements contre-indiqués.....	35
Traitements chirurgicaux .....	36
L'alimentation .....	37
Traitement à l'étude : la transplantation de microbiote fécal .....	38
3. Éducation thérapeutique .....	39
4. Soutien psychologique .....	40
<b>L'homéostasie intestinale</b> .....	<b>41</b>
Le Microbiote intestinale.....	41
I. Technique d'analyse du microbiote intestinal. ....	42
II. Développement du microbiote .....	43
III. Composition et biogéographie du microbiote .....	44
IV. Facteurs importants pour le microbiote .....	45
V. Rôle du microbiote chez l'individu sain .....	47
VI. Modification du microbiote chez les patients atteints de MICI .....	49
La cellule épithéliale intestinale .....	51
I. La muqueuse intestinale.....	51

II.	La cellule épithéliale intestinale .....	52
A.	Les récepteurs de l'immunité innée .....	54
B.	Réponse au niveau apicale .....	57
C.	Réponse basale .....	58
III.	Dysfonctionnement des CEI dans les MICI .....	59
	<b>Les récepteurs nucléaires.....</b>	<b>64</b>
I.	Les récepteurs nucléaires : histoire et généralité .....	64
II.	Nomenclature des récepteurs nucléaires .....	66
III.	Structure des récepteurs nucléaires.....	69
A.	Le domaine A/B.....	69
B.	Le domaine C.....	70
C.	Le domaine D .....	71
D.	Le domaine E/F .....	72
IV.	Les ligands des récepteurs nucléaires .....	73
A.	Agonistes des récepteurs nucléaires .....	75
B.	Antagonistes des récepteurs nucléaires.....	76
C.	Agonistes inverses .....	76
D.	Agonistes partiels.....	77
E.	Modulateurs sélectifs des récepteurs nucléaires.....	77
F.	Les vrais récepteurs orphelins .....	79
V.	Rôle/fonction des récepteurs nucléaires. ....	79
A.	Reconnaissance de l'ADN .....	80
B.	Activation transcriptionnelle .....	81
C.	Transrépression d'un gène .....	83
D.	Activité post traductionnelles.....	83
E.	Effets non-génomiques.....	84
	<b>Les récepteurs PPARs .....</b>	<b>86</b>
I.	Introduction .....	86
II.	Fixation et rôles des récepteurs PPARs .....	87
III.	Le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ .....	88
IV.	Le récepteur nucléaire PPAR $\beta/\delta$ .....	89
V.	Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ .....	90
A.	Les isoformes de PPAR $\gamma$ .....	90
B.	Les ligands de PPAR $\gamma$ .....	92
C.	Expression et rôle de PPAR $\gamma$ dans le côlon .....	95
D.	PPAR $\gamma$ : cible thérapeutique pour la RCH .....	96
	<b>La Thymic Stromal Lymphopoietin.....</b>	<b>98</b>
I.	Généralités.....	98
II.	Les isoformes de la TLSP.....	99
III.	La régulation transcriptionnelle de l'expression de la TSLP .....	101
A.	Facteurs agissant sur la régulation de la TSLP .....	101
1.	Les TLR.....	101
2.	Les allergènes.....	103
3.	Autres particules .....	103
B.	Les cytokines agissant sur la régulation de la TSLP .....	104
C.	Les facteurs de transcription agissant sur la TSLP .....	105
1.	Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B.....	105
2.	Le Récepteur nucléaire RXR .....	106
3.	Récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ .....	106
4.	Récepteur nucléaire VDR .....	107
5.	Récepteur nucléaire des glucocorticoïdes .....	108
6.	Deux sites promoteurs distincts pour les 2 isoformes.....	108
7.	SNP (Single Nucleotide polymorphisme) au niveau du promoteur de la TSLP.....	109
IV.	Le récepteur à la TSLP : TSLPR .....	110
V.	Cibles cellulaires de la TSLP .....	112
A.	Les cellules dendritiques.....	112

B.	Les Lymphocytes.....	114
1.	Les Lymphocytes T.....	114
2.	Les Lymphocytes B.....	115
3.	Les Lymphocytes T régulateurs.....	115
C.	Les cellules de l'immunité innée.....	116
VI.	Fonction de la TSLP dans l'organisme.....	117
A.	Le rôle homéostatique/toléro-gène de la TSLP.....	117
B.	La dermatite atopique.....	118
C.	L'asthme allergique.....	120
D.	La rhinite allergique.....	121
E.	L'œsophagite à éosinophiles.....	122
F.	TSLP et cancer.....	122
G.	Le rôle de la TSLP dans l'intestin.....	123
1.	La TSLP dans les MICI.....	124
2.	La TSLP dans la maladie coeliaque.....	125
3.	La TSLP dans les infections aux helminthes.....	126
4.	Rôle toléro-gène de la TSLP dans l'intestin.....	126
5.	La TSLP joue le rôle de peptide antimicrobien.....	127
	<b>Hypothèse de travail.....</b>	<b>128</b>
	<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>129</b>
I.	Culture cellulaire classique.....	129
II.	Culture cellulaire sur filtre.....	130
III.	Traitements des cellules.....	131
IV.	Muqueuses et cellules épithéliales humaines.....	131
A.	Muqueuses intestinales.....	131
B.	Extractions des cellules épithéliales intestinales.....	133
V.	Traitement des muqueuses de souris.....	134
A.	Traitement <i>ex vivo</i> des côlons de souris.....	134
B.	Traitement <i>in vivo</i> des côlons de souris.....	134
VI.	Extraction de l'ARN et des protéines.....	135
VII.	Traitement DNase et RT-PCR.....	135
VIII.	Q-PCR en fast past.....	136
IX.	Immunoprécipitation des protéines.....	138
X.	Western Blot.....	138
XI.	Étude <i>in silico</i> du promoteur de la TSLP.....	139
XII.	ChIP (Chromatin ImmunoPrecipitation).....	140
XIII.	Etude du gène rapporteur.....	143
XIV.	Mesure de l'activité de croissance bactérienne.....	144
XV.	Analyses Statistiques.....	146
	<b>Résultats.....</b>	<b>147</b>
	<b>Résultats publiés.....</b>	<b>147</b>
I.	L'expression de la TSLP est dépendante du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ dans les cellules Caco-2 et T84.....	147
A.	Variation d'expression de gènes codant des protéines anti- ou pro-inflammatoires dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$ : recherche de gènes cibles de PPAR $\gamma$ .....	147
B.	L'expression du gène codant la TSLP est diminuée dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$ .....	150
C.	Effets des agonistes de PPAR $\gamma$ sur les cellules Caco-2 et T84.....	151
D.	Effets des agonistes de PPAR $\gamma$ sur les cellules Caco-2 ShLuc et ShPPAR $\gamma$ .....	153
II.	L'expression de la TSLP 2 est dépendante de PPAR $\gamma$ dans les cellules Caco-2 et T84.....	154
A.	Expression génomique de la TSLP 1.....	154
B.	Expression génomique de la TSLP 2.....	155
III.	Expression protéique de la TSLP 2.....	157
IV.	L'expression de la TSLP 2 est dépendante de PPAR $\gamma$ dans les cellules Caco-2 polarisées.....	158



V.	Le promoteur de la TSLP 2 possède plusieurs éléments de réponse pouvant lier le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ .....	160
A.	Le promoteur de la TSLP 2 possède plusieurs éléments de réponse PPRE.....	160
B.	Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ se fixe sur un élément de réponse au niveau du promoteur de la TSLP 2.....	160
C.	Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ se fixe de manière fonctionnelle sur le promoteur de la TSLP 2.....	162
VI.	La diminution de l'expression du gène codant la TSLP 2 est corrélée à une diminution de l'expression du gène codant PPAR $\gamma$ dans les muqueuses saines et lésées et les cellules épithéliales coliques de patients atteints de RCH. ....	166
	<b>Résultats complémentaires non publiés .....</b>	<b>169</b>
I.	L'effets des agonistes et de l'antagoniste de PPAR $\gamma$ sur l'expression de la TSLP dans un modèle murin. ....	169
A.	Effet d'un traitement <i>ex vivo</i> par des agonistes de PPAR $\gamma$ sur des échantillons de côlons de souris .....	169
B.	Effet d'un traitement <i>ex vivo</i> par un antagoniste de PPAR $\gamma$ sur des échantillons de muqueuses murines.....	171
C.	Effet d'un traitement <i>in vivo</i> par les agonistes de PPAR $\gamma$ sur la muqueuse colique de souris	172
D.	Effet d'un traitement <i>in vivo</i> par l'antagoniste de PPAR $\gamma$ sur la muqueuse colique de souris	173
II.	Activité anti-microbienne de la TSLP 2 sur des souches bactériennes intestinales.....	174
A.	Seule, la TSLP 2 a une faible activité antimicrobienne. ....	174
B.	La TSLP 2 combiné à un autre peptide antimicrobien présente une bonne activité antimicrobienne. ....	178
	<b>Discussion.....</b>	<b>183</b>
I.	2 ISOFORMES DE LA TSLP .....	183
II.	MODELE MURIN POUR ETUDE DE LA TSLP.....	184
III.	REGULATION DE LA TSLP 2 DANS LA CEI .....	186
IV.	RÔLE DE LA TSLP 2 DANS LA CEI .....	187
V.	IMPLICATION DE LA TSLP DANS LES MICI.....	189
VI.	LES MICI ET TRAITEMENT AVEC DES AGONISTES DE PPAR $\gamma$ .....	191
	<b>Bibliographie .....</b>	<b>196</b>
	<b>Publication scientifique.....</b>	<b>226</b>

# Tables des figures

<b>Figure 1</b> : Représentation de l'incidence des MICI selon les pays. _____	20
<b>Figure 2</b> : Les facteurs génétiques, environnementaux et le microbiote intestinale des MICI _____	22
<b>Figure 3</b> : Représentation d'une colite distale, latérale gauche et une pancolite _____	24
<b>Figure 4</b> : Représentation de la mésalazine et de la sulfasalazine _____	31
<b>Figure 5</b> : Représentation de la prednisolone et de la méthylprednisolone _____	32
<b>Figure 6</b> : Représentation des molécules d'azathioprine et de 6-mercaptopurine _____	33
<b>Figure 7</b> : Proposition d'un algorithme de traitement pour les patients atteints de RCH _____	34
<b>Figure 8</b> : Représentation d'une colectomie totale avec anastomose iléorectale. _____	36
<b>Figure 9</b> : Représentation d'une coloproctectomie totale avec réservoir iléal en J et anastomose iléoanale. ____	37
<b>Figure 10</b> : Mécanismes d'action de la transplantation fécale chez les patients RCH _____	39
<b>Figure 11</b> : Analyses informations permettant de déterminer la composition bactérienne du microbiote : Analyse de la sous unité 16S de l'ARN ribosomal ou amplification du génome complet des bactéries. _____	43
<b>Figure 12</b> : Les phyla dominant dans diverses localisations du tractus digestif de l'homme _____	45
<b>Figure 13</b> : Principales fonctions du microbiote vis-à-vis de l'hôte. _____	47
<b>Figure 14</b> : Synthèse de butyrate par le microbiote à partir de SCFA (Short-chain fatty acid= acid gras à chaîne courte) : source d'énergie pour les colonocytes. _____	48
<b>Figure 15</b> : Représentation d'une coupe transversale des différentes couches constituant le tractus digestif . _	52
<b>Figure 16</b> : Les cellules intestinales épithéliales forment une barrière physique et chimique pour maintenir l'homéostasie intestinale entre le microbiote et le système immunitaire. _____	54
<b>Figure 17</b> : Reconnaissance du microbiote intestinale par la CEI, voie de signalisation et réponse de la CEI. ____	56
<b>Figure 18</b> : Les cellules épithéliales intestinales régulent l'immunité innée et adaptative. _____	59
<b>Figure 19</b> : L'inflammation intestinale est médiée par une dysbiose et un dysfonctionnement de la barrière intestinale. _____	63
<b>Figure 20</b> : Représentation sous la forme de frise chronologique des différentes découvertes majeures sur la super famille des récepteurs nucléaires. _____	65
<b>Figure 21</b> : Évolution des récepteurs nucléaires selon les organisme vivant, leur nombre et leur action. ____	66
<b>Figure 22</b> : Ensemble des 48 récepteurs nucléaires caractérisés chez l'homme. _____	68
<b>Figure 23</b> : Représentation de plusieurs récepteurs nucléaires. ER= Récepteur aux oestrogènes, PR= Récepteur aux progestérones, GR: Récepteur aux glucocorticoïdes, VDR: Récepteur à la vitamine D, RAR: Récepteur à l'acide rétinoïque, PPAR: récepteur activé par les proliférateurs aux péroxisomes. _____	69
<b>Figure 24</b> : Représentation de l'organisation structurale spécifique des récepteurs nucléaires. _____	70
<b>Figure 25</b> : Représentation des différentes box P, D, T, A sur le domaine fixant l'ADN d'un récepteur nucléaire. _____	71
<b>Figure 26</b> : Représentation des 12 hélices composant le domaine LBD. _____	73
<b>Figure 27</b> : Représentation de différents ligands des récepteurs nucléaires. _____	74
<b>Figure 28</b> : Exemple de SNuRM : les SPPARMs. _____	78
<b>Figure 29</b> : Représentation des différentes configurations possibles de la fixation des récepteurs nucléaires : en monomère, homodimère, hétérodimère et les différents éléments de réponses (Pal = palindromes= inversées ; DR= Direct repeat = répétitions directes ; IP = Inverted palindrome = répétitions indirectes). _____	81
<b>Figure 30</b> : Représentation des activateurs p160 et p300. _____	82
<b>Figure 31</b> : Représentation du corépresseur NCoR . _____	82
<b>Figure 32</b> : Activité transcriptionnelle ou répressive d'un récepteur nucléaire en présence de corépresseur ou de co-activateurs. _____	83
<b>Figure 33</b> : Représentation d'un récepteur aux androgènes avec les différents sites de phosphorylation (P), de SUMOylation (SUMO), acétylation (Ac). _____	84
<b>Figure 34</b> : Illustration de l'effet non-génomique du récepteur nucléaire à l'oestradiol. _____	85
<b>Figure 35</b> : Représentation tridimensionnelle du site de liaison du ligand de chaque sous-type de PPAR : PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ et PPAR $\gamma$ . _____	86
<b>Figure 36</b> : Différentes actions des récepteurs PPARs sur la transcription. (A) Répression de gènes cibles de PPARs en l'absence de ligand. (B) Activation ligand dépendant de gènes cibles par l'hétérodimère RXR-PPAR. (C) Transrépression de PPAR sur d'autres facteurs de transcription. _____	88

<b>Figure 37</b> : Agoniste naturel de PPAR $\alpha$ .	88
<b>Figure 38</b> : Agonistes synthétiques de PPAR $\alpha$ dont des molécules de la famille des fibrates.	89
<b>Figure 39</b> : Ligands naturels de PPAR $\beta/\delta$ .	90
<b>Figure 40</b> : Représentation des 7 transcrits de PPAR $\gamma$ et des 3 protéines de PPAR $\gamma$ .	91
<b>Figure 41</b> : Agonistes naturels de PPAR $\gamma$ .	92
<b>Figure 42</b> : Molécules composant la famille chimique « Glitazones ».	93
<b>Figure 43</b> : Représentation des molécules du 5-ASA et du GED-0507-34.	94
<b>Figure 44</b> : (A) Représentation de l'ADN codant la TSLP (vert) et les 2 transcrits : le variant 1 de la TSLP avec ses 4 exons (bleu) et le variant 2 de la TSLP avec ses 2 exons (bleu). (B) Séquence des acides aminés de la TSLP 1 et TSLP 2.	100
<b>Figure 45</b> : Les différents lieux de fixation des facteurs de transcription agissant sur les promoteurs de la TSLP 1 et de la TSLP 2 chez l'homme.	110
<b>Figure 46</b> : Représentation du récepteur à la TSLP constitué du TSLPR et de l'IL-7R $\alpha$ .	111
<b>Figure 47</b> : Phosphorylation de STAT5 au niveau des cellules dendritiques en présence de TSLP 1, TSLP 2 et TSLP 1+2.	111
<b>Figure 48</b> : Réponse cellulaires à la TSLP	117
<b>Figure 49</b> : Rôles de la TSLP dans l'intestin d'après Takai	124
<b>Figure 50</b> : La CEI ne sécrète pas la même isoforme de TSLP selon le contexte	125
<b>Figure 51</b> : Représentation schématique des compartiments accessibles grâce à la technique de culture cellulaire sur filtre Transwell®	130
<b>Figure 52</b> : Représentation schématique des 1000 premières paires de base en amont du point d'initiation à la transcription du gène codant la TSLP 2 et des différentes amorces utilisées lors des expériences de ChIP.	143
<b>Figure 53</b> : Le niveau d'expression de PPAR $\gamma$ est significativement diminué dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$ .	148
<b>Figure 54</b> : Niveau d'expression de différents gènes de cytokines anti-inflammatoires et pro-inflammatoires et de récepteurs.	150
<b>Figure 55</b> : La diminution d'expression de PPAR $\gamma$ dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$ est associée à une diminution d'expression de la TSLP.. L'antagonistes de PPAR $\gamma$ (GW9662) diminue l'expression du gène codant la TSLP dans les cellules Caco-2.	151
<b>Figure 56</b> : Les agonistes PPAR $\gamma$ augmentent l'expression du gène codant la TSLP dans les cellules Caco-2, T84	152
<b>Figure 57</b> : Effets des agonistes de PPAR $\gamma$ sur les cellules ShLuc et ShPPAR $\gamma$ .	153
<b>Figure 58</b> : L'expression de la TSLP 1 est détectée et induite par l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly I:C) dans les cellules épithéliales bronchiques H292.	155
<b>Figure 59</b> : Les agonistes PPAR $\gamma$ augmentent uniquement l'expression du gène codant la TSLP 2 dans les cellules Caco-2, T84.	157
<b>Figure 60</b> : (A) Les agonistes PPAR $\gamma$ augmentent l'expression protéique de la TSLP 2 dans les cellules Caco-2. (B) La diminution du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$ diminue l'expression de la TSLP 2.	158
<b>Figure 61</b> : L'agoniste de PPAR $\gamma$ augmente significativement l'expression du gène codant la TSLP 2 dans les cellules Caco-2 polarisées et la diminution d'expression de PPAR $\gamma$ dans les Caco-2 ShPPAR $\gamma$ est associée à la diminution d'expression de la TSLP 2.	159
<b>Figure 62</b> : (A) Représentation des mille premières paires de base en amont du point d'initiation à la transcription du gène codant la TSLP 2. (B) PPAR $\gamma$ se fixe sur un élément de réponse du promoteur en amont du gène codant la TSLP 2 dans les cellules contrôles et les cellules traitées par GED 30 mM.	161
<b>Figure 63</b> : (A) Représentation schématique des deux vecteurs lors des différentes transfections transitoires dans le cadre de l'étude du gène rapporteur. (B) Les cellules transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc présentent une activité significativement plus importante que les cellules transfectées par le vecteur pGL4-Luc. Le traitement par les agonistes de PPAR $\gamma$ augmente significativement l'activité de la luciférase sur les cellules transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc.	163
<b>Figure 64</b> : (A) Les cellules transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc $\Delta$ 1 ont une activité de la luciférase significativement plus faible que les cellules transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc et les agonistes de PPAR $\gamma$ n'ont pas d'effet sur l'activité de la luciférase.	165
<b>Figure 65</b> : Une diminution de l'expression de la TSLP 2 est observée dans les muqueuses saines et lésées et dans les cellules épithéliales coliques de patients atteints de RCH.	167
<b>Figure 66</b> : Les agonistes PPAR $\gamma$ augmentent l'expression du gène codant la TSLP dans les côlons murins.	170

<b>Figure 67</b> : L'antagoniste de PPAR $\gamma$ diminue l'expression du gène codant la TSLP dans les muqueuses coliques murines. _____	171
<b>Figure 68</b> : Les agonistes de PPAR $\gamma$ n'augmentent pas significativement l'expression du gène codant la TSLP dans les côlons murins. _____	172
<b>Figure 69</b> : L'antagoniste de PPAR $\gamma$ ne diminue pas l'expression du gène codant la TSLP dans les muqueuses coliques murines. _____	173
<b>Figure 70</b> : La TSLP 2 a uniquement une activité antimicrobienne faible au niveau des souches bactériennes gram+. _____	177
<b>Figure 71</b> : Synergie d'action entre la TSLP 2 et le LL-37 sur la souche 16148 de <i>C. perfringens</i> . _____	180
<b>Figure 72</b> : Synergie d'action entre la TSLP 2 et le LL-37 sur la souche 16148 de <i>C. perfringens</i> . _____	181
<b>Figure 73</b> : Synergie d'action entre la TSLP 2 et le LL-37 sur la souche LF82 d' <i>E. coli</i> adhéro-invasive. _____	182

# Abréviations

5-ASA= 5-aminosalicylate  
15d-PJ2= 15-dexoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J<sub>2</sub>  
ADN= Acide désoxiribonucléique  
AF= Fonction activatrice  
AIEC= Adherent Invasive Escherichia coli  
AMP= *Antimicrobial peptide* (peptide antimicrobien)  
ANCA= Auto-anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles  
AP-1= *Activator Protein-1*  
APRIL= *A proliferation-inducing ligand*  
AR= *Androgen Receptor*  
ASCA= Anticorps anti-Saccharomyces cerevisiæ  
ASMR = Amélioration du service médical rendu  
ARNm= Acide ribonucléique messenger  
ARNr= Acide ribonucléique ribosomal  
AVC= Accident cardio-vasculaire  
BAFF= *B cell-activating factor*  
CAR= *Constitutive androstane receptor*  
CDH1= Cadhérine E  
CEI= Cellule épithéliale intestinale  
ChIP= Immunoprécipitation de la chromatine  
CLR= *C-type lectin-like receptors*  
COUP-TF= *chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor*  
CRP= Protéine C réactive  
DAX-1= *dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*  
DBD= *Domain Binding DNA*  
DMEM= *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DR= *Direct Repeat*  
DSS= Dextran Sodium Sulfate  
ER= *Estrogen Receptor*  
ERR= *oestrogen-receptor-related*  
FDA= *Food and Drug Administration*  
FUT 2= *Fucosyltransferase 2*  
GCNF 1= *Germ Cell Nuclear Factor 1*  
GR= *Glucocorticoid Receptor*  
HAS= Haute autorité de santé  
Hath 1= *Helix-loop-helix transcription factor 1*  
HDL= *High Density LipoProtein*

HNF4A= *hepatocyte nuclear factor 4 alpha*  
HRE= *Hormon Response Element*  
IDM= infarctus du myocarde  
IgA= Immunoglobuline A  
IKKgamma= *IKappaB Kinasegamma*  
IL= *Interleukine*  
IRM= Imagerie à résonance magnétique  
JAK= Janus Kinase  
J11-Cl= 2-hydroxyethyl 5-chloro-4,5-didehydrojasmonate  
KLF4= *Kruppel-like factor 4*  
kDa= *KiloDalton*  
LBD= Ligand binding Domain  
LDL= *Low Density LipoProtein*  
LPS= lipopolysaccharide  
LXR= *Liver X factor*  
Lypd 8= *Ly6/PLAUR domain containing 8*  
MC= Maladie de Crohn  
MICI= Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin  
MR= *Mineralocorticoid receptor*  
MUC 2= Mucine 2  
NHBE= *Normal Human Epithelial Cells*  
NF- $\kappa$ B= *Nuclear Factor-kappa B*  
NGFI-B= *Nerve Growth Factor IB*  
NKT= Lymphocyte T Natural Killer  
NLR= *NOD-like receptors*  
NCoR= *Nuclear receptor Co-Repressor*  
NOR 1= *Neuron-derived Orphan Receptor 1*  
NURR 1= *Nuclear Receptor Related 1*  
PAMP= *Pathogen Associated Molecular Pattern*  
PAR-2= *Protease-Activated Receptor-2*  
PBMC= *Peripheral blood mononuclear cell*  
PPAR= Peroxisome Proliferator Activated Receptor  
PPRE= Peroxisome proliferator response element  
PR= *Progesterone receptor*  
PRR= *Pattern Recognition Receptor*  
PXR= *Pregnane X Factor*  
RAR= Récepteurs à l'acide rétinoïque  
RCH= Rectocolite hémorragique  
REGIII $\gamma$ = *Regenerating islet-derived protein III $\gamma$*   
RELM $\beta$ = *Resistin-like molecule- $\beta$*   
RLR= *RIG-I-like receptors*  
ROR= Récepteur des rétinoïdes  
ROS= *Reactive oxygen species*  
RXR= *Retinoid X receptor*

SARM= *Selective Androgen Receptor Modulator*  
SERM= *Selective Estrogene Receptor Modulator*  
SHP= *Small Heterodimer Partner*  
SNuRM= *Selective Nuclear Receptor Modulator*  
SPPARMS= *Selective PPARs Modulators*  
TARC= *thymus end activated chemokine*  
TFF3= *Trefoil Factor 3*  
TLR= *Toll-like receptors*  
TNF= *Tumor Necrosis Factor*  
TR= *Thyroid Receptor*  
TSLP= *Thymic Stromal Lymphopoeitin*  
TSLP 1= *Thymic Stromal Lymphopoeitin isoform 1*  
TSLP 2= *Thymic Stromal Lymphopoeitin isoform 2*  
TSLPR= *TSLP Receptor*  
TZD= *Thiazolidine-2,4-diones*  
VLDL= *Very Low Density LipoProtein*  
VDR= *Vitamin D Receptor*  
VS= *Vitesse de sédimentation*  
TMF= *Transplantation de microbiote fécal*  
TGF $\beta$ = *Transforming growth factor- $\beta$*

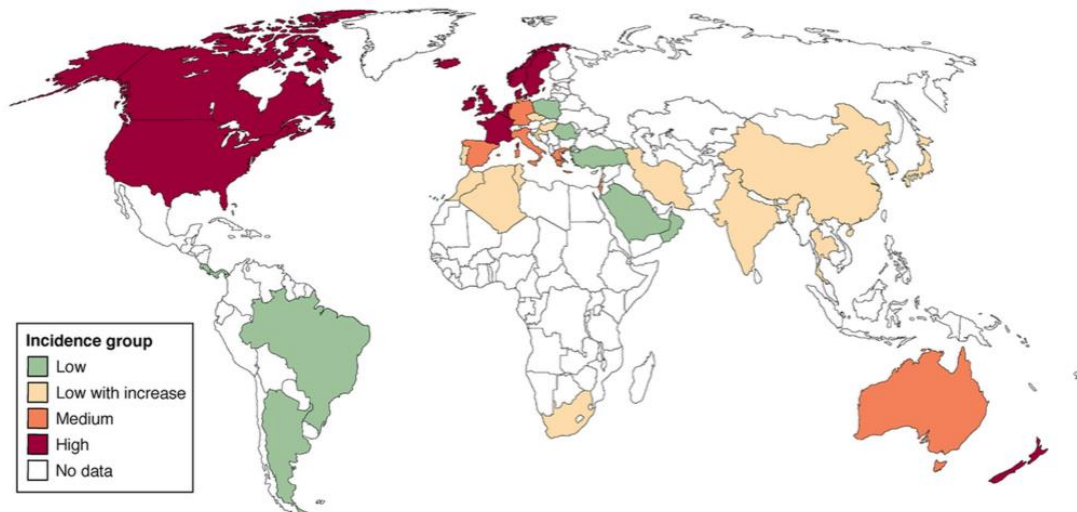
# Introduction

## La rectocolite hémorragique

### I. Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), représentées par la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC), sont caractérisées par une inflammation chronique de la muqueuse intestinale. Cette inflammation inappropriée est liée à une hyperactivité du système immunitaire digestif. Elles touchent le plus souvent les adultes jeunes et évoluent par poussées entrecoupées de rémissions plus ou moins prolongées selon les patients. Toutefois elles peuvent intervenir à tout âge et 15% des cas concernent des enfants. Leur fréquence est très variable selon les pays. Les pays industrialisés (Europe du Nord-Ouest et USA) comptent parmi les pays avec les taux les plus importants. Chaque année en France, ce sont entre 5 à 10 nouveaux cas de MC et autant de RCH qui sont diagnostiqués pour 100 000 habitants (**Figure 1**) (Cosnes et al., 2011). Les dernières données de prévalence pour la RCH montrent une augmentation de cette dernière. Ainsi, on dénombre 19,2 cas pour 100 000 habitants aux USA, 24,3 cas pour 100 000 habitants en Europe du Nord et 4,6 cas pour 100 000 habitants en Asie (Ng et al., 2016). Au niveau des pays en cours de développement (pays du Maghreb, Afrique du Sud...), cette prévalence augmente de façon exponentielle (Kaplan and Ng, 2017).





**Figure 1 :** Représentation de l'incidence des MICI selon les pays. En rouge, l'incidence est supérieure à 10 cas pour  $10^5$  habitants ; en orange, l'incidence est de 5-10 cas pour  $10^5$  habitants ; en vert, l'incidence est inférieure à 4 cas pour  $10^5$  habitants ; en jaune, l'incidence est faible mais en constante augmentation. Les pays pour lesquels les données sont absentes sont en blanc (Cosnes et al., 2011).

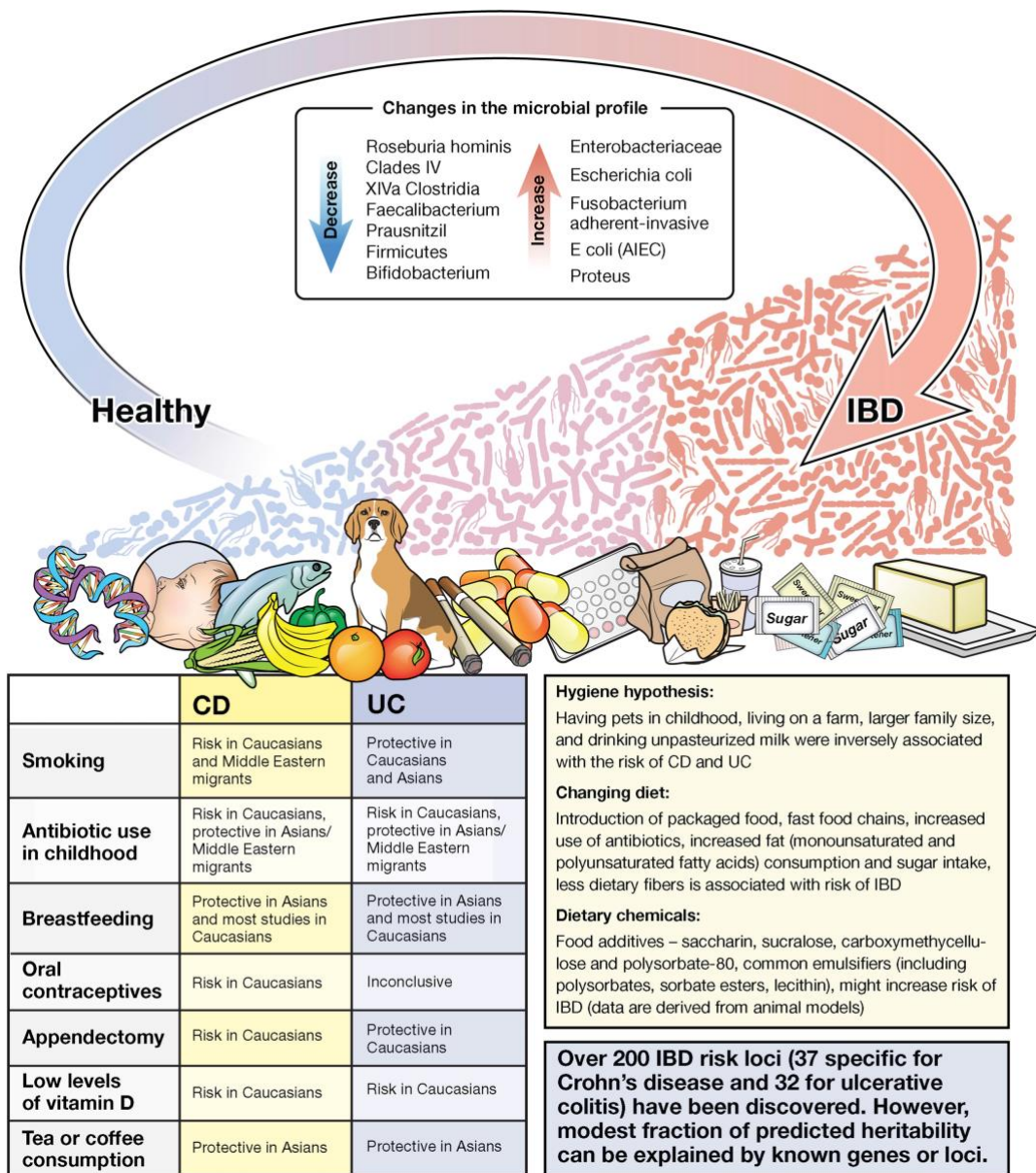
La physiopathologie, probablement multifactorielle, fait intervenir des facteurs génétiques, microbiens, environnementaux et immunologiques (Abraham and Cho, 2009). En effet, plusieurs facteurs de risques sont suspectés :

- Facteurs génétiques : 38 nouveaux loci associés aux MICI ont été récemment découverts, ce qui porte le nombre de gènes de prédisposition aux MICI à près de 200 gènes (Liu et al., 2015) (**Figure 2**). Parmi tous ces gènes, 32 sont spécifiques de la RCH dont HNF4A (*hepatocyte nuclear factor 4 alpha*) et CDH1 (Cadhérine E) (Jostins et al., 2012; UK IBD Genetics Consortium et al., 2009). La mutation du gène NOD2/CARD15 multiplierait par 40 le risque de développer une MC. Les MICI ne sont pas des maladies génétiques à proprement parler mais il existe une susceptibilité génétique pour ces maladies. En effet, il n'y a pas de transmission directe de la maladie des parents aux enfants. Cependant ces maladies peuvent toucher plusieurs membres d'une même famille. Le pourcentage de forme familiale varie entre 5 et 20%<sup>1</sup>. Concernant la RCH, la population d'origine juive a une incidence plus élevée (5 à 6 fois plus que le reste de la population) (Ananthakrishnan, 2015; Bernstein et al., 2006). Les personnes ayant des gènes de « susceptibilité » ont plus de risques que les autres à contracter une RCH : on parle de prédisposition génétique.

<sup>1</sup> [www.orpha.net](http://www.orpha.net)

- Facteurs environnementaux : la part environnementale tient une place plus que prépondérante dans les facteurs de risque. Il suffit d'observer la prévalence entre les pays industrialisés et les pays en voie de développement pour en être convaincu. Autre argument en faveur de l'environnement : en France comme en Europe, il existe un gradient Nord/Sud, avec une prévalence plus importante dans le nord (Haut de France) que dans le sud. Le régime alimentaire peut être mis en relation avec ce gradient. En effet, les habitudes alimentaires dans le nord de la France reposent sur une consommation riche en bières, beurres, œufs et pommes de terre alors que dans le sud de la France, les habitants consomment plus de fruits, légumes, poissons, huile d'olive et du vin (Perrin et al., 2005). Différents facteurs sont inversement associés au risque de MC ou de RCH. Ainsi, être en contact avec des animaux dans sa jeunesse, vivre à la ferme, boire du lait non pasteurisé limiteraient ce risque (Bernstein et al., 2006; Frolkis et al., 2013) (**Figure 2**). La pollution, avec les micro-particules, les métaux lourds (aluminium) ou encore le tabac pourraient être responsables de la survenue des MICI. Néanmoins, il existe une particularité avec le tabac. En effet, les personnes fumeuses ont moins de risque de développer une RCH alors que la MC est exacerbée lorsque le patient fume. Il y aurait donc un effet « protecteur » de la cigarette pour les patients susceptibles de contracter une RCH. Cependant, très récemment, une méta-analyse montrerait que le tabac n'est pas aussi protecteur qu'on pourrait l'envisager, sur le risque de développement de RCH (To et al., 2016).

- Microbiote intestinal : très longtemps délaissé et mal connu, de nombreuses études montrent aujourd'hui que le microbiote intestinal agirait comme un organe à part entière (Seksik and Landman, 2015). Un déséquilibre de ce dernier pourrait être le point de départ des MICI. L'une des hypothèses la plus communément admise pour expliquer l'origine des MICI est la rupture d'un équilibre essentiel au niveau de l'intestin : la tolérance orale. Sous l'influence de divers facteurs génétiques et environnementaux, il y aurait un déséquilibre de ce microbiote qui provoquerait ensuite une perte de tolérance vis à vis de cette flore commensale et l'initiation et le maintien d'une réaction inflammatoire non appropriée (**Figure 2**). Parmi les bactéries du microbiote pouvant être responsables des MICI, sont retrouvées les AIEC (*Adherent Invasive Escherichia coli*), sous-types d'*Escherichia coli*, qui sont plus adhérentes aux cellules de la paroi intestinale mais également plus invasives (Smith et al., 2013).



**Figure 2 :** Les facteurs génétiques, environnementaux et le microbiote intestinale des MICI (IBD= Inflammatory Bowel Disease) : RCH (UC= Ulcerative Colitis) et MC (CD= Crohn Disease) (Kaplan and Ng, 2017)

## II. La rectocolite hémorragique

### A. Généralités

La rectocolite hémorragique touche environ 40 000 personnes en France. Cette maladie survient à tout âge, avec une majorité des cas chez l'adulte jeune (20-30 ans). Elle touche aussi bien les femmes que les hommes. La fréquence est plus élevée chez la population d'origine européenne et plus particulièrement dans la communauté juive<sup>2</sup> (Ananthakrishnan, 2015; Bernstein et al., 2006).

### B. Manifestations cliniques

Contrairement à la MC pour laquelle l'inflammation de la paroi du tube digestif peut toucher l'ensemble du tractus digestif (de la bouche à l'anus), la RCH atteint constamment le rectum et s'étend de manière plus ou moins continue et plus ou moins haut vers le côlon droit, respectant l'intestin grêle.

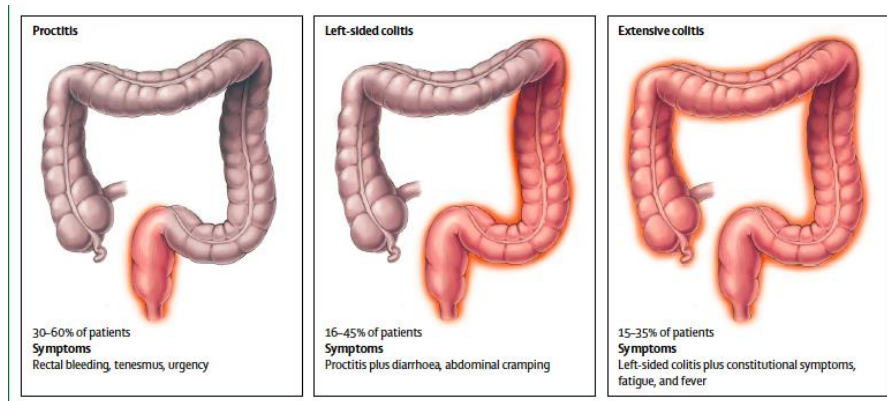
Elle peut se développer sous trois formes différentes (**Figure 3**)<sup>3</sup> :

- la **colite distale** (60 % des cas) atteint le rectum et la région du sigmoïde
- la **colite latérale gauche** (16-45 % des cas) entraîne des lésions plus étendues que la RCH distale, mais n'affecte pas l'intégralité du côlon.
- la **RCH pancolique** (15-35 % des cas) touche aussi le rectum et la totalité du côlon.

---

<sup>2</sup> [www.orpha.net](http://www.orpha.net)

<sup>3</sup> [www.orpha.net](http://www.orpha.net)



**Figure 3** : Représentation d'une colite distale, latérale gauche et une pancolite (Ungaro et al., 2017).

Les phases de poussées se caractérisent par différentes manifestations digestives et extra-digestives. Les symptômes sont très variables d'un individu à un autre et dépendent beaucoup de l'étendue de l'inflammation (rectite, proctite ou pancolite).

### 1. Manifestations digestives

Les principales manifestations digestives sont l'abondance de selles/diarrhées accompagnées de sang et de glaires. On parle de selles glairo-sanglantes. Lors de l'inflammation des muqueuses coliques, ces dernières sont fragilisées et sont le siège de petites ulcérations et d'hémorragies. Encore une fois, la gravité de la maladie influence la fréquence d'émissions de selles. Si l'inflammation a atteint le côlon gauche, la fréquence de selles sera de 4-6 selles par jour alors qu'en cas de pancolite, la fréquence augmente à 15-20 selles par jour. Dans les formes graves de la maladie, qui touchent environ 1 malade sur 10, les patients ne peuvent plus se retenir. Leur intensité peut imposer l'hospitalisation, l'arrêt de l'alimentation et un traitement par perfusion pendant quelques jours. En outre, l'évolution de la maladie peut entraîner le rétrécissement du segment intestinal atteint, puis une occlusion ou encore un abcès<sup>4</sup>. Ces diarrhées sont généralement associées à des douleurs abdominales intenses et des ténésmes (douleurs rectales).

<sup>4</sup> [www.orpha.net](http://www.orpha.net)

## **2. Manifestations extra-digestives**

Les manifestations extra-digestives, les plus fréquemment associées aux manifestations digestives sont la perte de poids et la fièvre lors des poussées. Mais il existe d'autres manifestations qui sont principalement dues à la réaction anormale du système immunitaire (Orpha.net, 2010). On retrouve ainsi :

- Des douleurs articulaires plus ou moins sévères qui s'accompagnent de gonflements des articulations atteintes (chevilles, genoux, poignets).

- Des atteintes de la peau sont aussi visibles chez certains patients. Ces atteintes se caractérisent par l'apparition de nodules douloureux et violacés (= érythèmes noueux) sous la peau des jambes et de lésions sur le tronc et les cuisses (ulcérations appelées *pyoderma gangrenosum*).

- Des inflammations des yeux et plus particulièrement au niveau de l'uvée (=uvéite). Cette partie de l'œil se situe entre l'enveloppe externe et la rétine et comprend entre autres l'iris. On observe dans ce cas, une rougeur de l'œil, une vision trouble et des douleurs oculaires.

- Des atteintes biliaires (plus rares que les autres, moins de 5 cas pour 100 patients) : l'atteinte est au niveau des canaux biliaires, on parle de cholangite sclérosante. Les manifestations, quand elles sont visibles, sont une fatigue, des démangeaisons ou encore une perte de poids. Une insuffisance hépatique peut apparaître (coloration jaune de la peau : ictère), ainsi qu'une hépatomégalie et une hypertension portale.

## **C. Evolution et complications de la RCH**

### ***1. Evolution de la RCH***

La rectocolite hémorragique est une maladie où les poussées et les phases de rémissions alternent. Ces phases peuvent durer quelques jours voire quelques années, selon les patients et leurs traitements. Certaines personnes n'auront qu'une seule poussée dans leur vie. Les poussées successives aggravent les lésions. Malheureusement, l'évolution de la maladie est totalement imprévisible.

Actuellement, la mortalité a énormément diminué pour les patients atteints de RCH grâce aux diagnostics, traitements et suivis de ces patients. Les grosses hémorragies, les complications infectieuses, les perforations coliques et les cancers colorectaux sont les principales causes de décès.

### ***2. Complication de la RCH***

Parmi les différentes complications on retrouve :

- Plaie sur l'anus (= fissures anales). Il n'y a pas de fistules contrairement à la maladie de Crohn.

- Le mégacôlon toxique (ou colectasie). Il s'agit d'une complication grave. Il survient généralement au cours d'une poussée aiguë. La colectasie est provoquée par une distension (ou dilatation) du côlon de façon exagérée. Les manifestations cliniques du mégacôlon toxique sont diverses. On retrouve une déshydratation importante (soif, diminution du volume urinaire, peau qui perd son élasticité), une diminution de la pression artérielle, une augmentation du rythme cardiaque, de la fièvre et des troubles de la conscience. Au cours de cette complication, il existe un risque de perforation du côlon et l'apparition d'une péritonite (inflammation de la membrane qui entoure les organes dans l'abdomen), dus à la fragilisation de la paroi colique par l'inflammation. A ce stade, le risque infectieux est très important et il y a urgence chirurgicale.

- La dernière complication est le surrisque de survenue d'un cancer colorectal. En effet, ce risque est plus élevé que pour le reste de la population. Il est augmenté chez les personnes ayant une pancolite et ayant leur maladie depuis de nombreuses années. Malheureusement ce risque est très difficile à estimer et augmente avec le temps : 2,5% entre 9 et 15 ans puis il atteint 21,4% au-delà de 15 ans d'évolution. Les patients sont suivis régulièrement afin d'être pris en charge rapidement si un cancer colorectal venait à apparaître (Nowacki et al., 2015).

## **D. Diagnostic de la RCH**

Il existe différents examens pour poser le diagnostic d'une rectocolite hémorragique. Parmi ces examens, on retrouve les examens cliniques, biologiques et les examens d'imagerie médicale. Les symptômes cliniques ont déjà été évoqués précédemment (diarrhée, douleurs abdominales, etc.). Lorsque ces symptômes sont présents chez un patient et qu'une RCH est suspectée, d'autres examens sont entrepris.

### ***1. Examens biologiques***

Les premiers examens réalisés sont une analyse des selles et une prise de sang.

#### ***Analyses des selles***

L'analyse des selles consiste à confirmer que les diarrhées n'ont pas une origine microbienne (bactérienne, virale, parasitaire). Elle permettra également de mettre en évidence la présence de sang, signe d'une hémorragie intestinale. La calprotectine est également dosée dans les selles. Cette protéine est produite par les leucocytes en cas d'inflammation. Ce marqueur sera augmenté chez les patients atteints de MICI contrairement à des maladies fonctionnelles comme le côlon



spastique (côlon irritable). Cet examen n'est pas prescrit systématiquement mais il peut être réitéré au cours de la prise en charge du patient afin d'évaluer l'efficacité du traitement mis en place.

## ***Analyses sanguines***

L'analyse sanguine va mettre en avant de nombreux signes évocateurs comme les signes d'inflammations : une hyperleucocytose et hyperthrombocytose, une vitesse de sédimentation (VS) augmentée, une augmentation de la Protéine C-Réactive (CRP) et une anémie (associée à une diminution des érythrocytes). Les anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiæ* (ASCA) (Main et al., 1988) et les auto-anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA), spécifiques des MICI, peuvent être également recherchés (Kyriakidi et al., 2016). Leur mise en évidence peut aider le médecin à poser le diagnostic. Plus de 65% des patients atteints de RCH ont l'ANCA. La prise de sang peut aussi montrer une dénutrition.

## ***2. Imagerie médicale / examens endoscopiques***

Les examens permettant de poser concrètement le diagnostic de RCH restent les examens endoscopiques. Il existe différents examens : la rectoscopie (le rectum), la sigmoïdoscopie (rectum et partie finale du côlon) et enfin la coloscopie (tout le côlon). Ces différents examens permettent de visualiser l'intérieur du rectum et/ou du côlon grâce à un endoscope (tube flexible) et d'apprécier la qualité de la paroi intestinale. Une muqueuse luisante, rouge et qui saigne facilement, est caractéristique d'une personne atteinte de RCH. Pour ce type d'examen, le patient doit rester à jeun le jour de l'examen.

Il est possible de faire des radiographies de l'abdomen sans préparation ou après un « lavement baryté ». Ces radiographies permettent de mettre en évidence la

présence de rétrécissements ou des dilatations du côlon. Les IRM (imagerie en résonance magnétique) peuvent être également utilisées.

### **3. Classement de gravité de la RCH**

La stratégie de traitement des patients RCH est fonction du type et de la sévérité de la maladie. Les médecins utilisent le score Mayo pour évaluer la sévérité de la maladie. Ce score se divise en deux sous-scores (Pineton de Chambrun et al., 2010).

Le premier est le sous-score clinique. Il va évaluer la sévérité clinique avec une évaluation de la fréquence des selles, de la présence de sang dans les selles et de l'observation globale du médecin. Ces trois évaluations sont notées entre 0 et 3. Si le score final est inférieur à 2, la maladie est considérée inactive ; entre 2 et 4, la maladie est faible ; entre 5 et 6, elle est modérée et entre 7 et 9, la sévérité de la maladie est jugée sévère.

Le deuxième sous-score va permettre d'évaluer la sévérité endoscopique. Comme les précédentes évaluations, elle varie entre 0 et 3. Un score de 0 signifie que l'intestin est normal ou que la RCH est inactive ; un score de 1 : RCH légère (érythème, réduction du réseau vasculaire, légère friabilité) ; score de 2 : RCH modérée (érythème marqué, absence de réseau vasculaire, friabilité, érosions) ; score de 3 : RCH sévère (saignements spontanés, ulcérations).

Par la suite, les deux sous-scores sont additionnés et les médecins ont un score final qui permet d'évaluer la sévérité globale de la maladie (score <2 : maladie inactive, entre 2 et 4 : faible, entre 5 et 10 : modérée et score >10 : sévère) et ainsi proposer un traitement adapté.

## **E. Traitements de la RCH**

Comme indiqué précédemment, il n'existe actuellement pas de traitement curatif pour la RCH. La plupart des médicaments sont prescrits afin d'atténuer la réaction inflammatoire, traiter les symptômes et diminuer les fréquences de rechutes. Le traitement mis en place est en fonction de la gravité de la maladie et doit être adapté à chaque patient. Les traitements différeront selon si le patient est en phase de rémission ou en poussée<sup>5</sup>.

### **1. Les traitements anti-inflammatoires**

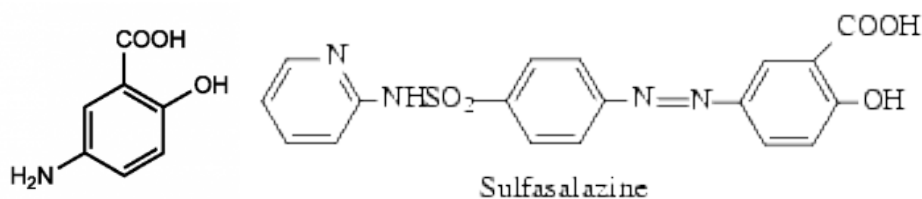
#### ***Les dérivés salicylés***

La mésalazine (5-aminosalicylate ou 5-ASA) et la sulfasalazine sont les traitements de première intention pour la RCH (**Figure 4**). L'action du 5-ASA est topique et ne passe pas par la voie systémique. Ces médicaments sont capables de contrôler les symptômes au cours d'une poussée. La mésalazine est également prescrite au long cours comme un traitement d'entretien afin de diminuer l'apparition de poussées. Le 5-ASA est prescrit pour les formes mineures et modérées de la RCH.

Comme tout traitement, ces médicaments ont certains effets indésirables (nausées, vomissements, brûlures d'estomac, maux de tête) mais ceux-ci ne justifient pas un arrêt de traitement. La mésalazine sera préférée à la sulfasalazine car elle provoque moins d'effets indésirables. Ses médicaments sont disponibles sous différentes formes pharmaceutiques afin de convenir au mieux aux patients : comprimés, granulés, suppositoires et lavements. Certaines spécialités pharmaceutiques sont à délitement chrono-dépendant et indifférentes au pH (Pentasa<sup>®</sup>) et d'autres sont pH dépendante (Rowasa<sup>®</sup>) ou encore gastro-résistant (Fivasa<sup>®</sup>).

---

<sup>5</sup> guide\_medecin\_rch\_web.pdf



**Figure 4** : Représentation de la mésalazine et de la sulfasalazine.

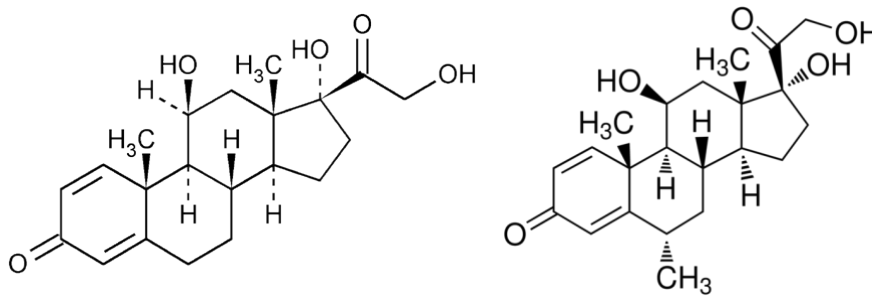
### **Les corticoïdes**

Les corticoïdes (prednisolone et méthylprednisolone) ne sont pas utilisés d'emblée (**Figure 5**). Ils sont généralement prescrits pour les formes sévères et uniquement quand les précédents traitements ne sont pas suffisamment efficaces. Ils réduisent l'inflammation avec plus de puissance et plus rapidement. Lorsqu'ils sont prescrits en cas de crises, ce n'est que pour une courte durée afin de pouvoir limiter les effets indésirables. En effet, cette classe de médicaments peut engendrer de nombreux effets indésirables : hypertension artérielle, trouble du sommeil et de l'humeur, risque accru d'infection, troubles digestifs, déminéralisation des os, troubles cutanés, perte de masse musculaire, prise de poids et gonflement du visage, troubles hormonaux. Ces traitements sont prescrits sous forme intra-veineuse, par voie orale ou encore par voie locale sous forme de lavement. Comme pour toute corticothérapie, l'arrêt du traitement doit se faire progressivement.

Il peut exister une corticorésistance et/ou une corticodépendance. En effet, dans certains cas, les malades ne répondent pas aux corticoïdes. Il n'y a pas vraiment de dose pour définir cette corticorésistance mais elle apparaît le plus souvent pour des doses comprises entre 15 et 20 mg/jour. On parle de corticodépendance dans 2 situations. Pour la première, le patient fait une rechute de la maladie lorsque les doses de corticoïdes sont diminuées. Pour la deuxième, une rechute est observée dans les 30 jours après l'arrêt de la corticothérapie.

L'ensemble de ces médicaments anti-inflammatoires nécessitent obligatoirement un suivi régulier des patients afin d'avoir une meilleure observance et

vérifier qu'ils supportent/tolèrent bien leur traitement. Ce type de traitement ne doit jamais être arrêté précipitamment.



**Figure 5 :** Représentation de la prednisolone et de la méthylprednisolone.

## 2. Les autres traitements

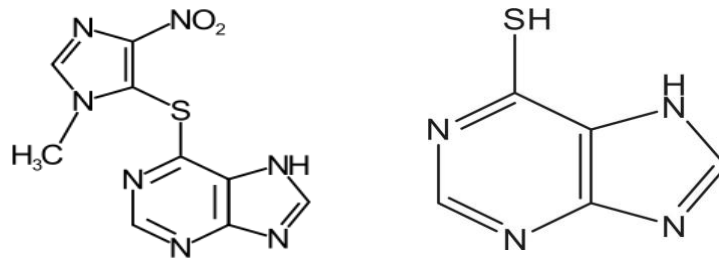
### *Les immunomodulateurs*

Les immunosuppresseurs occupent aujourd'hui une place importante dans le traitement des MICI. Leur efficacité est comparable que ce soit pour la MC ou la RCH. On estime à près de 56%, le nombre de patients traités actuellement par ces molécules. Les immunosuppresseurs et les traitements anti-inflammatoires permettent de diminuer les manifestations extra-intestinales de la RCH.

L'azathioprine (Imurel®) et la 6-mercaptopurine (Purinethol®) constituent un des traitements les plus efficaces pour prévenir les rechutes dans la RCH (**Figure 6**). Ces 2 molécules sont généralement prescrites pour les formes de RCH les plus évolutives et les plus difficiles à traiter (poussées fréquentes et/ou sévères), dépendantes ou résistantes aux corticoïdes. Il s'agit de molécules qui vont mettre beaucoup de temps à agir (3 à 6 mois) et avant de conclure à l'échec de ce type de traitement, le médecin s'assurera de l'observance du traitement durant 3 mois, à une posologie adaptée.

L'azathioprine est prescrit à une posologie de 2 à 2,5 mg/kg/24h. La 6-mercaptopurine, son métabolite actif est utilisé à une posologie moindre (1-1,5 mg/kg/24h). Ces molécules peuvent être prescrites en monothérapie ou en association

avec une corticothérapie au début, en attendant que le traitement soit efficace. Ces médicaments vont viser les cellules en division à renouvellement rapide (dont les cellules du système immunitaire) et donc provoquer certains effets indésirables : troubles digestifs, chute de cheveux temporaire, augmentation des risques infectieux, toxicité rénale (entraînant une insuffisance rénale), hypertension artérielle.



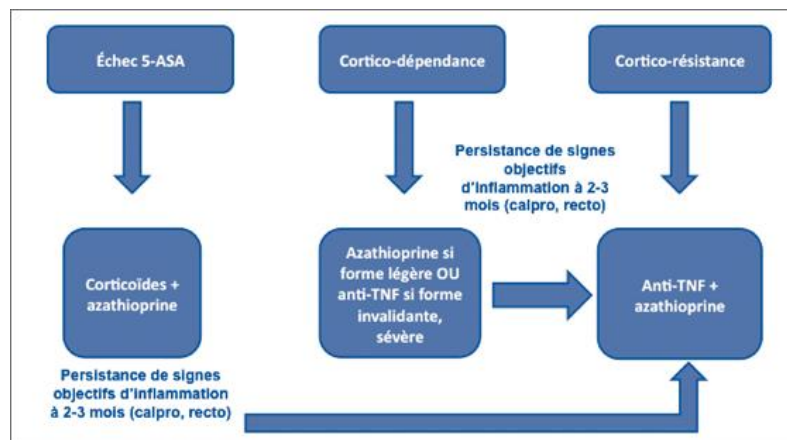
**Figure 6** : Représentation des molécules d'azathioprine et de 6-mercaptopurine.

### **Les biothérapies**

L'utilisation de biothérapies est envisagée chez les patients atteints de MICI, en cas d'échecs thérapeutiques des premières lignes de traitements. Parmi ces biothérapies, on retrouve les anti-TNF $\alpha$  dont l'infliximab (Remicade<sup>®</sup>), l'adalimumab (Humira<sup>®</sup>) et le golimumab (Simponi<sup>®</sup>). Ils sont indiqués uniquement chez les patients qui n'ont pas répondu de façon correcte aux autres traitements dont la corticothérapie et les immunomodulateurs (**Figure 7**). Ils sont également envisagés si les traitements précédents sont mal tolérés ou contre-indiqués. Dans certains cas (hypercorticisme, maladie invalidante), il est possible d'éviter les thiopurines (du fait de leur temps d'efficacité) pour débiter les anti-TNF. Il faut cependant signaler que 20% des patients ne répondent pas à ce type de traitement et 30% d'autres patients ont un risque de perdre la réponse souhaitée (Ben-Horin, 2014; Ungar and Kopylov, 2016; Ungar et al., 2014).

En janvier 2015, le vedolizumab (Entyvio<sup>®</sup>), anticorps monoclonal humanisé anti- $\alpha 4\beta 7$ , a obtenu l'AMM dans le traitement de la RCH mais également dans celui de la MC. Cet anticorps fait partie de la famille des anti-intégrines tout comme le

Natalizumab (Tysabri®). Ce traitement est proposé en cas d'échec thérapeutique avec les corticoïdes, les immunosuppresseurs et les anti-TNF. Les études ont montré que ce traitement induit une réponse clinique hautement significative, ainsi qu'une guérison des muqueuses chez les patients en échec thérapeutique en comparaison avec un placebo (phase 3 : GEMINI I) (Lam and Bressler, 2014). Cependant, aucune étude n'a encore montré la comparaison entre un traitement par vedolizumab et un traitement par anti-TNF. Ce traitement reste réservé à l'usage hospitalier et seuls les spécialistes en gastro-entérologie-hépatologie et médecine interne peuvent le prescrire. Il est souligné que le service médical rendu est insuffisant chez les patients naïfs de traitement anti-TNF mais il est important chez les patients en échec des corticoïdes, des immunomodulateurs et des anti-TNF. Chez les patients atteints de RCH modérée à sévère en échec thérapeutique, l'amélioration du service médicale rendu (ASMR) est considérée mineure (Commission de la transparence de l'HAS (Haute autorité de santé) concernant le vedolizumab, janvier 2015).



**Figure 7 :** Proposition d'un algorithme de traitement pour les patients atteints de RCH (Danese et al., 2013).

### **L'inhibiteur de JAK**

La dernière classe est représenté par les inhibiteurs de la JAK (Janus Kinase) 1 et 3. La molécule clé est le Tofacitinib. Elle va agir sur la prolifération, l'activation et la fonction des lymphocytes en inhibant la voie de signalisation JAK-STAT (Danese et

al., 2016). La *Food and Drug Administration* (FDA) a déjà approuvé cette molécule pour la polyarthrite rhumatoïde. Les études cliniques de phase 2 sur la RCH ont montré des résultats très intéressants (Sandborn et al., 2012).

Cette année, un ensemble de 3 études de phase 3 (appelés OCTAVE Induction 1 et 2, OCTAVE Sustain) ont été publiés. Il y avait 2 études qui observaient l'induction d'une rémission par le tofacitinib durant 8 semaines de traitement et 1 étude de thérapie de maintien d'une durée de 52 semaines. Les 3 études montrent que le taux de rémission de la maladie des patients ayant reçu le tofacitinib est significativement supérieur par rapport au groupe placebo (Sandborn et al., 2017). Cependant les effets indésirables sont plus présents dans les groupes ayant reçu le tofacitinib par rapport aux groupes placebo. Il est répertorié comme effets indésirables : une augmentation des lipoprotéines HDL et LDL cholestérol, une augmentation des infections et l'apparition de zona (Sandborn et al., 2017).

### ***Les traitements contre-indiqués***

Lors de la prise en charge thérapeutique d'un patient atteint de RCH, il est important de vérifier et de retirer tout médicament pouvant être néfaste pour le patient. Parmi ces médicaments, il est important de contre indiquer la classe des anti-diarrhéiques. En effet, le risque de mégacôlon toxique est accru avec ces médicaments. Une autre classe à éviter est la classe des anti-douleurs et en particulier des anti-inflammatoires non stéroïdiens, capables d'aggraver les symptômes de la RCH.

Il est donc important pour le patient de demander l'avis à son médecin ou son pharmacien avant l'introduction d'un nouveau médicament<sup>6</sup>.

---

<sup>6</sup> [www.orpha.net](http://www.orpha.net)

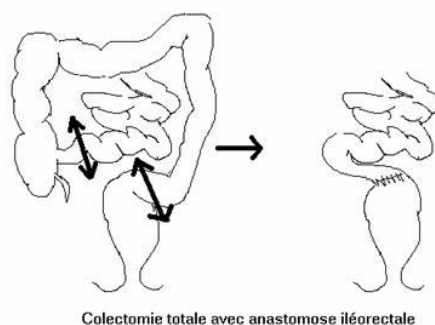


## Traitements chirurgicaux

Les traitements chirurgicaux sont envisagés en cas d'échec thérapeutique. Généralement, les personnes ayant recours à une intervention sont des patients atteints de formes sévères de RCH, de formes chroniques invalidantes ou en cas de complications sévères, citées précédemment. Ce ne sont pas loin d'un tiers des patients atteints de RCH qui ont recourt à la chirurgie. Cependant, ces interventions chirurgicales ne sont pas forcément adaptées à l'ensemble des individus. Il est demandé aux patients d'être parfaitement informés de ces chirurgies et des discussions doivent être entreprises avec tout le corps médical afin d'avoir un meilleur déroulement post-opératoire.

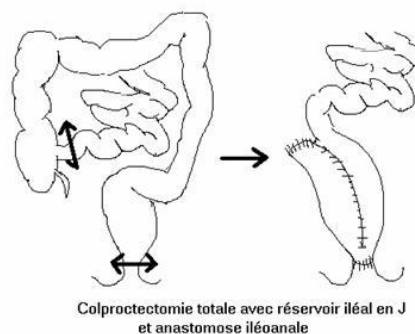
Il existe deux types d'intervention :

- La colectomie : suppression du côlon uniquement. L'intestin grêle est alors raccordé au rectum pour rétablir un transit intestinal normal. On parle d'anastomose iléo-rectale (**Figure 8**). Cette intervention sera préférée à la suivante pour les patients âgés ayant un problème de fonctionnement sphinctérienne, en cas de doute de MC ou encore les femmes en âges de procréer et désirant une grossesse (Mège et al., 2016).



**Figure 8:** Représentation d'une colectomie totale avec anastomose iléorectale. Société Nationale Française de Gastro-Entérologie.

- La coloproctectomie : suppression de la totalité des lésions. Le rectum et le côlon sont enlevés. Les patients ont ensuite une anastomose iléo-anale avec réservoir. Cette récente technique permet de reconstruire un réservoir, qui remplace le rectum, avec une partie de l'intestin grêle (**Figure 9**). Si le fait d'enlever la totalité du côlon supprime la pathologie, il existe malgré tout un risque d'inflammation du réservoir (pochite). Mais ce risque reste faible. L'anastomose iléo-anale avec réservoir en J est l'intervention de référence dans la RCH car elle permet d'arriver au double objectif de guérison de la maladie par ablation de la totalité de la muqueuse potentiellement malade, et de conservation de la fonction sphinctérienne. Pour cette raison, elle est faite (en 2 ou 3 temps opératoires) dans près 80 à 90% des RCH opérées (Mège et al., 2016).



**Figure 9:** Représentation d'une coloproctectomie totale avec réservoir iléal en J et anastomose iléoanale. Société Nationale Française de Gastro-Entérologie

Il est parfois nécessaire de recourir à une iléostomie de protection qui permettra l'évacuation des selles afin d'éviter le passage de ces dernières au niveau de l'anastomose, permettant ainsi une bonne cicatrisation.

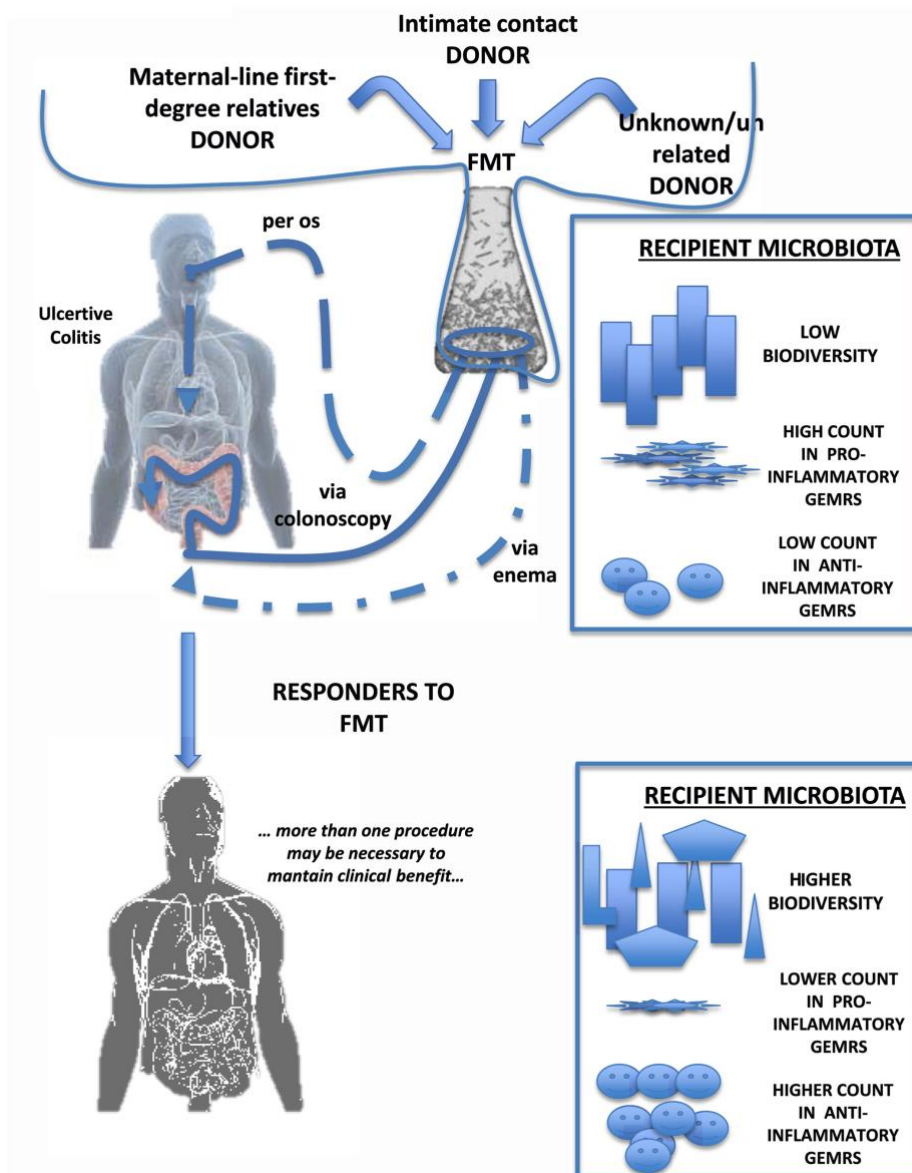
## **L'alimentation**

L'influence de l'alimentation au cours d'une RCH est un sujet encore très discuté (Marion-Letellier et al., 2016). Un régime « sans résidu » est conseillé en cas de poussée, afin de diminuer le nombre et le volume des selles. Ce régime diminue l'apport de fibres végétales ou animales. En dehors de poussée, le patient revient à

une alimentation normale. Il est conseillé de consommer du poisson vivant en eau froide (riche en acide gras de la famille des oméga-3 aux propriétés anti-inflammatoires). L'alcool et le café sont déconseillés au moment des poussées (Kaplan and Ng, 2017).

