



HAL
open science

PPAR γ et homéostasie intestinale

Mathurin Fumery

► **To cite this version:**

Mathurin Fumery. PPAR γ et homéostasie intestinale. Sciences agricoles. Université de Picardie Jules Verne, 2018. Français. NNT : 2018AMIE0015 . tel-03692126

HAL Id: tel-03692126

<https://theses.hal.science/tel-03692126>

Submitted on 9 Jun 2022

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.



Thèse de Doctorat
Mention Santé Biologie
Spécialité Physiologie Humaine

présentée à l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

MATHURIN FUMERY

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

PPAR γ et Homéostasie intestinale

Soutenue le 2 Juillet 2018, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen

M. F. Gottrand, Professeur

Rapporteur

Mme. M. Rachel Marion-Letellier, Professeur

Rapporteur

Mme. V. Bach, Professeur

Examineur

M. J. Maizel, Professeur

Examineur

M. E. Nguyen-Khac, Professeur

Directeur de thèse

M. B. Bertin, Maître de Conférences

Co-encadrant

Remerciements

M. le Professeur Frederic Gottrand et Mme le Docteur Rachel Marion-Letellier pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de ma gratitude sincère.

Mme. le Professeur Véronique Bach pour avoir accepté d'être examinateur pour cette soutenance de thèse. Merci pour tes conseils bienveillants et ton précieux accompagnement.

M. le Professeur Julien Maizel pour avoir accepté d'être examinateur pour cette soutenance de thèse. C'est un plaisir de ton compter parmi ce jury.

M. le Docteur Benjamin Bertin pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse et de m'avoir accompagné pendant cette longue aventure. Sans toi, rien n'aurait été possible. Tu m'as fait découvrir la recherche fondamentale et enseigné la rigueur scientifique. Merci d'avoir accepté cette organisation « atypique » et d'avoir compris mes difficultés. Merci pour le temps que tu m'as consacré et ta disponibilité. On a finit par y arriver ! J'espère que nous arriverons à travailler ensemble à l'avenir.

Mr le Professeur Nguyen-Khac. Merci d'avoir accepté de co-diriger cette thèse. Merci pour votre soutien et vos conseils au quotidien.

A Morgane, merci pour ton soutien indéfectible, malgré les difficultés que je nous impose. Cette fois, cette thèse est terminée pour de bon.

A Léon, tu nous remplis de bonheur.

A toute ma famille pour leur soutien sans faille.

A mon maitre, Jean-Louis Dupas. Je suis fier d'être ton élève.

A mes collègues du services d'hépatogastroenterologie du CHU d'Amiens. Merci pour votre

soutien et pour votre aide au quotidien. C'est aussi grâce à vous.

A toute l'équipe du laboratoire U995 de Lille. Merci Audrey pour ton aide précieuse, tes conseils et ton soutien. Merci Sylvia pour ton travail acharné. Merci pour ton simplicité et ta générosité. Sans toutes deux, rien n'aurait été possible.

A Pierre Desreumaux, pour votre soutien et vos conseils.

Résumé

PPAR γ est un récepteur nucléaire ligand-activé qui contrôle, dans différents organes, de nombreuses fonctions cellulaires, impliquées notamment dans le contrôle de l'inflammation, de la carcinogenèse ou du métabolisme. Au niveau de la cellule épithéliale intestinale, certaines fonctions de PPAR γ , comme son rôle métabolique, reste méconnu. Les effets génomiques des ligands de PPAR γ sont eux aussi très mal connus dans cette cellule. L'objectif de ce travail était de comparer l'expression génomique induite par différents agonistes de PPAR γ dans la cellule épithéliale intestinale par la technique de microarrays, et ainsi identifier de nouveaux gènes cibles de PPAR γ et les différentes fonctions cellulaires contrôlées par ce récepteur nucléaire. Nous avons pu identifier le gène lactase, dont le déficit d'expression est responsable de l'intolérance au lactose, comme un gène cible de PPAR γ . Nous avons ensuite pu montrer que les agonistes de PPAR γ étaient capables d'augmenter l'expression et l'activité de la lactase *in vitro* et *in vivo*, ainsi que d'améliorer les symptômes d'intolérance au lactose dans un modèle animal ; identifiant les agonistes de PPAR γ comme potentiellement le premier traitement pharmacologique de l'intolérance au lactose. Nous avons pu ensuite confirmer l'effet antinéoplasique du 5ASA au niveau de la cellule épithéliale intestinale, *in vivo* et *in vitro*, et confirmer que cette action était dépendante de PPAR γ . Comme dans d'autres organes, PPAR γ régule dans la cellule épithéliale intestinale les voies de l'inflammation, la différenciation et la maturation cellulaire mais aussi des fonctions métaboliques, confirmant le rôle clé de PPAR γ dans le contrôle l'homéostasie intestinale, et le potentiel thérapeutique des agonistes de PPAR γ .

Abstract

PPAR γ is a ligand-activated nuclear receptor that controls, in various organs, numerous cellular functions, involved in the control of inflammation, carcinogenesis or metabolism. In intestinal epithelial cell, some functions of PPAR γ , as its metabolic role, remain unknown. The genomic effects of PPAR γ ligands are also poorly known in this cell. Our objective was to compare the genomic expression induced by different PPAR γ agonists in the intestinal epithelial cells by a microarrays technique, and thus to identify new PPAR γ target genes and the different cellular functions controlled by this nuclear receptor. We have identified the lactase gene, whose lack of expression is responsible for lactose intolerance, as a target gene of PPAR γ . We then showed that PPAR γ agonists were able to increase lactase expression and activity *in vitro* and *in vivo*, identifying PPAR γ agonists as potentially the first pharmacological treatment of lactose intolerance. We then confirmed the antineoplastic effect of 5ASA in intestinal epithelial cell, both *in vivo* and *in vitro*, and confirmed that this action was PPAR γ -dependent. As in other organs, PPAR γ regulates in intestinal epithelial cell inflammation, cell differentiation and maturation as well as metabolic functions, confirming the key role of PPAR γ in the control of intestinal homeostasis, and the potential therapeutic effect of PPAR γ agonists.

Mots clés : PPAR γ , intolérance au lactose, cellule épithéliale intestinale, cancer colorectal

Keywords : PPAR γ , lactose intolerance, intestinal epithelial cell, colorectal cancer

Abréviations

ALA : acide α -linoléique

AGCC : acides gras à courtes chaînes

AOM: azoxymethane

CA : cryptes aberrantes

CCR : cancer colo-rectal

CHIP : test d'immunoprécipitation de la chromatine

CLA : acide linoléique conjugué

CTEN : C-terminal tensin-like

DHA : acide docosahexaénoïque

DR : direct repeat

EPA : acide eicosapentaénoïque

FCA : foyer de cryptes aberrantes

GED : minophenyl-alpha-methoxypropionic acid

LCT : lactase

MICI : maladies inflammatoires chroniques intestinales

PB : paires de bases

PCR : polymerase chain reaction

PIO : pioglitazone

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PPRE : peroxisome proliferator response element

PUFA : acides gras polyinsaturés

ROSI : rosiglitazone

RXR : retinoid-x-receptor

TLR : toll like receptor

5-ASA : acide 5-aminosalicylique

Table des matières

1. Le récepteur nucléaire PPAR γ

1.1 Structure moléculaire et rôle de PPAR γ

1.2 Expression de PPAR γ

1.3 Agonistes de PPAR γ

1.3.1 Ligands naturels de PPAR γ

1.3.2 Ligands synthétiques de PPAR γ

1.4 Fonction de PPAR γ dans l'organisme et au niveau intestinal

1.4.1 PPAR γ et inflammation

1.4.2 PPAR γ et cancer

1.4.3 PPAR γ et métabolisme glucidique et lipidique

2. Hypothèses de travail

3. Découverte de nouveaux gènes cibles de PPAR γ

3.1 Matériels et méthodes

3.2 Résultats

4. PPAR γ régule l'expression et l'activité intestinale de la lactase

4.1 Introduction

4.1.1 La lactase et l'hypolactasie

4.1.2 L'intolérance au lactose

4.1.3 Traitement de l'intolérance au lactose

4.2 Article 1: PPAR γ régule l'expression et l'activité de la lactase dans l'intestin

4.2.1 Objectifs

4.2.2 Matériels et Méthodes

4.2.3 Résultats

4.2.4 Conclusion

5. Les effets antinéoplasiques du 5asa dans l'intestin sont médiés par PPAR γ dans la cellule épithéliale intestinale.

5.1 Introduction

5.2 Article 2: L'effet antinéoplasique dans 5ASA dans la cellule épithéliale intestinale est dépendant de PPAR γ

5.2.1 Objectifs

5.2.2 Matériels et Méthodes

5.2.3 Résultats

5.2.4 Conclusion

6. les agonistes de PPAR γ inhibent l'expression du gène suppresseur de tumeur Cten

5.1 Introduction

5.2 Objectifs

5.3 Matériels et Méthodes

7. Discussion

7.1 PPAR γ et intolérance au lactose

7.2 Agonistes de PPAR γ et cancer colorectal

8. Conclusion

9. Références

1. Le récepteur nucléaire PPAR γ

1.1 Structure moléculaire et rôle de PPAR γ

PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) est un récepteur nucléaire de la superfamille des facteurs de transcription ligands-activés, un groupe comprenant une cinquantaine de facteurs impliqués dans différents processus biologiques. Il appartient à la famille PPAR qui comprend différents isotypes: PPAR α , PPAR β / δ et PPAR γ (Figure 1). Ces trois membres sont codés par différents gènes situés sur différents chromosomes. Malgré un niveau élevé de séquences et d'homologies structurelles, les différents sous-types de PPARs ont des profils d'expression tissulaire unique (Shearer and Billin, 2007).

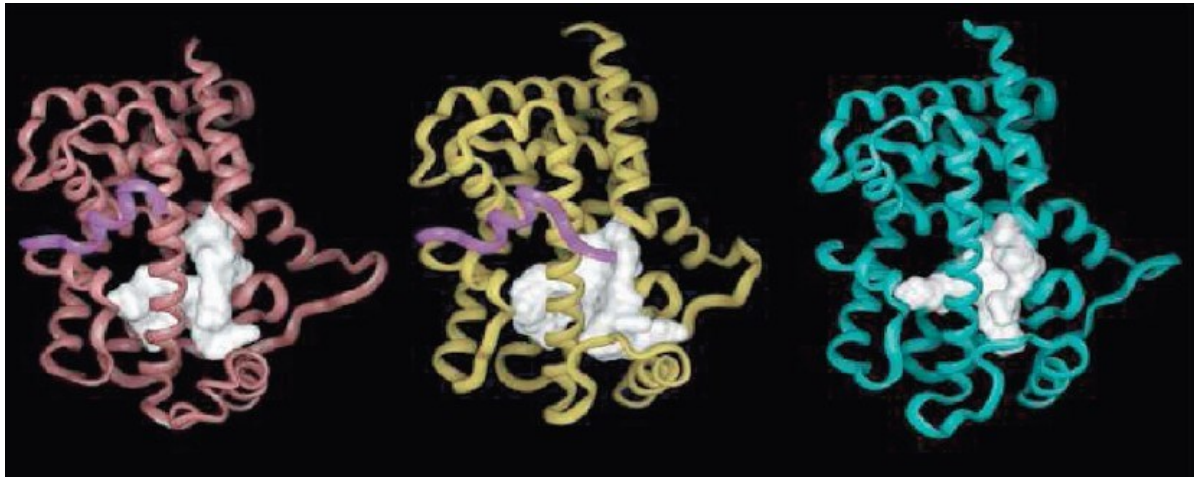


Figure 1. Représentation tridimensionnelle de PPAR α , PPAR β et PPAR γ avec leurs sites de liaison au ligand

Deux isoformes de PPAR γ (PPAR γ 1, PPAR γ 2) existent, avec des sites d'expression et donc des fonctions physiologiques différentes. PPAR γ contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes régulant le métabolisme des lipides, la sensibilité à l'insuline, ainsi que l'inflammation et la prolifération cellulaire. Ainsi PPAR γ a été lié à diverses pathologies chroniques telles que l'athérosclérose, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie d'Alzheimer, différents cancers (i.e. sein, côlon) et les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) (Dubuquoy et al. 2002). Ces récepteurs nucléaires constituent donc une cible thérapeutique importante dans ces différentes pathologies (Greschik and Moras, 2003; Dubuquoy et al. 2002 ; Whright et al. 2014).

PPAR γ peut avoir différents rôles au sein de la cellule :

1) ***Co-répression ligand indépendant de gène cible*** : en l'absence de ligand, PPAR interagit avec corépresseur qui, à l'état dé-acétylé, inhibe la transcription de l'ADN (Figure 2A) (Nolte et al. 1998).

2) ***Trans-activation ligand dépendant de gène cible*** : après activation par un de ses ligands, PPAR γ forme un hétérodimère dans le noyau cellulaire avec un autre récepteur nucléaire le Retinoid-X-Receptor alpha (RXR α), recrute un co-activateur tel que PPAR γ coactivator1- α (PGC-1 α) ou la E1A Protéine 300 (EP300) contenant une activité histone acétylase. Cet hétérodimère se fixe à un site de réponse spécifique sur l'ADN, situé sur le promoteur du gène cible, le peroxisome proliferator response element (PPRE). 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. (Schoonjans et al. 1996). Ce complexe va entraîner des modifications structurelles de la chromatine pour faciliter l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle au niveau du promoteur, aboutissant à l'activation ligand-dépendant des gènes cibles (Figure 2B).

3) *Un rôle de trans-répression ligand-dépendant*: il s'agit d'une régulation négative de l'expression de gènes cibles de manière ligand-dépendante. 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 trans-répression (Ricote et al. 2007). Son action répressive se fait directement sur d'autres facteurs de transcriptions (Figure 2C) (Glass et al. 2006; Pascual et al. 2006).

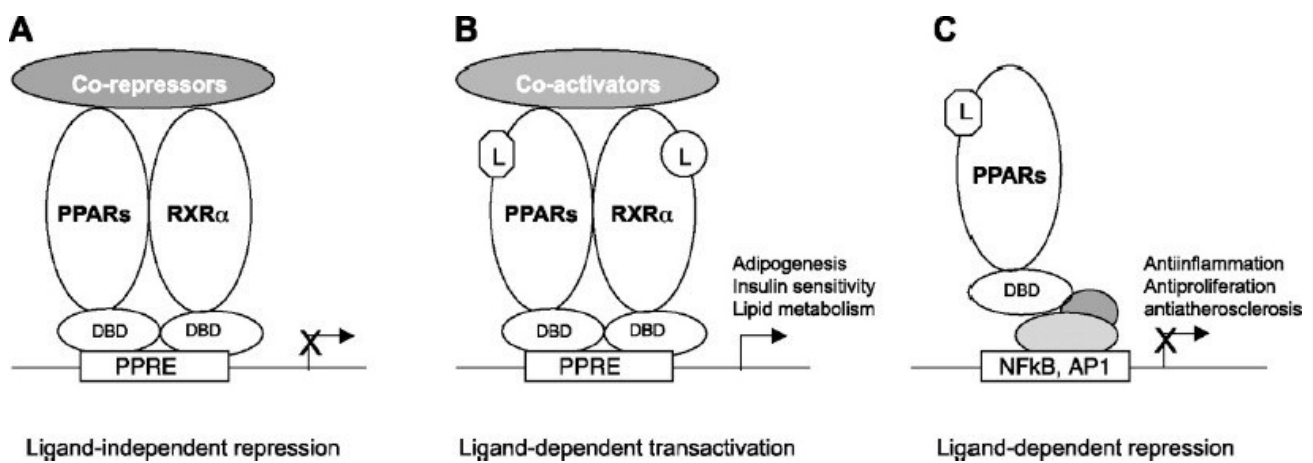


Figure 2. Différents mécanismes d'action de PPAR γ sur ses gènes cibles : (A) Répression ligand-indépendante ; (B) Transactivation ligand-dépendante ; (C) Répression ligand-dépendante (d'après Ruan et al. 2008)

1.2 Expression de PPAR γ

PPAR γ 2 est exprimé uniquement dans le tissu adipeux. PPAR γ 1 est fortement exprimé dans les tissus adipeux, mais aussi dans le colon. Au niveau colique, l'expression de PPAR γ est maximale au niveau du côlon distal puis diminue progressivement vers le côlon proximal et est beaucoup plus faible dans l'intestin grêle (Su et al. 2007). Son expression a aussi été mise en évidence dans l'estomac, l'intestin grêle, le foie, le pancréas, la peau, les reins (Figure 3).

Dans le tube digestif, divers types de cellules tels que les cellules épithéliales intestinales, les monocytes ou les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules B et cellules T, expriment PPAR γ (Dubuquoy et al. 2003).

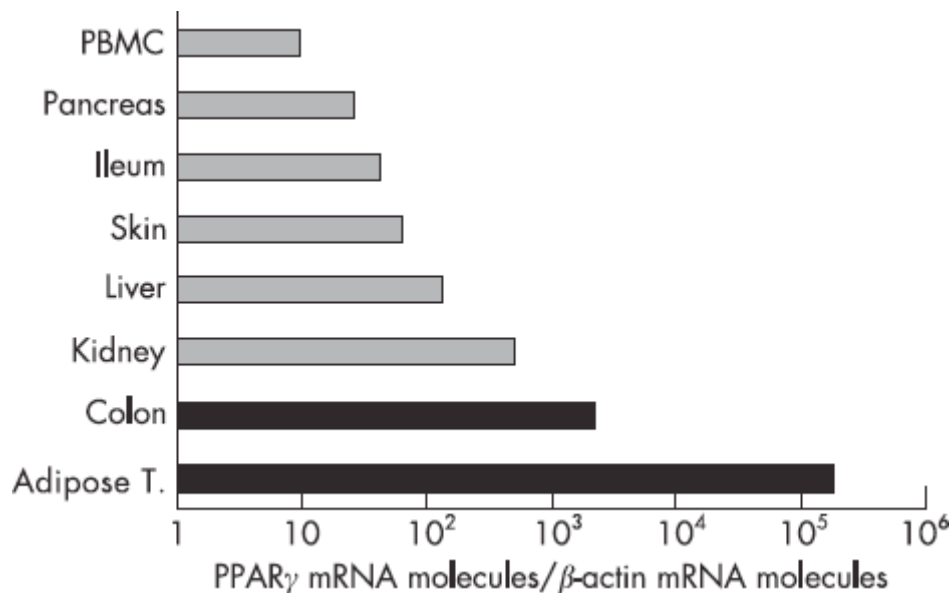


Figure 3. Localisation d'expression de l'ARNm de PPAR γ dans différents tissus (d'après Dubuquoy et al. 2003).

1.3 Agonistes de PPAR γ

Contrairement à la majorité des récepteurs nucléaires, de nombreux agonistes naturels et synthétiques peuvent se lier à PPAR γ et ainsi changer sa conformation, pour aboutir à son activation (Figure 4).

Il faut cependant souligner que beaucoup de ces ligands n'ont qu'une faible affinité avec le récepteur. Pour certains d'entre eux, les concentrations nécessaires pour activer PPAR γ *in vitro* sont supérieures aux concentrations physiologiques, ce qui amène à se questionner sur leur véritable rôle *in vivo*.

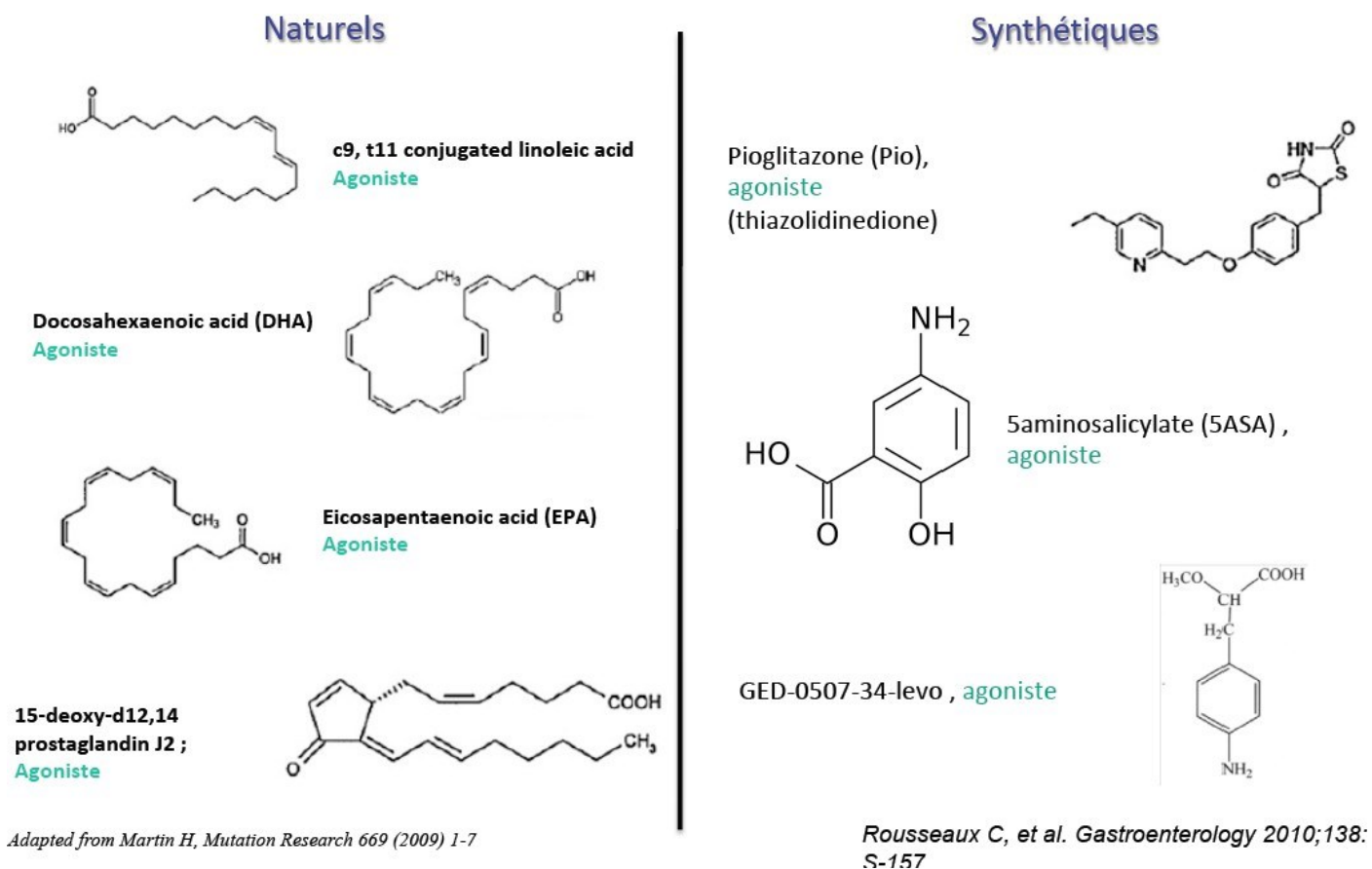


Figure 4. Structure chimique des principaux ligands naturels et synthétiques de PPAR γ .

1.3.1 Ligands naturels de PPAR γ

De nombreux ligands endogènes tels que les acides gras polyinsaturés (PUFA) et leurs dérivés appelés eicosanoïdes ont été identifiés comme ligands naturels de PPAR γ . Les principaux ligands naturels de PPAR γ sont détaillés dans le Tableau 1.

Le rôle de ses ligands naturels comme activateur de PPAR γ au niveau du tube digestif reste méconnu. Pourtant, des quantités micro-molaires de PUFA suffisent pour activer PPAR γ et

ces molécules sont détectées à des concentrations fonctionnelles dans le plasma humain (Dubuquoy et al. 2003, Marion-Tellier 2015). Ainsi, ces PUFA pourraient avoir un rôle physiologique dans les tissus exprimant PPAR γ .

Acides-gras polyinsaturés

La position de la première double liaison à partir de l'extrémité méthylée de l'acide gras (AG) définit les AG polyinsaturés comme n-3 ou n-6. Certains sont considérés comme essentiels car ils ne peuvent pas être synthétisés par voie endogène et doivent donc être apportés par l'alimentation tels que l'acide α -linoléique et l'acide linoléique.

L'acide linoléique (AL), un n-6 PUFA, et ses dérivés, tels que l'acide droxyoctadecadiénoïque (HODE), sont capables de transactiver PPAR γ de façon dose-dépendante dans des cellules entérocytaire en culture Caco-2 et HCT-116 (Bull et al. 2003), et ainsi exercer des propriétés anti-inflammatoires et apoptotiques (Altmann et al. 2007, Vangaveli et al. 2014). L'AL et ses dérivés sont aussi capables de transactiver PPAR γ de façon dose-dépendante dans des cellules enterocytes-like (Bull et al. 2003).

De même, l'acide α -linoléique (ALA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), des n-3 PUFA sont capables d'inhiber la synthèse de cytokines pro-inflammatoires via l'inhibition de NF- κ B par PPAR γ dans des cellules monocytaires (Zhao et al. 2005). Dans la cellule épithéliale intestinale en culture (Caco2), le DHA et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) sont capables de diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires (IL1b, IL6, TNF α) par un mécanisme PPAR γ dépendant (Marion-Letellier et al. 2008). Plus récemment, il a été démontré qu'un régime à faible ratio n-6/n-3 PUFA était efficace pour réduire l'inflammation dans les modèles animaux de colite (Huang et al. 2014). Il semble aussi que l'effet anti-inflammatoire des n-3 PUFA passe aussi par l'inhibition du Toll Like Receptor de type 4 (TLR4) (Lee JY et al. 2003, Weathrill AR et al. 2005). Ces molécules pourraient aussi moduler la composition en des phospholipides membranaires en acides gras et ainsi diminuer certains eicosanoïdes pro-

inflammatoires et augmenter certains composés anti-inflammatoires tels que les resolvines (Arita et al. 2005).

Il faut noter que certains éléments du microbiote intestinal sont capables de synthétiser des métabolites à partir de PUFA non digérés. Ces métabolites ont de nombreuses propriétés physiologiques dont celle de se fixer à PPAR γ (Gotoetal et al. 2015).

Du fait de ses propriétés anti-inflammatoires, les PUFA ont été évalués dans des essais cliniques chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques intestinales. Les données actuelles ne permettent pas de conclure à un éventuel bénéfice de ces derniers que ce soit dans la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique (Feagan et al. 2008)

Les eicosanoïdes

Les eicosanoïdes sont des substances dérivées de l'acide arachidonique (AA) libéré à partir de phospholipides membranaires à courte durée de vie. Elles comprennent notamment des prostaglandines, des leucotriènes, et des thromboxanes. La prostaglandine 15dPGJ2 à la dose de 1mM est capable d'activer PPAR γ dans différentes cellules dérivées de cancer du sein, du poumon mais aussi du colon (Allred et al. 2005). Cette même molécule a aussi montré des propriétés anti-inflammatoires au niveau colique chez le rat (Ponferrada et al. 2007).

Acide linoléique conjugué

L'acide linoléique conjugué (CLA) est un acide gras essentiel. Les bactéries présentes dans le rumen des ruminants convertissent l'acide linoléique en CLA, dont il existe quatre isomères (cis-9, cis-10, trans-11, et trans-12). Ainsi on retrouve surtout ces composés dans les matières grasses du lait et de la viande des ruminants, notamment le boeuf et le mouton

(Marion-Letellier et al. 2015).

Il a été montré que le CLA était capable d'améliorer les colites induites chez la souris (Bassaganya-Riera et al. 2004, Hontecillas et al. 2002) ainsi que d'inhiber la carcinogenèse colique via l'activation de PPAR γ (Hiroyuki Kohno et al. 2004). De même, il a été observé que les effets anti-inflammatoires et antinéoplasiques du CLA sont médiés par PPAR γ dans de nombreux types cellulaires dont les cellules épithéliales intestinales (Caco-2) (Yasui et al. 2005). D'autres isomères du CLA sont capables, via PPAR γ , d'influencer positivement l'homéostasie du glucose et d'inhiber certains médiateurs inflammatoires tels que le TNF α (Hontecillas et al. 2009).

Acides gras polyinsaturés (PUFA) n-6	Acide arachidonique (AA) Acide linoléique (AL)	Huiles
n-3	Acide α -linoléique (ALA) Acide docosahexaénoïque (DHA) Acide eicosapentaénoïque (EPA)	Légumes verts, lin Poisson Poisson
Eicosanoïdes (dérivés de l'acide arachidonique)	Prostaglandines (PG) Leucotriènes (LT) Thromboxanes (TX).	
Isomères de l'acide linoléique conjugué	Acide linoléique conjugué (CLA)	Bœuf, lait de bovin

Tableau 1. Principaux ligands naturels de PPAR γ et sources alimentaires pour les acides gras essentiels

1.3.2 Ligands synthétiques de PPAR γ

La plupart des agonistes de PPAR γ ont été initialement développés pour le traitement du diabète ou du cancer.

La famille des *thiazolidinediones* a été la première classe d'agonistes synthétiques spécifiques de PPAR γ . La troglitazone a été la première glitazone développée pour un usage thérapeutique chez les patients diabétiques mais elle a été retirée du marché en raison de sa toxicité (Dubuquoy et al. 2006). De nombreuses autres glitazones ont ensuite été développées et certaines ont été depuis approuvées pour le traitement du diabète de type 2 (i.e rosiglitazone (avandia) et pioglitazone (actos)), avant d'être, elles aussi, retirées du marché pour leur toxicité hépatique et cardiovasculaire, avec une augmentation du risque d'accident vasculaire-cérébral (AVC) et d'infarctus du myocarde (IDM), et de cancer de vessie (Consoli et al. 2013, Neumann et 2012, Ravinuthala et al. 2000).

Un essai pilote en ouvert a évalué l'efficacité de la rosiglitazone (4 mg par voie orale deux fois par jour) chez 15 patients atteints de rectocolite hémorragique réfractaires aux 5ASA et/ou aux corticoïdes et/ou aux immunosuppresseurs. Après 12 semaines de traitement, une rémission clinique et endoscopique étaient observées chez respectivement 27% et 20% des patients (Lewis et al. 2008). Du fait de cette faible efficacité et surtout des effets systémiques de cette classe thérapeutique, cette molécule a été abandonnée dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales.

Malgré tout, ces résultats ont aboutit au développement de nouveaux agonistes de PPAR γ avec une mécanisme d'action plus ciblé. Récemment, il a été mis en évidence au laboratoire que PPAR γ était la cible des *aminosalicylés*, une des plus anciennes molécules utilisées dans le traitement des maladies inflammatoires intestinales dont les mécanismes d'action étaient

jusqu'alors inconnu. Il a été montré que le 5-ASA était capable de se lier à PPAR γ , d'induire sa translocation du cytosol au noyau des cellules épithéliales, responsable d'un changement conformationnel de PPAR γ , et du recrutement d'un co-activateur nommé DRIP (Dubuquoy et al. 2003 ; Rousseaux et al. 2005). Le 5-ASA est aussi capable d'induire l'expression de PPAR γ et son activation dans la cellule épithéliale intestinale. Aussi, il a été montré chez des souris que l'efficacité du 5ASA sur les colites expérimentales était dépendante de l'expression de PPAR γ (Rousseaux C et al. 2005).

Cette découverte a aboutit au développement de *nouveaux analogues du 5ASA* avec un plus grand pouvoir d'activation de PPAR γ . L'action de plusieurs dizaines de nouveaux agonistes de PPAR γ au niveau des cellules épithéliales coliques, a déjà été mise en évidence. Une de ces dernières molécules est une nouvelle entité chimique, développée au laboratoire, le aminophenyl-alpha-methoxypropionic acid family appelé *GED-0507-34-Levo (GED)* (Specia et al. 2016 ; Rousseaux et al. 2010). Dans des modèles de colite induite chez la souris, un premier travail a montré un effet anti-inflammatoire du GED (1mM) 30 fois supérieur à l'effet du 5-ASA au dosage optimal (30 mM), diminuant l'inflammation intestinale de 50 à 70%. Le GED (1mM) a également des propriétés antalgiques viscérales similaires à la morphine, avec une activité plus précoce et plus longue en comparaison au 5-ASA. Aucune toxicité n'a été mise en évidence jusqu'à des dosages de 2000mg/kg/j ainsi qu'aucune génotoxicité ou aberration chromosomique. Une étude de phase I a rapporté une excellence tolérance et une étude de phase II est en cours (Rousseaux et al. 2010).

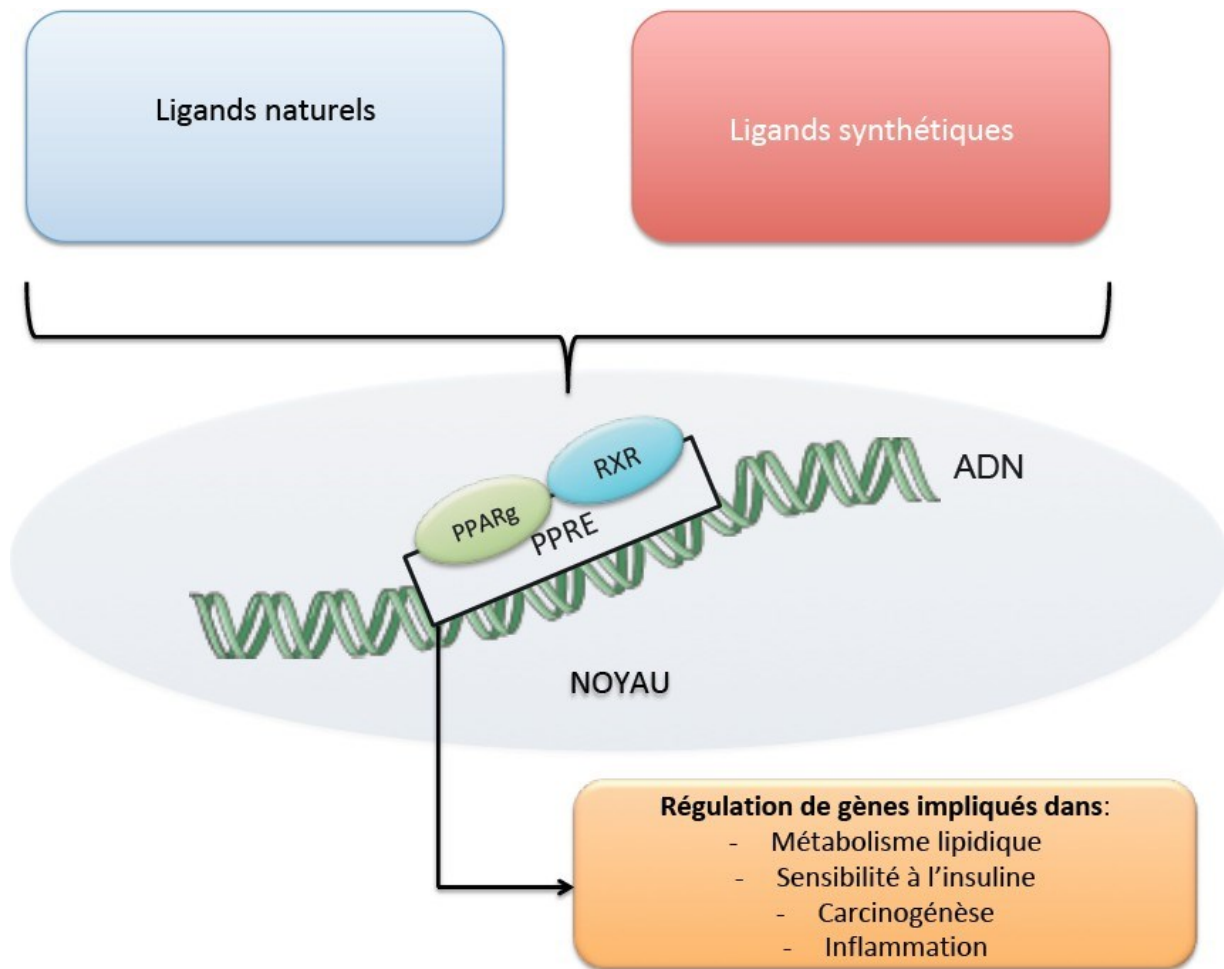


Figure 5. Actions des agonistes naturels et synthétiques sur les gènes cibles de PPAR γ .