### ***Traitement à l'étude : la transplantation de microbiote fécal***

La transplantation de microbiote fécal (TMF) est un traitement reconnu pour son efficacité contre les infections à *Clostridium difficile* multirésistant (Khoruts and Sadowsky, 2016). De nombreuses études sont actuellement en cours afin de déterminer l'efficacité et l'innocuité d'un tel traitement pour des patients atteints de MICI et plus particulièrement de RCH (Pigneur and Sokol, 2016). Il en ressort que la TMF permet une réponse clinique dans environ 2/3 des cas (65%) et une rémission clinique dans 40 % des cas. Il est également noté une augmentation de la richesse et de la diversification de la flore intestinale du patient avec parfois un changement de cette flore (**Figure 10**). Malgré quelques effets indésirables, ce nouveau type de traitement pourrait être à l'avenir utilisé comme un traitement de référence pour alterner ou remplacer les traitements médicamenteux (Laszlo et al., 2016; Shi et al., 2016).



**Figure 10 :** Mécanismes d'action de la transplantation fécale chez les patients RCH (Scaldferrri et al., 2016).

### 3. Éducation thérapeutique

L'éducation thérapeutique doit être proposée aux patients atteints de MICI. Le pharmacien tient un rôle prépondérant dans cette éducation au même titre que ses confrères du corps médical. Cette éducation va permettre aux patients de mieux vivre via l'acquisition et le maintien de ses connaissances autour de sa maladie afin de mieux gérer sa vie. Ils vont participer activement à leur prise en charge. Ainsi les

patients participent à l'amélioration de leurs qualités de vie et à celles de leurs proches. Ils seront informés de sa maladie mais également des traitements prescrits et des effets indésirables possibles, des conséquences et des risques d'aggravations et de la façon de faire face aux périodes de poussées. L'accent sera aussi mis sur l'hygiène de vie et la nouvelle organisation de vie des patients.

Cette éducation thérapeutique a clairement pour but d'aider au mieux les patients à comprendre leur maladie, l'accepter et surtout à pouvoir mettre en évidence de possibles troubles ou signes et savoir les décrire à leur médecin ou leur pharmacien<sup>7</sup>.

#### ***4. Soutien psychologique***

La RCH reste une maladie grave de par son imprévisibilité, sa chronicité et ses risques de complications. L'ensemble peut engendrer chez les patients atteints de RCH un stress et une angoisse, deux facteurs reconnus pour déclencher des poussées. Un soutien psychologique est donc proposé pour ces patients, afin de maîtriser ces situations de stress, de paniques ou encore d'éviter un isolement social et psychologique. Ces périodes d'angoisse ne doivent jamais être sous-estimées par le corps médical ou l'entourage du patient. Ce soutien psychologique peut également être proposé au conjoint du patient. Il est également proposé en vu de traitements chirurgicaux<sup>8</sup>.

---

<sup>7</sup> guide\_patient\_rch\_ald24\_1dec.pdf

<sup>8</sup> www.orpha.net

# L'homéostasie intestinale

L'homéostasie vient du grec *hómoios*, « similaire » et *stásis*, « stabilité ». L'homéostasie est donc une notion d'équilibre. Ici, dans le tractus digestif et plus particulièrement dans l'intestin, un équilibre est nécessaire entre notre tractus digestif et le microbiote qui le colonise.

## Le Microbiote intestinale

Le tractus gastro-intestinal humain est l'une des plus grandes surfaces entre l'hôte et l'environnement. De plus, pour une durée de vie moyenne, l'être humain consommera environ 60 tonnes de nourriture, accompagnées d'une quantité très importante de microorganismes qui sera une menace pour l'intégrité intestinale.

L'ensemble des microorganismes (bactéries, virus, parasites, champignons) qui colonise le tractus digestif est appelé « microbiote intestinal ». Ce dernier est estimé à  $10^{14}$  bactéries et représente 10 fois la totalité des cellules qui composent un humain. Cependant, une étude a récemment revu à la baisse ce ratio et montre qu'il serait finalement de 1:1 (Sender et al., 2016). Ce microbiote offre de nombreux avantages à notre organisme. Il permet de renforcer l'intégrité de l'épithélium intestinal (Natividad and Verdu, 2013), de récolter de l'énergie (den Besten et al., 2013), de protéger des pathogènes (Bäumler and Sperandio, 2016) et de réguler l'immunité de l'hôte (Gensollen et al., 2016). Très longtemps négligé, il est maintenant considéré par certains comme un organe à part entière.

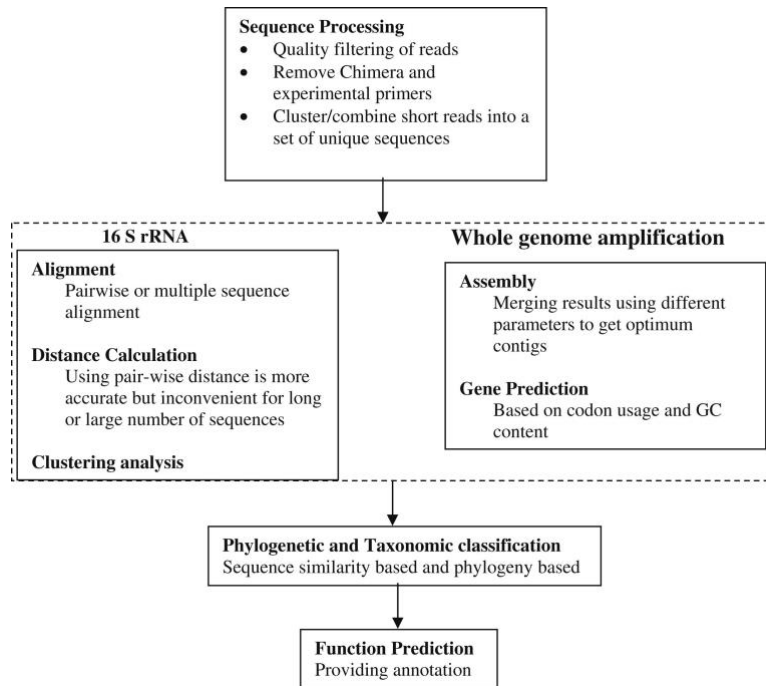
Lorsque ce microbiote est déstabilisé, on parle de dysbiose. Il est fréquemment montré que cet état de dysbiose est observé dans les maladies inflammatoires au niveau du tractus digestif (Chang and Lin, 2016; Schroeder and Bäckhed, 2016).

## **I. Technique d'analyse du microbiote intestinal.**

Il y a encore une dizaine d'années, les connaissances du microbiote fécal étaient pauvres, probablement dues à l'absence de techniques et d'outils adéquats. La plupart des découvertes de nouvelles espèces se faisait par des méthodes basées sur la culture en boîtes (Moore and Holdeman, 1974). Elle a permis d'identifier près de 500 espèces bactériennes dans l'intestin humain. Malheureusement, cette technique est insuffisante. En effet, 60 à 80% des micro-organismes intestinaux ne sont pas cultivables *in vitro* (Dave et al., 2012).

L'analyse de l'ARN ribosomal et plus particulièrement de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr 16S) a permis de caractériser les espèces bactériennes et de mettre en place la taxonomie bactérienne (Cole et al., 2007; Young and Schmidt, 2004) (**Figure 11**). L'ARNr 16S est présent chez les bactéries de manière ubiquitaire et présente une structure primaire mosaïque avec des régions conservées qui est commune à toutes les bactéries (Domaine Bacteria). On retrouve ensuite des régions variables qui permettent de classer les bactéries par groupe et des régions hypervariables qui sont spécifiques d'une espèce (Young and Schmidt, 2004). Cependant cette technique ne permet pas d'avoir d'information sur la physiologie bactérienne (DeLong and Pace, 2001).

Une dernière approche sur la composition des bactéries a été mise en place il y a maintenant quelques années. Il s'agit du séquençage complet du génome bactérien (Rondon et al., 2000) (**Figure 11**). A la différence de la technique de l'ARN 16S où environ 800 paires de bases étaient clonées et analysées, ici, l'ensemble du génome bactérien est séquencé et comparé avec des gènes précédemment caractérisés (DeLong and Pace, 2001). Cela permet donc mettre en évidence les capacités des bactéries isolées. Cette technique a permis, en plus d'identifier des espèces bactériennes rares, de découvrir les fonctions métaboliques ou biologiques des espèces constituant le microbiote (Bik et al., 2006).



**Figure 11** : Analyses et informations permettant de déterminer la composition bactérienne du microbiote : Analyse de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal ou amplification du génome complet des bactéries. (Dave et al., 2012).

## II. Développement du microbiote

Le développement du microbiote commence dès la naissance. Le tractus digestif est très rapidement colonisé. Cependant, ce dogme est contesté par quelques études qui démontrent que des microorganismes ont été détectés dans les tissus de l'utérus et dans le placenta (Aagaard et al., 2012; Rodríguez et al., 2015). Le microbiote semble aussi être affecté selon le mode d'accouchement lors de la naissance. En effet, les enfants nés par voie basse, ont, les premiers jours de leur vie, une population importante de lactobacilles au niveau de leur microbiote, reflet de la forte présence des lactobacilles de la flore vaginale (Aagaard et al., 2012; Avershina et al., 2014). Au contraire, les enfants nés par césarienne ont une flore pauvre en bacterioïdes et leur colonisation semble retardée alors que des bactéries anaérobies facultatives, comme les *Clostridium*, sont plus enclins à coloniser ces enfants (Jakobsson et al., 2014; Salminen et al., 2004).

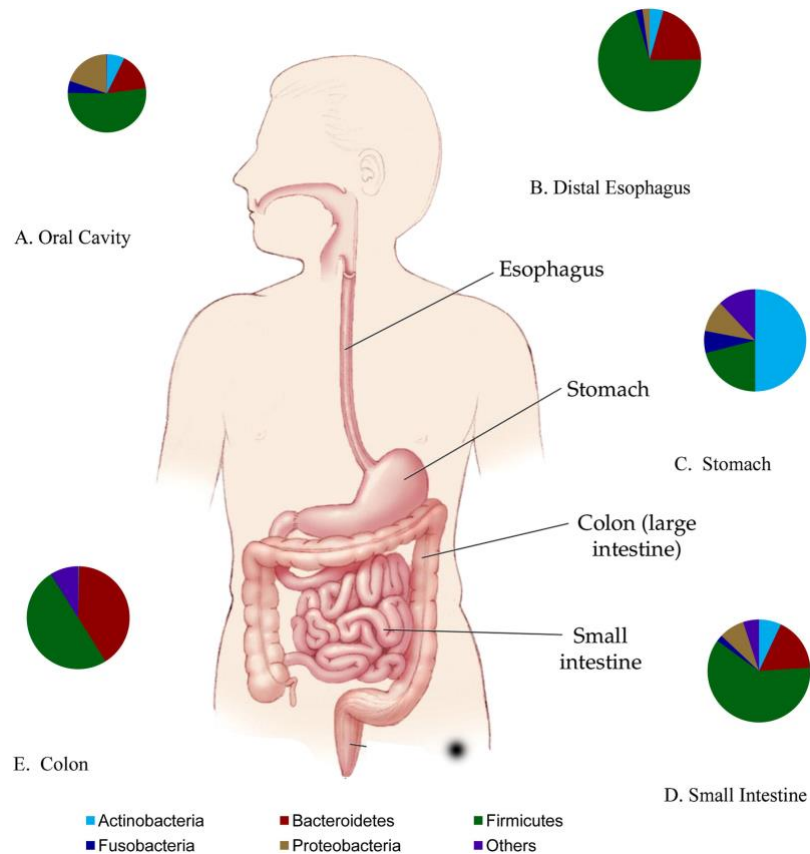


Le développement de ce microbiote évoluera durant l'enfance et l'adolescence et finira par se stabiliser à l'âge adulte. Ce développement sera perturbé tout au long de la vie par des événements aléatoires comme les changements alimentaires, les maladies ou encore la prise d'antibiotiques (Dethlefsen and Relman, 2011; Koenig et al., 2011; Rodríguez et al., 2015). Passer les 65 ans, la population bactérienne peut évoluer (Claesson et al., 2011) et la diversification diminuer (Biagi et al., 2010).

### **III. Composition et biogéographie du microbiote**

Les propriétés physiologiques du tractus digestif vont avoir un impact sur la composition du microbiote (Macpherson and McCoy, 2013). Pour illustrer ce propos : l'intestin grêle est un endroit acide, on y retrouve de l'oxygène, des peptides antimicrobiens et le transit est rapide. C'est donc un endroit défavorable pour la croissance microbienne, excepté pour les bactéries anaérobies facultatives, avec une croissance rapide et une capacité de fixation à la muqueuse (Donaldson et al., 2016). On retrouve une forte proportion de Firmicutes (plus de 50%), des Bacteroidetes, des Acinetobacteria, des Fusobacteria et Pretobacteria (**Figure 12**).

En revanche, au niveau du côlon, le lieu est plus propice aux développements microbiens avec très peu d'oxygène et une concentration élevée en hydrates de carbones complexes non digérés. Ceci va permettre une communauté bactérienne riche et dense, dominé par les anaérobies (Donaldson et al., 2016; Gu et al., 2013) (**Figure 12**). La composition du microbiote fécal (dans la lumière intestinale) est significativement différente du microbiote présent au niveau de la muqueuse intestinale (Eckburg et al., 2005; Lavelle et al., 2015). En effet, les Bacteroidetes sont plus représentées dans les échantillons de la lumière intestinale alors que ce sont les Firmicutes qui sont plus présents au niveau du mucus (Abbeele et al., 2013; Eckburg et al., 2005).



**Figure 12** : Les phyla dominant dans diverses localisations du tractus digestif de l'homme (Dave et al., 2012).

#### **IV. Facteurs importants pour le microbiote**

Les bactéries qui constituent le microbiote sont soumises à des exigences pour vivre dans l'intestin. Elles doivent s'adapter à la présence de divers produits biochimiques, la présence d'autres espèces bactériennes, la génération d'énergie par fermentation ou par réduction des sulfates de glucides. Les bactéries présentes dans l'intestin sont donc limitées par leur traits phénotypiques (Ley et al., 2006). On retrouve des facteurs extérieurs (nourriture, traitement, pollution) et des facteurs intérieurs (système immunitaire, mucus, etc). Comme vu précédemment, l'âge est également un facteur important pour la composition du microbiote.

Un des facteurs extérieurs influençant le microbiote est la nourriture. En effet, la composition de notre nourriture peut conditionner à une variation de notre microbiote (Kaplan and Ng, 2017). Tout régime alimentaire exerce un effet important sur le microbiote intestinal (Donaldson et al., 2016). Un régime extrême à « bases animales » ou à « bases végétales » entraîne d'importantes modifications (David et al., 2014). Les méthodes d'alimentation peuvent influencer la croissance de certaines bactéries. L'un des meilleurs exemples reste celui de l'allaitement maternel. Les oligosaccharides fucosylés sont abondants dans le lait humain et sont utilisés par les *Bifidobacterium* et plusieurs espèces de *Bacteroides*. Ces populations bactériennes se développent donc plus au détriment d'autres comme *Escherichia coli* ou *Costridium perfringens* (Marcobal et al., 2011; Yu et al., 2013). Les différentes études montrent que les enfants nourris au sein ont une population de *Bifidobacterium* plus importante que les enfants nourris aux laits artificiels. Ces derniers ont une flore intestinale plus diversifiée avec la présence d'*Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, Lactobacilles, *Bacteroides fragilis* (Bezirtzoglou et al., 2011; Favier et al., 2002; Marcobal et al., 2011; Penders et al., 2006; Yu et al., 2013). La sous-alimentation chez le nouveau-né provoque un microbiote immature et dysbiotique avec une augmentation des *Enterobacteriaceae* (Kau et al., 2015).

Les traitements antibiotiques constituent un autre facteur extérieur. Ces traitements peuvent perturbés le microbiote à court et long terme en altérant sa diversité (Dethlefsen and Relman, 2011; Jakobsson et al., 2010; Jernberg et al., 2007).

Les autres facteurs extérieurs sont divers, on peut retrouver le tabagisme, la chirurgie digestive, la dépression ou encore le mode de vie (urbain ou campagne) (Biedermann et al., 2013; Jiang et al., 2015; Rodríguez et al., 2015; Tyakht et al., 2013).

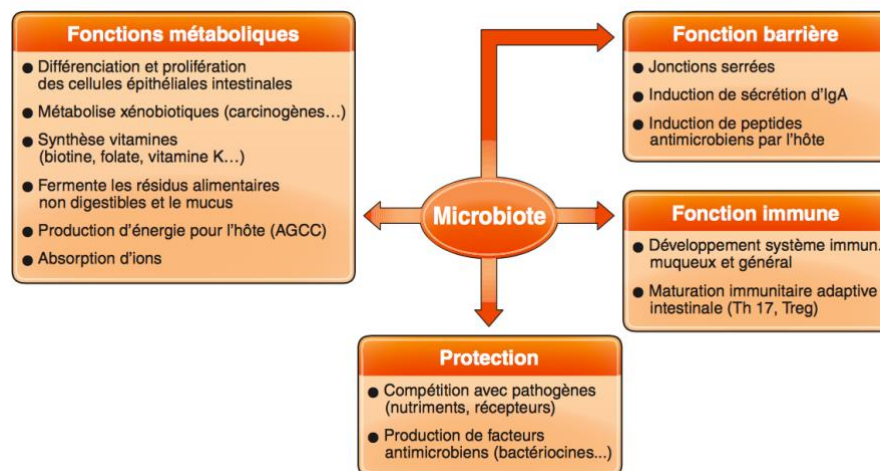
Notre muqueuse intestinale est également un important facteur pour le microbiote intestinal. En effet, elle joue différents rôles de barrières qui sont cruciaux pour le maintien de l'homéostasie. Elle a tout d'abord un rôle de barrière « physique » dynamique. Elle est capable de sécréter du mucus, associé à des sécrétions d'immunoglobulines A (IgA) et de peptides antimicrobiens pour combattre les bactéries pathogènes ou limiter le développement des bactéries commensales (Jandhyala et al., 2015; Mathias et al., 2014). Elles jouent également le rôle de barrière immunologique.

En effet, les cellules épithéliales intestinales vont interagir avec les cellules du système immunitaire pour maintenir l'homéostasie et combattre les agents pathogènes (**Figure 16 page 54**).

## V. Rôle du microbiote chez l'individu sain

Le microbiote joue un rôle crucial pour le bon fonctionnement du système immunitaire intestinal et le développement de la muqueuse intestinale. Des souris axéniques (stériles, sans microbiote) ont montré d'importantes carences dans divers types cellulaires immunitaires (dont les cellules lymphoïdes) (Mazmanian et al., 2005).

Ce microbiote va permettre, via ses composants structuraux et ses métabolites, la stimulation de la muqueuse intestinale à produire des composés antimicrobiens dont les peptides antimicrobiens (*Antimicrobial peptides* = AMP) (Hooper and Macpherson, 2010). Le microbiote peut également stimuler la sécrétion d'IgA muqueuses.

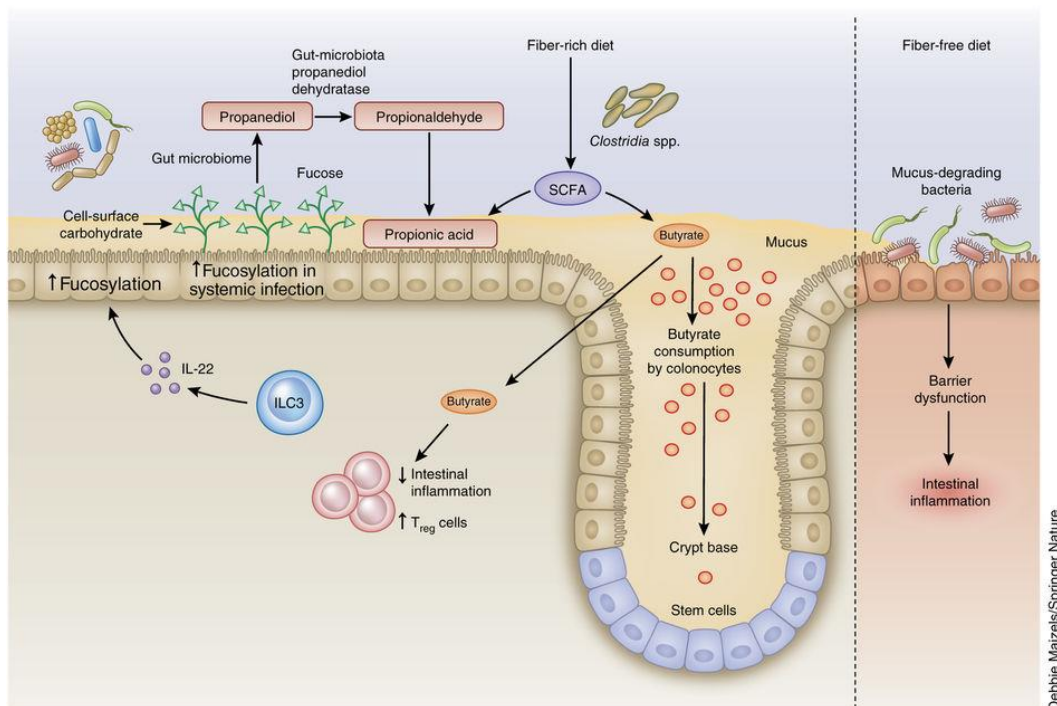


**Figure 13** : Principales fonctions du microbiote vis-à-vis de l'hôte<sup>9</sup>.

<sup>9</sup> Chapitre 13 : Microbiote et immunité intestinale. Les fondamentaux de la pathologie digestive. © CDU-HDE/Editions Elsevier-Masson – Octobre 2014

Le microbiote intestinal agit activement dans de nombreuses fonctions métaboliques comme par exemple l'apport de glucides, la synthèse de vitamines essentielles (B12 et K), la fermentation de résidus alimentaires non digérés, la différenciation et la prolifération cellulaire (LeBlanc et al., 2013; Martens et al., 2002) (**Figure 13**).

Ainsi, le microbiote va synthétiser le butyrate (acide gras à chaîne courte) reconnu pour avoir des propriétés anti-inflammatoires et anti-cancéreuses (Lin and Zhang, 2017; Morrison and Preston, 2016) (**Figure 14**). Il s'agit d'une source énergétique importante pour les colonocytes. Il permet également d'atténuer la translocation bactérienne et améliore la fonction de barrière intestinale via son action sur les jonctions serrées (Morrison and Preston, 2016). Une altération du métabolisme bactérien pourrait être une cause du développement de maladies métaboliques telle que l'obésité ou le diabète de type 2 (Palau-Rodriguez et al., 2015).



**Figure 14** : Synthèse de butyrate par le microbiote à partir de SCFA (Short-chain fatty acid= acid gras à chaîne courte) : source d'énergie pour les colonocytes (Blander et al., 2017).

## **VI. Modification du microbiote chez les patients atteints de MICI**

De nombreuses études sur la modification du microbiote chez les patients atteints de MICI ont recherché d'un part la présence de possibles micro-organismes pathogènes et d'autre part de changements globaux de la composition du microbiote (Ni et al., 2017).

Dans le règne bactérien, le phylum Firmicutes et spécifiquement *Faecalibacterium prausnitzii* est souvent réduit dans les selles des patients atteints de la MC. À l'inverse, les membres du phylum Proteobacteria, tels que *Enterobacteriaceae* (Baumgart et al., 2007; Seksik et al., 2003) y compris *Escherichia coli* (Frank et al., 2007; Mangin et al., 2004; Sartor, 2008), sont généralement augmentés chez les patients atteints de MICI par rapport aux personnes en bonne santé. De plus, certaines souches d'*Escherichia coli* dite « adhéro-invasive » (AIEC) ont été caractérisées et isolées au niveau de la muqueuse iléale de patients atteints de la MC (Darfeuille-Michaud et al., 1998). Elles sont considérées comme pathogènes via leur capacité à se répliquer dans les cellule épithéliales intestinales (CEI) *in vitro* (Boudeau et al., 1999).

Les analyses métagénomiques des particules virales isolées des matières fécales montrent un virome intestinal principalement composé de bactériophages (Breitbart et al., 2003; Reyes et al., 2010). Des études ont montré des changements de composition du virome intestinal dans les MICI et plus précisément au cours de la MC. En effet, une augmentation des « *Caudovirales* » est observée. Cette expansion des *Caudovirales* est associée à une réduction de la diversité bactérienne (Minot et al., 2011; Wagner et al., 2013).

Enfin au niveau du mycobiome, il est observé quelques modifications. Les séquences fongiques sont identifiées par des méthodes indépendantes de la culture : l'amplification par PCR de la petite sous-unité ribosomale 18S (Findley et al., 2013; Underhill and Iliev, 2014). Une étude sur les adultes atteints de MICI a montré des différences dans l'abondance relative de champignons spécifiques entre les patients

atteints d'une MICI et les témoins sains (Sokol et al., 2017). Plus précisément, la dysbiose fongique dans la MICI est associée à une augmentation du ratio Basidiomycota/Ascomycota, une diminution de la proportion de *Saccharomyces cerevisiae* et une augmentation de l'abondance de *Candida albicans*. Cette étude suggère en outre que l'environnement inflammatoire de la MC favorise l'expansion des champignons sur les bactéries.

En conclusion, une hypothèse suggère que la dysbiose dans les MICI pourrait, dans une large mesure, refléter la réponse d'une communauté microbienne complexe au stress environnemental de l'inflammation intestinale (Ni et al., 2017).

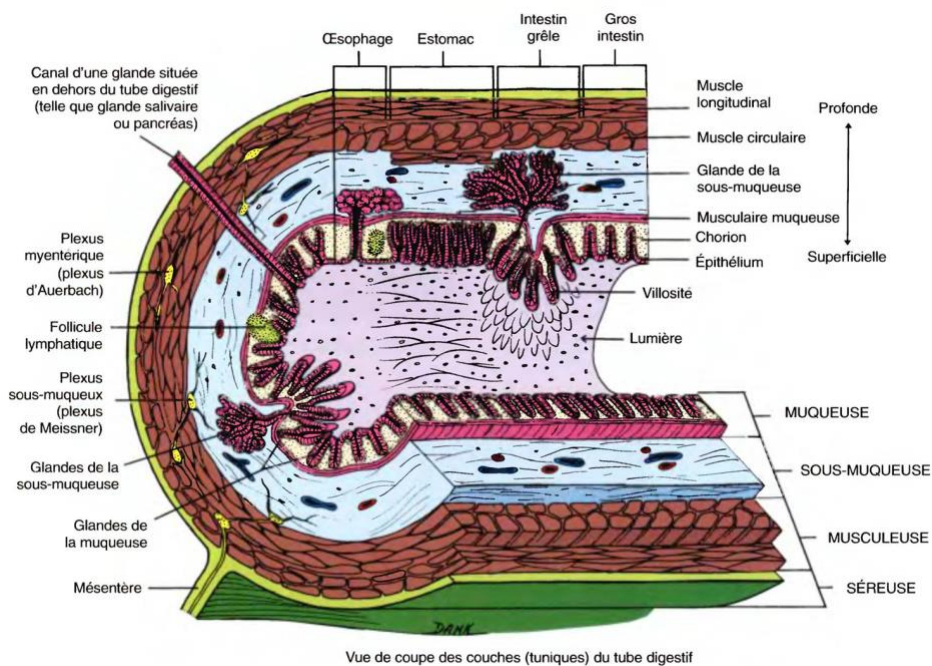
# La cellule épithéliale intestinale

## I. La muqueuse intestinale

L'intestin est constitué de 4 couches ou tuniques : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (**Figure 15**). La muqueuse intestinale est la couche en contact avec la lumière intestinale. Elle est constituée de 2 parties : une monocouche de cellules épithéliales intestinales et d'un tissu conjonctif appelé chorion ou *lamina propria*. C'est au niveau de celui-ci qu'est retrouvé l'ensemble du système immunitaire intestinal.

La muqueuse intestinale est une zone très importante d'échange entre le microbiote et les cellules immunitaires. Les antigènes constamment présents de la flore commensale et des aliments, sont normalement tolérés. Les antigènes pathogènes présents provoquent une réaction différente du système immunitaire. Les cellules immunitaires doivent être capables « d'accepter/tolérer » les antigènes commensaux et de l'alimentation tout en combattant les antigènes pathogènes. L'équilibre entre la flore commensale intestinale et la muqueuse intestinale constitue ce contexte d'« homéostasie intestinale » (Mowat, 2003). Cette homéostasie est rendue possible grâce à la communication qui existe entre le microbiote et la muqueuse. L'un des acteurs essentiels à cette communication est la CEI (Goto and Ivanov, 2013).





**Figure 15** : Représentation d'une coupe transversale des différentes couches constituant le tractus digestif<sup>10</sup>.

## II. La cellule épithéliale intestinale

L'épithélium intestinale est le plus grand du corps humain (environ 300 m<sup>2</sup> de surface). Il est constitué d'une monocouche de cellules organisées en cryptes et villosités (**Figure 16**). Ces cellules ont la capacité d'être polarisées. Elles présentent un pôle basal, en contact avec la *lamina propria* et un pôle apical en contact avec les différents éléments de la lumière intestinale. Les CEI sont continuellement renouvelées avec les cellules souches intestinales pluripotentes présentes au niveau des cryptes intestinales (Crosnier et al., 2006; van der Flier and Clevers, 2009) (**Figure 16**). L'ensemble de l'épithélium est remplacé tous les 4-5 jours chez l'homme, ce qui correspond à la production d'environ 10 milliards de cellules nouvelles par jour<sup>11</sup>. L'épithélium intestinal est principalement constitué d'entérocytes absorbants nécessaires pour la fonction digestive. D'autres types cellulaires sont présents comme les cellules caliciformes, les cellules de Paneth, les cellules enteroendocrines (**Figure**

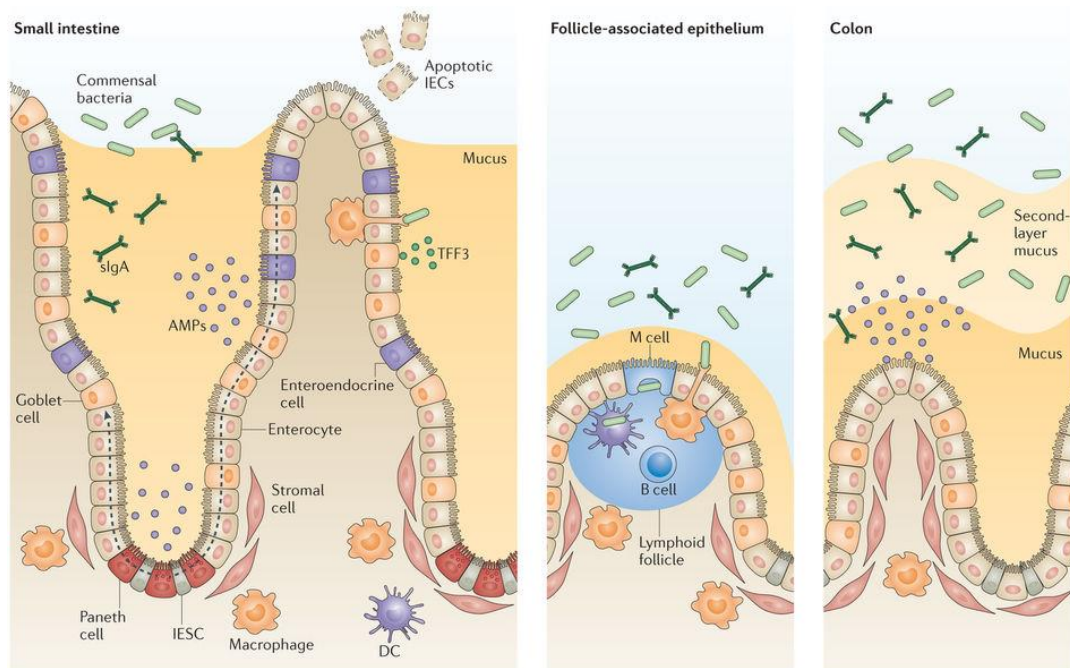
<sup>10</sup> <http://amar-constantine.e-monsite.com>

<sup>11</sup> <https://www.medecinesciences.org>

**16).** Les cellules caliciformes et les cellules de Paneth vont sécréter des mucines (qui constituent le mucus) et des AMP (Gallo and Hooper, 2012; Kim and Ho, 2010). Enfin, des plaques de Peyer sont également présentes au niveau de l'intestin grêle. Elles sont composées de cellules épithéliales spécialisées, appelées cellules M (*microfold*) et de nombreux follicules lymphoïdes contenant des lymphocytes B, T et des cellules dendritiques. Les cellules M sont capables d'absorber des antigènes ou des micro-organismes de la lumière intestinale. Ces derniers migrent au pôle basal par translocation et sont présentés directement aux cellules immunitaires des follicules lymphoïdes (Mabbott et al., 2013).

Dans le contexte de l'homéostasie intestinale, la CEI va être capable de reconnaître au niveau apical les micro-organismes et d'adapter sa réponse en fonction de la situation. Elle protège son hôte de l'exposition continue du microbiote et agit en cas d'infection. Ainsi, la CEI est considérée comme une cellule immunitaire et est indispensable à l'immunité intestinale. Elle joue son rôle au niveau de la composante innée avec les cellules présentatrices d'antigène mais également au niveau de la composante adaptative avec une action sur les lymphocytes de la muqueuse (Okumura and Takeda, 2017).

Le rôle de la CEI est donc complexe. En effet, elle doit être capable d'absorber les nutriments présents dans la lumière intestinale, tout en étant une barrière physique aux micro-organismes. Cette dernière est optimale grâce à 2 éléments : la couche de mucus et les jonctions serrées. Le mucus constitue la première ligne de défense. L'épaisseur du mucus varie en fonction de la localisation intestinale. Elle est importante dans l'iléon et maximale dans le colon (Okumura and Takeda, 2016). Les jonctions serrées sont des jonctions étanches entre les CEI empêchant la diffusion de microorganismes et de molécules (Okumura and Takeda, 2017).



Nature Reviews | Immunology

**Figure 16 :** Les cellules intestinales épithéliales forment une barrière physique et chimique pour maintenir l'homéostasie intestinale entre le microbiote et le système immunitaire (Peterson and Artis, 2014).

## **A. Les récepteurs de l'immunité innée**

Les CEI reconnaissent les motifs associés aux pathogènes (*Pathogen Associated Molecular Pattern* ou PAMPs) (Ren et al., 2001). Il s'agit de motifs moléculaires que les micro-organismes expriment et qui leur sont propres. Parmi ces PAMPs, on retrouve le lipopolysaccharide (LPS) retrouvé chez les bactéries Gram négatif, l'ARN double brin présent dans les virus à ARN ou encore la flagelline des bactéries flagellées. Cette reconnaissance se fait à l'aide des récepteurs de l'immunité innée appelés « *Pattern Recognition Receptor* » (PRR) (Lavelle et al., 2010). Ce sont des capteurs dynamiques de l'environnement microbien. Ils participent activement à la modulation de la réponse des cellules immunitaires de la muqueuse.

Ces PPRs regroupent les *Toll-like receptors* (TLR) (Abreu, 2010), les *NOD-like receptors* (NLR) (Chen and Núñez, 2011; Elinav et al., 2013), les *C-type lectin-like receptors* (CLR) et les *RIG-I-like receptors* (RLR) (Broquet et al., 2011; Li et al., 2011c).

Les TLR sont des récepteurs transmembranaires, présents au niveau de la membrane cellulaire ou au niveau des endosomes (**Figure 17**). Ces récepteurs sont capables de reconnaître de nombreux PAMPs bactériens, viraux, fongiques ou encore parasitaires. Il existe 10 récepteurs TLR chez l'homme (Cario, 2010). Les TLR jouent un rôle indispensable dans la reconnaissance de microorganismes. Le signal émis par ces récepteurs va permettre d'induire l'expression de « protéines cytoprotectrices de choc thermique » (Brandl et al., 2010; Rakoff-Nahoum et al., 2004), de TFF3 (*Trefoil Factor 3*) (Podolsky et al., 2009), et améliorer l'intégrité des jonctions serrées (Cario et al., 2004).

Les récepteurs NLR sont des récepteurs intracellulaires. Il en existe plus de 20 chez l'homme. On y retrouve par exemple NOD 1 et NOD 2. Le rôle principal va être de détecter des PAMPs cytoplasmiques et des signaux de danger (Elinav et al., 2013).

Les récepteurs RLR sont une petite famille de 3 récepteurs cytoplasmiques. Ils vont reconnaître les ARN viraux (Broquet et al., 2011).

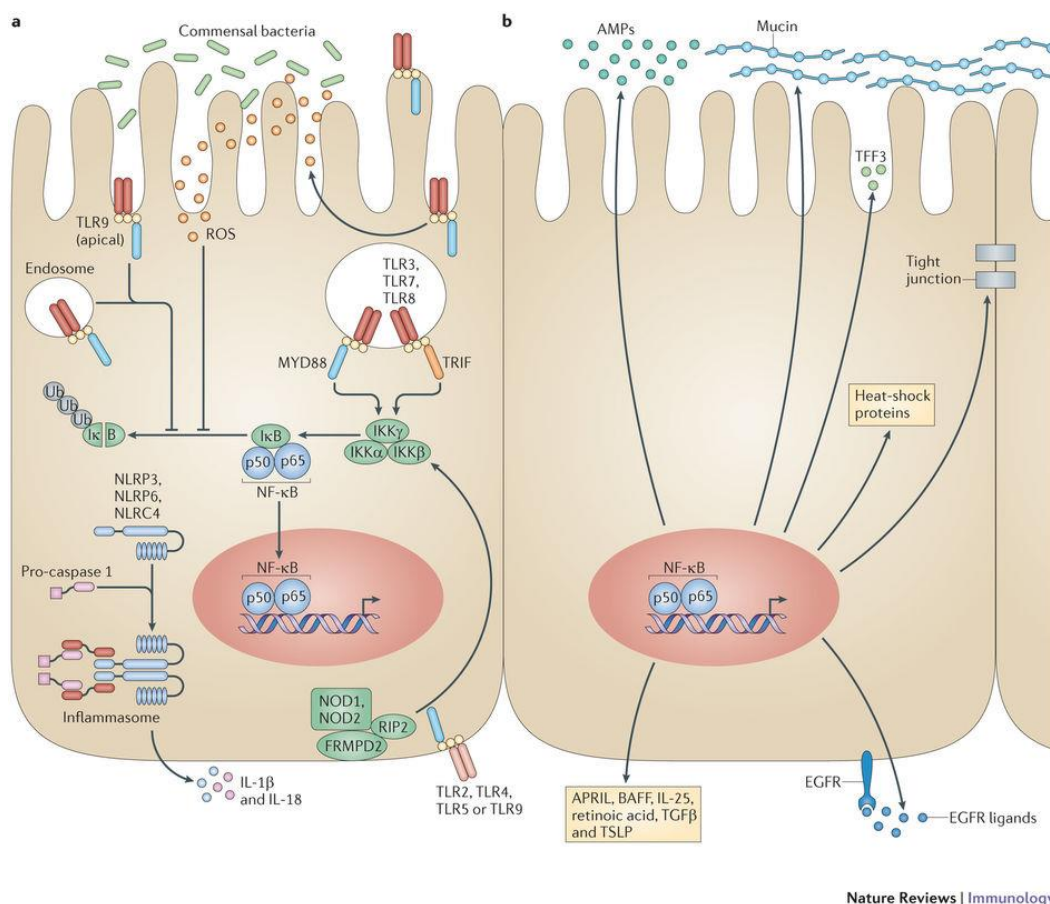
Enfin, les CLR sont une famille de récepteurs membranaires détectant les motifs hydrocarbonés de sucres. Ce type de motifs est principalement présent sur les parois fongiques (Li et al., 2011c).

La fixation de motifs microbiens sur des PRRs, entraînent une réponse pro-inflammatoire. Les voies de signalisation MyD 88 et NF- $\kappa$ B interviennent dans cette réponse inflammatoire. Elles vont être au centre de la synthèse du mucus, des AMP ou du TFF3 mais également de la synthèse de l'acide rétinoïque et de cytokines (TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*), APRIL (*A proliferation-inducing ligand*), BAFF (*B cell-activating factor*)) (**Figure 17**).

Au niveau des CEI, les PRRs vont agir pour maintenir l'homéostasie intestinale. Les CEI doivent maintenir un état de réactivité altérée (Peterson and Artis, 2014). Il existe dans les CEI une régulation spéciale sur les voies des PRR pour maintenir une réponse altérée ou diminuée aux stimuli du microbiote (Lotz et al., 2006; Otte et al., 2004). Pour cela, la CEI exprime des régulateurs négatifs des voies de signalisation inflammatoire dont IRAK-1, Tollip (*Toll-interacting Protein*) ou SIGIRR (*single immunoglobulin IL-1 receptor-related*) (Chassin et al., 2010; Otte et al., 2004; Vereecke et al., 2010; Xiao et al., 2007). Chez la souris, des perturbations de ces voies

de régulations exacerbent la réponse inflammatoire (Guma et al., 2011; Vereecke et al., 2010; Vlantis et al., 2011; Xiao et al., 2007).

Enfin, les ROS (*reactive oxygen species*), produits par les CEI en réponse aux micro-organismes commensaux ou pathogènes, vont intervenir dans l'homéostasie. En effet, ce sont des espèces chimiques oxygénées (radicaux libres, ions oxygénés) qui sont capable d'atténuer la voie NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor-kappa B*) (Kumar et al., 2004; Neish et al., 2000) (**Figure 17**) mais également d'inactiver des phosphatases et d'agir sur la migration cellulaire et l'adhésion focales entre CEI (Leoni et al., 2013; Swanson et al., 2011).



**Figure 17** : Reconnaissance du microbiote intestinale par la CEI, voie de signalisation et réponse de la CEI (Peterson and Artis, 2014).

La CEI possède donc tout un ensemble de récepteurs capable de reconnaître les motifs microbiens. L'activation de ces PPRs va induire une cascade de réactions dans la CEI. Cela va conduire à l'activation ou la modulation d'une réponse

immunitaire innée mais également adaptative. Ces deux réponses se font au niveau apical et basal de la CEI.

## **B. Réponse au niveau apicale**

La sécrétion de mucines glycosylées par les cellules caliciformes constitue la première barrière physique contre les micro-organismes. Ces mucines déterminent les propriétés rhéologiques du mucus : élasticité, viscosité, filance et adhérence. La mucine la plus abondante est MUC 2. Elle joue un rôle essentiel dans l'organisation du mucus (Johansson et al., 2008). L'importance de cette protéine est clairement soulignée dans un modèle de souris déficiente en MUC 2 où il est observé un développement de colite spontanée (Van der Sluis et al., 2006; Velcich et al., 2002).

Les cellules caliciformes vont également synthétiser et sécréter des molécules qui interviennent dans la formation du mucus. Parmi ces molécules, on retrouve RELM $\beta$  (*Resistin-like molecule- $\beta$* ) qui va induire la sécrétion de MUC 2 et inhiber le chimiotaxisme parasitaire (Artis et al., 2004; Nair et al., 2008) et TFF3 qui permet de structurer le mucus avec des liaisons entre les mucines. De plus, TFF3 induit la réparation et la migration cellulaire et l'inhibition de l'apoptose des cellules épithéliales (Dignass et al., 1994; Taupin et al., 2000).

La sécrétion de peptides antimicrobiens par les CEI renforce cette fonction de barrière physique. Les entérocytes de l'intestin grêle ou du côlon sont capables de produire des AMP avec une variabilité régionale. Ils produisent des lectines de type C (dont REGIII $\gamma$  : *regenerating islet-derived protein III $\gamma$* ), qui ont pour cible le peptidoglycane de la paroi des bactéries gram positif. Les cellules de Paneth sécrètent d'autres types d'AMP comme les défensines, les cathelicidines ou le lysozyme dans les cryptes de l'intestin grêle (Bevins and Salzman, 2011; Gallo and Hooper, 2012). Ces derniers agissent en formant des pores au niveau de la paroi bactérienne (Gallo and Hooper, 2012; Mukherjee et al., 2014). Cette fonction anti-bactérienne permet une régulation des micro-organismes commensaux et pathogènes.

La libération des AMP dans le mucus conduit à une activité antimicrobienne concentrée à la surface de la muqueuse et va limiter la quantité et la diversité des micro-organismes au contact de cette dernière (Meyer-Hoffert et al., 2008). L'action « microbiocide » des AMP va permettre aux PRRs des CEI de reconnaître les motifs microbiens sans que les micro-organismes soient présents à la surface des CEI.

Lors de la réponse adaptative, la CEI va être capable de stimuler et activer les lymphocytes B en sécrétant des composés tels que BAFF ou APRIL (He et al., 2007; Xu et al., 2007). Les lymphocytes B vont se différencier en plasmocytes et libérer des immunoglobulines de type A (IgA) sécrétoires. Ces IgA ont la particularité d'être sous la forme de dimères. Ces dimères sont constitués de 2 IgA et d'une pièce de jonction J synthétisée par les CEI. Les dimères se forment lorsque les IgA traversent les CEI par transcytose. Ils sont sécrétés au niveau apical, captent les antigènes et empêchent leur entrée dans la muqueuse (Johansen and Kaetzel, 2011).

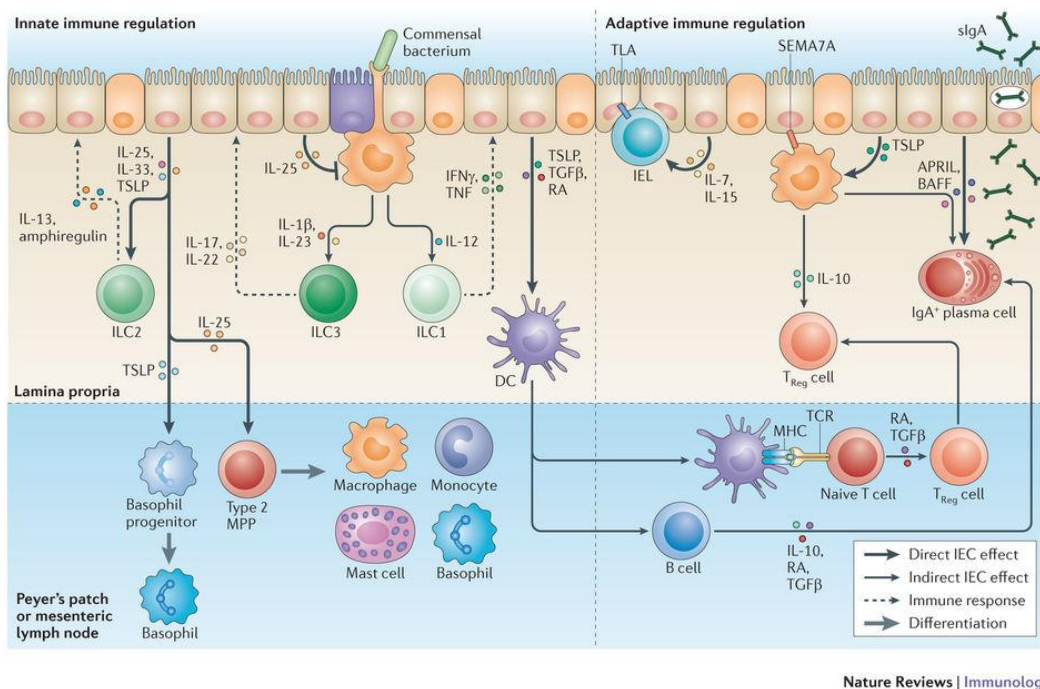
### **C. Réponse basale**

La CEI a la capacité de sécréter également des cytokines et des chimiokines au niveau basal et ainsi réguler les fonctions des cellules immunitaires de la muqueuse intestinale (Goto and Ivanov, 2013). Cette capacité va permettre d'orienter la différenciation des cellules dendritiques de la muqueuse intestinale vers un phénotype tolérogène (Iliev et al., 2009a; Rimoldi et al., 2005a, 2005b). Parmi les différentes molécules sécrétées qui orientent ce phénotype, on retrouve la TSLP et le TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ), deux cytokines immunomodulatrices et l'acide rétinoïque (dérivé de la vitamine A) (Johansson-Lindbom et al., 2005; Sun et al., 2007). Les cellules dendritiques tolérogènes vont par la suite orienter la différenciation des lymphocytes T naïfs vers un phénotype régulateur (Lymphocytes Treg FoxP3+). Ces lymphocytes sont des acteurs essentiels de la tolérance immunitaire (Iliev et al., 2009b). Les CEI sont également capables de sécréter des cytokines inflammatoires, comme par exemple l'IL-25 (Zaph et al., 2008). Ceci amène à la différenciation des



cellules multipotentes de type 2 en polynucléaires, mastocytes, macrophages (**Figure 18**).

De plus, les CEI sont capables de contrôler la sécrétion d'IL-22 par les cellules lymphoïdes innées de type 3 (ILC3). Cette cytokine va permettre dans un premier temps d'induire la production d'AMP par les CEI et dans un second temps induire l'expression de FUT 2 (*Fucosyltransferase 2*). La fucosylation (mécanisme de glycosylation) des protéines membranaires est importante dans la protection contre les infections (Goto et al., 2014; Pham et al., 2014; Pickard et al., 2014) (**Figure 14 page 48 et figure 18**).



**Figure 18** : Les cellules épithéliales intestinales régulent l'immunité innée et adaptative (Peterson and Artis, 2014).

### III. Dysfonctionnement des CEI dans les MICI

De nombreuses études montrent clairement que l'inflammation intestinale chez les patients atteints de RCH pourrait provenir d'un dysfonctionnement au niveau des CEI. Plusieurs études de méta-analyses (GWAS= *Genome-wide association study*)



ont identifié des gènes de susceptibilité au MICI et plus particulièrement chez les patients RCH.

Tout d'abord, les gènes *HNF4A*, *Lamp1* et *CDH1* présentent des loci de susceptibilité à la RCH (UK IBD Genetics Consortium et al., 2009). Ces 3 gènes codent respectivement pour 3 protéines : HNF4 $\alpha$ , la laminin et l'E-cadherine 1. C'est 3 protéines jouent des rôles clés dans les CEI.

HNF4 $\alpha$  est un récepteur nucléaire qui régule l'expression de multiples composants dans les trois compartiments clés de la jonction cellule-cellule, à savoir la jonction adhérente, la jonction étroite et le desmosome (Battle et al., 2006). Ces jonctions cellule-cellule sont fondamentales pour l'organisation épithéliale et la fonction de barrière. L'importance de ce récepteur nucléaire a été confortée chez les souris HNF4 $\alpha^{\Delta IEC}$  (souris génétiquement modifiées par la technique *Cre-Lox*). En effet, ces souris ont développé une perméabilité épithéliale accrue et une colite nettement plus sévère avec un traitement au DSS (Ahn et al., 2008). Ils observent également une dysrégulation du gène codant HNF4 $\alpha$  chez les patients RCH et MC.

La E-cadherine 1 est une glycoprotéine transmembranaire, l'un des principaux composants de la jonction adhérente et un médiateur clé de l'adhésion intercellulaire dans l'épithélium intestinal. Elle joue également un rôle clé dans la restitution et la réparation épithéliales suite aux dommages causés au niveau des muqueuses. L'expression de *CDH1* est significativement réduite dans les zones inflammatoires des muqueuses de patients RCH (Karayiannakis et al., 1998). L'E-cadherine et HNF4 $\alpha$  co-opèrent pour maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale dans l'intestin.

Les Laminins sont exprimés dans la membrane basale intestinale et jouent un rôle clé dans l'ancrage de l'épithélium. L'expression est diminuée chez les patients RCH (Schmehl et al., 2000) mais pas chez les patients MC.

Ensuite, on retrouve des gènes codant pour les protéines *nod 2*, *fut 2* et *muc 19*. Des modèles murins génétiquement modifiés, présentant des dysfonctionnements au niveau de la muqueuse intestinale, montrent le lien entre ces dysfonctionnements et la survenue d'inflammation intestinale. Par exemple, les souris déficientes en MUC 2 au niveau des CEI, développent spontanément une colite (Johansson et al., 2008;

Van der Sluis et al., 2006). Ces modèles expérimentaux permettent ainsi de mieux comprendre la susceptibilité des gènes incriminés.

De plus, une étude a montré récemment que l'expression de Lypd 8 (*Ly6/PLAUR domain containing 8*) est significativement diminuée au niveau des muqueuses coliques de patients atteints de RCH (Okumura et al., 2016). Lypd 8 est une protéine constitutivement sécrétée dans la lumière intestinale et qui va se lier de préférence aux bactéries comme *Escherichia*, *Proteus* ou encore *Helicobacter*. Elle va empêcher leur invasion au niveau des muqueuses coliques. Chez les souris déficientes en Lypd 8, les bactéries flagellées pénètrent la couche interne de mucus et provoquent une inflammation avec une sensibilité accrue au DSS (Okumura et al., 2016).

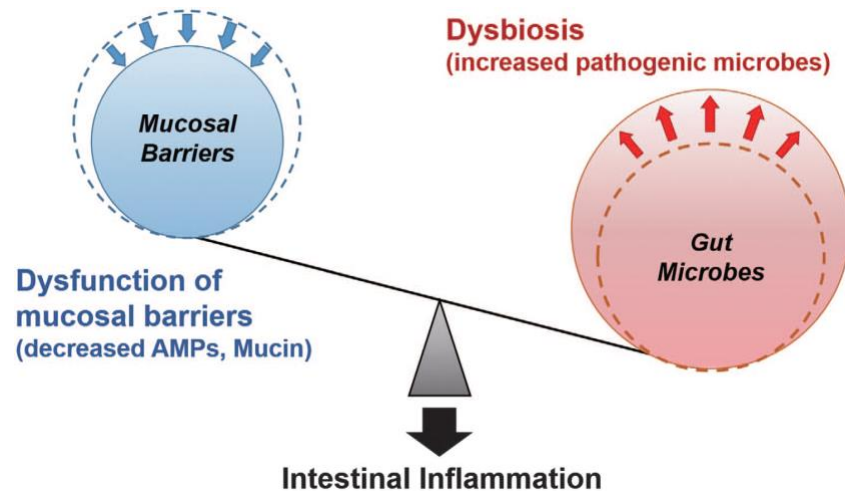
Des mutations au niveau des récepteurs TLRs (TLR1-R80T, TLR2-R753Q), sont associées à une pancolite chez les patients atteints de RCH (Cario, 2010; Pierik et al., 2006; Podolsky et al., 2009). La mutation TLR2-R753Q va perturber l'induction de la synthèse de TFF3 par les cellules caliciformes. Une mutation du TLR4 (TLR4-D299G) augmente la susceptibilité aux MICI (Franchimont et al., 2004). Cette même clinique est observée chez les souris déficientes en NLRP6, PRR qui intervient dans la sécrétion du mucus par les cellules caliciformes (Wlodarska et al., 2014). De nouveau, dans un modèle de colite induite par le DSS chez la souris, il a été montré que la déplétion des TLRs aggrave la colite chimique (Rakoff-Nahoum et al., 2004).

Ensuite, chez les patients atteints de MICI, il est observé une diminution des mucines mais également des AMP (Jäger et al., 2013). Chez les patients RCH, la couche de mucus est très mince en comparaison aux témoins. La diminution de synthèse de mucus peut s'expliquer par le nombre diminué de cellules caliciformes. Au niveau des cryptes, la différenciation de cellules souches intestinales en la cellules caliciformes est régulée par plusieurs facteurs de transcription tels que *Hath 1* (*Helix-loop-helix transcription factor 1*) et *KLF4* (*Kruppel-like factor 4*) (Katz et al., 2002; Yang et al., 2001). Chez les patients atteints de RCH (et pas chez les patients atteints de MC), il est observé une diminution d'expression du facteur de transcription *Hath 1* au niveau des muqueuses inflammatoires. Elle a pour conséquence une diminution de la différenciation des cellules caliciformes par rapports aux témoins et donc une

diminution de synthèse de mucine (Gersemann et al., 2009; Hanski et al., 1999; Tytgat et al., 1996; Zheng et al., 2011).

Concernant les AMP, leurs diminutions ne concernent que les  $\alpha$ -défensines au niveau de l'intestin grêle chez les patients atteints de MC (Wehkamp et al., 2004). Chez ces mêmes patients, l'expression de la  $\beta$ -défensine 1 (HBD1), peptide antimicrobien exprimé de manière constitutive, est significativement diminuée au niveau des muqueuses coliques non inflammatoires (Peyrin-Biroulet et al., 2010). De plus, en zone inflammatoire, l'induction des autres AMP (HBD2, HBD3, LL-37, Elafin), est inférieure à celle des patients RCH (Fahlgren et al., 2003; Schaubert et al., 2006; Schmid et al., 2007; Wehkamp et al., 2003). Enfin, l'effet bactéricide est diminué sur des biopsies de patients atteints de MC en comparaison à des biopsies de patients sains ou atteints de RCH (Wehkamp et al., 2007). Pour les patients RCH, l'induction de l'ensemble des AMP ne semble pas être perturbée et reste supérieure à celle des patients atteints de MC et des témoins (Nuding et al., 2007; Schmid et al., 2007; Wehkamp et al., 2007). L'intégrité de l'activité antimicrobienne au niveau des muqueuses inflammatoires et non inflammatoires est donc conservée chez les patients atteints de RCH.

Des perturbations des voies de signalisations au niveau des CEI peuvent également jouer un rôle dans la survenue des MICI. Des souris déficientes en MyD88 ou IL-22 dans les CEI présentent des diminutions d'expression des AMP et du mucus (**Figure 19**). Ces souris sont hautement sensibles aux colites expérimentales (Bhinder et al., 2014; Frantz et al., 2012). Enfin, l'inhibition d'une sous-unité de NF- $\kappa$ B (*IKKappaB Kinase gamma= IKKgamma*), essentielle pour son activation au niveau des CEI, provoque le développement d'une inflammation intestinale spontanée. Ceci s'explique par la diminution d'expression d'AMP et de leur translocation au niveau de la muqueuse colique (Nenci et al., 2007).



**Figure 19** : L'inflammation intestinale est médiée par une dysbiose et un dysfonctionnement de la barrière intestinale (Okumura and Takeda, 2017).

L'ensemble des données citées précédemment, démontre que les CEI sont des cellules de l'immunité innée à part entière (reconnaissance de motifs microbiens, sécrétion de cytokines, modulation de la réponse immune) impliquées dans le développement de l'homéostasie intestinale (Goto and Ivanov, 2013). La CEI se retrouve au centre de cet équilibre et est indispensable dans le maintien d'une symbiose entre microbiote et l'organisme.

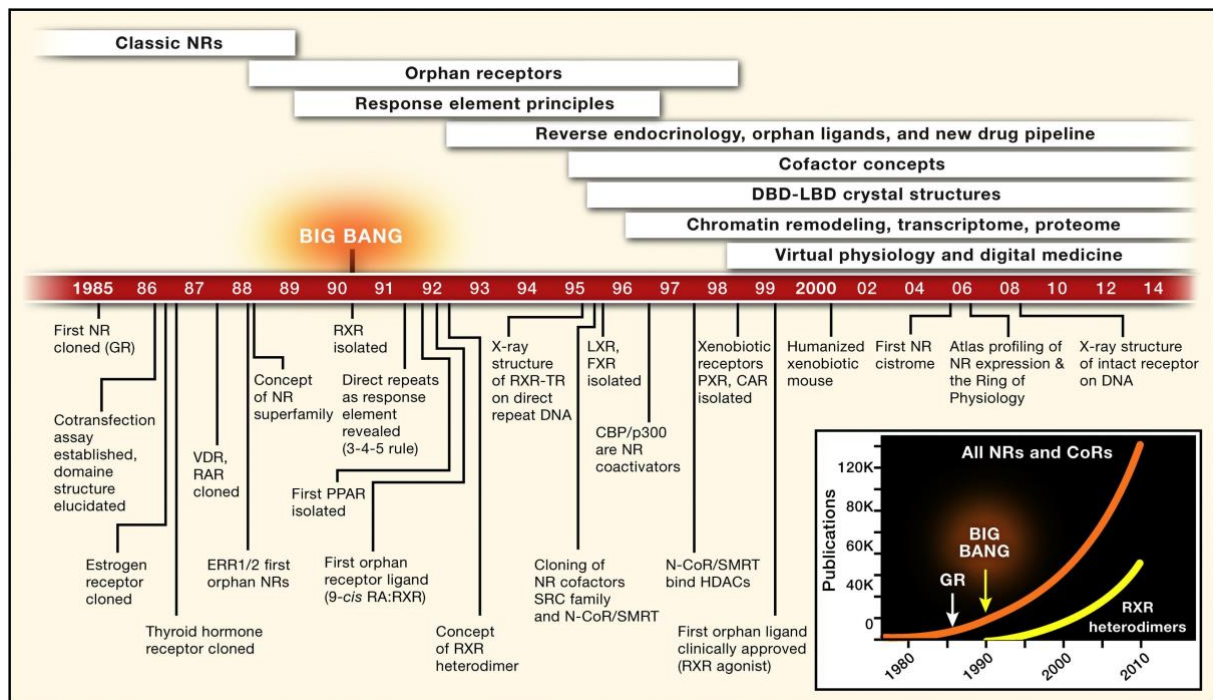
Les différentes cascades activées au cours des réponses innées et adaptatives font intervenir nécessairement des facteurs de transcriptions dont les récepteurs nucléaires. Le déficit d'un de ces facteurs de transcription pourrait amener à une dérégulation des cascades de signalisations et donc la perte d'une réponse adaptée. Le récepteur  $PPAR\gamma$ , reconnu pour avoir une action anti-inflammatoire, est significativement diminué au niveau des CEI du côlon chez les patients souffrants de RCH en comparaison aux patients contrôles (Dubuquoy et al., 2003).

# Les récepteurs nucléaires

## I. Les récepteurs nucléaires : histoire et généralité

Les récepteurs nucléaires sont des protéines faisant parties de la superfamille des facteurs de transcription ligand dépendant. Les facteurs de transcriptions sont nécessaires à l'initiation et/ou la régulation de la transcription d'un gène. Les récepteurs nucléaires possèdent différents domaines dont un qui va leur permettre de se fixer à l'ADN (**Figure 23**). Ces derniers se distinguent des autres facteurs de transcription par leur capacité à fixer des ligands hydrophobes qui vont modifier leur activité transcriptionnelle. Les récepteurs nucléaires ont une très grande importance dans l'organisme. Même si leur structure est conservée, le mode d'action et la fonction des récepteurs nucléaires sont très diversifiés. En effet, ils sont impliqués dans la quasi-totalité des processus de développement biologique, physiologique, dans l'homéostasie ou encore dans diverses maladies (Chambon, 1996; Evans, 2005; Laudet and Gronemeyer, 2001). C'est pour cela que les récepteurs nucléaires constituent une cible thérapeutique importante contre les désordres métaboliques, les maladies inflammatoires ou encore les cancers (Greschik and Moras, 2003; Jin and Li, 2010; Sladek, 2003).

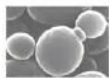
Jensen *et al.* ont découvert de manière biochimique le premier récepteur nucléaire. Ils ont démontré que l'œstradiol était spécifiquement capté par ces cellules cibles et que son activité cellulaire était médiée par un récepteur spécifique de haute affinité (Jensen, 1962). Vingt ans plus tard, Evans *et al.* caractérisèrent les récepteurs aux glucocorticoïdes (Hollenberg et al., 1985). Parallèlement, le Professeur Chambon avec son équipe, caractérisait le récepteur aux œstrogènes (Green et al., 1986) (**Figure 20**). Ces découvertes ont été permises grâce au clonage de ces 2 récepteurs nucléaires.



**Figure 20** : Représentation sous la forme de frise chronologique des différentes découvertes majeures sur la super famille des récepteurs nucléaires (Evans and Mangelsdorf, 2014).

La découverte de ces protéines est donc relativement récente et la recherche sur ces dernières a été très active durant les années qui ont suivi, en particulier sur la caractérisation et leur structure (Evans and Mangelsdorf, 2014) (**Figure 20**). La découverte du récepteur nucléaire RXR (récepteur X rétinoïde) va révolutionner la compréhension des récepteurs nucléaires (Evans and Mangelsdorf, 2014; Rastinejad, 2001; Wagner et al., 2017). En effet, la découverte de RXR représente une très grande avancée pour la compréhension des récepteurs hétérodimérisés et de son ligand : l'acide 9-*cis* rétinoïque, dérivé de la vitamine A (Mangelsdorf et al., 1990).

L'étude phylogénique des récepteurs nucléaires a permis de mettre en évidence l'émergence de ces derniers très tôt au cours l'évolution des métazoaires et donc avant la divergence entre les vertébrés et les invertébrés (Escriva et al., 1997) (**Figure 21**).

	Organism	Features	Number	Role		
	 Fungi	Cell wall Uni- and Multi-cellular	0 NR	None		
Animals	Metazoans	Porifera	No Tissues No Organs Various Cell Types Multiple Cell Layers	1-2 NRs	Environmental Sensor          Endocrine Receptor	
		Trichoplax		4 NRs		
	Cnidarians	Coral	Tissues Innate Immunity Sensory Organs Digestive System	10 NRs		
		Sea Anemone	Multiple Germ Layers Neuromuscular System	17 NRs		
	Bilaterians	Nematodes	Nematodes	Nervous System Excretory System Endocrine System		27-270 NRs*
			Insects	Brain Circulatory System Respiratory System		~21 NRs
		Vertebrates	Fish	Skeleton Adaptive Immunity		~70 NRs**
			Mammals	Lactation Homeothermic Integumentary System		~48 NRs

**Figure 21** : Évolution des récepteurs nucléaires selon les organisme vivant, leur nombre et leur action (Sladek, 2011).

## II. Nomenclature des récepteurs nucléaires

La classification et la nomenclature des récepteurs nucléaires a été permise grâce à l’alignement des séquences et la construction d’arbres phylogéniques. Le séquençage de l’ADN humain a permis d’identifier 48 récepteurs nucléaires. C’est en 1999 que la nomenclature des récepteurs nucléaires a été faite et acceptée. Cette nomenclature regroupe les récepteurs pour lesquels leurs ligands ont été caractérisés ainsi que d’autres récepteurs, appelés « récepteurs orphelins », pour lesquels, il n’existe pas de ligand ou pour lesquels aucun ligand n’a encore été caractérisé. À l’heure actuelle, nous ne savons pas si tous les récepteurs orphelins activent la transcription des gènes de façon constitutive ou si des mécanismes alternatifs agissent sur la régulation transcriptionnelle. Cette nomenclature est constituée de 6 sous-familles de tailles inégales (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999) (**Figure 22**).

On retrouve :

- Le groupe 1 : il s'agit d'un grand groupe qui contient les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TRs), les récepteurs à l'acide rétinoïque (RARs), le récepteur à la vitamine D (VDR) et les récepteurs activés par les proliférateurs de péroxisomes (PPARs). Il va également contenir des récepteurs orphelins comme les récepteurs apparentés au récepteur des rétinoïdes (ROR), Rev-erbs, récepteurs constitutifs aux androstanes (CAR), *Pregnane X Factor* (PXR), *Liver X factor* (LXR), etc...

- Le groupe 2 : les récepteurs nucléaires présents dans ce groupe sont les récepteurs X des rétinoïdes (RXR), *chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor* (COUP-TF) et *hepatocyte nuclear factor 4* (HNF4).

- Le groupe 3 : ce groupe contient les récepteurs fixant les stéroïdes, à savoir, les récepteurs aux oestrogènes (ER), aux glucocorticoïdes (GR), à la progestérone (PR), aux androgènes (AR) et les *oestrogen-receptor-related* (ERR).

- Le groupe 4 : cette sous-famille regroupe des récepteurs orphelins comme NGFI-B (*Nerve Growth Factor IB*), NURR 1 (*Nuclear Receptor Related 1*) et NOR 1 (*Neuron-derived Orphan Receptor 1*).

- Le groupe 5 : il s'agit de nouveau d'un petit groupe qui contient le facteur aux stéroïdes 1 (SF1), *Liver receptor homolog 1* (LRH-1) et les récepteurs liés à la drosophile.

- Le groupe 6 : ce groupe ne contient que le récepteur GCNF 1 (*Germ Cell Nuclear Factor 1*), qui ne rentre dans aucune des autres sous-familles.

Les récepteurs DAX-1 (*dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*) et SHP (*Small Heterodimer Partner*) ne sont classés dans aucune de ces sous-familles.