1.4 Fonction de PPAR γ dans l'organisme et au niveau intestinal

Après le tissu adipocytaire, le côlon est le principal site d'expression de PPAR γ dans lequel les cellules épithéliales en sont la principale source. PPAR γ y est aussi exprimé, dans un degré moindre, par les macrophages et les lymphocytes. L'estomac, l'intestin grêle, le foie, le pancréas, expriment aussi PPAR γ avec de plus faible concentration (Dubuquoy et al. 2003).

Au niveau intestinal, PPAR γ contrôle l'expression de nombreux gènes et régule des fonctions cellulaires très différentes telles que l'inflammation intestinale, et la prolifération cellulaire. Au niveau intestinal, le rôle métabolique de PPAR γ est méconnu.

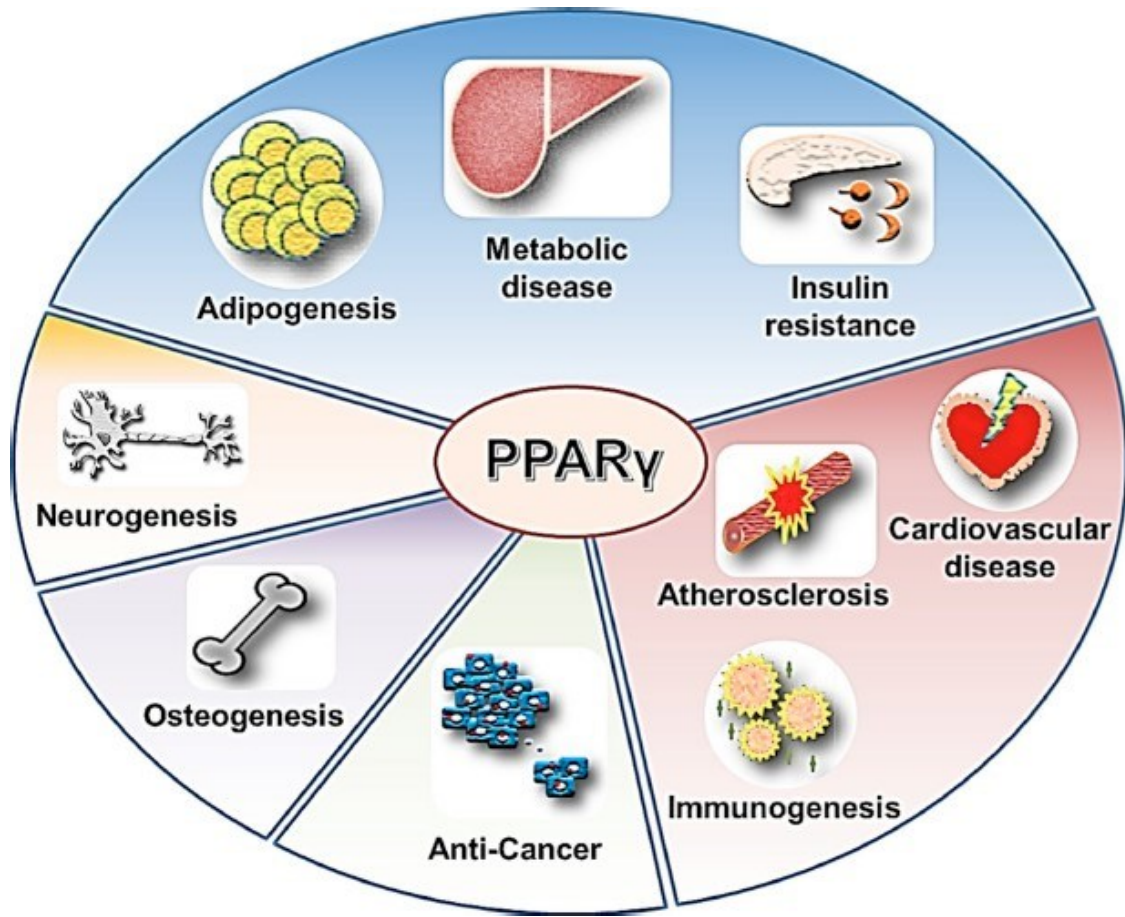


Figure 6. Effet pléiotropique de PPAR γ (issu de Kim et al. 2005)

1.4.1 PPAR γ et inflammation

PPAR γ agit sur les voies de l'inflammation via une interaction avec différents facteurs de transcription tels que NF-kB, AP-1 (activating protein-1), STAT (signal transducer and activator of transcription) ou encore NFAT (nuclear factor activated T cell) (Hou et al. 2012, Dubuquoy et al. Gut 2006). L'effet anti-inflammatoire de PPAR γ a été observé dans les macrophages (Shoelson et al. 2003), au niveau de la plaque d'athérome (Nagy et al. 1997, Tontonoz et al. 1998). PPAR γ est aussi capable d'inhiber la maturation des cellules dendritiques (Szanto et al. 2008, Kiss et al. 2013) et la survie et l'activation des Lymphocytes T et est capable de favoriser la réponses immunitaire TH2 aux dépends de la voie TH1 (da Rocha Junior et al. 2013, Tontonoz et al. 2008).

Les agonistes naturels de PPAR γ , tels que les PUFA, ont démontré des activités anti inflammatoires dans différents modèles d'inflammation notamment au niveau hépatique (Chen et al. 2014, Lian et a. 2015).

Dans la cellule épithéliale intestinale en culture HT-29, PPAR γ est capable de contrôler la réaction inflammatoire en formant un complexe avec NF-kb, ce complexe est ensuite transporté dans le noyau où il inhibe la transcription de nombreux gènes impliqués dans la cascade inflammatoire (Hou et al. 2012). Les propriétés anti-inflammatoires des agonistes de PPAR γ naturels et synthétiques ont été clairement démontrées dans la cellule épithéliale intestinale. Le DHA et l'EPA sont capables de diminuer l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 et IL-8 dans les Caco2 (Marion-Letellier et al. 2008). Les agonistes naturels et synthétiques de PPAR γ ont des effet bénéfiques dans plusieurs modèles de colites chez le rongeur (Bassaganya-Riera et al. 2004 ; Bassaganya-Riera et al. 2006 ; Cuzzocrea S et al. 2003).

Le déficit du récepteur nucléaire PPAR γ au niveau des cellules épithéliales intestinales chez la

souris augmente l'inflammation lors d'une colite expérimentale et à l'inverse, les agonistes de PPAR γ améliorent les lésions induites (Adachi et al. 2006 ; Desreumaux et al. 2001). Chez l'homme, le laboratoire a mis en évidence un déficit significatif de l'expression et de l'activité de PPAR γ dans les cellules épithéliales intestinales coliques de patients atteints de rectocolite hémorragique (Dubuquoy et al. 2003). Ce déficit, dont l'origine est encore inconnue, est limité au côlon et n'existe pas au cours de la maladie de Crohn. Le niveau d'expression de PPAR γ influence aussi la réponse au traitement.

Différentes équipes, dont la nôtre, ont mis en évidence que la flore intestinale colique, et certains produits bactériens, tels que le LPS, le butyrate, ou les probiotiques étaient capables de moduler l'expression de PPAR γ via la cellule épithéliale intestinale (Dubuquoy et al. 2003 ; Dubuquoy et al. 2003 ; Wächtershäuser et al. 2000 ; Eun et al. 2007; Lee et al. 2005; Voltan et al. 2008). Enfin, PPAR γ régule l'expression de b-defensin, un peptide antimicrobien et jouerait un rôle clé dans les activités bactéricides et candidacides au niveau de la muqueuse colique (Peyrin-Biroulet et al. 2010).

1.4.2 PPAR γ et cancer

PPAR γ est exprimé dans différents types de cancers tels que le colon, le sein, le poumon ou la prostate. Différentes études ont mise en évidence que PPAR γ était capable d'inhiber *in vitro* et/ou *in vivo* la progression de ces cancers (Bren-Mattison et al. 2008 ; Bonofiglio et al. 2006 ; Cesario et al. 2006 ; Sikka et al. 2012). Les cellules cancéreuses pulmonaires exprimant PPAR γ semblent plus chimio-sensibles (Jeong et al. 2012). Pour le cancer du colon, la survie semble même corrélée à l'expression de PPAR γ (Ogino et al. 2009).

De même, les agonistes de PPAR γ sont capables d'influencer positivement la tumorigénèse. Les agonistes de PPAR γ sont capables d'induire l'arrêt du cycle cellulaire et de favoriser l'apoptose dans des cellules en culture dérivées de cancer du pancréas ou de cancer du sein (Matomura et al. 2000). Des résultats similaires ont été observés dans le cancer du colon. Dans une étude de phase II chez 41 patients atteints de cancer prostate, la troglitazone était associée à une stabilisation durable du PSA (prostatic specific antigen) (Mueller et al. 2000).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer les fonctions antinéoplasiques de PPAR γ . Ces mécanismes ont été largement étudiés dans différents types cellulaires dont la cellule épithéliale intestinale, dans laquelle PPAR γ joue finalement un rôle de gène suppresseur de tumeur en contrôlant notamment la maturation, l'adhésion et la motilité entérocytaire (Gupta et al. 2001)

L'activation de PPAR γ par un agoniste :

- 1) inhibe la prolifération cellulaire et l'entrée en phase S du cycle cellulaire en favorisant la dégradation de la cycline D1 (Sarraf et al. 1998 ; Fajas et al. 2003),
- 2) stimule la différenciation cellulaire (Sarraf et al. 1998),

3) favorise l'apoptose en induisant l'expression du Death Receptor 5 (DR5), en inhibant la protéine anti-apoptotique c-flip, en diminuant l'expression de la protéine anti-apoptotique bcl2, et en inhibant l'expression de NF- κ B (Elrod HA et al. 2008),

4) active la dégradation de β -caténine et en conséquence de c-Myc (Fujisawa T et al. 2008 ; Liu J. et al. 2006),

5) inhibe l'activité de la voie de l'EGF-R (epidermal growth factor receptor) en augmentant l'activité de la phosphatase SH-PTP2,

5) réduit l'expression de Cox2 (Yang et al. Carcinogenesis 2001),

6) induit l'expression du répresseur transcriptionnel TSC22 et du gène suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and Tensin homolog at chromosome Ten) et réduit la survie cellulaire via un mécanisme caspase-dépendant (Patel L. et al. 2001) et,

7) inhibe l'angiogénèse (Bisho-bailey et al. 2011).

Récemment, le 5-ASA a été décrit, à une concentration cliniquement pertinente, comme un nouveau ligand synthétique de PPAR γ , capable d'induire son expression et son activation dans les cellules épithéliales intestinales (Rousseaux et al. 2005). Dans les cellules épithéliales coliques HT-29, le 5-ASA induit l'expression de PPAR γ , inhibe la prolifération et induit l'apoptose des cellules épithéliales par un mécanisme PPAR γ dépendant (Schwab M et al. 2008). L'effet antinéoplasique du 5-ASA a ensuite été confirmé dans les modèles animaux de cancer colorectal. Dans un modèle de cancer colorectal induit par la 1,2-diméthylhydrazine (DMH 40 mg/kg) chez des rats, le 5-ASA à 60 mg/kg/j réduisait la taille de la tumeur de plus de 60% par rapport aux animaux non traités (Kim et al. 2014). Le balsalazide, une prodrogues du 5ASA, était capable de réduire significativement le nombre de foyers de cryptes aberrantes

induits par l'azoxymethane (AOM) de façon dose dépendante. Un effet chimioprotecteur du 5-ASA (administration intra-rectale) a également été confirmé en dans un modèle de cancer du côlon induit par le NMNU chez les rats F344 (Narisawa et al. 2003).

Les mécanismes par lesquels les agonistes de PPAR γ sont capables d'inhiber la cancérogenèse colique *in vivo* restent finalement méconnue. De nouvelles études devront confirmer le caractère PPAR γ -dépendant par lequel ces agonistes exercent, au moins en partie, leurs effets antinéoplasiques.

1.4.3 PPAR γ et métabolisme glucidique et lipidique

PPAR γ est un régulateur essentiel du métabolisme comme en témoigne son rôle dans l'obésité, le diabète, ou l'athérosclérose. PPAR γ régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la sensibilité à l'insuline, la synthèse des lipides et la différenciation adipocytaire, comme CD36, FABP4 (fatty acid binding protein 4), l'adiponectine, le CEBPA (CCAAT/enhancer bonding protein alpha), etc (Kim et al. 2015).

Le contrôle de l'adipogenèse est finalement le rôle physiologique de PPAR γ le plus connu où il semble jouer un rôle de chef d'orchestre. L'activation de PPAR γ entraîne la différenciation des pre-adipocytes en adipocytes et induit un phénotype adipocytes-like chez les fibroblastes. PPAR γ est aussi capable de contrôler l'apoptose des adipocytes (Auwerxs et al. 1999). PPAR γ peut induire la synthèse de gènes qui vont modifier la matrice extra-cellulaire et favoriser le développement du tissu adipeux (Hong et al. 2010). L'activation de PPAR γ diminue l'expression de la leptine, favorisant alors une hyperphagie (Hollenberg et al. 1997). Aussi, l'activation de PPAR γ va induire l'expression des gènes codant les enzymes lipogènes telles que l'acétyl CoA carboxylase ou l'acides gras synthétase, et les protéines de transport des acides gras (Tontonoz et al. 1998).

Des mutations de PPAR γ ont été associées au diabète et à l'insulino-résistance (Tontonoz et al. 2008). Les ligands synthétiques de PPAR γ comme les glitazones améliorent la sensibilité à l'insuline et ont été utilisés dans le traitement du diabète avant leur retrait pour des effets indésirables graves. Les agonistes de PPAR γ naturels tels que l'EPA et ses dérivés sont aussi capables d'augmenter la sécrétion d'adiponectine par les adipocytes.

PPAR γ a aussi des fonctions métaboliques dans d'autres tissus. Dans le muscle, PPAR γ contrôle la répartition des lipides, la sécrétion des adipokines (Tontonoz et al. 2008) et la sensibilité à l'insuline (Norris et al. 2003). L'expression de PPAR γ est augmentée dans la

stéatose hépatique (Grilova et al. 2003) et un déficit d'expression de PPAR γ dans le foie diminue la sensibilité à l'insuline dans les modèles de souris diabétiques.

Alors que l'activation de PPAR γ semble moduler l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme, le rôle métabolique de PPAR γ au niveau de la cellule épithéliale intestinale reste largement méconnu.

2. Hypothèses de travail

PPAR γ présente des effets pléiotropiques, essentiellement dans le contrôle de l'inflammation, de la cancérogénèse et du métabolisme. Ces effets sont observés dans des types cellulaires très différents. Alors que les différents ligands de PPAR γ semblent avoir des effets communs, des effets très différents sont aussi observés, dont certains sont responsables d'effets indésirables. Les effets génomiques de ces différentes familles de ligands sont très mal connus en particulier au niveau de la cellule épithéliale intestinale. Certaines fonctions de PPAR γ , comme son rôle métabolique reste méconnu au niveau de la cellule épithéliale intestinale.

C'est pourquoi l'objectif de ce travail était initialement de comparer l'expression génomique induite par différents agonistes de PPAR γ dans la cellule épithéliale intestinale par la technique de microarrays afin de mieux comprendre le mode d'action de ces différentes molécules et de découvrir des nouveaux gènes cibles de PPAR γ dans la cellule épithéliale intestinale.

Ce projet s'inscrit dans la dynamique de recherche de notre laboratoire. Au cours des deux dernières décennies, celui-ci a pu mettre en évidence les propriétés anti-inflammatoires de PPAR γ dans la cellule épithéliale intestinale (Desreumaux et al. 2001), et le déficit de PPAR γ dans la muqueuse colique des patients atteints de rectocolite hémorragique (Dubuquoy et al. 2003). Après la découverte du mécanisme d'action du 5-ASA, notre laboratoire a développé de nouveaux agonistes de PPAR γ tel que le GED. L'étude des profils d'expression génomique de la cellule épithéliale intestinale induite par ces différents agonistes devaient aussi mieux nous faire comprendre leurs mécanismes d'actions thérapeutiques et aussi le risque d'effets indésirables.

3. Découverte de nouveaux gènes cibles de PPAR γ

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Culture cellulaire

La lignée Caco-2 dérivée de cellules épithéliales d'adénocarcinome colique a été utilisée dans ce projet. Ces cellules sont capables de se différencier spontanément avec un phénotype entérocytes-like après confluence. Les cellules Caco2 différenciées expriment plusieurs marqueurs de différenciation entérocytaire, y compris la lactase. Ces cellules Caco-2 étaient mises en culture dans un milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplémenté avec du sérum de veau foetal décomplémenté à 20% (SVF, Dutscher, Brumath, France), 1% de pénicilline-streptomycine (5 ml/l) (Invitrogen) et 1% de acides aminés non-essentiels (5 ml/l) (Invitrogen). Toutes les lignées cellulaires étaient cultivées en monocouches confluentes à 37°C dans un environnement contrôlé à 5% de CO₂. Chaque semaine, les monocouches confluentes ont été traitées à la trypsine (Invitrogen) puis réensemencées après une dilution de 1/10. Pour les expériences de stimulation, les cellules ont été placées dans des plaques 6-puits à une densité de 1x10⁶ cellules par puits. Une privation en sérum était réalisée 16 heures avant la stimulation afin de synchroniser les cellules.

3.1.2 Traitement des cellules

Les cellules ont été traitées avec du GED (1 mM et 30 mM, Guliani, Italie), du 5-ASA (30 mM, Sigma), ou de la pioglitazone (1 μ M, Sigma). Du milieu seul a été utilisé comme témoin (Ctrl) des conditions GED et 5ASA, et le DMSO (Sigma) comme témoin de la pioglitazone. Après 24 heures de stimulation, les puits ont été rincés trois fois avec du tampon phosphate alcalin (PBS) stérile à 4°C. Les cellules ont ensuite été lysées avec un tampon de lyse (RA1, Macherey-Nagel) contenant 1% β -mercaptoéthanol. Les stimulations cellulaires

étaient réalisées en quadruplicatas.

3.1.3 Extraction de l'ARN

Les ARN totaux ont été extraits à l'aide d'un kit Nucleospin RNA (Macherey Nagel). Après inactivation des RNAses, les ARN totaux ont été débarrassés des traces d'ADN génomique par un traitement à la DNase, et élués dans de l'eau RNase-free. La qualité des ARN a été évaluée à l'aide du spectre UV sur Nanodrop de 220 à 350 nm puis par profil sur BioAnalyzer Agilent 2100. 1µg d'ARN total a été utilisé (concentration minimale 50ng/µl).

3.1.4 Microarray

La technique de puces d'expression en deux couleurs a été utilisée afin de comparer les ARNc de deux échantillons (cellules traitées par le contrôle vs cellules traitées par un agoniste) (figure supplémentaire 1). Brièvement les ARN des échantillons ont été, dans une première étape, rétrotranscrits en ADNc grâce à une rétrotranscriptase (Affinity-Script RT, Agilent). Cet ADNc sert de matrice pour la synthèse et l'amplification des ARNc grâce à une T7 RNA polymérase en présence de cyanine3-CTP pour le Ctrl (fluorescence verte) ou de cyanine5-CTP pour l'agoniste (fluorescence rouge). Les deux ARNc marqués ont été mélangés et hybridés sur une seule lame (G4851A Agilent 8x44K) qui a été scannée (Agilent G2505B scanner). La fluorescence a été visualisée après excitation par un laser et les intensités relatives des deux fluorophores ont été analysées en ratios qui donneront l'état de sur ou sous expression de chaque gène grâce au logiciel GeneSpring (Agilent).

3.2 Résultats

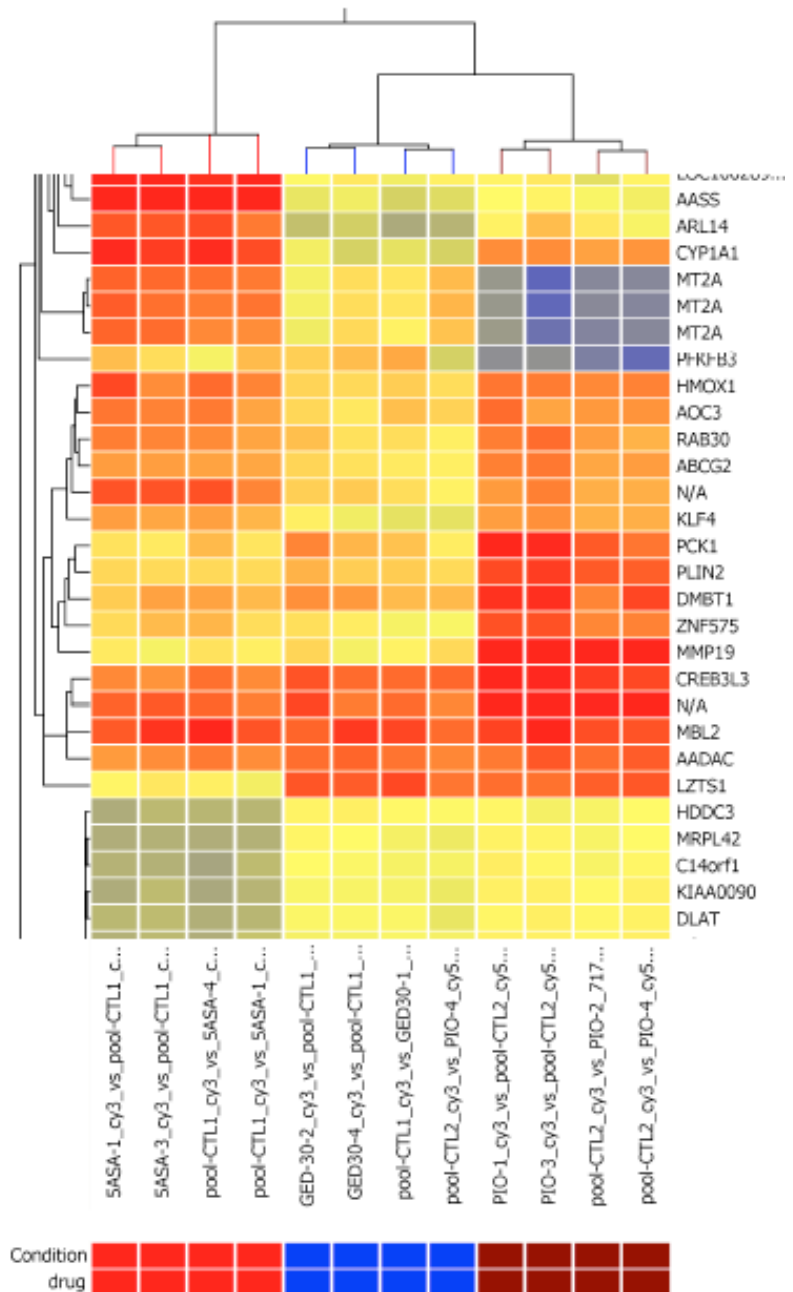
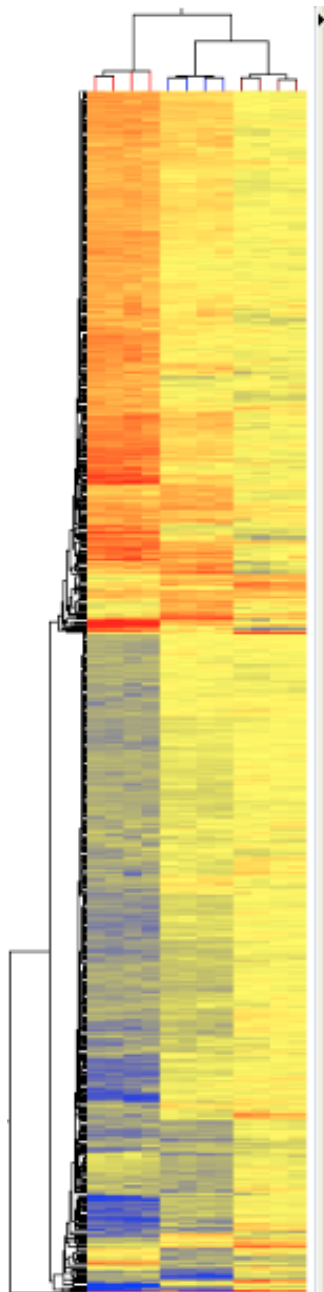
Les résultats du microarrays sont disponibles en ligne à partir du lien suivant :

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE68852>); GEO Series accession number GSE68852).

Les profils d'expression génomique des cellules Caco2 stimulées avec le GED 1mM et 30 mM, le 5ASA 30 mM ou la pioglitazone 1 μ M ont donc été comparés grâce à une puce à ADN. Dans ces conditions, respectivement 46, 355, 1574 et 121 gènes ont montré une expression de plus de 2 fois supérieure à leurs contrôles respectifs.

Parmi ces gènes, le gène de la lactase, était celui qui a bénéficié de l'induction la plus importante dans les conditions GED 1mM, GED 30mM, et pioglitazone, avec des augmentations d'expression de respectivement 5.28, 8.28 et 17.9 fois. Dans la condition 5ASA 30mM, la lactase est le 16ème gène dont l'induction d'expression est la plus importante, avec une augmentation de 8,76 fois en comparaison au contrôle.

A l'inverse, la tensine 4 (TSN4 ou CTEN) était le gène dont l'expression était la plus réprimée dans les conditions 5ASA et GED 30mM avec des diminutions d'expression de respectivement 19 et 18 fois.



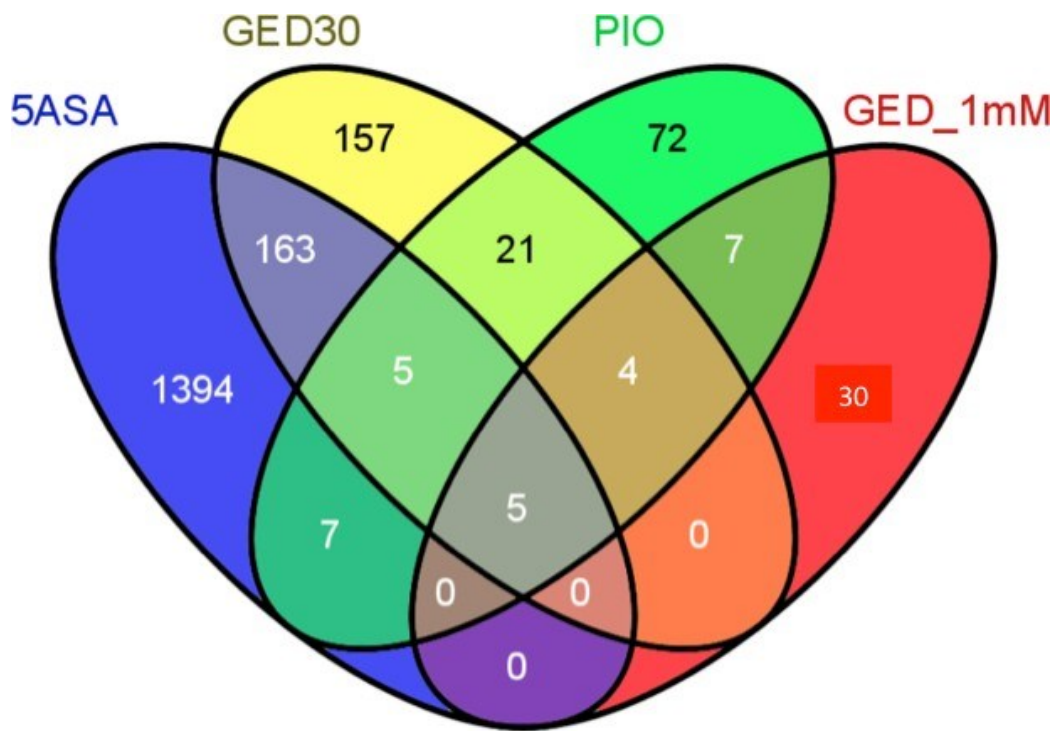


Figure 7. A. Exemple de résultats d'une partie de la puce à ADN pour différents gènes cibles pour les trois conditions : 5ASA 30 mM, GED 30 mM et pioglitazone 1mM. **B.** Représentation schématique du nombre de gènes up-regulés dans l'analyse en microarray dans les différentes stimulations (5ASA, GED 1mM et 30mM et pioglitazone).

4. PPAR γ régule l'expression et l'activité intestinale de la lactase

4.1 Introduction

4.1.1 La lactase et l'hypolactasie

Le lactose est présent en quantité importante dans les produits laitiers, notamment dans le lait indispensable à l'alimentation du nouveau né. Ce disaccharide est hydrolysé en glucose et galactose par une disaccharidase (β -galactosidase), la lactase-phlorizin hydrolase, communément appelée lactase. Après son absorption, le galactose participe à la synthèse de glycoprotéines et de glycolipides, il peut aussi être isomérisé en glucose au niveau hépatique. Le glucose peut lui être utilisé comme source directe d'énergie par de nombreux tissus dont les muscles et le cerveau. Il peut aussi être stocké sous forme de glycogène au niveau hépatique.

La lactase est située au niveau de la bordure en brosse entérocytaire, exprimée de façon maximale au niveau du jéjunum médian (Figure 8) (Montgomery. 1999 ; Troelsen. 2005 ; Newcomer et al. 1966).

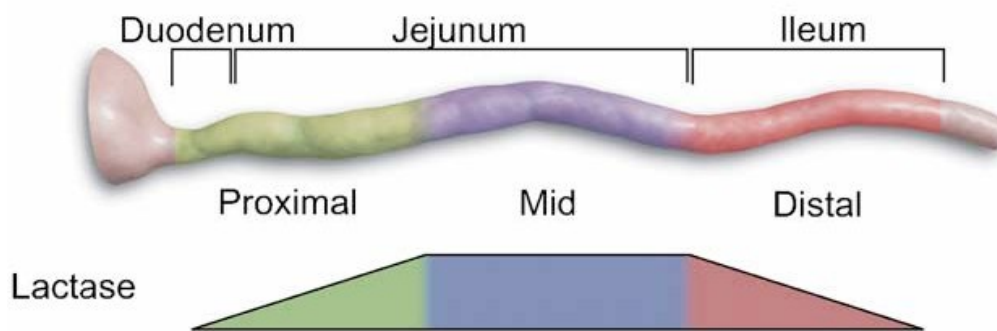


Figure 8. Représentation schématique de l'expression de la lactase au niveau des différents segments de l'intestin grêle (d'après Troelsen et al. 2005).

L'expression et l'activité de la lactase sont finement régulées de manière spatio-temporelle. Ainsi la lactase est reconnue comme un marqueur de l'entérocyte différencié (Troelsen. 2005). Chez certains nouveau-nés l'activité lactase est absente à la naissance. Cette situation incompatible avec la vie définit l'hypolactasie primaire congénitale. Normalement, son activité est maximale durant la période post natale et chez le nourrisson (Rings et al. 1992). Deux phénotypes émergent ensuite après le sevrage: (i) le phénotype « lactase non persistant » avec une activité lactase qui devient faible (hypolactasie primaire acquise) et (ii) le phénotype « lactase persistant » qui est associé à une activité lactasique adaptée à l'âge adulte (>10 UI/g) (Troelsen. 2005). Le phénotype lactase persistant est considéré comme ancestral et est observé chez les autres mammifères (Sebastio et al. 1989 ; Troelsen. 2005). La mutation ayant aboutie au phénotype lactase persistant semble être un phénomène adaptatif apparu il y a environ 5000-10000 ans de façon contemporaine à la domestication des bovins et à l'utilisation du lait dans l'alimentation à l'âge adulte (Hollow et al. 2001). Deux polymorphismes du gène de la lactase ont été identifiés et corrélés à ces deux phénotypes (Vesa et al. 2000). Les polymorphismes C/T13910 et G/A22018 sont étroitement corrélés au

phénotype « lactase persistant ». Les génotypes CC13910 et GG22018 sont associés au phénotype « lactase non-persistant » et à l'intolérance au lactose (Lomer MC et al. 2008). La présence de ces SNPs ne suffisent cependant pas à contrôler toute la machinerie transcriptionnelle du gène lactase. Des mécanismes dynamiques, temps dépendant semblent aussi être en jeu. Le lien fonctionnel entre l'allèle C -13910 et la non-persistance de la lactase a été récemment établi (Labrie et al, 2016). Labrie et al. ont montré que des facteurs épigénétiques, contrôlés par ces SNPs, modulait de façon temps-dépendant l'expression de la lactase chez la souris et chez l'homme.

La régulation transcriptionnelle de la lactase est finalement méconnue et semble complexe. L'expression du gène de la lactase diffère en fonction de l'état de différenciation cellulaire, du segment d'intestin grêle concerné et de l'âge de l'individu. Des études fonctionnelles ont montré qu'une zone de 150pb sur le promoteur de la lactase semblait très importante pour le contrôle de l'expression de la lactase. Ces 150 pb sont très bien conservés à travers les différentes espèces telles que l'homme, la souris, le rat ou le cochon (Troelsen et al. 2003). Sur cette région du promoteur peut se lier différents facteurs de transcription, tels que les récepteurs nucléaires appartenant à HNF (hépatocyte famille nucléaire), les facteurs Cdx-2, GATA, ou Oct-1 (Troelsen, 2005; Jarvela et al, 2009) qui semblent influencer l'expression de la lactase. Ces différents facteurs ne sont pas spécifiques, et sont impliqués notamment dans le contrôle de la différenciation et l'identité cellulaire ainsi que dans le maintien de l'épithélium intestinal (Troelsen et al. 2003).

Aussi, une régulation post-traductionnelle du gène de la lactase a été mise en évidence. Elle a par exemple été observée chez des enfants dénutris où une diminution d'expression de la lactase a été retrouvée.

Bien que de significatifs progrès ont été réalisés, les mécanismes moléculaires sous-jacents de ce modèle complexe d'expression sont encore incomplètement compris (Enattah et al. 2002; Tishkoff et al. 2007 ; Lewinsky et al. 2005).

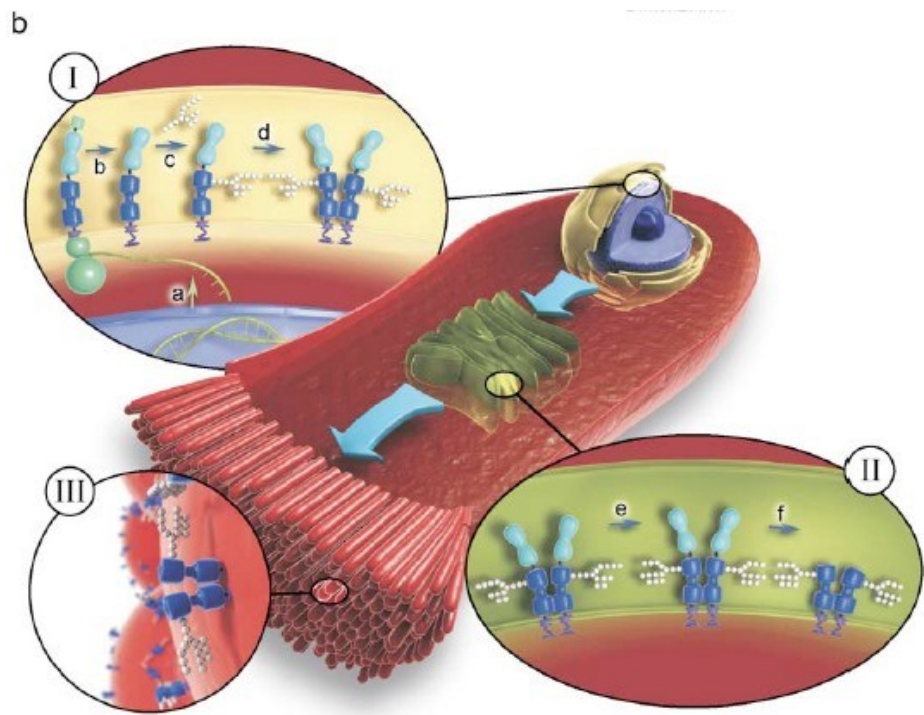


Figure 9. Biosynthèse de la lactase. Dans la cellule épithéliale intestinale différenciée, la transcription du gène lactase aboutit à la translocation dans le réticulum endoplasmique d'une pre-pro-lactase (I). Après un clivage et une N-glycosylation, la pro-lactase arrive dans l'appareil de Golgi (II). Une nouvelle glycosylation intervient et la pro-région N est clivée à son tour. La protéine lactase mature est ensuite transportée et externalisée au niveau de la bordure en brosse entérocytaire (d'après Troelsen JT et al. 2005).

La prévalence de l'hypolactasie primaire est évaluée aujourd'hui à 70% de la population mondiale adulte avec d'importantes différences géographiques. Elle serait observée chez 90% des asiatiques, 70% des africains, 40% des européens du sud et 20% des européens du nord (Sahi T et al. 2000). En France, on estime que 10 à 30% de la population sont hypolactasiques.

Il faut aussi noter que le déficit en lactose peut être aussi temporaire. C'est le cas dans les lésions de l'épithélium de l'intestin grêle comme dans la maladie de Crohn du grêle ou les ischémies du grêle. Dans ce cas, le déficit est temporaire et l'activité lactasique reprend sa valeur initiale quand l'épithélium cicatrise (Vasa et al. 2000).

4.1.2 L'intolérance au lactose

L'intolérance au lactose est décrite depuis l'antiquité. Après la deuxième guerre mondiale, l'exposition au lactose a augmenté du fait de la découverte de propriétés fonctionnelles du lactose qui a un rôle de fixation des arômes, de gélification, d'émulsion, de cristallisation et de coloration (Barbut et al. 2010). Ainsi on retrouve aujourd'hui du lactose de façon « caché » dans de nombreux préparations manufacturés tels que les viennoiseries, la charcuterie, pâtes à pizza/gâteaux, céréales, soupes,...), ainsi que dans le conditionnement de certains médicaments.

Une activité lactase insuffisante (hypolactasie) entraîne une maldigestion du lactose et donc une malabsorption. Le lactose arrive donc intact au niveau du colon où la flore anaérobie hydrolytique et glycolitique va produire par fermentation des sucres réducteurs, des acides gras à courte chaîne, des gaz et d'autres métabolites intermédiaires (Arola et al. 1994). Les gaz produits vont favoriser le météorisme abdominal et les douleurs tandis que les acides gras

à courtes chaînes et les métabolites intermédiaires vont entraîner une diarrhée osmotique. Certains patients hypolactasiques restent asymptomatiques grâce à des phénomènes adaptatifs. L'exposition régulière au lactose pourrait modifier la flore colique, de façon quantitative et qualitative, qui serait alors capable de métaboliser les sucres réducteurs, les acides gras et les acides organiques (Szilagyi et al. 2010 ; Arola et al. 1994).

Chez le sujet hypolactasique, la malabsorption pourra, dans certains cas, s'exprimer par des symptômes digestifs aspécifiques apparaissant 30 min à 2h après l'ingestion de lactose. Les douleurs abdominales, ballonnements, borborygmes et flatulences sont toujours présents. Deux tiers des patients atteints d'intolérance au lactose présentent des nausées/vomissements ou de la diarrhée (Matthews SB et al. 2005). L'intensité de ces symptômes est corrélée au niveau d'expression de la lactase et de la quantité de lactose ingérée (tableau 2) (Lomer MC et al. 2008). A charge identique, le lactose sous forme solide est associé à moins de symptômes, probablement du fait d'une vidange gastrique prolongée pour les aliments solides qui échelonne l'arrivée du lactose dans l'intestin (Vesa et al. 1997).

A la différence de l'intolérance, différentes méthodes permettent de diagnostiquer une hypolactasie. Le dosage de la lactase à partir de biopsies de muqueuse par voie endoscopique a longtemps été la référence. Le diagnostic est défini par un ratio lactase/sucrase $< 0,3$ et une activité lactase < 10 UI/g de protéines (Dahlquist et al. 1970). Cette méthode est cependant peu sensible car soumise à l'échantillonnage des biopsies. Un test rapide basé sur une réaction colorimétrique a récemment été développé. Il semble présenter une sensibilité et une spécificité satisfaisante (Kuokkannen et al. 2006). La mise en évidence de variants génétiques associés au phénotype lactase non-persistant a permis de développer des tests génétiques par PCR qui présentent une très bonne sensibilité (93 à 100%) et spécificité (95 à 100%). Ils se pratiquent sur de l'ADN constitutionnel qui peut être obtenu à partir d'un frottis buccal. Les polymorphismes C/T-13910 et T/T-13910 sont étroitement associés au phénotype tolérant alors que le génotype C/C-13910 est associé au phénotype intolérant (Rasinpera et al. Gut 2004).

D'autres tests permettent non pas de diagnostiquer l'hypolactasie mais la malabsorption du lactose. Plusieurs tests ont été proposés tels que l'analyse du PH des selles (Soeparto et al. 1972), le dosage du galactose dans les urines (Aroloa et al. 1994), ou encore le dosage dynamique de la glycémie après ingestion du lactose (Jarvela. 2005). Du fait de leur complexité ou de leur faible sensibilité/spécificité, ces tests sont peu utilisés en pratique clinique. Le test respiratoire à l'hydrogène, qui est un test simple, non invasif et peu coûteux, est aujourd'hui le plus utilisé. En cas de malabsorption d'un sucre, une partie de la dose ingérée parvient au colon et l'H₂ expiré augmente. Les sensibilités et spécificités rapportées par ce test varient respectivement de 80 à 100% et de 70 à 100% (Rosado et al. 1983).

L'intolérance au lactose est plus difficile à caractériser. Un test d'exclusion et de réintroduction est souvent utilisé en pratique clinique. Un questionnaire a été validé afin d'évaluer les symptômes déclenchés par l'ingestion de 25 g de lactose (Cassellas et al. 2010). Du fait de l'absence de symptômes spécifiques, ses performances diagnostiques sont faibles.

Aliments	Teneur en lactose pour 100g/100 ml
Laits	
Lait entier en poudre	38g
Lait condensé sucré	12g
Lait de brebis	4-5g
Lait de chèvre	4-5g
Lait écrémé	4-5g
Lait entier	4-5g
Lait sans lactose	0.5g
Produits laitiers	
Riz au lait	18g
Crème glacée	7g
Crème dessert	3-6g
Yaourt nature	3g
Crème fraîche, crème fouettée	2-4g
Fromage blanc	2-4g
Roquefort	2-4g
Parmesan	1-3g
Beurre	<1g
Camembert	<1g
Emmental	<1g
Produits industriels	
Charcuteries	4g
Gauffres, pancakes, biscuits, cookies	2-4g
Purées et soupes instantanées	2-4g
Viennoiseries	2g
Céréales petit-déjeuner	1-3g

Tableau 2. Teneur en lactase de principaux aliments (d'après Alexandre et al. 2011)

4.1.3 Traitement de l'intolérance au lactose

L'exclusion complète du lactose de l'alimentation est à l'heure actuelle le principal traitement de l'intolérance au lactose (Wooten et al. 2004). Nombreux patients utilisent alors des produits laitiers pauvres en lactose (i.e lait végétaux) ou des produits sans lactose. En plus de son caractère contraignant, ce régime expose à un risque de carences en vitamines et en oligo-éléments comme le calcium, la vitamine D, le magnésium, le potassium ou encore le phosphore ou la vitamine A (Tableau 3). Cette stratégie thérapeutique va aboutir à une consommation inférieure aux besoins journaliers recommandés (AJR). Ainsi 86% des noirs-américains consomment à peine la moitié des AJR en calcium. L'intolérance au lactose va aboutir à une réduction de la densité minérale osseuse problématique chez les enfants et adolescents ou chez la femme ménopausée, favorisant ostéoporose et fractures. Aussi, le défaut de consommation de produits laitiers a été associé à l'hypertension artérielle (Wooten et al. 2004 ; Appel et al. 1997 ; Appel et al. 2003), à la prise de poids (Zemel et al. 2004 ; Zemel et al. 2004), ou encore à un sur-risque de cancer colique (Wooten et al. 2004).

Aujourd'hui, le traitement le plus efficace semble finalement être l'utilisation de compléments alimentaires enrichis en lactase extraite de champignons ou de levures. Cette enzymothérapie a montré son efficacité sur les symptômes d'intolérance au lactose et sur les tests respiratoires (Portincasa et al. 2008 ; Montalto et al. 2005).

Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement pharmacologique permettant de moduler et restaurer l'expression et l'activité de la lactase.

Nutriments	Part des apports journaliers apportée par les produits laitiers
Calcium	72%
Phosphore	32%
Vitamine B2	26%
Vitamine A	23%
Vitamine B12	20%
Protéines	19%
Potassium	18%
Zinc	16,5%
Magnésium	15%

Tableau 3. Part des apports journaliers en différents nutriments apportés pour les produits laitiers (d'après Wooten et al. 2004)

4.2 Article 1: PPAR γ régule l'expression et l'activité de la lactase dans l'intestin

4.2.1 Objectifs

Notre analyse transcriptomique ayant identifié la lactase comme un nouveau gène cible de PPAR γ . L'objectif de notre étude était donc :

- de confirmer que les agonistes synthétiques de PPAR γ étaient capables d'augmenter l'expression de l'ARNm et de la protéine lactase *in vitro* et *in vivo*
- d'évaluer l'impact des agonistes naturels de PPAR γ sur l'expression de la lactase *in vitro* et *in vivo*
- de confirmer le caractère de PPAR γ dépendant de l'effet des agonistes de PPAR γ sur l'expression de la lactase
- d'évaluer l'impact des agonistes de PPAR γ sur les symptômes d'intolérance au lactose

4.2.2 Matériels et Méthodes

Les modalités de culture des cellules Caco-2, de traitement par les différents agonistes synthétiques de PPAR γ , et d'extraction de l'ADN ont été décrits ci-dessus.

Stimulation cellulaire

Comme précédemment décrit plus haut, les cellules ont été traitées avec du GED (1 mM et 30 mM, Guliani, Italie), du 5-ASA (30 mM, Sigma), ou de la pioglitazone (1 μ M, Sigma) mais aussi avec du CLA (1mM, Sigma), de la rosiglitazone (1mM, Sigma) et du Fenofibrate (Sigma). Pour ces expériences, les stimulations étaient réalisées en triplicatas. Afin d'évaluer l'influence de la durée de la stimulation, des stimulations par du GED 1mM durant 6 et 12h ont été effectuées. Afin de rechercher la dose minimale efficace et la dose permettant l'expression maximale, chaque stimulation a été effectuée pour chaque condition à différentes posologies : GED 0.1, 1 et 30mM, 5ASA 1, 30 et 100mM et pioglitazone 0.1, 1 et 10 μ M. Afin de mettre en évidence le caractère PPAR γ dépendant de l'expression de la lactase, une stimulation comme décrite précédemment a été effectuée après traitement 1 heure par le GW9662 10 μ M, antagoniste irréversible de PPAR γ .

PCR quantitative

L'expression des gènes a été évaluée par PCR quantitative (qPCR) afin de confirmer les résultats du microarray. La qPCR a été effectuée en utilisant un système ABI PRISM 7000 (Applied Biosystem) à l'aide de Power SYBR $\text{\textcircled{R}}$ Green PCR Master Mix (Applied Biosystem). Les paires d'amorces pour chaque transcription ont été identifiées grâce au logiciel qPrimer depot software (<http://primerdepot.nci.nih.gov>). La quantification des signaux qPCR était effectuée à l'aide d'une méthode de quantification relative en utilisant la

GAPDH comme gène de référence pour les extraits humains et la b-Actine pour les extraits de rongeurs. Les valeurs étaient représentées en terme de quantité relative de variation d'expression de l'ARNm (exprimée en ΔCt) ou de multiplication par rapport au témoin (Fold).

Western blot

6×10^6 cellules Caco-2 ont été traitées 24 h avec les différents agonistes de PPAR γ , 5-ASA (30 mM), Pio (1 mM), rosiglitazone (Rosi) (1 mM), GED (30 mM) et CLA (1 mM). La protéine totale était extraite dans du tampon RIPA contenant du Tris-HCl 50 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 5 mM EDTA, 1% de Triton X-100 et 10% de glycérol, complétés par du fluorure de sodium 100 mM (NaF), orthovanadate de sodium 2 mM (Na₃VO₄), pyrophosphate de sodium 10 mM (NaPPi), phénylméthanesulfonyle 1 mM fluorure (PMSF), et un cocktail d'inhibiteur de la protéase (Complete Mini, sans EDTA, Roche). Pour chaque échantillon 50 ug de protéines étaient séparés par électrophorèse et transférés dans des membranes de nitrocellulose. Après deux lavages Tampon TBS-Tween contenant du Tris-HCl 30 mM pH 8, NaCl 300 mM, et 0,1% de Tween-20, les membranes étaient fixées 2 h dans du lait 5% avec du TBS et 0,05% de Tween-20 et laissées 2 h à température ambiante avec des anticorps primaires anti-lactase (Novus Biological, monoclonal mice, clone 3C105.1, 1:200), PPAR γ (Cell signaling, monoclonal rabbit, clone C6H12, 1:1000), et la b-actine (Sigma, monoclonal mice, clone AC-15, 1/5 000) diluées dans du lait 1% avec 0,05% de TBS-Tween. Les membranes étaient ensuite incubées avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort [anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch) ; anti-mouse (Sigma)], à 1:10,000 dans du lait 1% dans 0,05% de TBS-T pendant 1 h à température ambiante. L'immunodétection était réalisée grâce à un substrat chimiluminescent SuperSignal West Pico (Thermo Scientific Pierce, Erembodegem) selon le protocole du fabricant. Les signaux chimiluminescent étaient capturés par une caméra CCD, et la densité optique des bandes était déterminée en utilisant un densitomètre assisté par ordinateur et le logiciel public ImageJ (W. S., Rasband, ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, MD;

<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2011). Les niveaux de protéines pour chaque échantillon étaient exprimés en unités de densité optique (DO) / quantité de protéines totales. Les résultats étaient exprimés par rapport aux groupes témoins.

Immunofluorescence

Après 24 h de stimulation par du GED 1 mM, de la Pio 1 mM, de la Rosi 1 mM, ou du CLA 1 mM, les cellules Caco-2 étaient fixées dans du paraformaldehyde à 4% 10 min, perméabilisées dans du PBS 0,1% Triton X-100 pendant 15 min à température ambiante, puis incubées avec du tampon de blocage [3% de sérum albumine bovine (BSA) dans du PBS]. Une incubation avec un anticorps lactase primaire (Atlas Antibodies, HPA007408; dilution 1:200) était réalisée pendant une nuit à 4 ° C puis une incubation avec anticorps secondaire (Invitrogen, anti-rabbit Alexa 488; dilution 1: 100) était réalisée 1 h à température ambiante. Les noyaux étaient colorés avec une solution de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, 0.125 mg/ml). Les cellules étaient visualisées sous un microscope à fluorescence (Leica, Bensheim, Allemagne). Les expressions de PPAR γ et de lactase étaient aussi évaluées dans des coupes histologiques de biopsies duodénales humaines (collection biologique locale approuvée par le comité d'éthique local (No DC-2008-642)). Les échantillons de tissus étaient fixés dans une solution de paraformaldehyde, puis déshydratés, et incorporés dans de la paraffine. Les coupes de 4 μ m d'épaisseur étaient traitées 10 min avec une solution bloquant les peroxydases endogènes (GeneTex) et 15 min avec une solution de blocage streptavidine/biotine (Vector Labs). Les coupes étaient ensuite incubées 10 min dans du TBS avec 0,1% de Triton X-100, à 4°C et bloquées 10 min à température ambiante avec du sérum de veau à 5% dans du TBS avec Tween- 20 0.05% puis 10 min à température ambiante avec BSA 3% dans du lait 5%. Les coupes étaient ensuite incubées une nuit à 4°C avec des anticorps primaires anti-lactase ou anti-PPAR γ (Novus Biological) aux dilutions de respectivement 1:100 et 1:50. Après deux lavages dans du Tween 0.05% dans du TBS, les coupes ont été incubées 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire dilué à 1:1000 (Jackson Immuno Research) et 30 min à

température ambiante avec de la Streptavidine-HRP diluée à 1:2000. Les protéines étudiées étaient détectées comme des précipités bruns visualisés après une courte incubation (3-5 min) avec 3,30-Diaminobenzidine (DAB) (Dako LSAB Corporation).

Évaluation de l'activité lactase

L'activité lactase des cellules Caco2 a été évaluée en utilisant une méthode dérivée de celle de Dahlquist (Glucose Assay Kit, Gago2, Sigma). Ce dosage en lactase est basé sur la quantité de glucose produite par l'action de la lactase après incubation d'une monocouche de cellules Caco2 avec une solution tampon de lactose (0.056mol/L de lactose dans un tampon 0.1mol/Na-maleate). Le surnageant était ensuite dilué avec le réactif glucose oxydase à 37°C dans une plaque à 96 puits. Après 60 minutes, la réaction était arrêtée avec de l'acide sulfurique. La plaque était alors lue par spectrophotométrie à 540 nm. Lorsque l'activité de la lactase était déterminée à partir d'échantillons d'intestin, ils étaient d'abord homogénéisés sur de la glace pilée dans du NaCl à 0,9%. Ces homogénats étaient ensuite dilués dans du NaCl à 0,9% (1/500), et 50 µl de cette dilution étaient incubés avec du tampon lactose pour déterminer l'activité de la lactase.

Génération des cellules Sh PPAR γ « PPAR γ knock down »

Les cellules épithéliales PPAR γ « knock-down » (ShPPAR γ) sont une lignée cellulaire disponible au laboratoire (Bouguen et al. 2015). Elles expriment de façon stable un ARN anti-sens contre PPAR γ conduisant une diminution spécifique et significative de l'expression de PPAR γ . Le déficit d'expression de PPAR γ était confirmé par qPCR et western-blot en comparaison à la lignée contrôle ShLuc.

Gène rapporteur

Le fragment correspondant aux premières 321 paires de bases (pb) en amont du site d'initiation de la transcription du gène de la lactase humaine était obtenu par PCR à partir d'ADN génomique de cellules Caco-2 en utilisant les oligonucléotides "Hs-Prom-0.3Kb sens" et "Hs-Prom-0.3Kb anti-sens". Les produits de PCR étaient ensuite clonés dans un vecteur TOPO pCR4 (TOPO TA cloning, Invitrogen) puis séquencés afin de rechercher la présence éventuelle d'erreur de Taq Polymerase. Un fragment sans mutation était cloné dans un vecteur pGL4.10 [Luc2] (Promega). Cette construction et le témoin vectoriel vide étaient ensuite transfectés dans des cellules Caco-2 en utilisant la technologie Nucleofector™ (Solution SE, programme DS 123). Les cellules transfectées étaient ensuite traitées par un agoniste de PPAR γ pendant 24 heures. L'activité Luciferase était mesurée en utilisant le kit Promega et un compteur multilac Wallac Victor2™ 1420 (PerkinElmer).

Mutagenèse dirigée

Les constructions "pGL4LucPromLCT MUT" et "pGL4Luc-PromLCT DEL " étaient créées en utilisant le kit QuickChange Site-directed Mutagenese (Stratagene) selon les instructions du fabricant, en utilisant le vecteur "pGL4LucPromLCT" comme modèle et les oligonucléotides "0.3 kb Mut Fwd"/"0.3 kb Mut Rev" pour la synthèse du "pGL4LucPromLCT MUT" et les oligonucléotides "0.3 kb Del Fwd"/"0.3 kb Del Rev" pour la synthèse de "pGL4LucPromLCT DEL". Après la vérification des séquences, les clones positifs étaient utilisés en transfection.

Immunoprécipitation à la chromatine (ChIP)

La liaison physique de PPAR γ sur le promoteur du gène de la lactase a été étudiée par des expériences de ChIP dans les cellules Caco-2 stimulées pendant 24 heures avec le GED 1mM. Les cellules Caco2 ont été plantées à une densité de 5 millions de cellules par boîte (de 10 cm

diamètre). Ces cellules ont été synchronisées par ajout d'un milieu sans sérum pendant 16h puis stimulées 24h selon le protocole décrit ci-dessus. Les cellules ont ensuite été rincées au PBS puis les complexes ADN-Protéines ont été fixés par ajout de PAF 1% 30 minutes à température ambiante. Cette fixation a été stoppée grâce à l'ajout de glycine 0.125M 5 min à température ambiante. Après cette étape, le travail a été effectué à 4°C (sur glace). La lyse cellulaire a été réalisée par décollement avec du PBS avec inhibiteurs de protéases (SIGMA). Le culot cellulaire obtenu par centrifugation a été repris dans un tampon SDS (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH8, inhibiteurs de protéases) et soniqué, à l'aide d'un sonicateur (Diagenode, Bioruptor UCD200TM-EX) afin d'obtenir des fragments de chromatine de 100pb à 1kb. L'input a été prélevé à ce moment (contrôle qui représente la chromatine totale de l'échantillon et qui sert ensuite à calculer le pourcentage de chromatine immunoprécipitée). Il a été réalisé ensuite une immunoprécipitation des complexes avec l'anticorps spécifique anti-PPAR γ (PPAR γ , mouse monoclonal IgG2a, clone K8713, R&D systems ; PPAR α mouse monoclonal antibody, clone 3B6, Thermo Fisher Scientific) par incubation une nuit à 4°C. Une étape de « preclearing » a été réalisée afin d'éliminer les complexes « billes de sepharoses-chromatine non spécifiques ». Le lendemain, 4 lavages ont été effectués afin de détacher les complexes non-spécifiques. L'ADN co-immunoprécipité a ensuite été extrait grâce au tampon d'extraction (0.1M NaHCO₃, 1% SDS). Le dépontage des complexes ADN-Protéines est enfin réalisé par incubation toute la nuit à 65°C. L'ADN est alors purifié grâce au kit PCR Clean-up (Macherey-Nagel) et analysé par PCR.

Expérimentation animale

Les expérimentations animales étaient réalisées à l'animalerie de l'Institut Pasteur Lille accrédité pour les expérimentations animales (Institut Pasteur de Lille, France; 35009) conformément aux directives gouvernementales (no 2010/63 / UE; Décret 2013-118). Ces expérimentations étaient validées par le comité d'éthique animale (protocole 05273.01). Des souris males C57BL/6 et des rats Sprague Dawley ont été obtenus auprès de Janvier Labs

(France). Afin d'évaluer l'effet du GED et du CLA sur l'expression et l'activité de la lactase, les souris C57BL/6 sevrées (âgées de 8 semaines) et les rats Sprague Dawley sevrés (âgés de plus de 2 mois) étaient randomisés en deux groupes recevant un gavage intra-gastrique quotidien de 30 mg/kg de GED, 200 mg/kg de CLA, ou du placebo (CMC 0.5%, Tween-80 1%). Après 7 jours de traitement, les animaux étaient euthanasiés et le tube digestif était extrait par laparotomie médiane. Des sections de 0,5 cm d'intestin proximal étaient extraites et congelées. L'expression de l'ARNm de lactase et l'activité de la lactase étaient évaluées comme décrit ci-dessus. L'effet du GED sur les symptômes associés à l'intolérance au lactose était évalué chez des rats sevrés nourris avec un régime enrichi en lactose fourni par Ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Allemagne). Les animaux étaient surveillés quotidiennement, pesés et la consistance des selles était évaluée à l'aide d'une échelle de Bristol modifiée (Heaton et al. 1992). Des échantillons des différents segments de tube digestif de 5 souris KO PPAR $\gamma^{\Delta IEC}$ et de 5 souris témoins nous ont été fournis gracieusement par le Pr Metzger Daniel (Institut de génétique, de biologie moléculaire et cellulaire, Strasbourg). Ces souris présentent une abolition de l'expression de PPAR γ spécifiquement dans les cellules épithéliales. Cette abolition de l'expression de PPAR γ a été induite à l'instant souhaité par exposition au tamoxifène.

Quantification SCFA

Les acides gras à chaîne courte ont été extraits et quantifiés comme décrit dans Alexandre et al. (2013).

Génotypage

Le génotypage des polymorphismes C/T-13910 et G/A-22018 du gène de lactase dans cellules Caco-2 ont été déterminées comme décrit dans Matthews et al (2005).

Analyse statistique

Les données sont présentées en moyenne, avec l'erreur type de la moyenne (SEM) ou écart type (SD). Tous les graphiques ont été tracés et analysés avec le logiciel GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA) en utilisant un test non paramétrique Mann-Whitney. Les tests statistiques ont été validés avec le soutien d'un statisticien. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives. Les valeurs P exactes étaient indiquées (sauf lorsque $P < 0,0001$).

4.2.3 Résultats

L'expression de l'ARNm, de la protéine et de l'activité de la lactase est induite par les agonistes de PPAR γ dans les cellules Caco-2

Les résultats du microarray ont été confirmés par qRT-PCR. Une surexpression significative de la lactase était observée dans les conditions GED 1mM (fold change 5,76 +/- 0,89), Pio 1mM (fold change 14,77 +/- 1,37), et 5-ASA 30 mM (fold change 9,57 +/- 1,96) (figure 10A). Afin de confirmer ces résultats, nous avons également étudié deux autres agonistes du PPAR γ : la rosiglitazone (Rosi, 1 μ M), autre ligand de la classe de médicaments TZD, et le CLA à 1 mM, un agoniste naturel de PPAR γ . Les deux ont significativement augmenté l'expression de l'ARNm de la lactase (Rosi, fold change 12,08 +/- 2,00 ; CLA, 4,03 +/- 0,27) (Figure 10A). L'étude de dose a montré que l'induction de l'ARNm de la lactase était optimale avec GED 1mM, la Pio 1 mM, le CLA 1mM, et la Rosi 10 μ M dans des cellules Caco-2.

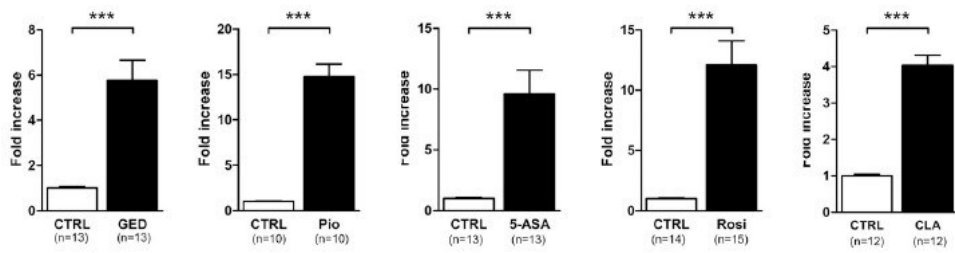
L'immunohistochimie et l'analyse en Western blot ont montré que l'expression de la protéine lactase étaient aussi induite dans les cellules Caco-2 stimulées par les différents agonistes de PPAR γ (GED, Pio, Rosi et CLA ; Figure 10B et C).

L'étape suivante était de confirmer que ces agonistes étaient capables d'augmenter l'activité de l'enzyme lactase dans ces mêmes cellules. Pour cela, nous avons utilisé la méthode de Dahlqvist grâce à laquelle nous étions capables d'évaluer le taux de glucose produit dans le surnageant de culture d'une monocouche de cellules Caco-2 après incubation avec du lactose (Dahlqvist. 1968). Le GED 1mM, Pio 1mM, Rosi 1mM et CLA 1mM augmentaient significativement l'activité lactase par rapport aux cellules non traitées (fold change 2 à 9) (Figure 10D), sans modification du glucose l'absorption des cellules Caco-2. Cet effet des agonistes de PPAR γ sur l'expression de la lactase n'a pas été observé pour les autres disaccharidases exprimées par des cellules Caco-2 telles que la sucrase-isomaltase (SIM) et la

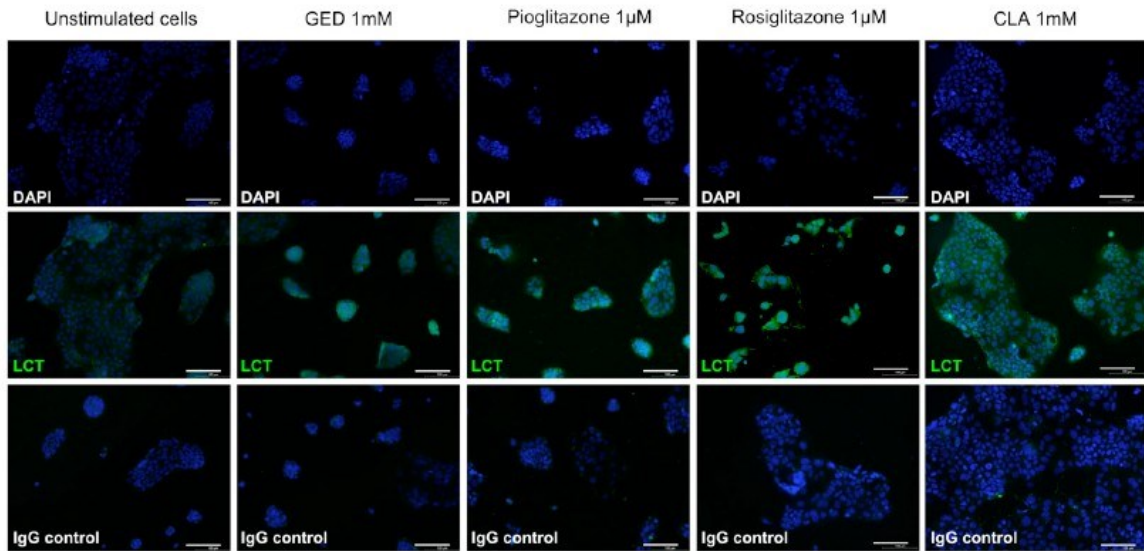
maltase-glucoamylase (MGAM).

De façon intéressante, les cellules Caco-2 se sont révélées présenter un génotype C/C-13910 et G/G-22018, suggérant que les agonistes PPAR γ sont capables d'induire l'expression de la lactase dans les génotypes lactase non-persistants (Enattah et al, 2002 ; Troelsen, 2005).

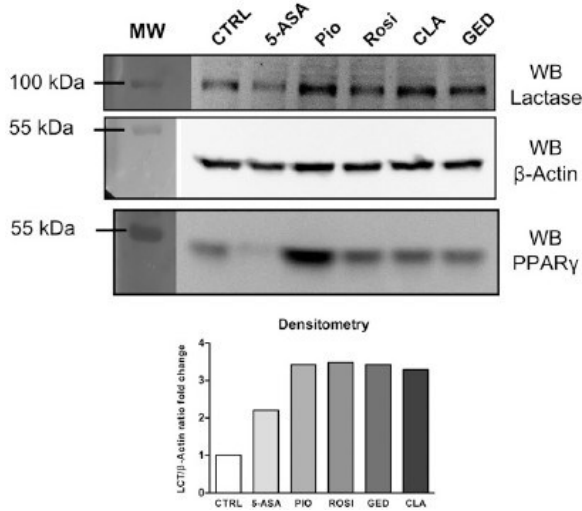
A LCT gene expression (mRNA)



B LCT protein expression (immunofluorescence)



C LCT protein expression (Western-Blot)



D LCT activity

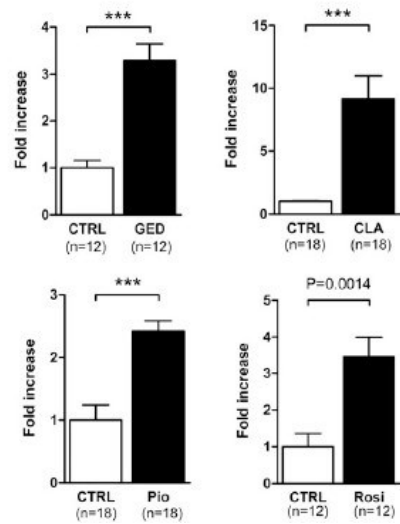


Figure 10. Les agonistes de PPAR γ augmentent l'expression et l'activité de la lactase dans des cellules Caco-2.

- A. Analyse par PCR quantitative (qPCR) de l'expression du gène lactase (LCT) dans des cellules Caco-2 stimulées par les différents agonistes de PPAR γ .
- B. Evaluation de l'expression de la protéine lactase (vert) par immunofluorescence des cellules Caco-2 stimulées par les différents agonistes de PPAR γ . Les noyaux sont colorés avec du DAPI (bleu).
- C. Evaluation de l'expression de la protéine lactase par Western Blot dans des cellules Caco-2 stimulées par les différents agonistes de PPAR γ
- D. Evaluation de l'activité lactase dans des cellules Caco-2 stimulées par les différents agonistes de PPAR γ selon la méthode de Dalhquist.

PPAR γ est un régulateur transcriptionnel du gène lactase

Nous nous sommes ensuite attachés à étudier la présence de PPRE dans le promoteur du gène lactase. L'analyse *in silico* des 3000 pb en amont du site de d'initiation de la transcription du gène humain lactase a révélé la présence de plusieurs PPRE potentiels, DR1 et DR2, par lesquels PPAR γ pourrait réguler l'expression de la LCT (Figure 11A). L'analyse de ces PPRE en immunoprécipitation à la chromatine a révélé qu'un DR2 situé entre -223 et -210 pb en amont du site d'initiation de la transcription pouvait être lié à PPAR γ au sein du promoteur lactase dans des cellules Caco-2 stimulées pendant 24 h par du GED 1mM. L'analyse en PCR quantitative a montré que la quantité de PPAR γ lié à ce PPRE doublait après stimulation par du GED 1mM (Figure 11A). Un fragment génomique contenant ce DR2 a ensuite été cloné en amont du gène de la luciférase dans un vecteur pGL4 (construction pGL4Luc-promLCT). Dans ces cellules transfectées, l'activité luciférase était significativement augmentée après stimulation par du GED 1mM (Figure 11B).