Malgré la grande diversité des récepteurs nucléaires et le nombre important de récepteurs nucléaires dits orphelins, le fort degré de conservation entre les différents récepteurs nucléaires, laisse à suggérer l'idée de l'existence d'un seul et même récepteur nucléaire ancestral commun, encore inconnu, qui a évolué et été dupliqué avec le temps (Amero et al., 1992; Detera-Wadleigh and Fanning, 1994; Laudet et al., 1992; Thornton and DeSalle, 2000).



Table 1 | **Human nuclear receptors**

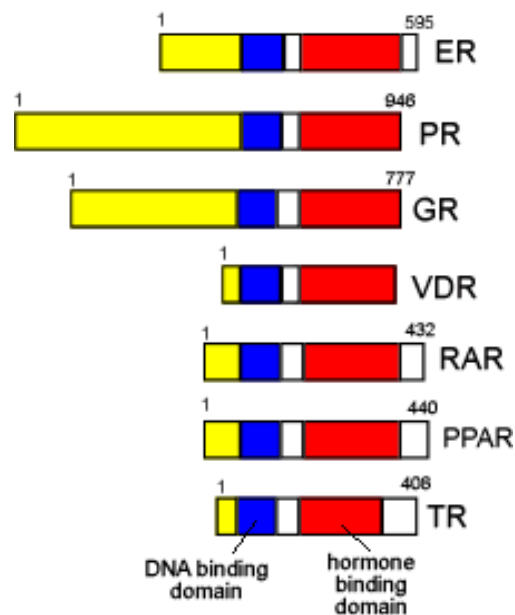
Name	Abbreviation	Nomenclature	Ligand
Thyroid hormone receptor	TR $\alpha$ TR $\beta$	NR1A1 NR1A2	Thyroid hormone Thyroid hormone
Retinoic acid receptor	RAR $\alpha$ RAR $\beta$ RAR $\gamma$	NR1B1 NR1B2 NR1B3	Retinoic acid Retinoic acid Retinoic acid
Peroxisome proliferator-activated receptor	PPAR $\alpha$ PPAR $\beta$ PPAR $\gamma$	NR1C1 NR1C2 NR1C3	Fatty acids, leukotriene B <sub>4</sub> , fibrates Fatty acids Fatty acids, prostaglandin J <sub>2</sub> ,
Reverse erbA	Rev-erb $\alpha$ Rev-erb $\beta$	NR1D1 NR1D1	Orphan Orphan
RAR-related orphan receptor	ROR $\alpha$ ROR $\beta$ ROR $\gamma$	NR1F1 NR1F2 NR1F3	Cholesterol, cholesteryl sulphate Retinoic acid Retinoic acid
Liver X receptor	LXR $\alpha$ LXR $\beta$	NR1H3 NR1H2	Oxysterols, T0901317, GW3965 Oxysterols, T0901317, GW3965
Farnesoid X receptor	FXR $\alpha$ FXR $\beta$ *	NR1H4 NR1H5	Bile acids, Fexaramine Lanosterol
Vitamin D receptor	VDR	NR1I1	1,25-dihydroxy vitamin D <sub>3</sub> , lithocholic acid
Pregnane X receptor	PXR	NR1I2	Xenobiotics, PCN
Constitutive androstane receptor	CAR	NR1I3	Xenobiotics, phenobarbital
Human nuclear factor 4	HNF4 $\alpha$ HNF4 $\gamma$	NR2A1 NR2A2	Orphan Orphan
Retinoid X receptor	RXR $\alpha$ RXR $\beta$ RXR $\gamma$	NR2B1 NR2B2 NR2B3	Retinoic acid Retinoic acid Retinoic acid
Testis receptor	TR2 TR4	NR2C1 NR2C2	Orphan Orphan
Tailless	TLL	NR2E2	Orphan
Photoreceptor-specific nuclear receptor	PNR	NR2E3	Orphan
Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor	COUP-TF1 COUP-TFII	NR2F1 NR2F2	Orphan Orphan
ErbA2-related gene-2	EAR2	NR2F6	Orphan
Oestrogen receptor	ER $\alpha$ ER $\beta$	NR3A1 NR3A2	Oestradiol-17 $\beta$ , tamoxifen, raloxifene Oestradiol-17 $\beta$ , various synthetic compounds
Oestrogen receptor-related receptor	ERR $\alpha$ ERR $\beta$ ERR $\gamma$	NR3B1 NR3B2 NR3B3	Orphan DES, 4-OH tamoxifen DES, 4-OH tamoxifen
Glucocorticoid receptor	GR	NR3C1	Cortisol, dexamethasone, RU486
Mineralocorticoid receptor	MR	NR3C2	Aldosterone, spiro lactone
Progesterone receptor	PR	NR3C3	Progesterone, medroxyprogesterone acetate, RU486
Androgen receptor	AR	NR3C4	Testosterone, flutamide
NGF-induced factor B	NGFIB	NR4A1	Orphan
Nur related factor 1	NURR1	NR4A2	Orphan
Neuron-derived orphan receptor 1	NOR1	NR4A3	Orphan
Steroidogenic factor 1	SF1	NR5A1	Orphan
Liver receptor homologous protein 1	LRH1	NR5A2	Orphan
Germ cell nuclear factor	GCNF	NR6A1	Orphan
DSS-AHC critical region on the chromosome, gene 1	DAX1	NR0B1	Orphan
Short heterodimeric partner	SHP	NR0B2	Orphan

\*FXR $\beta$  is a pseudogene in humans and does not encode a functional receptor. DES, diethylstilbestrol; DSS-AHC, dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita; NGF, nerve growth factor; PCN, pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile.

**Figure 22** : Ensemble des 48 récepteurs nucléaires caractérisés chez l'homme (Gronemeyer et al., 2004).

### III. Structure des récepteurs nucléaires

Les membres de la super famille des récepteurs nucléaires partagent les mêmes caractéristiques structurales (**Figure 23**). Les récepteurs nucléaires possèdent 5 ou 6 régions structurales d'homologie avec 4 domaines fonctionnels appelé A/B, C, D et E/F (**Figure 23 et 24**).



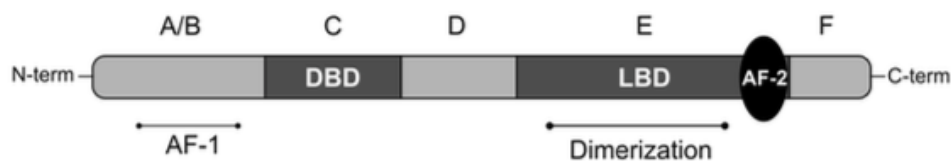
**Figure 23** : Représentation de plusieurs récepteurs nucléaires. ER= Récepteur aux oestrogènes, PR= Récepteur aux progestérones, GR= Récepteur aux glucocorticoïdes, VDR= Récepteur à la vitamine D, RAR= Récepteur à l'acide rétinoïque, PPAR= récepteur activé par les proliférateurs aux peroxyosomes<sup>12</sup>.

#### A. Le domaine A/B

Le domaine A/B constitue le domaine amino-terminal de la protéine (**Figure 24**). C'est une région dont la variabilité est importante entre les récepteurs nucléaires. Ce domaine possède une fonction activatrice nommée AF-1 (*activation function 1*). Contrairement à l'AF-2, présente plus loin dans la séquence protéique des récepteurs

<sup>12</sup> <http://www.angelfire.com/sc3/toxchick/endocrinology/endocrinology04.html>

nucléaires, l'AF-1 est indépendante de la présence du ligand, elle peut donc fonctionner de manière autonome. Ce domaine n'a pas été aussi bien conservé que les autres domaines protéiques (Germain et al., 2006). La présence de plusieurs sites de phosphorylation sur le domaine A/B, en particulier chez les RAR, est le signe de l'existence de modifications post-traductionnelles présentes dans cette région (Usuda and Kanda, 2014). Cette région peut également réagir avec différents co-facteurs (des co-activateurs ou des facteurs de transcription) (Germain et al., 2006). Le domaine A/B peut également interagir avec le domaine C-terminal (domaine E/F) (Ikonen et al., 1997). Enfin, il est montré que le domaine A/B est le domaine majeur de transactivation dans le cas des récepteurs aux androgènes. Cependant, l'activité de ce domaine est dépendante de la fixation des androgènes (Simental et al., 1991).



**Figure 24** : Représentation de l'organisation structurale spécifique des récepteurs nucléaires (Bertin et al., 2013).

## **B. Le domaine C**

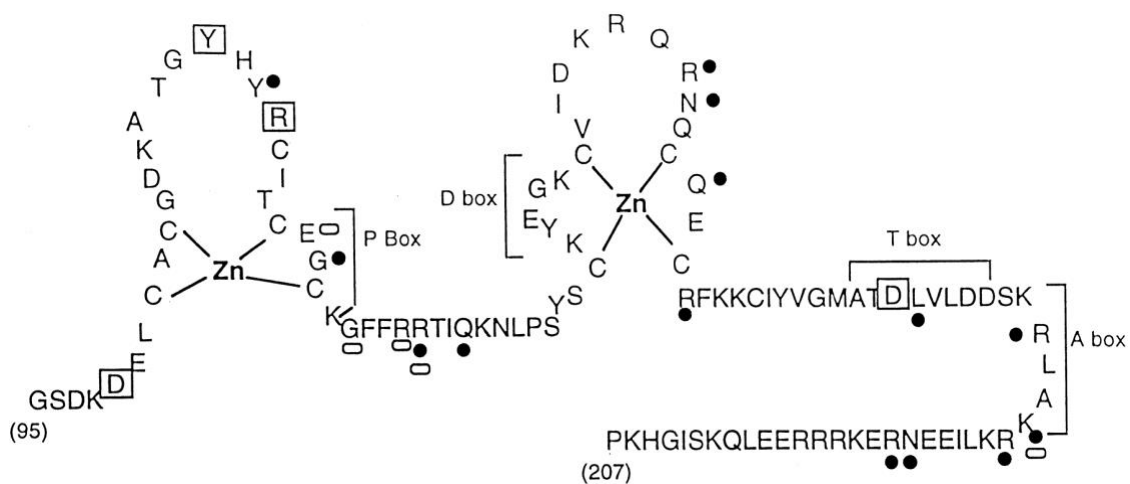
Le domaine C, appelé également *DNA Binding Domaine* ou DBD, est le domaine le plus conservé au niveau des récepteurs nucléaires (**Figure 24**). Ce domaine est absent chez 2 récepteurs nucléaires : DAX-1 et SHP (Kumar et al., 2004). Il permet spécifiquement la fixation des récepteurs nucléaires à un site de l'ADN appelé élément de réponse (*Hormone Response Element* ou HRE). Les récepteurs nucléaires forment généralement un homodimère ou un hétérodimère avant de se fixer sur la zone promotrice. Il est possible qu'il se fixe sous forme de monomère. Cette fixation est possible par la reconnaissance d'une séquence bien définie : Purine-GGTCA (Escriva et al., 2004)(Laudet et al., 1992).

Au cours de l'évolution, des mutations, des extensions ou encore des répétitions de séquences ont eu lieu. Ceci aura permis de créer de nouveaux éléments

de réponse, spécifiques et sélectifs pour un récepteur ou une classe de récepteurs (Laudet and Gronemeyer, 2001).

Différentes approches (résonance magnétique nucléaire, RMN, études cristallographiques) ont permis de mettre en évidence un noyau de 66 résidus très conservé et composé de 2 doigts de zinc riches en cystéines et d'une extension COOH. Divers séquences appelés *P box*, *D box*, *T box* et *A box* vont contribuer à la reconnaissance spécifique de l'élément réponse (Umesono and Evans, 1989) (**Figure 25**). La présence de ces 2 doigts de zinc ont permis de différencier les récepteurs nucléaires des autres protéines fixant l'ADN (Berg, 1989; Klug and Schwabe, 1995).

Enfin, ce domaine peut également subir des modifications post-traductionnelles et interagir avec des facteurs de transcriptions et des co-activateurs (Germain et al., 2006).



**Figure 25** : Représentation des différentes box P, D, T, A sur le domaine fixant l'ADN d'un récepteur nucléaire (Yen, 2001).

### **C. Le domaine D**

Le domaine D, région charnière entre le domaine fixant l'ADN et le domaine fixant le ligand (LBD), est un domaine peu conservé (**Figure 24**). Il possède un signal de localisation nucléaire fonctionnel. Le rôle de ce domaine serait de permettre aux

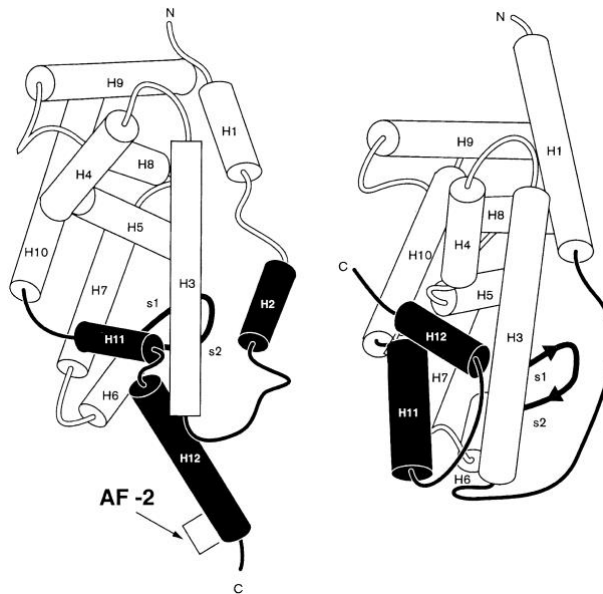
DBD et LBD différentes conformations en évitant de créer des problèmes d'entraves stériques (Germain et al., 2006).

#### **D. Le domaine E/F**

Le domaine E/F correspond au domaine fixant le ligand. C'est pour cela qu'il est également nommé *Ligand Binding Domaine* ou LBD (**Figure 24**). Ce domaine est moins conservé que le DBD. Il est composé de 12 hélices qui vont créer une poche hydrophobe. La douzième hélice possède une fonction de transactivation AF-2 qui est dépendante du ligand (**Figure 26**). Ce domaine possède 4 caractéristiques structurales distinctes. La première est une surface de dimérisation qui permet l'interaction avec les LBD des autres récepteurs nucléaires. La deuxième caractéristique est la présence d'une poche capable d'accueillir les ligands lipophiles. La troisième caractéristique est une surface de liaison capable de fixer le motif LxxLL des co-régulateurs et enfin une quatrième caractéristique est la fonction activatrice AF-2, qui est ligand dépendante (Germain et al., 2006).

Ce dernier domaine va jouer un rôle extrêmement important car avec la reconnaissance et la fixation son ligand, il assure la spécificité et la sélectivité de la réponse physiologique.

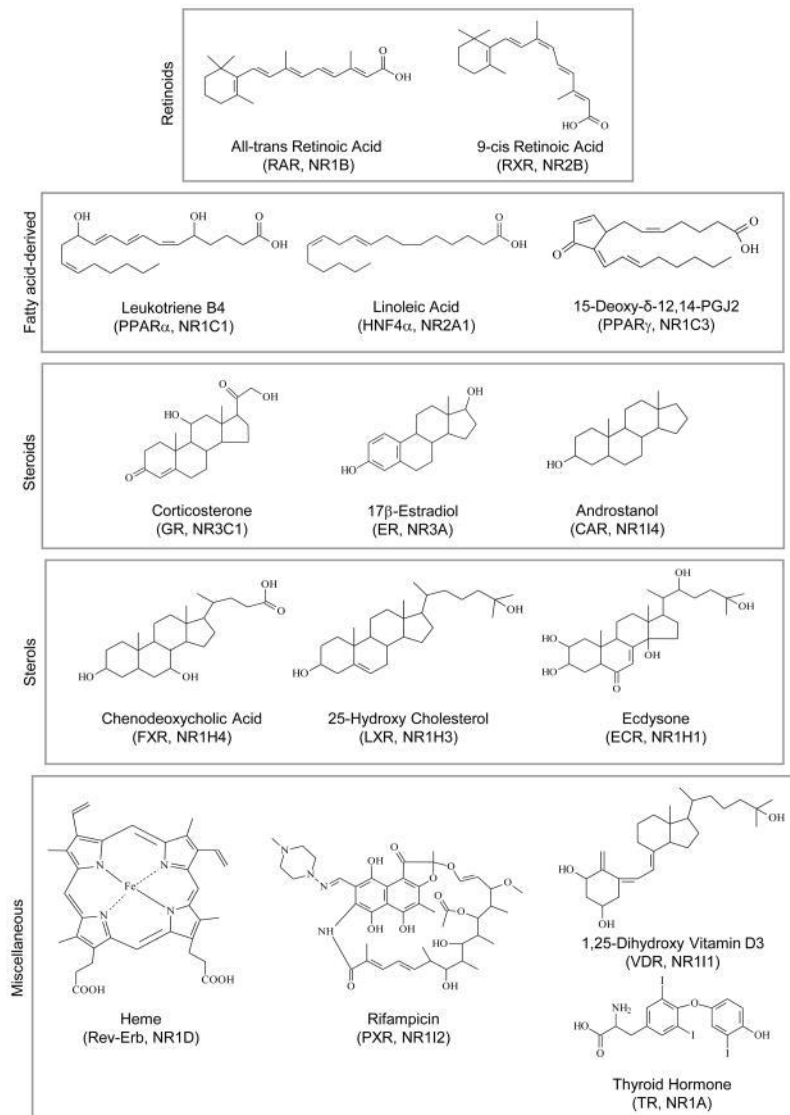
Les travaux sur les structures en 3D des différents récepteurs nucléaires ont permis de comprendre les mécanismes impliqués dans la fixation du ligand sur le domaine LBD. Suite à cette fixation, ce domaine va subir d'importantes modifications conformationnelles et permettre ainsi une interaction avec les co-régulateurs (co-activateurs ou co-represseurs). Cela aboutit à la transactivation ou la transrépression des gènes cibles (Bourguet et al., 2000).



**Figure 26** : Représentation des 12 hélices composant le domaine LBD (Aranda and Pascual, 2001).

#### **IV. Les ligands des récepteurs nucléaires**

Les ligands des récepteurs nucléaires sont divers. Cependant, ils partagent 2 caractéristiques communes : être hydrophobe et de petite taille. On retrouve diverses hormones comme les hormones thyroïdiennes, stéroïdiennes (oestrogènes, glucocorticoïdes, oxystérols, acides biliaires), l'acide rétinoïque, les acides gras, les leucotriènes, les prostaglandines (**Figure 22 et 27**) (Gronemeyer et al., 2004).



**Figure 27** : Représentation de différents ligands des récepteurs nucléaires (Sladek, 2011).

La reconnaissance du ligand par son récepteur nucléaire se fait par une reconnaissance spécifique de la structure chimique de ce dernier. La fixation du ligand va permettre la stabilisation de l'hélice 12 (qui contient l'AF-2) à l'état actif. Cette hélice 12 ne possède pas uniquement 2 positions : une active et l'autre inactive. Elle possède également des positions intermédiaires, ce qui signifie que certains composés peuvent avoir différents degrés d'agonisme ou d'antagonisme (Schoch et al., 2010).

## **A. Agonistes des récepteurs nucléaires**

Les ligands des récepteurs nucléaires ont des origines diverses : cholestérols (Hormones stéroïdes, vitamine D, acides biliaires, etc), les prostaglandines, les leucotriènes, les acides gras et les benzoates. La caractéristique hydrophobe va permettre à ces ligands de passer facilement la bi-couche lipidique des membranes cellulaires.

Les récepteurs comme PPARs (*Peroxisome Proliferator activated Receptors*) et LXR, ont de grandes poches pour fixer leur ligand alors que les récepteurs comme RARs ou TRs contiennent de petites poches. Cette différence structurale souligne une information très importante. En effet, les récepteurs avec de grandes poches vont pouvoir fixer divers ligands avec des affinités fortes comme faibles alors que pour les récepteurs avec les petites poches, eux, reconnaîtront que des ligands avec une forte affinité (Germain et al., 2006). La spécificité de la liaison au ligand va dépendre de la forme et du volume de la poche fixant le ligand et les différents acides aminés présents dans la poche. L'affinité et la spécificité sont donc deux critères importants pour la reconnaissance et la fixation du ligand à son récepteur nucléaire.

Le rôle de ces ligands est d'agir comme agoniste et de permettre une conformation stable de l'hélice 12 qui contient la fonction activatrice AF-2. Ce mécanisme est parfaitement visible aux niveaux des récepteurs RAR, PPAR et GR (Bledsoe et al., 2002; Germain et al., 2004; Xu et al., 1999). Cependant pour d'autres récepteurs nucléaires, le ligand n'agit pas directement sur l'hélice 12. Pour eux, c'est le changement conformationnel du LBD qui va permettre de stabiliser l'hélice 12. Par exemple, pour les récepteurs RXRs, c'est l'interaction de son ligand avec l'hélice 11 qui va stabiliser l'hélice 12 par la suite ou encore pour les ER, la liaison de l'agoniste va stabiliser les hélices H3 et H10 et permettre que l'hélice 12 se stabilise par la suite (Brzozowski et al., 1997; Shiau et al., 1998) (**Figure 26**).



## **B. Antagonistes des récepteurs nucléaires**

Les ligands servant d'antagonistes vont affecter négativement l'activité des récepteurs nucléaires. Les ligands antagonistes vont agir de différente manière pour empêcher l'activité du récepteur nucléaire. Ils vont ainsi empêcher la fixation du récepteur nucléaire sur son élément de réponse ou encore la dimérisation avec son homodimère ou hétérodimère. Si les agonistes sont considérés comme des molécules permettant la stabilisation de l'hélice 12 en conformation active, les antagonistes doivent être considérés comme l'inverse et donc comme des molécules qui vont empêcher cette conformation (Brzozowski et al., 1997).

Beaucoup d'antagonistes présentent une chaîne latérale volumineuse qui ne peut pas se loger dans la poche fixant le ligand. Parmi ces molécules, on retrouve le 4-Hydroxytamoxifène (antagoniste de ER $\alpha$ ) ou encore le LBD-BMS614 (antagoniste de RAR $\alpha$ ). Un certain nombre d'antagonistes ne présente pas de longue chaîne latérale, c'est le cas du flumattide ou de la progestérone, tous 2 antagonistes des récepteurs AR et MR (récepteur aux minéralocorticoïdes).

On peut raisonner que ces antagonistes vont empêcher l'hélice 12 d'adopter sa conformation active et empêcher l'interaction entre le récepteur nucléaire et ces co-activateurs. Dans ce cas, on parle d'antagonistes purs (Germain et al., 2006).

## **C. Agonistes inverses**

Les agonistes inverses correspondent à des ligands synthétiques capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle d'un récepteur nucléaire en l'absence d'agoniste. Par exemple, certains antagonistes synthétiques de RAR sont capables de jouer le rôle d'agoniste inverse et d'induire une interaction co-répressive et améliorer la répression d'un gène (Germain et al., 2002; Klein et al., 1996).

## **D. Agonistes partiels**

Il existe également des agonistes partiels encore appelés agonistes-antagonistes partiels. Ces composés restent de puissants ligands mais leur efficacité est diminuée en comparaison aux agonistes purs.

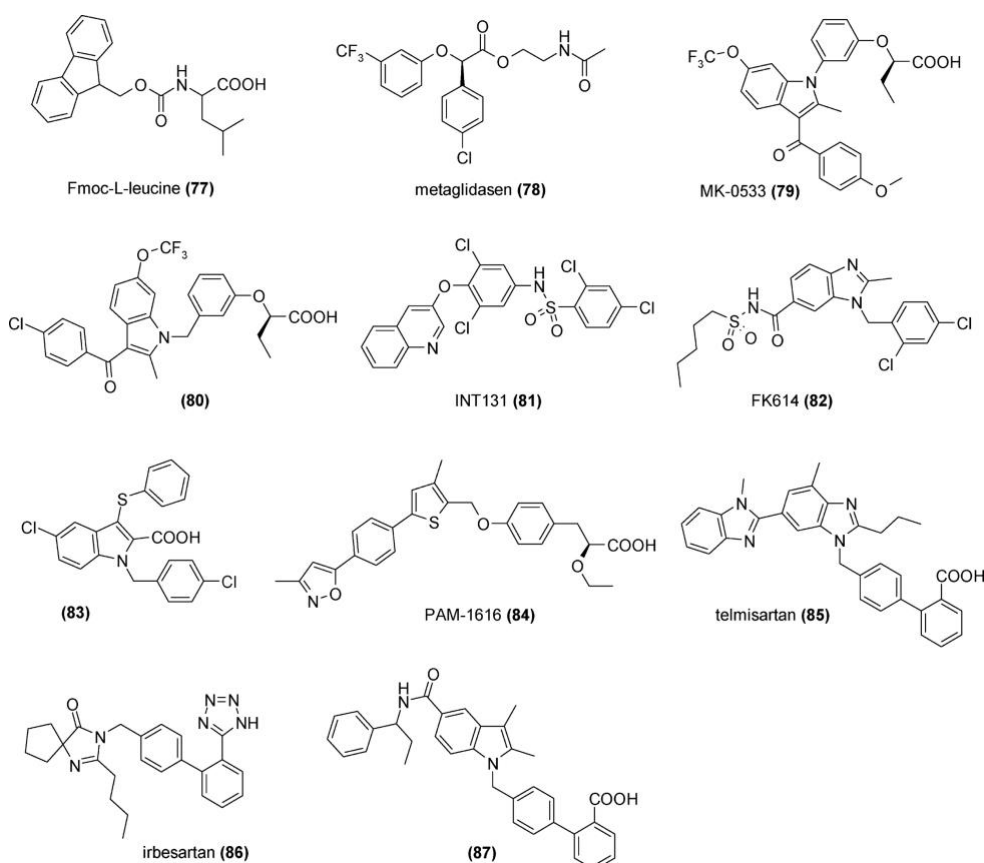
La perte d'activité transcriptionnelle est principalement due à une perte d'interaction avec l'hélice 12 (ou hélice 3 ou hélice 11 selon les récepteurs) avec le ligand et cela provoquera une diminution de stabilité (Germain et al., 2006).

## **E. Modulateurs sélectifs des récepteurs nucléaires**

Les modulateurs sélectifs des récepteurs nucléaires (*Selective Nuclear Receptor Modulator* ou SNuRM) peuvent être considérés comme des agonistes-antagonistes partiels. On retrouve ainsi des SERM (*Selective Estrogene Receptor Modulator*), SARM (*Selective Androgen Receptor Modulator*), SPPARMs (*Selective PPARs Modulators*) (**Figure 28**) (Smith and O'Malley, 2004). Cette propriété agoniste-antagoniste est associée au recrutement différentiel de co-activateurs ou co-represseurs selon l'expression tissulaire de ces co-modulateurs.

Pour un ligand donné, spécifique de son récepteur nucléaire, il va jouer le rôle d'un agoniste pur/complet dans un type cellulaire, et ainsi stabiliser l'hélice 12 et le recrutement ensuite des co-activateurs. Mais dans un autre type cellulaire, il peut jouer le rôle inverse, en ne permettant pas la stabilisation de l'hélice 12 et en permettant le recrutement de co-represseurs. Le tamoxifène ou le raloxifène sont de bons exemples pour illustrer ce propos. En effet, au niveau de cellules mammaires, ces 2 ligands vont induire le recrutement de co-represseurs (donc un rôle d'agoniste inverse) pour cibler les promoteurs de gènes. Néanmoins, dans les cellules endométriales, le tamoxifène, mais pas le raloxifène, va se comporter comme un agoniste pur/complet et induire le recrutement de co-activateurs sur certains gènes (Berry et al., 1990; McInerney and Katzenellenbogen, 1996; Metzger et al., 1992; Webb et al., 1998).

Pour un tissu donné, la réponse du récepteur nucléaire va dépendre de la concentration des co-activateurs et des co-represseurs présents et de l'équilibre global. Ils agiront avec les récepteurs nucléaires ayant fixé leur ligand et selon la modification conformationnelle produite (Nagy and Schwabe, 2004) . Ceci aboutit sur la possibilité de faire des ligands synthétiques sélectifs pouvant être soit des agonistes complets, partiels ou inverses ou encore des molécules qui vont activer un sous-ensemble de fonctions induites par un ligand donné dans un type cellulaire particulier. Cette possibilité est très intéressante pour la recherche pharmaceutique et le développement de principe actif agissant que sur un type cellulaire en particulier (Gronemeyer et al., 2004).



**Figure 28** : Exemple de SNuRM : les SPPARMs (Pirat et al., 2012).

## **F. Les vrais récepteurs orphelins**

Parmi les 48 récepteurs nucléaires humains, certains sont encore considérés comme orphelins car aucun ligand physiologique n'a encore été découvert. Des récepteurs dit « vrais orphelins » pourraient exister et auraient pour caractéristique de ne pas reconnaître de ligand endogène et auraient une conformation active de l'hélice 12 (Sablin et al., 2003).

## **V. Rôle/fonction des récepteurs nucléaires.**

Les récepteurs nucléaires vont moduler la transcription à travers de nombreux mécanismes. La signalisation des récepteurs nucléaires est très complexe. En effet, elle peut être génomique ou non génomique, dépendante ou indépendante d'un ligand. Son activité peut ainsi permettre l'activation ou la répression d'un gène, la libération de cette répression ou encore la transrépression d'un gène (Haffner et al., 2002).

Parmi les 48 récepteurs nucléaires, seuls 24 sont des facteurs de transcriptions ligand dépendant répondant à un grand nombre de substances hormonales et métaboliques (**Figure 22 page 68**).

La fixation de ces ligands va provoquer une modification conformationnelle du récepteur nucléaire. Elle va permettre ainsi le recrutement de co-régulateurs transcriptionnels (co-activateurs ou co-represseurs) et qui eux-mêmes permettront des modifications de la chromatine. L'action principale des récepteurs nucléaires ayant fixé leur ligand est de se placer sur l'élément de réponse du site promoteur du gène cible et d'améliorer la transcription de ce gène (Roeder, 1996).

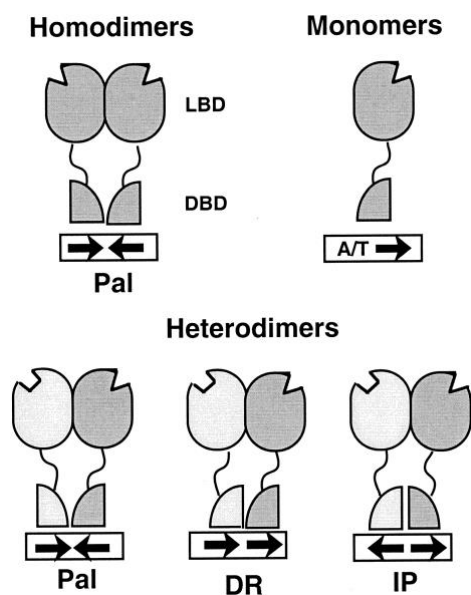
Certains récepteurs nucléaires peuvent avoir une double fonction. En effet, en l'absence de leur ligand, ils vont se fixer sur l'ADN et recruter des complexes co-represseurs. On parle de « *silencers of transcription* ». Mais lorsque leur ligand sera présent et qu'ils l'ont fixé, la transcription sera activée. Parmi ces récepteurs nucléaires, on retrouve RARs ou encore TRs.

## **A. Reconnaissance de l'ADN**

Il s'agit d'une des étapes les plus importantes de la transcription d'un gène. Les récepteurs nucléaires se fixent spécifiquement au niveau de l'élément de réponse situé en amont du gène, sous forme de monomère, d'homodimère ou d'hétérodimère (**Figure 29**). Pour rappel, les récepteurs DAX-1 et SHP ne possèdent pas de DBD et ne se fixent donc pas à l'ADN (Kumar et al., 2004). Les éléments de réponses sont une répétition d'une séquence consensus. Il s'agit de séquences de nucléotides formant des répétitions directes, indirectes ou inversées et se composant généralement de 2 demi-sites séparés par un ou plusieurs nucléotides (Chambon, 1996; Laudet et al., 1992; Mangelsdorf and Evans, 1995). Ainsi, les éléments de réponses seront spécifiques de leur récepteur nucléaire et seront définis selon leur séquence nucléotidique des deux demi-sites, le nombre de paire de bases qui sépare les 2 demi-sites et l'orientation relative des motifs.

Pour exemple, les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (sauf les récepteurs aux oestrogènes) forment tous des homodimères qui vont reconnaître le même élément de réponse contenant des répétitions inversées de la séquence 5'-AGAACA-3' séparée par 3 nucléotides entre chaque répétition (Beato et al., 1995) (**Figure 29**).

Pour les autres récepteurs (non stéroïdiens), ils vont reconnaître la séquence consensus 5'-AGGTCA-3'. Parmi ces récepteurs, on retrouve les récepteurs qui vont former des hétérodimères avec RXR. Les éléments de réponses que reconnaissent ces hétérodimères sont appelés « répétitions directes » ou DR. On retrouve ainsi un classement de DR de DR1 à DR5, avec le chiffre qui représente le nombre de nucléotides qui sépare les 2 demi-sites (Rastinejad, 2001; Shaffer and Gewirth, 2002; Zhao et al., 2014) (**Figure 29**).

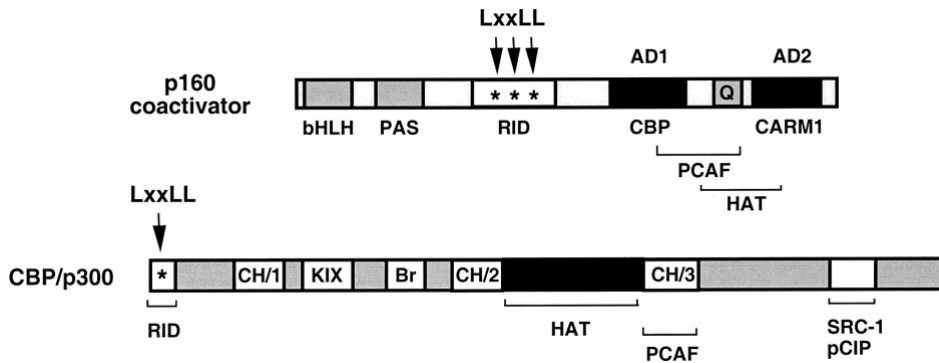


**Figure 29** : Représentation des différentes configurations possibles de la fixation des récepteurs nucléaires : en monomère, homodimère, hétérodimère et les différents éléments de réponses (Pal = palindromes= inversées ; DR= Direct repeat = répétitions directes ; IP = Inverted palindrome = répétitions indirectes) (Aranda and Pascual, 2001).

## **B. Activation transcriptionnelle**

Lorsque le ligand se fixe à son récepteur, il se produit un changement conformationnel au niveau du LBD et le récepteur nucléaire évolue d'un statut inactif à un statut actif. Suite à cette étape, il s'en suit un recrutement de co-régulateurs, qui possèdent des activités enzymatiques pouvant modifier la chromatine et nécessaires pour la transcription (Bourguet et al., 2000; Shang et al., 2000). Les récepteurs nucléaires vont ainsi faciliter le recrutement et l'action des différents mécanismes de la machinerie transcriptionnelle (**Figure 32**) (Roeder, 1996).

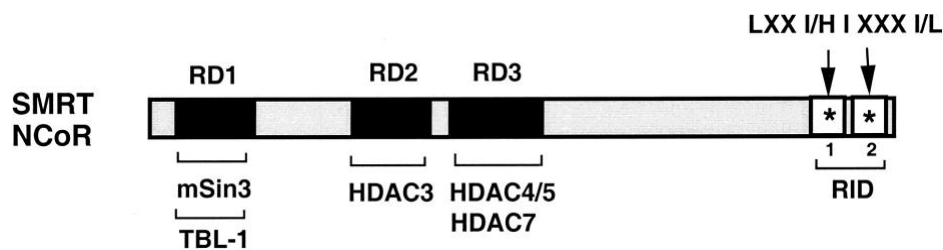
Parmi les co-régulateurs, on retrouve la famille de protéines p160 et p300 (**Figure 30**) (Chen et al., 2000; McKenna and O'Malley, 2002; Vo and Goodman, 2001). La famille p160 comprend les protéines SRC-1, TIF2 et RAC3 (Chen et al., 2006b). Ils sont considérés comme des co-activateurs et interagissent physiquement avec le LBD via leur motif LxxLL (L : leucine, x : autre acide aminé) (Heery et al., 1997).



**Figure 30** : Représentation des activateurs p160 et p300 (Aranda and Pascual, 2001).

Certains récepteurs nucléaires sont capables de se fixer sur l'ADN en l'absence de leur ligand. Ces derniers vont se fixer de façon constitutive sur la zone promotrice du gène cible et vont pouvoir avoir une fonction répressive (Baniahmad et al., 1995) (**Figure 32**). Parmi ces récepteurs, on retrouve les récepteurs thyroïdiens.

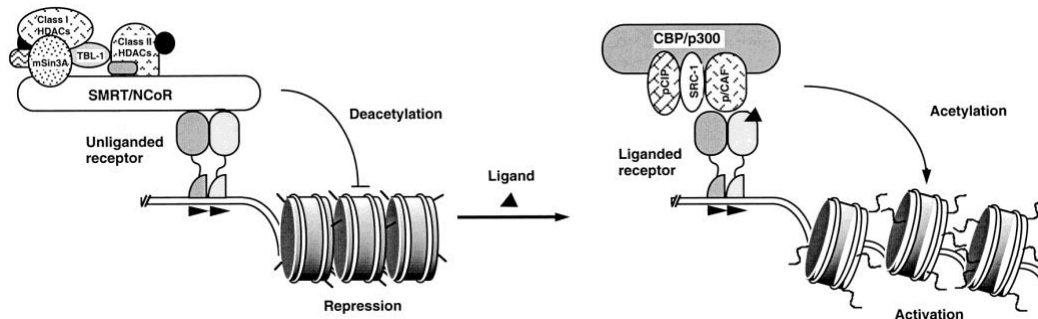
Enfin, les 2 récepteurs n'ayant pas de DBD (DAX-1 et SHP), vont agir comme répresseur. En effet, SHP est un inhibiteur pour certain NR. Il se fixe sur le domaine d'activation AF-2 et cela aboutit à l'inhibition du récepteur nucléaire. Cela implique donc la compétition entre l'action co-activatrice et la répression active (Båvner et al., 2005).



**Figure 31** : Représentation du corépresseur NCoR (Aranda and Pascual, 2001).

Le choix des co-activateurs et des co-répresseurs dépend essentiellement du ligand et de sa fixation sur le récepteur nucléaire. En effet, en son absence, le domaine LBD adopte une position conformationnelle qui va donner l'opportunité de présenter des sites où des molécules co-répressives pourront se loger. Parmi les co-répresseurs on retrouve NCoR (*Nuclear receptor Co-Repressor*) (**Figure 31**). Mais lorsque le ligand va se fixer sur son site, les modifications conformationnelles vont faire que les endroits,

où les co-répresseurs pouvaient se fixer, ne seront plus accessibles et ce sont les sites des co-activateurs qui seront accessibles (Hu and Lazar, 1999) (**Figure 32**).



**Figure 32** : *Activité transcriptionnelle ou répressive d'un récepteur nucléaire en présence de corépresseur ou de co-activateurs (Aranda and Pascual, 2001).*

### **C. Transrépression d'un gène**

La transrépression est une action du récepteur nucléaire qui a pour but de réprimer un gène. La transrépression ne nécessite pas la fixation du récepteur nucléaire sur l'ADN. En effet, le récepteur nucléaire va se fixer sur un autre facteur de transcription et inhiber son activité transcriptionnelle. Par exemple, le récepteur PPAR $\gamma$  peut, dans certaines situations, inhiber les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B ou AP-1 (*Activator Protein-1*) et empêche l'induction de gènes pro-inflammatoires (Haffner et al., 2002).

### **D. Activité post traductionnelles**

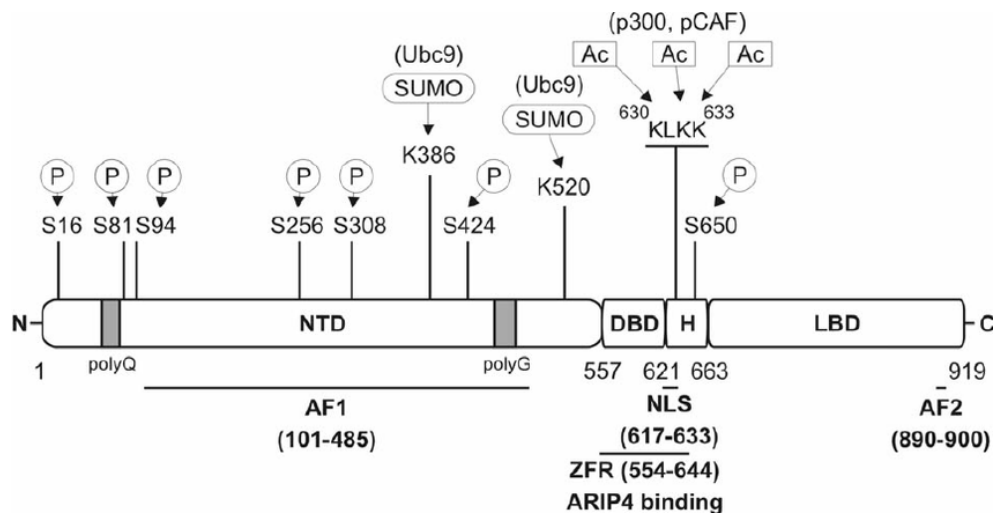
L'activité transcriptionnelle peut être modulée par des modifications post-traductionnelles au niveau des récepteurs nucléaires mais également des corégulateurs. Parmi ces modifications, on va retrouver des phosphorylations, des



acétylations, des ubiquitylations, SUMOylation, méthylation, etc... (Fu et al., 2002; Kouzarides, 2000; Perissi and Rosenfeld, 2005; Wang et al., 2001b) (**Figure 33**).

Les kinases qui vont agir sur les récepteurs nucléaires ou leurs co-régulateurs, vont ainsi pouvoir jouer plusieurs rôles, comme la possibilité d'améliorer l'activation de la transcription. Les différents co-régulateurs (SRC-1, TIF2, RAC3) sont des phosphoprotéines et des cibles pour les kinases. Elles peuvent permettre d'améliorer l'interaction des co-activateurs avec les récepteurs nucléaires (Font de Mora and Brown, 2000; Rowan et al., 2000).

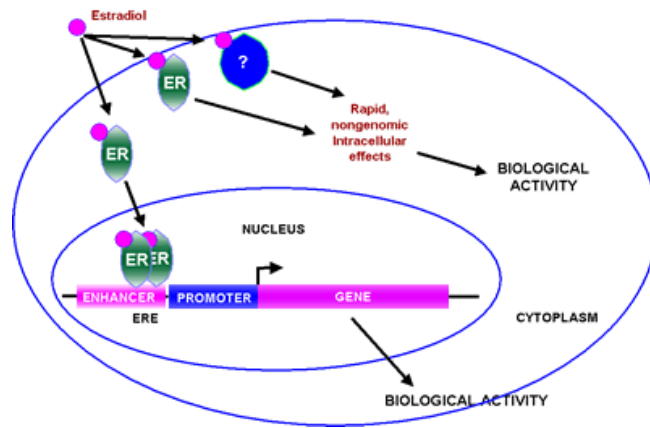
La phosphorylation de certaines régions du récepteur nucléaire aura une conséquence inverse, comme la dissociation entre l'ADN et le récepteur nucléaire, ou une diminution d'affinité avec son ligand (Bastien and Rochette-Egly, 2004).



**Figure 33** : Représentation d'un récepteur aux androgènes avec les différents sites de phosphorylation (P), de SUMOylation (SUMO), acétylation (Ac) (Fu et al., 2002).

## **E. Effets non-génomiques**

Il semble qu'il existe une autre activité des récepteurs nucléaires qui serait non-génomique (**Figure 34**). Cette activité serait vue particulièrement chez les récepteurs aux stéroïdes. Ces récepteurs, en dehors de l'activation transcriptionnelle, seront capables de modifier l'activité de certaines enzymes et de canaux ioniques (Aronica et al., 1994; Improta-Brears et al., 1999; Migliaccio et al., 1996).



**Figure 34** : Illustration de l'effet non-génomique du récepteur nucléaire à l'oestradiol<sup>13</sup>.

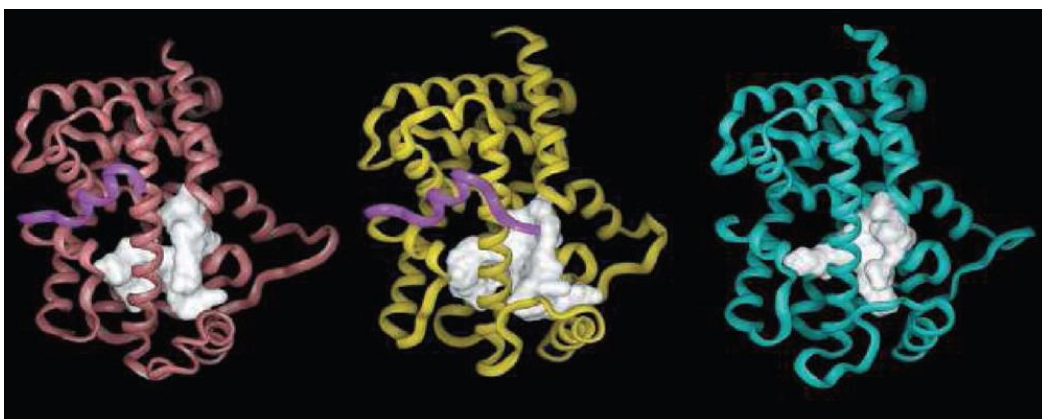
<sup>13</sup> <http://www.angelfire.com/sc3/toxchick/endocrinology/endocrinology04.html>

# Les récepteurs PPARs

## I. Introduction

Les protéines *Peroxisome Proliferator Activated Receptor* (PPAR) appartiennent au premier groupe de la super famille des récepteurs nucléaires (**Figure 22 page 68**). Initialement, ces récepteurs nucléaires furent considérés comme des récepteurs orphelins. Trois sous-types de ce récepteur ont été isolés et caractérisés : PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  et PPAR $\gamma$  (Dreyer et al., 1992; Issemann and Green, 1990). Ces 3 membres sont codés par différents gènes situés sur différents chromosomes. Malgré un niveau élevé de séquences et d'homologies structurelles (**Figure 35**), les différents sous-types de PPARs ont des profils d'expression tissulaire unique (Shearer and Billin, 2007).

Les récepteurs PPARs influencent les fonctions cellulaires en induisant ou réprimant certains gènes. Ils agissent principalement au niveau du métabolisme glucidique, lipidique et du cholestérol (Monsalve et al., 2013). C'est pour cela que ces récepteurs ont été considérés comme des cibles très intéressante pour le développement de thérapeutiques pour traiter les patients atteints de dyslipidémies ou de diabète de type 2.



**Figure 35** : Représentation tridimensionnelle du site de liaison du ligand de chaque sous-type de PPAR : PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  et PPAR $\gamma$  (Pirat et al., 2012).

## II. Fixation et rôles des récepteurs PPARs

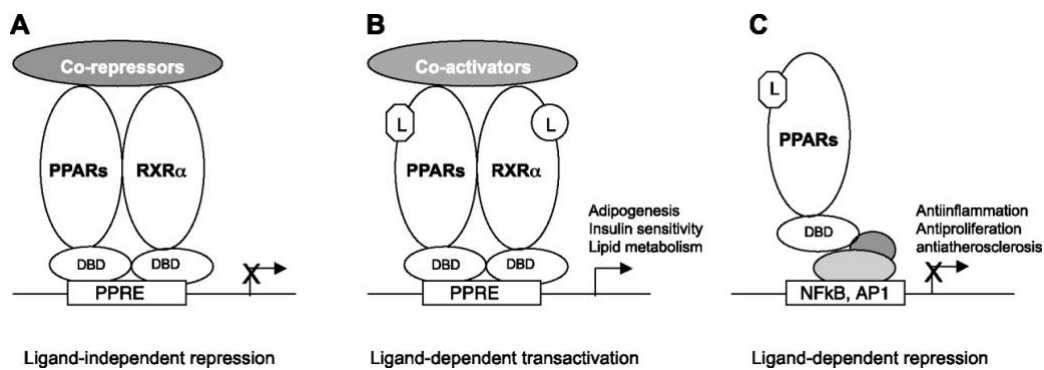
Afin que PPAR puisse être activé, il est indispensable que ce dernier soit lié à son hétérodimère : le *9-cis-retinoic acid receptor* (RXR). Le complexe PPAR/RXR va se fixer sur des régions spécifiques de l'ADN : les éléments de réponse. Ils sont localisés sur les régions promotrices de gènes cibles (en amont du gène) et sont appelés *peroxisome proliferator response element* (PPRE) (Kliwer et al., 1992) (**Figure 36**). Un PPRE est composé de la répétition d'une séquence consensus : AGGTCA, généralement espacée par un, deux ou trois nucléotides. Ces PPRE prendront le nom de *direct repeat 1* (DR1) lorsqu'il n'y aura qu'un nucléotide qui sépare les deux séquences consensus, DR2 si deux nucléotides, etc.

Les récepteurs nucléaires PPARs vont avoir plusieurs rôles dans les cellules :

- Après fixation de son ligand, PPAR va s'hétérodimériser avec le récepteur RXR et se fixer sur un PPRE. Les co-activateurs joueront un rôle important dans la modification structurale de la chromatine pour faciliter l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle au niveau du promoteur. Cela aboutit à l'activation ligand dépendant des gènes cibles (**Figure 36B**).

- Son second rôle va être la répression des gènes cibles en l'absence de ligands. On parle de répression ligand indépendante. Dans ce cas, PPAR-RXR, va interagir/recruter des co-répresseurs, qui vont inhiber la fixation/recrutement de co-activateurs et vont maintenir un état réprimé des gènes cibles en l'absence de ligand (**Figure 36A**).

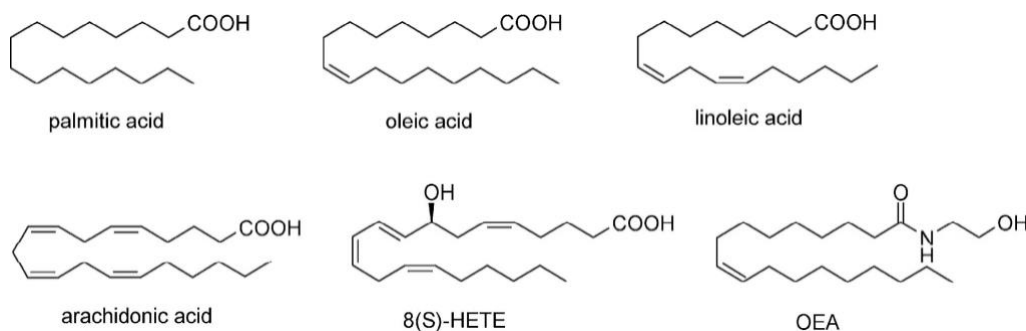
- Enfin le dernier rôle est un rôle de transrépression (Ricote and Glass, 2007). Il s'agit d'une régulation négative des gènes de manière ligand dépendant. Contrairement à l'activation ou la répression des gènes cibles, l'hétérodimère PPAR/RXR ne se fixe pas sur son élément de réponse pour agir lors de la transrépression. Son action répressive se fait directement sur d'autres facteurs de transcriptions. Parmi ces cibles potentielles, on retrouve les facteurs de transcriptions NF-kB ou encore AP-1, qui sont connus pour être 2 facteurs de transcriptions pouvant activer des gènes codant des cytokines ou molécules « pro-inflammatoires » (**Figure 36C**) (Glass and Ogawa, 2006; Pascual and Glass, 2006).



**Figure 36 :** Différentes actions des récepteurs PPARs sur la transcription. (A) Répression de gènes cibles de PPARs en l'absence de ligand. (B) Activation ligand dépendant de gènes cibles par l'hétérodimère RXR-PPAR. (C) Transrépression de PPAR sur d'autres facteurs de transcription (Ruan et al., 2008).

### III. Le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$

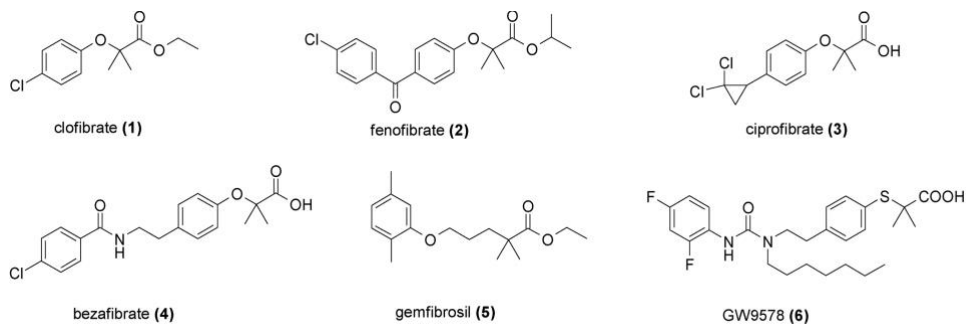
Le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  a été le premier récepteur PPAR caractérisé. Il est exprimé dans les tissus adipeux bruns, le foie, les reins, le cœur et le muscle squelettique. Il est présent dans les tissus avec un fort taux de catabolisme des acides gras. Il régule le métabolisme des acides gras et inhibe l'inflammation. Les agonistes naturels de PPAR $\alpha$  sont des acides gras comme l'acide palmitique, l'acide oléique ou encore l'acide linoléique (**Figure 37**).



**Figure 37 :** Agoniste naturel de PPAR $\alpha$  (Pirat et al., 2012).

PPAR $\alpha$  est une cible thérapeutique. Les fibrates hypolipémiants constituent une famille d'agonistes synthétiques thérapeutiques de PPAR $\alpha$ . On retrouve dans cette

famille le clofibrate ou encore le bezafibrate (**Figure 38**). Ils vont permettre d'augmenter la clairance des lipides en diminuant les VLDL (Lipoprotéines de faible densité) et les apo-Protéines sériques et en augmentant les HDL (Lipoprotéine de haute densité). C'est pour cela que les fibrates sont utilisés pour le traitement de la dyslipidémie associée à l'athérosclérose. Ils permettent de ralentir la formation de plaque d'athérosclérose et de réduire le nombre d'accidents coronariens chez les patients ayant un taux normal de LDL-cholestérol et chez les patients diabétiques (Staels et al., 1998).



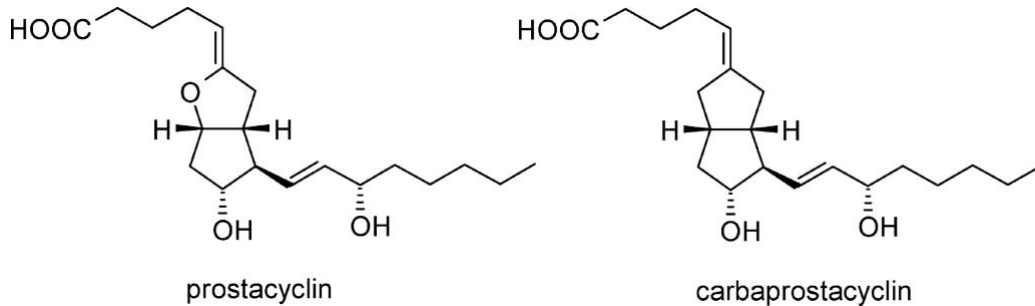
**Figure 38** : Agonistes synthétiques de PPAR $\alpha$  dont des molécules de la famille des fibrates, (Pirat et al., 2012).

Les agonistes de PPAR $\alpha$  peuvent diminuer l'expression de VCAM-1. De plus, PPAR $\alpha$  inhibe l'activité de NF- $\kappa$ B et AP-1 et réduit également les taux plasmatiques de l'IL-6, du fibrinogène et des protéines C-réactive (Pirat et al., 2012).

#### **IV. Le récepteur nucléaire PPAR $\beta/\delta$**

Le deuxième sous-type correspond à PPAR $\beta/\delta$ . Bien que découvert plus ou moins en même temps que PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ , il reste le moins compris. Cela vient probablement du fait qu'il est exprimé de façon ubiquitaire. Des études montrent qu'il jouerait un rôle dans le catabolisme des acides gras mais également dans la régulation glucidique en améliorant la résistance à l'insuline et réduisant la glycémie (Lee et al., 2006). Il aurait un rôle dans la dyslipidémie, différents cancers ou encore dans la

fertilité (Pirat et al., 2012). La prostacycline et la carbaprostacycline constituent 2 agonistes naturels de PPAR $\beta/\delta$  (**Figure 39**).



**Figure 39** : Ligands naturels de PPAR $\beta/\delta$  (Pirat et al., 2012).

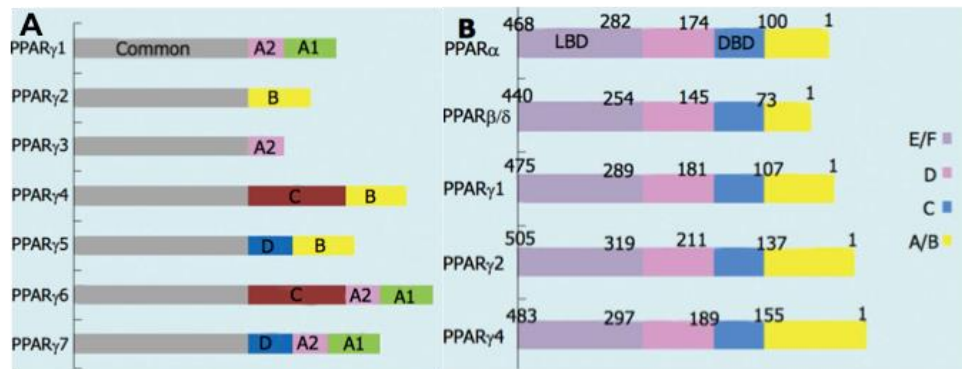
## V. Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$

### A. Les isoformes de PPAR $\gamma$

Le dernier sous-type est le récepteur PPAR $\gamma$ . Il reste le récepteur le plus étudié. S'il est principalement exprimé dans les tissus adipeux, on le retrouve également dans le cœur, le côlon, le rein, la rate, l'intestin, le muscle squelettique, le foie et les macrophages (Ricote et al., 1998a; Tontonoz and Spiegelman, 2008).

Il existe au niveau des tissus humains, 7 transcrits différents du gène PPAR $\gamma$ . Cependant seules 3 protéines sont exprimées. Les transcrits 1, 3, 5 et 7 donnent une protéine structurellement identique : PPAR $\gamma$ 1. Le transcrit 2 donne la protéine PPAR $\gamma$ 2, qui diffère par son domaine N-terminal (plus long de 28-30 acides aminés) et enfin les transcrits 4 et 6 donnent la protéine PPAR $\gamma$ 4 (**Figure 40 A et B**) (Usuda and Kanda, 2014). Le transcrit 1 est exprimé dans un très grand nombre de tissus dont les tissus cardiaques, muscles squelettiques, cellules  $\beta$  du pancréas, la rate, l'intestin, les macrophages, etc. Le transcrit 2 est, quant à lui, majoritairement exprimé dans les tissus adipeux (blancs et bruns). Le transcrit 3 est exprimé abondamment dans les

macrophages mais également dans le côlon et les adipocytes. La différence au niveau fonctionnel de ces deux transcrits (le 2 et le 3) n'est pas encore clairement comprise. Les transcrits 4, 5, 6 et 7 sont essentiellement exprimés au niveau des macrophages mais les transcrits 6 et 7 sont également retrouvés dans les tissus adipeux (Usuda and Kanda, 2014).



**Figure 40** : Représentation des 7 transcrits de PPAR $\gamma$  et des 3 protéines de PPAR $\gamma$  (Usuda and Kanda, 2014).

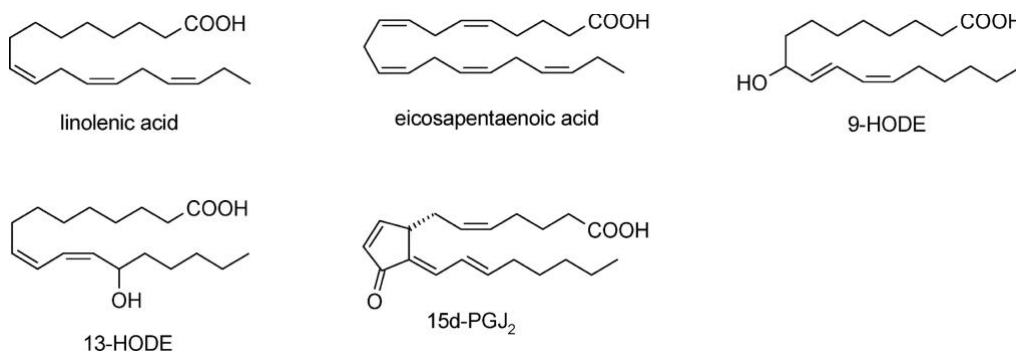
PPAR $\gamma$  joue un rôle important dans l'organisme. A l'origine, son expression a été mise en évidence au niveau du tissu adipocytaire. En plus de jouer un rôle primordial dans le métabolisme lipidique et la sensibilité à l'insuline (Tontonoz and Spiegelman, 2008), il est indispensable dans la différenciation des adipocytes. Il est capable d'intervenir sur la modulation de réponses immunitaires et inflammatoires. Il est exprimé dans des cellules immunitaires comme les lymphocytes B et T (Clark et al., 2000; Padilla et al., 2002), les macrophages (Ricote et al., 1998a), les cellules dendritiques (Gosset et al., 2001). Diverses études ont mis en évidence le rôle anti-inflammatoire de PPAR $\gamma$  et de ses ligands au niveau des cellules lymphoïdes et myéloïdes (Odegaard et al., 2007; Ramon et al., 2012; Tontonoz and Spiegelman, 2008; Welch et al., 2003). Parmi elles, la première étude montra que les ligands de PPAR $\gamma$  étaient capables d'inhiber l'expression de cytokines inflammatoires de macrophages (dont le TNF $\alpha$ ) (Jiang et al., 1998; Ricote et al., 1998b).



## B. Les ligands de PPAR $\gamma$

L'une des caractéristiques importante du récepteur PPAR $\gamma$  est sa capacité de fixer différents ligands (Bull et al., 2003; Hihi et al., 2002; Itoh et al., 2008). Cependant, il faut souligner que beaucoup de ces ligands n'ont qu'une faible affinité avec le récepteur. En effet, les concentrations de ligands nécessaires pour activer PPAR $\gamma$  *in vitro* sont supérieures aux concentrations physiologiques, ce qui amène à se demander si ceux-ci sont réellement des ligands endogènes. Une autre notion importante est l'existence, parmi tous ces agonistes, de modulateurs spécifiques de PPAR $\gamma$  (SPPARMs) (Higgins and Depaoli, 2010) (**Figure 28 page 78**). Pour rappel, il est possible d'obtenir deux réponses différentes sur la transcription d'un gène suivant l'agoniste de PPAR $\gamma$  utilisé. Cette différence de réponse s'explique essentiellement par la forme des molécules qui va modifier la structure du récepteur nucléaire et donc modifier l'ancrage de co-facteurs différents (Higgins and Depaoli, 2010).

Les acides gras oxydés sont des ligands naturels de PPAR $\gamma$  (**Figure 41**). Ils sont capables de se fixer sur un résidu cystéine du site LBD de PPAR $\gamma$  via une liaison covalente. Ces ligand vont être capable d'activer de manière plus longue et à faible concentration les récepteurs PPAR $\gamma$  (Itoh et al., 2008). Cette découverte est très importante et ouvre la voie pour la synthèse de nouvelles molécules ayant de meilleures affinités avec PPAR $\gamma$ .

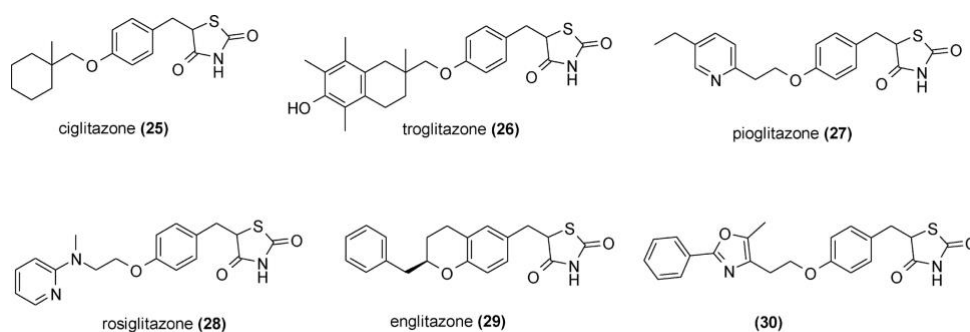


**Figure 41** : Agonistes naturels de PPAR $\gamma$  (Pirat et al., 2012).

La famille de molécules chimiques reconnue pour faire partie des ligands de PPAR $\gamma$  est la famille des thiazolidine-2,4-diones (TZD) (Lehmann et al., 1995) (**Figure**

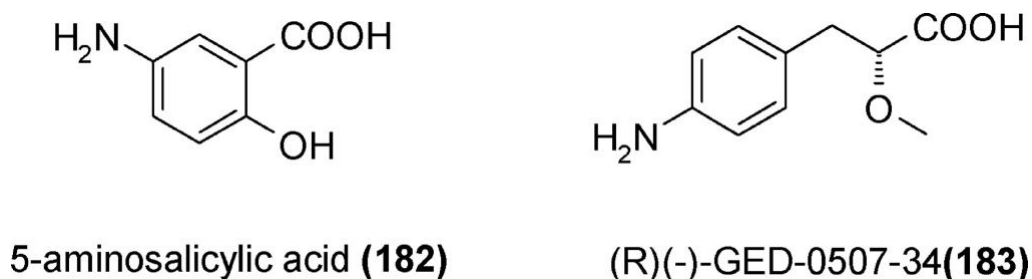
**42).** Cette famille (surnommée « famille des glitazones ») est historiquement connue par la commercialisation de ces différents membres en tant que traitements antidiabétiques (Gurnell et al., 2003). Parmi les molécules connues, sont retrouvées la troglitazone, la rosiglitazone et surtout la pioglitazone. Cependant, ces molécules ont été retirées du marché il y a quelques années à cause des effets secondaires délétères qu'elles pouvaient occasionner : rétention hydro-sodée, hépatotoxicité, accroissement du risque d'accident cardio-vasculaire (AVC) ou infarctus du myocarde (IDM) (pour la rosiglitazone) (Cariou et al., 2012) ou encore le faible risque de cancer de la vessie (pioglitazone). Cependant, ce risque de cancer de la vessie est contesté par de récentes données (Dong and Wang, 2016; Korhonen et al., 2016). La principale raison des effets secondaires s'explique par le fait que l'ensemble des fonctions de PPAR $\gamma$  dans l'organisme est encore mal connue. Son activation reste un mécanisme biochimique très puissant pour lequel toutes les facettes n'ont pas encore été élucidées.

De plus, cette famille semble avoir également une activité anti-inflammatoire. En effet, sur des modèles de rat exprimant des signes cliniques d'arthrite rhumatoïde, la pioglitazone et la rosiglitazone ont permis de diminuer les marqueurs d'inflammations synoviales et la sévérité de l'arthrite (Koufany et al., 2008; Shiojiri et al., 2002). Plus intéressant, une étude clinique randomisée double aveugle a montré l'efficacité d'un traitement par rosiglitazone en comparaison à un placebo chez des patients atteints de RCH (Lewis et al., 2008).



**Figure 42 :** Molécules composant la famille chimique « Glitazones » (Pirat et al., 2012).

Les travaux de Rousseaux *et al.* ont permis de mettre en évidence que PPAR $\gamma$  serait une cible (parmi d'autres) du 5-ASA (Rousseaux et al., 2005). Pour rappel, le 5-ASA est le traitement de première intention pour les patients souffrants de RCH. De nouveaux modulateurs spécifiques de PPAR $\gamma$  ont été synthétisés à partir d'un *drug design* du 5-ASA. Parmi ces molécules, le GED-0507-34-levo (acide amino-phényl-methoxy-propionique) a montré des résultats très intéressants (**Figure 43**) (Pirat et al., 2012; Rousseaux et al., 2011). Cette molécule, actuellement en phase 2 pour le traitement de la RCH, présente une activité anti-inflammatoire identique au 5-ASA mais à une concentration 30 fois inférieure à ce dernier.



**Figure 43** : Représentation des molécules du 5-ASA et du GED-0507-34. (Pirat et al., 2012)

Plus récemment, une nouvelle molécule synthétique, appelée 2-hydroxyethyl 5-chloro-4,5-didehydrojasmonate (J11-Cl) a montré qu'elle est capable d'activer les récepteurs PPAR $\gamma$  et d'avoir des effets anti-inflammatoires sur l'inflammation intestinale. Il s'agit d'une molécule ayant une structure similaire à la 15-dexo- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J<sub>2</sub> (15d-PJ<sub>2</sub>) (**Figure 41 page 92**), qui est un ligand endogène de PPAR $\gamma$ . Cette nouvelle molécule semble se fixer sur le LBD de PPAR $\gamma$  de la même manière que pour la 15d-PJ<sub>2</sub> et la rosiglitazone. Chez la souris, il est clairement montré que la J11-Cl augmente significativement l'activité transcriptionnelle de PPAR $\gamma$  et réduit l'inflammation intestinale. Elle va diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8) et inhiber les voies d'activation de NF- $\kappa$ B et de MAPK. Cette molécule pourrait donc être un candidat intéressant pour un futur traitement des MICI (Choo et al., 2015).