Afin de poursuivre l'étude de cet élément de réponse, nous avons ensuite modifié sa séquence par mutagenèse dirigée dans la construction pGL4LucpromLCT. Nous avons créé deux nouveaux plasmides rapporteurs: dans le premier, la séquence "AGG" dans le DR2 a été mutée en "TTT" (construction pGL4Luc-promLCT MUT), dans la seconde, la séquence "AGG" était entièrement supprimée (construction pGL4Luc-promLCT DEL) (Figure 11B). Bien que ces deux constructions étaient encore sensibles au GED, l'induction de l'activité luciférase était significativement plus faible par rapport à la construction non-mutée pGL4Luc-promLCT (Figure 11B), confirmant le rôle fonctionnel de l'élément de réponse DR2 dans le promoteur du gène lactase.

L'expression de la lactase est dépendante de PPAR γ

Pour confirmer davantage le rôle et la spécificité de PPAR γ dans la contrôle de l'expression du gène LCT, nous avons construit une lignée Caco-2 ShPPAR γ exprimant de manière stable

un ARN anti-sens en épingle contre PPAR γ , régulant négativement son expression (Bouguen et al. 2015). Dans ces cellules, l'expression en ARN et l'activité de la lactase étaient significativement réduites comparativement aux cellules témoins Caco-2 ShLuc (Figure 11C). De même, l'induction de l'activité lactase par le GED et le CLA était fortement réduite dans cette même lignée (Figure 11C). L'induction de l'expression de la lactase par le GED était également significativement réduite par le GW9662, un antagoniste spécifique de PPAR γ (Figure 11D).

L'expression du gène lactase était significativement diminuée dans la partie proximale de l'intestin grêle des souris présentant une délétion spécifique de PPAR γ dans les cellules épithéliales intestinales (souris PPAR $\gamma^{\Delta IEC}$; Figure 11E) par rapport aux animaux témoins. Les expressions des gènes PPAR γ et lactase étaient significativement corrélées dans le duodénum et jéjunum de rats Sprague-Dawley de type sauvage (Figure 12). Nous avons aussi observé que PPAR γ et la lactase étaient co-exprimés dans les entérocytes du duodénum humain (Figure 13).

Le fénofibrate, un agoniste spécifique du PPAR α , était incapable de moduler l'activité LCT et la transcription du gène lactase dans Cellules Caco-2 (figure 11F) confirmant le caractère PPAR γ spécifique de l'expression de la lactase. De plus, les analyses en CHIP utilisant un anticorps PPAR α n'ont pas entraîné la détection du fragment 8a-8b (Figure 11A). Nous avons également observé que l'expression de PPAR α n'était pas modifiée dans la lignée cellulaire ShPPAR γ ou dans l'intestin grêle des souris PPAR $\gamma^{\Delta IEC}$ (Figure 12G). Finalement, afin d'éliminer définitivement l'implication éventuelle de PPAR α dans la modulation de l'expression du gène LCT, nous avons évalué l'induction de l'ARNm de lactase dans des cellules Caco-2 traitées avec GW6471, un inhibiteur PPAR α spécifique (Figure 11H). Aucune différence des niveaux d'ARNm LCT, n'était observée dans les cellules Caco-2 stimulées par le GED, le CLA, la Pio ou la Rosi après un prétraitement par du GW6471 et les cellules témoins (figure 11H).

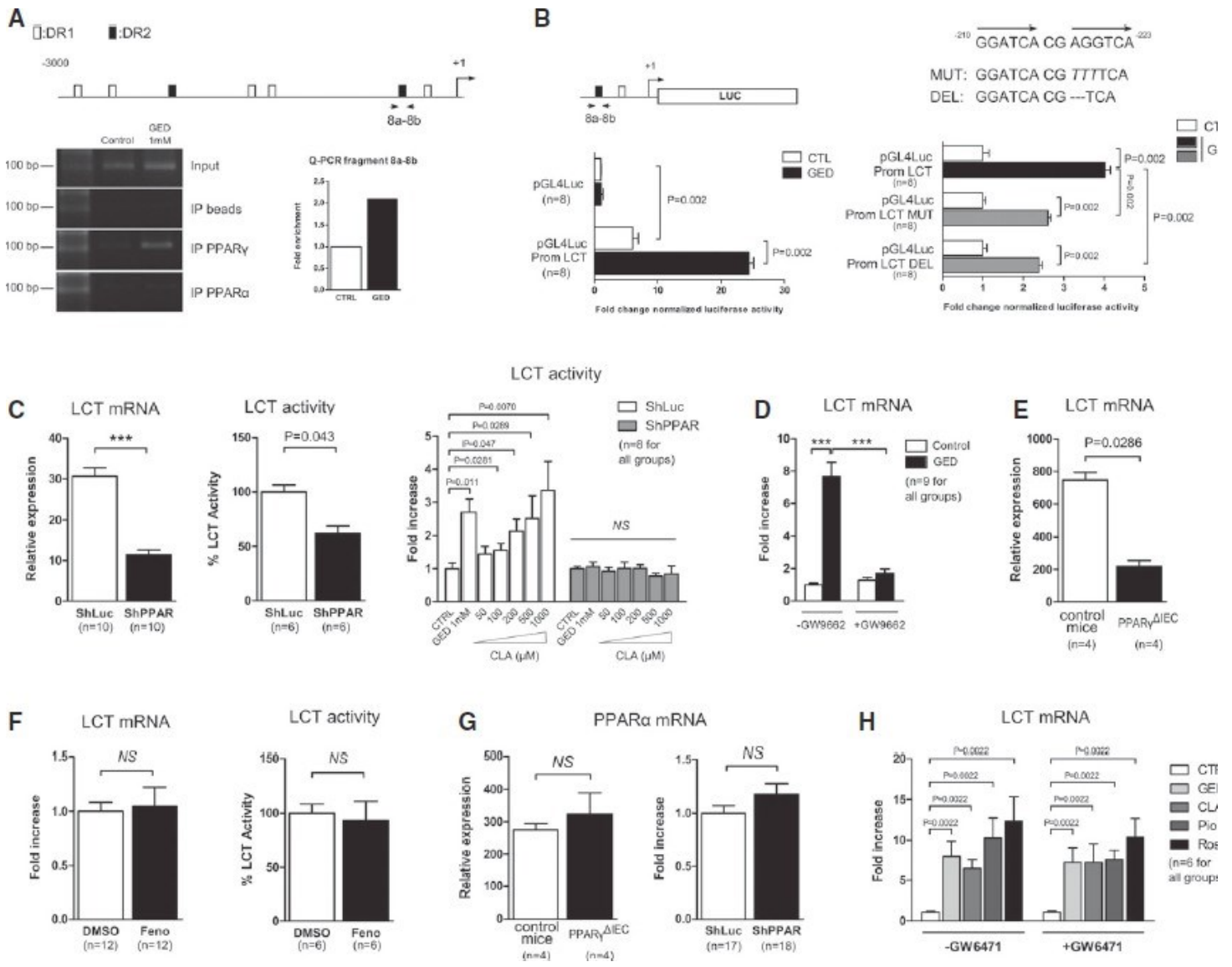


Figure 11. L'expression de la lactase est dépendante de PPAR γ

A. Test d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Sur la partie supérieure de la figure est représenté le PPRE mis en évidence par l'analyse in Silico.

B. Activité luciférase dans des cellules Caco-2 transfectées avec le pGL4Luc-PromLCT,

pGL4Luc-PromLCT MUT et le pGL4Luc-PromLCT DEL. Les cellules transfectées avec la construction pGL4Luc vide était utilisées comme témoin.

C. Expression du gène lactase et de son l'activité dans les cellules Caco-2 knock-out PPAR γ (ShPPAR) par rapport aux cellules témoins (ShLuc).

D. Effet du GW9662 sur l'induction de l'expression du gène lactase (mARN) dans les Caco-2 stimulées par du GED.

E. Expression de l'ARNm lactase dans l'intestin grêle proximal de souris PPAR $\gamma^{\Delta IEC}$.

F. Expression de l'ARNm lactase et activité de l'enzyme lactase dans les cellules Caco-2 stimulées avec le fénofibrate.

G. Expression de l'ARNm de PPAR γ dans l'intestin grêle de souris PPAR $\gamma^{\Delta IEC}$ et dans des cellules Caco-2 ShPPARc/ShLuc.

H. Effet du GW6471 sur l'induction de l'expression du gène lactase dans les Caco-2 par le GED, le CLA, la Pioglitazone et la Rosiglitazone.

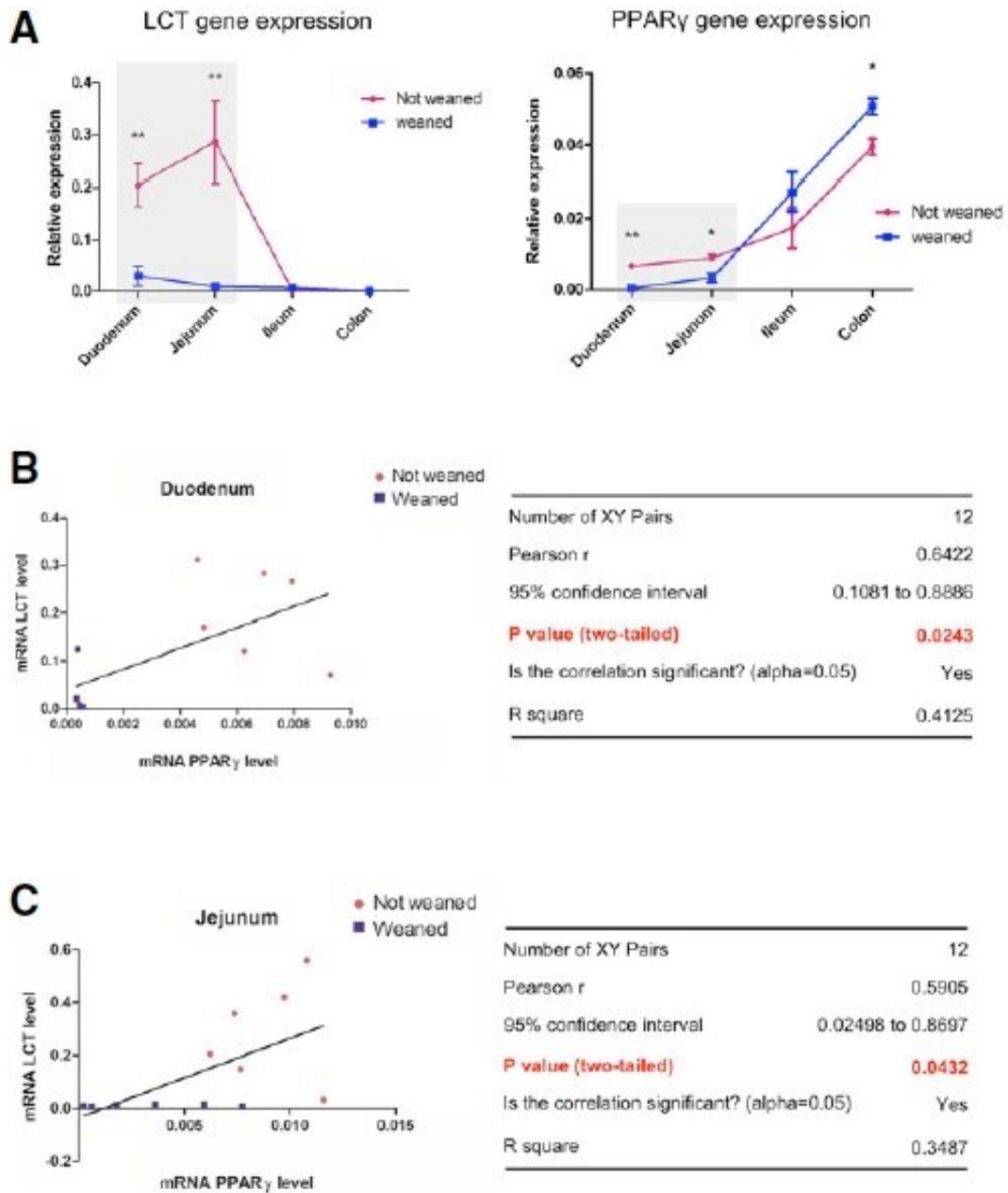


Figure 12. A. Evaluation de l'expression de l'ARNm de la lactase et de PPAR γ dans l'intestin grêle de rongeurs sevrés et non sevrés. B et C. Corrélation entre l'expression de l'ARNm Lactase et PPAR γ chez les rongeurs.

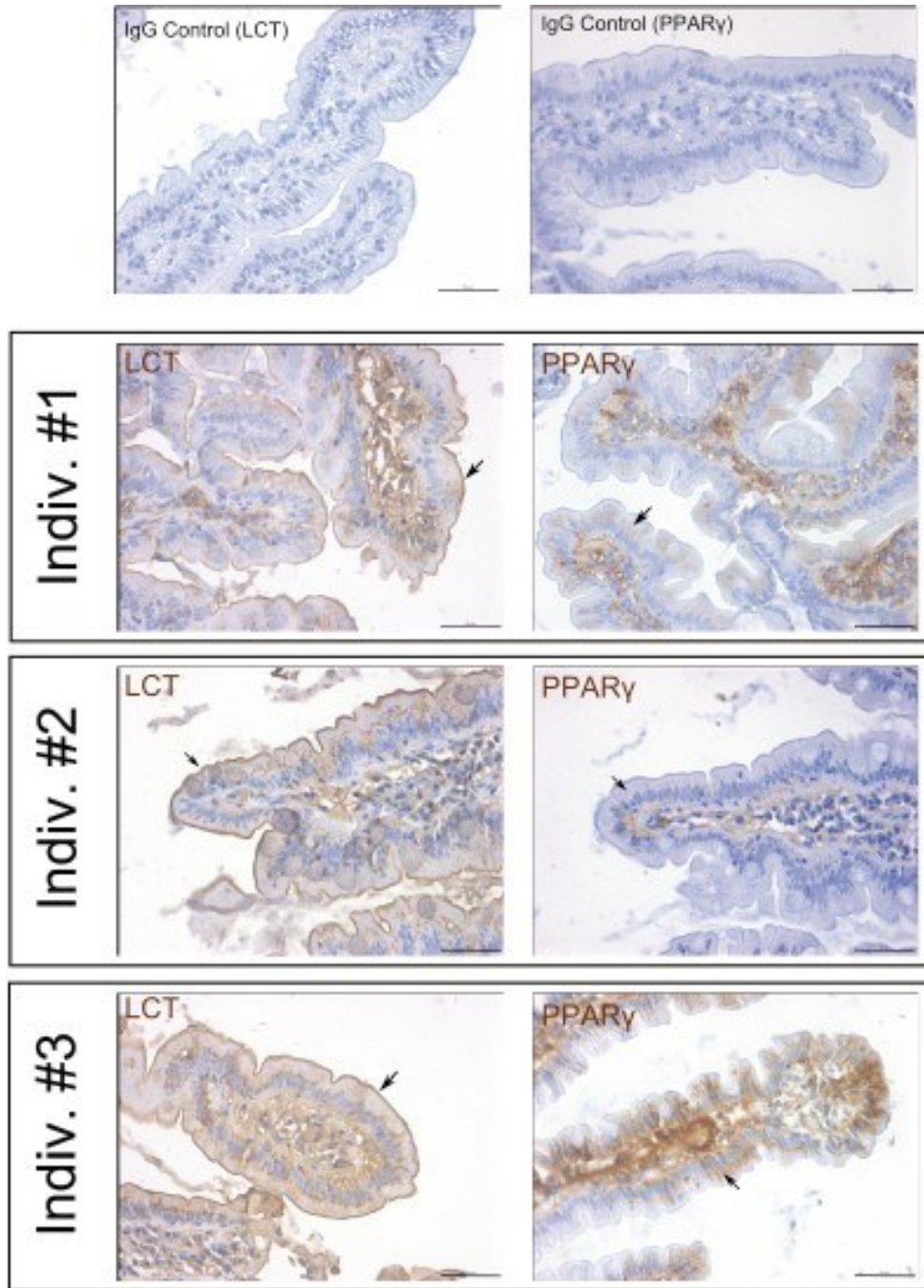


Figure 13. Expression des protéine lactase et PPAR γ dans les entérocytes des duodénums humains par immunohistochimie.

PPAR γ contrôle l'expression de la lactase chez les rongeurs

Pour explorer davantage *in vivo* la relation entre PPAR γ et la lactase, nous avons évalué l'impact des agonistes de PPAR γ sur de l'expression du gène lactase chez les rongeurs. Ainsi, 30 mg/kg de GED ou 200 mg/kg de CLA étaient administrés quotidiennement par gavage pendant 7 jours à des Souris C57BL/6 ou à des rats Sprague Dawley sevrés. L'expression en ARNm et l'activité LCT étaient évaluées dans la partie proximale de l'intestin grêle. Les deux agonistes de PPAR γ augmentaient significativement l'expression de la LCT et son activité *in vivo* (Figures 13A et B).

Les agonistes de PPAR γ améliorent les symptômes de l'intolérance au lactose chez le rongeur

Nous avons ensuite voulu évaluer l'impact de ces agonistes sur les symptômes d'intolérance au lactose. À cette fin, nous avons d'abord dû mettre en place un modèle d'intolérance au lactose. Des rats sevrés, naturellement lactase non persistants (Figure 13A), étaient nourris avec une alimentation enrichie en lactose (15% ou 60% de la ration totale). En comparaison aux animaux témoins, qui avaient reçu un régime iso-calorique sans lactose, les rats du groupe lactose présentaient une perte de poids et une diarrhée. Une augmentation significative du poids et de la taille du caecum était aussi observée (Figure 3C-E), reflétant une augmentation de l'activité de fermentation du lactose non digéré comme en témoigne l'augmentation marquée de la concentration d'acides gras à chaîne courte (SCFA) dans le caecum (Figure 3F).

Nous avons ensuite évalué l'impact des agonistes de PPAR γ dans notre modèle. La consistance des selles et le poids du caecum ont été rapidement et significativement améliorés après gavage par du GED (40 et 20% d'amélioration moyenne, respectivement, Figure 3D et

E). Le GED diminuait aussi significativement la concentration caecale en AGCC induite par le régime lactose (Figure 3F).

Ces résultats suggèrent donc que les agonistes de PPAR γ pourraient améliorer les symptômes d'intolérance au lactose qui associent habituellement diarrhées, douleurs abdominales, et météorisme abdominal après l'ingestion de lactose chez l'homme.

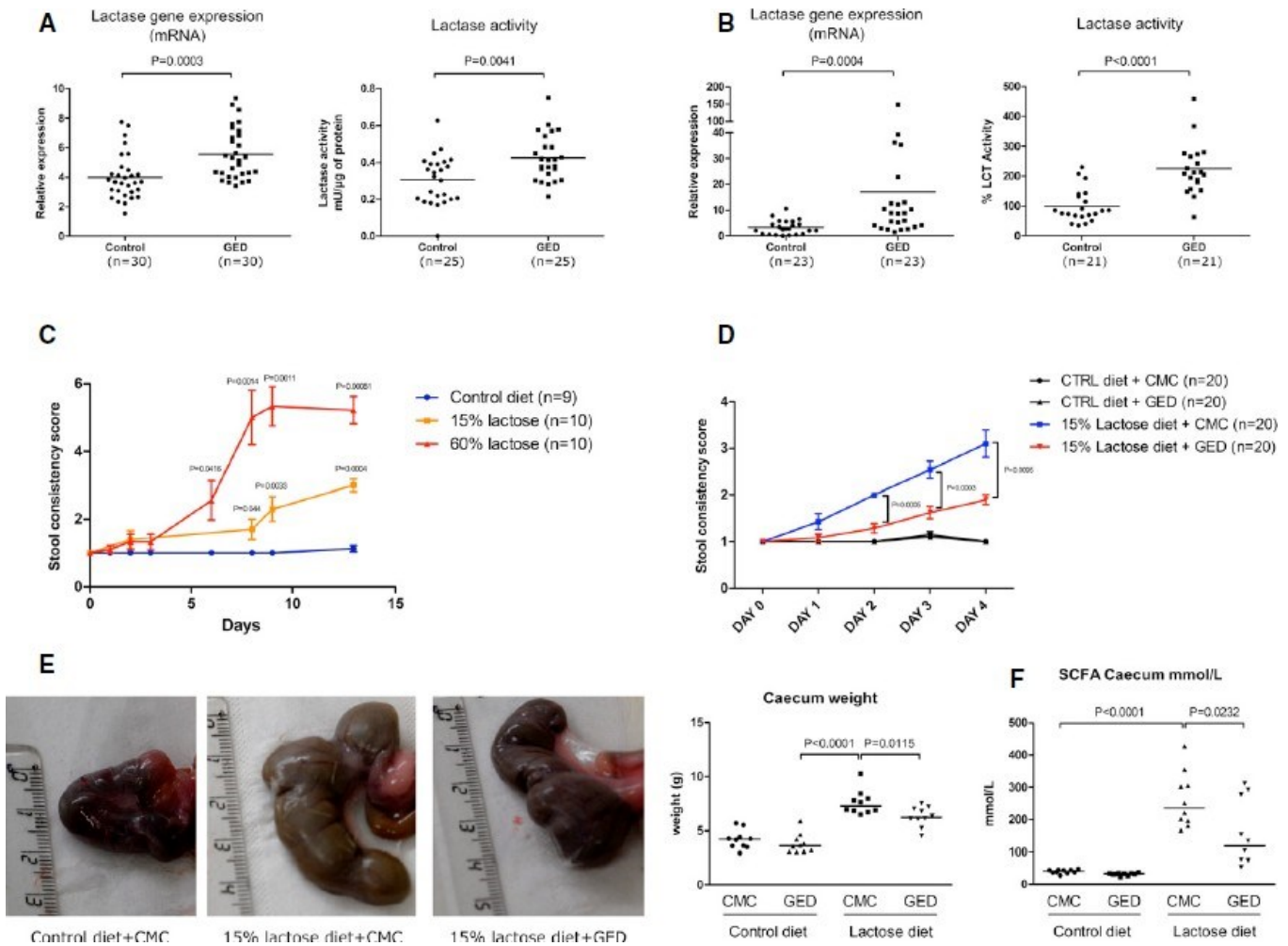


Figure 12. PPAR γ contrôle l'expression de la lactase chez les rongeurs

A - B. L'expression du gène lactase (qPCR) et de l'activité lactase évaluées dans l'intestin grêle proximal de souris C57BL/6 (A) et de rats Sprague-Dawley (B) sevrés traités avec du GED par voie orale (30 mg/kg) pendant 7 jours. Les résultats représentent la somme de trois expériences indépendantes.

C. Les scores de consistance des selles (selon l'échelle de Bristol modifiée) au cours du temps

chez les rats sevrés nourris avec des régimes enrichis en lactose à 10% et 60%.

D. Score de consistance des selles (selon l'échelle de Bristol modifiée) chez les rats avec et sans régime enrichi en lactose traités ou non avec du GED par voie orale à 30 mg/Kg. Les résultats représentent la somme de deux expériences indépendantes (n = 20 pour chaque groupe).

E. La dilatation de caecum induite par le régime riche lactose était amélioré par le GED oral. Les photographies montrent des images représentatives de la morphologie du caecum dans les divers groupes (n = 10 pour chaque groupe).

F. Concentration totale d'acides gras à courtes chaînes (mmol/l) dans le contenu caecal (n = 10 pour chaque groupe).

4.2.4 Conclusion

1. Les agonistes synthétiques et naturels de PPAR γ sont capables d'induire l'expression de l'ARNm LCT, de la protéine lactase et d'augmenter son activité dans les cellules Caco-2, malgré leur génotype « lactase non-persistant ».
2. L'induction de l'expression du gène de la lactase par les agonistes de PPAR γ *in vitro* et *in vivo* est PPAR γ -dépendante. Le gène Lactase est identifié ici pour la première fois comme un gène cible de PPAR γ .
3. PPAR γ est identifié ici pour la première fois comme un gène contrôlant l'homéostasie du glucose dans l'intestin.
4. Nous décrivons pour la première fois un mécanisme pharmacologique capable de moduler l'expression du gène Lactase. Les agonistes de PPAR γ synthétiques ou naturels pourraient améliorer les symptômes de l'intolérance en lactose en diminuant la malabsorption du lactose.

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) regulates lactase expression and activity in the gut

Mathurin Fumery^{1,2,3}, Silvia Speciani², Audrey Langlois², Anne-Marie Davila⁴, Caroline Dubuquoy⁵, Marta Grauso⁴, Anthony Martin Meana^{1,2}, Martin Figeac⁶, Daniel Metzger⁷, Christel Rousselleux⁵, Jean-Frederic Colombel⁸, Laurent Dubuquoy^{1,2}, Pierre Desreumaux^{1,2,9} & Benjamin Bertin^{1,2} • e

Abstract

Lactase (LCT) deficiency affects approximately 75% of the world's adult population and may lead to lactose maldigestion and intolerance. Currently, the regulation of LCT gene expression remains poorly known. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) is a key player in carbohydrate metabolism. While in the intestine is essential for carbohydrate digestion and absorption, the role of PPAR1 in enterocyte metabolic functions has been poorly investigated. This study aims at characterizing PPAR γ target genes involved in intestinal metabolic functions. In microarray analysis, the LCT gene was the most upregulated by PPAR γ agonists in *caco-2* cells. We confirmed that PPAR1 agonists were able to increase the expression and activity of LCT both *in vitro* and *in vivo* in the proximal small bowel of rodents. The functional response element activated by PPAR1 was identified in the promoter of the human LCT gene. PPAR modulation was able to improve symptoms induced by lactose-enriched diet in lean rats. Our results demonstrate that PPAR γ regulates LCT expression, and suggest that modulating intestinal PPAR γ activity might constitute a new therapeutic strategy for lactose maldigestion.

Keywords hypodactasia intestinal epithelial cells; lactase; lactose intolerance; PPARgamma

Subject Categories Metabolism; Pharmacology & Drug Discovery
001101S2S2/emmm.20170779SI Received 13 March 2017 | Revised 29 August 2017 | Accepted 1 September 2017 | Published online 25 September 2017
EMBO Mol Med (2017) 9: 1471–1481

Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcriptional factors and a master gene for the control of glucose homeostasis and lipid metabolism (Tonozon & Spiegelman, 2008). To date, most studies have evaluated the role of PPAR γ in major metabolic organs such as liver, adipocytes, pancreas, or skeletal muscles (Ahmadian *et al.*, 2013), leading to target PPAR γ for the treatment of type 2 diabetes with the development of the thiazolidinedione (TZD) class of drugs (Lehmann *et al.*, 1995). Besides adipocytes, the other major tissue expressing PPAR γ is the intestine (Fajers *et al.*, 1997). Genomic profiling of intestinal epithelial cells (IEC) stimulated with PPAR γ agonists, as well as functional studies in mice, demonstrated the roles played by this receptor in the gut (Bertin *et al.*, 2013). However, its precise functions within the intestine are poorly known and most of its target genes, notably in IEC, remain to be characterized.

The aim of this study was therefore to identify PPAR γ target genes involved in IEC metabolic functions and homeostasis. Our results identified the gene encoding lactase (LCT) enzyme as a new gene regulated by PPAR γ in IEC. Our data demonstrated that both synthetic and natural PPAR γ agonists are able to increase the expression and activity of LCT *in vitro* and *in vivo*. The PPAR γ ligand-dependent improvement of symptoms induced by a lactose-enriched diet in rodent further supports the important role played by the activation of PPAR γ in lactose metabolism.

1 U9954, IREC-Lille Inflammation Research International Center, Univ. Lille, Lille, France

2 Inserm, U99, S, Lille, France

3 Service d'Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalier universitaire d'Amiens, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

4 UMRO114, Institut National de la Recherche Agronomique/AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Paris, France

5 Intestinal Biotech Development, Lille, France

6 Functional Molecular Genomic Platform, Université de Lille, Lille, France

7 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, UMR7104/INSERM U964/Université de Strasbourg, Collège de France, Paris, France

8 The Henry D. Janowitz Division of Gastroenterology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

9 CHU Lille Service des Maladies de l'Appareil Digestif de la Nutrition, Hôpital Claude Huriez, Lille, France

• Corresponding author. Tel: +33 2062 7738; E-mail: benjamin.bertin-2@univ-lille.fr

These authors contributed equally to this work

Results and Discussion

Lactase mRNA, protein, and activity are induced by PPAR γ agonists in Caco-2 cells

Gene expression profiles of the Caco-2 intestinal epithelial cell line stimulated by PPAR γ agonists were first assessed by microarray analysis. We used three different PPAR γ agonists: the well-characterized pioglitazone (Pio; 1 μ M) belonging to the TZD drug class (Mooseker et al., 1991), 5-amino salicylic acid (5-ASA, 30 mM) (Rousseaux et al., 2005), and a new PPAR γ modulator M developed and named GED-050734-Levo (GED; 1 and 30 mM) (Pirat et al., 2012; Mastrofrancesco et al., 2014). Among the 44,000 genes tested, M observed that the LCT gene was the most upregulated gene in cells treated with Pio and GED. The LCT gene was significantly 5.23-fold (\pm 0.55; $P < 0.05$) upregulated by 1 mM GED, 8.23-fold (\pm 1.7; $P < 0.05$) upregulated by 30 mM GED and 17.93-fold (\pm 5.1; $P < 0.05$) upregulated by Pio compared to unstimulated cells. 5-ASA also upregulated LCT mRNA expression 10-fold (8.76-fold \pm 2.06, $P < 0.05$) (GEO Series accession number GSE68852; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE68852>). These results were confirmed in independent experiments by evaluating LCT gene expression by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Significant LCT overexpression was induced by 1 mM GED (5.76 \pm 0.89-fold change), 1 μ M Pio (14.77 \pm 1.37-fold change), and 30 mM 5-ASA (9.57 \pm 1.96-fold change) (Fig 1A). In order to strengthen these results, we also evaluated the ability of two other PPAR γ agonists to increase LCT expression: rosiglitazone (Rosi, 1 μ M), another TZD drug class ligand, and the trans-10, d⁵-12-conjugated linoleic acid (CLA, 1 mM) isomer, a natural PPAR γ modulator. Both of them significantly increased LCT mRNA expression (Rosi, 12.0 \pm 2.00-fold change; CLA 4.03 \pm 0.27-fold change) (Fig 1A). Dose-response evaluation showed that LCT mRNA upregulation was optimal with 1 mM GED, 1 μ M Pio, 1 mM CLA, and 10 μ M Rosi in Caco-2 cells (Fig EV1). In addition, immunostaining and Western blot analysis demonstrated induction of LCT protein in Caco-2 cells stimulated by CFD, Pio, Rosi, and CLA (Fig 1B and C). We then evaluated the potential induction of LCT activity in Caco-2 cells by PPAR γ agonists by measuring the rate of glucose production in culture supernatant resulting from the action of LCT after incubation of a monolayer of Caco-2 cells with lactose (Dahlqvist, 1968). Stimulation of Caco-2 cells by 1 mM GED, 1 μ M Pio, 1 μ M Rosi, and 1 mM CLA significantly increased LCT activity compared to untreated cells (from more than twofold and up to more than ninefold) (Fig 10), without modification of glucose

uptake or Caco-2 cells (Appendix Fig S1). This PPAR γ effect on LCT gene induction was not extended to other disaccharidases expressed by Caco-2 cells such as sucrose-isomaltase (SIM) and maltase-glucoamylase (MGAM) (Fig EV2).

Several elements of the genetic control of LCT gene expression have been elucidated (Troelsen, 2005; Curry, 2013). Among the single nucleotide polymorphisms characterized in the human LCT gene, two major polymorphisms, C4910 and C13910, were linked to hypolactasia (LCT gene expression deficiency) with homozygous CC4910 and CC13910 genotypes associated with the lactase non-persistent phenotype (Enanah et al., 2002; Swallow, 2003; Troelsen, 2005). The functional link between the C(-13910) allele and epigenetic changes that lead to lactase non-persistence has been recently established (Labrie et al., 2016). Interestingly, Caco-2 cells were found to be CC4910 and CC2101 (Fig EV3), suggesting that PPAR γ agonists may be able to control LCT expression in lactase non-persistent genotypes.

Together, these data demonstrate that PPAR γ agonists are able to induce LCT mRNA and activity in Caco-2 cells which possess the hypolactasia-associated genotype.

PPAR γ is a transcriptional regulator of the LCT gene

These results led us to investigate the presence of PPAR response element (PPRE) sequences in the LCT gene promoter. *In silico* analysis of the 3,000 base pairs upstream from the transcription start site of the human LCT gene revealed the presence of several potential PPRE, DR1, and DR2, by which PPAR γ may regulate LCT gene expression (Fig 2A and Appendix Fig S2). Chromatin immunoprecipitation analysis of these putative PPRE revealed notably that a DR2 located between -223 bases pairs (bp) and -210 bp upstream of the transcription start site was bound by PPAR γ within the LCT gene promoter in Caco-2 cells stimulated for 24 h by 1 mM GED. Quantitative PCR analysis showed a 2-fold increase of the amount of PPAR γ bound to this PPRE after 1 mM GED stimulation compared to unstimulated cells (Fig 2A). A genomic fragment containing this DR2 was cloned upstream to the luciferase gene into a pGL3 vector (pGL3-Luc-promLCT construct) and tested in a reporter gene assay in Caco-2 cells. In these transfected cells, luciferase activity was significantly increased after CFD stimulation compared to untreated cells (Fig 2B). Similar results were obtained with pioglitazone (Appendix Fig S3). In order to confirm the involvement of the DR2 as a functional response element, we modified the sequence of the response element by site-directed mutagenesis in the pGL3-Luc-promLCT reporter construct. We created two

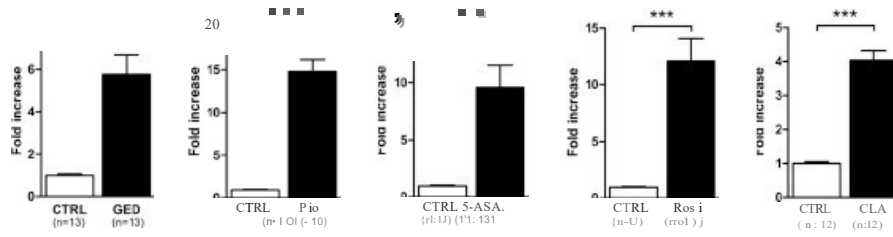
Figure 1 PPAR γ agonists specifically induce LCT expression and activity in Caco-2 cells.

- A. Quantitative PCR (qPCR) analysis of LCT gene expression in stimulated Caco-2 cells. Cells were stimulated for 24 h with each agonist. Results represent the fold change of LCT gene expression normalized to GAPDH. The expression level measured in control cells was used as reference and defined as 1.
- B. Immunofluorescence staining of Caco-2 cells for LCT protein (green). Cells were stimulated for 24 h with each agonist. Nuclei are stained with DAPI (blue). Non-relevant IgG was used as control. Magnification \times 100.
- C. Western blot analysis of LCT protein expression from stimulated Caco-2 cells. Densitometric analysis was used to quantify LCT protein.
- D. LCT activity in Caco-2 cells stimulated for 24 h. Results represent the fold change of LCT activity with respect to the activity measured in control cells arbitrarily defined as 1.