PPAR $\gamma$  pourrait également jouer un rôle dans l'action anti-inflammatoire d'une famille d'antiémétique : la famille des sétrons. Les sétrons sont des molécules

antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>3</sub>. Ils sont principalement utilisés pour limiter les vomissements induits par les chimiothérapies (Fakhfour et al., 2015). Chez le rat ayant une colite induite par de l'acide acétique, le tropisétron a montré des effets anti-inflammatoires sur les muqueuses intestinales. De plus, une augmentation de l'activité de PPAR $\gamma$  et une diminution de l'activité de la MPO sont observées. Cependant, lorsque le GW9662 est administré en parallèle du tropisétron, les effets anti-inflammatoires de ce dernier disparaissent. Ce qui permet de conclure que les effets anti-inflammatoires du tropisétron sont probablement médiés par le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (Rahimian et al., 2016).

### **C. Expression et rôle de PPAR $\gamma$ dans le côlon**

Après le tissu adipeux, l'organe exprimant le plus PPAR $\gamma$  est le côlon et plus particulièrement les CEI du côlon. L'expression de PPAR $\gamma$  est élevée au niveau du côlon distal puis elle diminue progressivement vers le côlon proximal et est beaucoup plus faible dans l'intestin grêle (Su et al., 2007). Ses différents rôles au niveau de la CEI ne sont encore pas entièrement connus mais il semble jouer un rôle sur la maturation, l'adhésion cellulaire et la motilité des colonocytes (Chen et al., 2006a; Gupta et al., 2001; Su et al., 2007). PPAR $\gamma$  jouerait également un rôle dans l'homéostasie intestinale. En effet, différentes équipes de recherche, dont la nôtre, ont mis en évidence une augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$  dans les CEI de côlon en présence de la flore intestinale (Dubuquoy et al., 2003), de produits bactériens (LPS ou butyrate) (Dubuquoy et al., 2003; Wächtershäuser et al., 2000), de probiotiques (Eun et al., 2007; Lee et al., 2005; Voltan et al., 2008). Très récemment, Byndloss *et al.* ont montré que l'activation de PPAR $\gamma$  par le microbiote réduit la biodisponibilité des accepteurs d'électrons respiratoires nécessaire pour la croissance des *Enterobacteriaceae* (*Escherichia* ou *Salmonella*) au niveau de la lumière du côlon. Ceci permet de limiter les risques de dysbiose potentiellement pathogène des genres *Escherichia* ou *Salmonella* (Byndloss et al., 2017). Enfin, PPAR $\gamma$  régule l'expression constitutive d'un peptide antimicrobien : la  $\beta$ -defensin 1 au niveau des colonocytes.

PPAR $\gamma$  jouerait un rôle clé dans les activités bactéricides et candidacides au niveau de la muqueuse colique (Peyrin-Biroulet et al., 2010).

Tous ces résultats montrent qu'il existe bien un échange entre la CEI et le microbiote et que PPAR $\gamma$  intervient dans cet échange.

Le déficit du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  au niveau des CEI chez la souris augmente l'inflammation lors d'une colite induite au DSS (Dextran Sodium Sulfate) (Adachi et al., 2006). On y retrouve une plus forte érosion de l'épithélium intestinal, une plus grande infiltration des leucocytes et des marqueurs de l'inflammation plus exprimés au niveau macroscopique (Mohapatra et al., 2010).

Chez l'homme, le laboratoire a mis en évidence un déficit significatif de l'expression et de l'activité de PPAR $\gamma$  dans les cellules épithéliales intestinales de côlon de patients souffrant de RCH (Dubuquoy et al., 2003). Ce déficit, dont l'origine est encore inconnue, est limité au côlon et n'existe pas au cours de la MC. Il est présent en muqueuses saines et lésées de RCH, suggérant qu'il pourrait s'agir d'un facteur primitif participant à la survenue de la maladie. Le niveau d'expression de PPAR $\gamma$  joue un rôle important concernant le traitement du Pentasa® de ces patients. Plus ce niveau sera élevé, meilleure sera la réponse.

#### **D. PPAR $\gamma$ : cible thérapeutique pour la RCH**

De nombreux travaux, dont ceux du laboratoire, ont permis de révéler le rôle essentiel de PPAR $\gamma$  dans la régulation de l'inflammation intestinale, notamment au cours de la RCH. En effet, son activation atténuée de plus de 50% la pathologie dans un modèle de colite expérimentale chez la souris (Desreumaux et al., 2001).

La première étude ayant mis en avant la possibilité de traiter les patients atteints de RCH par des agonistes de PPAR $\gamma$  remonte à une quinzaine d'années. Lewis *et al.* ont publié sur l'efficacité de la rosiglitazone chez les patients atteints de RCH et réfractaires au 5-ASA et aux corticoïdes (Lewis et al., 2001). Ils ont consolidé leur résultat sur une seconde étude randomisée et en double aveugle (Lewis et al., 2008). Une équipe chinoise a confirmé également ces résultats avec une étude clinique

comparant un traitement « rosiglitazone et 5-ASA » avec un traitement « 5-ASA seul ». Ils observèrent une meilleure efficacité lorsque le 5-ASA est combiné à la rosiglitazone (Liang and Ouyang, 2008). Enfin, Pedersen et Brynskov ont comparé les effets cliniques d'un traitement par mésalazine ou par rosiglitazone en topique chez des patients atteints de RCH. Dans les 2 groupes, ils observèrent une réponse clinique (diminution du score Mayo) mais aucune différence entre les deux groupes (Pedersen and Brynskov, 2010).

L'ensemble de ces données révèle donc que le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  est un acteur incontournable dans la mise en place d'une homéostasie au niveau intestinal. L'implication de PPAR $\gamma$  au niveau du côlon et les nouvelles thérapeutiques potentielles (GED-0507-34, J11CI) font de ce récepteur nucléaire l'une des cibles importantes pour soigner les patients souffrant de RCH (Choo et al., 2015; Pirat et al., 2012; Rousseaux et al., 2011).

# La Thymic Stromal Lymphopoietin

## I. Généralités

La TSLP est une cytokine épithéliale à 4 hélices  $\alpha$  faisant partie de la famille des IL-2 et est étroitement liée à l'IL-7. Elle fut initialement découverte en 1994 dans le surnageant de culture de lignées de cellules stromales thymiques de souris (Friend et al., 1994). Elle fut caractérisée et étudiée comme un facteur de croissance lymphocytaire des lignées B (Levin et al., 1999). Le gène codant la TSLP murine se situe au niveau du chromosome 18. La protéine mature de la TSLP fait 121 acides aminés et présente 3 sites de N-glycosylation potentiels et 7 résidus cystéine (Quentmeier et al., 2001).

Par la suite, la TSLP humaine fut isolée (Reche et al., 2001). En comparant les acides aminés, les sites de glycosylations ainsi que les résidus de cystéines, il a été montré qu'il existait un pourcentage d'identité de séquence de 43% entre les 2 TSLP (Quentmeier et al., 2001). Malgré ce faible pourcentage entre la TSLP murine et la TSLP humain, leur fonctionnalité semble être identique (Reche et al., 2001). Le gène codant la TSLP est localisé sur le chromosome 5q22.1 (**Figure 44A**).

L'ARNm codant la TSLP est principalement exprimé de façon constitutive au niveau des cellules épithéliales du thymus, du poumon, de la peau et de l'intestin. On la retrouve également dans les mastocytes, les cellules dendritiques ou les cellules stromales. Cependant l'ARNm codant la TSLP est absent dans les types cellulaires hématopoïétiques (lymphocytes, polynucléaires) ou les cellules endothéliales (Quentmeier et al., 2001; Rimoldi et al., 2005a). Chez l'homme comme chez la souris, la TSLP est constitutivement exprimée dans les CEI avec un haut niveau d'expression au niveau du côlon. Son expression, *in vitro*, peut être induite par des cytokines, micro-organismes ou productions microbiennes (He et al., 2007; Humphreys et al., 2008; Rimoldi et al., 2005a; Tanaka et al., 2010; Taylor et al., 2009; Zaph et al., 2007; Zeuthen et al., 2008).

## II. Les isoformes de la TSLP

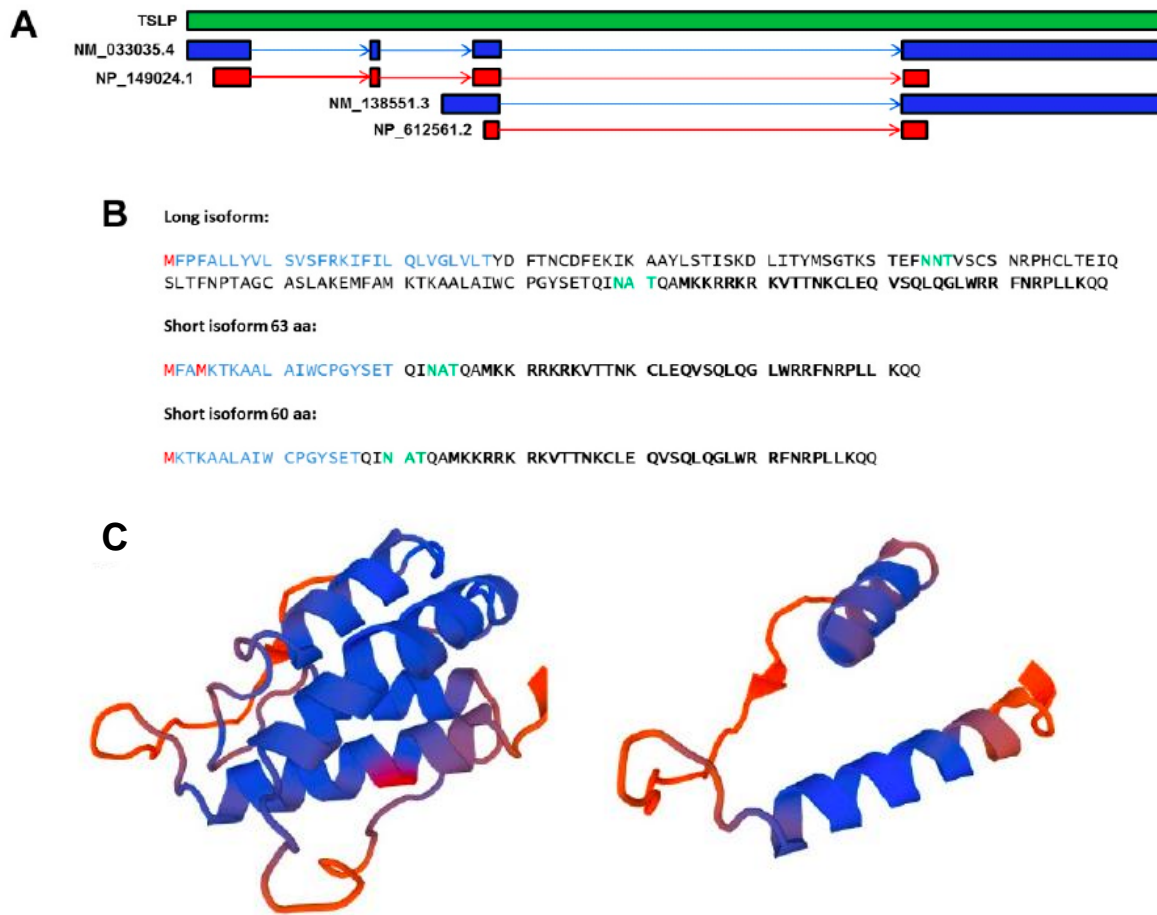
D'après le *National Center For Biotechnology Information*, il existerait 3 transcrits de la TSLP humaine : 2 transcrits « longs » et 1 transcrit court. Seul 1 seul transcrit long et le transcrit court seraient codants (**Figure 44A**). Il faudra attendre une dizaine d'années après la mise en évidence de la TSLP humaine pour que les 2 transcrits codants de la TSLP soient caractérisés (Harada et al., 2009). Si initialement, l'hypothèse d'un épissage alternatif était envisagée, Harada *et al.* ont confirmé qu'il existe 2 sites d'initiation de la transcription distincts donnant ainsi 2 isoformes de la TSLP (Harada et al., 2011). Suite à cette publication, d'autres laboratoires confirmeront l'existence de ces 2 isoformes distinctes de la TSLP. Il est donc admis qu'à partir du même gène, 2 ARNm de la TSLP de taille différente sont transcrits (**Figure 44A**) (Bjerkan et al., 2015, 2016; Fornasa et al., 2015).

Le premier variant est l'isoforme longue de la TSLP ou TSLP 1. Le deuxième variant est l'isoforme courte de la TSLP ou TSLP 2. Ces 2 isoformes sont constituées d'un nombre différent d'exons. La TSLP 1 a 4 exons alors que la TSLP 2 n'en compte que 2 (**Figure 44A**). La TSLP 1 est une protéine de 159 acides aminés et son poids moléculaire est estimé à 18,1 kDa (kiloDalton). La TSLP 2, plus courte au niveau N-Terminal, a deux sites d'initiation de la traduction possible. En effet, il y a au début de la séquence codant la TSLP 2, deux méthionines séparées par 2 acides aminés. C'est pour cela qu'il peut y avoir 2 TSLP 2 avec un nombre différent d'acides aminés. Elles seront constituées soit de 60 acides aminés soit de 63 acides aminés, avec des poids moléculaires estimés à 7,1 kDa et 7,4 kDa. Que ça soit pour la TSLP 1 ou la TSLP 2, il a été mis en évidence un possible site de clivage qui diminuerait la taille des protéines (Petersen et al., 2011; Quentmeier et al., 2001). On aurait ainsi des protéines avec un poids moléculaire calculé de 15 kDa pour la TSLP 1 et de 4,8 kDa et 5,1 kDa pour les 2 TSLP 2 (**Figure 44B**). Cette diminution correspond au peptide signal présent sur la partie N-terminale des protéines.

Cependant, lorsque les 2 protéines sont recherchées en Western Blot, leur poids moléculaire apparaît respectivement aux alentours de 23 kDa pour la TSLP 1 et 9 kDa pour la TSLP 2. Cette différence de taille peut s'expliquer par les modifications post-transcriptionnelles. En effet, la TSLP 1 possède 2 sites potentiels de glycolysation alors que la TSLP 2 possèdent 1 site potentiel. Concernant la conformation



tridimensionnelle, l'isoforme longue de la TSLP a 4 hélices  $\alpha$  (structure historiquement connue) et l'isoforme courte a, quant à elle, uniquement 2 hélices  $\alpha$  (Arnold et al., 2006) (Figure 44C).



**Figure 44** : (A) Représentation de l'ADN codant la TSLP (vert) et les 2 transcrits : le variant 1 de la TSLP avec ses 4 exons (bleu) et le variant 2 de la TSLP avec ses 2 exons (bleu). (B) Séquence des acides aminés de la TSLP 1 et TSLP 2. Les séquences des peptides signaux sont en bleus, les protéines matures sont en noires. Les possibles sites de N-glycosylation sont en verts et les méthionines en rouge représentent les méthionine initiateur. (C) Représentation des modèles tridimensionnelles de la protéine TSLP 1 (à gauche) et de la TSLP 2 (à droite) (Arnold et al., 2006; Bjerkan et al., 2016).

### **III. La régulation transcriptionnelle de l'expression de la TSLP**

Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle de la TSLP, avec des différences selon l'isoforme étudiée.

Les premières recherches sur les facteurs influençant la régulation transcriptionnelle de la TSLP ne différencient pas la régulation de la TSLP 1 ou de la TSLP2.

Les dernières avancées concernant la caractérisation des 2 isoformes ont permis de montrer que ces 20 dernières années, les différentes équipes qui ont étudié la régulation de la TSLP, ont étudié celle de la TSLP 1. En effet, l'induction de l'expression de la TSLP était souvent associée à un contexte d'inflammation et il est connu aujourd'hui que c'est dans ce contexte inflammatoire que la TSLP 1 est induite (Bjerkan et al., 2015; Fornasa et al., 2015). La TSLP 1 est donc induite *in vivo* dans les conditions inflammatoires chez les patients atteints de dermatite atopique, d'asthme ou encore quand les muqueuses des voies aériennes sont en contact avec la fumée de cigarette (Bjerkan et al., 2015; Harada et al., 2009; Soumelis et al., 2002).

#### **A. Facteurs agissant sur la régulation de la TSLP**

##### **1. Les TLR**

La majorité des TLR agissent sur l'expression de la TSLP humaine. Bien évidemment, suivant la localisation des cellules épithéliales, ce ne seront pas les mêmes ligands qui agiront sur la régulation de la TSLP.

Parmi les différents TLR caractérisés pour agir sur la TSLP, on retrouve :

- Le TLR 2: En présence de ses ligands (le peptidoglycane des Gram+, lipoprotéines), le TLR 2 est capable d'induire la sécrétion de la TSLP par les CEI, les cellules épithéliales pulmonaires et les kératinocytes (Allakhverdi et al., 2007; Vu et al., 2010; Zeuthen et al., 2008).

- Le TLR 3: Les cellules épithéliales pulmonaire, intestinales et les kératinocytes sécrètent de la TSLP également en réponse à une stimulation par du poly (I :C) (l'acide polyinosinique-polycytidylique), ARN double brin et ligand de TLR 3 (Allakhverdi et al., 2007; He et al., 2007; Kinoshita et al., 2009; Xu et al., 2007). Harada *et al.* montrent que le poly (I:C) induit significativement l'expression de la TSLP 1 mais pas celle de la TSLP 2 (Harada et al., 2009).

- Le TLR 5: Ce TLR reconnaît la flagelline. *In vitro*, au niveau des kératinocytes et des CEI, le TLR 5 induit la libération de la TSLP (He et al., 2007; Le et al., 2011).

- Les autres TLR: Les ligand des TLR 8 (LTA, poly (CpG)) et des TLR 9 (CpG-B) au niveau des cellules épithéliales bronchiques (Lee and Ziegler, 2007) peuvent jouer un rôle dans la sécrétion de la TLSP. Il en est de même pour le ligand du TLR 6 (diacyl des lipoprotéines) (Vu et al., 2010).

Xie *et al.* comparent l'expression de la TSLP totale et de la TSLP 1 en contact avec des ligands de différents TLR *in vitro* sur des kératinocytes. Ainsi, ils montrent que les TLR 2, 3, 5 et 6 agissent sur l'expression de la TSLP 1 et induisent de façon significative son expression (Xie et al., 2012a).

Enfin, Fornasa *et al.* ont évalué l'expression des 2 isoformes de la TSLP en présence de différentes souches bactériennes dont *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* adhéro-invasive LF82. Les cellules Caco-2 stimulées sont capables d'induire l'expression génomique et protéique de l'isoforme 1 de la TSLP (Fornasa et al., 2015).

Il existe donc de nombreuses molécules microbiennes, reconnues par des TLR, qui vont être capables d'induire l'expression et la sécrétion de la TSLP.

## **2. Les allergènes**

Les allergènes se définissent comme des antigènes qui sont, dans un premier temps, capables d'induire dans certaines conditions la synthèse d'immunoglobulines de type E chez des individus prédisposés et, en second lieu, de se lier spécifiquement aux molécules d'IgE fixées sur les cellules effectrices pour déclencher la réaction allergique. Le mode d'introduction de l'allergène dans l'organisme permet d'avoir une orientation clinique. Il existe deux types d'allergènes : les pneumallergènes (véhiculés par l'air) et les trophallergènes (d'origine alimentaire).

Les allergènes vont intervenir dans l'induction et la production de la TSLP. On retrouve divers allergènes comme les acariens mais également les allergènes respiratoires ou alimentaires (ovalbumine, cacahouète) (Dong et al., 2016; Noti et al., 2014). Les allergènes stimulent divers récepteurs présents sur la membrane des cellules épithéliales. Parmi ces récepteurs on retrouve PAR-2 (*Protease-Activated Receptor-2*) au niveau de cellules épithéliales pulmonaires. Les perturbations de PAR-2 sur les cellules épithéliales par les protéases de l'environnement induit la production de TSLP (Ziegler, 2010).

Enfin, Kuroda *et al.* ont observé, *in vitro*, dans une lignée humaine de kératinocytes en présence de protéines fortement allergisante (OVA, gluten, Glupearl® 19S), une induction de l'expression de la TSLP 1 (> 100 fold) mais également de la TSLP 2 (avec une induction plus modérée) (Kuroda et al., 2017).

## **3. Autres particules**

Diverses molécules peuvent également intervenir dans la libération de la TSLP. Parmi ces molécules, on retrouve le tabac (Nakamura et al., 2008; Smelter et al., 2010) ou encore les particules de diesel qui agissent sur l'expression et la libération

de la TSLP au niveau des cellules épithéliales bronchiques humaines et murines (Bleck et al., 2010; Nakamura et al., 2008; Smelter et al., 2010).

## **B. Les cytokines agissant sur la régulation de la TSLP**

De nombreuses cytokines sont capables d'agir sur les cellules épithéliales pour induire ou supprimer la production de la TSLP.

*In vitro*, le  $TNF\alpha$  et l' $IL-1\beta$  agissent en synergie avec l' $IL-4$  et l' $IL-13$  pour induire la production de TSLP au niveau des kératinocytes, des cellules épithéliales pulmonaires et intestinales (Allakhverdi et al., 2007; Bogiatzi et al., 2007; Futamura et al., 2010; Kato et al., 2007; Tanaka et al., 2010).

Il est également décrit que les interférons ( $IFN\alpha$  et  $IFN\beta$ ) et le  $TNF\alpha$  associé à l' $IL-4$  sont capables d'amplifier la production de TSLP induite par le poly (I:C) au niveau de différentes cellules épithéliales (Kato et al., 2007; Kinoshita et al., 2009; Tanaka et al., 2010). En revanche, l' $IFN\gamma$  inhibe la production de TSLP au niveau des kératinocytes ou des cellules épithéliales pulmonaires (Kato et al., 2007; Kinoshita et al., 2009; Vu et al., 2010).

Enfin, Xie *et al.* ont mis en évidence que dans un environnement/milieu riche en cytokines inflammatoires comme l' $IL-4$ , l' $IL-5$  ou le  $TNF\alpha$ , l'expression de la TSLP 1 est significativement augmentée (Xie et al., 2012a).

## **C. Les facteurs de transcription agissant sur la TSLP**

### **1. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B**

Actuellement, le facteur de transcription considéré comme essentiel pour l'expression de la TSLP est NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- Kappa B) (Lee and Ziegler, 2007; Li et al., 2006) (**Figure 45 page 110**). Il est montré qu'un site de fixation du NF- $\kappa$ B situé à -3,8 kb (-3800 paires de base) du site d'initiation de la transcription, est essentiel pour l'induction de l'expression de la TSLP au niveau des cellules épithéliales du poumon chez l'homme et chez la souris (Lee and Ziegler, 2007; Lee et al., 2008). Proche de la séquence consensus permettant la fixation du NF- $\kappa$ B (de -3,74 kb à -3,86 kb), se trouve un site potentiel de fixation pour le facteur de transcription AP-1 (*Activator Protein-1*). Le NF- $\kappa$ B induit l'expression de la TSLP lorsque les cellules épithéliales sont stimulées avec de l'IL-1 $\beta$ . L'AP-1 permet d'amplifier et soutenir une réponse à l'IL-1  $\beta$ . Une mutation au niveau du site de fixation du NF- $\kappa$ B a pour conséquence une perte importante de l'expression de la TSLP induite par l'IL-1b alors qu'une mutation au niveau du site de fixation de l'AP-1, occasionne une diminution seulement partielle de l'induction de la TSLP par L'IL-1 $\beta$  (Redhu et al., 2011) .

Li *et al.* ont décrit également la présence de sites de fixation possibles de NF- $\kappa$ B sur le promoteur de la TSLP (1 pour l'homme et 2 pour la souris) mais leurs localisations sont différentes de celle décrite par Lee *et al.* (Lee and Ziegler, 2007; Li et al., 2006) (**Figure 45 page 110**).

L'importance du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B a été également mis en évidence pour les cellules épithéliales intestinales (Caco-2 et HT-29) (Cultrone et al., 2013). Dans une analyse *in silico*, Lee et Ziegler ont mis en évidence 4 sites potentiels de fixation pour le NF- $\kappa$ B et 3 pour AP-1 dont ceux précédemment mis en évidence (Lee and Ziegler, 2007). Leurs résultats leur ont permis de mettre également en évidence que NF- $\kappa$ B est capable de se fixer sur 2 sites de fixations sur le promoteur de la TSLP : le premier site (appelé NF1) étant celui caractérisé par Lee *et al.* (-3,8kb) et le deuxième site (appelé NF2), beaucoup plus prêt du point d'initiation à la transcription (-369 pb). Selon Cultrone *et al.*, ce dernier est capital pour l'induction de l'expression de la TSLP

après une réponse inflammatoire à l'IL-1 $\beta$ . Le NF1, ne répondant pas à l'IL-1 $\beta$ , permettrait lui d'induire l'expression constitutive de la TSLP (Cultrone et al., 2013).

## **2. Le Récepteur nucléaire RXR**

Sur un modèle de spécifique de souris qui ont une ablation de RXR $\alpha$  et RXR $\beta$  au niveau des kératinocytes (Souris RXR $\alpha\beta^{ep-/-}$ ), Li *et al.* montrent qu'il y a une augmentation significative de la production de TSLP. En parallèle, un phénotype de dermatite atopique spontanée était mis en évidence (Li et al., 2005). Un an plus tard, les auteurs montrent qu'un traitement de la peau par un ligand naturel de VDR (Vitamine D3) et un de ses analogues (MC903) amène à la même observation (augmentation de la production de la TSLP et apparition spontanée d'une dermatite atopique) (Li et al., 2006).

Il a été également montré que l'acide rétinoïque 9-cis (9-cis RA), un agoniste de RXR, inhibe l'expression de l'ARNm de la TSLP induite par l'IL-1 $\beta$  au niveau des cellules pulmonaires humaines (cellules 16HBEo $^{-}$ ) (Lee et al., 2008).

Le récepteur nucléaire RXR est donc un récepteur important pour la régulation transcriptionnelle de la TSLP.

## **3. Récepteur nucléaire PPAR $\gamma$**

Un lien entre PPAR $\gamma$  et la régulation de la TSLP a déjà été mis en avant au cours d'un modèle de dermatite atopique chez la souris (Jung et al., 2011). Dans cette étude, les auteurs démontrent que le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  joue un rôle de rétro-contrôle négatif sur l'expression de la TSLP dans les kératinocytes. L'utilisation d'un agoniste de PPAR $\gamma$  (rosiglitazone) a pour effet de diminuer l'expression de la TSLP alors que l'antagoniste PPAR $\gamma$  (GW9662 20  $\mu$ M), permet d'induire son expression. Ce

lien semble exister également dans l'intestin dans le cas des maladies cœliaques chez l'enfant. En effet, lors de ces maladies, un faible taux de PPAR $\gamma$  est observé en parallèle d'une importante expression de la TSLP (Sziksz et al., 2014). Le gluten aurait un rôle sur la dégradation de PPAR $\gamma$  et l'augmentation d'expression de la TSLP. Cela permet de renforcer l'idée que le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  puisse jouer un rôle sur l'expression de la TSLP.

#### **4. Récepteur nucléaire VDR**

Initialement, une augmentation de production de TSLP accompagnée d'un phénotype proche de la dermatite atopique a été observée sur un modèle de souris traité au niveau cutané par de la vitamine D3 ou son analogue MC903 (2 agonistes de VDR) (Li et al., 2009). Cette observation laisse donc à supposer que les agonistes de VDR peuvent induire une inflammation cutanée avec une induction de l'expression de la TSLP.

Ces résultats n'ont pas été confirmés sur des kératinocytes humains primaires ou des biopsies de peau humaines (Landheer et al., 2015). En effet, avec ou sans vitamine D au niveau de cellules ou biopsies « saines », il n'y a aucune production de TSLP alors que des gènes connus comme cible de la vitamine D voient leur production augmentée. Cependant, il faut noter que lorsque la vitamine D est mise en contact avec de la peau ayant un psoriasis, il est observé une augmentation de production de la TSLP et une amélioration de « guérison ». En parallèle de ces observations, il y a une baisse d'expressions des différentes cytokines pro-inflammatoires.

En 2012, Xie *et al.* ont cherché à connaître l'effet de la vitamine D et MC903 d'une part, sur l'expression de la TSLP « totale », qui regroupe la TSLP 1 et la TSLP 2 et d'autre part sur l'expression de la TSLP 1. Ainsi, ils observent une augmentation de la TSLP totale mais pas de la TSLP 1 au niveau des kératinocytes humains (**Figure 45 page 110**).

Fornasa *et al.* confirment les travaux de Landheer et *al.* avec le traitement de kératinocytes primaires avec de la vitamine D (Fornasa et al., 2015). Ils vont plus loin



en affirmant que la seule isoforme impactée par un traitement à la vitamine D est l'isoforme court de la TSLP (TSLP 2). Une analyse *in silico* leur a permis de découvrir un possible site de fixation du récepteur à la vitamine D au niveau de l'intron 3 du gène de la TSLP (**Figure 45 page 110**).

### **5. Récepteur nucléaire des glucocorticoïdes**

Le GR (récepteurs aux glucocorticoïdes) et ses ligands (glucocorticoïdes) inhibent la production de TSLP au niveau de cellules épithéliales pulmonaires et les kératinocytes humaines. (Kato et al., 2007; Le et al., 2009, 2010; Ozawa et al., 2007; Surjit et al., 2011). La souris a également un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) au niveau du promoteur de la TSLP. Il agirait comme un élément « silence » (Surjit et al., 2011).

### **6. Deux sites promoteurs distincts pour les 2 isoformes**

La régulation et l'expression des 2 isoformes de la TSLP humaine sont dépendantes de la localisation cellulaire et de l'état de l'environnement. Une cellule épithéliale de la peau, du poumon ou de l'intestin pourra réguler ces 2 isoformes de manière différente et avec différents récepteurs nucléaires. Des cellules épithéliales dans un contexte stable, « normal » ne réguleront pas et n'exprimeront pas les 2 variants de la TSLP de la même façon également.

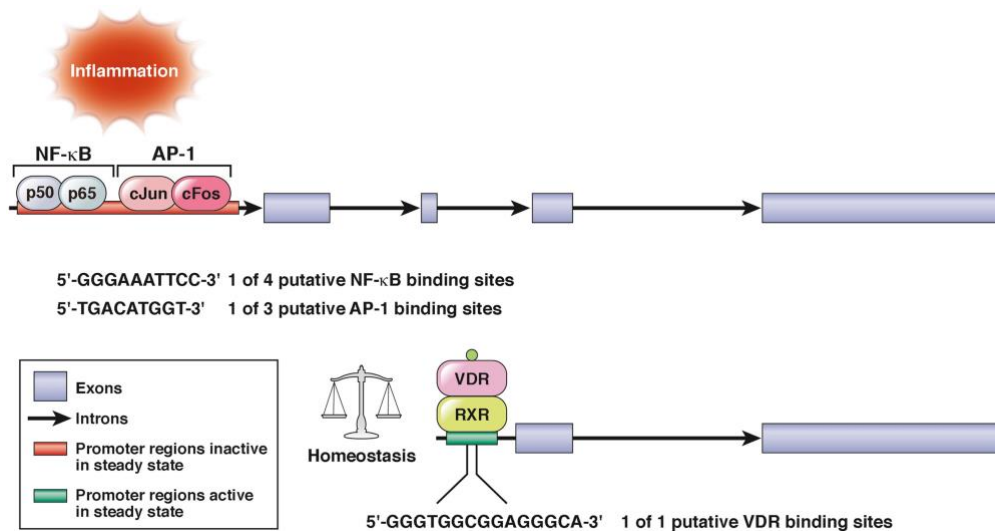
La quasi-totalité des travaux, qui traitent de la régulation de la TSLP depuis plus de 10 ans, chez l'homme ou la souris, s'est focalisée sur la forme longue de la TSLP. Ce n'est que depuis récemment, que certaines études cherchent à comprendre et décrire les facteurs de transcription agissant sur chacune des isoformes (Bjerkkan et al., 2016).

Fornasa *et al.* ont également effectué une étude sur la relevance des isoformes de la TSLP à l'état « sains » et en cas de pathologie. Cela leur a permis d'observer les

différentes expressions et activités des 2 isoformes. Sur une analyse *in silico*, ils confirment que les 2 isoformes ne sont pas le résultat d'un épissage alternatif du même transcrit mais bien issu de la transcription de 2 ARNm contrôlés par 2 régions promotrices différentes. Cette isoforme 2 était la principale isoforme détectée sur les cellules épithéliales de la peau mais également de l'intestin dans un état « sain » (Fornasa et al., 2015).

### **7. SNP (Single Nucleotide polymorphisme) au niveau du promoteur de la TSLP**

Harada *et al.* ont identifié deux polymorphismes fonctionnels au niveau du promoteur de la TSLP 1 et qui sont corrélés positivement à une susceptibilité à l'asthme chez l'enfant et chez l'adulte. Le premier polymorphisme, appelé rs3806933, est le remplacement d'une cytosine par une thymine au nucléotide -847. Ce changement permet de créer un site de fixation pour le facteur de transcription AP-1 (Activating Protein 1). Ceci a pour conséquence d'affecter la transcription de la TSLP 1 induite par le poly (I :C) au niveau de cellules épithéliales bronchiques primaires humaines (NHBE) (Harada et al., 2009). Le second polymorphisme, appelé rs2289276, est le remplacement encore une fois d'une cytosine par une thymine au nucléotide -82. Il se situe au niveau du motif de fixation AP-2 $\alpha$ . Il s'agit d'un possible facteur de transcription suppresseur. Les auteurs démontrent que la fixation AP-2 $\alpha$  sur le « -82 C », amène à une diminution de l'activité transcriptionnelle par un effet répressif de la transcription (Harada et al., 2011).



**Figure 45 :** Les différents lieux de fixation des facteurs de transcription agissant sur les promoteurs de la TSLP 1 et de la TSLP 2 chez l'homme (Tsilingiri et al., 2017).

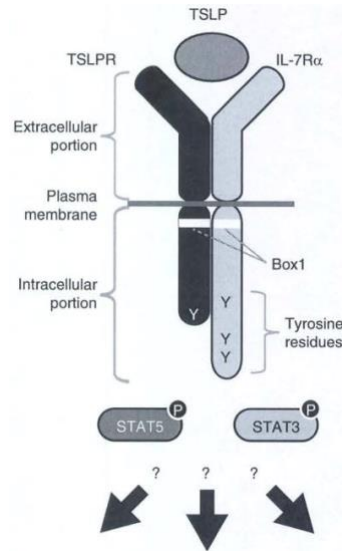
#### **IV. Le récepteur à la TSLP : TSLPR**

La TSLP exerce ses fonctions biologiques via son récepteur : TSLPR (TSLP Récepteur). Ce récepteur est un hétérodimère constitué d'une chaîne alpha 1 du récepteur TSLP (TSLPR  $\alpha$ 1) et d'une chaîne alpha du récepteur à l'IL-7 (IL-7R $\alpha$ ) (**Figure 46**). TSLPR  $\alpha$ 1 a une faible affinité pour la TSLP mais une combinaison avec l'IL-7R $\alpha$  permet d'obtenir un site de fixation à la TSLP de forte affinité.

En comparaison avec le récepteur de la TSLP chez la souris, on retrouve approximativement le même pourcentage d'homologie que pour celui de la TSLP. En effet, il y aura environ 39% d'homologie entre les TSLPR humain et murin. Cependant, chez les deux espèces, l'importance de l'hétérodimérisation du récepteur pour obtenir une forte liaison est maintenue chez les 2 espèces. Cela suggère donc que la TSLP et le TSLPR humains sont des orthologues de la TSLP et le TSLPR murins (Quentmeier et al., 2001).

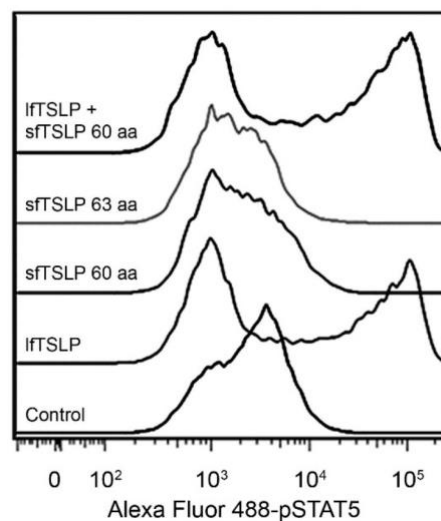
Suite à la fixation de la TSLP sur son récepteur, la voie de signalisation STAT 5 est activée chez les 2 espèces. De plus, la voie STAT 3 est activée également chez l'homme (Isaksen et al., 1999, 2002; Pandey et al., 2000; Quentmeier et al., 2001; Reche et al., 2001; Rochman et al., 2010).

La TSLP humaine est capable d'activer également les voies STAT 1, JAK 1 (Janus Kinase 1) et JAK 2 (Janus Kinase 2) au niveau des cellules dendritiques CD11<sup>+</sup> (Rochman et al., 2007; Wohlmann et al., 2010).



**Figure 46 :** Représentation du récepteur à la TSLP constitué du TSLPR et de l'IL-7Rα (Ito et al., 2012).

Seule la TSLP 1 se fixe sur le récepteur à la TSLP et permet la phosphorylation de STAT5 au niveau des cellules dendritiques (Bjerkkan et al., 2015). La TSLP 2 à 60 ou à 63 acides aminés ne perturbe pas la fixation de la TSLP 1 au TSLPR (**Figure 47**).



**Figure 47 :** Phosphorylation de STAT5 au niveau des cellules dendritiques en présence de TSLP 1, TSLP 2 et TSLP 1 + 2 (Bjerkkan et al., 2015).

A l'heure actuelle, aucun récepteur à la TSLP 2 n'a décrit ou découvert. Cependant, la TSLP 2 induit la phosphorylation de p38 $\alpha$  au niveau de cellules dendritiques et il n'y a aucun effet sur la phosphorylation de STAT 5 (Bjerkan et al., 2015; Fornasa et al., 2015).

## **V. Cibles cellulaires de la TSLP**

Beaucoup de cellules ont la capacité de répondre à la TSLP *in vivo* et *in vitro*. Parmi ces cellules, sont retrouvées les cellules hématopoïétiques des systèmes de l'immunité adaptatif et innée : les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, les lymphocytes T Natural Killer (NKT), les mastocytes, les polynucléaires basophiles et les éosinophiles, mais aussi les cellules non hématopoïétiques.

Historiquement, la TSLP a été caractérisée comme un puissant facteur de croissance et de différenciation des lymphocytes B et T. Les premiers travaux, chez la souris, se sont principalement focalisés sur le rôle de la TSLP dans la maturation des lymphocytes B immatures. Mais très vite, plusieurs études *in vitro* ont clairement montré que la TSLP agissait de préférence sur les monocytes et les cellules dendritiques CD11<sup>+</sup>. La présence des récepteurs de la TSLP sur les lymphocytes confirme malgré tout que la TSLP agit bien sur ces cellules.

### **A. Les cellules dendritiques**

Comme énoncé précédemment, au niveau des muqueuses, les cellules dendritiques présentent une communication étroite avec les cellules épithéliales. Ceci se fait via un échange de cytokines/chimiokines, dont la TSLP. Les cellules dendritiques expriment naturellement un fort niveau de TSLPR au niveau de leur surface.

La TSLP humaine favorise la maturation et les fonctions des cellules dendritiques CD11c<sup>+</sup> (Reche et al., 2001). En effet, la TSLP permet dans un premier temps une forte induction de l'expression de molécules attractives de surface comme le CD40 ou CD80 et dans un second temps la libération de chimiokines dont TARC (*thymus end activated chemokine*) / CCL17, MDC (*macrophage derived chemokine*) / CCL22, l'IL-8 et l'eotaxin-2. Cela permettra d'attirer les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles (Reche et al., 2001). Zhou *et al.* montrent également que des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse, traitées par de la TSLP, produisent du CCL17, augmentent les protéines CMH II et l'expression de protéines costimulatrices (Zhou et al., 2005). Cependant, la TSLP n'induit pas de production des cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$ , IL-1b ou IL-6 ou des cytokines caractéristiques du profil Th1 (IL-12 ou IFNs) (Liu, 2006; Soumelis et al., 2002).

L'effet le plus important de la TSLP au niveau de la cellule dendritique est l'augmentation d'expression de la protéine de surface OX40L (Arima et al., 2010; Ito et al., 2012; Zhou et al., 2005). L'induction de l'OX40L aura pour conséquence de conduire les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs à se différencier en lymphocytes T Th2 pro-inflammatoires (Reche et al., 2001; Soumelis et al., 2002; Watanabe et al., 2004; Zhou et al., 2005). Les lymphocytes T Th2 se caractérisent par la forte libération d'IL-4, IL-5, IL-13 et TNF $\alpha$  mais pas d'IL10 et de IFN $\gamma$  (Ito et al., 2005; Soumelis et al., 2002) (**Figure 48 page 117**). Une analyse en microarray sur des cellules dendritiques humaines activées par la TSLP a permis de confirmer la forte induction d'OX40L par la TSLP (Ito et al., 2005). OX40L est un médiateur essentiel *in vivo* des réponses Th2 médiées par la TSLP. L'utilisation d'un anticorps anti-OX40L inhibe les réponses immunitaires induite par la TSLP au niveau des poumons et de la peau, la sécrétion de cytokines ou encore l'infiltration de cellules inflammatoires Th2. Ce même anticorps inhibe la réponse pro-inflammatoire Th2 par un antigène dans des modèles d'asthme de souris et de primates (Seshasayee et al., 2007).

L'absence de la TSLP peut impacter le profil Th2. En effet, dans un modèle de souris normalement résistant au parasite *Trichuris muris*, un traitement par un anticorps anti-TSLP ou en présence d'une déficience en TSLPR, les souris perdent leur capacité à produire une réponse protectrice Th2. On y observe une diminution des

cytokines Th2 et une augmentation d'expression de l'IL-12/23p40, de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-17A (Taylor et al., 2009).

Les cellules dendritiques activées par la TSLP peuvent interagir avec les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs. Elles vont stimuler et développer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et induire leur différenciation en effecteurs producteurs d'IL-5 et IL-13. Il a été clairement montré que les lymphocytes CD8<sup>+</sup> interviennent dans les réactions allergiques (Gilliet et al., 2003).

Enfin, les cellules dendritiques ont la capacité de produire de la TSLP. Ceci conduirait donc à un effet autocrine et amène à une réponse Th2 (Kashyap et al., 2011; Spadoni et al., 2012).

## **B. Les Lymphocytes**

### ***1. Les Lymphocytes T***

L'effet indirect de la TSLP sur les lignées de lymphocytes T via les cellules dendritiques a été clairement décrit (paragraphe précédent). Mais la TSLP est également capable d'agir directement sur les lymphocytes T.

La TSLP exerce son action sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> lors de la stimulation du TCR. La TSLP va permettre la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en profil Th2 et induire la transcription de l'IL-4 (Omori and Ziegler, 2007; Rochman et al., 2007) (**Figure 48 page 117**). L'IL-4 joue à ce moment-là un rôle de *feed back* positif. En effet, l'IL-4 va augmenter l'expression du TSLPR au niveau de la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Il est montré *in vitro* que l'IL-4 est capable de maintenir la présence du TSLPR au niveau des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ayant le profil Th2 (Kitajima et al., 2011).

Chez la souris, Wang *et al.* expliquent que l'action de la TSLP au niveau des lymphocytes T CD4 + est requise non seulement pour la formation de cellules mémoires Th2 *in vivo*, mais aussi sur la réponse de rappel des lymphocytes T mémoire lors de la détection d'antigène (Wang *et al.*, 2014).

Concernant les lymphocytes T CD8+ naïfs de souris expriment également le récepteur à la TSLP alors que chez l'humain, ce récepteur est très peu présent voire absent. Cependant, une fois ces lymphocytes T CD8+ activés, l'expression du TSLPR augmente chez les 2 (Akamatsu *et al.*, 2008; Rochman and Leonard, 2008).

## **2. Les Lymphocytes B**

Le rôle de la TSLP sur les lymphocyte B reste encore aujourd'hui mal connu.

Sur une lignée murine de lymphocyte B, la TSLP joue, *in vitro*, un rôle dans la croissance et la différenciation des lymphocytes B immatures (Friend *et al.*, 1994; Levin *et al.*, 1999) (**Figure 48**). Malgré la capacité de la TSLP à soutenir la maturation des lymphocytes B *in vitro*, les travaux de Carpino *et al.* nous indiquent que la TSLP murine ne joue qu'un rôle mineur de soutien dans le développement lymphocytaire *in vivo* en particulier face à l'IL-7 (Carpino *et al.*, 2004).

Enfin, il a été mis en évidence qu'une concentration plus élevée de TSLP au niveau systémique chez la souris pouvait avoir un effet direct sur le développement des lymphocytes B et un effet indirect sur l'anémie hémolytique de type autoimmune (Astrakhan *et al.*, 2007; Iseki *et al.*, 2012).

## **3. Les Lymphocytes T régulateurs**

Les lymphocyte T régulateurs (Trég) exprime également le TSLPR. Ce récepteur est retrouvé chez ces derniers lorsqu'ils sont activés, au niveau pulmonaire. Une réponse médiée par STAT-5 est activée lorsque la TSLP se fixe sur son récepteur. La TSLP va ainsi diminuer la production d'IL-10 et l'activité suppressive qui lui est associée. Dans l'asthme allergique humain, les lymphocytes Trég pulmonaire ont une



diminution significative de l'activité suppressive et de la production d'IL-10 par rapport à un contrôle sain et des homologues asthmatiques non allergiques (Nguyen et al., 2010).

### **C. Les cellules de l'immunité innée**

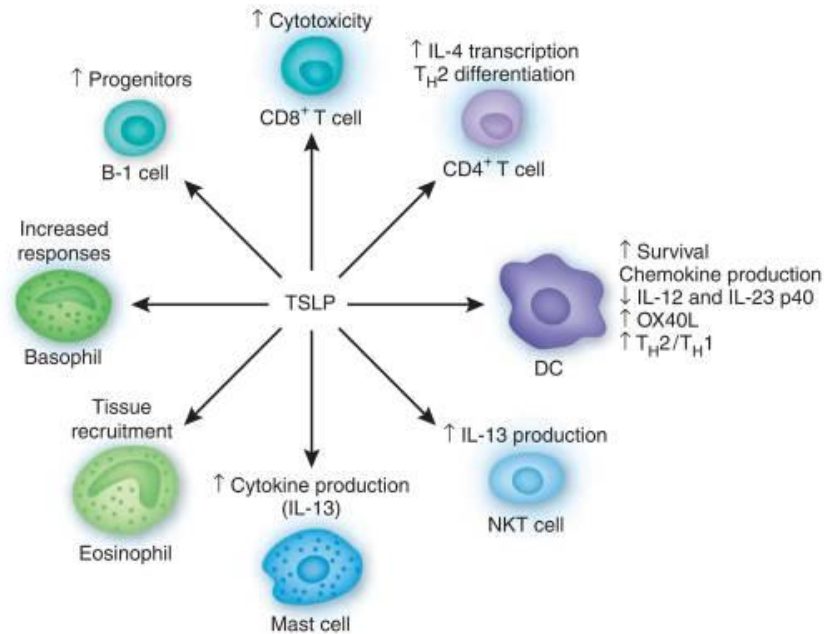
Le récepteur à la TSLP est également présent à la surface des cellules de l'immunité innée comme les lymphocytes Natural Killer T (NKT), les mastocytes, les granulocytes éosinophiles ou encore les granulocytes basophiles. Lorsque la TSLP se fixe à son récepteur, cela augmente la production de cytokine de ces dernières (Allakhverdi et al., 2007; Nagata et al., 2007; Wong et al., 2010) (**Figure 48**).

Au niveau des lymphocytes NKT, la TSLP stimulerait la libération de l'IL-13 mais pas celle de l'IL-4 ou de l'IFN $\gamma$  (Nagata et al., 2007).

Pour l'activité de la TSLP sur les mastocytes, des données montrent, *in vitro*, dans des conditions inflammatoires conditionnées par la présence d'IL-1 et de TNF $\alpha$ , que la TSLP est un puissant activateur des mastocytes et amène à la production de très fort taux de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires de type Th2 (IL-5, IL-6, IL-13, GM-CSF, CXCL8, etc). Ces dernières permettront d'induire et maintenir une réaction allergique (Allakhverdi et al., 2007).

L'action de la TSLP sur les éosinophiles est également caractérisée. En plus d'induire la libération de l'IL-6 (cytokine inflammatoire) et de chimiokines (CXCL1, CXCL8, CCL2), la TSLP est capable de retarder l'apoptose des polynucléaires éosinophiles, de réguler l'expression de la molécule d'adhésion CD18 et améliore l'adhésion des éosinophiles sur la fibronectine (Wong et al., 2010). Ces granulocytes éosinophiles présentent un plus grand nombre de TSPR et la TSLP permet la libération des neurotoxines dérivées des granulocytes éosinophiles. Ces dégranulations sont inhibées en présence d'un anticorps anti-TSPR.

La TSLP est également capable de jouer sur l'hématopoïèse de la lignée des granulocytes basophiles et jouerait un rôle dans de nombreuses maladies allergiques (Siracusa et al., 2013).



**Figure 48** : Réponse cellulaires à la TSLP (Ziegler and Artis, 2010).

## **VI. Fonction de la TSLP dans l'organisme**

Suivant sa localisation, la TSLP joue un rôle différent : soit un rôle homéostasique, soit un rôle pro-inflammatoire de type Th2.

Au niveau périphérique, son rôle dans la modulation pro-inflammatoire Th2 a été clairement démontré lors de pathologies allergiques (Roan et al., 2012; Siracusa et al., 2013; Watson and Gauvreau, 2014; Ziegler, 2010). Parmi celles-ci, on retrouve la dermatite atopique (inflammation chronique de la peau) (Indra, 2013; Xie et al., 2012b), les allergies pulmonaires et l'asthme (Soumelis et al., 2002).

### **A. Le rôle homéostatique/toléro-gène de la TSLP**

Au niveau central, la TSLP permet l'homéostasie lymphocytaire T dans le thymus via la sélection positive et la différenciation intra-thymique des lymphocytes T

régulateurs (Watanabe et al., 2005). Aucun laboratoire n'a actuellement cherché à différencier les 2 transcrits de la TSLP au niveau central.

## **B. La dermatite atopique**

La dermatite atopique est une maladie allergique inflammatoire qui touche environ 15% des nouveaux nés-jeunes enfants et 3 à 5% des adultes<sup>14</sup>. Cette maladie est fréquemment associée à des antécédents allergiques familiaux. Cette maladie allergique se caractérise par de fortes démangeaisons et une inflammation de la peau. La dermatite atopique, avec l'asthme et la rhinite allergique, qui sont traités par la suite, forment ce qu'on appelle, la « triade atopique ». Ces trois maladies partagent une pathogenèse commune : une inflammation allergique médiée par des lymphocytes T de profil Th2, qui vont sécréter du TNF $\alpha$  des cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), stimuler les lymphocytes B à augmenter la production d'IgE.

La TSLP a été beaucoup étudiée dans le cas de la dermatite atopique. L'hypothèse d'un lien entre la TSLP et les maladies allergiques a été envisagée après le clonage de la TSLP humaine. L'expression de la TSLP est plus élevée au niveau des épidermes lésionnels des patients atteints de dermatites atopiques en comparaison aux tissus non lésionnels de ces patients, des épidermes de patients sains ou encore de patients atteints de lupus érythémateux cutané (Corrigan et al., 2009; Soumelis et al., 2002). On retrouve aussi une sur-expression de la TSLP chez les personnes atteintes du syndrome de Netherton. Il s'agit d'une sévère maladie génétique de la peau caractérisée par des lésions cutanées semblables à celle de la dermatite atopique (Briot et al., 2009). La TSLP va être également essentielle pour la libération locale de cytokines Th2 sécrétés par des lymphocytes T CD4+ (He et al., 2008). Ces mêmes cytokines vont être capables d'induire l'expression de la TSLP au niveau des kératinocytes, ce qui laisse penser à un « cercle vicieux » de l'inflammation locale (Bogiatzi et al., 2007).

---

<sup>14</sup> <http://www.therapeutique-dermatologique.org/spip.php?article1068>

Le niveau d'expression de la TSLP dans le sang ou les épidermes inflammatoires ne sont pas corrélés avec la sévérité de la maladie (Lee et al., 2010; Soumelis et al., 2002). La TSLP agit *in situ* et permet d'initialiser la réponse allergique, sans pour autant agir sur la progression de l'allergie. En effet, la TSLP joue son rôle majeur lors de l'initiation de l'inflammation. L'IL-25, autre cytokine épithéliale, est responsable du maintien des lymphocytes Th2 mémoires induits par les cellules dendritiques activées par la TSLP et qui mène à la chronicité de la maladie allergique (Wang et al., 2014).

L'action de la TSLP dans les dermatites atopiques a été étudiée dans plusieurs modèles de souris modifiées génétiquement de manière spécifique au niveau des kératinocytes (Souris  $RXR\alpha\beta^{ep-/-}$ , souris avec une délétion de Notch ou encore souris surexprimant la TSLP). Ces souris présentent une expression aberrante de la TSLP et vont toutes développer un syndrome inflammatoire similaire à la dermatite atopique (Demehri et al., 2008; Dumortier et al., 2010; Li et al., 2005; Yoo et al., 2005). Le modèle de souris surexprimant la TSLP au niveau des kératinocytes présentent des infiltrats très riches en lymphocytes CD4+ Th2, mastocytes, éosinophiles, élévation des cytokines Th2 (Yoo et al., 2005).

Déjà cité précédemment, lorsque des souris sont traitées topiquement avec des agonistes de VDR, elles développent une maladie inflammatoire proche de la dermatite atopique, causée par l'induction de la TSLP au niveau des kératinocytes (Li et al., 2006). Le développement de cette inflammation est inhibé chez les souris  $TSLPR^{ep-/-}$ . Ces résultats sont confirmés chez des souris  $TSLPR^{-/-}$ , où l'inflammation allergique de la peau est grandement réduite par rapport aux souris contrôles (He et al., 2008; Larson et al., 2010).

L'ensemble des résultats au niveau de l'homme et des modèles de souris ont permis de mieux comprendre le rôle de la TSLP dans la dermatite atopique. En effet, tous s'accordent à dire que la TSLP joue un rôle central dans l'initiation de l'inflammation allergique.

## **C. L'asthme allergique**

L'asthme est une maladie inflammatoire des bronches. Il s'agit d'une maladie chronique qui apparaît par crises au cours desquelles la personne éprouve des difficultés à respirer, s'essouffle, et a une respiration sifflante.

Tout d'abord, des hybridations *in situ* montrent que l'expression de la TSLP est significativement augmentée au niveau des voies aériennes des patients asthmatiques et que cette augmentation est corrélée avec l'expression des chimiokines pro-Th2 et de la sévérité de la maladie (Ying et al., 2005, 2008).

De plus, l'expression protéique de la TSLP est significativement plus élevée dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire des patients asthmatiques en comparaison au patients non asthmatiques (Nguyen et al., 2010; Ying et al., 2008). Cependant, tout comme la dermatite atopique, le niveau de TSLP sérique n'est pas corrélé avec la sévérité de l'asthme.

Les souris présentant une inflammation allergique des voies aériennes ont une expression de la TSLP significativement plus élevée que chez les souris contrôles (Li et al., 2010; Shi et al., 2008; Zhou et al., 2005). De plus les souris KO TSLPR ne développent pas d'inflammation lorsqu'elles sont sensibilisées à OVA (Ovalbumine) (Al-Shami et al., 2004; Zhou et al., 2005). Enfin, l'utilisation d'un anticorps anti-TSLPR permet de diminuer la réponse inflammatoire allergique (Shi et al., 2008). Un modèle de souris transgéniques où la TSLP est constitutivement exprimée par les cellules épithéliales du poumon sous le contrôle du promoteur de la SPC (Surfactant Proteine C), développent une maladie voisine de l'asthme (Zhou et al., 2005).

Un traitement composé de la TSLP 2 recombinante ou du 1,25 Vitamine D3, est capable de prévenir et de diminuer l'asthme induit par les acariens chez la souris (Dong et al., 2016).

L'ensemble des travaux réalisés montre clairement l'impact d'une surexpression de la TSLP dans l'initiation de l'asthme allergique. Les résultats trouvés chez l'homme et chez les souris vont dans le même sens. Les analyses génétiques

montrent également la susceptibilité de certains individus à produire une sur-expression de la TSLP en réponse à un stimulus et donc de développer un asthme.

De plus, des méta-analyses concernant les génomes de nombreuses personnes asthmatiques ont incriminé de nombreux loci associés avec les risques d'asthme. Parmi eux, on retrouve celui de la TSLP (Hirota et al., 2011; Torgerson et al., 2011). Comme précédemment cité, il existe des « SNP » associés au risque d'asthme (Harada et al., 2011; He et al., 2009).

L'importance de la TSLP dans l'initiation de l'asthme a permis de faire d'elle une cible potentielle du point de vue thérapeutique. L'AMG 157 est le premier traitement pour lutter contre la surexpression de la TSLP dans l'asthme allergique. Il s'agit d'un anticorps monoclonal, testé chez l'humain, dirigé contre la TSLP. Il agit sur les réponses précoces et tardives de l'asthme provoqué par un allergène. L'AMG 157 va également diminuer des marqueurs de l'inflammation comme la fraction exhalée de l'oxyde de nitrite ou encore le nombre d'éosinophiles présents dans les expectorations ou la circulation sanguine (Gauvreau et al., 2014).

## **D. La rhinite allergique**

La dernière maladie de la « triade atopique » est la rhinite allergique. La TSLP joue un rôle majeur dans la rhinite allergique. L'expression de la TSLP au niveau des cellules épithéliales nasales est significativement plus importantes chez les patients atteints de rhinite allergique en comparaison aux patients sains (Kimura et al., 2011; Mou et al., 2009; Zhu et al., 2009). Le niveau d'expression de la TSLP est corrélé avec la concentration d'IL-4 et la gravité de la maladie (Mou et al., 2009). 3 cohortes indépendantes d'études génétiques ont mis en évidence que le polymorphisme de la TSLP était associé à la rhinite allergique chez l'enfant (Bunyavanich et al., 2011).

Dans le modèle de souris de rhinite allergique, on retrouve une augmentation de l'expression de la TSLP lorsque les souris sont traitées à l'OVA. Lorsque la TSLP

est neutralisée par un anticorps anti-TSLP durant la phase de traitement, il y a une inhibition du développement de la rhinite allergique (Miyata et al., 2008).

## **E. L'œsophagite à éosinophiles**

L'œsophagite à éosinophiles est une maladie inflammatoire chronique de type Th2 qui touche l'œsophage et qui est caractérisée par une accumulation de granulocytes éosinophiles dans la muqueuse œsophagienne.

Une étude multicentrique sur le génome des personnes atteintes de l'œsophagite à éosinophiles a permis d'incriminer le gène de la TSLP comme un candidat potentiel pour la survenue de cette maladie.

De plus, l'expression de la TSLP est augmentée chez les patients atteints d'œsophagite à éosinophiles en comparaison aux patients sains (Rothenberg et al., 2010). Enfin, Un polymorphisme du récepteur à la TSLP augmente la susceptibilité à l'œsophagite à éosinophiles mais uniquement chez l'homme (Sherrill et al., 2010).

## **F. TSLP et cancer**

L'inflammation joue un rôle important dans la survenue de cancer mais également à différents stades de développement de cancer (Grivennikov et al., 2010; Mantovani et al., 2008). La survie des cellules cancéreuses et le développement des métastases sont favorisés par un microenvironnement inflammatoire chronique avec des macrophages activés par des cytokines Th2 : l'IL-4 et l'IL-13 (Mantovani and Sica, 2010). La TSLP est exprimée de façon abondante dans de nombreux cancers (cancer du sein, cancer métastatiques du seins, mélanome) (Olkhanud et al., 2011; Pedroza-Gonzalez et al., 2011). Il existe également une corrélation entre la forte présence de lymphocytes Trég et la TSLP dans les microenvironnements tumoraux. Ceci a été montré dans le cancer du poumon (Li et al., 2011a).

Au niveau du cancer du sein, les cellules tumorales sont capables de produire de la TSLP qui participe à la création du microenvironnement inflammatoire et au

développement du processus tumoral (Pedroza-Gonzalez et al., 2011). La TSLP joue également un rôle dans l'infiltration de Lymphocytes T Th2 dans le cancer du pancréas humain (De Monte et al., 2011).

Chez la souris, la TSLP est également exprimée dans les adénocarcomes 4T1 (lignée cellulaire de carcinome mammaire). Cette expression est corrélée avec la progression de la tumeur et des métastases. Une diminution d'expression de la TSLP dans ces cellules cancéreuses permet d'abolir la progression du cancer et des métastases (Olkhanud et al., 2011).

La propriété « anti-cancéreux » de la TSLP est mis en évidence dans le cancer du côlon. Dans un premier temps, une diminution de l'expression de la TSLP est observée dans les tissus cancéreux du colon en comparaison à des muqueuses saines. De plus cette diminution d'expression de la TSLP est inversement corrélée avec le score du stade clinique du cancer du côlon. Les cellules cancéreuses du côlon expriment le TSLPR et lorsque la TSLP se fixe sur son récepteur, cela provoque l'apoptose des cellules cancéreuses, via l'activation de la voie p38. Cette action apoptotique n'est pas retrouvée chez les cellules épithéliales saines de côlon qui expriment également le TSLPR (Yue et al., 2016).

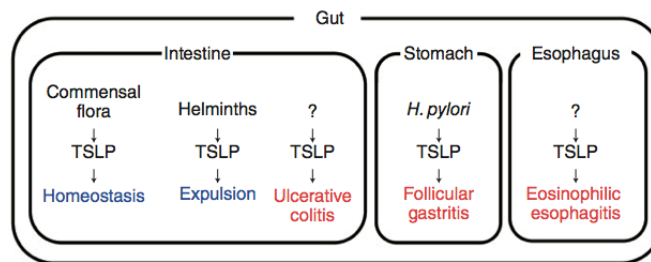
Au vu des différents travaux sur la TSLP dans un contexte de tumeurs et du paradoxe qui en découle, il est très important de comprendre la complexité des sous-ensembles de cellules sensibles à la TSLP, afin de trier l'ensemble des données et pouvoir conclure au rôle exact de la TSLP dans un microenvironnement tumoral (Lo Kuan and Ziegler, 2014).

## **G. Le rôle de la TSLP dans l'intestin**

Au niveau intestinal, le rôle de la TSLP est plus complexe (**Figure 49**). En effet, les deux isoformes et rôles de la TSLP y sont retrouvés. La TSLP 2 est constitutivement libérée/sécrétée par les CEI alors que la TSLP 1 n'est sécrétée qu'en cas d'inflammation (Fornasa et al., 2015). Les résultats de ce manuscrit confirment



uniquement l'expression constitutive du gène codant la TSLP 2 au niveau des CEI à l'état basal (Martin Mena et al., 2017).



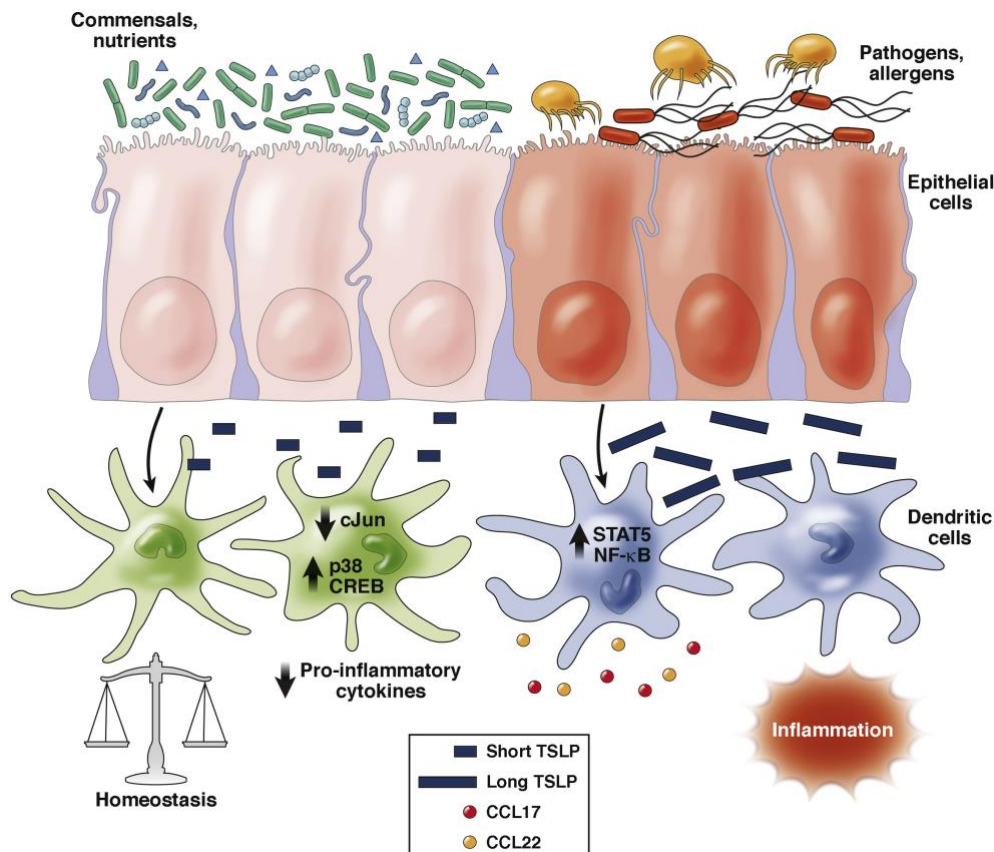
**Figure 49** : Rôles de la TSLP dans l'intestin d'après Takai (Takai, 2012).

## 1. La TSLP dans les MICI

Concernant les MICI, le rôle de la TSLP est encore mal connu (**Figure 49**). D'une part, son expression est diminuée voire absente au niveau des CEI chez les patients atteints de MC (Iliev et al., 2009b; Rimoldi et al., 2005a; Zaph et al., 2007). D'autre part, chez les patients atteints de RCH, il est retrouvé une diminution d'expression de la TSLP sur les tissus non inflammatoires alors que cette expression est augmentée au niveau des tissus inflammatoires en comparaison à des tissus de patients contrôles (Noble et al., 2008; Ordonez et al., 2012; Tanaka et al., 2010). Selon Tanaka *et al.*, cette augmentation est due à une production de cytokines Th2 pro-inflammatoires (Tanaka et al., 2010). En parallèle de cette expression aberrante de la TSLP au cours des MICI, il est observé une diminution des lymphocytes T régulateurs (Eastaff-Leung et al., 2010).

La TSLP 2 est présente constitutivement dans le tissu sain intestinal humain alors que ce n'est pas le cas pour la TSLP 1. (Fornasa et al., 2015; Martin Mena et al., 2017). Cependant au niveau des tissus inflammatoires, nos résultats sont différents de ceux de Fornasa *et al.*. En effet, si nous observons une diminution significative de l'expression de la TSLP 2, sans observer une induction de l'expression de la TSLP 1, Fornasa *et al.* remarquent une augmentation significative de cette dernière sans de changement significatif sur l'expression de la TSLP 2 (**Figure 50**).

Rimoldi *et al.* concluent leur recherche en émettant l'hypothèse qu'une concentration physiologique de la TSLP pourrait rétablir l'homéostasie intestinale et apporter une réelle bénéfice thérapeutique pour les patients atteints de MICI (Rimoldi et al., 2005a). Une étude clinique a également montré qu'une réponse des lymphocytes Th2 et Trég induite par une infection helminthique via une voie potentiellement dépendante de la TSLP, permet de réduire les symptômes des personnes atteints de MICI (Maizels et al., 2009).



**Figure 50 :** La CEI ne sécrète pas la même isoforme de TSLP selon le contexte (homéostasie ou inflammation) (Tsilingiri et al., 2017).

## 2. La TSLP dans la maladie coeliaque

Chez les patients atteints de la maladie coeliaque, une diminution de la TSLP 2 dans la muqueuse intestinale est observée pour les malades non traités ou réfractaires en comparaison aux patients traités (Biancheri et al., 2015). Cette diminution de la

TSLP pourrait contribuer à l'augmentation des enzymes dégradant la matrice des fibroblastes et des cytokines libérées par les lymphocytes T.

Une étude sur des enfants atteints de la maladie coeliaque montre une diminution d'expression du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  au niveau des muqueuses duodénales. Cette diminution d'expression serait due au peptide de gliatine qui provoquerait un stress oxydatif avec pour conséquence finale, l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de PPAR $\gamma$  (Luciani et al., 2010). En parallèle de cette diminution, il est observé une augmentation significative de la TSLP (Sziksz et al., 2014). Il montre dans cette même étude que les patients nourris par un régime sans gluten voient leur expression de PPAR $\gamma$  significativement augmentée et celle de la TSLP diminuée. Les auteurs émettent donc l'hypothèse que PPAR $\gamma$  pourrait jouer le rôle de régulateur inhibiteur du processus inflammatoire induit par la TSLP.

### **3. La TSLP dans les infections aux helminthes**

Lors d'infections par l'helminthe *Trichuris muris*, la TSLP permet une réponse pro-Th2 protectrice, via une augmentation d'OX40L par des cellules dendritiques (Taylor et al., 2009) (**Figure 49**). Comme vu précédemment, chez des souris « *wild type* » traitées par un anticorps anti-TSLP, Taylor *et al.* ont observé une susceptibilité accrue au parasite accompagné d'une augmentation d'expression d'Il-12/23p40, d'IFN $\gamma$  et d'IL-17A. Cela avait pour conséquence une diminution de réponse Th2 spécifique de ce pathogène. De plus, il démontre également l'importance de la liaison TSLP avec son récepteur pour obtenir une réponse anti-helminthique satisfaisante.

### **4. Rôle tolérogène de la TSLP dans l'intestin**

Son rôle homéostatique a également été démontré dans la tolérance vis à vis de la flore commensale et la différenciation de cellules dendritiques tolérogènes (Iliev et al., 2009a; Li et al., 2011b). Ceci aboutit à la production de lymphocytes T

régulateurs (**Figure 49**) et la modulation du profil inflammatoire Th1/Th17 (Rimoldi et al., 2005a). En effet, la TSLP va inhiber la production d'IL-12 et IL-23p40 des cellules dendritiques et ainsi réduire la polarisation Th1/Th17 et diminuer la production de cytokines inflammatoires (Th-17, IFN $\gamma$ ) (Shale and Ghosh, 2009; Ziegler and Artis, 2010).

## **H. La TSLP joue le rôle de peptide antimicrobien**

D'autres équipes de recherche se sont penchées sur un tout autre aspect de la fonction de la TSLP. En effet, ils ont émis l'hypothèse que la TSLP pouvait jouer un rôle de peptide antimicrobien. Sonesson *et al.* ont mis en évidence une activité antimicrobienne de la TSLP recombinante, préférentiellement sur les bactéries gram négatif (*E. coli* et *Ps. aeruginosa*) (Sonesson et al., 2011). Ils démontrent également que la région C-terminale, commune aux deux transcrits de la TSLP, serait la région où se situe l'activité antimicrobienne (Sonesson et al., 2011).

Bjerkan *et al.* sont allés plus loin et ont cherché à savoir laquelle des isoformes pouvait avoir une activité antimicrobienne. Ainsi, ils démontrent que la TSLP 2, en plus d'être l'isoforme prédominante dans les kératinocytes, joue un rôle de peptide antimicrobien (Bjerkan et al., 2015).

# Hypothèse de travail

Suite aux travaux du laboratoire concernant le déficit de PPAR $\gamma$  au niveau des CEI chez les patients atteints de RCH, ces derniers se sont orientés sur la compréhension du rôle de PPAR $\gamma$  dans l'homéostasie intestinale mais aussi sur la cause et les conséquences de ce déficit chez ces patients. Quelques publications commencent à montrer le rôle anti-inflammatoire joué par le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  au niveau des muqueuses intestinales. Cependant aucune d'entre elles n'explique les conséquences de son déficit au niveau des cellules coliques intestinales.

L'hypothèse de ce travail est que le défaut d'expression de ce facteur de transcription au sein des CEI perturberait les capacités de ces cellules à induire un phénotype tolérogène des cellules immunitaires de la muqueuse intestinale. Ainsi, le déficit de PPAR $\gamma$  pourrait être une des causes de rupture de la tolérance intestinale et être à l'origine du développement d'une réaction inflammatoire exagérée au niveau des muqueuses intestinales coliques chez les patients atteints de RCH. La compréhension et la description des différents mécanismes moléculaires et cellulaires impliquées dans cette perte de tolérance permettraient d'ouvrir la possibilité de corriger ce déséquilibre chez les patients atteints de MICI.

**Les buts du projet sont donc :**

- 1. D'identifier des gènes cibles du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  au niveau de lignée de cellules épithéliales intestinales**
- 2. De confirmer le rôle de PPAR $\gamma$  dans le contrôle de l'expression de ces gènes cibles dans des lignées de cellules épithéliales intestinales.**
- 3. D'évaluer et de comparer l'expression des gènes cibles chez les patients atteints de rectocolite hémorragique.**

# Matériels et méthodes

## I. Culture cellulaire classique

Deux lignées cellulaires ont été utilisées. La première lignée était les Caco-2 (n°ATCC : CRL 2102), dérivée de cellules épithéliales d'adénocarcinome colique. Cette lignée était cultivée dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplémenté avec 20% de sérum de veau fœtal (SVF, Dutscher, Brumath, France), 1% de pénicilline-streptomycine (Invitrogen). La deuxième lignée était les T84 (n°ATCC : CCL-248), dérivée de cellules épithéliales de cancer colorectale métastatique isolées sur un poumon. Cette lignée est cultivée dans un milieu DMEM associé avec du Ham's F12 medium. Ce mélange est supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal et 1% de pénicilline-streptomycine. Les milieux de culture étaient changés tous les 2-3 jours afin de préserver un milieu riche en nutriments et pauvre en déchets toxiques pour permettre une croissance cellulaire optimale.

Parmi les lignées de Caco-2 disponibles au laboratoire, les cellules PPAR $\gamma$  « knock-down » (ShPPAR $\gamma$ ) ont été utilisées. Elles expriment de façon stable un ARN anti-sens dirigé contre le gène codant PPAR $\gamma$  conduisant à une diminution spécifique et significative de l'expression de PPAR $\gamma$ . Ce déficit d'expression de PPAR $\gamma$  a été mesuré par qRT-PCR et western blot en comparaison à la lignée contrôle ShLuc (diminution d'expression du gène luciférase, normalement absent dans ces cellules).

Les lignées cellulaires étaient cultivées en monocouche confluente à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO<sub>2</sub> et 85% d'humidité. Chaque semaine, les monocouches confluentes étaient traitées à la trypsine (Invitrogen) puis repiquées après une dilution au 1/10<sup>ème</sup>. Concernant les lignées Caco-2 ShPPAR $\gamma$  et Caco-2 ShLuc, la puromycine (2,5 µg/mL, Sigma) était ajoutée au milieu afin de maintenir la sélection des cellules transfectées.

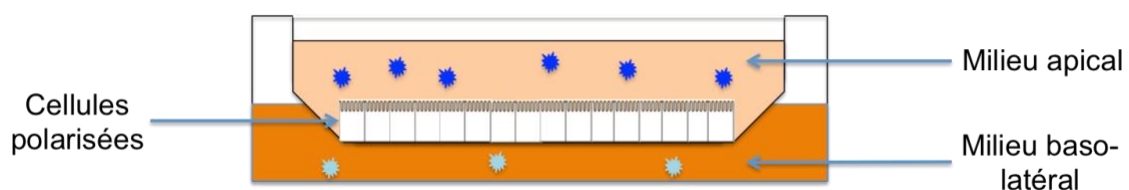
Pour les expériences de stimulation, les cellules étaient placées dans des plaques 6 puits. Chaque puits contenait 10<sup>6</sup> cellules. La veille des stimulations (16

heures avant), le milieu de culture des puits était remplacé par un milieu sans SVF afin de synchroniser les cellules.

## II. Culture cellulaire sur filtre

Une seule lignée cellulaire a été utilisée pour cette culture : la lignée Caco-2 (Caco-2 CRL, Caco-2 ShLuc et Caco-2 ShPPAR $\gamma$ ). Les cultures ont été faites sur des plaques 12 puits compatible avec les filtres semi-perméables Transwell®. 30 000 cellules ont été déposées sur chaque filtre (**Figure 51**). Durant les 7 premiers jours, du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplémenté avec 20% de sérum de veau fœtal (SVF, Dutscher, Brumath, France), 1% de pénicilline-streptomycine (Invitrogen) a été placé sous et sur le filtre. Puis entre le 8<sup>ème</sup> jour et le 21<sup>ème</sup> jour, du milieu DMEM supplémenté en SVF et la pénicilline-streptomycine est placé sous le filtre (milieu baso-latéral) et le milieu déposé sur le filtre ne sera pas supplémenté en SVF. Afin de garantir l'intégrité du tapis cellulaire et la polarisation des cellules, la mesure de la résistance trans-épithéliale (TEER) a été effectuée tous les 2 jours, juste avant le changement de milieu (EVOM<sup>2</sup>, *Epithelial Voltammeter*, WPI).

Lorsque des cellules Caco-2 ShLuc et Caco-2 ShPPAR $\gamma$  ont été cultivées, la puromycine (2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma) a été ajoutée dans les 2 milieux/compartiments.



**Figure 51** : Représentation schématique des compartiments accessibles grâce à la technique de culture cellulaire sur filtre Transwell®.

### **III. Traitements des cellules**

Les cellules ont été traitées avec l'acide 5-amino salicylique (5-ASA 30 mM, Sigma) (Rousseaux et al., 2005), du CLA (*Conjugated linoleic acid*), un agoniste naturel de PPAR $\gamma$  (1 mM, Sigma) (Bassaganya-Riera et al., 2004), de la pioglitazone (famille des thiazolidinediones, 10 $\mu$ M, Sigma) et un nouveau modulateur de PPAR $\gamma$  développé au laboratoire et appelé GED (acide amino-phényl-methoxy-propionique) (GED 30 mM, Nogra Pharma, Italie) (Rousseaux et al., 2011) et un antagoniste spécifique de PPAR $\gamma$  : le GW9662 (10 $\mu$ M, Sigma). Du milieu seul a été utilisé comme témoin négatif (=contrôle) pour les stimulations GED et 5-ASA. Le diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma) a servi de contrôle pour les traitements par la pioglitazone et le GW9662. L'éthanol 100% a servi de contrôle pour la stimulation par le CLA. Après 24 heures de stimulation, les puits sont rincés à deux reprises par du PBS stérile. Les cellules sont lysées par l'ajout d'1 ml de TRIzol® (Invitrogen) par puit. Les plaques sont ensuite congelées à -80°C en attendant l'extraction d'ARN et des protéines.

## **IV. Muqueuses et cellules épithéliales humaines**

### **A. Muqueuses intestinales**

Une tissuthèque (déclaration de collection biologique n° DC-2008-642) est disponible au laboratoire. Les prélèvements sont des fragments de pièces opératoires récupérées lors de chirurgies ablatives. Cette tissuthèque contient des prélèvements de côlons de patients contrôles (opérés par exemple pour l'ablation d'une diverticulite), mais également des prélèvements d'intestins grêles et de côlons provenant de patients atteints de RCH et de MC. Ces prélèvements sont effectués en zones inflammatoires et non inflammatoires lorsque cela est possible.



Les données des patients sont les suivantes :

### **Sujets contrôles (n=22)**

#### Sexe

Nombre d'hommes (% d'hommes) 12/22 (54.5%)

Age à l'inclusion 57.5 ± 12.9

#### Pathologies

*Polypes* 4/22 (18.2%)  
*Adenocarcinome* 4/22 (18.2%)  
*Diverticulite* 13/22 (59.1%)  
*Mégacôlon toxique* 1/22 (4.5%)

### **Rectocolite hémorragique (n=23)**

#### Sexe

Nombre d'hommes (% d'hommes) 09/23 (39.1%)

Age à l'inclusion 42.6 ± 13.6

Age du diagnostic 35,2 ± 12.2 (*données manquantes n=2*)

#### Etendue de la maladie

*Colite gauche* 4/23 (17.4%)  
*Pancolite* 19/23 (82.6%)

#### Traitements à l'inclusion

*Aminosalicylates* 6/23 (26.1%)  
*Corticoides* 6/23 (26.1%)  
*Immunosuppresseurs* 2/23 (8.7%)  
*Anti-TNF* 8/23 (34.8%)  
*Aucun traitement* 1/23 (4.3%)  
*Données manquantes* 1/23 (4.3%)

#### Type de chirurgie

*Colectomie* 17/23 (74%)  
*Proctectomie* 3/23 (13%)  
*Sigmoïdectomie* 3/23 (13%)

Un morceau de prélèvement est mis dans un tube contenant 1 ml de Trizol® puis broyé (ultraturax ou Precellys). Les ARN et les protéines sont extraits par la technique du TRizol®.

## **B. Extractions des cellules épithéliales intestinales**

Les côlons récupérés sont ouverts et découpés en morceau d'environ 5 millimètres. Les morceaux de muqueuses sont lavés dans la solution de lavage (Milieux de culture + 1% DTT 0,1M). Ils sont ensuite laissés 5 à 10 minutes sous agitation douce. Les morceaux de muqueuses sont ensuite incubés dans le HBSS (HBSS + 1% SVF + 1% glutamine 200 mM + 1% EDTA 500 mM + 1% pénicilline/streptomycine (100X) + 1% ampicilline 10 mg/mL + 0,5% gentamycine 10 mg/mL + 1% Amphotéricine B 250 µg/mL + 2 gouttes de soude 0,1M pour ajuster le pH) sous agitation lente durant 30 minutes- 1 heure, en vortexant de temps en temps. A la fin de l'agitation, les morceaux de muqueuses sont jetés et la solution HBSS est centrifugé à 600 g durant 5 minutes. Le culot est repris dans 10 mL de milieu RPMI (REF). Les cellules présentes dans la solution, sont filtrées sur un filtre de nylon. Par la suite, les cellules sont lavées 2 fois avec 10 mL de milieu RPMI. Enfin les cellules sont reprises dans 4 mL de Percoll de densité 1,055 (11,3 mL de sérum physiologique + 8,7 mL de Percoll).

1 mL de Percoll de densité 1,085 (6,3 mL de sérum physiologique + 13,7 mL de Percoll) est déposé dans un falcon de 15 mL. Puis, les 4 mL de Percoll 1,055, contenant les cellules, sont déposés délicatement dans le falcon puis 3 mL de RPMI. Le falcon est centrifugé 20 minutes à 600 g. L'anneau de cellules épithéliales (anneau du haut) est récupéré. Il est lavé 2 fois dans du sérum physiologique puis il est repris dans 1 mL de sérum physiologique. Après comptage des cellules, les cellules sont divisées en 2 aliquots et transférées dans 2 eppendorfs de 1,5 mL et centrifugées 5 minutes à 500 rpm. Le surnageant est retiré et le culot cellulaire sec est congelé à -80°C.

Les cellules sont lysées par l'ajout d'1 ml de TRizol® (Invitrogen) par eppendorf pour l'extraction d'ARN et des protéines.

## **V. Traitement des muqueuses de souris**

### **A. Traitement *ex vivo* des côlons de souris**

Les muqueuses coliques de souris C57BL/6 âgées de 8 à 10 semaines ont été traitées de façon *ex vivo*. Les souris étaient sacrifiées, leur côlon était récupéré puis placé dans une boîte de culture, durant 6 heures, avec du milieu DMEM + 1% de P/S en présence d'un agoniste de PPAR $\gamma$  (5-ASA 30 mM, GED 30 mM) ou d'un antagoniste de PPAR $\gamma$  (GW9662 10  $\mu$ M). Le DMSO a servi de contrôle lors du traitement par le GW9662. Les pièces de côlons ont été rincées avec du PBS, placées dans un tube contenant 1 ml de Trizol puis broyées (ultraturax ou Precellys). L'ARN et les protéines ont été extraites par la technique du TRIzol®.

### **B. Traitement *in vivo* des côlons de souris**

Les différents traitements utilisés ont été le 5-ASA (30 mg/kg), le GED (30 mg/kg), la pioglitazone (1  $\mu$ M), le GW 9662 (1 mg/kg dans du DMSO à 1%), la solution placebo (CMC 0,5%, Tween 80 1%) et le DMSO pour les témoins de la pioglitazone et du GW9662. Les voies d'administrations étaient différentes selon le traitement. Le 5-ASA a été administré par voie intra-rectale alors que le GED a été administré par gavage. Concernant le GW9662, son administration a été faite par voie intra-péritonéale. Les traitements ont été effectués une fois par jour pendant 1 semaine. Au 8<sup>ème</sup> jour, les souris ont été sacrifiées, les colons ont été récupérées, placées dans un tube contenant 1 ml de TRIzol® puis broyées (Ultraturax ou Precellys) afin d'y extraire l'ARN et les protéines.

## **VI. Extraction de l'ARN et des protéines**

L'extraction de l'ARN a été réalisée au TRIzol® (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Après l'addition de chloroforme et centrifugation (12000 g, 15 minutes, 4°C), les ARN contenus dans la phase aqueuse sont précipités et lavés après un traitement successif à l'isopropanol et à l'éthanol 75%. La phase organique restante est utilisée pour l'extraction des protéines. Les culots d'ARN sont re-suspendus dans 20 à 30 µL d'eau sans ribonucléase. La quantification et l'analyse de la qualité de l'ARN (via le ratio DO260/DO280) étaient réalisées par spectrophotométrie (Nanodrop).

Avant d'effectuer l'extraction des protéines, une étape de précipitation de l'ADN est réalisée. 300 µL d'éthanol 100% sont ajoutés à la phase organique et les tubes sont centrifugés (2000 g, 5 minutes, 4°C). Le surnageant est récupéré et les protéines contenues dans la phase organique sont précipitées à l'isopropanol (10 minutes à température ambiante puis centrifugation 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C). Le culot protéique est lavé 3 fois par une solution de Guanidine HCl 0,3 M dans de l'éthanol à 95% puis lavé 1 fois par une solution d'éthanol à 100%. Après séchage, le culot est repris dans le SDS 1% et laissé à 4°C toute la nuit. Le lendemain, les culots sont chauffés 10 minutes à 50°C.

## **VII. Traitement DNase et RT-PCR**

Avant la rétrotranscription, l'ADN génomique contaminant les ARN extraits est éliminé par digestion enzymatique à la désoxyribonucléase I (DNase I Amplification grade, Sigma-Aldrich®). 2,2 µg d'ARN sont traités pendant 15 minutes avec 1 unité de DNase I. La réaction est stoppée par ajout d'EDTA (4,55 mM) puis l'ARN est incubé 10 minutes à 70°C.

L'ARN est ensuite rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) par action de la rétrotranscriptase inverse, en utilisant le kit commercial Applied Biosystems

(Warrigton, Grande Bretagne), suivant les instructions du fabricant. 1 µg d'ARN total était mis en présence de transcriptase inverse (Multiscribe, cDNA Reverse Transcriptase), d'amorces aléatoires (*random primers*), de tampon (10X RT Buffer) pendant 10 minutes à 25°C, puis 2 heures à 37°C et enfin 5 minutes à 85°C.

### VIII. Q-PCR en fast past

Le niveau d'expression des ARNm a été estimé par PCR quantitative (q-PCR) en temps réel de 40 cycles. La q-PCR a été effectuée en utilisant un système StepOnePlus (Applied Biosystem) à l'aide de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem). Le SYBR® Green est un fluorochrome qui a la capacité de s'intercaler entre les bases de l'ADN double brins en cours de synthèse. L'évolution de la PCR peut donc être suivie grâce à la fluorescence émise par le SYBR Green et analysée par l'automate. La quantification des signaux q-PCR a été effectuée à l'aide d'une méthode de quantification relative en utilisant la GAPDH comme gène de référence pour les extraits humains.

Les valeurs ont été représentées en termes de quantité relative de variation d'expression de l'ARNm (exprimé en  $2^{\Delta Ct}$ ) ou de multiplication par rapport aux conditions de contrôle (Fold).

Les séquences d'amorces humaines utilisées sont :

Gènes humains	Séquence des amorces sens	Séquences des amorces anti-sens
GAPDH	5'-GACACCCACTCCTCCACCTTT-3'	5'-TTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3'
PPAR $\gamma$	5'- GCTGTCATTATTCTCAGTGGAGAC- 3'	5'-GTCTTCTTGATCACATGCAGTAG-3'
TSLP	5'-TGCCTTAGCTACTGGTGCC-3'	5'-ACGCCACAATCCTTGTAATTG-3'
TSLP 1	5'- GGGCTGGTGTTAACTTACGACTTCA -3'	5'-ACTCGGTACTTTTGGTCCCACTCA-3'

TSLP 2	5'-CGT-AAA-CTT-TGC-CGC-CTA-TGA-3'	5'-TTC-TTC-ATT-GCC-TGA-GTA-GCA-TTT-AT-3'
TSLP 1 (Fornasa et al., 2015).	5'-CACCGTCTCTTGTAGCAATCG-3'	5'-TAGCCTGGGCACCAGATAGC-3'
TSLP 2 (Fornasa et al., 2015)	5'-CCGCCTATGAGCAGCCAC-3'	5'-CCTGAGTAGCATTTATCTGAG-3'
IL-8	5'- AAGGAACCATCTCACTGTGTGTA AAC 3'	5'-AAATCAGGAAGGCTGCCAAGA-3'
IL-1 $\beta$	5'-TTGTTGAGCCAGGCCTCTCT- 3'	5'-CCAAATGTGGCCGTGGTT-3'
LT $\beta$	5'-TATCACTGTCCTGGCTGTGC-3'	5'-GCTTCTGAAACCCAGTCCT-3'
TNF $\alpha$	5'-ATCAATCGGCCCGACTATCTC-3'	5'-ACAGGGCAATGATCCCAAAGT-3'
CCL 28	5'-AATGCAGCAGAGAGGACTCG-3'	5'-ATGTGAAACCTCCGTGCAAC-3'
BAFF	5'-CGTTCAGGGTCCAGAAGAAA-3'	5'-AAGCTGAGAAGCCATGGAAC-3'
IL-10 R $\alpha$	5'-AACTGGACCGTCACCACCAC-3'	5'-GGCCTGGGTAGCTGAATCTT-3'
CCL 20	5'-GTGCTGCTACTCCACCTCTG-3'	5'-CGTGTGAAGCCACAATAAA-3'
TGF $\beta$	5'-CAAGCAGAGTACACACAGCAT-3'	5'-TGCTCCACTTTTAACTTGAGCC-3'
RALDH 1	5'-GCACGCCAGACTTACCTGTC-3'	5'-CCACTCACTGAATCATGCCA-3'
IL-13 R $\alpha$ 1	5'-TCCCTCCAATTCCTGATCCT-3'	5'-AGTCGGTTTCCTCCTTGGTT-3'
IL-22 R	5'-AAATCATGATGGTGCCAAGG-3'	5'-TTAGAGCTCCAGGTCAACCG-3'
IL-10 R $\beta$	5'-GGGAACCTGACTTTCACAGC-3'	5'-CCTGACTCTCAAGGTGTGGTC-3'

Les séquences d'amorces murines utilisées sont :

Gènes murins	Séquence des amorces sens	Séquences des amorces anti-sens
$\beta$ -Actine	5'- TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC- 3'	5'- TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'
TSLP	5'-CCGAGAACAAGAGAAGCCC-3'	5'-GTGCCATTTCTGAGTACCGT-3'

## **IX. Immunoprécipitation des protéines**

Cette technique consiste à sélectionner et concentrer la protéine d'intérêt. 6 millions de cellules sont cultivées et traitées dans des boîtes de pétri 10 cm spécifique pour la culture cellulaire.

Après un traitement de 24 heures, ces cellules sont lavées deux fois au PBS. Les cellules sont ensuite décollées à l'aide d'un grattoir dans du PBS. Après centrifugation, les culots sont récupérés et traités avec un mix de tampon IPH (Tris 50 mM pH= 8, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NP40 0,5%) et d'inhibiteurs protéases (PMSF 0,1 M et Protease Inhibitor Cocktail, Sigma®) pendant 1 heure dans la glace. Après une nouvelle centrifugation à vitesse maximale, le surnageant est récupéré puis dosé. Le réactif de Bradford est utilisé et la concentration protéine des surnageants est calculée selon une gamme d'étalonnage.

1,5 mg de protéine sont engagés par immunoprécipitation (IP) avec 2 µg d'anticorps (TSLP : Clone #184638 Rabbit polyclonal, Abcam®) qui ciblent la protéine d'intérêt. L'ensemble est incubé une nuit à 4°C. Le lendemain, un mélange de protéine A/G (bille d'agarose 50/50) est ajouté. Le mélange est incubé 2 heures à 4°C. Enfin, les billes sont lavées 3 fois par du tampon IPH. Les échantillons sont analysés par la technique de Western Blot. 15 µg de surnageants (input) sont récupérés pour analyser la quantité d'actine présente.

## **X. Western Blot**

Les différents échantillons de protéines sont dénaturés 5 minutes à 95°C (tampon de dénaturation : Tris HCl 50 mM pH 6,5, SDS 2,5%, β mercaptoéthanol 5%, glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,08%) puis déposés sur un gel d'acrylamide soit de 12% pour la protéine de PPAR $\gamma$  soit de 15% pour la protéine de la TSLP 2. Après migration 1H30 à 130V (tampon de migration : Tris 3 g/L, Glycine 14,4 g/L, SDS 1 g/L), les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C extra

(Amersham biosciences) en milieu liquide (tampon de transfert : Tris 3 g/L, Glycine 14,4 g/L, Éthanol 20%) 1 heure à 110V.

Cette membrane est saturée dans du TBS 1X (Tris Buffer Saline : 24,23 g Tris ; 80,06 g NaCl, pH 7,6)-Tween 0,1% Lait 5% BSA 0,5% 1H sous agitation à température ambiante. Elle est ensuite incubée une nuit à 4°C, sous agitation, en présence de l'anticorps primaire (PPAR $\gamma$  : C26H12 Rabbit mAb, Cell Signaling® ; TSLP : Clone #184638 Rabbit polyclonal, Abcam® ;  $\beta$ -actin : Mouse mAb, Sigma-Aldrich®) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du TBS IX-Tween 0,1% et de la BSA 5% pour l'anticorps anti-PPAR $\gamma$  ou du lait 5% pour l'anticorps anti-TSLP. Trois lavages de 10 minutes en TBS IX-Tween 0,4% sont effectués puis la membrane est incubée sous agitation avec l'anticorps secondaire (Goat IgG ; PPAR $\gamma$  et TSLP : anti-rabbit IgG Perox, Jackson ;  $\beta$ -actin : anti-mouse IgG Perox, Jackson) dilué au 1/10 000<sup>ème</sup> dans du TBS IX-Tween 0,1%-lait 5%. De nouveau la membrane est lavée 3 fois 10 minutes avec du TBS IX-Tween 0,4%. Elle est incubée 1 minute avec le kit Immobilon Western Chemiluminescence HRP substrate (Millipore). La membrane est ensuite placée dans une cassette de révélation. Puis, le film chimioluminescent (GE Healthcare) est apposé dans la cassette le temps nécessaire. Enfin, le film est successivement immergé dans un bain révélateur, eau et un bain fixateur (Sigma).

## **XI. Étude in silico du promoteur de la TSLP**

Des séquences PPRE ont été recherchées *in silico* au niveau du promoteur du gène TSLP 2. 1000 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription ont été analysées par différents logiciels NUBIScan<sup>15</sup>, PPRE Search<sup>16</sup> afin d'identifier des éléments de réponses potentiels (**Figure 52**). La fonctionnalité des séquences PPRE prédites a été étudiée par deux approches complémentaires : *ChIP assay* (ImmunoPrécipitation de la Chromatine) et l'étude de gène rapporteur en transfection transitoire.

---

<sup>15</sup> <http://www.nubiscan.unibas.ch/>

<sup>16</sup> <http://www.classicrus.com/PPRE>



## **XII. ChIP (Chromatin ImmunoPrecipitation)**

L'immoprécipitation de la chromatine est une technique qui permet de mettre en évidence et sélectionner des fragments de chromatine qui ont été immunoprécipités par un anticorps reconnaissant une protéine spécifique (ici PPAR $\gamma$ ). Cette technique a pour but de mettre en évidence la fixation physique de PPAR $\gamma$  sur l'ADN et en particulier sur la zone promotrice de la TSLP 2.

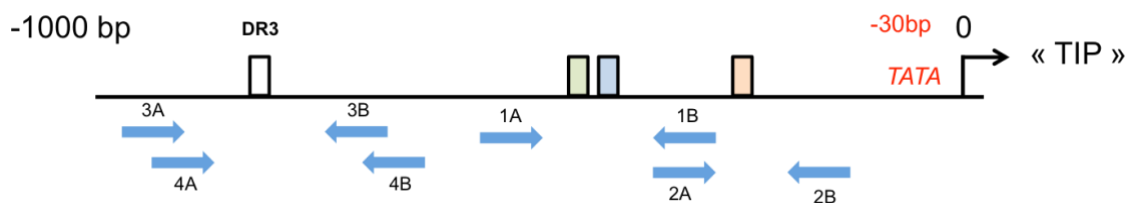
L'immunprécipitation de la chromatine (ChIP) se déroule en plusieurs étapes :

- Préparation des cellules :
  - Culture et traitement des cellules : les cellules Caco-2 sont platées dans des boites de 15 cm de diamètre puis la veille des stimulations, le milieu de culture des boites est remplacé par un milieu sans SVF. Le lendemain, ces cellules ont été stimulées pendant 24h par un ligand agoniste de PPAR $\gamma$  (GED 30 mM).
  - « Cross-linking » ou étape de fixation : les cellules sont ensuite fixées par un traitement au formaldéhyde à 10% pendant 30 minutes à température ambiante avec une agitation à mi-temps. L'action du formaldéhyde est stoppée par l'ajout de glycine à 1,25M (préparée extemporanément) durant 5 minutes.
  - Lyse cellulaire : l'étape suivante est réalisée sur la glace. Les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS 1X froid. Les boites sont grattées en présence de PBS 1X + inhibiteurs de protéases (cocktails d'inhibiteurs de protéases au 1/1000<sup>ème</sup> + PMSF 0,1M au 1/1000<sup>ème</sup>). Le PBS contenant les cellules est transféré dans un falcon. L'opération est répétée une deuxième fois. L'ensemble est centrifugé à 3000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré et le culot est repris dans du SDS buffer froid (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH8) + inhibiteurs de protéases (même mélange que précédemment).

- Etape de sonication : afin de pouvoir fragmenter la chromatine, une étape de sonication est nécessaire. Un bioruptor® est utilisé avec un programme comportant une alternance de phases ON et OFF toutes les 30 secondes pour une durée totale de 10 minutes. A la fin de cette sonication, 10% du volume est prélevé et congelé. Cet échantillon servira « d'Input » (= témoin).
- Immunoprécipitation : l'étape d'immunoprécipitation a pour but de sélectionner uniquement les fragments de chromatine.
  - Pré-clearing : la chromatine en suspension va être diluée dans de l'IP buffer froid (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 mM Tris HCl pH 8,1, inhibiteurs de protéases) avec du DNA carrier (ADN de sperme de saumon) et des billes de sépharose (Protéine A/G). L'ensemble est incubé durant 4 heures à 4°C sur une roue. Suite à cette étape, les tubes sont centrifugés 1 minute à 800g à 4°C. Les culots formés représentent les complexes non-spécifiques. Seuls les surnageants seront conservés.
  - ImmunoPrécipitation : après avoir récupéré les surnageants de l'étape précédente, de l'IP buffer est de nouveau ajouté ainsi que des anticorps anti-PPAR $\gamma$  pour le tube « IP anti-PPAR $\gamma$  » (aucun anticorps n'est placé dans la situation contrôle). En parallèle de cette étape, des billes de sépharose sont saturées (billes + DNA carrier + BSA 10mg/mL). L'ensemble (tubes IP et tube billes saturées) est incubé toute la nuit sur roue à 4°C. Le lendemain, les billes de sépharose saturées et du DNA carrier sont placés dans les tubes (IP contrôle et IP anti-PPAR $\gamma$ ). Ils sont ensuite incubés 4 heures sur roue à 4°C et centrifugés 1 minute à 800g à 4°C. Les culots représentent cette fois-ci les complexes spécifiques recherchés. Les surnageants sont jetés.
- Lavages : les culots subissent plusieurs étapes de lavage successifs avec des centrifugations d'1 minute à 800g à 4°C :
  - Wash buffer 1 froid (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0,1% Deoxycholate, 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 20 mM Tris HCl pH8,1) (X2).

- Wash buffer 2 froid (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 500 mM NaCl, 0,1% Deoxycholate, 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 20 mM Tris HCl pH8,1) (X2).
  - Wash buffer 3 (0,25 mM LiCl, 0,5% Deoxycholate, 0,5% NP40, 0,5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl pH 8,1) (X1).
  - Wash buffer 4 froid (1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl pH8,1) (X3).
- Extraction et purification de l'ADN :
- L'ADN purifié est extrait à l'aide de l'extraction buffer (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, SDS 1%). Ce dernier est ajouté au culot, incubé durant 10 minutes puis les tubes sont centrifugés pendant 5 minutes à 800g à 4°C. Puis l'extraction buffer contenant l'ADN est récupéré. Pour augmenter le rendement au maximum, cette opération est répétée 2 fois. La totalité de l'extraction buffer récupérée est ensuite incubée toute la nuit dans un bain marie à 65°C pour le « reverse cross-link », à savoir le détachement de l'anticorps PPAR<sub>γ</sub> aux fragments de chromatine. Les « Input » préalablement récupérés la veille sont également placés dans le bain marie.
  - Le lendemain, les culots d'ADN seront purifiés par un kit de purification (NucleoSpin Gel and PCR clean up).
- Analyse des fragments de chromatine par PCR : les fragments sont amplifiés sur des PCR de 30 cycles. Le « mix PCR » ajouté aux différents échantillons est composé (pour un puit) de 3µL de Tampon 10X–MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,5 µL de Taq platinum, 1 µL oligonucléotides (reverse et forward) (**Figure 52**), 15,5 µL d'eau stérile.

A la fin de la PCR, du « *loading buffer DNA 6X* » (Glycérol, BBP, EDTA, eau) est ajouté au produit de PCR. L'ensemble est déposé sur un gel d'agarose 2%. La migration se fait à 110V pendant environ 45 minutes.



**Figure 52 :** Représentation schématique des 1000 premières paires de base en amont du point d'initiation à la transcription du gène codant la TSLP 2 et des différentes amorces utilisées lors des expériences de ChIP.

Les séquences d'amorces utilisées pour la reconnaissance des fragments sont :

Amorces	Séquence des amorces sens (A)	Séquences des amorces anti-sens (B)
1	5'-GCCTGGGAGCAAAGGGTGGAGGG-3'	5'-CCCGATTGCTACAAGAGACGGTG-3'
2	5'-CAGAACTCCGAGAGGTGCCTG-3'	5'-GCTAGGCGCAGCCCCGCTCTG-3'
3	5'-CAGAAATATGGTGTACTTGGAA-3'	5'-GATGTCCGCATCTGTACTGTG-3'
4	5'-GCTGTGCTCCAGGTCTCTCCAGTG-3'	5'-GTACTGTGGCCATTCATGAATGC-3'

### **XIII. Etude du gène rapporteur**

Un fragment d'ADN génomique contenant l'élément PPRE identifié a été cloné en amont du gène rapporteur luciférase (plasmide pGL4-Luc ; Promega). La capacité de cet élément PPRE à transactiver la transcription du gène rapporteur a été étudiée par transfection transitoire des cellules Caco-2 stimulées ou non par les ligands agonistes PPAR $\gamma$ . L'activité luciférase sera mesurée 24 à 36 heures après transfection.

Différents fragments d'ADN génomique ont été amplifiés et ont permis le clonage de différents vecteurs. Le fragment correspondant aux 1000 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription du gène *tslp2* humain (construction « Prom TSLP2 ») a été obtenu par PCR sur de l'ADN génomique d'extrait de cellules Caco-2 (oligonucléotide sens 5'-CGCTCGAGGGATGTCTATCCTTTGCTAAAG-3' ; oligonucléotide antisens 5'-CGAAGCTTGGCGGAGGGCACTCGTCGCGAAAAG-3'). Le fragment correspondant aux 548 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription du gène *tslp2* humain (construction « Prom TSLP2 $\Delta$ 1 ») a été obtenu par PCR sur de l'ADN

génomique d'extrait de cellules Caco-2 (oligonucléotide sens 5'-CGCTCGAGGGTACCTGAGTGGAAACTGTT-3' ; oligonucléotide antisens 5'-CGAAGCTTGGCGGAGGGCACTCGTCGCGAAAAG-3'). Les produits PCR ont été clonés en vecteur TOPO pCR4 (TOPO TA cloning, Invitrogen) puis séquencés afin de vérifier les éventuelles erreurs de Taq Polymérase. Pour chaque construction, un fragment sans mutation a été sous-cloné dans le vecteur pGL4.10[*Luc2*] (Promega) à l'aide des sites de restriction *XhoI/HindIII* introduits dans les oligonucléotides (soulignés dans la séquence).

Dans le cadre de la transfection transitoire, les cellules utilisées avaient un niveau de confluence compris entre 50 et 70%. Pour chaque condition, 2 millions de cellules ont été transfectées (SE Cell Line 4D-Nucleofector®, LONZA). Elles étaient placées au repos toute la nuit dans des plaques de 48 puits à raison de 100 000 cellules par puits. Les cellules sont ensuite traitées par un agonistes de PPAR $\gamma$  durant 24H.

Le lendemain, les cellules sont lavées avec du PBS puis un tampon de lyse (Reporter Lysis 5X buffer, Promega) dilué à l'eau stérile est ajouté. Si les cellules ne sont pas analysées tout de suite, elles sont placées à -80°C.

Deux étapes sont effectuées durant l'analyse :

- La première est un dosage de l'activité de la luciférase (gène rapporteur). Pour cela, 20  $\mu$ L de lysat cellulaire est utilisée avec 100  $\mu$ L de solution contenant le substrat de la luciférase (la luciférine) (Luciferase Assay System, PROMEGA) par puit et l'activité de la luciférase est mesurée sur un fluoromètre (FLUOstar Omega, BMG Labtech).
- La deuxième étape est un dosage des protéines des différents puits par la technique de Bradford. Du réactif de Bradford est placé avec les échantillons. Les échantillons sont incubés dans le noir pendant 15 minutes puis une lecture est faite à 595 nm.

#### **XIV. Mesure de l'activité de croissance bactérienne**

La veille des expériences de mesure de l'activité bactérienne, les souches bactériennes d'intérêt sont décongelées et placées dans un milieu de culture (Bouillon cœur cerveau, Oxoid) et dans un environnement (37°C, aérobie ou anaérobie) bénéfique à une croissance optimale.

Deux peptides anti-microbiens utilisés ont été synthétisés : la TSLP 2 et le LL-37 (10 mg, Protéogénix). Ils présentent une pureté de 95%.

Pour la TSLP 2, la séquence protéique (60 acides aminés) est : M-K-T-K-A-A-L-A-I-W-C-P-G-Y-S-E-T-Q-I-N-A-T-Q-A-M-K-K-R-R-K-R-K-V-T-T-N-K-C-L-E-Q-V-S-Q-L-Q-G-L-W-R-R-F-N-R-P-L-L-K-Q-Q.

Pour le LL-37, la séquence protéique (37 acide aminés) est : L-L-G-D-F-F-R-K-S-K-E-K-I-G-K-E-F-K-R-I-V-Q-R-I-K-D-F-L-R-N-L-V-P-R-T-E-S.

Les souches bactériennes utilisées proviennent de selles de patients hospitalisés au CHRU de Lille. Un consentement oral du patient est suffisant pour la récupération des selles. Parmi les souches utilisées, il y a :

- Une souche de *Clostridium perfringens*, nommée 16148, isolée chez un patient atteint de la MC.
- Une souche multirésistante d'*Enterococcus faecalis*, nommée 09001, isolée d'un patient en néphrologie
- Une souche d'*Escherichia coli* Adhéro-invasive, nommée LF82, isolée d'un patient atteint de la MC
- Une souche d'*Enterobacter Cloacae*, nommée OR 3,11, également isolée d'un patient atteint de la MC.

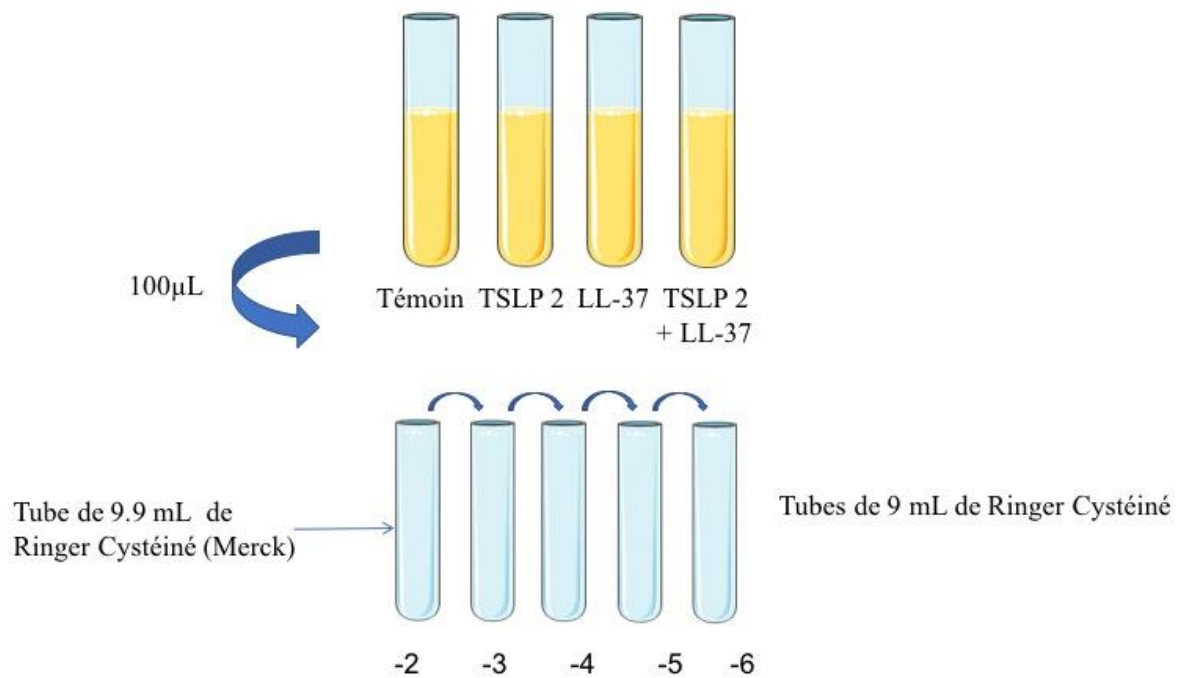
Le jour J, des tubes contenant le milieu de culture (Bouillon cœur cerveau, Oxoid) sont préparés avec les différentes concentrations de peptides antimicrobiens (TSLP 2 ou LL-37, aux concentrations finales : 4, 8, 16 ou 32 µg/mL). Les peptides sont solubilisés au préalable dans du DMSO. Un tube témoin ne contenant que du DMSO est préparé.

Les bactéries sont diluées dans chaque tubes afin d'obtenir une concentration bactérienne d'environ 10<sup>5</sup> bactéries/mL.

Au temps t=0, 100 µL de culture bactérienne avec du DMSO sont prélevés et ensemencés sur une gélose pour faire un témoin DMSO. De plus, un volume

(contenant  $10^5$  bactéries) de la solution mère de bactérie est ensemencé pour effectuer un dénombrement à  $t=0$  heure Cette boîte servira de témoin positif.

Au temps  $t= 2$  heures, 4 heures, 6 heures et 24 heures, des prélèvements sont effectués sur chaque condition, dilués (au  $10^{\text{ème}}$ ) puis ensemencés sur gélose. La technique se fait de la manière suivante :



100 µL des milieux de culture sont prélevés et pour chaque dilution, 1 mL de la dilution précédente est utilisée pour la nouvelle dilution.

La lecture des boîtes se fait à 24 heures après inoculation pour les bactéries aérobies et 48 heures pour les bactéries anaérobies. La lecture se fait toujours sur la boîte ayant un nombre de colonies compris entre 15 et 150 colonies.

## **XV. Analyses Statistiques**

Les analyses statistiques sont réalisées en utilisant le test non-paramétrique de Mann-Withney à l'aide du logiciel Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque  $p < 0,05$ .

# Résultats

## Résultats publiés

Dans cette sous-partie, l'ensemble des résultats présentés ont fait l'objet d'une publication dans *Frontiers in Immunology* en septembre 2017 : « ***The expression of the short isoform of TSLP in the colon is regulated by the nuclear receptor PPAR $\gamma$  and is impaired during ulcerative colitis*** » (A. Martin Mena, A. Langlois, S. Speca, L. Schneider, P. Desreumaux, L. Dubuquoy, B. Bertin) (Martin Mena et al., 2017).

### **I. L'expression de la TSLP est dépendante du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ dans les cellules Caco-2 et T84.**

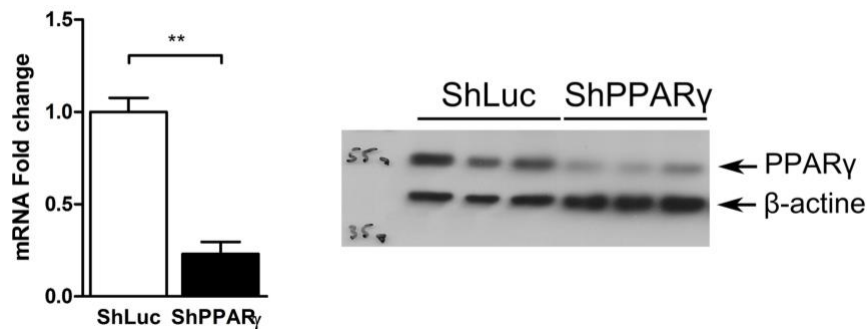
#### **A. Variation d'expression de gènes codant des protéines anti- ou pro-inflammatoires dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$ : recherche de gènes cibles de PPAR $\gamma$**

Des expériences de *screening* ayant pour but d'identifier des facteurs jouant un rôle dans la mise en place d'un mécanisme de tolérance et étant modulés par la diminution d'expression de PPAR $\gamma$  dans les CEI ont été entreprise.

Afin d'évaluer le rôle de PPAR $\gamma$  sur l'expression de différents gènes exprimés par les CEI, une lignée de Caco-2 exprimant stablement un ARN anti-sens (interférant) contre le gène PPAR $\gamma$  a été établie (Caco-2 ShPPAR $\gamma$ ). Cette technique permet d'obtenir un « *knock-down* » de PPAR $\gamma$ . Une deuxième lignée exprime un ARN anti-sens contre le gène codant la luciférase, normalement absent dans ces cellules (cellules contrôles ; Caco-2 ShLuc). La diminution de l'expression de PPAR $\gamma$  a été contrôlée par qRT-PCR et western blot (**Figure 53**). Les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  expriment environ 70% moins d'ARNm codant PPAR $\gamma$ , provoquant une diminution



significative de l'expression de la protéine PPAR $\gamma$ . Cette diminution d'expression du gène PPAR $\gamma$  dans la cellule Caco-2 ShPPAR $\gamma$  est équivalente à celle observée dans les CEI des patients atteints de RCH (Bouguen et al., 2014; Dubuquoy et al., 2003).



**Figure 53 :** Le niveau d'expression de PPAR $\gamma$  est significativement diminué dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$ . Confirmation du déficit d'expression par RT-qPCR (\*\* :  $p < 0,01$  ;  $n = 6$ ). Détection de la protéine PPAR $\gamma$  par Western Blot dans la lignée ShPPAR $\gamma$  en comparaison à ShLuc ( $n = 3$ ).

Ainsi, différents facteurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires exprimés par les CEI ont été évalués. (Figure 54).

La TSLP et TGF- $\beta$  sont deux cytokines régulatrices anti-inflammatoires (vu précédemment) (Zeuthen et al., 2008).

Les cytokines IL-8, TNF (*Tumor Necros Factor*), IL-1 $\beta$  et *Lymphotoxin*  $\beta$  (LT $\beta$  = TNF de type C) sont des cytokines inflammatoires. Leur expression est augmentée en cas d'inflammation (van Deventer, 1997).

Les molécules MCP-1 (*Monocyte chemotactic protein-1* = CCL2), CCL20 (*Chemokine (C-C ligand) ligand 20*) et CCL28 (*Chemokine (C-C ligand) ligand 28*) sont comme leurs noms l'indiquent, des molécules chimioattractantes. MCP-1 agit sur les monocytes, CCL20 sur les neutrophiles et CCL28 sur les éosinophiles (van Deventer, 1997; Sibartie et al., 2009).

L'expression des récepteurs alpha et bêta de l'IL-10 (IL-10R $\alpha$  et IL-10R $\beta$ ) et du récepteur à l'IL22 (IL-22R) ont été analysée. L'IL-10 et l'IL-22 sont de la même famille

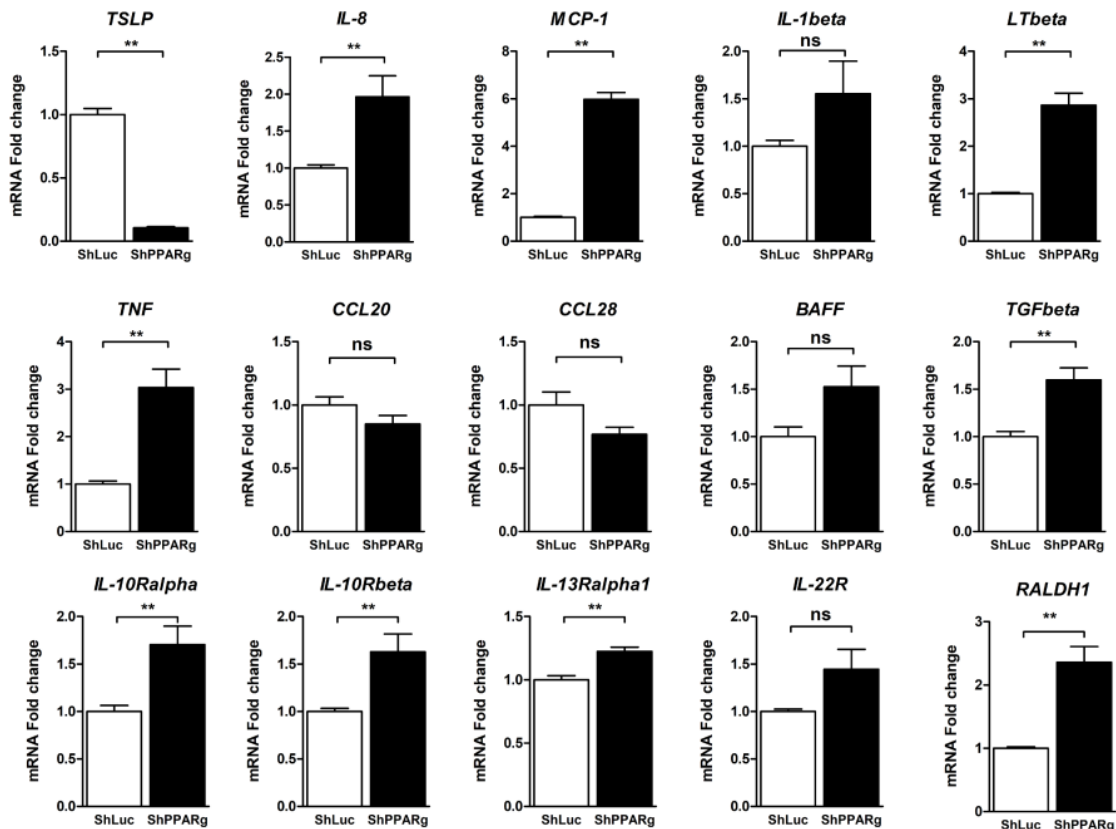
et régulent les réponses immunitaires. L'expression de l'IL-13R $\alpha$ 1 a également été recherché. Ce récepteur est significativement augmenté au niveau des CEI dans les cas de RCH (Mandal and Levine, 2010).

Enfin, l'expression de BAFF, protéine permettant la différenciation des lymphocytes B, et RALDH1 (*retinaldehyde dehydrogenase 1*), enzyme intervenant dans le métabolisme de la vitamine A, a également été évaluée.

L'expression des gènes codant l'IL-8, MCP-1, LT $\beta$ , TNF, TGF- $\beta$ , IL-10R $\alpha$ , IL-10R $\beta$ , IL-13R $\alpha$ 1, RALDH1 est significativement augmentée au niveau des cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  en comparant avec les cellules Caco-2 ShLuc. Ces résultats confortent les résultats d'Hadachi *et al.* chez des souris PPAR $\gamma^{\Delta IEC}$ . Ils ont mis en évidence une augmentation significative de l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  (Adachi et al., 2006).

Aucune différence significative n'est observée pour l'expression des gènes codant BAFF, IL-1 $\beta$ , CCL20, CCL28, IL-22R entre les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  et Caco-2 ShLuc.

Enfin, l'expression du gène codant la TSLP est fortement diminuée dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  en comparaison aux cellules Caco-2 ShLuc. Ce qui fait de la TSLP un candidat intéressant (**Figure 54**).



**Figure 54 :** Niveau d'expression de différents gènes de cytokines anti-inflammatoires et pro-inflammatoires et de récepteurs. Expression de l'ARNm des différents gènes évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 ShLuc et Caco-2 ShPPAR $\gamma$  (\*\* $P < 0.01$  ; ns, non significatif ; Mann Whitney ;  $n = 6$ ).

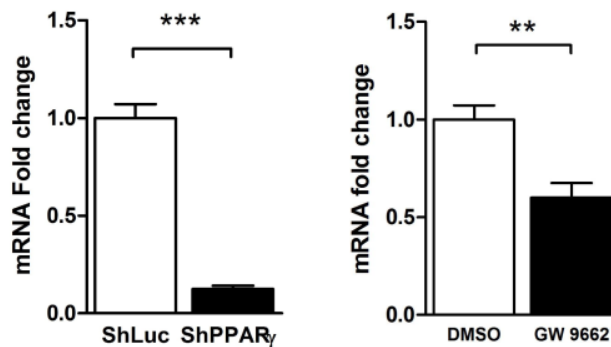
## **B. L'expression du gène codant la TSLP est diminuée dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$**

Afin de confirmer les résultats préliminaires concernant la diminution de l'expression de la TSLP au niveau des cellules ShPPAR $\gamma$ , cette expérience a été répétée plusieurs fois de façon indépendante. Sur 5 expériences indépendantes, l'expression de l'ARNm codant la TSLP est diminuée significativement de 90% environ dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  en comparaison avec les cellules Caco-2 ShLuc ( $p < 0,0001$ ,  $n = 18$ ) (**Figure 55**).

Pour confirmer les résultats obtenus avec les cellules ShPPAR $\gamma$ , les cellules Caco-2 ont été traité par l'antagoniste spécifique et irréversible de PPAR $\gamma$ .

Sur 2 expériences indépendantes, après un traitement de 24 heures au GW9662 à 10  $\mu$ M, l'expression de la TSLP était significativement diminuée ( $p < 0,01$ ,  $n=9$ ) (**Figure 55**).

Ces premiers résultats suggèrent donc que le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  participerait au contrôle de l'expression de la TSLP dans les cellules Caco-2.



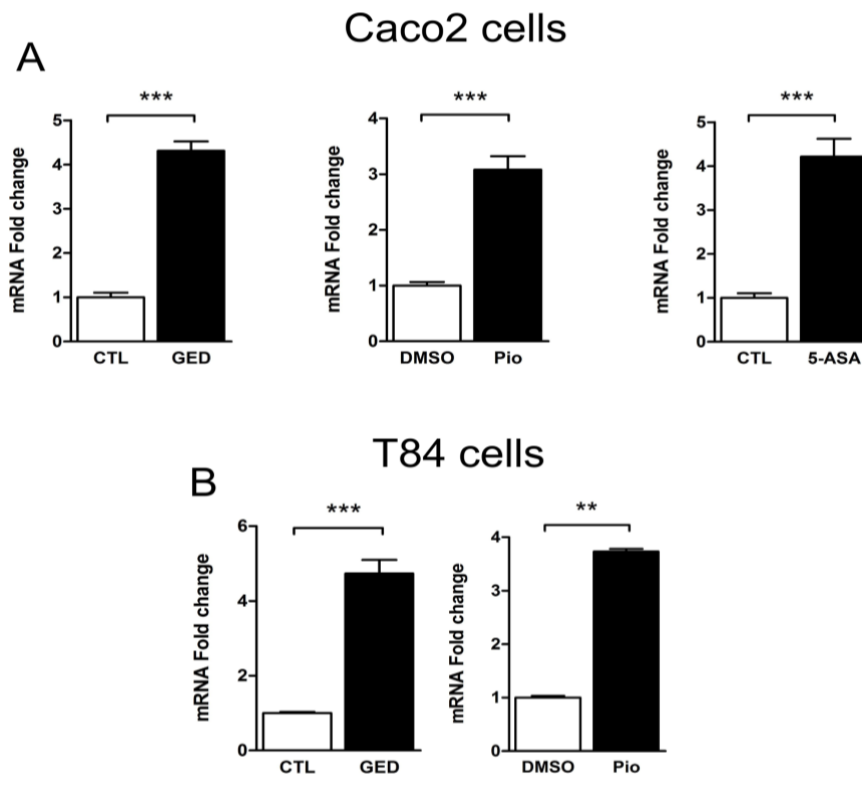
**Figure 55** : La diminution d'expression de PPAR $\gamma$  dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  est associée à une diminution d'expression de la TSLP. Expression de l'ARNm de la TSLP évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 ShLuc et Caco-2 ShPPAR $\gamma$ , somme de 5 expériences indépendantes (\*\*\* :  $p < 0,0001$  ;  $n=18$ ). L'antagonistes de PPAR $\gamma$  (GW9662) diminue l'expression du gène codant la TSLP dans les cellules Caco-2. Expression de l'ARNm de la TSLP évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 traitées par le GW992 10  $\mu$ M (\*\* :  $p < 0,01$  ; Mann Whitney ;  $n=9$ ).

### **C. Effets des agonistes de PPAR $\gamma$ sur les cellules Caco-2 et T84**

Afin d'établir le rôle de PPAR $\gamma$  dans la régulation de l'expression de la TSLP, 3 ligands agonistes de PPAR $\gamma$  ont été utilisés : la pioglitazone (10  $\mu$ M) (Momose et al., 1991), le 5-ASA (30 mM) (Rousseaux et al., 2005) et le GED (30 mM) (Rousseaux et al., 2011). Les cellules Caco-2 et T84 ont été stimulées 24 heures par un des agonistes.

Sur 3 expériences indépendantes, l'ensemble des agonistes de PPAR $\gamma$  induit une augmentation significative de l'expression de l'ARNm codant la TSLP dans les cellules Caco-2 ( $p < 0,001$  pour GED 30 mM, pioglitazone 10 $\mu$ M et 5-ASA 30 mM,  $9 < n < 12$ ) (**Figure 56A**).

Une 2<sup>ème</sup> lignée de cellules épithéliales (T84) a été utilisée afin de renforcer les résultats précédents. Tout comme pour les Caco-2, les agonistes de PPAR $\gamma$  induisent une augmentation significative de l'expression de l'ARNm codant la TSLP ( $p < 0,001$  pour GED 30mM,  $n=12$  ;  $p < 0,01$  pour pioglitazone 10  $\mu$ M,  $n=6$ ) (**Figure 56B**).

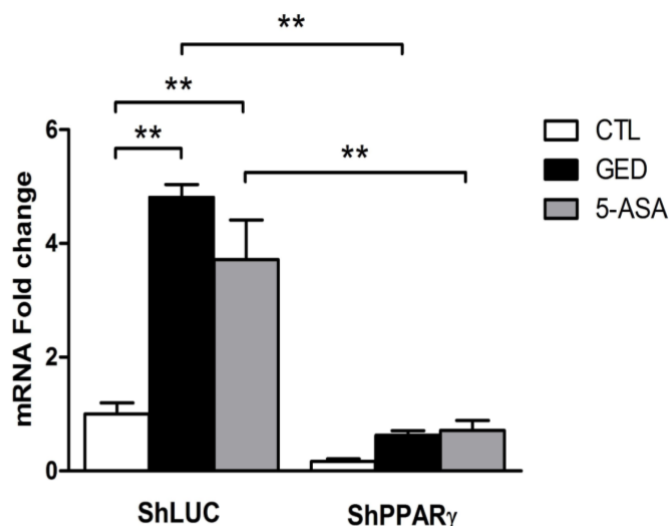


**Figure 56 : Les agonistes PPAR $\gamma$  augmentent l'expression du gène codant la TSLP dans les cellules Caco-2, T84** (A) Expression de l'ARNm codant la TSLP évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco2 en présence d'agonistes de PPAR $\gamma$  : GED 30 mM, pioglitazone 10  $\mu$ M (pio) et 5-ASA 30 mM (\*\*\*) :  $p < 0,001$  ; Mann Whitney ;  $9 < n < 12$ ). (B) Expression de l'ARNm codant la TSLP évaluée par qRT-PCR dans les cellules T84 en présence d'agonistes de PPAR $\gamma$  : GED 30 mM et pioglitazone 10  $\mu$ M (\*\*\*) :  $p < 0,0001$ , \*\* :  $p < 0,01$  ; Mann Whitney ;  $6 < n < 12$ ).

## D. Effets des agonistes de PPAR $\gamma$ sur les cellules Caco-2 ShLuc et ShPPAR $\gamma$

L'évaluation du niveau d'expression de l'ARNm de la TSLP sur les cellules Caco-2 ShLuc et Caco-2 ShPPAR $\gamma$  en présence des agonistes PPAR $\gamma$ , GED 30 mM et 5-ASA 30 mM, a également été réalisée. D'une part, l'expression de la TSLP est de nouveau significativement diminuée dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  en comparaison aux cellules Caco-2 ShLuc confirmant les résultats précédents. D'autre part, malgré le traitement des cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  par les agonistes PPAR $\gamma$ , le niveau d'expression de l'ARNm codant la TSLP n'atteint pas celui observé pour les cellules Caco-2 ShLuc stimulées par les agonistes PPAR $\gamma$  ( $p < 0,01$  pour GED 30 mM et 5-ASA 30 mM,  $n = 6$ ) (**Figure 57**). Ceci suggère que l'expression normale de PPAR $\gamma$  dans les cellules Caco-2 est indispensable à l'expression optimale de la TSLP.

Il faut cependant noter que l'action des agonistes PPAR $\gamma$  sur les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  augmentent légèrement l'expression de la TSLP. Ceci s'explique probablement par le fait que les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  expriment toujours une petite quantité de PPAR $\gamma$  (environ 30%), entraînant l'augmentation observée (**Figure 57**).



**Figure 57 :** Effets des agonistes de PPAR $\gamma$  sur les cellules ShLuc et ShPPAR $\gamma$ . Expression de l'ARNm de la TSLP évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  en comparaison avec les Caco-2 ShLuc après stimulation par différents agonistes de PPAR $\gamma$  (GED 30 mM et 5-ASA 30 mM) (\*\* :  $p < 0,01$  ; Mann Whitney ;  $n = 6$ ).

## **II. L'expression de la TSLP 2 est dépendante de PPAR $\gamma$ dans les cellules Caco-2 et T84.**

Les résultats précédents suggèrent que le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  agit sur l'expression du gène codant la TSLP.

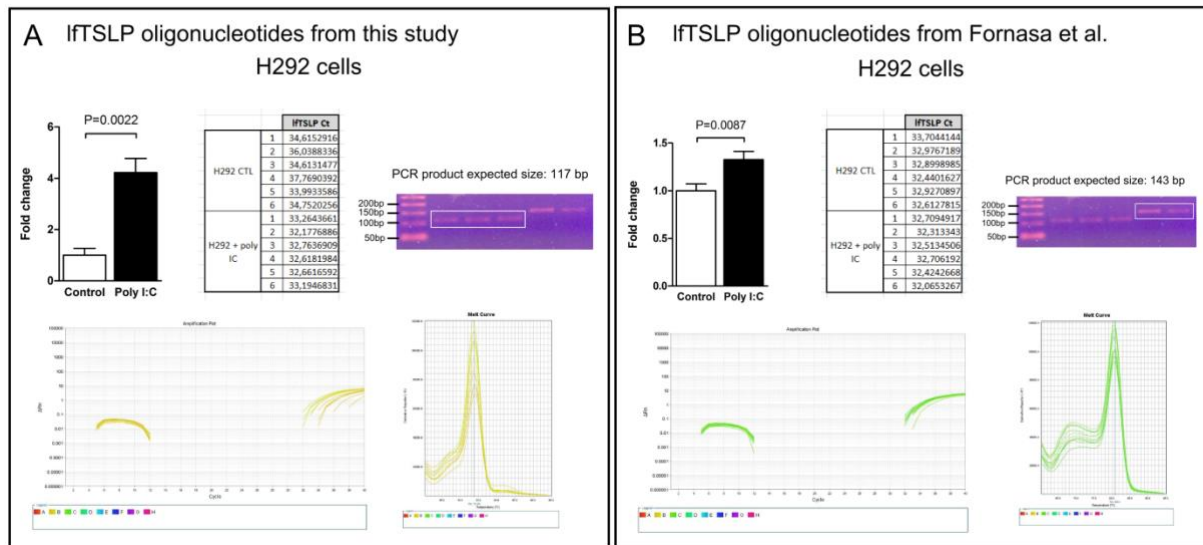
Il existe 2 isoformes de la TSLP (TSLP 1 et TSLP 2) (Bjerkan et al., 2015; Fornasa et al., 2015) (**Figure 59A**). Il était donc intéressant de connaître quelle isoforme pouvait avoir son expression modifiée en présence des agonistes de PPAR $\gamma$  ou lors d'une diminution de ce récepteur. Les deux isoformes ont été testées sur l'ensemble des expériences précédentes.

### **A. Expression génomique de la TSLP 1**

La TSLP 1 n'a jamais été détectée sur l'ensemble des expériences *in vitro* au niveau des lignées de cellules épithéliales intestinales (Caco-2 et T84) (cellules contrôles ou traitées par un agoniste/antagoniste de PPAR $\gamma$ ).

Dans l'hypothèse que nos amorces ne soient pas efficaces. Le couple d'oligonucléotide amplifiant la région de la TSLP 1 utilisé par Fornasa *et al.* a également été utilisé. Pour rappel, ils ont mis en évidence une augmentation significative de l'expression du gène codant la TSLP 1 au niveau des CEI chez les patients atteints de RCH. De nouveau, aucune expression de la TSLP 1 n'a été détectée sur l'ensemble des expériences *in vitro* utilisant les lignées de CEI.

Afin d'exclure un problème lié avec les oligonucléotides de qPCR, l'expression de la TSLP 1 a été recherchée sur des cellules épithéliales bronchiques H292 stimulées par du poly (I:C). Pour les 2 couples d'amorces, l'expression du gène codant la TSLP 1 a été mise en évidence et cette expression était augmentée par un traitement au poly (I:C) (**Figure 58**).



**Figure 58** : L'expression de la TSLP 1 est détectée et induite par l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly I:C) dans les cellules épithéliales bronchiques H292. (A) et (B) : expression de l'ARNm de la TSLP 1 évaluée par qRT-PCR dans les cellules H292 stimulées avec poly (I:C) pendant 8 h ( $p < 0,022$  pour les amorces de l'étude ;  $p < 0,0087$  pour les amorces décrites dans (Fornasa et al., 2015) ; 2 expériences indépendantes; Mann Whitney ;  $n = 6$ ). Le tableau A présente les résultats obtenus avec une paire d'amorces conçue par notre propre étude. Le tableau B présente les résultats obtenus avec une paire d'amorces décrite dans (Fornasa et al., 2015). Ces tableaux présentent les données brutes des valeurs de Ct pour l'amplification de la TSLP 1. Les courbes d'amplification et de fusion obtenues pour chaque paire d'amorces sont également présentées. Gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium montrant le produit de PCR obtenu pour la TSLP 1. Le produit PCR migre vers la taille attendue (117 pb et 143 pb respectivement).