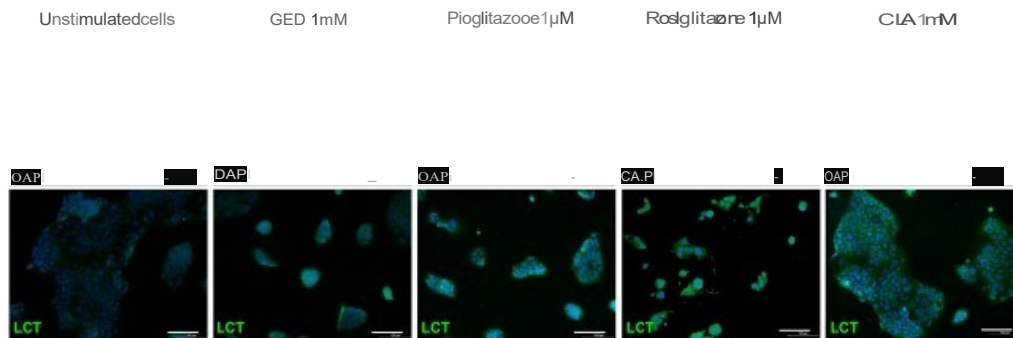
Data information: (A-D) Data are expressed as mean \pm SEM (two to four independent experiments). Statistical analysis: two-tailed nonparametric Mann-Whitney U-test. $p < 0.0001$.

Source data are available online for this figure.

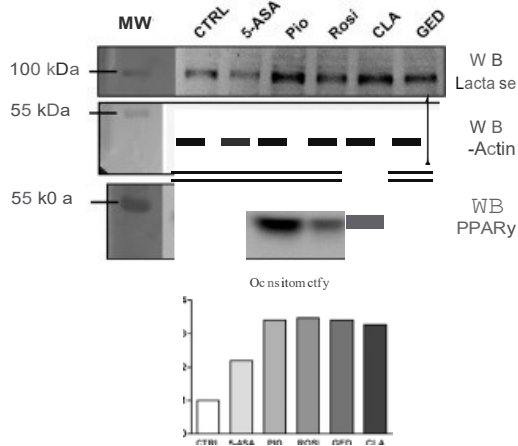
A LCT gene expression (mRNA)



B LCT protein expression (immunofluorescence)



C LCT protein expression (Western-Blot)



D LCT activity

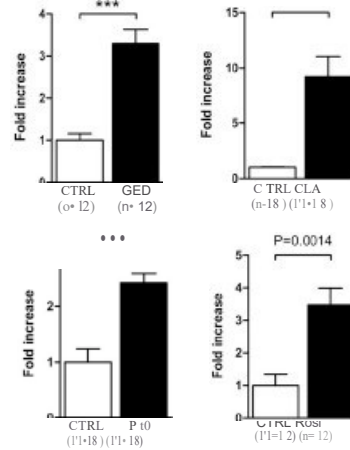


Figure 1

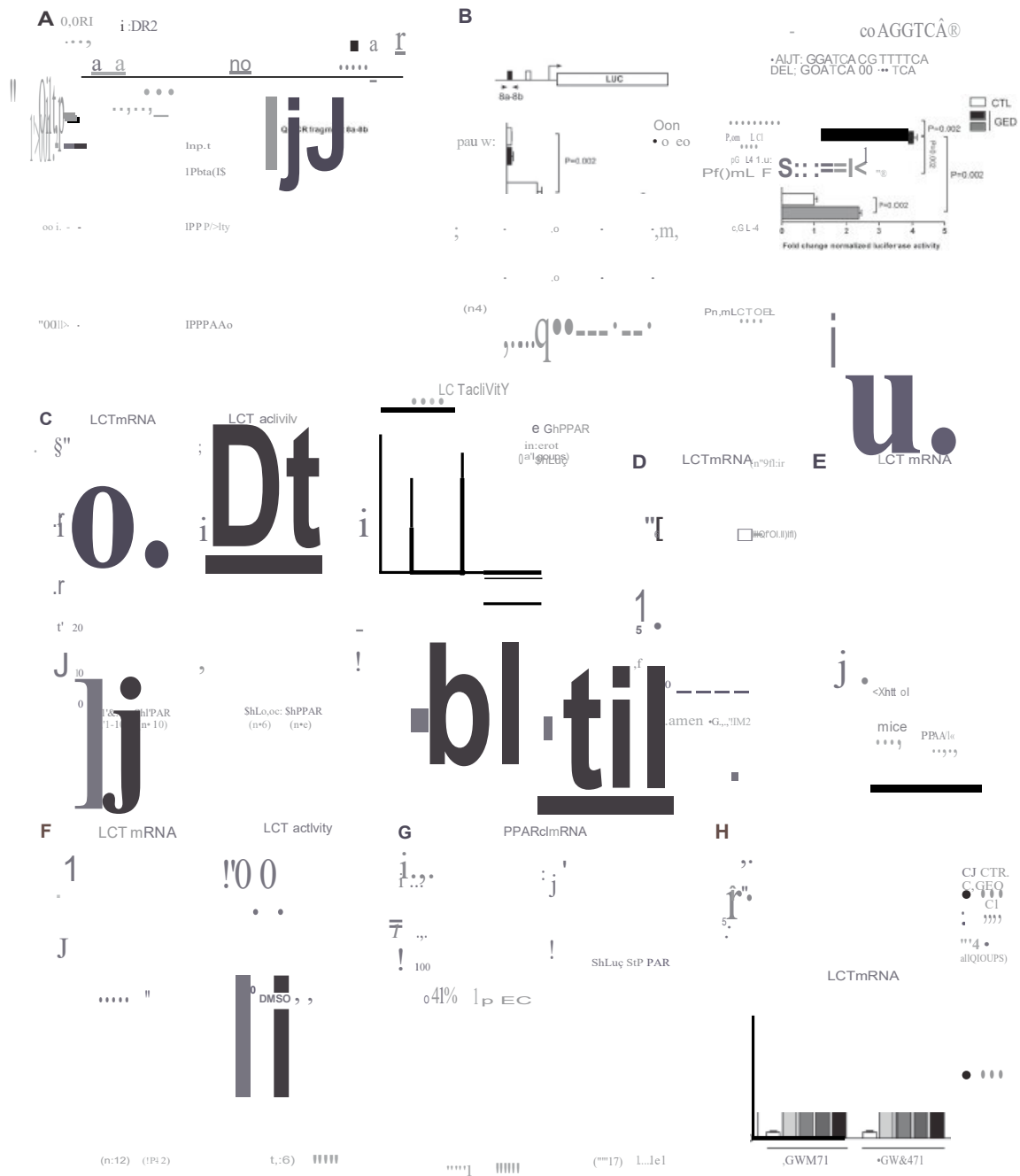


Figure 2. PPAR γ is a transcriptional regulator of the LCT gene.

A Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay. The top diagram depicts the PPAR predicted by *in silico* analysis. The picture shows PCR amplification of the 8a-8b fragment in ChIP assay from Caco-2 cells. Graph bars represent quantification of the Sa-Sb fragment by qPCR. Results are expressed as fold enrichment with amplification from control cells defined as 1.

B Luciferase reporter assay in Caco-2 cells transfected with pGL4, pGL4-Luc, pGL4-Luc ProrbtCT MUT and pGL4-Luc ProrbtCT DEL reporter constructs. Cells transfected with empty pGL4-Luc were used as control. Results represent the fold change of luciferase activity normalized to protein content.

C LCT mRNA expression measured by qPCR and LCT activity in PPAR γ knockdown Caco-2 cells (ShPPAR) compared to control cells (ShLuc). LCT activity in ShPPAR cells is compared to ShLuc cells stimulated by GEO and CLA. The activity levels measured in control cells were arbitrarily defined as one.

D Effect of GW662 on GED-dependent induction of LCT gene expression in Caco-2 cells. LCT mRNA expression was determined by qPCR. Results represent the fold change of LCT gene expression. The expression level measured in control cells (w/o GEO and GW662) was used as reference and defined as 1.

E LCT mRNA expression in the proximal small intestine of PPAR γ knockdown mice. Results represent the mean \pm SD.

F LCT mRNA expression in Caco-2 cells stimulated with GW662 compared to control cells (DMSO).

G PPAR α mRNA expression in the small intestine of PPAR γ knockdown mice (left) and in Caco-2 ShPPAR/ShLuc cells (right). For mice results, data represent the mean \pm SD.

H Effect of GW662 on GED-CLA, Plo- and Rosi-4-dependent induction of LCT gene expression in Caco-2 cells. Results represent the fold change of LCT gene expression. The expression level measured in control cells was used as reference and defined as 1.

Data information: Data are expressed as mean \pm SEM (two to four independent experiments) for panels A, E and mouse data shown in G). Statistical analysis: two-tailed nonparametric Mann-Whitney U-test; * p < 0.0001; NS, not significant.

new reporter plasmids: in the first one, the "ACE" sequence within the DR2 was mutated into "TJT" (pGL4-Luc promLCT MUT construct), and in the second one, the "AGG" sequence was entirely deleted (pGL4-Luc promLCT DEL construct) (Fig 2B). Although

these two constructs were still responsive to GED in transient

transfection, the induction of luciferase activity was significantly less efficient (by nearly two fold) compared to the non-mutated

reporter construct pGLuc, c promLCT (Fig 2B). This observation endorsed the hypothesis of a functional role of the DR2 response element in the LCT gene promoter.

To further confirm the role and specificity of PPAR γ in the control of LCT gene expression, we constructed a Caco-2 ShPPAR γ cell line that stably expresses a short hairpin anti-sense RNA against PPAR γ , leading to specific downregulation of PPAR γ (Bouguen *et al.*, 2015) (Appendix Fig S4). In these cells, both LCT gene transcription and activity were significantly reduced by 63 and 33%, respectively, compared to Caco-2 ShLuc control cells (Fig 2C). In addition, both GED and CLA-dependent induction of LCT activity were strongly compromised in PPAR γ knockdown cells (Fig 2C). The induction of LCT expression by GED was also markedly reduced by GW9662, a specific PPAR γ antagonist (Fig 2D). Moreover, LCT gene expression was significantly decreased in the proximal part of the small intestine of knockout mice presenting a specific deletion of PPAR γ in IEC (PPAR γ^{AIEC} KO mice; Fig 2E) compared to control animals, and PPAR γ and LCT gene expression were significantly correlated in the duodenum and jejunum of wild-type Sprague Dawley rats (Fig EV4). Interestingly, we also observed that LCT and PPAR γ proteins were co-expressed in the enterocytes of human duodenum (Appendix Fig S5). Finally, since some of the ligands used in our study are known to be able to weakly activate the PPAR α receptor, we also assessed the potential involvement of this receptor in the control of LCT gene expression. We observed that fenofibrate, a specific PPAR α agonist, was unable to modulate LCT activity and LCT gene transcription in Caco-2 cells (Fig 2F). Moreover, ChIP assays using a PPAR α antibody did not result in the detection of fragment 8a–8b (Fig 2A and Appendix Fig S3). We also observed that PPAR α expression was not modified in the ShPPAR γ cell line or in small intestine of PPAR γ^{AIEC} mice (Fig 2G) making participation of PPAR α in the control of LCT expression in these two systems unlikely. Finally, in order to clarify definitively the possible involvement of PPAR α in the modulation of LCT gene expression induced by our PPAR γ agonists, we assessed LCT mRNA induction in Caco-2 cells treated with GW6471, a specific PPAR α inhibitor (Fig 2H). No difference of LCT mRNA levels induction by GED, CLA, Pio, and Rosi was observed between GW6471-treated Caco-2 cells and control untreated cells (Fig 2H). Taken together, our results strongly suggest that PPAR α activation is not involved in the control of LCT gene expression.

In mammals, the expression of the lactase gene is tightly regulated in a spatio-temporal manner. The lactase activity is usually greatest during the postnatal period and in infants, and then, lactase gene expression is downregulated after weaning. Although significant progress has been made, the underlying molecular mechanisms of this complicated pattern of expression are still incompletely understood. Several regulatory factors have been implicated in the control of lactase expression, such as Cdx-2 (caudal-related homeobox protein), nuclear receptors belonging to HNF (hepatocyte nuclear factor) family, GATA factors, or Oct-1 (Troelsen, 2005; Jarvela *et al.*, 2009). Our data clearly demonstrate that PPAR γ is also an essential factor controlling LCT gene expression. The overexpression of PPAR γ in the duodenum and jejunum of not weaned rats compared to weaned animals (Fig EV4) suggests that PPAR γ might be an important component of the molecular machinery involved in the maintenance of LCT expression before weaning. Moreover, a key finding of our study is also the first description of a pharmacological mechanism by which LCT gene expression is able to be modulated.

Modulation of PPAR γ increases LCT expression and activity *in vivo* in rodents and improves lactose intolerance symptoms in rats

To further explore *in vivo* the relationship between PPAR γ and LCT, we assessed the potential induction of LCT gene expression by PPAR γ modulators in rodents. Briefly, 30 mg/kg of GED or 200 mg/kg of CLA was administered daily by gavage for 7 days to weaned C57BL/6 mice or Sprague Dawley rats, and LCT activity and mRNA level were measured in the proximal part of the small intestine. Both PPAR γ agonists significantly increased LCT expression and activity *in vivo* (Figs 3A and B, and EV5). This result led us to test whether modulating PPAR γ was able to improve symptoms associated with lactose intolerance. For this purpose, weaned rats that are naturally LCT non-persistent (Fig EV4) were fed with a lactose-enriched diet (15 or 60% of total diet weight, Appendix Table S1). Compared to control animals, which received an isocaloric lactose-free diet, rats in the lactose groups lost weight, developed loose stools and diarrhea, and presented a significant increase in cecum weight and size (Appendix Fig S6, Fig 3C–E). Cecum dilatation reflected an increased fermentation activity of undigested lactose as revealed by the marked increase in total short-chain fatty acids (SCFA) concentration in the cecum contents of rats receiving lactose-enriched diet (Fig 3F). Stool consistency and cecum weight were rapidly and significantly improved by GED gavage in animals fed with a lactose-enriched diet (40 and 20% mean improvement, respectively, Fig 3D and E). GED treatment also significantly improved lactose-induced SCFA production in rat's cecum (Fig 3F).

This improvement in stool consistency along with the decrease in fermentation products and cecal dilatation obtained in GED-treated rats clearly suggests that modulating PPAR γ activity might be clinically relevant to improve lactose maldigestion which usually associates diarrhea, abdominal pain, flatulence, and/or bloating after lactose ingestion in humans. Lactose intolerance prevalence cannot be evaluated with available data, but it has been estimated that hypolactasia, the LCT non-persistent phenotype, affects approximately 75% of the world's adult population with marked disparity according to ethnic origin (Sahi, 1994). Current management of lactose intolerance is based on exclusion of lactose intake. However, in addition to be naturally present in mammalian milk and dairy products, lactose is largely used in the food and pharmaceutical industry (as a bulking agent or vehicle), making nearly impossible the avoidance of this "hidden" lactose for patients. Moreover, the restriction of dairy products, often applied by individuals with lactose intolerance, fails to provide the daily recommended intake of calcium, leading to increased risk of osteoporosis, but also of development of obesity and cardiovascular diseases (Tremblay & Gilbert, 2011; Wang *et al.*, 2012; Zhu & Prince, 2012). Our results suggest that it might be possible to restore lactose tolerance through the modulation of PPAR γ in hypolactasic patients and to overcome potential health concerns as well as the quality of life impairment associated with lactose intolerance.

A newly major objective in the field of nutrition research is the development of functional food products with demonstrated health benefits (Roberfroid, 2000). In this context, alternative to synthetic PPAR γ agonists, that is, PPAR γ modulators naturally present in diet or in medicinal plants, are currently a major topic of interest (Wang *et al.*, 2014; Sauer, 2015). The ability of one of this natural PPAR γ modulator, the trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid (CLA)

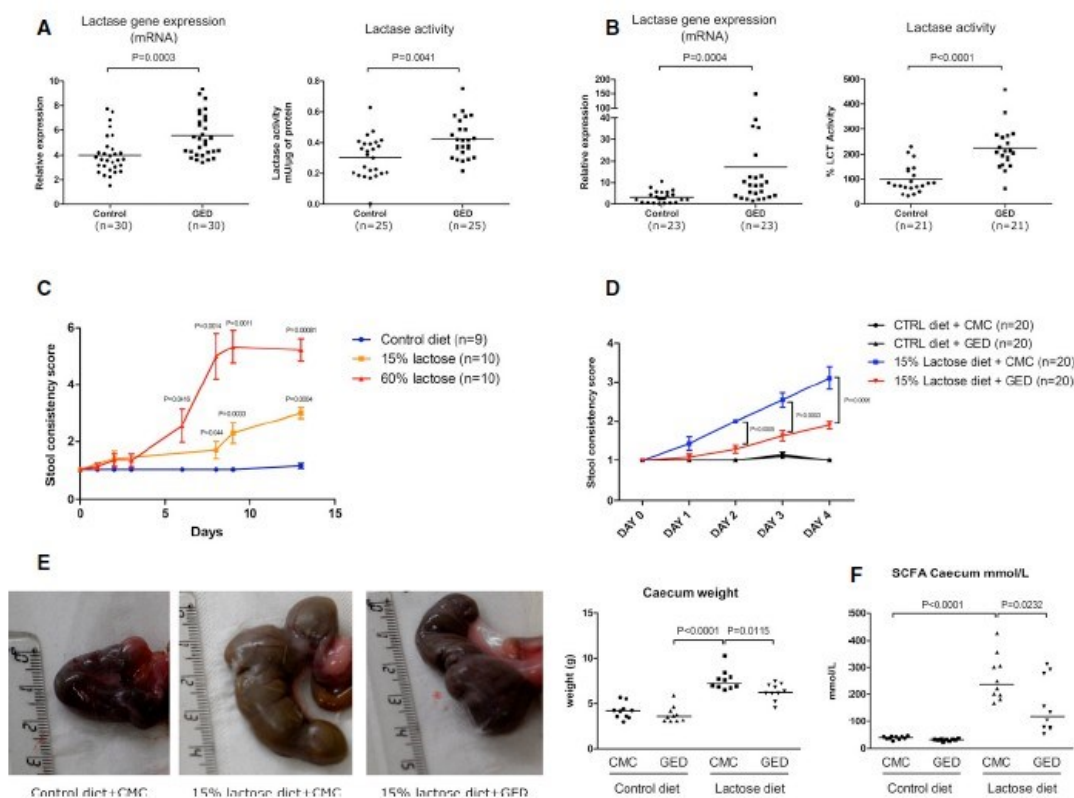


Figure 3. LCT expression and activity *in vivo* in rodents following GED administration.

A, B LCT gene expression (qPCR) and LCT activity were assessed in the proximal small intestine of weaned C57BL/6 mice (**A**) and Sprague Dawley rats (**B**) treated with oral GED (30 mg/kg) for 7 days. Results represent the sum of three independent experiments. Horizontal bars represent mean values. LCT activities in rats are expressed as the percentage of activity compared to that measured in control animals (arbitrarily defined as 100%).

C Stool consistency scores over time in weaned rats fed with lactose-enriched diets. *P*-values between lactose groups and control diet are indicated.

D Stool consistency score in rats with and without lactose-enriched diet treated or not with GED. Results represent the sum of two independent experiments ($n = 20$ for each group).

E Cecum dilatation induced by lactose diet was improved by GED treatment. Photographs show representative pictures of cecum size and morphology in the various groups. Results of caecum weight for one experiment ($n = 10$ for each group) are represented in the dot plot graph. Horizontal bars represent mean values.

F Total SCFA concentration (mmol/l) in the caecal contents ($n = 10$ for each group). Horizontal bars represent mean values.

Data information: (C, D) Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis: two-tailed nonparametric Mann–Whitney *U*-test.

isomer, to induce the LCT expression and activity (Figs 1A and D, and EV5) strongly suggests that PPAR γ agonists naturally present in food sources might be promising for the management of lactose malabsorption.

Our results identified the gene encoding LCT as a new gene regulated by PPAR γ and extend the pivotal role of PPAR γ in the control of glucose homeostasis in the gut. We describe for the first time a pharmacological mechanism able to modulate LCT gene expression in LCT non-persistent phenotypic and genotypic contexts. We propose that controlling intestinal PPAR γ activity by means of PPAR γ ligands might improve lactose malabsorption and the symptoms of lactose intolerance.

Materials and Methods

Cell culture and treatment

Caco-2 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Dutscher, Brumath, France), 1% penicillin-streptomycin (5 ml/l) (Invitrogen, Life technologies), and 1% non-essential amino acids (5 ml/l) (Invitrogen, Life technologies). All cell lines were cultured as confluent monolayers at 37°C in a controlled, 5% CO $_2$ atmosphere. Caco-2 cells spontaneously differentiate

to a small bowel phenotype after confluency (Ding *et al*, 1999).

For cell stimulations, 1×10^6 cells per well were seeded in six-well plates. Serum deprivation was used 16 h prior to stimulation in order to synchronize the cells. Cells were treated with various concentrations of GED (Nogra Pharma Ltd, Italy), pioglitazone (Sigma-Aldrich), 5-ASA (Sigma-Aldrich), CLA (Sigma-Aldrich), rosiglitazone (Sigma-Aldrich), or fenofibrate (Sigma-Aldrich). The PPAR γ antagonist GW9662 (10 μ M) and PPAR α antagonist GW6471 (10 μ M) were used concomitantly with the agonist. When necessary, the DMSO vehicle (Sigma-Aldrich) was used as control. After 24 h of stimulation, cells were washed three times with sterile PBS before RNA extraction. Cell stimulations were performed in four replicates for microarray analysis and in three, four, or six replicates for other stimulations.

RNA extraction

Total RNA was extracted with a Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) according to manufacturer's instructions. After RNase inactivation, total RNA was cleaned of genomic DNA traces by DNase treatment and eluted in RNase-free DEPC-treated water. The purity of the RNA was evaluated by UV spectroscopy on a Nanodrop system (Nyxor Biotech, Paris, France) from 220 to 350 nm. Before microarray experiments, RNAs were also profiled on an Agilent 2100 bioanalyzer. One μ g of total RNA with a minimum concentration of 50 ng/ μ l was used in the microarray and qRT-PCR analysis.

Microarrays

Dual-color gene expression microarrays were used to compare the cRNA from the samples. 44,000 genes were screened. The RNAs from the samples were first reverse-transcribed into cDNA (Affinity-Script RT, Agilent), which were then used as the substrate for the synthesis and amplification of cRNA by T7 RNA polymerase in the presence of cyanine 3-CTP for the CTL sample (green fluorescence) and cyanine 5-CTP for the PPAR γ agonist sample (red fluorescence). The two-labeled cRNAs were mixed, hybridized on the same array (G4851A Agilent 8 \times 44K), and then scanned (with an Agilent G2505B scanner). Fluorescence was visualized after laser excitation and the relative intensities of the two fluorophores were expressed as a ratio, in order to yield the over- or under-expression status of each gene (using GeneSpring software (Agilent)). This analysis was performed for each PPAR γ agonist. Data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (Edgar *et al*, 2002) and are accessible via GEO Series accession number GSE68852 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE68852>).

Quantitative PCR

Expression of genes of interest was quantified by quantitative PCR of corresponding reverse-transcribed mRNA. One μ g of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems). Amplification was performed using an ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystem) using Power SYBR[®] Green PCR master Mix (Applied Biosystem). Primer pairs for each human transcript were chosen

with qPrimer depot software (<http://primerdepot.nci.nih.gov>). See Appendix Table S2 for the oligonucleotides used in this study. Quantification of qPCR signals was performed using Δ Ct relative quantification method using GAPDH as a reference gene for human and rat samples and β -actin for mouse samples. Values were represented in terms of relative quantity of mRNA level variation or fold increase compared to control conditions.

Western blot analysis

6×10^6 Caco-2 cells were treated 24 h with PPAR γ agonists, 5-ASA (30 mM), Pio (1 μ M), Rosi (1 μ M), GED (30 mM), and CLA (1 mM), and then, total protein was extracted in RIPA buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, and 10% glycerol, supplemented with 100 mM sodium fluoride (NaF), 2 mM sodium orthovanadate (Na₂VO₄), 10 mM sodium pyrophosphate (NaPPi), 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), and a classical protease-inhibitor cocktail (Complete Mini, EDTA-free, Roche). 50 μ g of protein for each sample was separated by SDS-PAGE electrophoresis and transferred in 100% pure nitrocellulose membranes. After two washes in TBS-Tween buffer containing 30 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, and 0.1% Tween-20, membranes were blocked 2 h in 5% non-fat dry milk in TBS supplemented by 0.05% Tween-20 and probed 2 h a RT with primary antibodies directed against lactase (Novus Biological, monoclonal mouse, clone 3C105.1, 1:200), PPAR γ (Cell Signaling, monoclonal rabbit, clone C₆H₁₂, 1:1,000), and β -actin (Sigma, monoclonal mouse, clone AC-15, 1:5,000) diluted in 1% non-fat dry milk in 0.05% TBS-Tween. Membranes were then incubated with secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies [anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch) and anti-mouse (Sigma)], 1:10,000 in 1% non-fat dry milk in 0.05% TBS-T for 1 h at room temperature.

Immunodetection was performed with SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Thermo Scientific Pierce, Erembodegem) according to manufacturer's protocol. Chemiluminescent signals were captured by a cooled charged coupled device (CCD) camera, and the optical density of target bands was determined using a computer-assisted densitometer and the ImageJ public domain software (W. S., Rasband, ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2011). Protein levels for each sample were expressed as units of optical density (OD) per quantity of total proteins and normalized with the β -actin, and results were expressed as fold change compared to the control groups.

Immunofluorescence and immunohistochemistry

Immunofluorescence

After 24 h of stimulation by 1 mM GED, 1 μ M Pio, 1 μ M Rosi, and/or 1 mM CLA, Caco-2 cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min, permeabilized in 0.1% Triton X-100 phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min at room temperature, and then incubated with blocking buffer [3% bovine serum albumin (BSA) in PBS]. Incubation with primary lactase antibody (HPA007408 from Atlas Antibodies; dilution 1:200) was performed overnight 4°C. Normal Goat IgG (Invitrogen) was used as negative control. Incubation with secondary antibody (goat anti-rabbit Alexa 488 labeled (Invitrogen); dilution 1:100) was performed 1 h at room temperature. Nuclei

were stained with Hoechst 33342 solution (0.125 mg/ml) (Sigma-Aldrich). Cells were visualized under a fluorescence microscope (Leica, Bensheim, Germany).

Histological sections of human duodenal biopsies (our biological collection of human intestinal specimens: a local ethics committee approved the study and all subjects gave informed consent (No. DC-2008-642); the experiments conformed to the principles set out in the WMA Declaration of Helsinki and the Department of Health and Human Services Belmont Report) were examined for PPAR γ and lactase staining. Tissue specimens were fixed in fresh 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS solution for 3 h at room temperature, were dehydrated in a graded ethanol series, and embedded in low-temperature-fusion paraffin. 4- μ m-thick sections were treated 10 min with an endogenous peroxidase blocking kit (GeneTex) and 15 min with a Streptavidin/Biotin Blocking Kit (Vector Labs). Then, sections were restored by 10 min of incubation in TBS supplemented with 0.1% Triton X-100, at 4°C and blocked 10 min at RT with 5% calf serum in TBS supplemented by 0.05% Tween-20 and 10 min at RT with 3% BSA in 5% non-fat dry milk. Sections were incubated overnight at 4°C with monoclonal mouse primary anti-lactase or polyclonal rabbit anti-PPAR γ (both purchased from Novus Biological) at the dilution of 1:100 and 1:50, respectively. After two washes in 0.05% Tween in TBS, sections were incubated 1 h at RT with biotinylated secondary antibody diluted 1:1,000 (donkey anti-mouse purchased from Jackson Immuno Research) in 0.05% Tween in TBS and 30 min at RT with Streptavidin-HRP diluted 1:2,000. The specific proteins were detected as brown precipitates obtained by a short incubation (3–5 min) with 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (Dako LSAB Corporation), a chromogen substrate for peroxidase enzyme. Sections were counterstained with Harris hematoxylin and observed under the Leica DM2000 light microscope at 40 \times magnification.

Lactase activity

Lactase activity was evaluated by using a glucose oxidase method (Glucose Assay Kit, Sigma) previously described by Dahlqvist (1968). This lactase assay is based on the measurement of the amount of glucose produced following the action of lactase by incubating samples with a lactose buffer solution (0.056 mol/l lactose in a 0.1 mol/l Na-maleate buffer). For Caco-2 cells, lactase activity was determined directly from the cell monolayer. After extensive washing, the cell monolayer was incubated with lactose buffer for 1 h at 37°C. The supernatant was recovered; 50 μ l was diluted with 100 μ l of glucose oxidase reagent and incubated at 37°C for 1 h. The reaction was stopped with 100 μ l of H₂SO₄ and read by spectrophotometry at 450 nm. When lactase activity was determined from intestinal sample, tissue samples were first dounce-homogenized in 0.9% NaCl on crushed ice. These homogenates were then diluted in 0.9% NaCl (1/500), and 50 μ l of dilution was incubated with lactose buffer and used to determine lactase activity. For each experiment, the background attributed to the remaining glucose in the samples was measured by incubating cells or cell extracts in lactose-free buffer.

Glucose uptake assay

Glucose uptake was evaluated by using the glucose uptake colorimetric assay kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's

instructions. Briefly, Caco-2 cells were seeded into a 96-well plate at a density of 30,000 cells per well. Serum deprivation was used 16 h prior to stimulation in order to synchronize the cells. Cells were treated with GED (1 mM) or pioglitazone (1 μ M) for 24 h. Cells were then washed three times with PBS and were glucose-starved by incubating with 100 μ l of KRPH buffer (Krebs-Ringer-Phosphate-HEPES (KRPH) buffer—20 mM HEPES, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 136 mM NaCl, and 4.7 mM KCl, pH 7.4) containing 2% BSA for 40 min. 10 μ l of 2-deoxyglucose (2-DG; 10 mM) was then added, and incubation was continued for 20 min. 2-DG is taken up by the cells and phosphorylated by hexokinase to 2-DG6P, which cannot be further metabolized and accumulates in cells. Following incubation, cells were washed three times with PBS and lysed with 80 μ l of the extraction buffer provided. The amount of 2-DG6P (which is directly proportional to glucose uptake by the cells) was determined by a colorimetric detection assay according to the manufacturer's protocol.

Generation of PPAR γ knockdown cells

Generation of PPAR γ knockdown Caco-2 cells was described in Bouguen *et al* (2015).

Reporter gene assay

The fragment corresponding to the first 321 bp upstream to the transcription initiation site of the human lactase gene was obtained by PCR from genomic DNA of Caco-2 cells using "Hs-Prom-0.3Kb sens" and "Hs-Prom-0.3Kb anti-sens" oligonucleotides. The PCR products were cloned into a TOPO pCR4 vector (TOPO TA cloning, Invitrogen) and then sequenced in order to check for potential Taq Polymerase errors. A mutation-free fragment was subcloned into the vector pGL4.10 [Luc2] (Promega) using the *Xho*I/*Hind*III restriction sites introduced into the oligonucleotides. This construction and the empty vector control were transiently transfected in Caco-2 cells using Nucleofector™ Technology (Solution SE, program DS 123). Transfected cells were treated with PPAR γ agonist for 24 h. Luciferase activity was measured using the luciferase assay kit (Promega) in a Wallac Victor2™ 1420 multilabel counter (Perkin Elmer).

Site-directed mutagenesis

Reporter constructs "pGL4LucPromLCT MUT" and "pGL4LucPromLCT DEL" were generated using the QuickChange® Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions, using "pGL4LucPromLCT" vector as template and "0.3 kb Mut Fwd"/"0.3 kb Mut Rev" oligonucleotides for "pGL4LucPromLCT MUT" synthesis and "0.3 kb Del Fwd"/"0.3 kb Del Rev" oligonucleotides for "pGL4LucPromLCT DEL" synthesis. Following sequence verification, positive clones were used directly in transfection assays.

Chromatin immunoprecipitation experiments

The physical binding of PPAR γ onto the LCT gene promoter was studied by ChIP experiments in Caco-2 cells (5 \times 10⁶ cells) stimulated for 24 h with 1 mM GED in 100 mm cell culture petri dishes.

Caco-2 cells were synchronized by the addition of serum-free medium for 16 h and then stimulated for 24 h using the protocol described previously. Cells were then rinsed with PBS, and the protein-DNA complex was fixed by adding 1% PFA for 30 min at room temperature. This binding was stopped by the addition of glycine (0.125 M). Cells were collected by scrapping in cold PBS and protease inhibitors (Sigma). The cell pellet obtained by centrifugation was taken up in 300 μ l SDS buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8, protease inhibitors) and sonicated (Diagenode, Bioruptor UCD-200 TM-EX) for 30 s, followed by 30-s resting time, during 10 min. For each immunoprecipitation, 125 μ l of cross-linked sonicated sample was diluted with 225 μ l of IP buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, and protease inhibitors) and precleared for 4 h by adding 40 μ l of protein A/G beads (50% slurry protein A/G Sepharose, Clinisciences) and 5 μ g of salmon sperm DNA (Invitrogen). Complexes were immunoprecipitated with 2 μ g of specific antibodies (PPAR γ , mouse monoclonal IgG2a, clone K8713, R&D Systems; PPAR α , mouse monoclonal antibody, clone 3B6, Thermo Fisher Scientific) by incubation overnight at 4°C under rotation. Immune complexes were recovered by adding 40 μ l of protein A/G Sepharose (50%) plus 2 μ g salmon sperm DNA and incubated for 4 h at 4°C. The beads were washed twice in wash buffer 1 (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0.1% Deoxycholate, 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0), twice in wash buffer 2 (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 500 mM NaCl, 0.1% Deoxycholate, 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0), once in wash buffer 3 (0.25 mM LiCl, 0.5% Deoxycholate, 0.5% NP-40, 0.5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0), and three times in wash buffer 4 (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0). The co-immunoprecipitated DNA was then extracted with 150 μ l of extraction buffer (0.1 M NaHCO₃, 1% SDS). Cross-linking was reverse overnight at 65°C. DNA was then purified using the PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) and analyzed by PCR.

Animal experimentation

Animal experiments were performed in the accredited Pasteur Institute animal care facility (Institut Pasteur de Lille, France; no B59-35009) according to governmental guidelines (no 2010/63/UE; Décret 2013-118) and animal ethics committee approval (protocol no 05273.01). Specific pathogen-free male C57BL/6 mice and Sprague Dawley rats were obtained from Janvier Labs (France). Mice and rats were housed five animals/cage and three animals/cage, respectively, in a specific pathogen-free facility, in an air-conditioned room with controlled temperature (22 \pm 1°C), humidity (65–70%), and 12-h light/12-h dark cycles. Animals were fed with standard laboratory chow (except when indicated) and were provided with autoclaved tap water *ad libitum*. Animals were acclimatized for at least 1 week before entering the study.