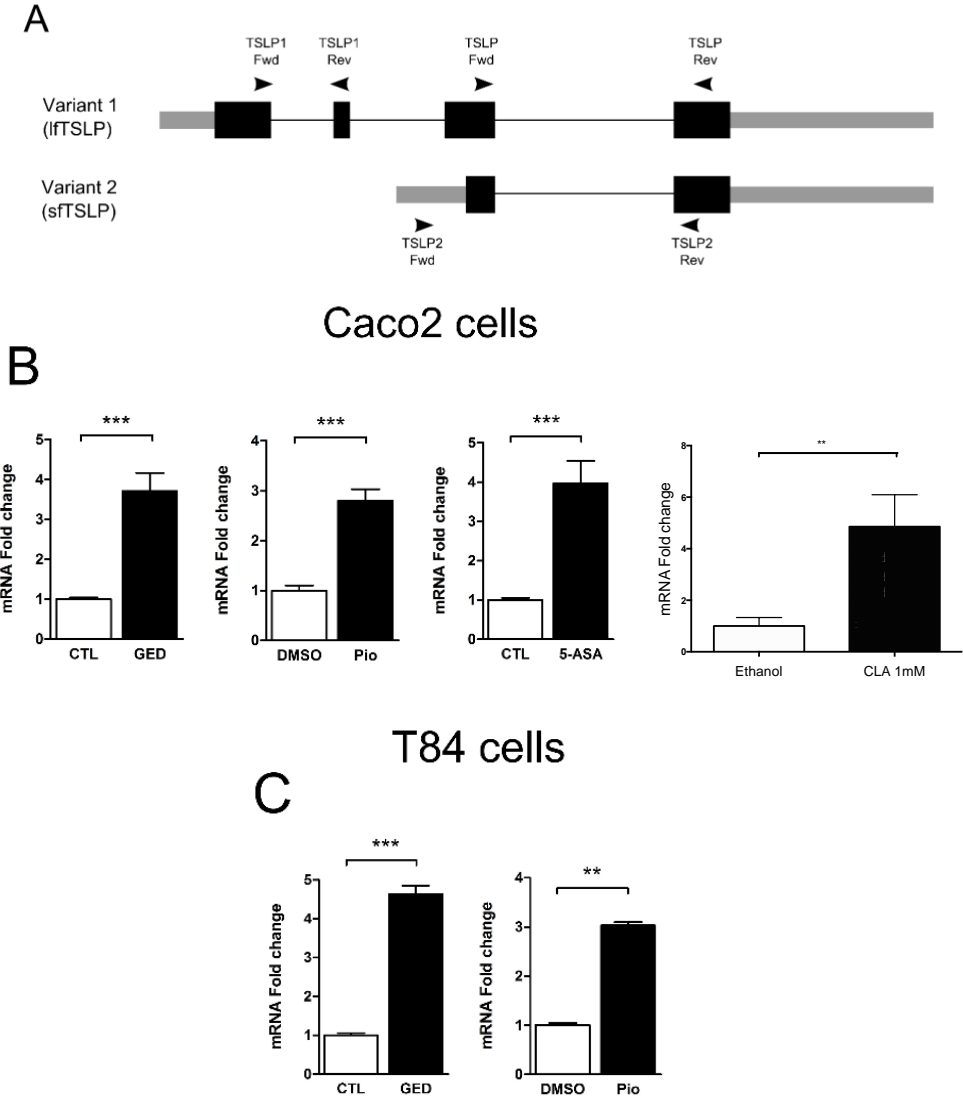
## **B. Expression génomique de la TSLP 2**

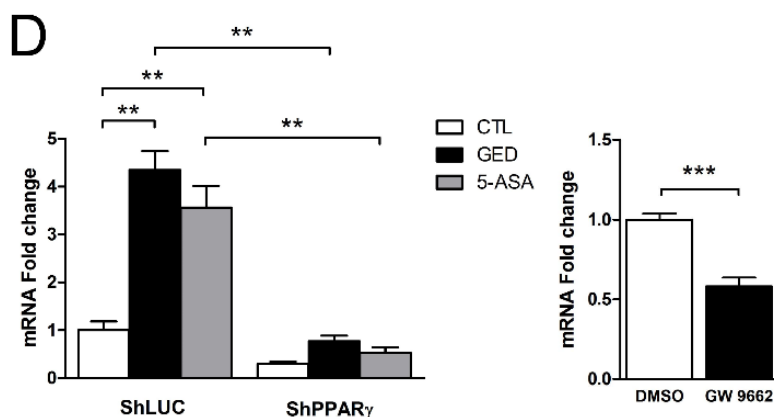
L'isoforme courte de la TSLP est exprimée par les cellules épithéliales intestinales Caco-2 et T84. Son expression est significativement augmentée en présence des agonistes de  $PPAR\gamma$ . (Caco-2 :  $p < 0,001$  pour GED 30 mM, pioglitazone 10  $\mu$ M, 5-ASA 30 mM et CLA 1 mM,  $6 < n < 12$  ; T84 :  $p < 0,001$  pour GED 30mM,  $n = 12$  et  $p < 0,01$  pour pioglitazone 10  $\mu$ M,  $n = 6$ ) (**Figure 59B et 59C**).

De plus, un traitement par l'antagoniste spécifique et irréversible de  $PPAR\gamma$  entraîne une diminution d'expression du gène codant la TSLP 2 (2 expériences indépendantes,  $p < 0,0001$ ,  $n = 9$ ) (**Figure 59D**).



Au niveau des cellules Caco-2 ShLuc et ShPPAR $\gamma$ , une diminution significative de l'expression du gène codant la TSLP 2 au niveau des cellules ShPPAR $\gamma$  est observé par rapport aux cellules contrôles. Lorsque les Caco-2 ShPPAR $\gamma$  sont traitées avec les agonistes de PPAR $\gamma$ , une induction significative de l'expression du gène codant la TSLP 2 est observée sans jamais atteindre les niveaux d'expression de la TSLP 2 dans les cellules Caco-2 ShLuc (**Figure 59D**).



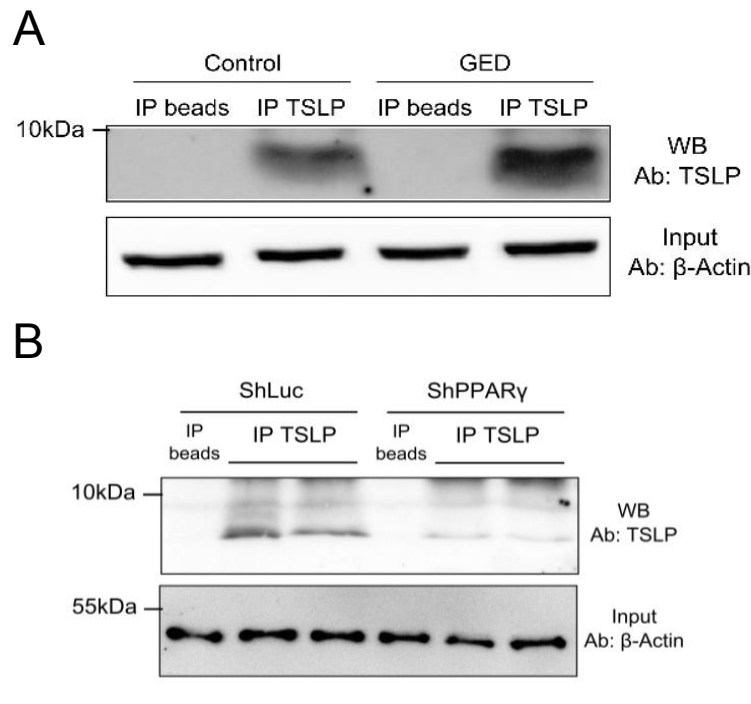


**Figure 59 : Les agonistes PPAR $\gamma$  augmentent uniquement l'expression du gène codant la TSLP 2 dans les cellules Caco-2, T84.** (A) Représentation des différents exons (carrés noirs) constituant les 2 isoformes de la TSLP (lfTSLP ou sfTSLP). 4 exons pour la TSLP 1 et 2 exons pour la TSLP 2. Les flèches noires représentent les différentes séquences d'oligonucléotides des couples de primers utilisés lors des qRT-PCR. (B) Expression de l'ARNm codant la TSLP 2 évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 en présence d'agonistes de PPAR $\gamma$ : GED 30 mM, pioglitazone 10  $\mu$ M (pio), 5-ASA 30 mM et CLA 1 mM (\*\*\* :  $p < 0,001$ , \*\* :  $p < 0,01$ ; Mann Whitney ;  $6 < n < 12$ ). (C) Expression de l'ARNm codant la TSLP 2 évaluée par qRT-PCR dans les cellules T84 en présence d'agonistes de PPAR $\gamma$ : GED 30 mM et pioglitazone 10  $\mu$ M (\*\*\* :  $p < 0,0001$ , \*\* :  $p < 0,01$ ; Mann Whitney ;  $6 < n < 12$ ). (D) Expression de l'ARNm de la TSLP 2 évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  en comparaison avec les Caco-2 ShLuc après stimulation par différents agonistes de PPAR $\gamma$  (GED 30 mM et 5-ASA 30 mM) (\*\* :  $p < 0,01$ ; Mann Whitney ;  $n = 6$ ) et expression de l'ARNm de la TSLP 2 évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 après traitement par l'antagoniste de PPAR $\gamma$  (\*\*\* :  $p < 0,0001$ ; Mann Whitney ;  $n = 9$ ).

### III. Expression protéique de la TSLP 2

Pour confirmer les résultats obtenus par qRT-PCR, il est important de vérifier l'expression de la TSLP 2 au niveau protéique sur les expériences précédentes. Le lysat cellulaire (1 millions de cellules par condition) a été analysé par Western Blot et la TSLP 2 n'a jamais été directement détectée. Notre hypothèse est que la quantité de TSLP 2 produite est trop faible. C'est pour cela qu'une autre technique a été envisagée en amont du western blot : l'immunoprécipitation des protéines. Cette technique a pour but de sélectionner et concentrer la protéine d'intérêt. Le lysat cellulaire d'un plus grand nombre de cellule (6 millions de cellules) est récupéré. L'immunoprécipitation va sélectionner/concentrer uniquement la TSLP et le culot est analysé par Western Blot afin de rechercher la TSLP 2.

La TSLP 2 s'exprime dans les cellules Caco-2 contrôles et traitées par un agoniste de PPAR $\gamma$  (GED). La quantité de TSLP 2 est augmentée dans les cellules traitées par le GED en comparaison aux cellules contrôles (**Figure 60A**). Au niveau des cellules ShPPAR $\gamma$ , l'expression de la TSLP 2 est diminuée de manière importante par rapport aux cellules contrôles Caco-2 ShLuc (**Figure 60B**).



**Figure 60 :** (A) Les agonistes PPAR $\gamma$  augmentent l'expression protéique de la TSLP 2 dans les cellules Caco-2. (B) La diminution du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  diminue l'expression de la TSLP 2. Western blot d'échantillons protéiques provenant d'une immunoprécipitation avec un anticorps anti-TSLP (TSLP 2 : 7 kDa). Western blot de contrôle :  $\beta$ -actin.

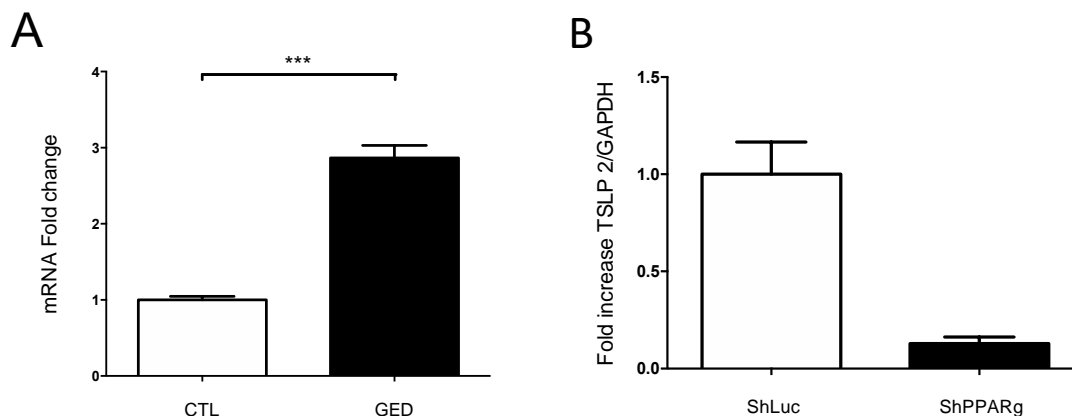
#### **IV. L'expression de la TSLP 2 est dépendante de PPAR $\gamma$ dans les cellules Caco-2 polarisées.**

Les résultats précédents nous montrent clairement que l'expression de la TSLP 2 est dépendante du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . Pour confirmer et appuyer cette hypothèse, une culture sur filtre Transwell® de 3  $\mu$ M a été envisagée.

Les cellules Caco-2 ont la capacité de se polariser spontanément lorsqu'elles sont en confluence. Elles présentent donc un pôle apical et basal, expriment des protéines de jonctions serrées et développent une résistance trans-épithéliales.

Les cellules Caco-2 mais également les cellules Caco-2 ShLuc et ShPPAR $\gamma$  ont été cultivés sur filtre durant 21 jours. Ensuite, les cellules Caco-2 ont été traitées pendant 24 heures par du GED 30 mM. La mesure de la résistance trans-épithéliale a été faite tous les 2 jours, avant les changements de milieux, pour s'assurer de la qualité du tapis cellulaire.

Les observations sont identiques à celles déjà décrites, à savoir une induction de l'expression de la TSLP 2 lorsque les cellules Caco-2 polarisées sont traitées par du GED 30 mM (2 expériences indépendantes,  $p < 0,0001$ ,  $11 < n < 12$ ) (**Figure 61A**) et une diminution de l'expression de la TSLP 2 au niveau des cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  polarisées par rapport aux cellules Caco-2 ShLuc polarisées (1 expérience,  $n=3$ ) (**Figure 61B**).



**Figure 61 :** L'agoniste de PPAR $\gamma$  augmente significativement l'expression du gène codant la TSLP 2 dans les cellules Caco-2 polarisées et la diminution d'expression de PPAR $\gamma$  dans les Caco-2 ShPPAR $\gamma$  est associée à la diminution d'expression de la TSLP 2. (A) Expression de l'ARNm codant la TSLP 2 évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 polarisées en présence d'agonistes de PPAR $\gamma$ : GED 30 mM (\*\*\*) :  $p < 0,0001$  ; Mann Whitney ;  $11 < n < 12$ ). (B) Expression de l'ARNm codant la TSLP 2 évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 ShLuc et Caco-2 ShPPAR $\gamma$  polarisées ( $n=3$ ).

## **V. Le promoteur de la TSLP 2 possède plusieurs éléments de réponse pouvant lier le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ .**

Pour confirmer le rôle de PPAR $\gamma$  dans le contrôle de l'expression de la TSLP 2, la recherche et l'étude d'éléments de réponse PPRE, au niveau du promoteur de la TSLP 2 ont été effectuées.

### **A. Le promoteur de la TSLP 2 possède plusieurs éléments de réponse PPRE**

Une étude *in silico* a été effectuée dans un premier temps. Pour cela, 2 logiciels spécialisés (PPRE search<sup>17</sup> et NUBIsScan<sup>18</sup>) ont été utilisés pour la recherche d'éléments de réponse PPRE susceptibles de fixer l'hétérodimère PPAR $\gamma$ -RXR. Cette étude est faite sur les 1000 premières paires de bases en amont du point d'initiation de la transcription. L'ensemble des résultats obtenus montre l'existence de 4 PPRE possibles au niveau du promoteur de la TSLP 2 (**Figure 62A**) : un DR1 situé sur la position -249 à -262, un DR2 situé sur la position -407 à -421 et enfin deux DR3 positionnés respectivement sur la position -443 à -458 et -770 à -785.

### **B. Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ se fixe sur un élément de réponse au niveau du promoteur de la TSLP 2.**

La technique d'immunoprécipitation de la chromatine (*ChIP*) a pour but de ne sélectionner uniquement que les fragments d'ADN où PPAR $\gamma$  s'est fixé. Pour cela, les fragments d'ADN sont mis en contact avec un anticorps anti-PPAR $\gamma$  puis

---

<sup>17</sup> <http://www.classicrus.com/PPRE/>

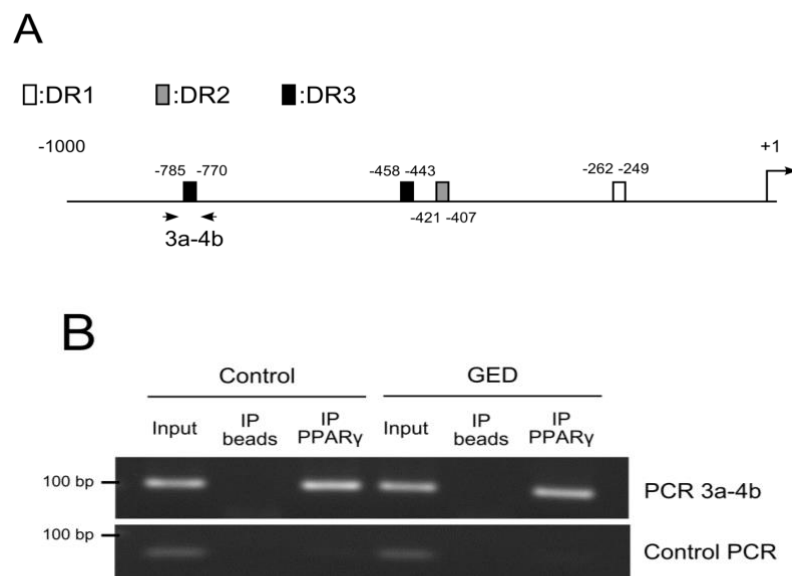
<sup>18</sup> <http://www.nubiscan.unibas.ch/>

immunoprécipités. Ces fragments sont ensuite purifiés et amplifiés par PCR avec les différentes amorces reconnaissant les zones au niveau du promoteur de la TSLP 2.

Les amorces 3a-4b, encadrant le DR3 (-770 ; -785), ont permis d'amplifier l'ADN de la zone où ce DR3 est localisé, en condition contrôle et en condition traitée (**Figure 62B**). Ce qui signifie que l'ADN amplifié provient d'un fragment d'ADN sélectionné par l'immunoprécipitation et donc que PPAR $\gamma$  s'y fixe. Aucune différence n'est observée entre les 2 conditions (**Figure 62B**). PPAR $\gamma$  se fixe donc sur le promoteur de la TSLP 2 malgré l'absence de GED.

Pour s'assurer que les bandes d'ADN visibles sur le gel sont bien des bandes spécifiques d'ADN où PPAR $\gamma$  se fixe, il est indispensable de faire un contrôle en utilisant des amorces qui peuvent amplifier une zone où PPAR $\gamma$  ne se fixe pas. Les amorces choisies sont celles amplifiant la région codante de la TSLP 2. Une bande apparait au niveau des input, mais pas au niveau des puits d'immunoprécipitations, ce qui confirme que les zones d'ADN où PPAR $\gamma$  ne se fixe pas, il n'y a aucune amplification.

PPAR $\gamma$  se fixe donc de manière spécifique sur l'élément de réponse DR3 situé dans la zone -770 à -785.



**Figure 62 :** (A) Représentation des mille premières paires de base en amont du point d'initiation à la transcription du gène codant la TSLP 2. 4 éléments de réponses ont été mis en évidence par l'analyse *in silico*. (B) PPAR $\gamma$  se fixe sur un élément de réponse du promoteur en amont du gène codant la TSLP 2 dans les cellules contrôles et les cellules traitées par GED 30 mM. Mise en évidence de l'ADN amplifié par migration sur gel d'agarose 2%.

### **C. Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ se fixe de manière fonctionnelle sur le promoteur de la TSLP 2.**

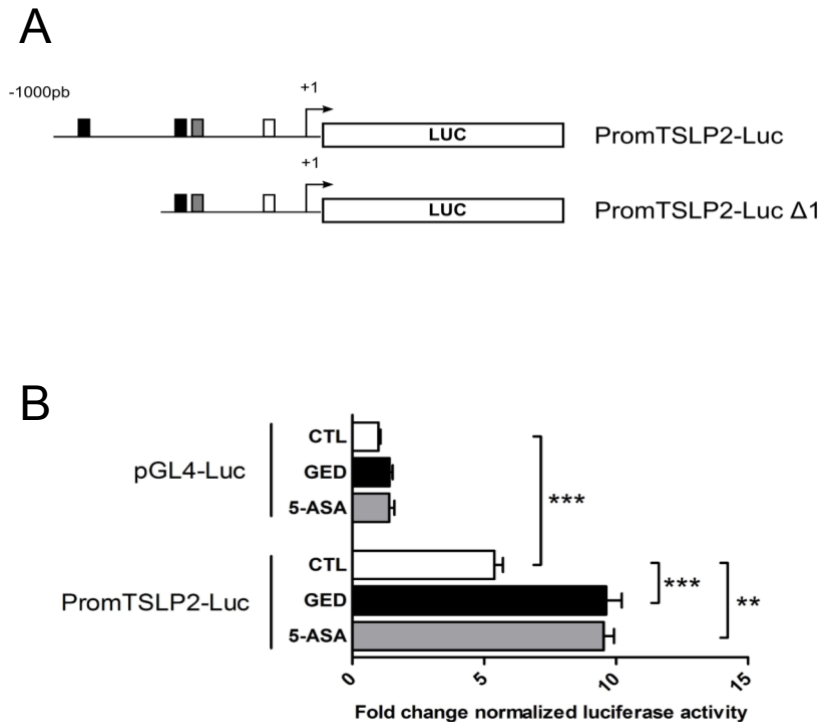
Après avoir montré par *ChIP* que PPAR $\gamma$  se fixe sur la zone promotrice du gène codant la TSLP 2, il est intéressant de savoir si cette fixation est fonctionnelle. Pour répondre à cette question, la technique d'étude de gène rapporteur (ici, la luciférase) par transfection transitoire a été utilisée.

Dans un premier temps, un vecteur contenant la partie promotrice du gène de la TSLP 2, a été construit. Cette partie promotrice a été clonée en amont du gène codant la luciférase. Ce vecteur est nommé PromTSLP2-Luc (**Figure 63A**). Il a été transfecté dans des cellules Caco-2, qui ont été ensuite traitées par des agonistes de PPAR $\gamma$  (GED 30mM et 5-ASA 30 mM).

Tout d'abord, en l'absence de stimulation, la transfection du vecteur PromTSLP2-Luc conduit à une augmentation significative de l'activité de la luciférase en comparaison des cellules transfectées avec le vecteur contrôle (pGL4-Luc) ( $p < 0,001$ ,  $n=15$ ) (**Figure 63B**, comparaison des barres blanches). Ceci indique donc que la portion de promoteur présent sur le vecteur PromTSLP2-Luc est active dans les cellules Caco-2.

Ensuite, aucune différence sur l'activité de la luciférase n'est observée lorsque les cellules, transfectées par le vecteur contrôle, sont traitées par les agonistes de PPAR $\gamma$ .

Enfin, la stimulation des cellules transfectées avec le vecteur PromTSLP2-Luc par du GED ou du 5-ASA, induit une nouvelle augmentation significative de l'activité de la luciférase en comparaison avec les cellules transfectées non stimulées (GED 30mM :  $p < 0,0001$  ; 5-ASA 30 mM :  $p < 0,01$ ) (**Figure 63B**, comparaison des barres blanches, noires et grises sur le graphique PromTSLP2-Luc). Cela suggère qu'il existe un élément de réponse fonctionnel où PPAR $\gamma$  se fixe, au niveau du fragment de région promotrice de la TSLP 2.



**Figure 63 :** (A) Représentation schématique des deux vecteurs lors des différentes transfections transitoires dans le cadre de l'étude du gène rapporteur. (B) Les cellules transfectées par le vecteur *PromTSLP2-Luc* présentent une activité significativement plus importante que les cellules transfectées par le vecteur *pGL4-Luc*. Résultat exprimé en fold change (\*\*\*) :  $p < 0,0001$  ; Mann Whitney ;  $n = 15$ ). Le traitement par les agonistes de *PPAR $\gamma$*  augmente significativement l'activité de la luciférase sur les cellules transfectées par le vecteur *PromTSLP2-Luc* (\*\*\*) :  $p < 0,0001$ , \*\* :  $p < 0,01$  ; Mann Whitney ;  $n = 6-9$ ).

Afin de vérifier si le DR3 (en position -770 ; -785) identifié par le *ChIP* est l'élément de réponse fonctionnel, un deuxième vecteur a été construit. Ce nouveau vecteur, appelé *PromTSLP2-Luc  $\Delta$ 1*, contient également le promoteur de la TSLP 2 à la seule différence que l'élément de réponse DR3 en position -770 à -785 a été enlevé (**Figure 63A**).

Premièrement, comme attendu, en l'absence de stimulation, la transfection des cellules Caco-2 avec le vecteur *PromTSLP2-Luc* permet la même induction significative de l'activité luciférase en comparaison avec les cellules transfectées par le vecteur *pGL-4* (comparaison des barres blanches sur le graphique A) ( $p < 0,001$ ,  $n = 15$ ).

Ensuite, toujours en l'absence de stimulation, les cellules Caco-2 transfectées par le vecteur *PromTSLP2-Luc  $\Delta$ 1*, ont une induction de l'activité de la luciférase est significativement plus faible que pour les cellules transfectées par le vecteur



PromTSLP2-Luc ( $p < 0,05$ ,  $n = 14$ ) (**Figure 64A**, comparaison des barres blanches). Ceci suggère que la région promotrice enlevée pourrait contenir un ou plusieurs éléments de réponse intervenant dans l'activité transcriptionnelle.

Enfin, l'effet inducteur du GED est totalement perdu au niveau des cellules Caco-2 transfectées avec le vecteur PromTSLP2-Luc  $\Delta 1$  en comparaison avec les cellules transfectées avec le vecteur PromTSLP2-Luc (**Figure 64A**, comparaison des barres noires).

La présence du DR3 (en position -770 ; -785) semble donc être indispensable pour obtenir une augmentation significative de l'activité de la luciférase lorsque les cellules sont traitées par les agonistes de PPAR $\gamma$ .

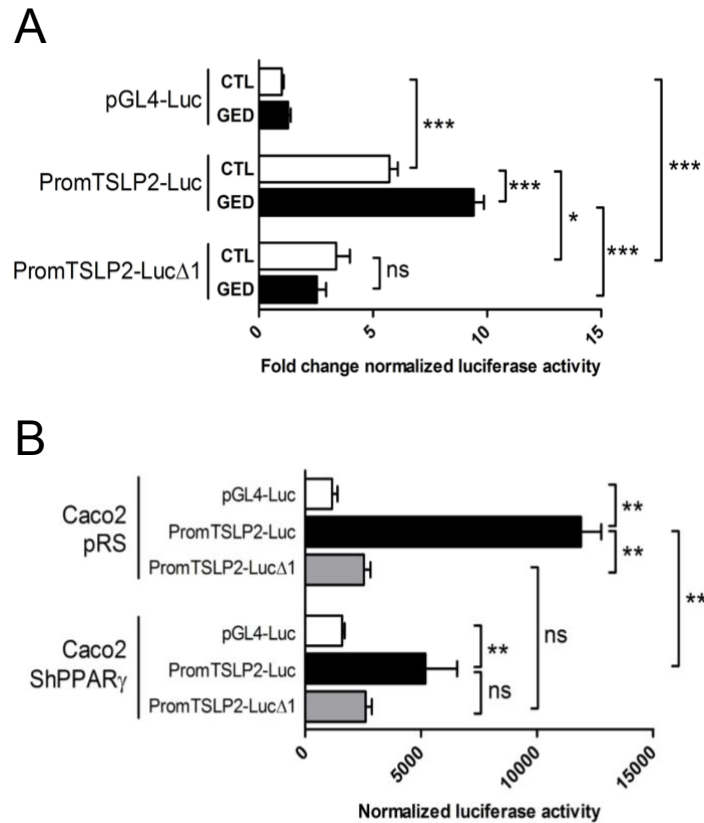
Ces résultats suggèrent fortement que l'élément de réponse DR3, fixé par PPAR $\gamma$  au niveau du *ChIP*, est fonctionnelle au niveau du promoteur de la TSLP 2.

Pour confirmer les résultats précédents, des cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  ont été transfectées avec les 2 vecteurs (PromTSLP2-Luc et PromTSLP2-Luc  $\Delta 1$ ). Les Caco-2 pRS (Caco-2 ayant intégrées stablement le vecteur pRS servant à exprimer des ShRNA) sont utilisées comme cellules contrôles.

Pour commencer, la transfection du vecteur PromTSLP2-Luc au niveau des cellules contrôles va induire significativement l'activité de la luciférase, en comparaison avec les cellules Caco-2 pRS transfectées avec le vecteur pGL-4-Luc ( $p < 0,01$ ,  $n = 6$ ).

La transfection des cellules Caco-2 pRS avec le vecteur PromTSLP2-Luc  $\Delta 1$ , provoque une importante diminution de l'activité de la luciférase, en comparaison avec les cellules transfectées avec le vecteur PromTSLP2-Luc ( $p < 0,01$ ,  $n = 6$ ). Ce résultat confirme les données précédentes et l'importance de la région contenant le DR3 pour l'activité transcriptionnelle du promoteur de la TSLP 2.

La diminution d'expression du gène codant PPAR $\gamma$  dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  diminue significativement l'activité de la luciférase induite par la construction PromTSLP2-Luc ( $p < 0,01$ ,  $n = 6$ ) (**Figure 64B**, comparaison des barres noires). De plus, la diminution d'expression du gène codant PPAR $\gamma$  ne provoquent aucun effet sur l'activité luciférase des cellules transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc  $\Delta 1$  (Figure 57B, comparaison des barres grises).



**Figure 64 :** (A) Les cellules transfectées par le vecteur *PromTSLP2-LucΔ1* ont une activité de la luciférase significativement plus faible que les cellules transfectées par le vecteur *PromTSLP2-Luc* et les agonistes de *PPAR $\gamma$*  ont pas d'effet sur l'activité de la luciférase. Résultat exprimé en fold change (\* :  $p < 0,05$ , \*\*\* :  $p < 0,0001$  ; Mann Whitney ;  $n = 12-14$ ). (B) L'absence de *PPAR $\gamma$*  influence l'activité de la luciférase au niveau des cellules *Caco2 ShPPAR $\gamma$*  (\*\* :  $p < 0,01$  ; Mann Whitney ;  $n = 6$ ).

L'ensemble de ces résultats confirme clairement que *PPAR $\gamma$*  est impliqué dans le contrôle de l'activité du promoteur de la TSLP 2. Nos résultats démontrent que *PPAR $\gamma$*  se fixe de manière fonctionnelle sur le promoteur de la TSLP 2 et montrent que *PPAR $\gamma$*  est un régulateur transcriptionnel du gène codant la TSLP 2.

## **VI. La diminution de l'expression du gène codant la TSLP 2 est corrélée à une diminution de l'expression du gène codant PPAR $\gamma$ dans les muqueuses saines et lésées et les cellules épithéliales coliques de patients atteints de RCH.**

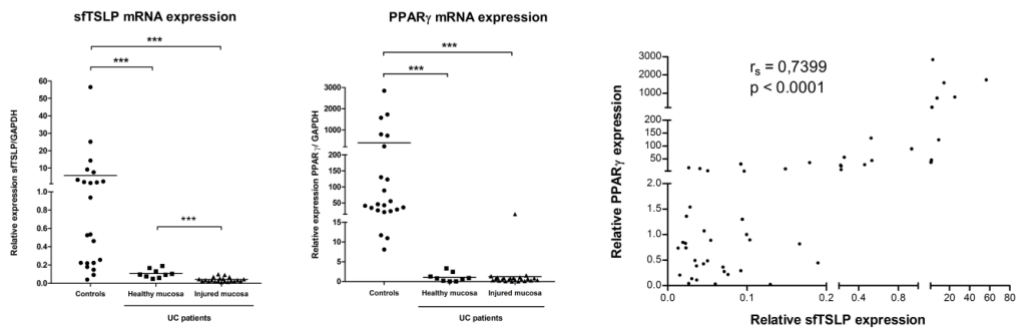
Nos résultats nous ont poussé à évaluer l'expression de la TSLP 2 chez les patients atteints de RCH. Son expression a été évaluée dans le côlon de patients contrôles (opérés pour une diverticulite) et des patients atteints de RCH. Pour rappel, les CEC de patients atteints de RCH ont un déficit d'expression de PPAR $\gamma$  par rapport aux CEC des patients contrôles (Bouguen et al., 2014; Dubuquoy et al., 2003). L'hypothèse testée est donc la suivante : ce déficit peut-il avoir un impact sur l'expression de la TSLP 2 chez les patients atteints de RCH ?

Les essais se sont tout d'abord portés sur des prélèvements de muqueuses entières de côlon. Le déficit de PPAR $\gamma$  est retrouvé au niveau des muqueuses inflammatoires des patients atteints de RCH (**Figure 65A**). Il existe une diminution significative de l'expression de l'ARNm codant la TSLP 2 entre les muqueuses de patients contrôles et les muqueuses saines et lésées des patients atteints de RCH (**Figure 65A**). Cette diminution est corrélée avec celle observée pour PPAR $\gamma$  ( $p < 0,0001$  et  $r_s = 0,7399$ ) (**Figure 65A**).

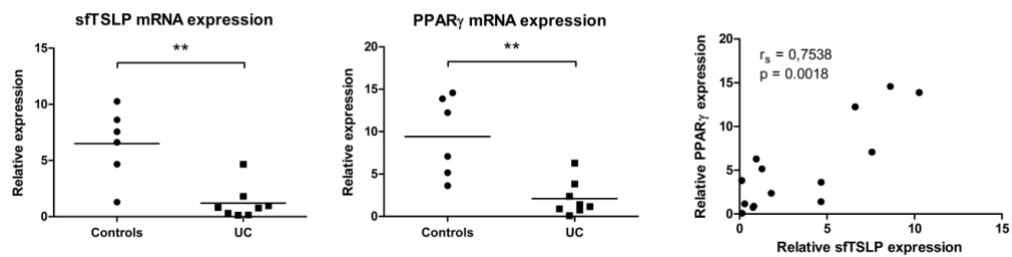
Suite aux résultats précédents, des cellules épithéliales coliques ont été isolées des muqueuses de patients provenant des pièces opératoires de patients contrôles ( $n=6$ ) et patients RCH ( $n=8$ ) (**Figure 65B**). L'expression de la TSLP 2 et de PPAR $\gamma$  a été testée sur ces cellules. Il est observé une diminution significative de l'expression du gène codant la TSLP 2 ( $p < 0,01$ , Mann Whitney) et le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  ( $p < 0,01$ , Mann Whitney) et une corrélation entre le déficit de PPAR $\gamma$  et la diminution d'expression de la TSLP 2 ( $p = 0,0018$  et  $r_s = 0,7538$ ) (**Figure 65B**).

Ces résultats montrent un défaut d'expression de la TSLP 2 chez les patients atteints de RCH, en lien avec le défaut de PPAR $\gamma$ .

### A Colonic mucosa

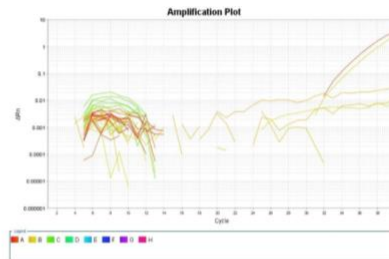


### B Colonic epithelial cells



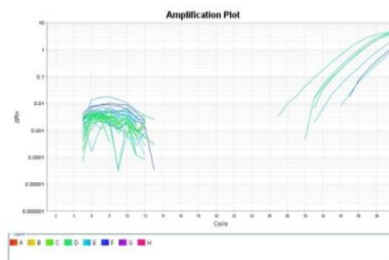
### C IFTSLP oligonucleotides from this study (patients)

	IFTSLP Ct	IFTSLP Ct	IFTSLP Ct
Control patients - mucosa	1	Undetermined	Undetermined
	2	Undetermined	Undetermined
	3	Undetermined	Undetermined
	4	Undetermined	Undetermined
	5	Undetermined	Undetermined
	6	Undetermined	Undetermined
	7	Undetermined	Undetermined
	8	34,70343018	Undetermined
	9	Undetermined	Undetermined
	10	Undetermined	Undetermined
	11	Undetermined	Undetermined
	12	Undetermined	Undetermined
UC patients - mucosa	1	Undetermined	Undetermined
	2	Undetermined	Undetermined
	3	Undetermined	Undetermined
	4	Undetermined	Undetermined
	5	Undetermined	Undetermined
	6	Undetermined	Undetermined
	7	35,56515503	Undetermined
	8	Undetermined	Undetermined
	9	Undetermined	Undetermined
	10	Undetermined	Undetermined
	11	Undetermined	Undetermined
	12	Undetermined	Undetermined
Control patients - Colonic epithelial cells	1	Undetermined	Undetermined
	2	Undetermined	Undetermined
	3	Undetermined	Undetermined
	4	Undetermined	Undetermined
UC patients - Colonic epithelial cells	1	Undetermined	Undetermined
	2	Undetermined	Undetermined
	3	Undetermined	Undetermined
	4	Undetermined	Undetermined



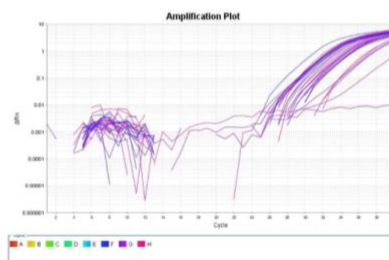
### D IFTSLP oligonucleotides from Fornasa et al. (patients)

	IFTSLP Ct	IFTSLP Ct	IFTSLP Ct
Control patients - mucosa	1	Undetermined	Undetermined
	2	Undetermined	Undetermined
	3	Undetermined	Undetermined
	4	Undetermined	Undetermined
	5	Undetermined	Undetermined
	6	Undetermined	Undetermined
	7	Undetermined	Undetermined
	8	34,08393478	Undetermined
	9	Undetermined	Undetermined
	10	Undetermined	Undetermined
	11	Undetermined	Undetermined
	12	Undetermined	Undetermined
UC patients - mucosa	1	32,22763443	Undetermined
	2	34,0875206	Undetermined
	3	Undetermined	Undetermined
	4	Undetermined	Undetermined
	5	Undetermined	Undetermined
	6	Undetermined	Undetermined
	7	37,58689499	Undetermined
	8	Undetermined	Undetermined
	9	35,89627838	Undetermined
	10	33,71149063	Undetermined
	11	Undetermined	Undetermined
	12	Undetermined	Undetermined
Control patients - Colonic epithelial cells	1	Undetermined	Undetermined
	2	Undetermined	Undetermined
	3	Undetermined	Undetermined
	4	Undetermined	Undetermined
UC patients - Colonic epithelial cells	1	37,21725845	Undetermined
	2	Undetermined	Undetermined
	3	Undetermined	Undetermined
	4	Undetermined	Undetermined



### E sFTSLP oligonucleotides from this study (patients)

	sFTSLP Ct	sFTSLP Ct	sFTSLP Ct
Control patients - mucosa	1	30,63375092	Undetermined
	2	32,80359605	Undetermined
	3	30,89529228	Undetermined
	4	28,72303963	Undetermined
	5	31,19595337	Undetermined
	6	30,22859001	Undetermined
	7	32,83689485	Undetermined
	8	30,35647202	Undetermined
	9	32,86552811	Undetermined
	10	32,61972809	Undetermined
	11	35,28813934	Undetermined
	12	32,26247406	Undetermined
UC patients - mucosa	1	35,09952927	Undetermined
	2	Undetermined	Undetermined
	3	32,1223793	Undetermined
	4	31,99969292	Undetermined
	5	30,66615295	Undetermined
	6	30,28780556	Undetermined
	7	30,46177864	Undetermined
	8	32,48423388	Undetermined
	9	34,67904282	Undetermined
	10	31,45259476	Undetermined
	11	37,78862762	Undetermined
	12	30,03289223	Undetermined
Control patients - Colonic epithelial cells	1	30,23652649	Undetermined
	2	30,41848833	Undetermined
	3	31,72497749	Undetermined
	4	30,18336487	Undetermined
UC patients - Colonic epithelial cells	1	34,87486267	Undetermined
	2	Undetermined	Undetermined
	3	30,24961662	Undetermined
	4	32,3642254	Undetermined



**Figure 65 : Une diminution de l'expression de la TSLP 2 est observée dans les muqueuses saines et lésées et dans les cellules épithéliales coliques de patients atteints de RCH. Ces**

*diminutions sont corrélées avec la diminution de l'expression du gène codant PPAR $\gamma$ . (A) Expression de l'ARNm de PPAR $\gamma$  et de la TSLP 2 évaluées par qRT-PCR au niveau des muqueuses saines (n=9) et lésées (n=21) des patients RCH en comparaison avec des muqueuses de patients atteints de diverticulite (patients contrôles, n=18) (\* : p<0,05, \*\*\* : p<0,0001 ; Mann Whitney). (B) Expression de l'ARNm de PPAR $\gamma$  et de la TSLP 2 évaluées par qRT-PCR au niveau des cellules épithéliales coliques des patients RCH (n=8) en comparaison avec des muqueuses de patients atteints de diverticulite (patients contrôles, n=6). (C) Amplification de l'isoforme de TSLP 1 (lfTSLP) à partir d'échantillons de patients utilisant notre propre paire d'amorces. Le graphique présente les données brutes des valeurs de Ct pour l'amplification de la TSLP 1 et l'image montre la courbe d'amplification correspondante. (D) Amplification de l'isoforme de la TSLP1 à partir d'échantillons de patients utilisant la paire d'amorces de (Fornasa et al., 2015). Le graphique présente les données brutes des valeurs de Ct pour l'amplification de la TSLP 1 et l'image montre la courbe d'amplification correspondante. (E) Amplification de l'isoforme de la TSLP 2 (sfTSLP) à partir d'échantillons de patients utilisant notre propre paire d'amorces. Le graphique présente les données brutes des valeurs de Ct pour l'amplification de la TSLP 2 et l'image montre la courbe d'amplification correspondante. Les données montrées dans les panneaux C, D et E correspondent aux données d'amplification obtenues à partir d'échantillons rétro-transcrits en même temps, dans les mêmes conditions et sur la même plaque qPCR.*

L'expression de l'ARNm codant la TSLP 1 n'a jamais été mise en évidence de manière satisfaisante que çà soit dans les échantillons inflammatoires ou non inflammatoires de muqueuses intestinales et de CEC des patients contrôles et RCH (**Figure 65C**).

Pour confirmer ces résultats, sur une même plaque de qPCR, divers échantillons rétro-transcrits ont été testé par 3 paires d'amorces : nos paires d'amorces de TSLP 1 et TSLP 2 et la paire d'amorce de TSLP 1 de Fornasa *et al.* (TSLP 1, TSLP1 de Fornasa et TSLP 2). Que çà soit nos amorces ou celles de Fornasa *et al.*, l'expression de l'ARNm codant la TSLP 1 n'est pas mise en évidence de manière exploitable. Concernant les amorces de la TSLP 2, les résultats confirment les résultats précédents (**Figure 65 C, D et E**).

# **Résultats complémentaires non publiés**

## **I. L'effet des agonistes et de l'antagoniste de PPAR $\gamma$ sur l'expression de la TSLP dans un modèle murin.**

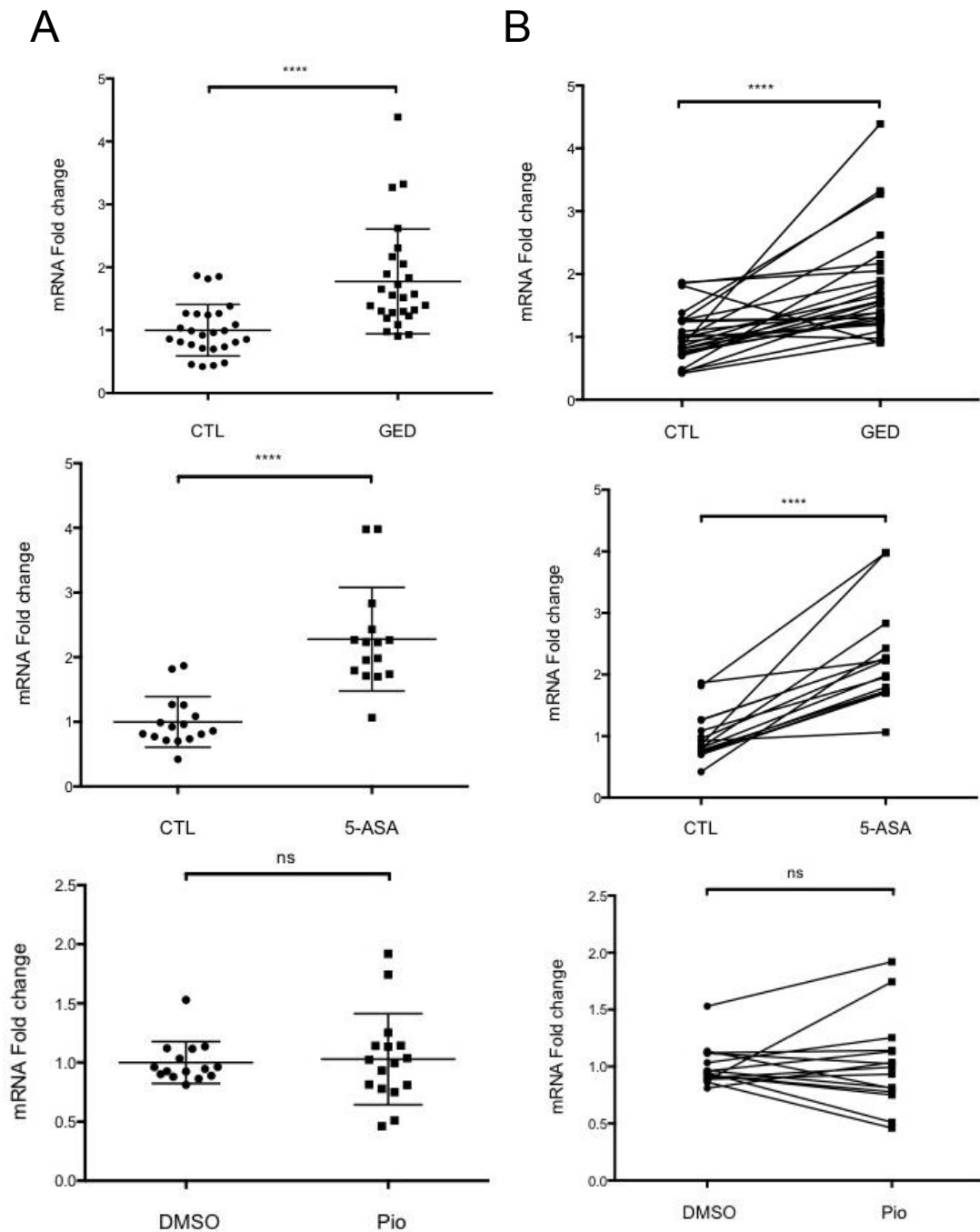
A l'heure actuelle, il n'existe qu'un ARNm codant pour une seule protéine TSLP chez la souris. Cette protéine présente les similitudes d'activité inflammatoire de la TSLP 1 retrouvée chez l'homme. Il est cependant intéressant de savoir si les agonistes/antagoniste de PPAR $\gamma$  peuvent jouer un rôle sur l'expression de cette TSLP murine. Pour cela, 2 types de traitements des muqueuses coliques ont été envisagés : un traitement *ex vivo* et un traitement *in vivo*.

### **A. Effet d'un traitement *ex vivo* par des agonistes de PPAR $\gamma$ sur des échantillons de côlons de souris**

Des prélèvements de côlon ont été récupérés et placés dans un milieu de culture contenant du GED 30 mM, du 5-ASA 30 mM ou de la pioglitazone 10 $\mu$ M durant 6 heures.

Sur différentes expériences indépendantes, l'ensemble des agonistes de PPAR $\gamma$  n'ont pas donné les mêmes résultats. Le GED (30 mM) et le 5-ASA (30 mM) ont, tous les 2, induit une augmentation significative de l'expression de l'ARNm codant la TSLP dans les côlons de souris ( $p < 0,0001$ ) (**Figure 66A**). Cependant, un traitement à la pioglitazone (10  $\mu$ M), n'a pas permis d'induire l'expression de la TSLP au niveau des côlons de souris ( $p = 0,8916$ ).

Les prélèvements de côlons contrôles et traités par le GED, le 5-ASA ou la pioglitazone proviennent du même animal, il est possible de comparer ces deux morceaux entre eux (**Figure 66B**) et ainsi évaluer le traitement par GED, du 5-ASA et de la pioglitazone, côlon par côlon.

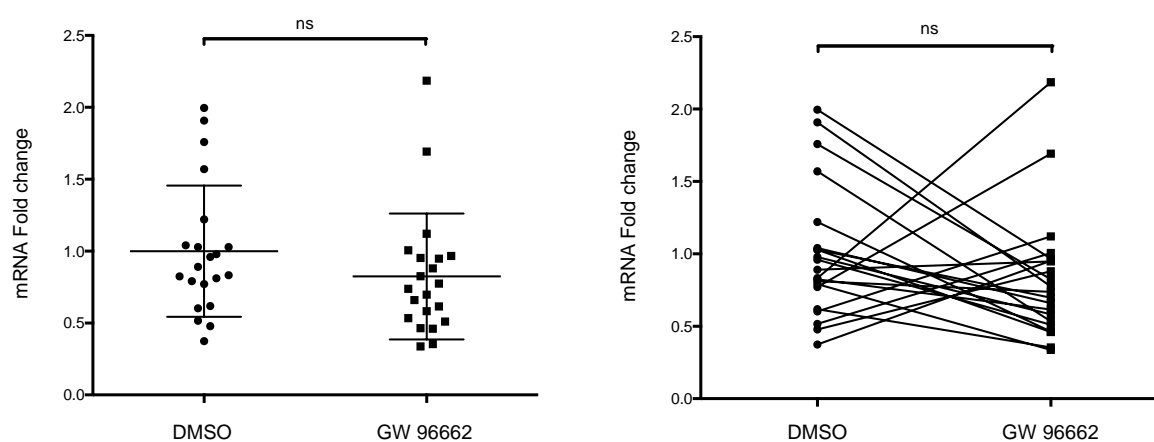


**Figure 66 :** Les agonistes  $PPAR\gamma$  augmentent l'expression du gène codant la TSLP dans les côlons murins. (A) et (B) Expression de l'ARNm codant la TSLP évaluée par qRT-PCR dans les côlons de souris en présence d'agonistes de  $PPAR\gamma$ : GED 30 mM, 5-ASA 30 mM, Pio 10 μM (\*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ; ns: non significatif ( $p = 0,8916$ ); 2-3 expériences indépendantes; Mann Whitney;  $16 < n < 25$ ).

## **B. Effet d'un traitement ex vivo par un antagoniste de PPAR $\gamma$ sur des échantillons de muqueuses murines.**

De la même manière que précédemment, des prélèvements de côlon ont été récupérés et placés dans un milieu de culture contenant du GW9662 durant 6 heures. Les morceaux de côlon témoin ont été placés dans du milieu de culture contenant du DMSO.

Sur 2 expériences indépendantes, l'antagoniste de PPAR $\gamma$ , le GW9662, induit une diminution non significative de l'expression de l'ARNm codant la TSLP dans les muqueuses coliques de souris ( $p=0,1079$ ,  $n= 21$ ) (**Figure 67**). De nouveau, les prélèvements de côlons contrôles et traités par le GW9662 proviennent du même animal, il est possible de comparer ces deux morceaux entre eux (**Figure 67**) et ainsi évaluer le traitement par GW9662 côlon par côlon. On remarque ainsi que pour 5 côlons, un traitement par du GW9662 a induit l'expression de la TSLP.



**Figure 67 : L'antagoniste de PPAR $\gamma$  diminue l'expression du gène codant la TSLP dans les muqueuses coliques murines. Expression de l'ARNm codant la TSLP évaluée par qRT-PCR dans les muqueuses coliques de souris en présence de l'antagoniste de PPAR $\gamma$ : GW 9662 10 $\mu$ M ( $p=0,1079$  ; 2 expériences indépendantes ; Mann Whitney ;  $n=21$ ).**



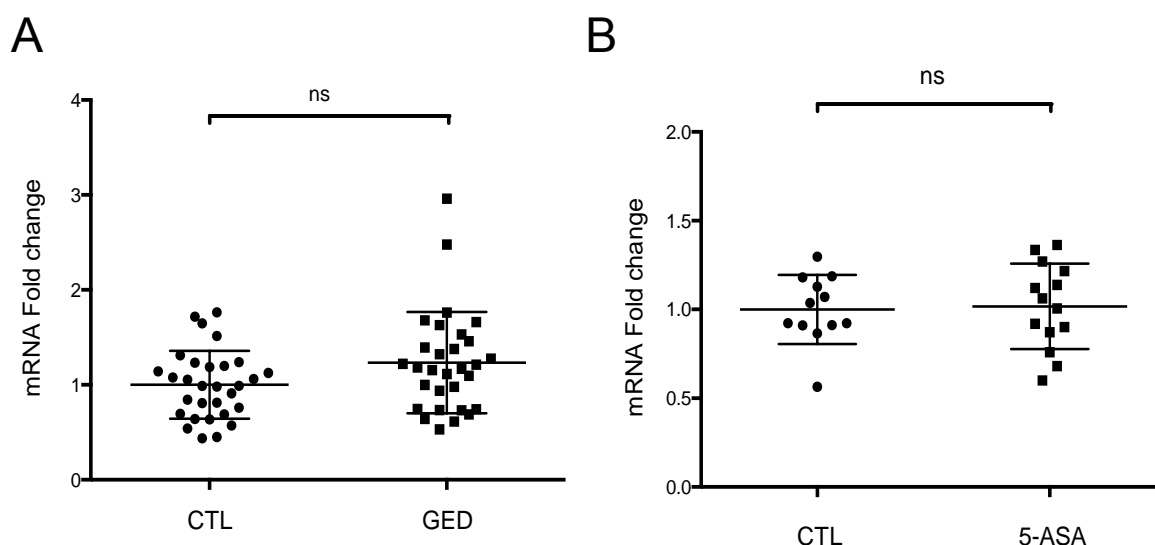
### **C. Effet d'un traitement *in vivo* par les agonistes de PPAR $\gamma$ sur la muqueuse colique de souris**

Le traitement *ex vivo* des muqueuses coliques par GED 30 mM et 5-ASA 30 mM ayant montré des inductions significatives de l'expression de la TSLP, l'étape suivante était de confirmer ces résultats sur des traitements *in vivo* de ces muqueuses.

Pour un traitement au GED, les souris ont été gavées avec une concentration de GED à 30 mg/kg pendant 1 semaine. Il s'agit de la dose utilisée au cours des tests pré-cliniques de la molécule et ayant montré une action anti-inflammatoire sur des modèles de colites.

Pour le traitement par 5-ASA, les souris ont été traitées par voie intra-rectale à la dose de 30 mg/kg pendant 1 semaine.

Sur 3 expériences indépendantes, l'administration par gavage du GED 30 mg/kg n'a pas permis d'induire significativement une augmentation de l'expression de l'ARNm codant la TSLP au niveau des muqueuses coliques ( $p=0,0823$ ,  $n=30$ ) (**Figure 68A**). L'administration par voie intra-rectale du 5-ASA 30 mg/kg ne permet pas une augmentation significative de l'expression de l'ARNm codant la TSLP ( $p=0,8995$ ,  $12 < n < 14$ ) (**Figure 68B**).



**Figure 68 : Les agonistes de PPAR $\gamma$  n'augmentent pas significativement l'expression du gène codant la TSLP dans les côlons murins. Expression de l'ARNm codant la TSLP évaluée par qRT-PCR dans les muqueuses coliques de souris traitées par un agonistes de PPAR $\gamma$ : (A)**

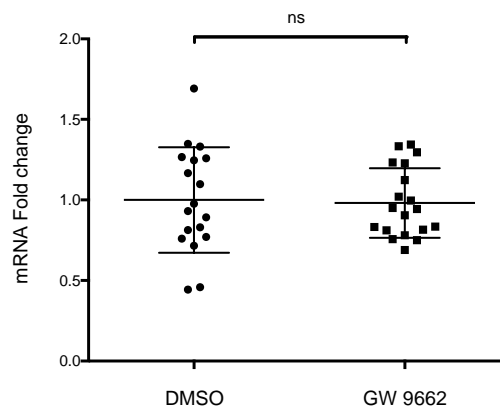
GED 30 mg/kg ( $p=0,0823$  ; 3 expériences indépendantes ; Mann Whitney ;  $n=30$ ) et (B) 5-ASA 30 mg/kg ( $p=0,8995$  ; 2 expériences indépendantes ; Mann Whitney ;  $12 < n < 14$ ).

#### **D. Effet d'un traitement *in vivo* par l'antagoniste de PPAR $\gamma$ sur la muqueuse colique de souris**

Comme précédemment, le traitement *ex vivo* des côlons de souris par le GW9662 n'ayant montré pas une diminution significative de l'expression de la TSLP, l'étape suivante était de confirmer ces résultats sur un traitement *in vivo* de ces côlons.

Pour un traitement au GW9662, une injection par voie intra-péritonéale a été effectuée une fois par jour pendant 1 semaine aux souris, à la concentration de 1 mg/kg/j. Pour les souris contrôle, il était injecté le même volume de DMSO.

Sur 2 expériences indépendantes, aucune différence significative n'est observée entre le groupe de souris traitées par du GW9662 et le groupe témoin ( $p=0,8926$ ,  $n=19$ ) (**Figure 69**).



**Figure 69** : L'antagoniste de PPAR $\gamma$  ne diminue pas l'expression du gène codant la TSLP dans les muqueuses coliques murines. Expression de l'ARNm codant la TSLP évaluée par qRT-PCR dans les muqueuses coliques de souris en présence de l'antagoniste de PPAR $\gamma$  : GW 9662 10 $\mu$ M ( $p=0,8926$  ; 2 expériences indépendantes ; Mann Whitney ;  $n=19$ ).

## **II. Activité anti-microbienne de la TSLP 2 sur des souches bactériennes intestinales.**

Sonesson *et al.* puis Bjerkan *et al.* ont montré que la TSLP, et plus particulièrement la TSLP 2, joue un rôle de peptide antimicrobien envers certaines bactéries au niveau de la peau et des muqueuses de la voie orale (Bjerkan *et al.*, 2015; Sonesson *et al.*, 2011). C'est pour cela que des expériences ont été entreprises pour savoir si la TSLP 2 pouvait également jouer un rôle de peptide antimicrobien contre des bactéries présentes dans l'intestin. Pour cela, des souches bactériennes ont été mises en contact dans un premier temps, avec uniquement de la TSLP 2 puis, dans un second temps, avec un mélange de TSLP 2 et de LL-37, autre peptide antimicrobien reconnu.

### **A. Seule, la TSLP 2 a une faible activité antimicrobienne.**

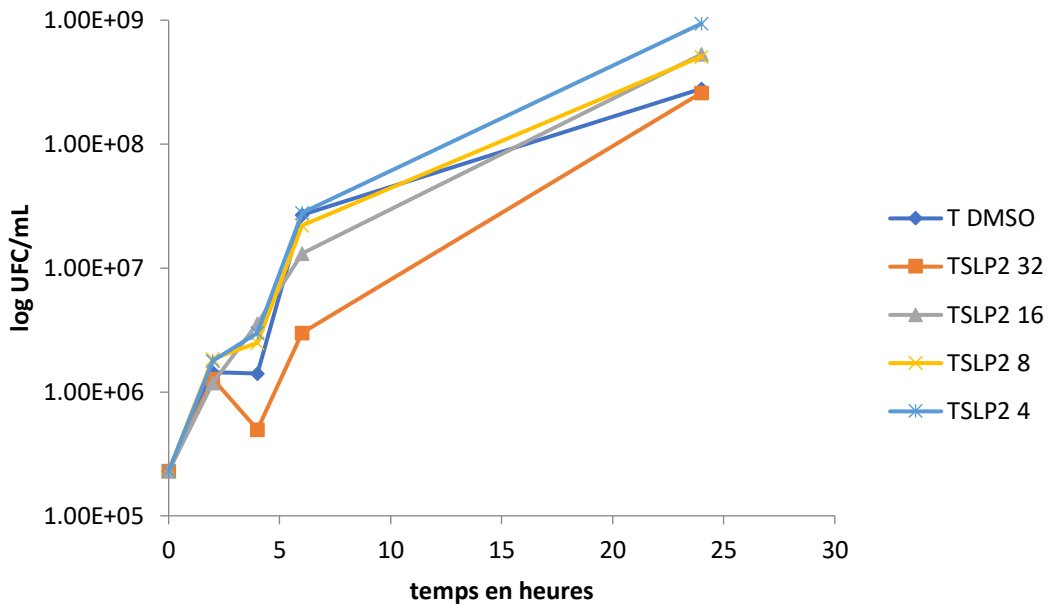
Dans un premier temps, différentes bactéries originaires de patients hospitalisés au CHRU de Lille ont été étudiées. Parmi ces bactéries, le choix s'est porté sur la différence de respiration (aérobie ou anaérobie) mais également sur la différence au niveau de la coloration de Gram (Gram + ou Gram -).

Les premiers résultats obtenus, montrent clairement que la TSLP 2 semble agir uniquement sur les bactéries Gram +. En effet, seul les souches d'*Enterococcus faecalis* et de *Clostridium perfringens* voient leur croissance perturbée/ralentie en présence de TSLP 2 dans le milieu. Donc quel que soit le type respiratoire, la TSLP 2 agit sur ces bactéries (**Figure 70A et 70B**). Pour la concentration la plus forte de la TSLP 2 (32 µg/mL), une baisse de la croissance bactérienne entre 4 et 6 heures est observée, avec une différence maximale d'environ 2 log entre la concentration bactérienne du tube témoin et ceux contenant la TSLP 2. Pour les autres concentrations (4, 8 et 16 µg/mL), elles semblent être efficaces que sur *C. perfringens* où une diminution de la concentration bactérienne est diminuée d'environ 1 log.

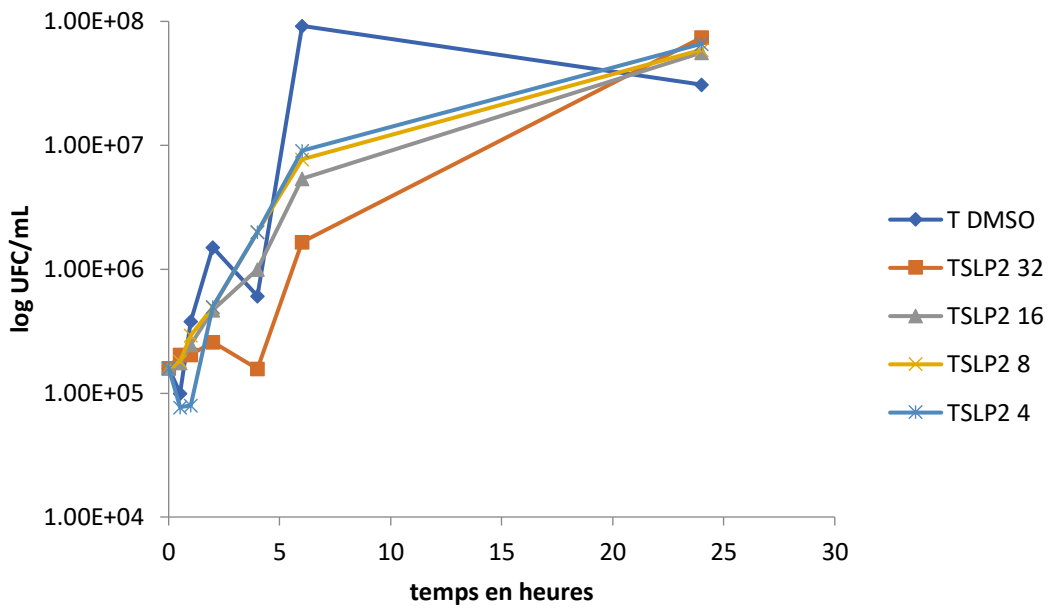
Au long terme (24 heures), l'effet de la TSLP 2 semble diminué et la croissance bactérienne n'est plus perturbée. On retrouve la même concentration bactérienne que dans le contrôle (**Figure 70A et 70B**).

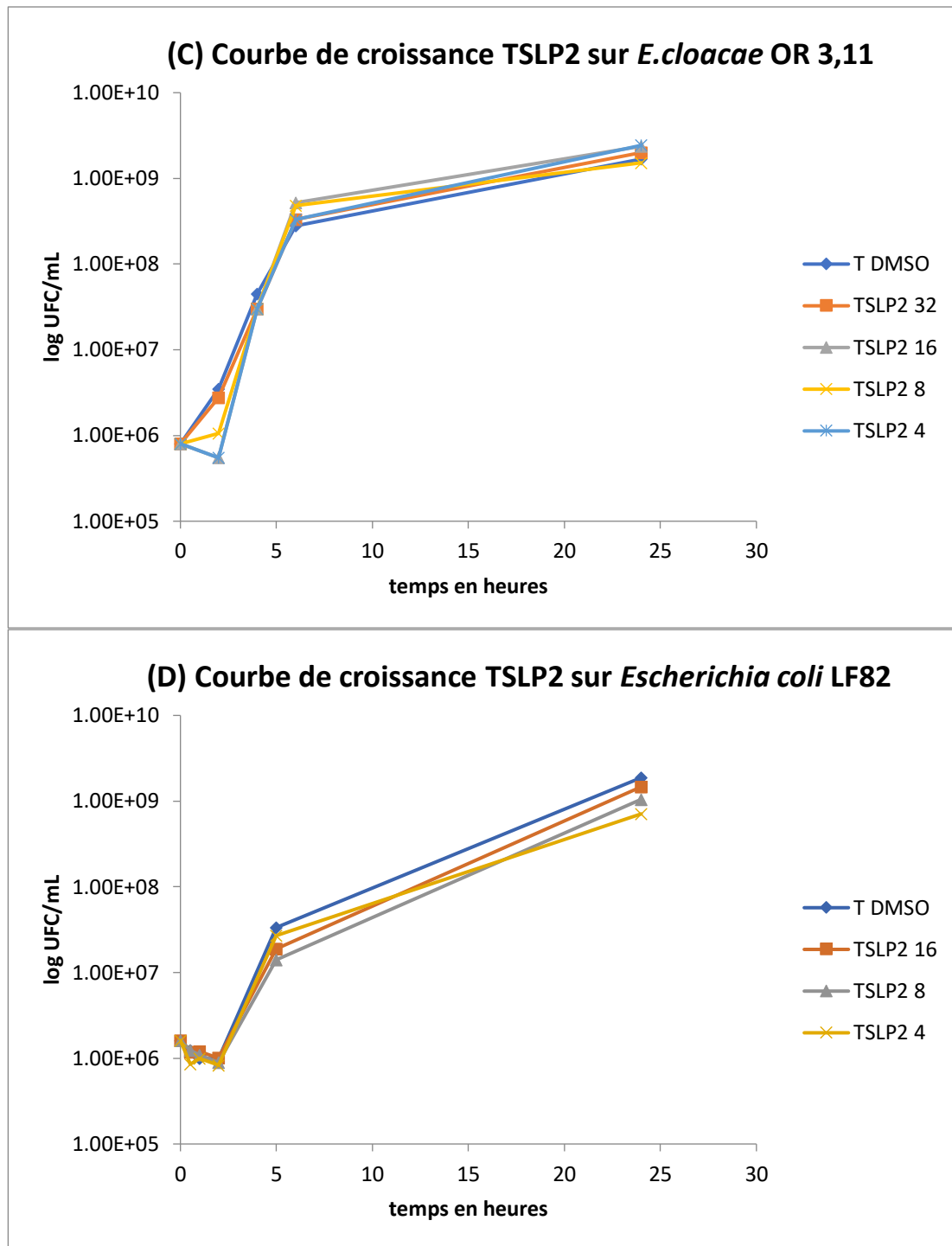
Au niveau des 2 bactéries gram négatifs (*Escherichia coli* LF82 et *Enterobacter cloacae*), aucune perturbation de la croissance est observée, quelque soit la concentration de TSLP 2. Ces résultats laissent donc à supposer que la TSLP 2 n'agit pas sur les membranes des bactéries gram négatifs (**Figure 70C et 70D**).

**(A) Courbe de croissance TSLP2 sur *E.faecalis* 09001**



**(B) Courbe de croissance TSLP2 sur *C.perfringens* 16148**





**Figure 70 : La TSLP 2 a uniquement une activité antimicrobienne faible au niveau des souches bactériennes gram+ (A) Cinétiques des différentes croissances d'*Enterococcus faecalis* en présence de la TSLP 2. (B) Cinétiques des différentes croissances de *Clostridium perfringens* en présence de la TSLP 2. (C) Cinétiques des différentes croissances d'*Enterobacter cloacae* en présence de la TSLP 2. (D) Cinétiques des différentes croissances d'*Escherichia coli* adherent-invasive LF82 en présence de la TSLP 2 (32, 16, 8 et 4 µg/mL).**

## **B. La TSLP 2 combinée à un autre peptide antimicrobien présente une bonne activité antimicrobienne.**

Au niveau de la barrière intestinale, il existe de nombreux peptides antimicrobiens, qui sont libérés dans la lumière intestinale de façon constante afin que l'homéostasie soit maintenue. Donc, malgré la faible activité antimicrobienne observée de la TSLP 2, l'association avec un autre peptide antimicrobien pourrait agir sur son activité. C'est pour cela que des expériences de synergie sur les bactéries précédentes (à l'exception d'*E. cloacae* OR 3,11) ont été envisagées. Le peptide antimicrobien testé en synergie avec la TSLP 2 est le LL-37. Ce peptide a montré au préalable une bonne activité antimicrobienne sur ces 2 souches bactériennes. Concernant le LL-37, les 2 concentrations les plus élevées montrant une perte d'activité au bout de 24 heures ont été choisies : 4 µg/mL et 8 µg/mL. Pour la TSLP 2, les concentrations 8 µg/mL, 16 µg/mL et 32 µg/mL ont été choisies.