In order to assess the effect of GED and CLA on lactase expression and activity, weaned C57BL/6 mice (8 weeks old) and weaned Sprague Dawley rats (older than 2 months) were randomized into two groups receiving daily intragastric gavage of 30 mg/kg of GED, 200 mg/kg of CLA, or vehicle (0.5% CMC, 1% Tween-80). After 7 days of treatment, animals were euthanized and the gastrointestinal tract was removed via a midline laparotomy. Approximately

0.5 cm of proximal intestine tissue specimens was snap-frozen for further extractions. LCT mRNA expression and LCT activity were assessed as described above.

The effect of GED on the symptoms associated with lactose intolerance was evaluated in weaned rats fed with a lactose-enriched diet provided by Ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Germany; Appendix Table S1). Animals were monitored daily, weighed and stool consistencies were evaluated.

C57BL/6 mice carrying a targeted disruption of the gene encoding PPAR γ in IECs were generated by breeding mice harboring a floxed PPAR γ (PPAR $\gamma^{fl/fl}$) (Imai *et al*, 2004) to transgenic mice bearing a tamoxifen-dependent Cre recombinase (vil-Cre-ERT2) expressed under the control of the villin promoter (El Marjou *et al*, 2004). Recombination and PPAR γ gene deletion were induced by tamoxifen treatment. These mice were designated “PPAR γ^{AIEC} KO mice”. Mice received an intraperitoneal injection of tamoxifen (10 mg/ml; 100 μ l) for 5 consecutive days and sacrificed. Control animals correspond to littermate control mice which do not carry transgenic Cre recombinase but received injection of tamoxifen. These mice were designated “Control mice”. Intestinal samples were collected (“PPAR γ^{AIEC} KO mice”: $n = 4$, three females and one male; “Control mice”: $n = 4$, three females and one male) and snap-frozen for further extraction.

SCFA quantification

Short-chain fatty acids were extracted and measured as described in Alexandre *et al* (2013).

Genotyping

Lactase genotyping of C/T₁₃₉₁₀ and G/A₂₂₀₁₈ polymorphisms for Caco-2 cells were determined as described in Matthews *et al* (2005).

Statistics

The data are presented as mean with SEM or SD. All graphs were plotted and analyzed with GraphPad Prism 5 Software (San Diego, CA, USA) using a two-tailed nonparametric Mann-Whitney test. Statistical tests were validated with the support of a statistician. P -values < 0.05 were considered statistically significant, and exact P -values were indicated (except when $P < 0.0001$).

Data availability

Microarray data are available at NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO Series accession number GSE68852; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE68852>).

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

We thank Céline Villenet, Sabine Quié, and Frédéric Lepretre (Functional and Structural Genomic Platform, Université de Lille) for conducting microarray experiments and the management of microarray dataset. We acknowledge the support of the DigestScience Foundation. This study was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche (Inserm), Société Nationale Française de Gastro-Entérologie (FARE 2015) and NograPharma Ltd, Dublin.

The paper explained**Problem**

Lactose intolerance is a frequent condition that causes abdominal discomfort, pain, and diarrhea. It results from lactase (LCT) enzyme deficiency (hypolactasia) produced by IECs. It is estimated that hypolactasia affects approximately 75% of the world's adult population. Except for lactose-free diet, no treatment can cure lactose intolerance and the regulation of LCT enzyme expression remains poorly understood. PPAR γ is a nuclear receptor expressed by IECs playing a key role in gut homeostasis and metabolism regulation.

Results

We identified LCT gene as one of the master regulated gene by PPAR γ modulators in IECs. We demonstrated that both synthetic and natural PPAR γ agonist ligands are able to increase the expression and activity of LCT *in vitro* and *in vivo*. We also developed a new model of lactose intolerance in weaned rodents and demonstrated that PPAR γ agonist improved symptoms induced by lactose-enriched diet.

Impact

We identified for the first time a pharmacological mechanism able to modulate LCT expression and activity. We propose that modulating intestinal PPAR γ activity by means of PPAR γ ligands might restore lactose tolerance and might improve lactose malabsorption and the symptoms associated with hypolactasia.

Author contributions

MFu, SS, A-MD, CR, LD, PD, and BB designed the study. MFu, SS, AL, A-MD, CD, MG, AMM, and BB performed experiments and analysis of the data. MFI performed and analyzed microarray experiments. DM managed and provided transgenic mice. MFu, SS, A-MD, DM, LD, J-FC, PD, and BB wrote the study and participated to the critical reading of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM (2013) PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 19: 557–566
- Alexandre V, Even PC, Larue-Achagiotis C, Blouin JM, Blachier F, Benamouzig R, Tome D, Davila AM (2013) Lactose malabsorption and colonic fermentations alter host metabolism in rats. *Br J Nutr* 110: 625–631
- Bertin B, Dubuquoy L, Colombel JF, Desreumaux P (2013) PPAR- γ in ulcerative colitis: a novel target for intervention. *Curr Drug Targets* 14: 1501–1507
- Bouguen G, Langlois A, Djouina M, Branche J, Koriche D, Dewaeles E, Mongy A, Auwerx J, Colombel JF, Desreumaux P et al (2015) Intestinal steroidogenesis controls PPAR γ expression in the colon and is impaired during ulcerative colitis. *Gut* 64: 901–910
- Curry A (2013) Archaeology: the milk revolution. *Nature* 500: 20–22
- Dahlqvist A (1968) Assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem* 22: 99–107
- Ding Q, Dong Z, Evers BM (1999) Enterocyte-like differentiation of the Caco-2 intestinal cell line is associated with increases in AP-1 protein binding. *Life Sci* 64: 175–182
- Edgar R, Domrachev M, Lash AE (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30: 207–210
- El Marjou F, Janssen KP, Chang BH, Li M, Hindie V, Chan L, Louvard D, Chambon P, Metzger D, Robine S (2004) Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* 39: 186–193
- Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Jarvela I (2002) Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet* 30: 233–237
- Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S et al (1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem* 272: 18779–18789
- Imai T, Takakuwa R, Marchand S, Dentz E, Bomert JM, Messaddeq N, Wendling O, Mark M, Desvergne B, Wahli W et al (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4543–4547
- Jarvela I, Tornaiainen S, Kolho KL (2009) Molecular genetics of human lactase deficiencies. *Ann Med* 41: 568–575
- Labrie V, Buske OJ, Oh E, Jeremian R, Ptak C, Gasiunas G, Maleckas A, Peterleit R, Zvirbliene A, Adamonis K et al (2016) Lactase nonpersistence is directed by DNA-variation-dependent epigenetic aging. *Nat Struct Mol Biol* 23: 566–573
- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270: 12953–12956
- Mastrofrancesco A, Kovacs D, Sarra M, Bastonini E, Cardinali G, Aspite N, Camera E, Chavatte P, Desreumaux P, Monteleone G et al (2014) Preclinical studies of a specific PPAR γ modulator in the control of skin inflammation. *J Invest Dermatol* 134: 1001–1011
- Matthews SB, Waud JP, Roberts AG, Campbell AK (2005) Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med J* 81: 167–173
- Momose Y, Meguro K, Ikeda H, Hatanaka C, Oi S, Sohma T (1991) Studies on antidiabetic agents. X. Synthesis and biological activities of pioglitazone and related compounds. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 39: 1440–1445
- Pirat C, Farce A, Lebegue N, Renault N, Furman C, Millet R, Yous S, Speca S, Berthelot P, Desreumaux P et al (2012) Targeting peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): development of modulators. *J Med Chem* 55: 4027–4061
- Roberfroid MB (2000) Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am J Clin Nutr* 71: 1660S–1664S; discussion 1674S–1665S
- Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, Lefebvre P, Romano O, Auwerx J, Metzger D, Wahli W, Desvergne B, Naccari GC et al (2005) Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *J Exp Med* 201: 1205–1215
- Sahi T (1994) Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand J Gastroenterol Suppl* 202: 7–20
- Sauer S (2015) Ligands for the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Trends Pharmacol Sci* 36: 688–704
- Swallow DM (2003) Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet* 37: 197–219
- Tontonoz P, Spiegelman BM (2008) Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ . *Annu Rev Biochem* 77: 289–312

5. LES EFFETS ANTI-NEOPLASIQUES DU 5ASA **DANS L'INTESTIN SONT MEDIES PAR PPAR γ**

5.1 Introduction

Le cancer colorectal (CCR) est une complication fréquente et grave des maladies inflammatoires chroniques intestinales. Les patients atteints de MICI présente une augmentation du risque de CCR de 2.5 en comparaison à la population générale, et environ 1.5% de ces patients développent un CCR après 10 ans d'évolution (Fumery et al. 2017). Ce risque augmente avec l'extension de la maladie, sa durée d'évolution ou encore en cas d'association à une cholangite sclérosante primitive.

A la différence du CCR sporadique qui se développe à partir d'un adénome, le CCR associé au MICI se développe selon une séquence inflammation-dysplasie-cancer.

Deux stratégies de prévention de CRC sont actuellement réalisées :

(1) la surveillance endoscopique avec chromo-endoscopie et/ou biopsies aléatoires systématiques dont la fréquence dépend de la présence des facteurs de risques discutés plus haut.

(2) la chimoprévention, essentiellement par l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA).

Cette seconde stratégie repose sur des études épidémiologiques qui ont montré que l'exposition aux 5-ASA était associée à une diminution du risque de CRC (Velayos et al. 2005). Une méta-analyse a estimé que le 5-ASA réduisait de moitié le risque de développer

une dysplasie ou un CRC chez les patients atteints de rectocolite hémorragique (RCH) (Velayos et al. 2005). Eaden et al. (Eaden et al. 2001) ont montré dans une étude cas-témoin que la mesalamine réduisait le risque de CRC de 81% dans cette même population. Cependant le niveau de preuve de ces études observationnelles est limité. En effet, l'association entre la réduction du risque de CCR et l'exposition au 5-ASA n'est pas nécessairement causale et peut être le résultat d'un biais. En effet, les malades qui prennent des salicylés sont peut-être aussi plus observants, mieux suivis, et/ou mieux surveillés par coloscopie. Aucun essai randomisé ne peut être réalisé afin de confirmer ces résultats au vu de la fréquence de l'événement étudié, qui nécessiterait l'inclusion d'effectifs très importants à surveiller sur une longue période (5260 patients suivis pendant 10 ans) (Rubin et al. 2005).

Ainsi, des études chez les rongeurs ont tenté de confirmer l'effet antinéoplasique du 5-ASA dans des modèles de cancer sporadique et associé aux colites inflammatoires (Ikeda et al. 2007 ; Brown et al. 2005). Les mécanismes par lesquels le 5ASA pourrait exercer ces propriétés antinéoplasiques reste méconnues. Certaines études *in vitro* ont démontré que le 5ASA utilisait des mécanismes à la fois dépendants et indépendants de l'inflammation tels que l'inhibition de NFkB (Bantel et al. 2000), de la voie Wnt / β -caténine (Bos et al. 2006), la régulation des points contrôles (« check point ») de la réplication de l'ADN (Campregher et al. 2010) ou de la voie du TGF- β (Monteleone et al. 2006). Un autre mécanisme par lequel le 5ASA pourrait avoir des effets antinéoplasiques est l'activation de PPAR γ (Sarraf et al. 2008). En effet, PPAR γ contrôle la transcription de nombreux gènes impliqués dans la différenciation cellulaire, le métabolisme et la tumorigénèse. Dans l'intestin, PPAR γ est fortement exprimé dans les cellules épithéliales coliques où il a des propriétés anti-inflammatoires. Pourtant, peu d'études ont tenté de mettre en évidence le caractère PPAR γ -dépendant de l'effet antinéoplasique du 5ASA *in-vitro* et surtout *in-vivo*.

5.2 Article 2: L'effet antinéoplasique dans 5ASA dans la cellule épithéliale intestinale est dépendant de PPAR γ

5.2.1 Objectifs

L'objectif de cette étude était de confirmer que les effets antinéoplasiques du 5-ASA dans la cellule épithéliale intestinale étaient médiés par PPAR γ *in vitro* et *in vivo*.

5.2.2 Matériels et Méthodes

Agents chimiques

Le 5-ASA, l' azoxymethane (AOM) et le GW9662, un antagoniste spécifique de PPAR γ , était fournis par Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). La rosiglitazone et l'étoposide (un médicament anti-cancéreux appartenant à la famille des inhibiteurs de la topoisomérase II) étaient respectivement commandées chez Spi Bio (Massy, France) et chez TCI Europe (N.V., Belgique). L'étoposide présente une action cytotoxique indépendante de PPAR γ . Pour les études *in vivo*, des souris A/JOlaHsd et des granules d'éthylcellulose (Pentasa, Ferring, Suisse) libérant du 5ASA au niveau iléocolique était utilisées.

Lignes cellulaires

Des lignées HT-29 et Caco-2, dérivées d'adénocarcinome colique, étaient cultivées dans du milieu de Eagle modifié de Dulbecco complété avec respectivement 10% et 20% de sérum veau foetal, des antibiotiques et des acides-aminés essentiels pour la lignée cellulaire Caco-2. La construction et la validation de la lignée cellulaire HT-29 PPAR γ knockdown (HT-29 ShPPAR γ) et son contrôle négatif (HT-29 ShLuc) ont été décrits précédemment.

Évaluation de la croissance cellulaire

Les cellules HT-29 et Caco-2 étaient traitées avec du 5-ASA (30 mM) ou de la rosiglitazone (10^{-5} M) avec ou sans GW9662 (10^{-6} M) pendant 12, 24 ou 36 h. L'Etoposide 50 mM était utilisé comme témoin. La viabilité cellulaire était évaluée grâce à un test au bleu tryptan.

Analyse de la prolifération cellulaire par immunocoloration de Ki-67

Après 24 h de culture, les cellules HT-29 et Caco-2 étaient stimulées 24 h avec du 5-ASA (30 mM) avec ou sans GW9662. La rosiglitazone était utilisé comme témoin. La prolifération cellulaire était évaluée par un marquage nucléaire Ki-67 à l'aide d'un anticorps monoclonal souris dirigé contre Ki-67 (dilution 1:50, ZYMED, Clinisciences, Montrouge, France). Les noyaux étaient colorés avec une solution Hoescht 33342 (0,125 mg / ml ; Sigma-Aldrich) et observé grâce à un microscope à fluorescence (Leica, Bensheim, Allemagne). Un minimum de 500 cellules/échantillon était évalué dans chacune des quatre expériences indépendantes.

Détection de l'apoptose

Après 24 h de culture, les cellules HT-29 et Caco-2 étaient stimulées 24 h avec du 5-ASA (30 mM) avec ou sans GW9662 (10^{-6} M). La Rosiglitazone (10^{-5} M) et l'étoposide (50 mM) étaient utilisés comme témoins. Les cellules apoptotiques étaient identifiées grâce à la technique de TUNEL (Roche Diagnostics, Meylan, France). Un minimum de 500 cellules/échantillons était évalué dans chacune des quatre expériences indépendantes.

Modèle de tumeur xénogreffe

Des Souris SCID BALB/c, âgées de 6 à 7 semaines (Institut Pasteur, Lille, France) ont été utilisées. Les animaux étaient logés cinq par cage avec libre accès à de l'eau stérile et à la nourriture. Des cellules dérivées d'adénocarcinome colique humain (10^7 cellules HT-29) prétraitées ou non avec du GW9662 pendant 24 h étaient implantées par voie sous-cutanée dans le flanc des animaux. Deux jours après l'inoculation, étaient administrées quotidiennement par injection péri-tumorale soit (i) du 5-ASA (50 mM) soit (ii) une solution saline témoin, pendant 21 jours. Le caractère PPAR γ -dépendant du l'effet du 5-ASA était évalué via l'injection intrapéritonéale quotidienne de GW9662 (1 mg/kg/jour). Après le

sacrifice à 10 ou 21 jours, la taille et le volume de la tumeur étaient évalués comme décrit précédemment en utilisant la formule $(L \times l^2) 0.5$, où « L » est la longueur et « l » la largeur (Euheus et al. 1986). Les tumeurs étaient ensuite incluses en paraffine pour l'examen histologique.

Modèle de cryptes aberrantes

Des souris A/JOlaHsd âgées de 5 semaines ont été utilisées compte tenu de leur forte susceptibilité à l'AOM (Papanikolaou et al. 1998). Elles ont été randomisées en quatre groupes de 10 souris puis traitées pendant 7 semaines comme suit: (i) groupe témoin : nourri avec un régime standard, (ii) groupe 5-ASA : nourri de croquettes avec granules de 5-ASA à la dose de 200 mg/kg/jour, (iii) groupe 5-ASA + GW9662 : alimenté de croquettes avec granules de 5-ASA à la dose de 200 mg/kg/jour et recevant quotidiennement un injection intra-péritonéale de GW9662 à 2 mg/kg/jour, et (iiii) groupe GW9662 : alimenté par un régime standard et recevant une injection quotidienne intra-péritonéale de GW9662 à 2 mg/kg/jour. Les groupes de souris témoins et 5-ASA ont reçu une injection intra-péritonéale quotidienne de diméthylsulfoxyde 3%/PBS (témoin du GW9662). Une semaine plus tard, chacun des groupes a reçu deux injections intra-péritonéales d'AOM, à 10 mg/kg/jour à une semaine d'intervalle. A la fin de la semaine 7, les souris étaient euthanasiées. Le côlon était extrait par laparotomie médiane, fixé dans du formol à 4% pendant 24 h, puis lavé avec du PBS. Une coloration avec du bleu de méthylène 0,2% était ensuite réalisée afin d'identifier les foyers de cryptes aberrantes (FCA). La totalité de la surface muqueuse était examinée au stéréo-microscope. Les FCA étaient distingués des cryptes normales si elles étaient au moins deux fois plus grandes, avaient une cavité irrégulière et avaient une zone pericryptale densément colorée. Le nombre de FCA/colon et le nombre de cryptes aberrantes par foyer étaient évalués en aveugle.

5.2.3 Résultats

Le 5-ASA régule la croissance des cellules épithéliales intestinale par un mécanisme dépendant de PPAR γ

Une inhibition significative de la croissance cellulaire de 45%, 54% et 85% ($P < 0,01$) était observée dans les cellules HT-29 traitées par 5ASA (30 mM) respectivement à 24, 36 et 48 h (Figure 13). Des résultats similaires étaient observés dans les cellules traitées avec les deux témoins positifs, la rosiglitazone (10^{-5} M) et l'étoposide (50 mM) ($P < 0,01$). Le GW9662 n'était pas capable de moduler l'inhibition de la croissance cellulaire induite par l'étoposide, à la différence du 5-ASA ou de la rosiglitazone. Des résultats comparables ont été observés dans les cellules Caco-2.

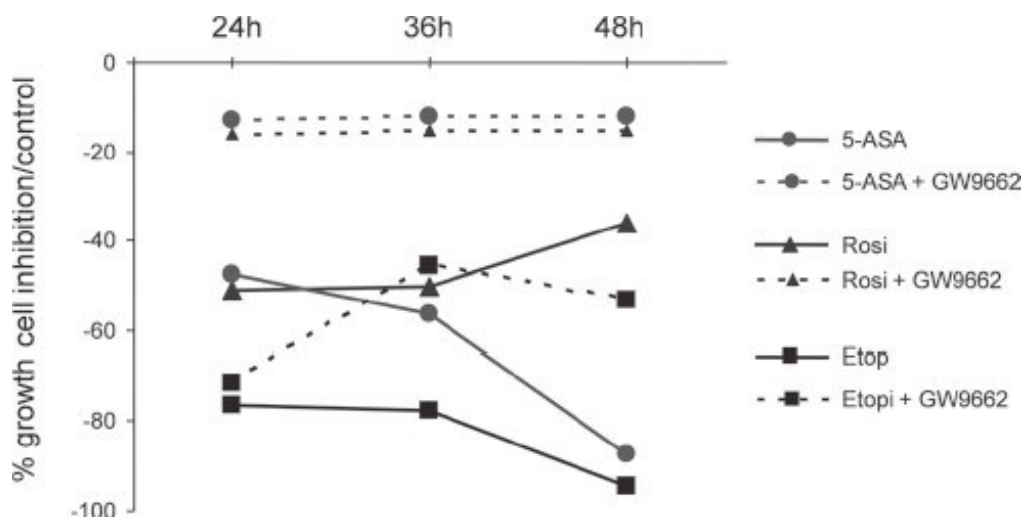


Figure 13. Le 5ASA et la rosiglitazone inhibent la croissance cellulaire de façon PPAR γ dépendante. Rosi, rosiglitazone ; Etop, etoposide.

Le 5-ASA régule la prolifération des cellules épithéliales par un mécanisme PPAR γ -dépendant

Dans les cellules HT-29, le 5-ASA induisait une diminution spectaculaire de l'indice de prolifération en comparaison au témoin ($35 \pm 4\%$ versus $94 \pm 1\%$, $P < 0,001$). Des résultats similaires ont été obtenus avec la rosiglitazone. La prolifération des cellules HT-29 était aussi réduite de 95% ($P < 0,0001$) lors d'un traitement pas étoposide (Figure 14A et 14B). Le GW9662 était capable de diminuer significativement l'effet anti-prolifératif du 5ASA et de la rosiglitazone (respectivement, 38% vs 75%, $p < 0,05$ et 10% vs 84%, $p < 0,05$). Des résultats similaires ont été observés dans des cellules Caco-2. Dans les cellules HT-29 ShPPAR γ , ni le 5-ASA ni la rosiglitazone n'était capable de moduler la prolifération cellulaire.

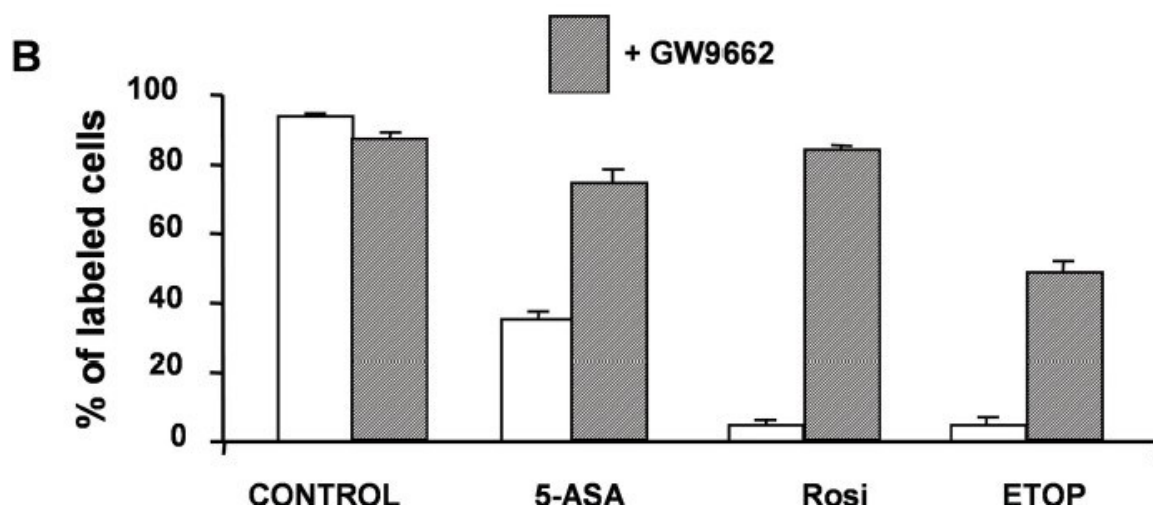
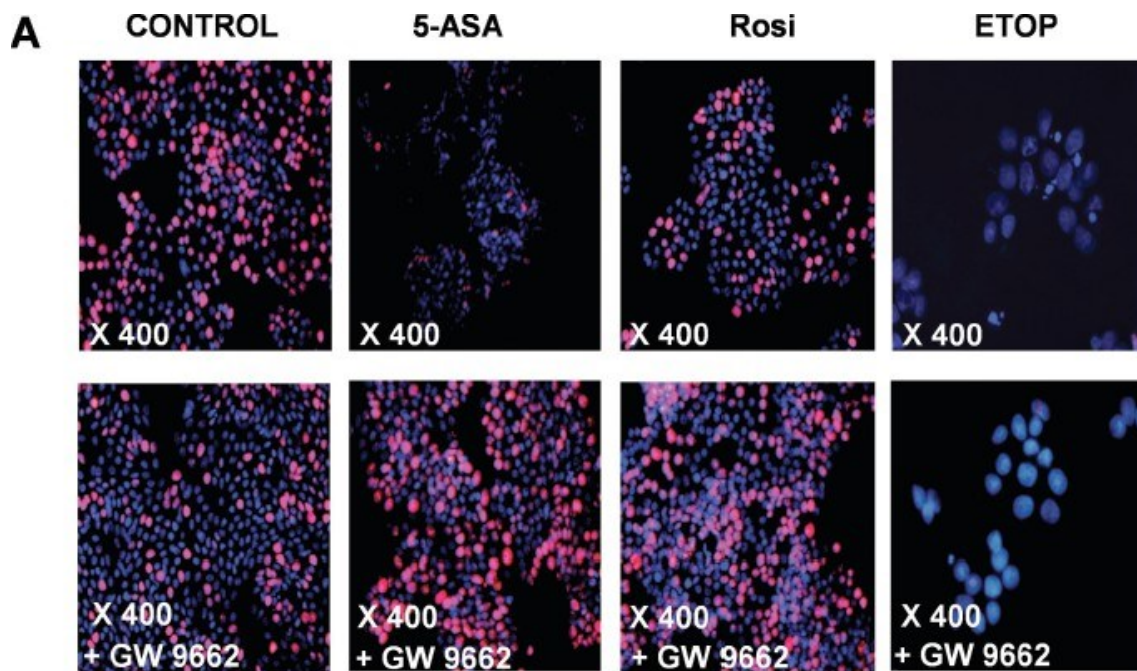


Figure 14. Le 5ASA inhibe la prolifération cellulaire. Rosi, rosiglitazone ; Etop, etoposide. (A) Le 5-ASA et la rosiglitazone inhibent la prolifération des cellules HT-29 évaluée par la coloration nucléaire Ki-67 (rose). L'addition de GW9662 pendant 24 h inhibait les effets antiprolifératifs du 5-ASA et de la rosiglitazone. (B) En comparaison avec les cellules HT-29 non traitées, le 5-ASA inhibait par 65% la prolifération cellulaire, cet effet était inhibé par le GW9662.

Le 5-ASA régule l'apoptose des cellules épithéliales par un mécanisme PPAR γ -dépendant

Dans les cellules HT-29 non stimulées, aucune apoptose n'était détectée. Après traitement par étoposide ou rosiglitazone, un taux élevé d'apoptose (95% et 62%, respectivement) était observés. Des résultats similaires étaient obtenus avec le 5-ASA (83%) (Figure 15A et B). L'addition de GW9662 inhibait l'induction de l'apoptose (83 vs 35%, $p < 0,001$). L'effet pro-apoptotique du 5ASA (97%), inhibé par le GW9662 (3%) était aussi observé dans les cellules Caco-2. L'effet des agonistes de PPAR γ a aussi été évalué dans des cellules HT-29 ShPPAR γ . Dans cette lignée, ni le 5-ASA ni la rosiglitazone n'était capable de moduler l'apoptose.

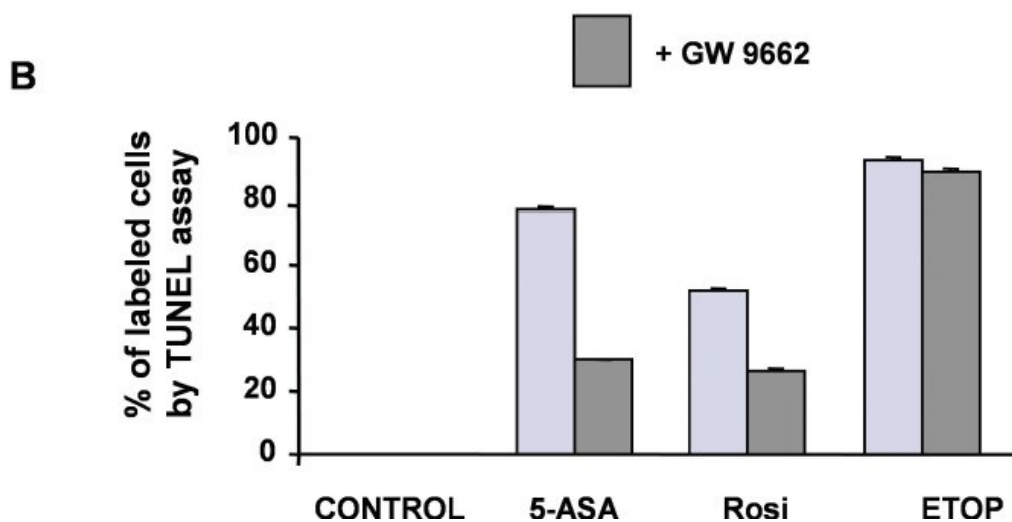
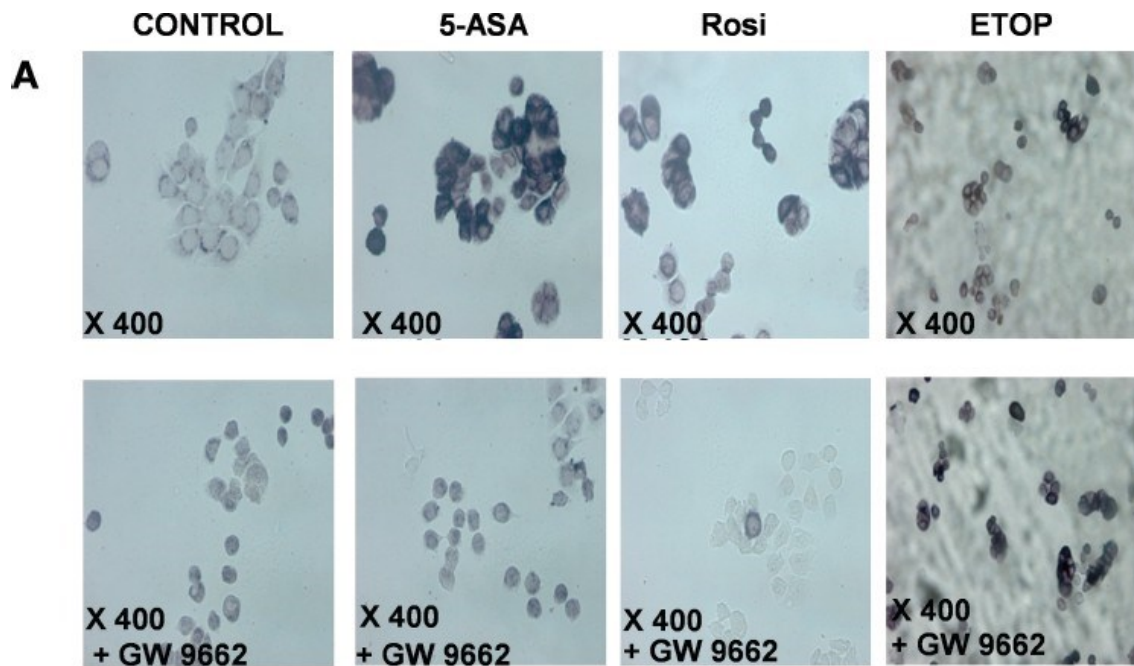


Figure 15. Le 5ASA est capable d'induire une apoptose cellulaire par un mécanisme PPAR γ dépendant. A. Le 5ASA et la rosiglitazone induisent une apoptose cellulaire (technique de TUNEL). Cet effet est inhibé en cas de co-traitement avec du GW9662. **B.** Le 5ASA et la rosiglitazone induisent une apoptose de respectivement 83% et 62% des cellules. Cet effet est inhibé en cas de co-traitement avec du GW9662.

Le 5-ASA a un effet antinéoplasique dans un modèle de tumeur xéno greffe

L'effet antinéoplasique du 5-ASA *in vivo*, était évalué grâce à des souris SCID chez lesquelles des cellules dérivées d'adénocarcinome colique humain (HT-29) étaient implantées par voie sous-cutanée dans le flanc des animaux. Le 5ASA était ensuite administré en injection péritumorale. A la fin du traitement, une réduction du poids (moins 60%) et du volume (moins 80%) de la tumeur était observés chez les souris SCID recevant du 5-ASA comparativement aux souris témoins ou aux souris traitées GW9662 seul (Figure 16A-C). L'effet antinéoplasique du 5-ASA était détectable dès 10 jours de traitement 5-ASA. L'effet antinéoplasique du 5-ASA était complètement aboli par l'administration intra-péritonéale simultanée de GW9662 (à J21).

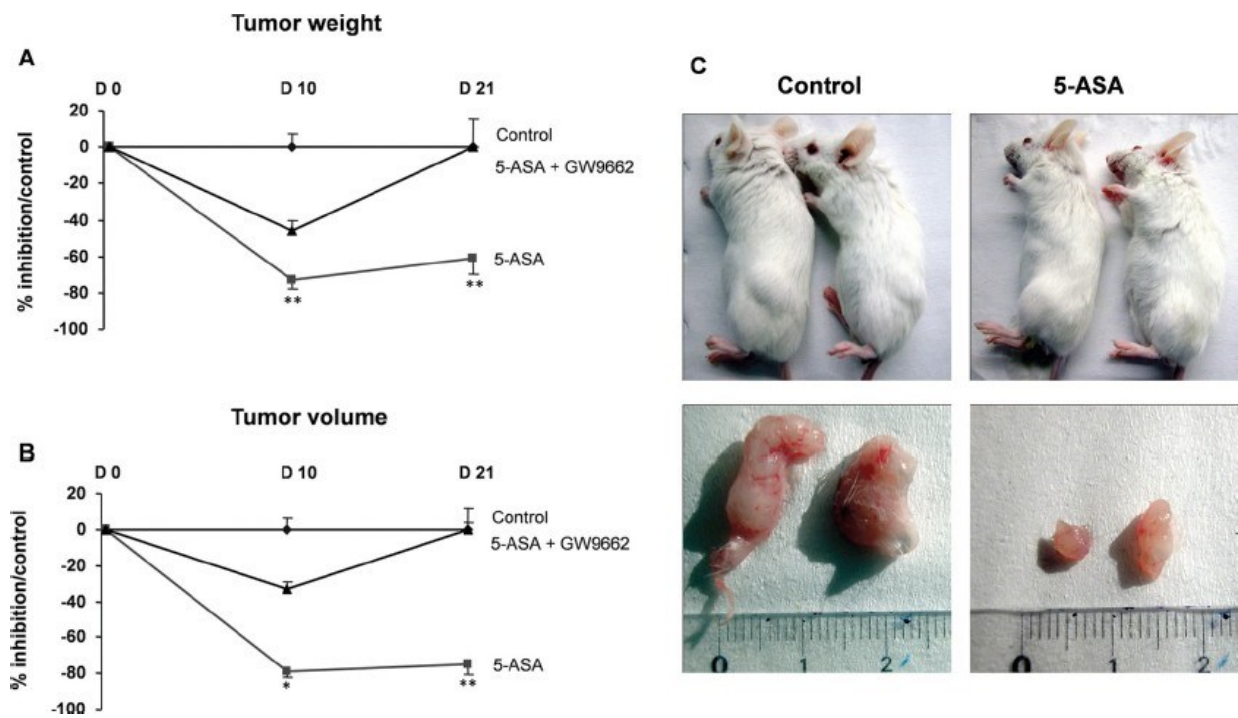


Figure 16. Modèle de tumeur xénogrefe. Après l'injection de cellules HT-29, le poids (A) et le volume (B) tumoral étaient évalués à +10 jours et + 21 jours. Une réduction du poids (moins 60%) et du volume (moins 80%) tumoral était observés chez les souris SCID recevant du 5-ASA comparativement aux souris témoins. L'injection de GW9662 inhibait l'effet du 5ASA. (C) Photos illustrant la masse tumorale chez les souris traitées par 5ASA et les souris contrôles.

Effet antinéoplasique du 5-ASA in vivo

Afin d'étudier l'effet antinéoplasique du 5-ASA, un modèle de carcinogenèse AOM a été utilisé. Les souris étaient traitées avec du 5-ASA et/ou du GW9662 pendant 7 semaines (Figure 17A). Pour induire la cancérogenèse, les souris recevaient deux injections intrapéritonéales d'AOM à 1 semaine d'intervalle. Une diminution significative du nombre de CA par foyer (22%, $P = 0.038$) et de FCA / côlon (75%, $p = 0.017$) était observée sous 5-ASA en comparaison aux souris témoins (figure 17C et D). Le GW9662 inhibait presque totalement l'effet antinéoplasique du 5-ASA.

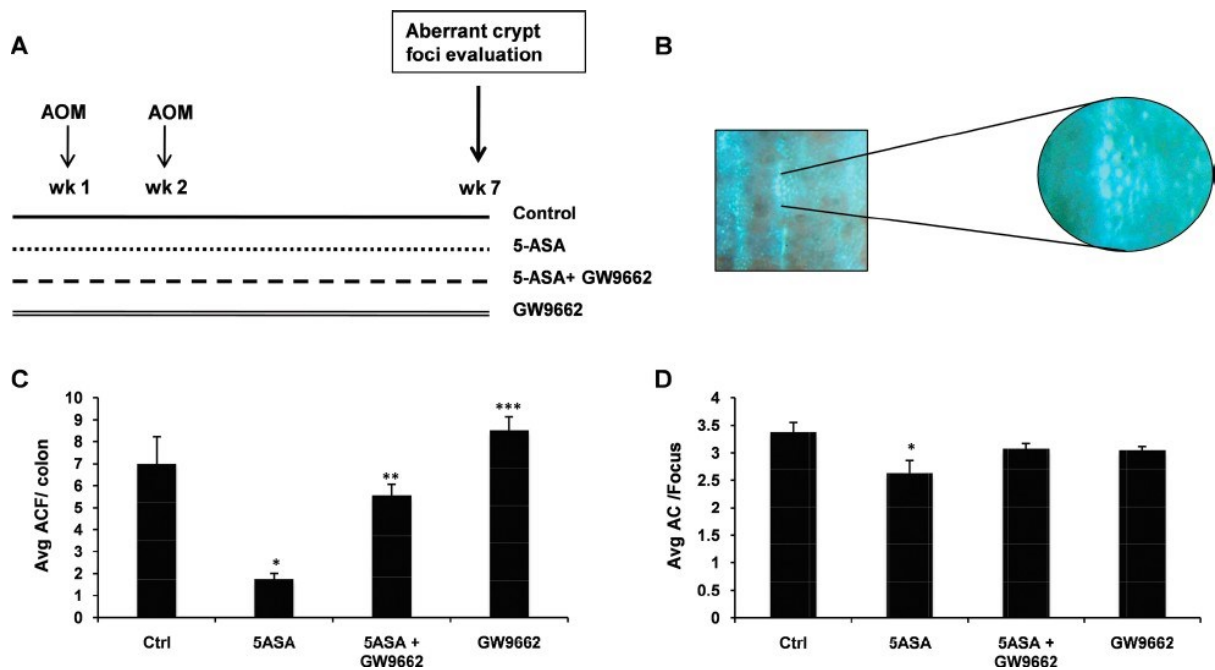


Figure 17. Effet antinéoplasique du 5ASA in-vivo.

A et B. Modèle AOM permettant l'induction de crypte aberrantes : les souris recevaient deux doses intrapéritonéales d'AOM (10 mg / kg / jour) aux semaines 2 et 3. A la fin du protocole (semaine 7), la présence de cryptes aberrantes était évaluée en aveugle,

C et D. Le 5-ASA induisait une diminution significative du nombre de foyers de cryptes aberrantes (75%) et du nombre de cryptes aberrantes (22%) par rapport aux souris témoins. La co-administration de GW9662 inhibait l'effet du 5-ASA.

5.2.4 Conclusion

- *In vitro*, dans des cellules dérivées d'adénocarcinome colique, le 5ASA était capable de diminuer la croissance et la prolifération cellulaire, et d'induire une apoptose.
- Cet effet était inhibé par les antagonistes de PPAR γ (GW9662) et dans les cellules Sh PPAR γ .
- *In vivo*, dans différents modèles de carcinogenèse induite, le 5ASA présentait un effet antinéoplasique, cet effet était, là-encore, inhibé par les antagonistes de PPAR γ .
- Ces observations suggèrent que l'effet antinéoplasique de PPAR γ au niveau de la cellule épithéliale intestinale est médié, au moins partiellement, par PPAR γ .

The 5-aminosalicylic acid antineoplastic effect in the intestine is mediated by PPAR γ

Christel Rousseaux¹, Noura El-Jamal^{1,2,1},
Mathurin Fumery^{1,2}, Caroline Dubuquoy,
Olivier Romano^{1,2}, Denis Chatelain³,
Audrey Langlois^{1,2}, Benjamin Bertin^{1,2}, David Buob⁴,
Jean Frederic Colombel^{1,2,5}, Antoine Cortot^{1,2,5},
Pierre Desreumaux^{1,2,5} and Laurent Dubuquoy^{1,2,*}

Department of Project Management, Intestinal Biotech Development, 59045 Lille, France, ¹Faculté de Médecine, INSERM U995, 59045 Lille, France, ²Faculté de Médecine, Université Lille Nord de France, 59000 Lille, France, ³Service d'Anatomopathologie, CHU d'Amiens, 80054 Amiens, France, ⁴Service d'Anatomie Pathologique, Centre de Biologie-Pathologie, CHRU Lille, 59000 Lille, France and ⁵Service des maladies de l'appareil digestif et de la nutrition, hôpital Claude Huriez, CHRU Lille, 59037 Lille, France

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 3 20 97 42 08; Fax: +33 3 20 97 42 01;

Email: laurent.dubuquoy@orange.fr

Epidemiological evidences suggested that 5-aminosalicylic acid (5-ASA) therapy may prevent the development of colorectal cancer in inflammatory bowel disease patients. Our aim is to investigate whether peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) mediates the antineoplastic effects of 5-ASA. HT-29 and Caco-2 cells were treated by 5-ASA, rosiglitazone (PPAR γ ligand) or etoposide (anticarcinogenic drug). Epithelial cell growth, proliferation and apoptosis were assessed by cell count, Ki-67 staining and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling assay, respectively. The antineoplastic effect of 5-ASA was evaluated in a xenograft tumor model in severe combined immunodeficiency (SCID) mice and in azoxymethane (AOM)-induced colon carcinogenesis in A/JOLA^{Hsd} mice. The role of PPAR γ was examined by administration of PPAR γ antagonist, GW9662 and in PPAR knockdown cells. Compared with untreated cells, treatment of HT-29 cells by 5-ASA inhibited significantly cell growth and cell proliferation (respectively, 60% and 63%) and induced apoptosis in 75% of cells. These effects were abolished by co-treatment with GW9662 and blunted in PPAR knockdown cells. Contrarily to etoposide, similar inhibitory effects of GW9662 were obtained in HT-29 cells treated with rosiglitazone. In the xenograft model, GW9662 abolished the therapeutic effect of 5-ASA, which decreased tumor weight and volume by 80% in SCID mice compared with untreated mice. In A/JOLA^{Hsd} mice, 5-ASA suppressed colon carcinogenesis by decreasing the number of aberrant crypt foci (75%) and aberrant crypts (22%) induced by AOM treatment with an absence of 5-ASA response after GW9662 administration. In conclusion, 5-ASA exerts potent antineoplastic effects that are mediated through PPAR γ . These data provide new rational for designing more effective and safe antineoplastic PPAR γ ligands with topical effects.

Introduction

One of the most serious complications of colonic inflammatory bowel disease (IBD) is colorectal cancer (CRC). Two prevention strategies of CRC are available: regular surveillance colonoscopy with random biopsies and chemoprevention with 5-aminosalicylic acid

Abbreviations: 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; AOM, azoxymethane; CRC, colorectal cancer; IBD, inflammatory bowel disease; PBS, phosphate-buffered saline; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; SCID, severe combined immunodeficiency; UC, ulcerative colitis.

[†]These authors contributed equally to this work.

© The Author 2013. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

(5-ASA) treatment. Surveillance colonoscopies are limited strategies during which only 20–50% of colonic neoplasms are detected (1). Epidemiological studies have shown that the chronic use of 5-ASA in IBD has chemopreventive effects on the development of CRC. A meta-analysis has estimated that 5-ASA halved the risk of developing CRC or dysplasia in ulcerative colitis (UC) patients and showed a positive correlation between the protection and the treatment duration (2). Also, Eaden *et al.* (3) in a case-control study showed that mesalazine reduced the risk of CRC by 81% in UC patients. Furthermore, functional studies in rodents have shown potent anticarcinogenic effects for 5-ASA in models of sporadic and colitis-associated cancer (4–6).

The mechanisms sustaining the putative antineoplastic property of 5-ASA are still under investigation. However, several *in vitro* studies have demonstrated that the antineoplastic effects of 5-ASA are mediated via inflammatory-dependent and inflammatory-independent mechanisms including the inhibition of nuclear factor-kappaB (7,8), the Wnt/ β -catenin pathway (9), regulation of DNA replication checkpoints (10,11) and disruption of tumor growth factor- β pathway (12,13). Another mechanism sustaining the effect of 5-ASA is the induction and activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) (14). PPARs are nuclear receptors that function as transcription factors regulating the expression of genes involved in cellular differentiation, development, metabolism and tumorigenesis. In the gut, PPAR γ is significantly expressed in colonic epithelial cells and exhibits anti-inflammatory and anticarcinogenic effects, notably by interacting with the β -catenin pathway (15–17).

Our laboratory has already demonstrated that PPAR γ mediates 5-ASA anti-inflammatory effects in the colon epithelium in mice and in human culture colonic biopsies (15,18,19). The aim of the present study was to test the hypothesis that the antineoplastic effects of 5-ASA were mediated via PPAR γ . We studied the antineoplastic effect of 5-ASA first *in vitro* on the proliferation, growth and apoptosis of HT-29 and Caco-2 colon epithelial cell lines and *in vivo* in a mouse model of colon cancer cell xenograft and in azoxymethane (AOM)-induced colon carcinogenesis. The involvement of PPAR γ in 5-ASA-induced antineoplastic effect was assessed by the use of PPAR γ antagonist GW9662 and the PPAR γ knockdown cells (HT-29 ShPPAR γ).

Materials and methods

Chemicals

5-ASA, AOM and GW9662 were purchased at Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Rosiglitazone was ordered at Spi Bio (Massy, France). Etoposide was purchased at (TCI EUROPE N.V., Belgium). For *in vivo* studies in A/JOLA^{Hsd} mice, ethyl cellulose granules (Pentasa, Ferring, Switzerland) leading to a 5-ASA ileocolonic release were used.

Cell lines

HT-29 (ATCC HTB-38) and Caco-2 (ATCC HTB-39) colon carcinoma cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% and 20% fetal calf serum, respectively, antibiotics and 1x essential amino acids for Caco-2 cell line. The construction and validation of the cell line HT-29 PPAR γ knockdown (HT-29 ShPPAR γ) and its negative control (HT-29 ShLuc) are described in Supplementary Materials and methods, available at [Carcinogenesis Online](http://carcinogenesis.oxfordjournals.org/).

Assessment of cell growth

HT-29 and Caco-2 cells were treated either with 5-ASA (30 mM) or rosiglitazone (10^{-6} M) with or without GW9662 (10^{-6} M) for 12, 24 or 36 h. Etoposide 50 mM was used as a positive control. These doses of 5-ASA and rosiglitazone were chosen because in previous publications, they have shown to induce an anti-inflammatory effect on cultured cells (15) and are clinically relevant (20,21). Cells were detached with the trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid solution before counting. Results were expressed as the mean number of cells counted blindly in four different experiments when a coefficient of variation

<10% was obtained. The viability of cells was determined by the trypan blue exclusion test.

Analysis of cell proliferation by Ki-67 immunostaining

After 24 h of culture, HT-29 and Caco-2 cells were treated for 48 h with 5-ASA (30 mM) with or without GW9662 (10^{-6} M). Rosiglitazone (10^{-5} M) treatment was used as control. Cells were fixed in paraformaldehyde 4%, permeabilized in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% triton X-100 at 4°C and then incubated with 1.5% normal goat normal and blocking buffer (1% bovine serum albumin in PBS). Cell proliferation was assessed by a nuclear Ki-67 staining using a mouse monoclonal primary antibody directed against Ki-67 (dilution 1:50 overnight; ZYMED, Clinisciences, Montrouge, France). An Alexa 594 donkey anti-mouse IgG was used as secondary antibody (dilution 1:100, Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Nuclei were stained with Hoechst 33342 solution (0.125 mg/ml) (Sigma-Aldrich) and visualized under a fluorescence microscope (Leica, Bensheim, Germany). An irrelevant mouse serum was used as a negative control. At least 500 cells/sample were counted in four different experiments. Results were expressed as the mean \pm standard error of the mean percentage of stained cells.

Detection of apoptosis

After 24 h of culture, HT-29 and Caco-2 cells were treated for 24 h with 5-ASA (30 mM) with or without GW9662 (10^{-6} M). Rosiglitazone (10^{-5} M) was used as control ligand of PPAR γ and etoposide (50 mM) as an apoptosis inducer. Cells undergoing apoptosis were identified using a TUNEL assay (Roche Diagnostics, Meylan, France). At least 500 cells/sample were counted in four different experiments. Results were expressed as the mean \pm standard error of the mean percentage of stained cells.

Xenograft tumor model

Six to seven weeks old pathogen-free BALB/c SCID mice (Institut Pasteur, Lille, France) were used. Animals were housed five per cage in barrier environment and had free access to sterile water and food. Human colon cancer cells (10^7 HT-29 cells) pretreated or not with GW9662 for 24 h were implanted subcutaneously in the flank of animals. Two days after cell inoculation, mice were treated with 5-ASA (5 or 50 mM) administered daily by peritumoral injection for 10 or 21 days. The effect of PPAR γ during 5-ASA treatment was evaluated by daily intraperitoneal injection of GW9662 (1 mg/kg/day). The control group has received saline instead of 5-ASA. Mice were checked three times a week for tumor development. After killing at 10 or 21 days, tumor size and volume were calculated as described previously using the formula ($L \times W^2$) 0.5, where L is length and W is width (22). Tumors were weighted before paraffin embedding for histological examination.

Aberrant crypt model

A/J01aHsd mice have been used in this experiment given the high susceptibility of this genetic background to the carcinogen AOM (23). A/J01aHsd mice aged of 5 weeks were randomized into four groups each of 10 mice and treated for 7 weeks as follows: Control group fed with standard diet, 5-ASA group fed with 5-ASA ethylcellulose granules-containing chaw at 200 mg/kg/day, 5-ASA+GW9662 group fed with 5-ASA ethylcellulose granules-containing chaw at 200 mg/kg/day and receiving daily intraperitoneal injection of GW9662 at 2 mg/kg/day, GW9662 group fed with standard diet and receiving daily intraperitoneal injection of GW9662 at 2 mg/kg/day. Control and 5-ASA mice groups have received daily intraperitoneal injection of 3% dimethyl sulfoxide/PBS (GW9662 vehicle). One week after 5-ASA and/or GW9662 treatment, all received two intraperitoneal injections of AOM, at 10 mg/kg/day dissolved in isotonic saline, with 1 week interval between doses. At the end of week 7, mice were euthanized and the colon was removed via a midline laparotomy. The colons were opened along the mesenteric border, washed with PBS and pinned flat. The colon was fixed in 4% neutral buffered formalin for 24 h and then washed with PBS. To identify aberrant crypt foci (ACF), colons were stained with 0.2% methylene blue in water for 3 min. The entire mucosal surface was examined using stereomicroscope. ACF were distinguished from normal colonic crypts if they were at least two times greater than normal size, had an irregular crypt cavity and had a densely staining pericryptal zone. The number of ACF per colon and the number of aberrant crypts (ACs) per focus were double blindly recorded (N.E.-J. and L.D.).

Results

5-ASA regulates epithelial cell growth in a PPAR γ -dependent manner
HT-29 and Caco-2 cell lines were used to investigate the cellular mechanisms underlying 5-ASA-induced cell growth arrest (Figure 1). To this aim, cells were treated with 5-ASA (30 mM), rosiglitazone

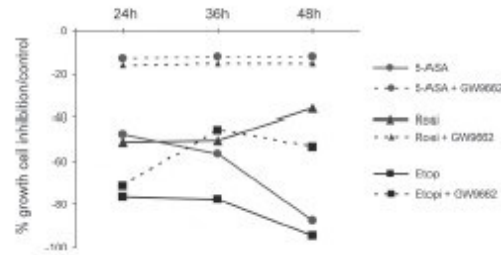


Fig. 1. 5-ASA inhibits cell growth in a PPAR γ -dependent way. Incubation of HT-29 cells with 5-ASA (30 mM) resulted in a significant inhibition of cell growth compared with controls. Similar results were obtained in cells treated with the rosiglitazone (rosi, 10^{-5} M) and etoposide (etop, 50 mM). Addition of GW9662 (10^{-6} M) completely abolished the growth inhibitory activities of 5-ASA and rosiglitazone. Results were expressed as the mean number of 500 cells counted blindly in four different experiments.

(10^{-5} M, PPAR γ ligand, positive control) and etoposide (50 mM). For instance, etoposide, an anticancer drug belonging to the family of topoisomerase II inhibitors, was used as positive control, which exhibits cytotoxic actions independently of PPAR γ . Compared with untreated cells, incubation of HT-29 cells for 24, 36 and 48 h with 5-ASA (30 mM) resulted in a significant inhibition of cell growth to 45, 54 and 85%, respectively ($P < 0.01$). Similar results were obtained in cells treated with the two positive controls, that is, rosiglitazone (10^{-5} M) and etoposide (50 mM) ($P < 0.01$). As expected, GW9662 was not capable of significantly modulating etoposide-induced cell growth inhibition, whereas it abolished this effect on cells treated with 5-ASA or rosiglitazone. Similar results were observed in Caco-2 cells (data not shown).

5-ASA regulates epithelial cell proliferation through a PPAR γ -dependent mechanism

To assess the involvement of PPAR γ in the potential antiproliferative effect of 5-ASA, we performed immunohistochemistry assays using an antibody directed to the nuclear protein Ki-67. We first verified that HT-29 cells, colonic adenocarcinoma cell lines, were characterized by a high rate of proliferation under basal conditions ($94 \pm 1\%$ of stained cells). In HT-29 cells, 5-ASA treatment induced a dramatic decrease in the proliferative index ($35 \pm 4\%$ versus $94 \pm 1\%$, $P < 0.001$). Similar results were obtained in rosiglitazone-treated cells, with less than 10% of cells stained. Furthermore, the proliferation of HT-29 cells was decreased by 95% ($P < 0.0001$) when treated with etoposide (Figure 2A and B). Treatment with GW9662 significantly abolished the antiproliferative effect of 5-ASA and rosiglitazone (38% versus 75%, $P < 0.05$ of stained cells and 10% versus 84%, $P < 0.05$, respectively). The proliferative potential of HT-29 was restored by 40% in cells co-treated with etoposide and GW9662 ($P < 0.05$). Similar results were observed in Caco-2 cells (data not shown).

5-ASA regulates epithelial cell apoptosis through a PPAR γ -dependent mechanism

Apoptosis is another major mechanism involved in the regulation of cell growth. In HT-29, no apoptosis was detected by the TUNEL method, which labeled DNA strand breaks. However, etoposide and rosiglitazone induced a high rate of apoptosis (95% and 62%, respectively). As expected, similar results were obtained with 5-ASA treatment (30 mM), with $83 \pm 1\%$ stained cells (Figure 3A and B). Co-treatment with 5-ASA and GW9662 suppressed the induction of apoptosis ($83 \pm 1\%$ versus $35 \pm 0.1\%$, $P < 0.001$), indicating that 5-ASA proapoptotic effect is at least, in part, dependent of the PPAR γ signaling pathway. Similar inhibition of HT-29 apoptosis was obtained in cells co-treated by rosiglitazone and

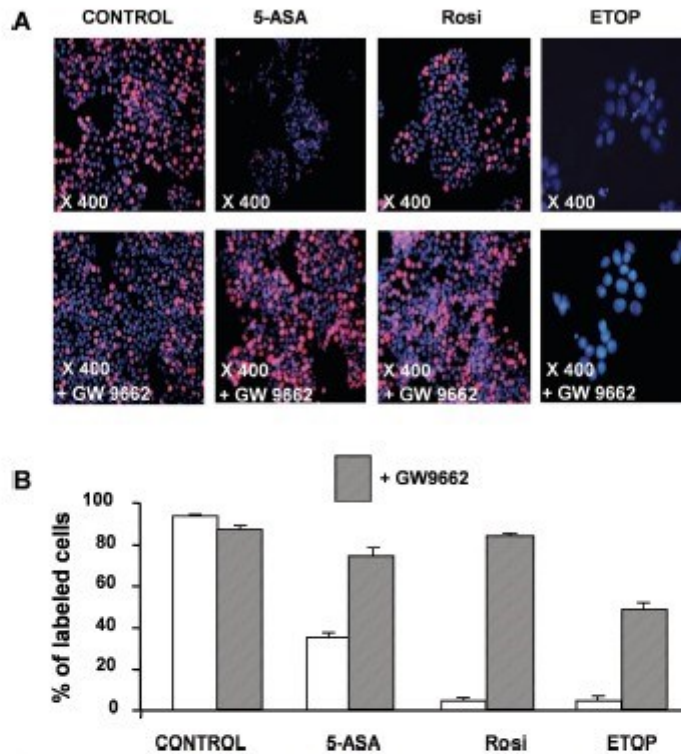


Fig. 2. 5-ASA inhibits proliferation through PPAR γ . (A) 5-ASA (30 mM) and rosiglitazone (rosi, 10^{-5} M) inhibited HT-29 cell proliferation assessed by the nuclear Ki-67 staining (pink) compared with cells incubated with the medium alone (control). Nuclei were stained in blue with Hoechst 33342 solution. Addition of GW9662 (10^{-6} M) for 24 h blocked the antiproliferative effects of 5-ASA and rosiglitazone. (B) In comparison with untreated HT-29 cells, 5-ASA treatment for 48 h inhibited by 63% cell proliferation ($35 \pm 4\%$ stained cells versus $94 \pm 1\%$ stained cells, $P < 0.001$). Co-treatment with GW9662 blocked the antiproliferative effects of 5-ASA. Results expressed as the mean number of 500 cells counted blindly in four different experiments.

GW9662 but not in etoposide-treated cells (Figure 3). Likewise, the proapoptotic effect of 5-ASA in Caco-2 cells (97%) was completely abolished by the addition of GW9662 (3%) (data not shown).

Beside the pharmacological verification of the role of PPAR γ in mediating the antineoplastic effects of 5-ASA using GW9662, the effect of 5-ASA was assessed in PPAR γ knockdown cells (HT-29 ShPPAR γ). Compared with HT-29ShLuc cells, neither 5-ASA (30 mM) nor rosiglitazone (10^{-5} M) had significant effect on the proliferation and apoptosis of HT-29 ShPPAR cells as assessed by Ki-67 immunostaining and TUNEL assay (Supplementary Figure 1B–E, available at *Carcinogenesis* Online).

Taken together, these observations suggest that the regulation of epithelial cell growth, proliferation and apoptosis by 5-ASA are mediated, at least partially, via PPAR γ signaling pathway.

5-ASA has an antineoplastic effect in a xenograft tumor model

To evaluate the *in vivo* antineoplastic effect of 5-ASA, severe combined immunodeficiency (SCID) mice engrafted with HT-29 colon cancer cells were treated daily for 21 consecutive days with 5-ASA at 50 mM (Figure 4). At the end of the treatment, a reduction of 80–86% of tumor weight and volume was observed in SCID mice receiving 5-ASA compared with control mice or mice treated with GW9662 alone (Figure 4A–C). The antineoplastic effect of 5-ASA was already detectable after 10 days of 5-ASA treatment. Similar

results were obtained with mice treated with 5-ASA at 5 mM (data not shown). Antitumorogenic effect of 5-ASA was completely abolished at 21 days by simultaneous intraperitoneal administration of GW9662. Thus, the observed antineoplastic effect of 5-ASA is at least partially dependent on PPAR γ .

Antineoplastic effect of 5-ASA *in vivo*

In order to examine the direct antineoplastic effect of 5-ASA on mice, a model of AOM carcinogenesis was employed (Figure 5A and B). Mice were treated with 5-ASA and/or GW9662 for 7 weeks as described above. To induce carcinogenesis, mice have received two intraperitoneal injections of AOM at 1 week interval. After 7 weeks, mice were harvested and the formation of ACs and ACF was recorded. A significant decrease in the number of ACs/focus (22%, $P = 0.038$) and ACF/colon (75%, $P = 0.017$) was observed under 5-ASA compared with control mice treated with AOM only (Figure 5C and D). The co-treatment of mice with GW9662 suppressed almost completely the antineoplastic effect of 5-ASA. For instance, mice treated with 5-ASA+GW9662 had increased number of ACF (5.6 ± 0.5) compared with mice treated with 5-ASA only (1.75 ± 0.25), revealing a 68% increase in the number of ACF ($P = 0.04$). Interestingly, GW9662-treated mice had even higher ACF count compared with mice treated with 5-ASA+GW9662 (8.5 ± 0.64 versus 5.6 ± 0.5 , $P = 0.003$) and even to control mice (8.5 ± 0.64 versus 7 ± 1.22) (not significant).

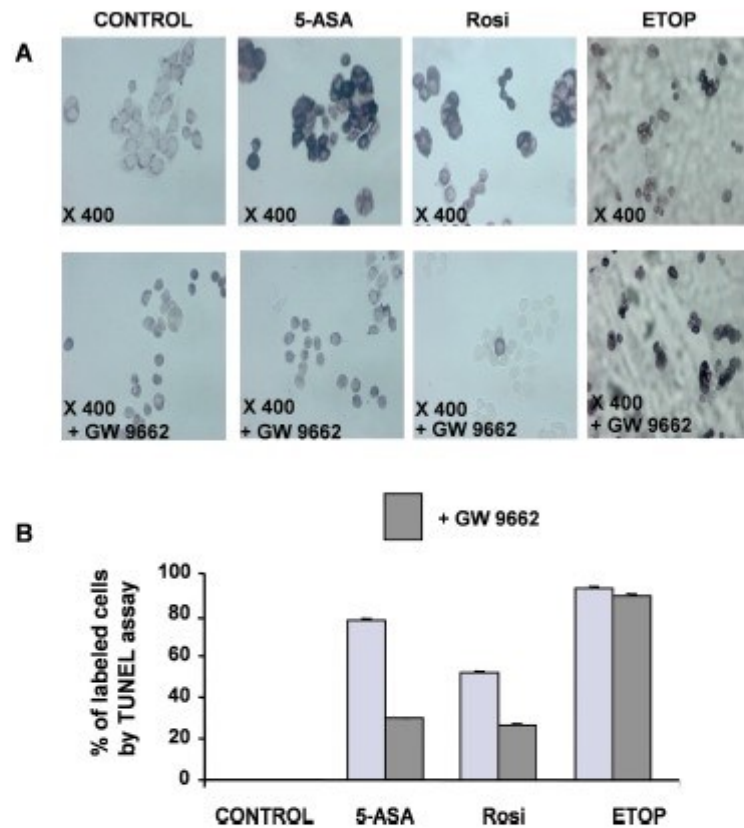


Fig. 3. 5-ASA induces apoptosis through PPAR γ . (A) Treatment of either 5-ASA (30 mM) or rosiglitazone (10^{-5} M) induced apoptosis measured by TUNEL assay in HT-29 cells. Addition of GW9662 (10^{-6} M) for 24 h completely abolished the proapoptotic effects of 5-ASA and rosiglitazone. (B) 5-ASA and rosiglitazone treatment for 48 h induced apoptosis in 83% and 62% of cells, respectively. Co-treatment with GW9662 blocked the proapoptotic effect of 5-ASA and rosiglitazone. Results were expressed as the mean number of 500 cells counted blindly in four different experiments.

Taken together, these data support the antineoplastic properties of 5-ASA *in vivo* and reveal that PPAR γ signaling is required for mediating 5-ASA antineoplastic effects.

Discussion

Patients suffering from Crohn's disease and UC displayed an increased risk of developing CRC. Surveillance colonoscopies provided limited protection against CRC due to the technical limitations of detecting dysplastic lesions in normal appearing mucosa (1,24). However, retrospective studies have shown that chemopreventive strategies, employing aminosalicylates, provided enhanced protection for IBD patients against CRC development (25,26). 5-ASA was opted since decades as the treatment of choice of active mild to moderate of IBD, notably UC. In addition to its efficacy and safety as an anti-inflammatory therapy, 5-ASA was also believed to have unique chemopreventive properties. Several studies have shown that regular usage of 5-ASA prevented the development of CRC in IBD patients by decreasing cell proliferation and promoting apoptosis (25,27). However, the mechanisms sustaining 5-ASA chemopreventive properties remain largely unknown. In this work, we demonstrated that the well recognized antineoplastic effects of 5-ASA are mediated via PPAR γ .

Using clinically relevant concentrations (20,21), we first showed by *in vitro* cell count, Ki-67 immunostaining and TUNEL assay that 5-ASA displayed both antiproliferating and proapoptotic properties. Subsequent to GW9662 application, evidence that PPAR γ mediated the chemopreventive effects of 5-ASA was established. Besides, the antiproliferating and proapoptotic properties of 5-ASA were absent in PPAR γ knockdown cells that further supports the role of PPAR γ . In an *in vivo* model of xenograft tumor, we furthermore showed a strong reduction in tumor development due to topic effect of 5-ASA through a PPAR γ -dependent mechanism. Finally, in a model of AOM-induced colon carcinogenesis, 5-ASA significantly suppressed the number of both ACF and ACs via PPAR γ signaling pathway.

The antiproliferative and proapoptotic effects of 5-ASA on several tumor-derived cell lines have been previously reported and different mechanisms have been proposed, namely inhibition of nuclear factor-kappaB, prostaglandins (7,8) and cyclo-oxygenase (28); activation of caspase-3 (29–31); inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway (9); disruption of the epidermal growth factor receptor signaling (13); regulation of DNA replication checkpoints (10,11,31); suppression of oncogenes (32) and disruption of tumor growth factor- β pathway (12,13). However, the receptor mediating these antineoplastic effects of 5-ASA was not revealed. One study has established in wild-type

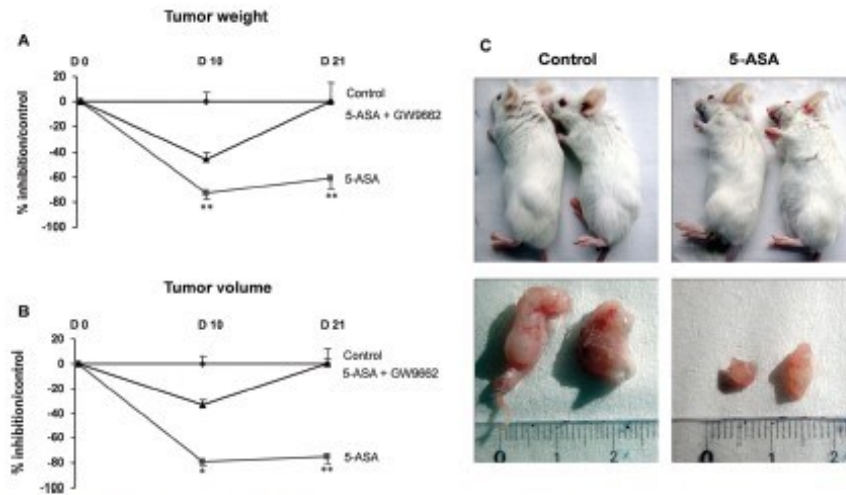


Fig. 4. Xenograft tumor model in SCID mice. 10^7 HT-29 cells pretreated or not pretreated with GW9662 were injected subcutaneously in 6–7-week-old SCID mice. Mice were treated for 21 days at the injection point of HT-29 with 5-ASA (50 mM) or PBS (control). One group of mice was co-treated with a local injection of 5-ASA and an intraperitoneal injection of GW9662 (1 mg/kg/day). Following injection of HT-29 cells, tumor development was monitored at days 10 and 21 and evaluated by tumor weight (A) and volume (B) measurements. Results are expressed as percentage of inhibition compared with control mice. Topical subcutaneous treatment of 5-ASA (50mM) reduced the tumor weight by 60% and volume by 83% compared with controls after 10 days of treatment. Injection of PPAR γ antagonist GW9662 (1 mg/kg/day) significantly abolished the inhibition of tumor growth induced by 5-ASA. (C) Illustrative photo of the tumor mass in control and 5-ASA groups taken upon animal harvest and showing the effect of 5-ASA on tumor size. * $P < 0.05$ for D10 compared to D0; ** $P < 0.05$ for D21 compared to D0.