Dans les premières heures, le cocktail avec les 2 peptides antimicrobiens montre déjà une meilleure activité antimicrobienne que les peptides seuls. Il semblerait donc que les peptides agissent de façon synergique (**Figure 71-72-73**).

A 24 heures, au niveau la souche *E. faecalis*, la concentration bactérienne est redevenue identique à celle du tube témoin pour les souches en contact avec les différentes concentrations de TSLP 2 et de LL-37. En revanche, tous les tubes contenant le cocktail TSLP 2 + LL-37, montrent clairement un effet de synergie antimicrobienne. A 24 heures, la concentration bactérienne a diminué entre 3 et 4 log suivant les concentrations. Le maximum d'efficacité est observé pour le cocktail avec les plus fortes concentrations en TSLP 2 (32 µg/mL) et en LL-37 (8 µg/mL), la concentration bactérienne a chuté de 7 log environ (**Figure 72 A, B, C**).

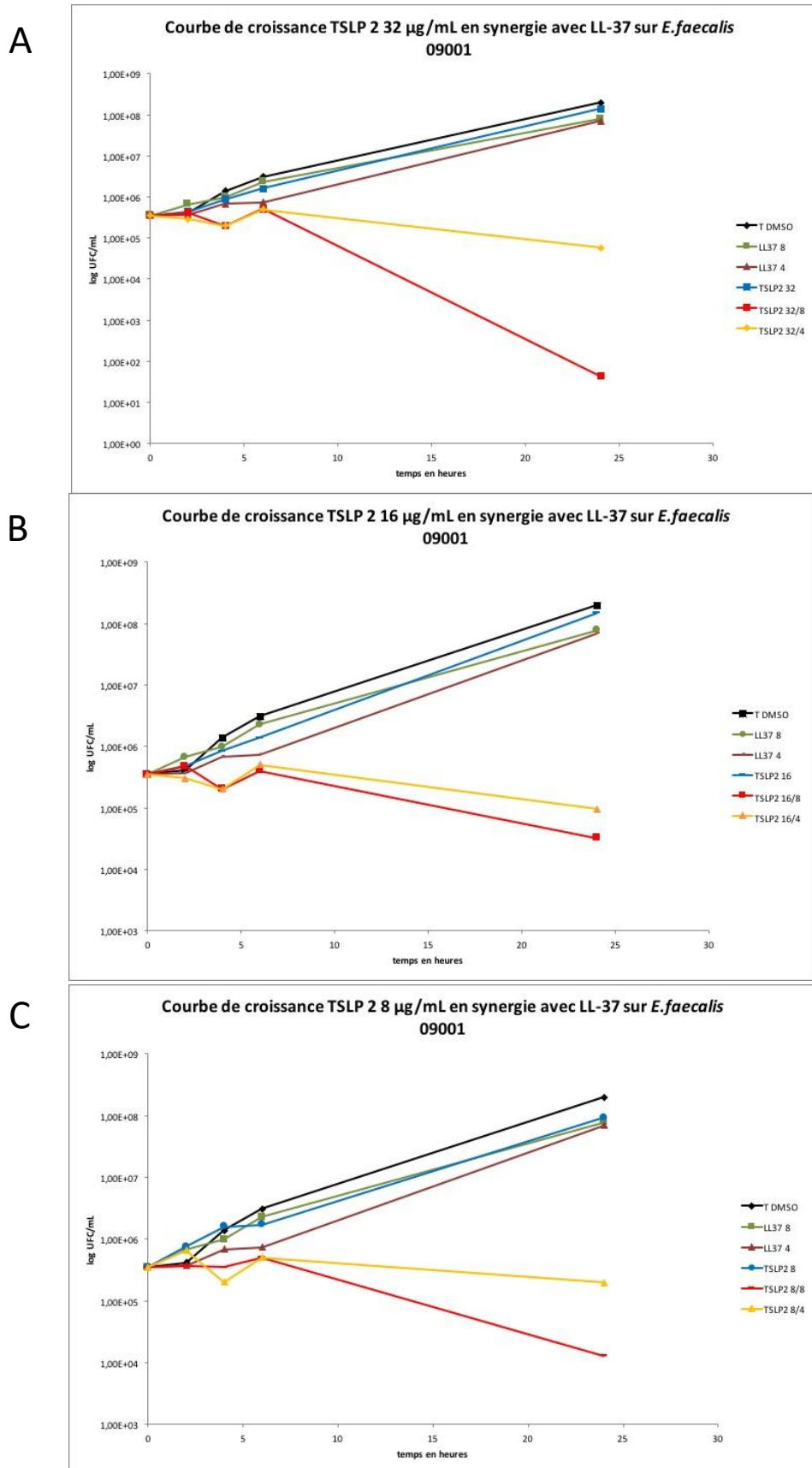
Concernant la souche du *Clostridium perfringens*, la concentration bactérienne est redevenue identique à celle du tube témoin pour les souches en contact avec les différentes concentrations de TSLP 2 et la concentration 4µg/mL du LL-37. Lorsque le LL-37 seul est utilisé à une concentration à 8µg/mL, on observe un effet antimicrobien visible. En effet, la concentration bactérienne est diminuée d'environ 2 log et demi. Ce qui montre que le LL-37 a une bonne efficacité contre cette souche (**Figure 73 A, B, C**).

Lorsque qu'on regarde les courbes avec l'association TSLP 2 et LL-37, l'action synergique est clairement visible dès les premières heures (2 heures et 4 heures) de culture en comparaison avec le témoin mais également les tubes contenant qu'un seul peptide. Cet écart s'agrandit au fur et à mesure de l'expérience, et à 24 heures de culture, le seuil de détection est atteint pour l'ensemble des tubes contenant les cocktails de peptides antimicrobiens. L'action synergique entre les 2 peptides antimicrobiens a donc été très bactéricide contre cette souche bactérienne (**Figure 73 A, B, C**).

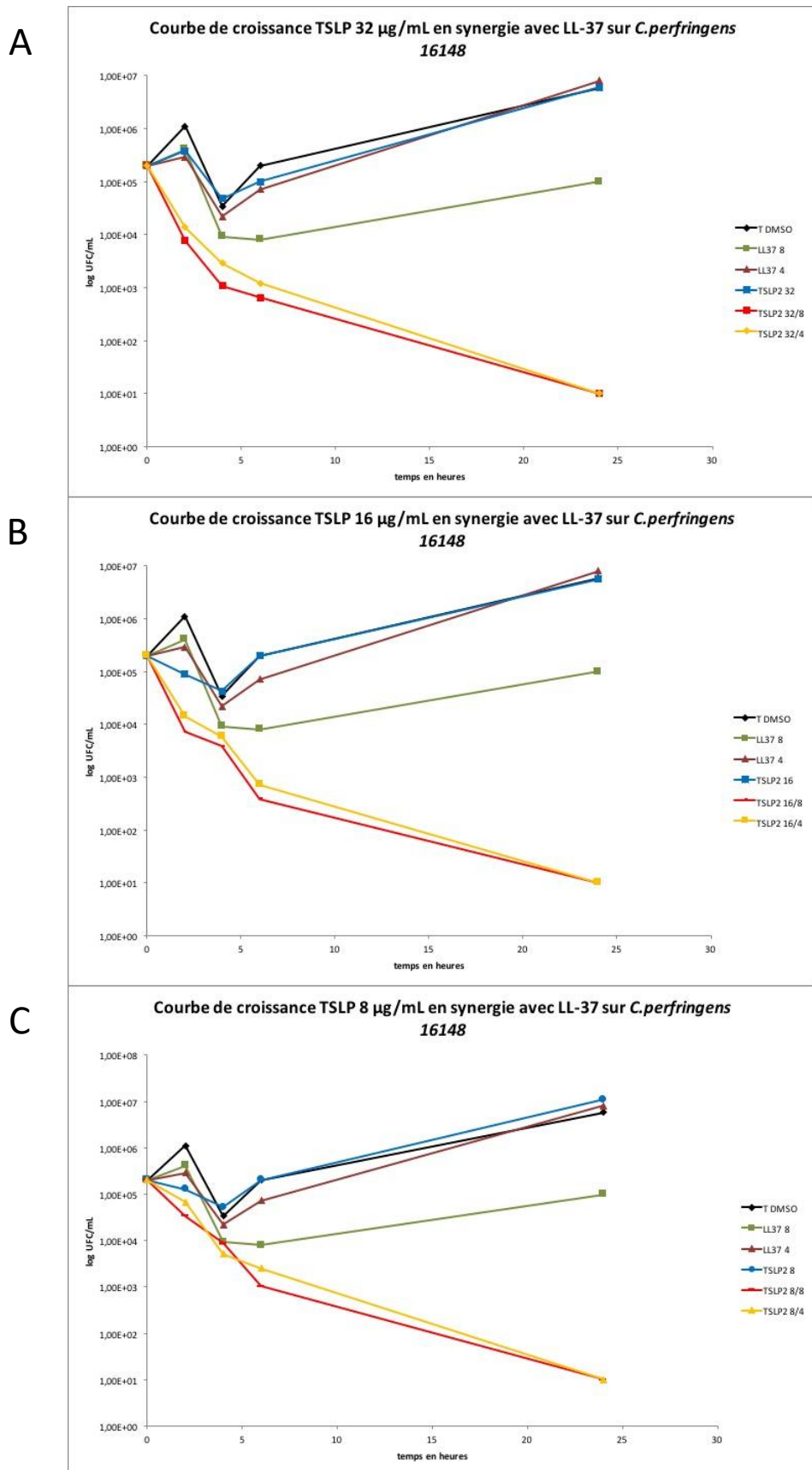
Enfin, pour la souche *E. coli* LF82, la synergie d'action est également visible. Le LL-37 à 4 et 8 µg/mL n'avait pas d'activité antimicrobienne sur cette souche (**Figure 73 A**). De même la TSLP 2 à 16 µg/mL n'avait pas agi sur cette souche (**Figure 70D**). La TSLP 2 à cette concentration et associé à du LL-37 (4 ou 8 µg/mL) diminue la croissance bactérienne. On obtient un effet bactériostatique (**Figure 73 C**). Pour savoir si cette synergie pouvait arriver à un effet bactéricide, la concentration de TSLP 2 a été augmentée. La TSLP 2 à 32 µg/mL seule a un effet bactériostatique (**Figure 73 B**). De plus l'action synergique de la TSLP 2 et du LL-37 (4 ou 8 µg/mL) permet de nouveau d'obtenir une réponse bactériostatique mais pas une réponse bactéricide.

L'ensemble de ces résultats montrent donc que la TSLP 2 a une activité antimicrobienne sur des bactéries de la flore intestinale. Son activité semble se limiter au Gram + quand elle est seule. La TSLP 2 associée à un autre AMP voit son activité améliorée, avec un effet bactéricide pour *Cl. Perfringens* et bactériostatique pour *E. faecalis* et un élargissement de son spectre au Gram –, avec un effet bactériostatique sur la souche *E. coli* LF82.

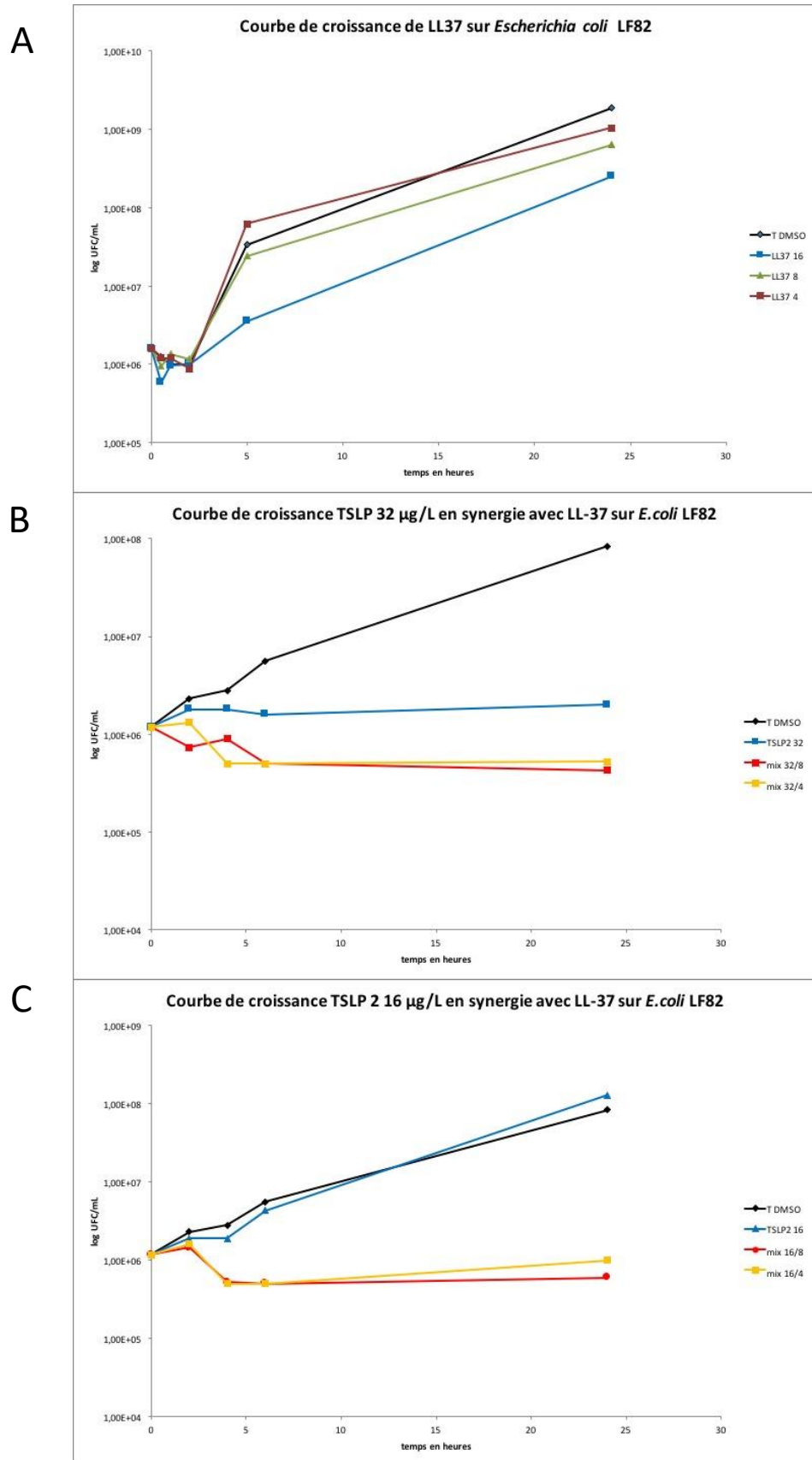




**Figure 71 : Synergie d'action entre la TSLP 2 et le LL-37 sur la souche 16148 de *C. perfringens*. Cinétiques des différentes croissances de *Enterococcus faecalis* en présence de la TSLP 2 seule, du LL-37 seul et de l'association TSLP 2/LL-37 avec une concentration fixe de TSLP 2 à (A) 32 µg/mL, (B) 16 µg/mL et (C) 8 µg/mL.**



**Figure 72 : Synergie d'action entre la TSLP 2 et le LL-37 sur la souche 16148 de *C. perfringens*. Cinétiques des différentes croissances de *Clostridium perfringens* en présence de la TSLP 2 seule, du LL-37 seul et de l'association TSLP 2/LL-37 avec une concentration fixe de TSLP 2 à (A) 32 µg/mL, (B) 16 µg/mL et (C) 8 µg/mL.**



**Figure 73 : Synergie d'action entre la TSLP 2 et le LL-37 sur la souche LF82 d'*E. coli* adhéro-invasive. Cinétiques des différentes croissances d'*Escherichia coli* en présence de LL-37 seul (A) et de l'association TSLP 2/LL-37 avec une concentration fixe de TSLP 2 à (B) 32 µg/mL, (C) 16 µg/mL.**

# Discussion

L'ensemble du travail effectué durant ce projet montre pour la toute première fois une régulation transcriptionnelle de l'expression de la TSLP 2 par le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . Ces résultats suggèrent fortement que la diminution d'expression de la TSLP 2 observée dans les muqueuses et les cellules épithéliales coliques chez les patients atteints de RCH est liée à celle de PPAR $\gamma$  (Martin Mena et al., 2017).

## **I. 2 ISOFORMES DE LA TSLP**

La distinction entre les 2 isoformes de TSLP n'a été réalisée que très récemment. C'est maintenant un aspect fondamental de la biologie de cette cytokine car les 2 isoformes possèdent des fonctions distinctes et des profils d'expression différents (Bjerkan et al., 2015, 2016; Dong et al., 2016; Fornasa et al., 2015; Tsilingiri et al., 2017).

*In vitro*, l'expression du gène codant la TSLP 1 est induite par des stimuli inflammatoires. Par exemple, l'exposition de poly (I:C) sur des cellules épithéliales bronchiques induit uniquement l'expression de la TSLP 1 (Harada et al., 2009). De plus, dans les kératinocytes humains, les cytokines inflammatoires (TNF, IFN, IL-1 $\beta$ ) ou les ligands de TLRs (poly (I:C), flagelline, etc) sont de puissants inducteurs de la TSLP 1. Enfin, une exposition de *Salmonella typhimurium* sur des cellules Caco-2 induit une régulation transcriptionnelle positive pour la TSLP 1 concomitante à une régulation négative de l'expression de la TSLP 2 (Fornasa et al., 2015). En adéquation avec les résultats *in vitro*, la TSLP 1 est surexprimée *in vivo* chez des patients atteints de dermatite atopique, asthme (Fornasa et al., 2015; He et al., 2009; Lee and Ziegler, 2007).

Parallèlement aux travaux de Guilia Fornasa, notre étude a mis en évidence la présence d'une seule isoforme présente à l'état physiologique au niveau des cellules épithéliales intestinales : la TSLP 2. Ces résultats *in vitro* ont été soutenus par les résultats obtenus sur les échantillons de patients contrôles. L'isoforme de la TSLP 1 n'a pas été détectée sur les cultures cellulaires *in vitro*. La TSLP 1 n'est pas exprimée de façon constitutive et serait surexprimée dans des conditions inflammatoires (Fornasa et al., 2015). Ceci explique donc son absence sur les différentes expériences *in vitro* effectuées. Une mauvaise qualité des amorces utilisées, pour amplifier le gène codant la TSLP 1 lors de la PCR, pourrait expliquer l'absence d'expression sur nos différentes expériences. Cependant, les oligonucléotides ont été testés sur un autre type cellulaire (cellules H292 : cellules épithéliales bronchiques) et une expression de la TSLP 1 a été mise en évidence au niveau de ces cellules à l'état basal. Toujours dans ces cellules, une stimulation avec du poly (I:C) (ARN double brin viral) a induit significativement l'expression de la TSLP 1. Enfin pour confirmer l'ensemble des précédents résultats, les oligonucléotides utilisées par Fornasa *et al.* pour observer l'expression de la TSLP 1 ont donné les mêmes résultats sur l'ensemble des expériences effectuées lors de cette étude.

## **II. MODELE MURIN POUR L'ETUDE DE LA TSLP**

Il existe 43% d'homologie entre la TSLP murine et la TSLP humaine. Malgré cela, la souris a permis de confirmer de nombreuses hypothèses concernant la TSLP, sa régulation et son côté délétère lors des inflammations sur la dermatite atopique, l'asthme allergique ou l'inflammation pulmonaire (Hener et al., 2011). Il est important de resouligner que la TSLP 2 n'existe pas chez la souris et qu'elle a été uniquement isolée chez l'homme. Sans que cela ne soit encore formellement confirmé, l'expression et les fonctions de la TSLP murine se rapprocheraient plus de celles de la TSLP 1 que de la TSLP 2, en particulier au niveau des zones inflammatoires sur les modèles de souris asthmatique ou développant des maladies proches de la dermatite atopique ou de l'asthme. De ce fait, la relevance d'études de la TSLP 2 chez la souris est limitée.

Il a été suggéré que l'injection intrapéritonéale de TSLP 2 recombinante améliore légèrement la colite induite par le DSS chez la souris, mais le mécanisme sous-jacent n'a pas été étudié et demeure inconnu (Fornasa et al., 2015). Également, dans un modèle d'allergie provoquée par des acariens chez la souris, l'injection de TSLP 2 recombinante limite l'inflammation induite (Dong et al., 2016). Mais le mécanisme d'action qui en découle et le récepteur impliqué dans cette réponse restent encore inconnus.

Durant cette étude, différentes expériences (*ex vivo* et *in vivo*) ont été entreprises chez le modèle murin. Les côlons de souris ont été mis en contact direct avec différents agonistes de PPAR $\gamma$  (*in vivo* : 5-ASA et GED 30mg/kg ; *in vitro* : 5-ASA 30 mM, GED 30 mM et Pioglitazone 1  $\mu$ M) et avec un antagoniste spécifique de PPAR $\gamma$  (GW9662) *ex vivo* et *in vivo*. Les agonistes de PPAR $\gamma$  n'induisent pas *in vivo* l'expression de la TSLP et l'antagoniste de PPAR $\gamma$  n'inhibe pas *in vivo* l'expression de la TSLP. L'ensemble de ces résultats suggère donc que PPAR $\gamma$  n'agit pas sur l'expression du gène codant la TSLP chez la souris. Cependant, *ex vivo*, les traitements par 5-ASA et GED ont permis d'induire l'expression de la TSLP. Ce résultat n'est pas confirmé pour le traitement par pioglitazone. Il est possible que 6H de traitement abime les morceaux de côlon, et que l'induction de la TSLP n'est pas due à un traitement par un agoniste de PPAR $\gamma$ . C'est principalement pour cette raison que des expériences *in vivo* ont été envisagées par la suite.

Les résultats obtenus *in vivo* pourraient être confirmés en comparant l'expression de la TSLP des muqueuses et des CEI de côlon de souris témoins avec une lignée de souris PPAR $\gamma^{\Delta IEC}$  (souris génétiquement modifiées par la technique *Cre-Lox*) n'exprimant plus le gène PPAR $\gamma$  spécifiquement au niveau des CEI (Kundu et al., 2014).

Le modèle de souris reste un très bon modèle animal pour étudier et comprendre la physiopathologie des MICI mais dans notre étude, ce n'est pas le cas. En effet, si la TSLP 2 n'existe pas chez la souris, de nombreux gènes pouvant être impliqués dans la survenue des MICI et plus particulièrement la RCH ont montré des similitudes avec les résultats observés chez les patients. Parmi ces gènes, sont retrouvés les gènes cités précédemment comme HNF4 $\alpha$ , MUC 2, MyD88, Lypd 8. Les

souris génétiquement modifiées et ayant une déficience pour un de ces gènes présentent une susceptibilité accrue à une colite au DSS ou une colite spontanée.

Le développement récent d'organoïdes de côlon d'origine humaine peut être une alternative à l'expérimentation animale et peut être mieux adapté pour comprendre le rôle de la TSLP 2 lors de l'homéostasie intestinale (Fatehullah et al., 2016; Miyoshi and Stappenbeck, 2013; VanDussen et al., 2015). Ce système de culture en 3D permettrait de cultiver des cellules épithéliales humaines de patients sains comme de patients RCH ou MC et d'observer l'expression de différents gènes cibles. Elle permettrait également d'observer les jonctions serrées entre cellules, qui semblent faire défaut chez les patients RCH. Une co-culture avec des cellules dendritiques aiderait à la compréhension du dialogue entre les CEI de patients sains ou RCH/MC et les cellules dendritiques. Cela pourra aboutir à la description de la physiopathologie des MICI.

### **III. REGULATION DE LA TSLP 2 DANS LA CEI**

Ce projet apporte un élément nouveau concernant la régulation transcriptionnelle de la TSLP 2 au niveau des CEI. Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  se fixe en amont du gène codant la TSLP 2. Ce récepteur est présent sur la zone promotrice même en l'absence d'agoniste synthétique de PPAR $\gamma$  (résultats *ChIP*). Ceci peut s'expliquer par la présence d'agonistes naturels dans les cellules. L'étude du gène rapporteur par transfection transitoire permet de conclure que l'ajout d'agoniste de PPAR $\gamma$  amplifie la réponse inductrice du gène codant la TSLP 2. Un défaut de PPAR $\gamma$  amène à une importante diminution d'expression de la TSLP 2. Les précédentes recherches autour de la régulation transcriptionnelle de la TSLP ont mis en évidence les actions de différents facteurs de transcriptions comme NF- $\kappa$ B ou encore AP-1. Les sites de fixation potentiels de ces 2 facteurs de transcriptions sont situés uniquement dans la zone promotrice de la TSLP 1 et NF- $\kappa$ B est identifié comme un facteur critique pour l'expression de la TSLP induite par l'inflammation (Tsilingiri et al., 2017). La positions de ces sites de fixations soutiennent l'hypothèse que seule

l'isoforme 1 de la TSLP aurait une fonction dans les réactions inflammatoires. D'autres facteurs de transcription agissent sur la régulation transcriptionnelle de la TSLP 2 comme les récepteurs nucléaires RXR, RAR ou VDR (Cultrone et al., 2013; Lee and Ziegler, 2007; Lee et al., 2008; Xie et al., 2012b). Pour ces derniers (RXR, RAR et VDR), leurs actions ont été étudiées uniquement sur les cellules épithéliales pulmonaires et sur les kératinocytes. Les CEI exprimant ces récepteurs, il serait intéressant de tester leur influence sur l'expression de la TSLP 2. Il serait également intéressant de regarder si la régulation transcriptionnelle de la TSLP 2 par le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  est retrouvée dans d'autres cellules épithéliales exprimant PPAR $\gamma$  comme les kératinocytes ou encore les cellules épithéliales pulmonaires (Mao-Qiang et al., 2004; Wang et al., 2001a).

#### **IV. RÔLE DE LA TSLP 2 DANS LA CEI**

En termes de fonction, bien que les travaux effectués ne distinguent que très rarement les différentes isoformes, les données suggèrent que le TSLP 1 possède des propriétés pro-inflammatoires (Bjerkan et al., 2016; Dong et al., 2016). À l'inverse, *in vivo* et *in vitro*, la TSLP 2, forme prédominante de TSLP, qui est constitutivement exprimée à l'état basal, aurait des propriétés anti-inflammatoires (Dong et al., 2016; Fornasa et al., 2015).

Cependant le rôle exact de la TSLP 2 n'est pas clairement élucidé dans la littérature. Plusieurs hypothèses sur les fonctions de la TSLP 2 ont été émises parmi lesquelles l'action anti-inflammatoire. En effet, *in vitro*, sur des PBMCs (*Peripheral Blood mononuclear cells* = cellules mononuclées sanguines périphériques), la TSLP 2 exerce une action anti-inflammatoire en inhibant la production de cytokines inflammatoires par les cellules dendritiques (dérivés des PBMCs) (Fornasa et al., 2015). Cependant, une étude conduite en 2015 par Bjerkan *et al.* proposent une fonction différente avec la possibilité que la TSLP 2 présente les caractéristiques d'un peptide antimicrobien au niveau des kératinocytes (Bjerkan et al., 2015).



Nos résultats de bactériologie confirment et renforcent cette hypothèse. La TSLP 2 a une action antimicrobienne sur des souches bactériennes issues des selles de patients hospitalisés. Cela reste des résultats encore au stade préliminaire et d'autres études de croissances bactériennes sont actuellement envisagées, l'action antimicrobienne de la TSLP 2 synthétique semble agir de préférence sur les bactéries Gram +. Dans un contexte d'homéostasie intestinale, au niveau de la muqueuse, de nombreux AMP différents sont présents dans le mucus. L'hypothèse d'une action synergique entre eux est fortement possible dans ce microenvironnement. Cette hypothèse est vérifiée avec nos résultats. En effet, lorsque la TSLP 2 est associée à un autre AMP, l'action antimicrobienne est améliorée (bactéricide selon l'espèce) et le spectre élargi au Gram – où la synergie TSLP 2/LL-37 permet une action bactériostatique. Il faudra évidemment étayer ces premiers résultats avec une gamme de bactéries plus conséquente et tester des synergies avec d'autres AMP produites par les CEI. Les bactéries testées provenant principalement de patients atteints de MC, il serait important de tester sur des souches isolées de selles de patients atteints de RCH.

L'action tolérogène de la TSLP 2 et sa fonction antimicrobienne suggèrent que les CEI sont capables de produire et relarguer la TSLP 2 soit au niveau basal, soit au niveau apical. En effet, pour une action sur les cellules dendritiques, les cellules sécrètent les cytokines vers la muqueuse intestinale, c'est donc une sécrétion au niveau du pôle basal de la cellule, alors qu'une action antimicrobienne, aurait une libération au niveau du pôle apical de la cellule. Une technique de culture sur des filtres Transwell® permettrait de répondre à cette question. Cette culture permet de produire un environnement proche de l'état *in vivo* via une alimentation basolatérale des cellules polarisées et par conséquent une activité métabolique plus naturelle. La culture des cellules Caco-2 et/ou T84 sur filtre semi-perméable permet d'avoir une sécrétion polarisée des protéines et de délimiter deux compartiments, l'un au pôle apical correspondant à la lumière intestinale, l'autre au pôle basolatéral représentant le milieu lymphatique/plasmatique. Ce système permet de mimer la situation "*in vivo*" et de mesurer la sécrétion de la TSLP 2 au niveau apical et au niveau basal. L'évaluation de la TSLP 2 se ferait par WB après une immunoprécipitation des protéines des surnageants.

## V. IMPLICATION DE LA TSLP DANS LES MICI

Actuellement, peu de données sont disponibles sur le lien entre l'expression de la TSLP et son implication dans le mécanisme des MICI. Les premiers résultats ont été obtenus par Rimoldi *et al.* (Rimoldi et al., 2005a) et ont montré une diminution de l'expression de la TSLP dans les CEI de patients atteints de maladie de Crohn. Bien qu'obtenus avec très peu de patients et sans analyse statistique, ces résultats étaient les premiers à suggérer qu'une perte d'expression de la TSLP au niveau intestinal pouvait être associée à un déficit de contrôle de l'immunité intestinale et au développement d'une inflammation chronique. L'hypothèse démontrée par les auteurs est que la TSLP est un acteur essentiel du dialogue entre les CEI et les DC de la *lamina propria*. Au travers de ses capacités de polarisation des DC, cette cytokine permet la différenciation de lymphocytes T CD4+ régulateurs, indispensables au maintien de l'homéostasie intestinale. Son absence perturberait cet équilibre et participerait au développement d'une inflammation chronique.

Bien que le rôle exact de PPAR $\gamma$  dans le tractus intestinal reste à caractériser, il a été suggéré que ce facteur joue un rôle clé dans l'homéostasie intestinale. La diminution d'expression de PPAR $\gamma$  dans la cellule épithéliale colique (CEC) de souris augmente la sensibilité à la colite induite chimiquement, tandis que l'activation de ce récepteur réduit l'inflammation intestinale et la gravité de la maladie chez les patients RCH et dans les modèles expérimentaux de souris.

PPAR $\gamma$  joue un rôle bénéfique sur l'homéostasie intestinale en contrôlant divers acteurs de la barrière antimicrobienne. En effet, PPAR $\gamma$  est capable d'intervenir dans l'immunité antimicrobienne dans le côlon, notamment en contrôlant l'expression des gènes codant pour la  *$\beta$ -defensin-1* (un AMP) et la *mannose-binding lectine* (Choteau et al., 2016; Peyrin-Biroulet et al., 2010). Cependant, les bêta-défensines et d'autres peptides semblables (HDB2, HDB 3, LL-37) sont induits chez les patients atteints de RCH dans des conditions inflammatoires et, en outre, l'activité antimicrobienne *in vitro* de la muqueuse RCH enflammée est significativement plus élevée par rapport à la

muqueuse MC enflammée (Nuding et al., 2007; Schmid et al., 2007; Wehkamp et al., 2007). Par conséquent, il semble que la synthèse et l'activité de la défensine ne soient pas perturbées en RCH. Cependant, les AMP ont une activité « mucus dépendante ». En effet, le mucus va concentrer ces AMP et permettre une meilleure synergie d'action. Donc chez les patients atteints de RCH, si le mucus est fortement diminué, il est possible que l'efficacité des AMP *in vivo* soit impactée.

Dans ce contexte, les résultats obtenus au cours de ce travail sur l'activité antimicrobienne semblent très pertinents. Par conséquent, l'identification d'une action antimicrobienne de la TSLP 2, nouveau gène cible de PPAR $\gamma$  dans la CEI, élargit le rôle de ce récepteur nucléaire à la fois comme un facteur antimicrobien important sur les surfaces muqueuses intestinales, ainsi qu'un acteur clé pendant l'homéostasie intestinale. De plus, nous apportons une notion nouvelle avec la possibilité que certains peptides antimicrobiens peuvent avoir un défaut d'expression au cours de la RCH.

Suite aux résultats obtenus *in vitro*, sur le rôle de PPAR $\gamma$  dans la régulation transcriptionnelle de la TSLP 2, la question qui s'est naturellement posée est : existe-t-il une diminution d'expression de la TSLP 2 chez les patients atteints de RCH, pour lesquels le défaut de PPAR $\gamma$  dans les CEI est une caractéristique ?

Chez les patients atteints de RCH, Fornasa *et al.* mettent en évidence le rôle anti-inflammatoire de la TSLP 2 via l'inhibition de sécrétion de cytokines par les cellules dendritiques . Cependant, au cours de la RCH, elle ne trouve pas de différence d'expression de la TSLP 2 entre les patients contrôles et les patients atteints de RCH. La différence se voit en revanche au niveau de la TSLP 1 qui est très fortement augmentée au cours de la RCH (Fornasa et al., 2015).

Nos résultats d'expression obtenus à partir de fragments de muqueuses coliques et des cellules épithéliales coliques issus de patients montrent clairement une diminution significative de l'expression de la TSLP 2 dans la muqueuse et dans les cellules épithéliales coliques inflammées de patients atteints de RCH. De manière plus intéressante, ces mêmes résultats montrent que la diminution d'expression de la TSLP 2 chez les patients RCH est également présente en territoire non inflammatoire, suggérant qu'il pourrait s'agir d'un mécanisme primitif de la pathologie. Cette observation renforce le lien entre PPAR $\gamma$  et la TSLP 2 dans l'intestin et l'hypothèse

que la perte d'homéostasie est un facteur étiologique chez les patients atteints de MICI. Elle corrobore également les résultats obtenus par Noble *et al.* (Noble *et al.*, 2008). En effet, ils mettent en évidence que l'expression de la TSLP est significativement diminuée au niveau des zones sigmoïdes inflammatoires mais également non inflammatoires de patients RCH en comparaison au sigmoïde de patients sains. De plus, l'expression de TSLP 1 n'a jamais été détectée dans les muqueuses ou les cellules épithéliales coliques en muqueuses saines ou inflammées. La différence entre les résultats publiés par Fornasa *et al.* et les nôtres peut être due à la nature des échantillons utilisés. En effet, pour l'étude de Fornasa *et al.*, la très grande majorité des échantillons des patients RCH avait pour origine le côlon sigmoïde (Fornasa *et al.*, 2015). Pour notre étude, quelques échantillons provenaient également de sigmoïdectomie mais la majorité des échantillons venait du côlon proximal ou de morceaux de colectomies totales. Le profil d'expression des isoformes de la TSLP le long de l'intestin (côlon proximal contre le côlon distal) n'est pas connu et explique peut-être les différences observées entre nos deux résultats. Il sera important de déterminer le profil d'expression de la TSLP le long du tractus intestinal sain chez l'homme, pour mieux comprendre la biologie de la cytokine.

## **VI. LES MICI ET TRAITEMENT AVEC DES AGONISTES DE PPAR $\gamma$**

Les éléments susceptibles d'être à l'origine des MICI sont d'une part l'apparition d'une inflammation de la muqueuse intestinale et d'autre part, la modification du microbiote intestinale et l'apparition d'une dysbiose. Nous ignorons encore qu'elle est l'élément déclencheur, une dysbiose ou un ou plusieurs déficit(s) au niveau de la CEI ou de la muqueuse intestinale ? Les récentes publications orientent plus l'élément déclencheur vers un (ou plusieurs) défaut(s) au niveau de la muqueuse intestinale qui aboutit à une intolérance du microbiote, l'installation d'une zone inflammatoire et une réponse d'une partie de ce microbiote à ce stress environnemental. Cependant, au vu des résultats prometteurs des traitements par TMF (Transplantation du microbiote

fécal) dont une rémission clinique dans 40% des cas chez les patients atteints de RCH, la compréhension de l'étiologie de la RCH est loin d'être résolue.

L'environnement joue un rôle indéniable dans la survenue des MICI. L'hypothèse que des polluants ou encore des molécules synthétiques chimiques issus de l'industrie alimentaire pourraient avoir un impact sur le microbiote mais également sur nos CEI est confirmée (Burisch et al., 2014; Sakamoto et al., 2005). Certaines molécules synthétiques sont capables de pénétrer nos cellules et agir sur des protéines indispensables au bon fonctionnement cellulaire. Parmi ces protéines, les récepteurs nucléaires peuvent en faire parti et ces molécules pourraient jouer le rôle d'« agoniste inverse » et perturberaient l'activité de ces RN.

Un des plus anciens anti-inflammatoire utilisé dans le traitement des MICI est le 5-ASA. PPAR $\gamma$  est une cible du 5-ASA. Ce traitement reste celui de première intention pour les patients atteints de RCH. Cette molécule ne pénètre pas la barrière intestinale et son action locale limite les effets indésirables sur le reste de l'organisme. Malheureusement, ce n'est pas le cas pour les molécules d'une famille de ligands synthétiques de PPAR $\gamma$ , des thiazolidinediones. Malgré des études combinant le 5-ASA et la rosiglitazone ayant montré une meilleure efficacité contre l'inflammation intestinale en comparaison à un traitement 5-ASA seul, les glitazones peuvent pénétrer la barrière intestinale et provoquer très probablement à long terme les mêmes effets indésirables déjà répertoriés (Liang and Ouyang, 2008). C'est dans ce contexte que les laboratoires de recherche, dont celui du Professeur Philippe Chavatte, tentent de créer de nouvelles molécules pouvant avoir une meilleure efficacité que le 5-ASA, tout gardant l'absence d'effets indésirables systémiques. Le GED-0507-34-levo fait partie de ces molécules. Les premiers résultats montrent une meilleure activité que le 5-ASA avec un franchissement de la barrière intestinale mais qui reste faible pour provoquer des effets indésirables systémiques. Cette molécule est actuellement en phase 2 pour le traitement de la RCH. Le J11-Cl, agoniste synthétique de PPAR $\gamma$ , pourrait être également un possible candidat pour un traitement contre les MICI au vu de ces premiers résultats anti-inflammatoires au niveau intestinal chez la souris.

Selon le contexte cellulaire ou les gènes ciblés, certains agonistes n'agissent pas. Le terme « SPPARMs » (*selective PPAR $\gamma$  modulators*) peut expliquer cet effet

(Higgins and Depaoli, 2010). Pour illustrer ce terme succinctement, la liaison du ligand PPAR $\gamma$  au domaine ligand du récepteur va tout d'abord dépendre de sa structure chimique. Une fois lié au récepteur, il en résulte une modification conformationnelle de PPAR $\gamma$  et une différence d'interaction avec ses cofacteurs et ses corépresseurs. Ces derniers sont, eux-mêmes, de nature et de concentration variables selon le contexte cellulaire. C'est pour cela, que l'action de deux agonistes de PPAR $\gamma$  peut induire une différence transcriptionnelle des gènes cibles dans un même type cellulaire (Pirat et al., 2012). De plus, un même agoniste de PPAR $\gamma$  pourra induire fortement l'expression sur un type cellulaire donné et ne rien induire sur un second type cellulaire. Les SPPARMs peuvent ouvrir d'importantes perspectives thérapeutiques. Le choix de SPPARMs permettrait ainsi d'avoir une meilleure activité mais également une réponse ciblée sur un type cellulaire/un organe voulu, tout en minimisant les effets non désirés sur d'autres parties de l'organisme.

L'intérêt de PPAR $\gamma$  comme cible thérapeutique va bien au-delà d'un traitement contre la RCH. En effet, les agonistes de PPAR $\gamma$  peuvent également avoir un avenir contre d'autres pathologies et en particulier les cancers. En effet, le risque majeur de complication chez les patients atteints de RCH est le développement d'un cancer colorectal. Ce risque est de 2,5% entre 9 et 15 ans et atteint 21,4% au-delà de 15 ans d'évolution (Nowacki et al., 2015). De nombreuses données suggèrent que PPAR $\gamma$  possède des propriétés anti-prolifératives et suppressives de tumeurs (Peters et al., 2012). Cependant, la conséquence d'un défaut d'expression de PPAR $\gamma$  sur cette évolution chez les patients RCH n'est pas clairement établie ou reconnue. Il a été démontré que la survie de patients atteints de cancer colorectal était améliorée si l'expression de PPAR $\gamma$  était détectable au niveau des cellules cancéreuses (Ogino et al., 2009). Dans le même sens, il a été montré qu'une déficience de PPAR $\gamma$  spécifiquement au niveau de l'intestin augmentait le risque de cancérogenèse dans un modèle murin (McAlpine et al., 2006). L'utilisation d'agoniste de PPAR $\gamma$  préviendrait de la survenue de cancer colorectal dans différents essais cliniques (Zhao et al., 2014). Parmi ces agonistes, le 5-ASA (Rousseaux et al., 2005), traitement de première intention pour les patients atteints de RCH, posséderait un effet bénéfique et protecteur sur la survenue du cancer colorectal (O'Connor et al., 2015; Zhao et al., 2014). De plus, le laboratoire a notamment montré, *in vitro* et dans un modèle murin, que l'effet anti-néoplasique du 5-ASA est dépendant de l'activation de

PPAR $\gamma$  (Rousseaux et al., 2013). Très récemment, l'activation de ce récepteur par la pioglitazone en association avec l'imatinib (Glivec<sup>®</sup>) a également permis d'obtenir des résultats spectaculaires sur la rémission de la leucémie myéloïde chronique (Egan, 2015; Prost et al., 2015). Il y a donc un véritable intérêt de comprendre le rôle exact de PPAR $\gamma$  et les perspectives d'avenir de traitement anti-cancéreux.

Un traitement par la TSLP 2 n'est clairement pas envisageable pour un retour à l'homéostasie intestinale. Les MICI sont l'ensemble d'une multitude de dérèglements qui vont aboutir à la perte de la tolérance intestinale. L'étiologie de la RCH n'est pas due uniquement à une diminution d'expression de la TSLP 2. L'inflammation observée dans les zones malades est une résultante de la diminution de la TSLP 2 dans cette zone, mais ce n'est pas l'unique cause. Le projet montre bien que le défaut d'expression de PPAR $\gamma$  dans ces zones inflammatoires peut induire la diminution de certaines cytokines, facteurs responsables de l'homéostasie intestinale. De nombreuses questions restent encore en suspens. Par exemple, le laboratoire a tenté de connaître la raison de la baisse du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . Il a ainsi montré que l'expression du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  est également dépendant d'un autre récepteur nucléaire : LRH-1 (*Liver Receptor Homolog 1*) (Bouguen et al., 2014).

Actuellement, il n'existe aucun traitement commercialisé autour de la TSLP. Il y a cependant de nombreuses études pour rechercher des thérapeutiques. Cependant ces recherches se focalisent sur l'isoforme 1 de la TSLP même si, sur les études, la différence entre les 2 isoformes n'est pas faite. Ils cherchent à empêcher la liaison de la TSLP à son récepteur et ainsi inhiber/ralentir l'apparition d'une réaction inflammatoire exagérée en cas d'asthme. L'étude de Gauveau *et al.* reste la plus intéressante en terme d'avancée thérapeutique. Dans une étude en double aveugle, ils ont montré que l'injection durant 5 à 12 semaines d'un anticorps monoclonal humanisé (AMG 157) dirigé contre la TLSP permet de réduire de façon significative la réponse précoce et tardive de l'asthme par l'induction d'un allergène.

Ce travail de thèse a permis de confirmer le rôle essentiel de PPAR $\gamma$  dans la CEI pour le maintien de l'homéostasie intestinale. Ce travail met en évidence pour la première fois un nouveau gène cible de PPAR $\gamma$  : la TSLP 2. Cette cytokine, mal connue

n'a pas encore de récepteur identifié. La caractérisation de celui-ci permettrait de mieux comprendre son mécanisme d'action. Cependant, elle présente une activité antimicrobienne en plus d'une activité anti-inflammatoire sur les cellules dendritiques.

De plus, les résultats sur les CEI et les muqueuses de patients RCH confortent notre hypothèse. En effet, cette cytokine est significativement diminuée aux niveaux des CEI de patients RCH et cette diminution est corrélée avec la diminution du récepteur PPAR $\gamma$ . Notre hypothèse de travail (un défaut de PPAR $\gamma$  au niveau des CEI, perturbe les capacités de ces cellules à induire un phénotype tolérogène des cellules immunitaires de la muqueuse intestinale) est donc confirmée.

La TSLP 2 va continuer à être étudiée en tant que peptide antimicrobien sur d'autres souches bactériennes ou fongiques du microbiote intestinal et afin d'obtenir son spectre d'action. L'action synergique avec un autre peptide antimicrobien n'a jamais été décrit. Il serait intéressant de tester d'autres peptides comme HBD-1, HBD-2, lysosyme, etc. Ces expériences sont d'ores et déjà envisagés et fera l'objet une publication dans les mois à venir.

Enfin, le screening réalisé au début de ce travail a mis en évidence d'autres gènes dont l'expression varie fortement en l'absence de PPAR $\gamma$ . Parmi les différents gènes, MCP-1 est un candidat intéressant. En effet, son expression est significativement augmentée au niveau des cellules ShPPAR $\gamma$  en comparaison aux cellules Caco-2 ShLuc.



# Bibliographie

- Aagaard, K., Riehle, K., Ma, J., Segata, N., Mistretta, T.-A., Coarfa, C., Raza, S., Rosenbaum, S., Veyver, I.V. den, Milosavljevic, A., et al. (2012). A Metagenomic Approach to Characterization of the Vaginal Microbiome Signature in Pregnancy. *PLoS ONE* 7.
- Abbeele, P.V. den, Belzer, C., Goossens, M., Kleerebezem, M., Vos, W.M.D., Thas, O., Weirdt, R.D., Kerckhof, F.-M., and Wiele, T.V. de (2013). Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME J.* 7, 949.
- Abraham, C., and Cho, J.H. (2009). Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 361, 2066–2078.
- Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 131–144.
- Adachi, M., Kurotani, R., Morimura, K., Shah, Y., Sanford, M., Madison, B.B., Gumucio, D.L., Marin, H.E., Peters, J.M., Young, H.A., et al. (2006). Peroxisome proliferator activated receptor gamma in colonic epithelial cells protects against experimental inflammatory bowel disease. *Gut* 55, 1104–1113.
- Ahn, S.-H., Shah, Y.M., Inoue, J., Morimura, K., Kim, I., Yim, S., Lambert, G., Kurotani, R., Nagashima, K., Gonzalez, F.J., et al. (2008). Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in the intestinal epithelial cells protects against inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 908.
- Akamatsu, T., Watanabe, N., Kido, M., Saga, K., Tanaka, J., Kuzushima, K., Nishio, A., and Chiba, T. (2008). Human TSLP directly enhances expansion of CD8+ T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 154, 98.
- Allakhverdi, Z., Comeau, M.R., Jessup, H.K., Yoon, B.-R.P., Brewer, A., Chartier, S., Paquette, N., Ziegler, S.F., Sarfati, M., and Delespesse, G. (2007). Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J. Exp. Med.* 204, 253–258.
- Al-Shami, A., Spolski, R., Kelly, J., Fry, T., Schwartzberg, P.L., Pandey, A., Mackall, C.L., and Leonard, W.J. (2004). A role for thymic stromal lymphopoietin in CD4(+) T cell development. *J. Exp. Med.* 200, 159–168.
- Amero, S.A., Kretsinger, R.H., Moncrief, N.D., Yamamoto, K.R., and Pearson, W.R. (1992). The origin of nuclear receptor proteins: a single precursor distinct from other transcription factors. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 6, 3–7.
- Ananthakrishnan, A.N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 205–217.
- Aranda, A., and Pascual, A. (2001). Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol. Rev.* 81, 1269–1304.
- Arima, K., Watanabe, N., Hanabuchi, S., Chang, M., Sun, S.-C., and Liu, Y.-J. (2010). Distinct Signal Codes Generate Dendritic Cell Functional Plasticity. *Sci. Signal.* 3, ra4.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling.

- Bioinforma. Oxf. Engl. 22, 195–201.
- Aronica, S.M., Kraus, W.L., and Katzenellenbogen, B.S. (1994). Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8517–8521.
- Artis, D., Wang, M.L., Keilbaugh, S.A., He, W., Brenes, M., Swain, G.P., Knight, P.A., Donaldson, D.D., Lazar, M.A., Miller, H.R.P., et al. (2004). RELMbeta/FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13596–13600.
- Astrakhan, A., Omori, M., Nguyen, T., Becker-Herman, S., Iseki, M., Aye, T., Hudkins, K., Dooley, J., Farr, A., Alpers, C.E., et al. (2007). Local increase in thymic stromal lymphopoietin induces systemic alterations in B cell development. *Nat. Immunol.* 8, 522–531.
- Avershina, E., Storrø, O., Øien, T., Johnsen, R., Pope, P., and Rudi, K. (2014). Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 280–290.
- Baniahmad, A., Leng, X., Burriss, T.P., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1995). The tau 4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required for release of a putative corepressor(s) necessary for transcriptional silencing. *Mol. Cell. Biol.* 15, 76–86.
- Bassaganya-Riera, J., Reynolds, K., Martino-Catt, S., Cui, Y., Hennighausen, L., Gonzalez, F., Rohrer, J., Benninghoff, A.U., and Hontecillas, R. (2004). Activation of PPAR  $\gamma$  and  $\delta$  by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 127, 777–791.
- Bastien, J., and Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328, 1–16.
- Battle, M.A., Konopka, G., Parviz, F., Gaggl, A.L., Yang, C., Sladek, F.M., and Duncan, S.A. (2006). Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8419.
- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R.H., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S.G., et al. (2007). Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J.* 1, 403–418.
- Bäumler, A.J., and Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* 535, 85–93.
- Båvner, A., Sanyal, S., Gustafsson, J.-A., and Treuter, E. (2005). Transcriptional corepression by SHP: molecular mechanisms and physiological consequences. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 16, 478–488.
- Beato, M., Herrlich, P., and Schütz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83, 851–857.
- Ben-Horin, S. (2014). Loss of response to anti-tumor necrosis factors: what is the next step? *Dig. Dis. Basel Switz.* 32, 384–388.
- Berg, J.M. (1989). DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 57, 1065–1068.
- Bernstein, C.N., Rawsthorne, P., Cheang, M., and Blanchard, J.F. (2006). A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 993–1002.
- Berry, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1990). Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent

- agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* 9, 2811–2818.
- Bertin, B., Dubuquoy, L., Colombel, J.-F., and Desreumaux, P. (2013). PPAR-gamma in ulcerative colitis: a novel target for intervention. *Curr. Drug Targets* 14, 1501–1507.
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., and Bakker, B.M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 54, 2325–2340.
- Bevins, C.L., and Salzman, N.H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 356–368.
- Bezirtzoglou, E., Tsiotsias, A., and Welling, G.W. (2011). Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe* 17, 478–482.
- Bhinder, G., Stahl, M., Sham, H.P., Crowley, S.M., Morampudi, V., Dalwadi, U., Ma, C., Jacobson, K., and Vallance, B.A. (2014). Intestinal epithelium-specific MyD88 signaling impacts host susceptibility to infectious colitis by promoting protective goblet cell and antimicrobial responses. *Infect. Immun.* 82, 3753–3763.
- Biagi, E., Nylund, L., Candela, M., Ostan, R., Bucci, L., Pini, E., Nikkila, J., Monti, D., Satokari, R., Franceschi, C., et al. (2010). Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One* 5, e10667.
- Biancheri, P., Di Sabatino, A., Rescigno, M., Giuffrida, P., Fornasa, G., Tsilingiri, K., Pender, S.L.F., Papadia, C., Wood, E., Pasini, A., et al. (2015). Abnormal thymic stromal lymphopoietin expression in the duodenal mucosa of patients with coeliac disease. *Gut*.
- Biedermann, L., Zeitz, J., Mwinyi, J., Sutter-Minder, E., Rehman, A., Ott, S.J., Steurer-Stey, C., Frei, A., Frei, P., Scharl, M., et al. (2013). Smoking cessation induces profound changes in the composition of the intestinal microbiota in humans. *PLoS One* 8, e59260.
- Bik, E.M., Eckburg, P.B., Gill, S.R., Nelson, K.E., Purdom, E.A., Francois, F., Perez-Perez, G., Blaser, M.J., and Relman, D.A. (2006). Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 732–737.
- Bjerkkan, L., Schreurs, O., Engen, S.A., Jahnsen, F.L., Baekkevold, E.S., Blix, I.J., and Schenck, K. (2015). The short form of TSLP is constitutively translated in human keratinocytes and has characteristics of an antimicrobial peptide. *Mucosal Immunol.* 8, 49–56.
- Bjerkkan, L., Sonesson, A., and Schenck, K. (2016). Multiple Functions of the New Cytokine-Based Antimicrobial Peptide Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP). *Pharm. Basel Switz.* 9.
- Blander, J.M., Longman, R.S., Iliev, I.D., Sonnenberg, G.F., and Artis, D. (2017). Regulation of inflammation by microbiota interactions with the host. *Nat. Immunol.* 18, 851–860.
- Bleck, B., Tse, D.B., Gordon, T., Ahsan, M.R., and Reibman, J. (2010). Diesel exhaust particle-treated human bronchial epithelial cells upregulate Jagged-1 and OX40 ligand in myeloid dendritic cells via thymic stromal lymphopoietin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 6636–6645.
- Bledsoe, R.K., Montana, V.G., Stanley, T.B., Delves, C.J., Apolito, C.J., McKee, D.D., Consler, T.G., Parks, D.J., Stewart, E.L., Willson, T.M., et al. (2002). Crystal

- structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 110, 93–105.
- Bogiatzi, S.I., Fernandez, I., Bichet, J.-C., Marloie-Provost, M.-A., Volpe, E., Sastre, X., and Soumelis, V. (2007). Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 3373–3377.
- Boudeau, J., Glasser, A.L., Masseret, E., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (1999). Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* 67, 4499–4509.
- Bouguen, G., Langlois, A., Djouina, M., Branche, J., Koriche, D., Dewaeles, E., Mongy, A., Auwerx, J., Colombel, J.-F., Desreumaux, P., et al. (2014). Intestinal steroidogenesis controls PPAR $\gamma$  expression in the colon and is impaired during UC. *Gut*.
- Bourguet, W., Germain, P., and Gronemeyer, H. (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 381–388.
- Brandl, K., Sun, L., Neppl, C., Siggs, O.M., Le Gall, S.M., Tomisato, W., Li, X., Du, X., Maennel, D.N., Blobel, C.P., et al. (2010). MyD88 signaling in nonhematopoietic cells protects mice against induced colitis by regulating specific EGF receptor ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19967–19972.
- Breitbart, M., Hewson, I., Felts, B., Mahaffy, J.M., Nulton, J., Salamon, P., and Rohwer, F. (2003). Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J. Bacteriol.* 185, 6220–6223.
- Briot, A., Deraison, C., Lacroix, M., Bonnart, C., Robin, A., Besson, C., Dubus, P., and Hovnanian, A. (2009). Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J. Exp. Med.* 206, 1135–1147.
- Broquet, A.H., Hirata, Y., McAllister, C.S., and Kagnoff, M.F. (2011). RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 1618–1626.
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engström, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753–758.
- Bull, A.W., Steffensen, K.R., Leers, J., and Rafter, J.J. (2003). Activation of PPAR gamma in colon tumor cell lines by oxidized metabolites of linoleic acid, endogenous ligands for PPAR gamma. *Carcinogenesis* 24, 1717–1722.
- Bunyavanich, S., Melen, E., Wilk, J.B., Granada, M., Soto-Quiros, M.E., Avila, L., Lasky-Su, J., Hunninghake, G.M., Wickman, M., Pershagen, G., et al. (2011). Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is associated with allergic rhinitis in children with asthma. *Clin. Mol. Allergy CMA* 9, 1.
- Burisch, J., Pedersen, N., Cukovic-Cavka, S., Turk, N., Kaimakliotis, I., Duricova, D., Bortlik, M., Shonová, O., Vind, I., Avnstrøm, S., et al. (2014). Environmental factors in a population-based inception cohort of inflammatory bowel disease patients in Europe--an ECCO-EpiCom study. *J. Crohns Colitis* 8, 607–616.
- Byndloss, M.X., Olsan, E.E., Rivera-Chávez, F., Tiffany, C.R., Cevallos, S.A., Lokken, K.L., Torres, T.P., Byndloss, A.J., Faber, F., Gao, Y., et al. (2017). Microbiota-activated PPAR- $\gamma$  signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science* 357, 570–575.
- Cario, E. (2010). Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later.

- Inflamm. Bowel Dis. 16, 1583–1597.
- Cario, E., Gerken, G., and Podolsky, D.K. (2004). Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology* 127, 224–238.
- Cariou, B., Charbonnel, B., and Staels, B. (2012). Thiazolidinediones and PPAR $\gamma$  agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 23, 205–215.
- Carpino, N., Thierfelder, W.E., Chang, M., Saris, C., Turner, S.J., Ziegler, S.F., and Ihle, J.N. (2004). Absence of an Essential Role for Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor in Murine B-Cell Development. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2584.
- Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 10, 940–954.
- Chang, C., and Lin, H. (2016). Dysbiosis in gastrointestinal disorders. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 30, 3–15.
- Chassin, C., Kocur, M., Pott, J., Duerr, C.U., Gütle, D., Lotz, M., and Hornef, M.W. (2010). miR-146a mediates protective innate immune tolerance in the neonate intestine. *Cell Host Microbe* 8, 358–368.
- Chen, G.Y., and Núñez, G. (2011). Inflammasomes in intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 141, 1986–1999.
- Chen, D., Huang, S.M., and Stallcup, M.R. (2000). Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. *J. Biol. Chem.* 275, 40810–40816.
- Chen, L., Bush, C.R., Necela, B.M., Su, W., Yanagisawa, M., Anastasiadis, P.Z., Fields, A.P., and Thompson, E.A. (2006a). RS5444, a novel PPAR $\gamma$  agonist, regulates aspects of the differentiated phenotype in nontransformed intestinal epithelial cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 251, 17–32.
- Chen, Y., Jimenez, A.R., and Medh, J.D. (2006b). Identification and regulation of novel PPAR-gamma splice variants in human THP-1 macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1759, 32–43.
- Choo, J., Lee, Y., Yan, X.-J., Noh, T.H., Kim, S.J., Son, S., Pothoulakis, C., Moon, H.R., Jung, J.H., and Im, E. (2015). A Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) $\gamma$  Agonist 2-Hydroxyethyl 5-chloro-4,5-didehydrojasmonate Exerts Anti-Inflammatory Effects in Colitis. *J. Biol. Chem.* 290, 25609–25619.
- Choteau, L., Vasseur, F., Lepretre, F., Figeac, M., Gower-Rousseau, C., Dubuquoy, L., Poulain, D., Colombel, J.-F., Sendid, B., and Jawhara, S. (2016). Polymorphisms in the Mannose-Binding Lectin Gene are Associated with Defective Mannose-Binding Lectin Functional Activity in Crohn's Disease Patients. *Sci. Rep.* 6, 29636.
- Claesson, M.J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J.R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., et al. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4586–4591.
- Clark, R.B., Bishop-Bailey, D., Estrada-Hernandez, T., Hla, T., Puddington, L., and Padula, S.J. (2000). The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 164, 1364–1371.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Bandela, A.M., Cardenas, E., Garrity, G.M., and Tiedje, J.M. (2007). The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality

- controlled public data. *Nucleic Acids Res.* 35, D169-172.
- Corrigan, C.J., Jayaratnam, A., Wang, Y., Liu, Y., de Waal Malefyt, R., Meng, Q., Kay, A.B., Phipps, S., Lee, T.H., and Ying, S. (2009). Early production of thymic stromal lymphopoietin precedes infiltration of dendritic cells expressing its receptor in allergen-induced late phase cutaneous responses in atopic subjects. *Allergy* 64, 1014–1022.
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., and Cortot, A. (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 1785–1794.
- Crosnier, C., Stamataki, D., and Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* 7, 349–359.
- Cultrone, A., de Wouters, T., Lakhdari, O., Kelly, D., Mulder, I., Logan, E., Lapaque, N., Doré, J., and Blottière, H.M. (2013). The NF- $\kappa$ B binding site located in the proximal region of the TSLP promoter is critical for TSLP modulation in human intestinal epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* 43, 1053–1062.
- Danese, S., Colombel, J.-F., Peyrin-Biroulet, L., Rutgeerts, P., and Reinisch, W. (2013). Review article: the role of anti-TNF in the management of ulcerative colitis -- past, present and future. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 37, 855–866.
- Danese, S., Grisham, M., Hodge, J., and Telliez, J.-B. (2016). JAK inhibition using tofacitinib for inflammatory bowel disease treatment: a hub for multiple inflammatory cytokines. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 310, G155-162.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115, 1405–1413.
- Dave, M., Higgins, P.D., Middha, S., and Rioux, K.P. (2012). The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 160, 246–257.
- David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A.V., Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., et al. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559.
- De Monte, L., Reni, M., Tassi, E., Clavenna, D., Papa, I., Recalde, H., Braga, M., Di Carlo, V., Doglioni, C., and Protti, M.P. (2011). Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* 208, 469–478.
- DeLong, E.F., and Pace, N.R. (2001). Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst. Biol.* 50, 470–478.
- Demehri, S., Liu, Z., Lee, J., Lin, M.-H., Crosby, S.D., Roberts, C.J., Grigsby, P.W., Miner, J.H., Farr, A.G., and Kopan, R. (2008). Notch-deficient skin induces a lethal systemic B-lymphoproliferative disorder by secreting TSLP, a sentinel for epidermal integrity. *PLoS Biol.* 6, e123.
- Desreumaux, P., Dubuquoy, L., Nutten, S., Peuchmaur, M., Englaro, W., Schoonjans, K., Derijard, B., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P., et al. (2001). Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J. Exp. Med.* 193, 827–838.
- Detera-Wadleigh, S.D., and Fanning, T.G. (1994). Phylogeny of the steroid receptor

- superfamily. *Mol. Phylogenet. Evol.* 3, 192–205.
- Dethlefsen, L., and Relman, D.A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 *Suppl 1*, 4554–4561.
- van Deventer, S.J. (1997). Review article: Chemokine production by intestinal epithelial cells: a therapeutic target in inflammatory bowel disease? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11 *Suppl 3*, 116-120-121.
- Dignass, A., Lynch-Devaney, K., Kindon, H., Thim, L., and Podolsky, D.K. (1994). Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J. Clin. Invest.* 94, 376–383.
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., and Mazmanian, S.K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 20–32.
- Dong, Y., and Wang, A. (2016). Pioglitazone does not increase the risk of type II diabetes in patients with bladder cancer: A retrospective study. *Oncol. Lett.* 12, 89–92.
- Dong, H., Hu, Y., Liu, L., Zou, M., Huang, C., Luo, L., Yu, C., Wan, X., Zhao, H., Chen, J., et al. (2016). Distinct roles of short and long thymic stromal lymphopoietin isoforms in house dust mite-induced asthmatic airway epithelial barrier disruption. *Sci. Rep.* 6, 39559.
- 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., Jansson, E.A., Deeb, S., Rakotobe, S., Karoui, M., Colombel, J.-F., Auwerx, J., Pettersson, S., and Desreumaux, P. (2003). Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124, 1265–1276.
- Dumortier, A., Durham, A.-D., Di Piazza, M., Vauclair, S., Koch, U., Ferrand, G., Ferrero, I., Demehri, S., Song, L.L., Farr, A.G., et al. (2010). Atopic dermatitis-like disease and associated lethal myeloproliferative disorder arise from loss of Notch signaling in the murine skin. *PLoS One* 5, e9258.
- Eastaff-Leung, N., Mabarrack, N., Barbour, A., Cummins, A., and Barry, S. (2010). Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J. Clin. Immunol.* 30, 80–89.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638.
- Egan, J.M. (2015). Targeting Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia with a PPAR-γ Agonist. *N. Engl. J. Med.* 373, 1973–1975.
- Elinav, E., Henao-Mejia, J., and Flavell, R.A. (2013). Integrative inflammasome activity in the regulation of intestinal mucosal immune responses. *Mucosal Immunol.* 6, 4–13.
- Escriva, H., Safi, R., Hänni, C., Langlois, M.C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron, A., Pierce, R., and Laudet, V. (1997). Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6803–6808.
- Escriva, H., Bertrand, S., and Laudet, V. (2004). The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem.* 40, 11–26.
- Eun, C.S., Han, D.S., Lee, S.H., Jeon, Y.C., Sohn, J.H., Kim, Y.S., and Lee, J. (2007). [Probiotics may reduce inflammation by enhancing peroxisome proliferator activated receptor gamma activation in HT-29 cells]. *Korean J. Gastroenterol.*

- Taehan Sohmagi *Hakhoe Chi* 49, 139–146.
- Evans, R.M. (2005). The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 19, 1429–1438.
- Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2014). Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* 157, 255–266.
- Fahlgren, A., Hammarström, S., Danielsson, A., and Hammarström, M.-L. (2003). Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 131, 90–101.
- Fakhfouri, G., Mousavizadeh, K., Mehr, S.E., Dehpour, A.R., Zirak, M.R., Ghia, J.-E., and Rahimian, R. (2015). From Chemotherapy-Induced Emesis to Neuroprotection: Therapeutic Opportunities for 5-HT<sub>3</sub> Receptor Antagonists. *Mol. Neurobiol.* 52, 1670–1679.
- Fatehullah, A., Tan, S.H., and Barker, N. (2016). Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat. Cell Biol.* 18, 246–254.
- Favier, C.F., Vaughan, E.E., De Vos, W.M., and Akkermans, A.D.L. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 219–226.
- Findley, K., Oh, J., Yang, J., Conlan, S., Deming, C., Meyer, J.A., Schoenfeld, D., Nomicos, E., Park, M., NIH Intramural Sequencing Center Comparative Sequencing Program, et al. (2013). Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature* 498, 367–370.
- van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241–260.
- Font de Mora, J., and Brown, M. (2000). AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5041–5047.
- Fornasa, G., Tsilingiri, K., Caprioli, F., Botti, F., Mapelli, M., Meller, S., Kislak, A., Homey, B., Di Sabatino, A., Sonzogni, A., et al. (2015). Dichotomy of short and long thymic stromal lymphopoietin isoforms in inflammatory disorders of the bowel and skin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 413–422.
- Franchimont, D., Vermeire, S., El Housni, H., Pierik, M., Van Steen, K., Gustot, T., Quertinmont, E., Abramowicz, M., Van Gossum, A., Devière, J., et al. (2004). Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 53, 987–992.
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13780–13785.
- Frantz, A.L., Rogier, E.W., Weber, C.R., Shen, L., Cohen, D.A., Fenton, L.A., Bruno, M.E.C., and Kaetzel, C.S. (2012). Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides. *Mucosal Immunol.* 5, 501–512.
- Friend, S.L., Hosier, S., Nelson, A., Foxworthe, D., Williams, D.E., and Farr, A. (1994). A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM<sup>+</sup> B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Exp. Hematol.* 22, 321–328.
- Frolkis, A., Dieleman, L.A., Barkema, H.W., Panaccione, R., Ghosh, S., Fedorak, R.N., Madsen, K., Kaplan, G.G., and Alberta IBD Consortium (2013). Environment



- and the inflammatory bowel diseases. *Can. J. Gastroenterol. J. Can. Gastroenterol.* 27, e18-24.
- Fu, M., Wang, C., Wang, J., Zhang, X., Sakamaki, T., Yeung, Y.G., Chang, C., Hopp, T., Fuqua, S.A.W., Jaffray, E., et al. (2002). Androgen receptor acetylation governs trans activation and MEKK1-induced apoptosis without affecting in vitro sumoylation and trans-repression function. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3373–3388.
- Futamura, K., Orihara, K., Hashimoto, N., Morita, H., Fukuda, S., Sagara, H., Matsumoto, K., Tomita, Y., Saito, H., and Matsuda, A. (2010). beta2-Adrenoceptor agonists enhance cytokine-induced release of thymic stromal lymphopoietin by lung tissue cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 152, 353–361.
- Gallo, R.L., and Hooper, L.V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 503–516.
- Gauvreau, G.M., O’Byrne, P.M., Boulet, L.-P., Wang, Y., Cockcroft, D., Bigler, J., FitzGerald, J.M., Boedigheimer, M., Davis, B.E., Dias, C., et al. (2014). Effects of an anti-TSLP antibody on allergen-induced asthmatic responses. *N. Engl. J. Med.* 370, 2102–2110.
- Gensollen, T., Iyer, S.S., Kasper, D.L., and Blumberg, R.S. (2016). How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* 352, 539–544.
- Germain, P., Iyer, J., Zechel, C., and Gronemeyer, H. (2002). Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. *Nature* 415, 187–192.
- Germain, P., Kammerer, S., Pérez, E., Peluso-Iltis, C., Tortolani, D., Zusi, F.C., Starrett, J., Lapointe, P., Daris, J.-P., Marinier, A., et al. (2004). Rational design of RAR-selective ligands revealed by RARbeta crystal structure. *EMBO Rep.* 5, 877–882.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., and Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* 58, 685–704.
- Gersemann, M., Becker, S., Kübler, I., Koslowski, M., Wang, G., Herrlinger, K.R., Griger, J., Fritz, P., Fellermann, K., Schwab, M., et al. (2009). Differences in goblet cell differentiation between Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Differ. Res. Biol. Divers.* 77, 84–94.
- Gilliet, M., Soumelis, V., Watanabe, N., Hanabuchi, S., Antonenko, S., de Waal-Malefyt, R., and Liu, Y.-J. (2003). Human dendritic cells activated by TSLP and CD40L induce proallergic cytotoxic T cells. *J. Exp. Med.* 197, 1059–1063.
- Glass, C.K., and Ogawa, S. (2006). Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 44–55.
- Gosset, P., Charbonnier, A.S., Delerive, P., Fontaine, J., Staels, B., Pestel, J., Tonnel, A.B., and Trottein, F. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 31, 2857–2865.
- Goto, Y., and Ivanov, I.I. (2013). Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk. *Immunol. Cell Biol.* 91, 204–214.
- Goto, Y., Obata, T., Kunisawa, J., Sato, S., Ivanov, I.I., Lamichhane, A., Takeyama, N., Kamioka, M., Sakamoto, M., Matsuki, T., et al. (2014). Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science* 345, 1254009.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., and Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134–139.
- Greschik, H., and Moras, D. (2003). Structure-activity relationship of nuclear receptor-ligand interactions. *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 1573–1599.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and

- cancer. *Cell* 140, 883–899.
- Gronemeyer, H., Gustafsson, J.-A., and Laudet, V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 950–964.
- Gu, S., Chen, D., Zhang, J.-N., Lv, X., Wang, K., Duan, L.-P., Nie, Y., and Wu, X.-L. (2013). Bacterial Community Mapping of the Mouse Gastrointestinal Tract. *PLoS ONE* 8.
- Guma, M., Stepniak, D., Shaked, H., Spehlmann, M.E., Shenouda, S., Cheroutre, H., Vicente-Suarez, I., Eckmann, L., Kagnoff, M.F., and Karin, M. (2011). Constitutive intestinal NF- $\kappa$ B does not trigger destructive inflammation unless accompanied by MAPK activation. *J. Exp. Med.* 208, 1889–1900.
- Gupta, R.A., Brockman, J.A., Sarraf, P., Willson, T.M., and DuBois, R.N. (2001). Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells. *J. Biol. Chem.* 276, 29681–29687.
- Gurnell, M., Savage, D.B., Chatterjee, V.K.K., and O’Rahilly, S. (2003). The metabolic syndrome: peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its therapeutic modulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2412–2421.
- Haffner, S.M., Greenberg, A.S., Weston, W.M., Chen, H., Williams, K., and Freed, M.I. (2002). Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 106, 679–684.
- Hanski, C., Born, M., Foss, H.D., Marowski, B., Mansmann, U., Arastéh, K., Bachler, B., Papenfuss, M., and Niedobitek, F. (1999). Defective post-transcriptional processing of MUC2 mucin in ulcerative colitis and in Crohn’s disease increases detectability of the MUC2 protein core. *J. Pathol.* 188, 304–311.
- Harada, M., Hirota, T., Jodo, A.I., Doi, S., Kameda, M., Fujita, K., Miyatake, A., Enomoto, T., Noguchi, E., Yoshihara, S., et al. (2009). Functional analysis of the thymic stromal lymphopoietin variants in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 368–374.
- Harada, M., Hirota, T., Jodo, A.I., Hitomi, Y., Sakashita, M., Tsunoda, T., Miyagawa, T., Doi, S., Kameda, M., Fujita, K., et al. (2011). Thymic stromal lymphopoietin gene promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 787–793.
- He, B., Xu, W., Santini, P.A., Polydorides, A.D., Chiu, A., Estrella, J., Shan, M., Chadburn, A., Villanacci, V., Plebani, A., et al. (2007). Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 26, 812–826.
- He, J.-Q., Hallstrand, T.S., Knight, D., Chan-Yeung, M., Sandford, A., Tripp, B., Zamar, D., Bossé, Y., Kozyrskyj, A.L., James, A., et al. (2009). A thymic stromal lymphopoietin gene variant is associated with asthma and airway hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 222–229.
- He, R., Oyoshi, M.K., Garibyan, L., Kumar, L., Ziegler, S.F., and Geha, R.S. (2008). TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11875–11880.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733–736.
- Hener, P., Friedmann, L., Metzger, D., Chambon, P., and Li, M. (2011). Aggravated TSLP-induced atopic dermatitis in mice lacking Dicer in adult skin keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 131, 2324–2327.
- Higgins, L.S., and Depaoli, A.M. (2010). Selective peroxisome proliferator-activated

- receptor gamma (PPARgamma) modulation as a strategy for safer therapeutic PPARgamma activation. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 267S–272S.
- Hihi, A.K., Michalik, L., and Wahli, W. (2002). PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 59, 790–798.
- Hirota, T., Takahashi, A., Kubo, M., Tsunoda, T., Tomita, K., Doi, S., Fujita, K., Miyatake, A., Enomoto, T., Miyagawa, T., et al. (2011). Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nat. Genet.* 43, 893–896.
- Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635–641.
- Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 159–169.
- Hu, X., and Lazar, M.A. (1999). The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 402, 93–96.
- Humphreys, N.E., Xu, D., Hepworth, M.R., Liew, F.Y., and Grencis, R.K. (2008). IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 2443–2449.
- Ikonen, T., Palvimo, J.J., and Jänne, O.A. (1997). Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators. *J. Biol. Chem.* 272, 29821–29828.
- Iliev, I.D., Spadoni, I., Mileti, E., Matteoli, G., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Foschi, D., Caprioli, F., Viale, G., and Rescigno, M. (2009a). Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* 58, 1481–1489.
- Iliev, I.D., Mileti, E., Matteoli, G., Chieppa, M., and Rescigno, M. (2009b). Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunol.* 2, 340–350.
- Improta-Brears, T., Whorton, A.R., Codazzi, F., York, J.D., Meyer, T., and McDonnell, D.P. (1999). Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4686–4691.
- Indra, A.K. (2013). Epidermal TSLP: a trigger factor for pathogenesis of atopic dermatitis. *Expert Rev. Proteomics* 10, 309–311.
- Isaksen, D.E., Baumann, H., Trobridge, P.A., Farr, A.G., Levin, S.D., and Ziegler, S.F. (1999). Requirement for Stat5 in Thymic Stromal Lymphopoietin-Mediated Signal Transduction. *J. Immunol.* 163, 5971–5977.
- Isaksen, D.E., Baumann, H., Zhou, B., Nivollet, S., Farr, A.G., Levin, S.D., and Ziegler, S.F. (2002). Uncoupling of Proliferation and Stat5 Activation in Thymic Stromal Lymphopoietin-Mediated Signal Transduction. *J. Immunol.* 168, 3288–3294.
- Iseki, M., Omori-Miyake, M., Xu, W., Sun, X., Takaki, S., Rawlings, D.J., and Ziegler, S.F. (2012). Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-induced polyclonal B-cell activation and autoimmunity are mediated by CD4+ T cells and IL-4. *Int. Immunol.* 24, 183–195.
- Issemann, I., and Green, S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645–650.
- Ito, T., Wang, Y.-H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G.J., Watanabe, N., Qin, F.X.-F., Yao, Z., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2005). TSLP-activated dendritic cells induce

- an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J. Exp. Med.* *202*, 1213–1223.
- Ito, T., Liu, Y.-J., and Arima, K. (2012). Cellular and molecular mechanisms of TSLP function in human allergic disorders--TSLP programs the “Th2 code” in dendritic cells. *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.* *61*, 35–43.
- Itoh, T., Fairall, L., Amin, K., Inaba, Y., Szanto, A., Balint, B.L., Nagy, L., Yamamoto, K., and Schwabe, J.W.R. (2008). Structural basis for the activation of PPARgamma by oxidized fatty acids. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 924–931.
- Jäger, S., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2013). Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbecks Arch. Surg.* *398*, 1–12.
- Jakobsson, H.E., Jernberg, C., Andersson, A.F., Sjölund-Karlsson, M., Jansson, J.K., and Engstrand, L. (2010). Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PloS One* *5*, e9836.
- Jakobsson, H.E., Abrahamsson, T.R., Jenmalm, M.C., Harris, K., Quince, C., Jernberg, C., Björkstén, B., Engstrand, L., and Andersson, A.F. (2014). Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* *63*, 559–566.
- Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., and Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* *21*, 8787–8803.
- Jensen, E.V. (1962). On the mechanism of estrogen action. *Perspect. Biol. Med.* *6*, 47–59.
- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., and Jansson, J.K. (2007). Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.* *1*, 56–66.
- Jiang, C., Ting, A.T., and Seed, B. (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* *391*, 82–86.
- Jiang, H., Ling, Z., Zhang, Y., Mao, H., Ma, Z., Yin, Y., Wang, W., Tang, W., Tan, Z., Shi, J., et al. (2015). Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain. Behav. Immun.* *48*, 186–194.
- Jin, L., and Li, Y. (2010). Structural and functional insights into nuclear receptor signaling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *62*, 1218–1226.
- Johansen, F.-E., and Kaetzel, C.S. (2011). Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* *4*, 598–602.
- Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 15064–15069.
- Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Pabst, O., Palmqvist, C., Marquez, G., Förster, R., and Agace, W.W. (2005). Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J. Exp. Med.* *202*, 1063–1073.
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Schumm, L.P., Sharma, Y., Anderson, C.A., et al. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* *491*, 119–124.
- Jung, K., Tanaka, A., Fujita, H., Matsuda, A., Oida, K., Karasawa, K., Okamoto, N., Ohmori, K., Jee, Y., Shin, T., et al. (2011). Peroxisome proliferator-activated

- receptor  $\gamma$ -mediated suppression of dendritic cell function prevents the onset of atopic dermatitis in NC/Tnd mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 420–429.e6.
- Kaplan, G.G., and Ng, S.C. (2017). Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 152, 313–321.e2.
- Karayiannakis, A.J., Syrigos, K.N., Efstathiou, J., Valizadeh, A., Noda, M., Playford, R.J., Kmiot, W., and Pignatelli, M. (1998). Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease. *J. Pathol.* 185, 413–418.
- Kashyap, M., Rochman, Y., Spolski, R., Samsel, L., and Leonard, W.J. (2011). Thymic stromal lymphopoietin is produced by dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 1207–1211.
- Kato, A., Favoreto, S., Avila, P.C., and Schleimer, R.P. (2007). TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 1080–1087.
- Katz, J.P., Perreault, N., Goldstein, B.G., Lee, C.S., Labosky, P.A., Yang, V.W., and Kaestner, K.H. (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Dev. Camb. Engl.* 129, 2619–2628.
- Kau, A.L., Planer, J.D., Liu, J., Rao, S., Yatsunenkov, T., Trehan, I., Manary, M.J., Liu, T.-C., Stappenbeck, T.S., Maleta, K.M., et al. (2015). Functional characterization of IgA-targeted bacterial taxa from undernourished Malawian children that produce diet-dependent enteropathy. *Sci. Transl. Med.* 7, 276ra24.
- Khoruts, A., and Sadowsky, M.J. (2016). Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 508–516.
- Kim, Y.S., and Ho, S.B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 319–330.
- Kimura, S., Pawankar, R., Mori, S., Nonaka, M., Masuno, S., Yagi, T., and Okubo, K. (2011). Increased Expression and Role of Thymic Stromal Lymphopoietin in Nasal Polyposis. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 3, 186–193.
- Kinoshita, H., Takai, T., Anh Le, T., Kamijo, S., Ling Wang, X., Ushio, H., Hara, M., Kawasaki, J., Tuan Vu, A., Ogawa, T., et al. (2009). Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 179–186.
- Kitajima, M., Lee, H.-C., Nakayama, T., and Ziegler, S.F. (2011). TSLP enhances the function of helper type 2 cells. *Eur. J. Immunol.* 41, 1862–1871.
- Klein, E.S., Pino, M.E., Johnson, A.T., Davies, P.J., Nagpal, S., Thacher, S.M., Krasinski, G., and Chandraratna, R.A. (1996). Identification and functional separation of retinoic acid receptor neutral antagonists and inverse agonists. *J. Biol. Chem.* 271, 22692–22696.
- 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.
- Klug, A., and Schwabe, J.W. (1995). Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 9, 597–604.
- Koenig, J.E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A.D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L.T., and Ley, R.E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4578–4585.
- Korhonen, P., Heintjes, E.M., Williams, R., Hoti, F., Christopher, S., Majak, M., Kool-

- Houweling, L., Strongman, H., Linder, M., Dolin, P., et al. (2016). Pioglitazone use and risk of bladder cancer in patients with type 2 diabetes: retrospective cohort study using datasets from four European countries. *BMJ* 354, i3903.
- Koufany, M., Moulin, D., Bianchi, A., Muresan, M., Sebillaud, S., Netter, P., Weryha, G., and Jouzeau, J.-Y. (2008). Anti-inflammatory effect of antidiabetic thiazolidinediones prevents bone resorption rather than cartilage changes in experimental polyarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10, R6.
- Kouzarides, T. (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 19, 1176–1179.
- Kumar, R., Wang, R.-A., and Barnes, C.J. (2004). Coregulators and chromatin remodeling in transcriptional control. *Mol. Carcinog.* 41, 221–230.
- Kundu, P., Ling, T.W., Korecka, A., Li, Y., D'Arienzo, R., Bunte, R.M., Berger, T., Arulampalam, V., Chambon, P., Mak, T.W., et al. (2014). Absence of intestinal PPAR $\gamma$  aggravates acute infectious colitis in mice through a lipocalin-2-dependent pathway. *PLoS Pathog.* 10, e1003887.
- Kuroda, Y., Yuki, T., Takahashi, Y., Sakaguchi, H., Matsunaga, K., and Itagaki, H. (2017). Long form of thymic stromal lymphopoietin of keratinocytes is induced by protein allergens. *J. Immunotoxicol.* 14, 178–187.
- Kyriakidi, K.S., Tsianos, V.E., Karvounis, E., Christodoulou, D.K., Katsanos, K.H., and Tsianos, E.V. (2016). Neutrophil anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody proteins: bactericidal increasing protein, lactoferrin, cathepsin, and elastase as serological markers of inflammatory bowel and other diseases. *Ann. Gastroenterol. Q. Publ. Hell. Soc. Gastroenterol.* 29, 258–267.
- Lam, M.C., and Bressler, B. (2014). Vedolizumab for ulcerative colitis and Crohn's disease: results and implications of GEMINI studies. *Immunotherapy* 6, 963–971.
- Landheer, J., Giovannone, B., Sadekova, S., Tjabringa, S., Hofstra, C., Dechering, K., Buijnzeel-Koomen, C., Chang, C., Ying, Y., de Waal Malefyt, R., et al. (2015). TSLP is differentially regulated by vitamin D3 and cytokines in human skin. *Immun. Inflamm. Dis.* 3, 32–43.
- Larson, R.P., Zimmerli, S.C., Comeau, M.R., Itano, A., Omori, M., Iseki, M., Hauser, C., and Ziegler, S.F. (2010). Dibutyl Phthalate (DBP) Induced Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) Is Required for Th2 Contact Hypersensitivity Responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 2974.
- Laszlo, M., Ciobanu, L., Andreica, V., and Pascu, O. (2016). Fecal transplantation indications in ulcerative colitis. Preliminary study. *Clujul Med.* 1957 89, 224–228.
- Laudet, V., and Gronemeyer, H. (2001). *The Nuclear Receptor FactsBook* (Gulf Professional Publishing).
- Laudet, V., Hänni, C., Coll, J., Catzeflis, F., and Stéhelin, D. (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.* 11, 1003–1013.
- Lavelle, A., Lennon, G., O'Sullivan, O., Docherty, N., Balfe, A., Maguire, A., Mulcahy, H.E., Doherty, G., O'Donoghue, D., Hyland, J., et al. (2015). Spatial variation of the colonic microbiota in patients with ulcerative colitis and control volunteers. *Gut* 64, 1553–1561.
- Lavelle, E.C., Murphy, C., O'Neill, L.A.J., and Creagh, E.M. (2010). The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunol.* 3, 17–28.
- Le, T.A., Takai, T., Kinoshita, H., Suto, H., Ikeda, S., Okumura, K., and Ogawa, H. (2009). Inhibition of double-stranded RNA-induced TSLP in human

- keratinocytes by glucocorticoids. *Allergy* 64, 1231–1232.
- Le, T.A., Takai, T., Vu, A.T., Kinoshita, H., Ikeda, S., Ogawa, H., and Okumura, K. (2010). Glucocorticoids inhibit double-stranded RNA-induced thymic stromal lymphopoietin release from keratinocytes in an atopic cytokine milieu more effectively than tacrolimus. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 153, 27–34.
- Le, T.A., Takai, T., Vu, A.T., Kinoshita, H., Chen, X., Ikeda, S., Ogawa, H., and Okumura, K. (2011). Flagellin induces the expression of thymic stromal lymphopoietin in human keratinocytes via toll-like receptor 5. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 155, 31–37.
- LeBlanc, J.G., Milani, C., de Giori, G.S., Sesma, F., van Sinderen, D., and Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 160–168.
- Lee, H.-C., and Ziegler, S.F. (2007). Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 914–919.
- Lee, C.-H., Olson, P., Hevener, A., Mehl, I., Chong, L.-W., Olefsky, J.M., Gonzalez, F.J., Ham, J., Kang, H., Peters, J.M., et al. (2006). PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3444–3449.
- Lee, E.B., Kim, K.W., Hong, J.Y., Jee, H.M., Sohn, M.H., and Kim, K.-E. (2010). Increased serum thymic stromal lymphopoietin in children with atopic dermatitis. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 21, e457-460.
- Lee, H.-C., Headley, M.B., Iseki, M., Ikuta, K., and Ziegler, S.F. (2008). Cutting edge: Inhibition of NF-kappaB-mediated TSLP expression by retinoid X receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 5189–5193.
- Lee, S.K., Kim, H.J., Chi, S.G., Jang, J.Y., Nam, K.D., Kim, N.H., Joo, K.R., Dong, S.H., Kim, B.H., Chang, Y.W., et al. (2005). [*Saccharomyces boulardii* activates expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in HT-29 cells]. *Korean J. Gastroenterol. Taehan Sohwagi Hakhoe Chi* 45, 328–334.
- Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M., and Kliewer, 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.
- Leoni, G., Alam, A., Neumann, P.-A., Lambeth, J.D., Cheng, G., McCoy, J., Hilgarth, R.S., Kundu, K., Murthy, N., Kusters, D., et al. (2013). Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. *J. Clin. Invest.* 123, 443–454.
- Levin, S.D., Koelling, R.M., Friend, S.L., Isaksen, D.E., Ziegler, S.F., Perlmutter, R.M., and Farr, A.G. (1999). Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 677–683.
- Lewis, J.D., Lichtenstein, G.R., Stein, R.B., Deren, J.J., Judge, T.A., Fogt, F., Furth, E.E., Demissie, E.J., Hurd, L.B., Su, C.G., et al. (2001). An open-label trial of the PPAR-gamma ligand rosiglitazone for active ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 3323–3328.
- Lewis, J.D., Lichtenstein, G.R., Deren, J.J., Sands, B.E., Hanauer, S.B., Katz, J.A., Lashner, B., Present, D.H., Chuai, S., Ellenberg, J.H., et al. (2008). Rosiglitazone for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 134, 688–695.

- Ley, R.E., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124, 837–848.
- Li, H., Zhao, H., Yu, J., Su, Y., Cao, S., An, X., and Ren, X. (2011a). Increased prevalence of regulatory T cells in the lung cancer microenvironment: a role of thymic stromal lymphopoietin. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 60, 1587–1596.
- Li, M., Messaddeq, N., Teletin, M., Pasquali, J.-L., Metzger, D., and Chambon, P. (2005). Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14795–14800.
- Li, M., Hener, P., Zhang, Z., Kato, S., Metzger, D., and Chambon, P. (2006). Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11736–11741.
- Li, M., Hener, P., Zhang, Z., Ganti, K.P., Metzger, D., and Chambon, P. (2009). Induction of thymic stromal lymphopoietin expression in keratinocytes is necessary for generating an atopic dermatitis upon application of the active vitamin D3 analogue MC903 on mouse skin. *J. Invest. Dermatol.* 129, 498–502.
- Li, M., Zhang, J., Wu, Y., and Li, J. (2011b). The regulation of thymic stromal lymphopoietin in gut immune homeostasis. *Dig. Dis. Sci.* 56, 2215–2220.
- Li, X.-D., Chiu, Y.-H., Ismail, A.S., Behrendt, C.L., Wight-Carter, M., Hooper, L.V., and Chen, Z.J. (2011c). Mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) monitors commensal bacteria and induces an immune response that prevents experimental colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 17390–17395.
- Li, Y.-L., Li, H.-J., Ji, F., Zhang, X., Wang, R., Hao, J.-Q., Bi, W.-X., and Dong, L. (2010). Thymic stromal lymphopoietin promotes lung inflammation through activation of dendritic cells. *J. Asthma Off. J. Assoc. Care Asthma* 47, 117–123.
- Liang, H.-L., and Ouyang, Q. (2008). A clinical trial of combined use of rosiglitazone and 5-aminosalicylate for ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* 14, 114–119.
- Lin, L., and Zhang, J. (2017). Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunol.* 18, 2.
- Liu, Y.-J. (2006). Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J. Exp. Med.* 203, 269–273.
- Liu, J.Z., van Sommeren, S., Huang, H., Ng, S.C., Alberts, R., Takahashi, A., Ripke, S., Lee, J.C., Jostins, L., Shah, T., et al. (2015). Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat. Genet.* 47, 979–986.
- Lo Kuan, E., and Ziegler, S.F. (2014). Thymic stromal lymphopoietin and cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 4283–4288.
- Lotz, M., Gütle, D., Walther, S., Ménard, S., Bogdan, C., and Hornef, M.W. (2006). Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* 203, 973–984.
- Luciani, A., Vilella, V.R., Vasaturo, A., Giardino, I., Pettoello-Mantovani, M., Guido, S., Cexus, O.N., Peake, N., Londei, M., Quarantino, S., et al. (2010). Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPARgamma downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut* 59, 311–319.
- Mabbott, N.A., Donaldson, D.S., Ohno, H., Williams, I.R., and Mahajan, A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* 6, 666–677.



- Macpherson, A.J., and McCoy, K.D. (2013). Stratification and compartmentalisation of immunoglobulin responses to commensal intestinal microbes. *Semin. Immunol.* 25, 358–363.
- Main, J., McKenzie, H., Yeaman, G.R., Kerr, M.A., Robson, D., Pennington, C.R., and Parratt, D. (1988). Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ* 297, 1105–1106.
- Maizels, R.M., Pearce, E.J., Artis, D., Yazdanbakhsh, M., and Wynn, T.A. (2009). Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *J. Exp. Med.* 206, 2059–2066.
- Mandal, D., and Levine, A.D. (2010). Elevated IL-13R $\alpha$ 2 in intestinal epithelial cells from ulcerative colitis or colorectal cancer initiates MAPK pathway. *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 753–764.
- Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841–850.
- Mangelsdorf, D.J., Ong, E.S., Dyck, J.A., and Evans, R.M. (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345, 224–229.
- Mangin, I., Bonnet, R., Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Sutren, M., Bouhnik, Y., Neut, C., Collins, M.D., Colombel, J.-F., Marteau, P., et al. (2004). Molecular inventory of faecal microflora in patients with Crohn's disease. *FEMS Microbiol. Ecol.* 50, 25–36.
- Mantovani, A., and Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 231–237.
- Mantovani, A., Romero, P., Palucka, A.K., and Marincola, F.M. (2008). Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet Lond. Engl.* 371, 771–783.
- Mao-Qiang, M., Fowler, A.J., Schmuth, M., Lau, P., Chang, S., Brown, B.E., Moser, A.H., Michalik, L., Desvergne, B., Wahli, W., et al. (2004). Peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma activation stimulates keratinocyte differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 123, 305–312.
- Marcobal, A., Barboza, M., Sonnenburg, E.D., Pudlo, N., Martens, E.C., Desai, P., Lebrilla, C.B., Weimer, B.C., Mills, D.A., German, J.B., et al. (2011). Bacteroides in the Infant Gut Consume Milk Oligosaccharides via Mucus-Utilization Pathways. *Cell Host Microbe* 10, 507.
- Marion-Letellier, R., Savoye, G., and Ghosh, S. (2016). IBD: In Food We Trust. *J. Crohns Colitis*.
- Martens, J.H., Barg, H., Warren, M.J., and Jahn, D. (2002). Microbial production of vitamin B12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 275–285.
- Martin Mena, A., Langlois, A., Specia, S., Schneider, L., Desreumaux, P., Dubuquoy, L., and Bertin, B. (2017). The Expression of the Short Isoform of Thymic Stromal Lymphopoietin in the Colon Is Regulated by the Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma and Is Impaired during Ulcerative Colitis. *Front. Immunol.* 8, 1052.
- Mathias, A., Pais, B., Favre, L., Benyacoub, J., and Corthésy, B. (2014). Role of secretory IgA in the mucosal sensing of commensal bacteria. *Gut Microbes* 5, 688.
- Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O., and Kasper, D.L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122, 107–118.
- McAlpine, C.A., Barak, Y., Matise, I., and Cormier, R.T. (2006). Intestinal-specific PPARgamma deficiency enhances tumorigenesis in *ApcMin/+* mice. *Int. J.*

- Cancer J. Int. Cancer 119, 2339–2346.
- McInerney, E.M., and Katzenellenbogen, B.S. (1996). Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation. *J. Biol. Chem.* 271, 24172–24178.
- McKenna, N.J., and O'Malley, B.W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108, 465–474.
- Mège, D., Figueiredo, M.N., Manceau, G., Maggiori, L., Bouhnik, Y., and Paris, Y. (2016). Three-stage Laparoscopic Ileal Pouch-anal Anastomosis Is the Best Approach for High-risk Patients with Inflammatory Bowel Disease: An Analysis of 185 Consecutive Patients. *J. Crohns Colitis*.
- Metzger, D., Losson, R., Bornert, J.M., Lemoine, Y., and Chambon, P. (1992). Promoter specificity of the two transcriptional activation functions of the human oestrogen receptor in yeast. *Nucleic Acids Res.* 20, 2813–2817.
- Meyer-Hoffert, U., Hornef, M.W., Henriques-Normark, B., Axelsson, L.-G., Midtvedt, T., Pütsep, K., and Andersson, M. (2008). Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut* 57, 764–771.
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., and Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* 15, 1292–1300.
- Minot, S., Sinha, R., Chen, J., Li, H., Keilbaugh, S.A., Wu, G.D., Lewis, J.D., and Bushman, F.D. (2011). The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res.* 21, 1616–1625.
- Miyata, M., Hatsushika, K., Ando, T., Shimokawa, N., Ohnuma, Y., Kato, R., Suto, H., Ogawa, H., Masuyama, K., and Nakao, A. (2008). Mast cell regulation of epithelial TSLP expression plays an important role in the development of allergic rhinitis. *Eur. J. Immunol.* 38, 1487–1492.
- Miyoshi, H., and Stappenbeck, T.S. (2013). In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture. *Nat. Protoc.* 8, 2471–2482.
- Mohapatra, S.K., Guri, A.J., Climent, M., Vives, C., Carbo, A., Horne, W.T., Hontecillas, R., and Bassaganya-Riera, J. (2010). Immunoregulatory actions of epithelial cell PPAR gamma at the colonic mucosa of mice with experimental inflammatory bowel disease. *PloS One* 5, e10215.
- Momose, Y., Meguro, K., Ikeda, H., Hatanaka, C., Oi, S., and Sohda, T. (1991). Studies on antidiabetic agents. X. Synthesis and biological activities of pioglitazone and related compounds. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 39, 1440–1445.
- Monsalve, F.A., Pyarasani, R.D., Delgado-Lopez, F., and Moore-Carrasco, R. (2013). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Targets for the Treatment of Metabolic Diseases. *Mediators Inflamm.* 2013.
- Moore, W.E., and Holdeman, L.V. (1974). Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.* 27, 961–979.
- Morrison, D.J., and Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7, 189–200.
- Mou, Z., Xia, J., Tan, Y., Wang, X., Zhang, Y., Zhou, B., Li, H., and Han, D. (2009). Overexpression of thymic stromal lymphopoietin in allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 129, 297–301.
- Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 331–341.
- Mukherjee, S., Zheng, H., Derebe, M.G., Callenberg, K.M., Partch, C.L., Rollins, D., Propheter, D.C., Rizo, J., Grabe, M., Jiang, Q.-X., et al. (2014). Antibacterial

- membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature* 505, 103–107.
- Nagata, Y., Kamijuku, H., Taniguchi, M., Ziegler, S., and Seino, K. (2007). Differential role of thymic stromal lymphopoietin in the induction of airway hyperreactivity and Th2 immune response in antigen-induced asthma with respect to natural killer T cell function. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 144, 305–314.
- Nagy, L., and Schwabe, J.W.R. (2004). Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* 29, 317–324.
- Nair, M.G., Guild, K.J., Du, Y., Zaph, C., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A., Stevens, S., Karow, M., and Artis, D. (2008). Goblet cell-derived resistin-like molecule beta augments CD4+ T cell production of IFN-gamma and infection-induced intestinal inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 4709–4715.
- Nakamura, Y., Miyata, M., Ohba, T., Ando, T., Hatsushika, K., Suenaga, F., Shimokawa, N., Ohnuma, Y., Katoh, R., Ogawa, H., et al. (2008). Cigarette smoke extract induces thymic stromal lymphopoietin expression, leading to TH2-type immune responses and airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 1208–1214.
- Natividad, J.M.M., and Verdu, E.F. (2013). Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol. Res.* 69, 42–51.
- Neish, A.S., Gewirtz, A.T., Zeng, H., Young, A.N., Hobert, M.E., Karmali, V., Rao, A.S., and Madara, J.L. (2000). Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I $\kappa$ B-alpha ubiquitination. *Science* 289, 1560–1563.
- Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., van Loo, G., Danese, S., Huth, M., Nikolaev, A., Neufert, C., Madison, B., et al. (2007). Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 446, 557–561.
- Ng, W.K., Wong, S.H., and Ng, S.C. (2016). Changing epidemiological trends of inflammatory bowel disease in Asia. *Intest. Res.* 14, 111–119.
- Nguyen, K.D., Vanichsarn, C., and Nadeau, K.C. (2010). TSLP directly impairs pulmonary Treg function: association with aberrant tolerogenic immunity in asthmatic airway. *Allergy Asthma Clin. Immunol. Off. J. Can. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 6, 4.
- Ni, J., Wu, G.D., Albenberg, L., and Tomov, V.T. (2017). Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*
- Noble, C.L., Abbas, A.R., Cornelius, J., Lees, C.W., Ho, G.-T., Toy, K., Modrusan, Z., Pal, N., Zhong, F., Chalasani, S., et al. (2008). Regional variation in gene expression in the healthy colon is dysregulated in ulcerative colitis. *Gut* 57, 1398–1405.
- Noti, M., Kim, B.S., Siracusa, M.C., Rak, G.D., Kubo, M., Moghaddam, A.E., Sattentau, Q.A., Comeau, M.R., Spergel, J.M., and Artis, D. (2014). Exposure to food allergens through inflamed skin promotes intestinal food allergy via the TSLP-basophil axis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 1390–1399.e6.
- Nowacki, T.M., Brückner, M., Eveslage, M., Tepasse, P., Pott, F., Thoennissen, N.H., Hengst, K., Ross, M., and Bettenworth, D. (2015). The risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 60, 492–501.
- Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97, 161–163.
- Nuding, S., Fellermann, K., Wehkamp, J., and Stange, E.F. (2007). Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut* 56, 1240–1247.

- Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Goforth, M.H., Morel, C.R., Subramanian, V., Mukundan, L., Red Eagle, A., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A.W., et al. (2007). Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447, 1116–1120.
- Ogino, S., Shima, K., Baba, Y., Noshō, K., Irahara, N., Kure, S., Chen, L., Toyoda, S., Kirkner, G.J., Wang, Y.L., et al. (2009). Colorectal cancer expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG, PPARgamma) is associated with good prognosis. *Gastroenterology* 136, 1242–1250.
- Okumura, R., and Takeda, K. (2016). Maintenance of gut homeostasis by the mucosal immune system. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 92, 423–435.
- Okumura, R., and Takeda, K. (2017). Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp. Mol. Med.* 49, e338.
- Okumura, R., Kurakawa, T., Nakano, T., Kayama, H., Kinoshita, M., Motooka, D., Gotoh, K., Kimura, T., Kamiyama, N., Kusu, T., et al. (2016). Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. *Nature* 532, 117–121.
- Olkhanud, P.B., Rochman, Y., Bodogai, M., Malchinkhuu, E., Wejksza, K., Xu, M., Gress, R.E., Hesdorffer, C., Leonard, W.J., and Biragyn, A. (2011). Thymic stromal lymphopoietin is a key mediator of breast cancer progression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 5656–5662.
- Omori, M., and Ziegler, S. (2007). Induction of IL-4 expression in CD4(+) T cells by thymic stromal lymphopoietin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 1396–1404.
- Ordóñez, F., Lacaille, F., Canioni, D., Talbotec, C., Fournet, J.-C., Cerf-Bensussan, N., Goulet, O., Schmitz, J., and Ruemmele, F.M. (2012). Pediatric ulcerative colitis associated with autoimmune diseases: a distinct form of inflammatory bowel disease? *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 1809–1817.
- Orpha.net (2010). La recto-colite hémorragique.
- Otte, J.-M., Cario, E., and Podolsky, D.K. (2004). Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 126, 1054–1070.
- Ozawa, T., Koyama, K., Ando, T., Ohnuma, Y., Hatsushika, K., Ohba, T., Sugiyama, H., Hamada, Y., Ogawa, H., Okumura, K., et al. (2007). Thymic stromal lymphopoietin secretion of synovial fibroblasts is positively and negatively regulated by Toll-like receptors/nuclear factor-kappaB pathway and interferon-gamma/dexamethasone. *Mod. Rheumatol.* 17, 459–463.
- O'Connor, A., Packey, C.D., Akbari, M., and Moss, A.C. (2015). Mesalamine, but Not Sulfasalazine, Reduces the Risk of Colorectal Neoplasia in Patients with Inflammatory Bowel Disease: An Agent-specific Systematic Review and Meta-analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 2562–2569.
- Padilla, J., Leung, E., and Phipps, R.P. (2002). Human B lymphocytes and B lymphomas express PPAR-gamma and are killed by PPAR-gamma agonists. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 103, 22–33.
- Palau-Rodríguez, M., Tulipani, S., Queipo-Ortuño, M.I., Urpi-Sarda, M., Tinahones, F.J., and Andres-Lacueva, C. (2015). Metabolomic insights into the intricate gut microbial–host interaction in the development of obesity and type 2 diabetes. *Front. Microbiol.* 6.
- Pandey, A., Ozaki, K., Baumann, H., Levin, S.D., Puel, A., Farr, A.G., Ziegler, S.F., Leonard, W.J., and Lodish, H.F. (2000). Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. *Nat. Immunol.* 1, 59–64.
- Pascual, G., and Glass, C.K. (2006). Nuclear receptors versus inflammation:

- mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 17, 321–327.
- Pedersen, G., and Brynskov, J. (2010). Topical rosiglitazone treatment improves ulcerative colitis by restoring peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 1595–1603.
- Pedroza-Gonzalez, A., Xu, K., Wu, T.-C., Aspord, C., Tindle, S., Marches, F., Gallegos, M., Burton, E.C., Savino, D., Hori, T., et al. (2011). Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation. *J. Exp. Med.* 208, 479–490.
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F.F., Snijders, B., Kummeling, I., van den Brandt, P.A., and Stobberingh, E.E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118, 511–521.
- Perissi, V., and Rosenfeld, M.G. (2005). Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 542–554.
- Perrin, A.-E., Dallongeville, J., Ducimetière, P., Ruidavets, J.-B., Schlienger, J.-L., Arveiler, D., and Simon, C. (2005). Interactions between traditional regional determinants and socio-economic status on dietary patterns in a sample of French men. *Br. J. Nutr.* 93, 109–114.
- Peters, J.M., Shah, Y.M., and Gonzalez, F.J. (2012). The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat. Rev. Cancer* 12, 181–195.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786.
- Peterson, L.W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 141–153.
- Peyrin-Biroulet, L., Beisner, J., Wang, G., Nuding, S., Oommen, S.T., Kelly, D., Parmentier-Decrucq, E., Dessein, R., Merour, E., Chavatte, P., et al. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8772–8777.
- Pham, T.A.N., Clare, S., Goulding, D., Arasteh, J.M., Stares, M.D., Browne, H.P., Keane, J.A., Page, A.J., Kumazaka, N., Kane, L., et al. (2014). Epithelial IL-22RA1-mediated fucosylation promotes intestinal colonization resistance to an opportunistic pathogen. *Cell Host Microbe* 16, 504–516.
- Pickard, J.M., Maurice, C.F., Kinnebrew, M.A., Abt, M.C., Schenten, D., Golovkina, T.V., Bogatyrev, S.R., Ismagilov, R.F., Pamer, E.G., Turnbaugh, P.J., et al. (2014). Rapid fucosylation of intestinal epithelium sustains host-commensal symbiosis in sickness. *Nature* 514, 638–641.
- Pierik, M., Joossens, S., Van Steen, K., Van Schuerbeek, N., Vlietinck, R., Rutgeerts, P., and Vermeire, S. (2006). Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 12, 1–8.
- Pigneur, B., and Sokol, H. (2016). Fecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease: the quest for the holy grail. *Mucosal Immunol.*
- Pineton de Chambrun, G., Peyrin-Biroulet, L., Lémann, M., and Colombel, J.-F. (2010). Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 15–29.
- Pirat, C., Farce, A., Lebègue, N., Renault, N., Furman, C., Millet, R., Yous, S., Specq, S., Berthelot, P., Desreumaux, P., et al. (2012). Targeting peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): development of modulators. *J. Med.*

- Chem. 55, 4027–4061.
- Podolsky, D.K., Gerken, G., Eysing, A., and Cario, E. (2009). Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency. *Gastroenterology* 137, 209–220.
- Prost, S., Relouzat, F., Spentchian, M., Ouzegdouh, Y., Saliba, J., Massonnet, G., Beressi, J.-P., Verhoeyen, E., Raggueneau, V., Maneglier, B., et al. (2015). Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR $\gamma$  agonists. *Nature* 525, 380–383.
- Quentmeier, H., Drexler, H.G., Fleckenstein, D., Zaborski, M., Armstrong, A., Sims, J.E., and Lyman, S.D. (2001). Cloning of human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and signaling mechanisms leading to proliferation. *Leukemia* 15, 1286–1292.
- Rahimian, R., Zirak, M.R., Keshavarz, M., Fakhraei, N., Mohammadi-Farani, A., Hamdi, H., and Mousavizadeh, K. (2016). Involvement of PPAR $\gamma$  in the protective action of tropisetron in an experimental model of ulcerative colitis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1–9.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229–241.
- Ramon, S., Bancos, S., Thatcher, T.H., Murant, T.I., Moshkani, S., Sahler, J.M., Bottaro, A., Sime, P.J., and Phipps, R.P. (2012). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  B cell-specific-deficient mice have an impaired antibody response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 189, 4740–4747.
- Rastinejad, F. (2001). Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 33–38.
- Reche, P.A., Soumelis, V., Gorman, D.M., Clifford, T., Liu Mr, null, Travis, M., Zurawski, S.M., Johnston, J., Liu, Y.J., Spits, H., et al. (2001). Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 336–343.
- Redhu, N.S., Saleh, A., Halayko, A.J., Ali, A.S., and Gounni, A.S. (2011). Essential role of NF- $\kappa$ B and AP-1 transcription factors in TNF- $\alpha$ -induced TSLP expression in human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 300, L479-485.
- Ren, H., Musch, M.W., Kojima, K., Boone, D., Ma, A., and Chang, E.B. (2001). Short-chain fatty acids induce intestinal epithelial heat shock protein 25 expression in rats and IEC 18 cells. *Gastroenterology* 121, 631–639.
- Reyes, A., Haynes, M., Hanson, N., Angly, F.E., Heath, A.C., Rohwer, F., and Gordon, J.I. (2010). Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 466, 334–338.
- Ricote, M., and Glass, C.K. (2007). PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 926–935.
- Ricote, M., Huang, J., Fajas, L., Li, A., Welch, J., Najib, J., Witztum, J.L., Auwerx, J., Palinski, W., and Glass, C.K. (1998a). Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7614–7619.
- Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., and Glass, C.K. (1998b). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79–82.
- Rimoldi, M., Chiappa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M.,

- Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005a). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat. Immunol.* *6*, 507–514.
- Rimoldi, M., Chieppa, M., Larghi, P., Vulcano, M., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005b). Monocyte-derived dendritic cells activated by bacteria or by bacteria-stimulated epithelial cells are functionally different. *Blood* *106*, 2818–2826.
- Roan, F., Bell, B.D., Stoklasek, T.A., Kitajima, M., Han, H., and Ziegler, S.F. (2012). The multiple facets of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) during allergic inflammation and beyond. *J. Leukoc. Biol.* *91*, 877–886.
- Rochman, Y., and Leonard, W.J. (2008). The Role of Thymic Stromal Lymphopoietin in CD8+ T cell Homeostasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 7699.
- Rochman, I., Watanabe, N., Arima, K., Liu, Y.-J., and Leonard, W.J. (2007). Cutting edge: direct action of thymic stromal lymphopoietin on activated human CD4+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 6720–6724.
- Rochman, Y., Kashyap, M., Robinson, G.W., Sakamoto, K., Gomez-Rodriguez, J., Wagner, K.-U., and Leonard, W.J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 19455–19460.
- Rodríguez, J.M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R.P., Kober, O.I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M.C., et al. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb. Ecol. Health Dis.* *26*.
- Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 327–335.
- Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., et al. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* *66*, 2541–2547.
- Rothenberg, M.E., Spergel, J.M., Sherrill, J.D., Annaiah, K., Martin, L.J., Cianferoni, A., Guber, L., Kim, C., Glessner, J., Frackelton, E., et al. (2010). Common variants at 5q22 associate with pediatric eosinophilic esophagitis. *Nat. Genet.* *42*, 289–291.
- Rousseaux, C., Lefebvre, B., Dubuquoy, L., Lefebvre, P., Romano, O., Auwerx, J., Metzger, D., Wahli, W., Desvergne, B., Naccari, G.C., et al. (2005). Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J. Exp. Med.* *201*, 1205–1215.
- Rousseaux, C., Dubuquoy, C., El-Jamal, N., Specca, S., Bellinva, S., Viti, F., Colombel, J.-F., Chavatte, P., and Desreumaux, P. (2011). Preclinical Evaluation of Intestinal Anti-Inflammatory/Analgesic Properties and Phase I Clinical Trial of a New PPAR Agonist Ged-0507-34-Levo. *Gastroenterology* *140*, S-515.
- Rousseaux, C., El-Jamal, N., Fumery, M., Dubuquoy, C., Romano, O., Chatelain, D., Langlois, A., Bertin, B., Buob, D., Colombel, J.F., et al. (2013). The 5-aminosalicylic acid antineoplastic effect in the intestine is mediated by PPARγ. *Carcinogenesis* *34*, 2580–2586.
- Rowan, B.G., Weigel, N.L., and O'Malley, B.W. (2000). Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* *275*, 4475–4483.

- Ruan, X., Zheng, F., and Guan, Y. (2008). PPARs and the kidney in metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 294, F1032–F1047.
- Sablin, E.P., Krylova, I.N., Fletterick, R.J., and Ingraham, H.A. (2003). Structural basis for ligand-independent activation of the orphan nuclear receptor LXR-1. *Mol. Cell* 11, 1575–1585.
- Sakamoto, N., Kono, S., Wakai, K., Fukuda, Y., Satomi, M., Shimoyama, T., Inaba, Y., Miyake, Y., Sasaki, S., Okamoto, K., et al. (2005). Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm. Bowel Dis.* 11, 154–163.
- Salminen, S., Gibson, G.R., McCartney, A.L., and Isolauri, E. (2004). Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut* 53, 1388.
- Sandborn, W.J., Ghosh, S., Panes, J., Vranic, I., Su, C., Rousell, S., Niezychowski, W., and Study A3921063 Investigators (2012). Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* 367, 616–624.
- Sandborn, W.J., Su, C., and Panes, J. (2017). Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* 377, 496–497.
- Sartor, R.B. (2008). Therapeutic correction of bacterial dysbiosis discovered by molecular techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16413–16414.
- Scaldaferri, F., Pecere, S., Petito, V., Zambrano, D., Fiore, L., Lopetuso, L.R., Schiavoni, E., Bruno, G., Gerardi, V., Laterza, L., et al. (2016). Efficacy and Mechanisms of Action of Fecal Microbiota Transplantation in Ulcerative Colitis: Pitfalls and Promises From a First Meta-Analysis. *Transplant. Proc.* 48, 402–407.
- Schauber, J., Rieger, D., Weiler, F., Wehkamp, J., Eck, M., Fellermann, K., Scheppach, W., Gallo, R.L., and Stange, E.F. (2006). Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 615–621.
- Schmehl, K., Florian, S., Jacobasch, G., Salomon, A., and Körber, J. (2000). Deficiency of epithelial basement membrane laminin in ulcerative colitis affected human colonic mucosa. *Int. J. Colorectal Dis.* 15, 39–48.
- Schmid, M., Fellermann, K., Fritz, P., Wiedow, O., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2007). Attenuated induction of epithelial and leukocyte serine antiproteases elafin and secretory leukocyte protease inhibitor in Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* 81, 907–915.
- Schoch, G.A., D'Arcy, B., Stihle, M., Burger, D., Bär, D., Benz, J., Thoma, R., and Ruf, A. (2010). Molecular switch in the glucocorticoid receptor: active and passive antagonist conformations. *J. Mol. Biol.* 395, 568–577.
- Schroeder, B.O., and Bäckhed, F. (2016). Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat. Med.* 22, 1079–1089.
- Seksik, P., and Landman, C. (2015). Understanding Microbiome Data: A Primer for Clinicians. *Dig. Dis. Basel Switz.* 33 Suppl 1, 11–16.
- Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., and Doré, J. (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52, 237–242.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 14, e1002533.
- Seshasayee, D., Lee, W.P., Zhou, M., Shu, J., Suto, E., Zhang, J., Diehl, L., Austin, C.D., Meng, Y.G., Tan, M., et al. (2007). In vivo blockade of OX40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation. *J. Clin. Invest.* 117,



3868.

- Shaffer, P.L., and Gewirth, D.T. (2002). Structural basis of VDR-DNA interactions on direct repeat response elements. *EMBO J.* 21, 2242–2252.
- Shale, M., and Ghosh, S. (2009). How intestinal epithelial cells tolerate dendritic cells and its relevance to inflammatory bowel disease. *Gut* 58, 1291–1299.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A., and Brown, M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103, 843–852.
- Shearer, B.G., and Billin, A.N. (2007). The next generation of PPAR drugs: do we have the tools to find them? *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 1082–1093.
- Sherrill, J.D., Gao, P.-S., Stucke, E.M., Blanchard, C., Collins, M.H., Putnam, P.E., Franciosi, J.P., Kushner, J.P., Abonia, J.P., Assa'ad, A.H., et al. (2010). Variants of thymic stromal lymphopoietin and its receptor associate with eosinophilic esophagitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 160–165.e3.
- Shi, L., Leu, S.-W., Xu, F., Zhou, X., Yin, H., Cai, L., and Zhang, L. (2008). Local blockade of TSLP receptor alleviated allergic disease by regulating airway dendritic cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 129, 202–210.
- Shi, Y., Dong, Y., Huang, W., Zhu, D., Mao, H., and Su, P. (2016). Fecal Microbiota Transplantation for Ulcerative Colitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One* 11, e0157259.
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., and Greene, G.L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927–937.
- Shiojiri, T., Wada, K., Nakajima, A., Katayama, K., Shibuya, A., Kudo, C., Kadowaki, T., Mayumi, T., Yura, Y., and Kamisaki, Y. (2002). PPAR gamma ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice. *Eur. J. Pharmacol.* 448, 231–238.
- Sibartie, S., O'Hara, A.M., Ryan, J., Fanning, A., O'Mahony, J., O'Neill, S., Sheil, B., O'Mahony, L., and Shanahan, F. (2009). Modulation of pathogen-induced CCL20 secretion from HT-29 human intestinal epithelial cells by commensal bacteria. *BMC Immunol.* 10, 54.
- Simental, J.A., Sar, M., Lane, M.V., French, F.S., and Wilson, E.M. (1991). Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 510–518.
- Siracusa, M.C., Saenz, S.A., Wojno, E.D.T., Kim, B.S., Osborne, L.C., Ziegler, C.G., Benitez, A.J., Ruyman, K.R., Farber, D.L., Sleiman, P.M., et al. (2013). Thymic stromal lymphopoietin-mediated extramedullary hematopoiesis promotes allergic inflammation. *Immunity* 39, 1158–1170.
- Sladek, F.M. (2003). Nuclear receptors as drug targets: new developments in coregulators, orphan receptors and major therapeutic areas. *Expert Opin. Ther. Targets* 7, 679–684.
- Sladek, F.M. (2011). What are Nuclear Receptor Ligands? *Mol. Cell. Endocrinol.* 334, 3–13.
- Smelter, D.F., Sathish, V., Thompson, M.A., Pabelick, C.M., Vassallo, R., and Prakash, Y.S. (2010). Thymic stromal lymphopoietin in cigarette smoke-exposed human airway smooth muscle. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 3035–3040.
- Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (2004). Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr. Rev.* 25, 45–71.
- Smith, E.J., Thompson, A.P., O'Driscoll, A., and Clarke, D.J. (2013). Pathogenesis of adherent-invasive *Escherichia coli*. *Future Microbiol.* 8, 1289–1300.

- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H.-P., Jegou, S., Landman, C., Cohen, D., Liguori, G., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., et al. (2017). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 66, 1039–1048.
- Sonesson, A., Kasetty, G., Olin, A.I., Malmsten, M., Mörgelin, M., Sørensen, O.E., and Schmidtchen, A. (2011). Thymic stromal lymphopoietin exerts antimicrobial activities. *Exp. Dermatol.* 20, 1004–1010.
- Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., et al. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol.* 3, 673–680.
- Spadoni, I., Iliev, I.D., Rossi, G., and Rescigno, M. (2012). Dendritic cells produce TSLP that limits the differentiation of Th17 cells, fosters Treg development, and protects against colitis. *Mucosal Immunol.* 5, 184–193.
- Staels, B., Dallongeville, J., Auwerx, J., Schoonjans, K., Leitersdorf, E., and Fruchart, J.C. (1998). Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 98, 2088–2093.
- Su, W., Bush, C.R., Necela, B.M., Calcagno, S.R., Murray, N.R., Fields, A.P., and Thompson, E.A. (2007). Differential expression, distribution, and function of PPAR-gamma in the proximal and distal colon. *Physiol. Genomics* 30, 342–353.
- Sun, C.-M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* 204, 1775–1785.
- Surjit, M., Ganti, K.P., Mukherji, A., Ye, T., Hua, G., Metzger, D., Li, M., and Chambon, P. (2011). Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell* 145, 224–241.
- Swanson, P.A., Kumar, A., Samarin, S., Vijay-Kumar, M., Kundu, K., Murthy, N., Hansen, J., Nusrat, A., and Neish, A.S. (2011). Enteric commensal bacteria potentiate epithelial restitution via reactive oxygen species-mediated inactivation of focal adhesion kinase phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 8803–8808.
- Sziksz, E., Molnár, K., Lippai, R., Pap, D., Onody, A., Veres-Székely, A., Vörös, P., Szabó, D., Györffy, H., Veres, G., et al. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and thymic stromal lymphopoietin are involved in the pathophysiology of childhood coeliac disease. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.*
- Takai, T. (2012). TSLP expression: cellular sources, triggers, and regulatory mechanisms. *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.* 61, 3–17.
- Tanaka, J., Saga, K., Kido, M., Nishiura, H., Akamatsu, T., Chiba, T., and Watanabe, N. (2010). Proinflammatory Th2 cytokines induce production of thymic stromal lymphopoietin in human colonic epithelial cells. *Dig. Dis. Sci.* 55, 1896–1904.
- Taupin, D.R., Kinoshita, K., and Podolsky, D.K. (2000). Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 799–804.
- Taylor, B.C., Zaph, C., Troy, A.E., Du, Y., Guild, K.J., Comeau, M.R., and Artis, D. (2009). TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J. Exp. Med.* 206, 655–667.
- Thornton, J.W., and DeSalle, R. (2000). A new method to localize and test the significance of incongruence: detecting domain shuffling in the nuclear receptor superfamily. *Syst. Biol.* 49, 183–201.
- To, N., Ford, A.C., and Gracie, D.J. (2016). Systematic review with meta-analysis: the effect of tobacco smoking on the natural history of ulcerative colitis. *Aliment.*

- Pharmacol. Ther. *44*, 117–126.
- Tontonoz, P., and Spiegelman, B.M. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem.* *77*, 289–312.
- Torgerson, D.G., Ampleford, E.J., Chiu, G.Y., Gauderman, W.J., Gignoux, C.R., Graves, P.E., Himes, B.E., Levin, A.M., Mathias, R.A., Hancock, D.B., et al. (2011). Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nat. Genet.* *43*, 887–892.
- Tsilingiri, K., Fornasa, G., and Rescigno, M. (2017). Thymic Stromal Lymphopoietin: To Cut a Long Story Short. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* *3*, 174–182.
- Tyakht, A.V., Kostryukova, E.S., Popenko, A.S., Belenikin, M.S., Pavlenko, A.V., Larin, A.K., Karpova, I.Y., Selezneva, O.V., Semashko, T.A., Ospanova, E.A., et al. (2013). Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat. Commun.* *4*, 2469.
- Tytgat, K.M., van der Wal, J.W., Einerhand, A.W., Büller, H.A., and Dekker, J. (1996). Quantitative analysis of MUC2 synthesis in ulcerative colitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *224*, 397–405.
- UK IBD Genetics Consortium, Barrett, J.C., Lee, J.C., Lees, C.W., Prescott, N.J., Anderson, C.A., Phillips, A., Wesley, E., Parnell, K., Zhang, H., et al. (2009). Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat. Genet.* *41*, 1330–1334.
- Umesono, K., and Evans, R.M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* *57*, 1139–1146.
- Underhill, D.M., and Iliev, I.D. (2014). The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 405–416.
- Ungar, B., and Kopylov, U. (2016). Advances in the development of new biologics in inflammatory bowel disease. *Ann. Gastroenterol. Q. Publ. Hell. Soc. Gastroenterol.* *29*, 243–248.
- Ungar, B., Chowers, Y., Yavzori, M., Picard, O., Fudim, E., Har-Noy, O., Kopylov, U., Eliakim, R., Ben-Horin, S., and ABIRISK consortium (2014). The temporal evolution of antidrug antibodies in patients with inflammatory bowel disease treated with infliximab. *Gut* *63*, 1258–1264.
- Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P.B., Peyrin-Biroulet, L., and Colombel, J.-F. (2017). Ulcerative colitis. *The Lancet* *389*, 1756–1770.
- Usuda, D., and Kanda, T. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors for hypertension. *World J. Cardiol.* *6*, 744–754.
- Van der Sluis, M., De Koning, B.A.E., De Bruijn, A.C.J.M., Velcich, A., Meijerink, J.P.P., Van Goudoever, J.B., Büller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B., et al. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* *131*, 117–129.
- VanDussen, K.L., Marinshaw, J.M., Shaikh, N., Miyoshi, H., Moon, C., Tarr, P.I., Ciorba, M.A., and Stappenbeck, T.S. (2015). Development of an enhanced human gastrointestinal epithelial culture system to facilitate patient-based assays. *Gut* *64*, 911–920.
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K., and Augenlicht, L. (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* *295*, 1726–1729.
- Vereecke, L., Sze, M., Mc Guire, C., Rogiers, B., Chu, Y., Schmidt-Supprian, M., Pasparakis, M., Beyaert, R., and van Loo, G. (2010). Enterocyte-specific A20 deficiency sensitizes to tumor necrosis factor-induced toxicity and experimental colitis. *J. Exp. Med.* *207*, 1513–1523.

- Vlantis, K., Wullaert, A., Sasaki, Y., Schmidt-Supprian, M., Rajewsky, K., Roskams, T., and Pasparakis, M. (2011). Constitutive IKK2 activation in intestinal epithelial cells induces intestinal tumors in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 2781–2793.
- Vo, N., and Goodman, R.H. (2001). CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 276, 13505–13508.
- Voltan, S., Martines, D., Elli, M., Brun, P., Longo, S., Porzionato, A., Macchi, V., D’Incà, R., Scarpa, M., Palù, G., et al. (2008). Lactobacillus crispatus M247-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acts as a signal transducing molecule activating peroxisome proliferator activated receptor-gamma in the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 135, 1216–1227.
- Vu, A.T., Baba, T., Chen, X., Le, T.A., Kinoshita, H., Xie, Y., Kamijo, S., Hiramatsu, K., Ikeda, S., Ogawa, H., et al. (2010). Staphylococcus aureus membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in keratinocytes through the Toll-like receptor 2–Toll-like receptor 6 pathway. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 985–993.e3.
- Wächtershäuser, A., Loitsch, S.M., and Stein, J. (2000). PPAR-gamma is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 380–385.
- Wagner, C.E., Jurutka, P.W., Marshall, P.A., and Heck, M.C. (2017). Retinoid X Receptor Selective Agonists and their Synthetic Methods. *Curr. Top. Med. Chem.* 17, 742–767.
- Wagner, J., Maksimovic, J., Farries, G., Sim, W.H., Bishop, R.F., Cameron, D.J., Catto-Smith, A.G., and Kirkwood, C.D. (2013). Bacteriophages in gut samples from pediatric Crohn’s disease patients: metagenomic analysis using 454 pyrosequencing. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 1598–1608.
- Wang, A.C., Dai, X., Luu, B., and Conrad, D.J. (2001a). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates airway epithelial cell activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24, 688–693.
- Wang, C., Fu, M., Angeletti, R.H., Siconolfi-Baez, L., Reutens, A.T., Albanese, C., Lisanti, M.P., Katzenellenbogen, B.S., Kato, S., Hopp, T., et al. (2001b). Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J. Biol. Chem.* 276, 18375–18383.
- Wang, Q., Du, J., Zhu, J., Yang, X., and Zhou, B. (2014). Thymic stromal lymphopoietin signaling in CD4(+) T cells is required for TH2 memory. *J. Allergy Clin. Immunol.*
- Watanabe, N., Hanabuchi, S., Soumelis, V., Yuan, W., Ho, S., de Waal Malefyt, R., and Liu, Y.-J. (2004). Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat. Immunol.* 5, 426–434.
- Watanabe, N., Wang, Y.-H., Lee, H.K., Ito, T., Wang, Y.-H., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2005). Hassall’s corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436, 1181–1185.
- Watson, B., and Gauvreau, G.M. (2014). Thymic stromal lymphopoietin: a central regulator of allergic asthma. *Expert Opin. Ther. Targets* 18, 771–785.
- Webb, P., Nguyen, P., Shinsako, J., Anderson, C., Feng, W., Nguyen, M.P., Chen, D., Huang, S.M., Subramanian, S., McKinerney, E., et al. (1998). Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 12, 1605–1618.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Mueller, O., Herrlinger, K.R., Fellermann, K., Schroeder, J.M., and Stange, E.F. (2003). Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 9, 215–223.

- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., et al. (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53, 1658–1664.
- Wehkamp, J., Schmid, M., and Stange, E.F. (2007). Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23, 370–378.
- Welch, J.S., Ricote, M., Akiyama, T.E., Gonzalez, F.J., and Glass, C.K. (2003). PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6712–6717.
- Wlodarska, M., Thaïss, C.A., Nowarski, R., Henao-Mejia, J., Zhang, J.-P., Brown, E.M., Frankel, G., Levy, M., Katz, M.N., Philbrick, W.M., et al. (2014). NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell* 156, 1045–1059.
- Wohlmann, A., Sebastian, K., Borowski, A., Krause, S., and Friedrich, K. (2010). Signal transduction by the atopy-associated human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor depends on Janus kinase function. *Biol. Chem.* 391, 181–186.
- Wong, C.K., Hu, S., Cheung, P.F.Y., and Lam, C.W.K. (2010). Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and prosurvival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 43, 305–315.
- Xiao, H., Gulen, M.F., Qin, J., Yao, J., Bulek, K., Kish, D., Altuntas, C.Z., Wald, D., Ma, C., Zhou, H., et al. (2007). The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. *Immunity* 26, 461–475.
- Xie, Y., Takai, T., Chen, X., Okumura, K., and Ogawa, H. (2012a). Long TSLP transcript expression and release of TSLP induced by TLR ligands and cytokines in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 66, 233–237.
- Xie, Y., Takai, T., Chen, X., Okumura, K., and Ogawa, H. (2012b). Long TSLP transcript expression and release of TSLP induced by TLR ligands and cytokines in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 66, 233–237.
- Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Parks, D.J., Blanchard, S.G., Brown, P.J., Sternbach, D.D., Lehmann, J.M., Wisely, G.B., Willson, T.M., et al. (1999). Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol. Cell* 3, 397–403.
- Xu, W., He, B., Chiu, A., Chadburn, A., Shan, M., Buldys, M., Ding, A., Knowles, D.M., Santini, P.A., and Cerutti, A. (2007). Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat. Immunol.* 8, 294–303.
- Yang, Q., Bermingham, N.A., Finegold, M.J., and Zoghbi, H.Y. (2001). Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 294, 2155–2158.
- Yen, P.M. (2001). Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiol. Rev.* 81, 1097–1142.
- Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Mallett, K., Cousins, D., Robinson, D., Zhang, G., Zhao, J., Lee, T.H., et al. (2005). Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 174, 8183–8190.
- Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Fang, C., Cousins, D., Zhang, G., Gu, S.,

- Gao, Z., Shamji, B., et al. (2008). Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 2790–2798.
- Yoo, J., Omori, M., Gyarmati, D., Zhou, B., Aye, T., Brewer, A., Comeau, M.R., Campbell, D.J., and Ziegler, S.F. (2005). Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J. Exp. Med.* *202*, 541–549.
- Young, V.B., and Schmidt, T.M. (2004). Antibiotic-associated diarrhea accompanied by large-scale alterations in the composition of the fecal microbiota. *J. Clin. Microbiol.* *42*, 1203–1206.
- Yu, Z.-T., Chen, C., Kling, D.E., Liu, B., McCoy, J.M., Merighi, M., Heidtman, M., and Newburg, D.S. (2013). The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology* *23*, 169–177.
- Yue, W., Lin, Y., Yang, X., Li, B., Liu, J., and He, R. (2016). Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) inhibits human colon tumor growth by promoting apoptosis of tumor cells. *Oncotarget* *7*, 16840–16854.
- Zaph, C., Troy, A.E., Taylor, B.C., Berman-Booty, L.D., Guild, K.J., Du, Y., Yost, E.A., Gruber, A.D., May, M.J., Greten, F.R., et al. (2007). Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature* *446*, 552–556.
- Zaph, C., Du, Y., Saenz, S.A., Nair, M.G., Perrigoue, J.G., Taylor, B.C., Troy, A.E., Kobuley, D.E., Kastelein, R.A., Cua, D.J., et al. (2008). Commensal-dependent expression of IL-25 regulates the IL-23-IL-17 axis in the intestine. *J. Exp. Med.* *205*, 2191–2198.
- Zeuthen, L.H., Fink, L.N., and Frokiaer, H. (2008). Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology* *123*, 197–208.
- Zhao, L.-N., Li, J.-Y., Yu, T., Chen, G.-C., Yuan, Y.-H., and Chen, Q.-K. (2014). 5-Aminosalicylates reduce the risk of colorectal neoplasia in patients with ulcerative colitis: an updated meta-analysis. *PloS One* *9*, e94208.
- Zheng, X., Tsuchiya, K., Okamoto, R., Iwasaki, M., Kano, Y., Sakamoto, N., Nakamura, T., and Watanabe, M. (2011). Suppression of *hath1* gene expression directly regulated by *hes1* via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *17*, 2251–2260.
- Zhou, B., Comeau, M.R., De Smedt, T., Liggitt, H.D., Dahl, M.E., Lewis, D.B., Gyarmati, D., Aye, T., Campbell, D.J., and Ziegler, S.F. (2005). Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat. Immunol.* *6*, 1047–1053.
- Zhu, D., Zhu, X., Jiang, X., and Dong, Z. (2009). Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in nasal epithelial cells of patients with mugwort pollen sensitive-seasonal allergic rhinitis. *Chin. Med. J. (Engl.)* *122*, 2303–2307.
- Ziegler, S.F. (2010). The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders. *Curr. Opin. Immunol.* *22*, 795–799.
- Ziegler, S.F., and Artis, D. (2010). Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nat. Immunol.* *11*, 289–293.

## **Role of the nuclear receptor PPAR $\gamma$ in the immunomodulatory functions of the intestinal epithelial cell in ulcerative colitis: control of the expression of the short isoform of the TSLP**

### Abstract:

The origin of inflammatory bowel disease (IBD), including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), remains unknown. The loss of intestinal homeostasis as an etiologic factor is accepted. One of the key players in this homeostasis is the intestinal epithelial cells (IECs). It is now clearly established that the IECs regulate the functions of immune cells in the intestinal mucosa and actively participate in maintaining immune tolerance in the intestine. In particular, they have the ability to direct the differentiation of dendritic cells from the intestinal mucosa to a tolerogenic phenotype, notably through the production of cytokines such as TGF- $\beta$  (Transforming growth Factor- $\beta$ ) and TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin).

The laboratory has previously shown that there is a defect in the expression level of the nuclear receptor PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma) in the IEC of the colon, specifically in UC patients. In mice, invalidation of the gene encoding PPAR $\gamma$  increases susceptibility to experimental colitis induced by DSS (Dextran Sodium Sulfate). Other studies have highlighted the anti-inflammatory effect of a PPAR agonist, 5-amino-salicylic acid (5-ASA). The nuclear receptor PPAR $\gamma$  is an essential actor in the establishment of homeostasis in the IEC.

Our hypothesis is that PPAR $\gamma$  deficiency in UC patients disrupts the immune modulating functions of the IEC and would be at the origin of the loss of intestinal tolerance. The aim of this thesis is to characterize new target genes of the nuclear receptor PPAR $\gamma$  involved in the establishment of homeostasis in the intestinal epithelial cells. Among the potential candidates tested, the expression of TSLP cytokine is significantly decreased *in vitro* in PPAR $\gamma$  knock-down Caco-2 cells (ShPPAR $\gamma$ Caco-2). This epithelial cytokine is known to play a role in intestinal homeostasis. It exists under two isoforms: a long isoform called TSLP 1 and a short isoform called TSLP 2.

The results show that only the short form of the TSLP (sfTSLP) is regulated by PPAR $\gamma$ . The different PPAR $\gamma$  agonists (Pioglitazone, 5-ASA, GED, CLA) significantly induce the expression of TSLP 2. The PPAR $\gamma$  antagonist (GW9662) significantly decrease the expression of TSLP 2. The response element activated by PPAR $\gamma$  is identified in the promoter of the short form TSLP gene by chromatin immunoprecipitation and gene reporter assays. The expression of TSLP2 was significantly decreased in the colonic mucosa of UC patients compared to controls and was correlated with PPAR $\gamma$  expression. The PPAR $\gamma$  agonists don't induce the expression of the gene encoding TSLP in mice. Finally, the results confirm that TSLP 2 has an anti-microbial peptide function.

This work identified TSLP2 as a new PPAR $\gamma$ -target gene and support the hypothesis that, in UC, PPAR $\gamma$  deficiency in colonic mucosa could play a role in the loss of intestinal tolerance through an impaired sfTSLP expression.

### Key words:

Intestinal homeostasis, ulcerative colitis, intestinal epithelial cell, PPAR $\gamma$ , TSLP, antimicrobial peptide.