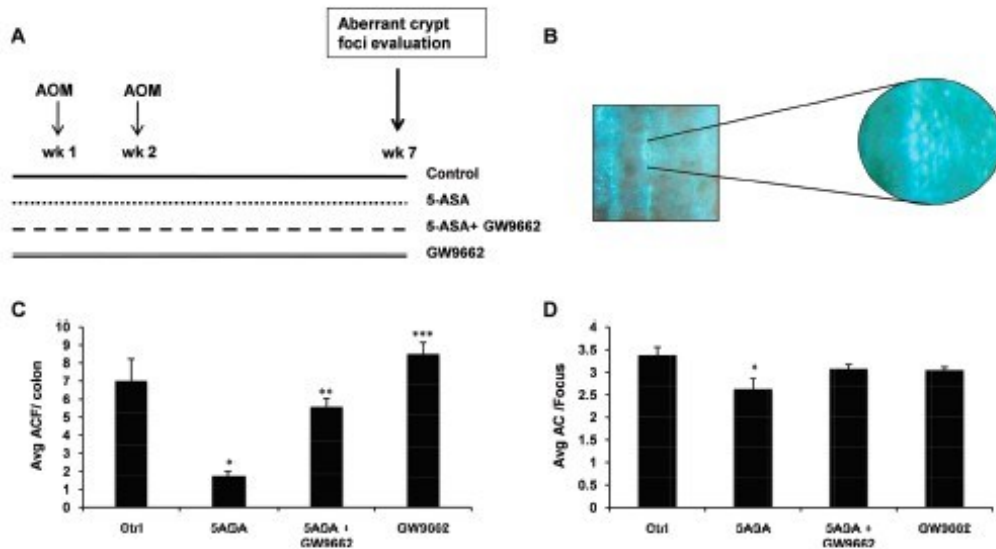


Fig. 5. 5-ASA exhibits a potent anticarcinogenic effect *in vivo*. (A) A/JOLaHsd mice were randomly divided into four groups: Control group (Ctrl) fed with standard diet, 5-ASA group fed with 5-ASA granules-containing chaw at 200 mg/kg/day, 5-ASA+GW9662 group fed with 5-ASA granules-containing chaw at 200 mg/kg/day and receiving daily intraperitoneal injection of GW9662 at 2 mg/kg/day, GW9662 group fed with standard diet and receiving daily intraperitoneal injection of GW9662 at 2 mg/kg/day. Control and 5-ASA mice groups have received daily intraperitoneal injection of 3% dimethyl sulfoxide/PBS (GW9662 vehicle). To induce ACFs (B), mice have received intraperitoneally two doses of AOM (10 mg/kg/day) at weeks 2 and 3. At the end of the protocol (week 7), mice were harvested and the formation of ACFs and ACF was blindly recorded. (C and D) 5-ASA treatment induced a significant reduction of ACF (75%) and ACFs (22%) compared with mice fed with standard diet. Coadministration of GW9662 suppressed the antitumoral effect of 5-ASA. GW9662-treated group displayed higher number of ACF compared with 5-ASA+GW9662 group. * $P < 0.05$ for 5ASA compared to control; ** $P < 0.05$ for 5ASA + GW9662 compared to 5ASA; *** $P < 0.05$ for GW9662 compared to 5ASA + GW9662.

2584

and PPAR γ -negative CRC cell lines treated with 5-ASA that PPAR γ was involved in 5-ASA-mediated induction of apoptosis. In this work, Schwab *et al.* (31) showed that mesalazine regulates cell cycle and caspase activity in a PPAR γ -dependent and PPAR γ -independent pathways in colonocytes. However, this study was limited to *in vitro* experiments and even showed mesalazine antiproliferative effects in dominant-negative PPAR γ cells. In our work, we further established, thanks to the specific effect of GW9662 and to PPAR γ knockdown cells, that the antiproliferative and proapoptotic actions of 5-ASA were at least partially PPAR γ dependent. Regarding the *in vivo* antineoplastic effects of 5-ASA, data from rodent models of CRC were contradictory. Several studies have shown that using chemical CRC animal models, 5-ASA and other PPAR γ ligands reduced the number of ACF, as well as the rate of tumor cell proliferation, and increased tumor apoptosis (4–6,17,33). On the other side, in APC mouse model of multiple intestinal neoplasia not only 5-ASA was found without any antineoplastic properties (34) but also PPAR γ ligands were shown to enhance colon carcinogenesis (17,33,35,36). A possible explanation for such discrepancies is that colon carcinogenesis in APC^{M66} mice was driven by germ-line mutations in the *Apc* gene. It has been shown that mice with preexisting damage to APC, a regulator of β -catenin, develop tumors in a manner insensitive to the status of PPAR γ . Thus, PPAR γ can suppress colon carcinogenesis only before damage to the APC/ β -catenin pathway (37). In this work, the results are in good agreement with previous reports showing antitumorigenic role for 5-ASA, but we demonstrated for the first time the link between the role of 5-ASA in suppressing colon carcinogenesis and its signaling through PPAR γ . Interestingly, blockage of PPAR γ with GW9662 induced ACF formation in the colon of mice reflecting the important endogenous antineoplastic role of PPAR γ (Figure 5).

Several clinical studies have evaluated the potential chemopreventive effect of PPAR γ ligands, including 5-ASA. For example, in patients with chemotherapy-resistant metastatic CRC, troglitazone treatment did not induce any objective tumor response and all patients had progressive disease as their best response to therapy (38). In fact, troglitazone, as all thiazolidinediones, has a wide systemic distribution due to broad expression of PPAR γ . This might explain from one side its inefficiency in tumor prevention and highlights and from the other side the need for further development of ligands targeting tumor cells. What adds a further level of complexity is that UC patients were shown to have impaired colonic expression of PPAR γ , which might also reduce drug efficiency (39). In this perspective, 5-ASA galenic presentations of delayed release have been developed so that to act locally in the colon and to be absorbed by colonic epithelial cells. Therefore, the efficiency of this drug is related to its mucosal concentration and systemic dosages remain low after oral or rectal administration (20). Thus, the availability of 5-ASA at the cellular level could explain its superior efficacy in preventing CRC among IBD subjects compared with other PPAR γ ligands. Notably, Rubin *et al.* (26) observed a 3.4-fold risk reduction of dysplasia and CRC in UC patients treated with ≥ 1.2 g/day of 5-ASA. In a case-control study comparing 102 patients with UC and CRC to matched controls, it was shown that CRC risk was reduced by 75% under 5-ASA regular treatment compared with no 5-ASA use (40). Likewise, a nested case-control study involving 18 969 patients with IBD in the UK General Practice Research Database (1987–2001) showed that regular 5-ASA users had a significantly reduced risk of CRC (adjusted odds ratio 0.6) compared with irregular 5-ASA users (41). On the other hand, some retrospective studies did not support 5-ASA as protective in preventing CRC in IBD patients (42–44) potentially due to the heterogeneity of the populations analyzed and the short period of exposure to 5-ASA. Furthermore, because of the design of retrospective studies, some key areas have not been sufficiently addressed such as concurrent use of other medications and accurate data on dosing.

In our experimental model, 5-ASA treatment (200 mg/kg/day) was started 1 week before the injection of the carcinogenic AOM and maintained for 6 weeks afterward. The treatment consisted of 5-ASA granules, usually used in IBD therapy, administered orally in mouse chaw in order to mimic tablet medication in humans. Whether

this protocol reflects the chemoprevention strategy in patients with IBD is arguable. In case-control studies, regular users, having decreased risk of CRC, were defined as having at least 6 months of non-interrupted 5-ASA treatment at doses ranging between 1.2 and 2 g/day (26,40,41). Nevertheless, the accurate dosage and duration of 5-ASA pharmacological therapy targeting CRC prevention are not yet well established. Moreover, little information is available regarding the potential chemopreventive effect of other IBD medications, and it is currently unclear whether a patient would benefit from enhanced chemoprevention when combining, for example, 5-ASA and another treatment (e.g., azathioprine). Finally, despite its well-characterized antineoplastic activities, it remains to be determined the step at which 5-ASA would interfere in the carcinogenesis process. Although there is complete absence of data from humans, studies in rodent models of colon cancer have shown that 5-ASA was able to prevent tumor formation and further to reduce the number of developed tumors (5,6,34). Although these observations warrant further investigation since they were detected in various animal models, using different dosages and administration routes, they may reveal that 5-ASA would act at multiple stages of the carcinogenesis.

5-ASA was originally developed without any knowledge of its molecular targets. However, in the past years, our knowledge of its role as a chemopreventive agent in IBD-related CRC has increased. Our piece of work, establishing the key role of PPAR γ in mediating 5-ASA antineoplastic prevention, may lead to the development of more effective PPAR γ ligands with higher efficiency or for use in association with agents of additive or synergic effects.

Supplementary material

Supplementary Materials and methods and Figure 1 can be found at <http://carcin.oxfordjournals.org/>

Funding

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Université Lille Nord de France; Centre Hospitalier et Universitaire de Lille.

Acknowledgements

We would like to thank the Association Francois Aupetit and the Foundation DigestScience for their faithful support.

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

1. Leung, K. *et al.* (2010) Ongoing colorectal cancer risk despite surveillance colonoscopy: the Polyp Prevention Trial Continued Follow-up Study. *Gastrointest. Endosc.*, **71**, 111–117.
2. Velayos, F.S. *et al.* (2005) Effect of 5-aminosalicylate use on colorectal cancer and dysplasia risk: a systematic review and metaanalysis of observational studies. *Am. J. Gastroenterol.*, **100**, 1345–1353.
3. Eaden, J.A. *et al.* (2001) The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, **48**, 526–535.
4. Brown, W.A. *et al.* (2000) 5-aminosalicylic acid and olsalazine inhibit tumor growth in a rodent model of colorectal cancer. *Dig. Dis. Sci.*, **45**, 1578–1584.
5. Ikeda, I. *et al.* (2007) 5-aminosalicylic acid given in the remission stage of colitis suppresses colitis-associated cancer in a mouse colitis model. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 6527–6531.
6. Clapper, M.L. *et al.* (2008) 5-aminosalicylic acid inhibits colitis-associated colorectal dysplasias in the mouse model of azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colitis. *Inflamm. Bowel Dis.*, **14**, 1341–1347.
7. Bantel, H. *et al.* (2000) Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF-kappaB in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.*, **95**, 3452–3457.
8. Wahl, C. *et al.* (1998) Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J. Clin. Invest.*, **101**, 1163–1174.

9. Bos, C.L. et al. (2006) Protein phosphatase 2A is required for mesalazine-dependent inhibition of Wnt/beta-catenin pathway activity. *Carcinogenesis*, **27**, 2371–2382.
10. Campregher, C. et al. (2010) Mesalazine reduces mutations in transforming growth factor beta receptor II and activin type II receptor by improvement of replication fidelity in mononucleotide repeats. *Clin. Cancer Res.*, **16**, 1950–1956.
11. Stolfi, C. et al. (2008) Mesalazine negatively regulates CDC25A protein expression and promotes accumulation of colon cancer cells in S phase. *Carcinogenesis*, **29**, 1258–1266.
12. Koelink, P.J. et al. (2010) 5-Aminosalicylic acid inhibits TGF-beta signaling in colorectal cancer cells. *Cancer Lett.*, **287**, 82–90.
13. Montelione, G. et al. (2006) Silencing of SH-PTP2 defines a crucial role in the inactivation of epidermal growth factor receptor by 5-aminosalicylic acid in colon cancer cells. *Cell Death Differ.*, **13**, 202–211.
14. Sarraf, P. et al. (1998) Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat. Med.*, **4**, 1046–1052.
15. Rousseaux, 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.
16. Grommes, C. et al. (2004) Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol.*, **5**, 419–429.
17. Osawa, E. et al. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice. *Gastroenterology*, **124**, 361–367.
18. Dubuquoy, L. et al. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: a new target for the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, **24**, 719–724.
19. Dubuquoy, L. et al. (2002) Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. *Lancet*, **360**, 1410–1418.
20. Staerk Laursen, L. et al. (1990) Disposition of 5-aminosalicylic acid by olsalazine and three mesalazine preparations in patients with ulcerative colitis: comparison of intraluminal colonic concentrations, serum values, and urinary excretion. *Gut*, **31**, 1271–1276.
21. Frieri, G. et al. (1999) Rectal and colonic mesalazine concentration in ulcerative colitis: oral vs. oral plus topical treatment. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **13**, 1413–1417.
22. Fabus, D.M. et al. (1986) Tumor measurement in the nude mouse. *J. Surg. Oncol.*, **31**, 229–234.
23. Papanikolaou, A. et al. (1998) Azoxymethane-induced colon tumors and aberrant crypt foci in mice of different genetic susceptibility. *Cancer Lett.*, **130**, 29–34.
24. Ahmadi, A. et al. (2009) Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: the search continues. *World J. Gastroenterol.*, **15**, 61–66.
25. Rubin, D.T. et al. (2008) Colorectal cancer prevention in inflammatory bowel disease and the role of 5-aminosalicylic acid: a clinical review and update. *Inflamm. Bowel Dis.*, **14**, 265–274.
26. Rubin, D.T. et al. (2006) Aminosalicylate therapy in the prevention of dysplasia and colorectal cancer in ulcerative colitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **4**, 1346–1350.
27. Stolfi, C. et al. (2012) Colorectal cancer chemoprevention by mesalazine and its derivatives. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2012**, 980458.
28. Stolfi, C. et al. (2008) Cyclooxygenase-2-dependent and -independent inhibition of proliferation of colon cancer cells by 5-aminosalicylic acid. *Biochem. Pharmacol.*, **75**, 668–676.
29. Reinacher-Schick, A. et al. (2003) Mesalazine causes a mitotic arrest and induces caspase-dependent apoptosis in colon carcinoma cells. *Carcinogenesis*, **24**, 443–451.
30. Chan, T.A. et al. (1998) Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 681–686.
31. Schwab, M. et al. (2008) PPARgamma is involved in mesalazine-mediated induction of apoptosis and inhibition of cell growth in colon cancer cells. *Carcinogenesis*, **29**, 1407–1414.
32. Chu, E.C. et al. (2007) Mesalazine downregulates c-Myc in human colon cancer cells. A key to its chemopreventive action? *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **25**, 1443–1449.
33. Tanaka, T. et al. (2001) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res.*, **61**, 2424–2428.
34. Koelink, P.J. et al. (2009) 5-Aminosalicylic acid inhibits colitis-associated but not sporadic colorectal neoplasia in a novel conditional Apc mouse model. *Carcinogenesis*, **30**, 1217–1224.
35. Lefebvre, A.M. et al. (1998) Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-ApCMin/+ mice. *Nat. Med.*, **4**, 1053–1057.
36. Saez, E. et al. (1998) Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat. Med.*, **4**, 1058–1061.
37. Gimun, G.D. et al. (2002) APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPARgamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13771–13776.
38. Kulke, M.H. et al. (2002) A phase II study of troglitazone, an activator of the PPARgamma receptor, in patients with chemotherapy-resistant metastatic colorectal cancer. *Cancer J.*, **8**, 395–399.
39. Dubuquoy, L. et al. (2003) Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, **124**, 1265–1276.
40. Eaden, J. et al. (2000) Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **14**, 145–153.
41. van Staa, T.P. et al. (2005) 5-Aminosalicylate use and colorectal cancer risk in inflammatory bowel disease: a large epidemiological study. *Gut*, **54**, 1573–1578.
42. Nguyen, G.C. et al. (2012) 5-Aminosalicylic acid is not protective against colorectal cancer in inflammatory bowel disease: a meta-analysis of non-referral populations. *Am. J. Gastroenterol.*, **107**, 1298–1304.
43. Bernstein, C.N. et al. (2003) Does the use of 5-aminosalicylates in inflammatory bowel disease prevent the development of colorectal cancer? *Am. J. Gastroenterol.*, **98**, 2784–2788.
44. Terdiman, J.P. et al. (2007) 5-Aminosalicylic acid therapy and the risk of colorectal cancer among patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, **13**, 367–371.

Received October 31, 2012; revised May 30, 2013; accepted June 19, 2013

6. LES AGONISTES DE PPAR γ INHIBENT

L'EXPRESSION DU GENE SUPRESSEUR DE

TUMEUR CTEN

6.1 Introduction

La tensine est une famille de gènes comprenant quatre membres (tensin1, tensin2, tensin3 et la tensin4 ou cten), codant pour des protéines exprimées au contact du versant cytoplasmique des molécules d'adhésion (Lo et Lo, 2002). Cten est plus petite que les autres tensines et n'a en commun avec ces dernières que deux domaines : le domaine SH2 (Src homology 2) et PTB (phosphotyrosine binding) qui sont présents aux extrémités C-terminales de tous les types de tensines (Lo, 2004). Grâce à leur domaine PTB, les tensines interagissent avec la queue cytoplasmique des intégrines, molécules d'adhésion cellulaire transmembranaire. Plusieurs études ont montré le rôle de Cten dans le contrôle de la mobilité cellulaire, de l'apoptose et de l'homéostasie des récepteurs des facteurs de croissance cellulaire.

En dehors de la prostate et du placenta, Cten est très peu exprimée dans les tissus normaux. Par contre, l'expression de Cten augmente significativement dans de nombreux cancers, tels que l'estomac, le CCR, le sein, le poumon, la peau ou le pancréas (Lo et al. 2014; Katz et al. 2007, Albasri et al. 2011 ; Al-Ghamdi et al. 2013), suggérant que la surexpression de Cten pourrait jouer un rôle dans la tumorigénèse. Dans de nombreux cancers, l'expression de Cten a été significativement associée à la présence de métastases, au caractère invasif ou à la mortalité. Dans le CCR, la surexpression de Cten est associée à un stade de Dukes plus avancé, à des métastases à distance et à un mauvais pronostic (Albasri et al. 2011).

Même si certaines études ont montré que l'expression de Cten semble être, en partie, régulée

par les voies RAS-Raf-Mek, PI3K-Akt et Stat3, qui sont largement activées dans les processus néoplasiques (Lo et al. 2014), les mécanismes contrôlant l'expression de Cten restent largement méconnus.

Des études ont démontré que la surexpression de Cten favorisait de la migration des cellules épithéliales normales et cancéreuses (Katz et al. 2007 ; Liao et al. 2009 ; Albasri et al. 2009 ; Al-Ghamdi et al. 2013). Cten est capable d'interrompre le lien entre la Tensine3, les intégrines de surface et le cytosquelette d'actine, conduisant à une condition plus favorable à la migration cellulaire et à l'invasion (Katz et al. 2007). Cten serait aussi capable de favoriser la mobilité cellulaire en régulant à la hausse l'expression de l' « intégrin linked kinase » (Albasri et al, 2011) ou en se liant à DLC1, un suppresseur de tumeur. Cten serait aussi capable de favoriser la prolifération cellulaire en réduisant le niveau d'ubiquitination de l'EGF-R (Hong et al. 2013). L'interaction de la Cten avec la β -caténine contribuerait également à favoriser le processus tumoral (Liao et al. 2009). La β -caténine se trouve normalement dans les jonctions adhérentes, le cytoplasme et le noyau. Au niveau des jonctions adhérentes, elle interagit avec l'E-cadhérine. Il semble que Cten soit capable d'interagir avec la β -caténine dans le noyau cellulaire et de moduler l'expression de l'E-Cadherine (Hong et al. 2013). Dans les cellules d'adénocarcinome colique, la surexpression de Cten diminue l'expression d'E-cadhérine (Albasri et al. 2009).

Différentes équipes tentent actuellement d'utiliser Cten comme marqueur de dépistage ou marqueur pronostic de certains cancer. Avec son impact sur la voie de l'EGFR, cibler Cten de façon spécifique pourrait être une approche thérapeutique prometteuse pour certains cancers. Cependant à ce jour, il n'existe agent pharmacologique capable de moduler l'expression de Cten.

6.2 Objectifs

- Confirmer par une *étude préliminaire in-vitro* que les agonistes de PPAR γ sont capables de diminuer l'expression de CTEN

6.3 Matériels et Méthodes

Les modalités de culture des cellules Caco-2, de stimulation par les différents agonistes de synthétiques de PPAR γ , et d'extraction de l'ADN ont été décrites ci-dessus. Pour l'étude de l'expression de CTEN, des cellules COLO205, dérivées d'adénocarcinome colique, ont aussi été étudiées, selon les mêmes modalités. Comme précédemment décrit, les cellules ont été traitées avec du GED (30mM, Guliani, Italie), et du 5-ASA (30 mM, Sigma).

La transcription de gènes était estimée par PCR quantitative afin de confirmer les résultats du microarray dans des cellules Caco-2 et Colo205. L'expression protéique de CTEN était évaluée par western blot selon les modalités décrites précédemment. Ici, 6×10^6 cellules Colo-205 étaient traitées 24 h avec soit du 5-ASA (30 mM) ou du GED (30 mM). Des anticorps primaires anti-CTEN (Novus Biological), et b-actine (Sigma, monoclonal mice, clone AC-15, 1/5 000) étaient utilisés pour le western-blot.

Pour l'immunofluorescence, des cellules Colo205 étaient stimulées 24h par le 5ASA 30mM et le GED 30 mM. L'immunofluorescence était ensuite réalisée selon les modalités décrites plus haut. L'anticorps E-Cadherin primaire provenait de Atlas Antibodies.

s.

6.4 Résultats

L'expression de l'ARNm et de la protéine CTEN est diminuée par le GED et le 5ASA dans les cellules Caco-2 et Colo-205

Les résultats du microarray ont été confirmés par qRT-PCR. Une répression significative de l'expression de l'ARNm CTEN était observée dans les cellules Caco-2 et Colo-205 traitées par le GED 30mM et le 5ASA 30mM (Figure 18). L'analyse en Western blot a montré que l'expression de la protéine CTEN était elle aussi diminuée dans les cellules Colo-205 stimulées par ces mêmes molécules (Figure 18 A et B).

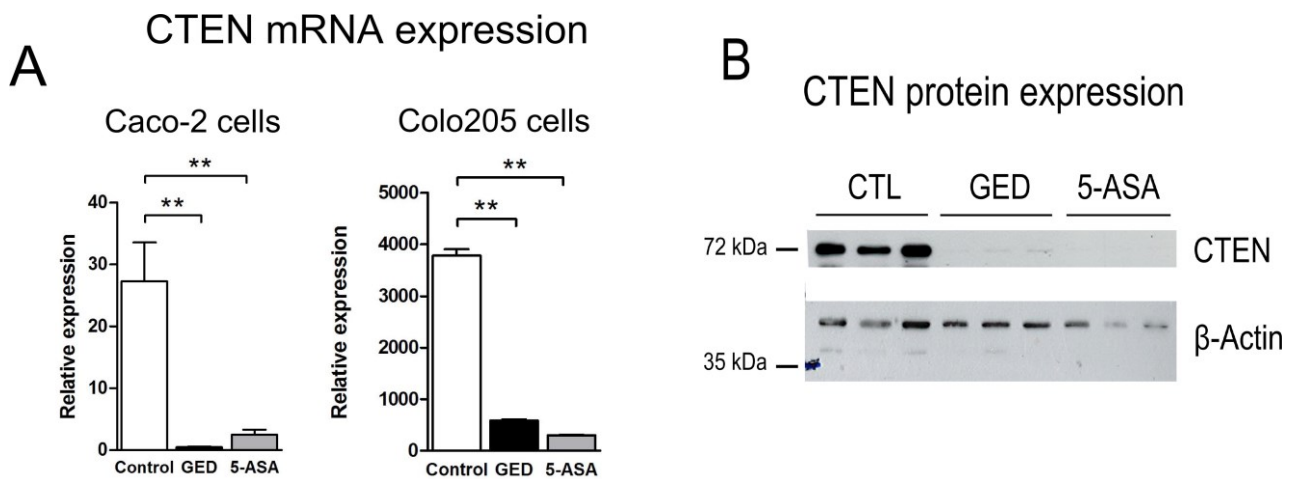


Figure 18. A. Le GED et le 5ASA réprime l'expression de l'ARNm CTEN dans les cellules Caco2 et les Colo205. B. Le GED et le 5ASA réprime l'expression de la protéine CTEN dans les cellules Caco2 et les Colo205.

Le GED est capable d'augmenter l'expression d'E-Cadherine

Dans les cellules Colo-205 traitées 24h par du GED 30mM, une augmentation de l'expression de l'E-Cadherine était observée par immunofluorescence.

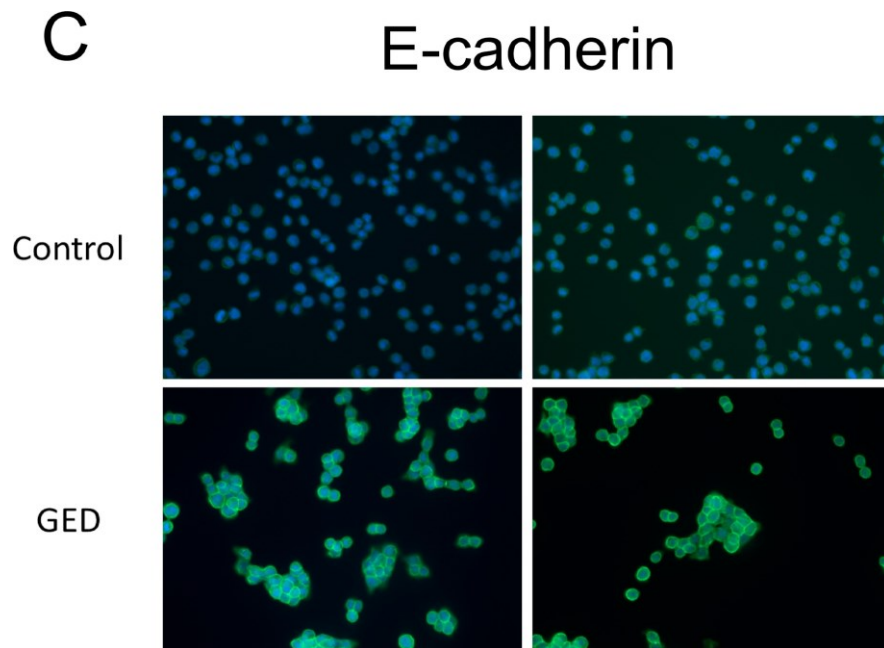


Figure 19. Le GED 30mM augmente l'expression d'E-Cadherine dans les cellules Colo205.

6.5 Conclusions

Ces résultats préliminaires montrent que le GED et le 5ASA sont capables de moduler l'expression de CTEN et de ces gènes cibles tels que l'E-Cadherine.

Les travaux se poursuivent au laboratoire afin de :

- confirmer le caractère PPAR γ dépendant de cette inhibition,
- évaluer l'impact des agonistes de PPAR γ , via CTEN, sur l'adhésion et la migration cellulaire,
- étudier les mécanismes par lesquels le 5ASA et le GED module l'expression d'E-Cadherine et la voie de l'EGF,
- De confirmer ces résultats in-vivo.

7. DISCUSSION

L'ensemble de ces résultats confirme le rôle clé de PPAR γ dans le contrôle l'homéostasie intestinale. Comme dans d'autres organes, PPAR γ régule dans la cellule épithéliale intestinale les voies de l'inflammation, la différenciation et la maturation cellulaire mais aussi des fonctions métaboliques. Les agonistes de PPAR γ , qu'ils soient synthétiques ou naturels, peuvent influencer de nombreuses fonctions cellulaires et pourraient donc être proposés dans diverses ères thérapeutiques.

7.1 PPAR γ et intolérance au lactose

Grâce à une analyse transcriptomique à partir de cellules épithéliales intestinales, nous avons mis en évidence une induction de l'expression de la lactase par différents agonistes de PPAR γ (GED 1mM et 30mM, 5ASA 30mM et pioglitazone 1 μ M). Nous avons confirmé le caractère PPAR γ dépendant de son expression grâce à un modèle de cellule épithéliale intestinale déficitaire pour l'expression de PPAR γ . Nous avons identifié plusieurs éléments de réponse à PPAR γ (PPRE) au niveau du promoteur du gène de lactase, dont l'activité augmente après stimulation par le GED. *In vivo*, le GED est capable d'augmenter significativement l'expression et l'activité de la lactase. Son expression est réduite en cas de déficit d'expression de PPAR γ , confirmant les données *in vitro*. Le GED est capable de réduire les manifestations d'intolérance au lactose chez le rongeur. Finalement, nous identifions ici pour la première fois, la lactase comme un nouveau gène cible de PPAR γ et nous identifions le rôle pivot de PPAR γ dans le contrôle de l'homéostasie du glucose dans l'intestin. Aussi nous identifions ici, les agonistes de PPAR γ comme des traitements potentiels de l'intolérance au lactose.

Malgré le développement de substituts lactasique, le principal traitement de l'intolérance au lactose reste à ce jour l'éviction des produits laitiers. Ce régime restrictif élimine cependant les principales sources de nombreux oligo-éléments et vitamines indispensables comme le calcium, la vitamine D, le magnésium, le potassium ou encore le phosphore ou la vitamine A. L'intolérance au lactose peut aboutir à une réduction de la densité minérale osseuse problématique chez les enfants et adolescents ou chez la femme ménopausée, favorisant ostéoporose et fractures (Tereszkowski et al. 2012 ; Birge et al. 1967).

L'intolérance au lactose est aussi favorisée par la présence croissante et souvent cachée de lactose dans de nombreux composés alimentaires. Le lactose est communément utilisé par l'industrie pharmaceutique et agro-alimentaire comme agent de consistance, de texture, ou encore comme colorant. Ainsi, la production du lactose aux USA a augmenté de 50 millions

kg/an en 1979 à 300 millions de kg/an en 2004 (Matthews 2005, Vesa et al. 2000).

Différents traitements comme les laits pauvres en lactose ou supplémentés en lactase, des prébiotiques ou encore certains antibiotiques ont été évalués pour le traitement de l'intolérance au lactose. L'objectif du traitement serait d'éviter la présence des symptômes et d'assurer un apport satisfaisant en nutriments lors de l'enfance, l'adolescence, la grossesse, l'allaitement puis après la ménopause. Cependant ces études ont utilisé des définitions différentes de l'intolérance de lactose et des critères de jugement très hétérogènes. Pour les quelques études positives, le niveau de preuve est donc insuffisant de par leurs résultats ou de faiblesses méthodologiques. Ainsi aujourd'hui aucun traitement spécifique n'est actuellement recommandé pour l'intolérance au lactose (Wooten et al. 2004).

Ces résultats nous permettent d'envisager la lactase comme une nouvelle cible thérapeutique des agonistes de PPAR γ . Nos résultats devront être confirmés chez l'homme. Avant un essai clinique randomisé contrôlé, une première étape pourrait être la stimulation ex-vivo de biopsies duodénales humaines de patients hypolactasiques. L'innocuité et la tolérance du GED dans une étude de phase I a déjà été mise en évidence (Rousseaux C et al. 2010). A l'inverse, la pioglitazone, utilisée dans le diabète de type II a été récemment retiré du marché en France du fait de complications cardiovasculaires et néoplasiques. Le 5ASA, utilisé actuellement pour le traitement des maladies inflammatoires intestinales, n'a pas pour cible les sites spécifiques de l'expression de la lactase. En effet, il possède une action locale au niveau colique grâce à un délitement contrôlé.

Un nouvel objectif dans le domaine de la recherche nutritionnelle est le développement « d'aliment » , des produits alimentaires fonctionnels responsables d'effets thérapeutiques et de bénéfices en terme de santé (Roberfroid, 2000). Dans ce contexte, les agonistes naturels de PPAR γ ont un intérêt tout particulier (Sauer, 2015). Nous avons observé que la CLA était capable d'induire l'expression et l'activité de la lactase, suggérant fortement que les agonistes de PPAR γ présents naturellement dans sources alimentaires pourraient limiter la

malabsorption du lactose.

7.2 Agonistes de PPAR γ et cancer colorectal

Nos travaux montrent que le 5ASA est capable de prévenir l'apparition de lésions néoplasiques coliques induites chez la souris par un mécanisme PPAR γ dépendant ; plaçant donc le 5ASA comme une molécule clef de la prévention du CCR. Les patients atteints de MICI présentent une augmentation du risque de CCR (Fumery et al. 2017) et le 5ASA, est actuellement reconnu comme le principal traitement de la RCH légère à modérée (Magro et al. 2017).

Cependant, les mécanismes par lesquels le 5ASA induit un effet antinéoplasique demeurent largement inconnus. Ici, nous avons pu montrer que ces effets étaient médiés par PPAR γ . En utilisant des concentrations cliniquement pertinentes (Staerk et al. 1990 ; Frieri et al. 1999), nous avons montré que le 5ASA était capable d'inhiber la prolifération cellulaire et d'induire une apoptose dans la cellule épithéliale intestinale dérivée d'adénocarcinome colique en culture. Ces effets disparaissaient dans les cellules traitées par le GW9662, agoniste de PPAR γ , ou dans les cellules ShPPAR γ . Ensuite, dans un modèle *in vivo* de tumeur xéno greffée, puis de carcinogenèse colique induite par l'AOM, nous avons confirmé un effet anti-néoplasique du 5ASA, là aussi par un mécanisme PPAR γ -dépendant.

Les effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques du 5-ASA ont déjà été rapportées dans différents types de cellules épithéliales intestinales en culture, et plusieurs mécanismes ont été identifiés : l'inhibition de NF κ B (Bantel et al. 2000, Wahl et al. 1998), de cyclo-oxygénases (Dubuquoy et al. 2000), l'activation de la caspase-3 (Chan et al. 1998), l'inhibition de la voie de l'EGF-R (Monteleone et al. 2006), de la voie Wnt / β -caténine (Bos et al. 2006), la régulation des points de contrôle de la réplication de l'ADN (Campregher et al. 2010) ou encore l'inhibition de la voie du TGF- β (Monteleone et al. 2006). Dans le cadre d'une analyse transcriptomique dans la cellule épithéliale intestinale, nous avons pu identifier pour la première fois le gène suppresseur de tumeur Cten comme un gène cible de PPAR γ . Des manipulations préliminaires ont montré que le 5ASA et le GED étaient capables de diminuer l'expression de Cten et en parallèle d'augmenter l'expression d'E-Cadherine dans la cellule

épithéliale intestinale dérivée d'adénocarcinome colique. Cependant, le récepteur par lequel le 5-ASA exerce ses effets antinéoplasiques reste méconnu. Schwab et al. (Schwab et al. 2008) a montré que la mesalazine régula le cycle cellulaire et l'activité de caspases dans la cellule épithéliale intestinale à la fois de façon PPAR γ -dépendante et indépendante. Cependant, cette étude s'est limitée à des expériences *in vitro*. Les données sur les effets antinéoplasiques du 5-ASA *in vivo* étaient jusqu'alors contradictoires (Brown et al. 2000 ; Ikeda et al. 2007 ; Koelink et al. 2009). Une explication possible de ces différences de résultats est le type de modèle utilisé. Il a été montré que la carcinogenèse colique induite par la mutation du gène APC, un régulateur de la β -caténine, présentait des tumeurs insensibles au statut de PPAR γ .

Dans ce travail, les résultats confirment l'effet antinéoplasique du 5-ASA, mais surtout démontrent pour la première fois que cet effet est, au moins en partie, dépendant de PPAR γ . Plusieurs études cliniques ont évalué l'intérêt des agonistes de PPAR γ dans cette indication. La troglitazone a été évalué dans le CCR métastatique ou aucune réponse tumorale objective n'avait été observée (Kulke et al. 2002). En réalité, la troglitazone, comme toutes les thiazolidinediones, présente une large distribution systémique et un défaut de spécificité au niveau de la cellule épithéliale intestinale, qui pourrait expliquer, au moins en partie, son inefficacité. Il semble nécessaire de développer des agonistes de PPAR γ avec un mécanisme d'action plus ciblé. Des galéniques à libération prolongée ont été développées pour le 5ASA, favorisant ainsi sa biodisponibilité au niveau colique et sa concentration au niveau de la muqueuse intestinale. Or, l'efficacité du 5ASA est liée à cette concentration muqueuse. A l'inverse sa concentration systémique reste limitée après son administration orale ou rectale (Staerk-Laursen et al. 1990). Différentes études cliniques rétrospectives ont évalué l'intérêt du 5ASA pour la prévention du CCR chez les patients atteints de RCH avec des résultats conflictuels. Une méta-analyse de ces études a estimé que le 5-ASA réduisait de moitié le risque de développer une dysplasie ou un CRC (Velayos et al. 2005). Ces études présentent cependant de nombreuses limites, notamment de nombreux facteurs confondants (activité de la maladie, traitements associés, etc) et limites méthodologiques (hétérogénéité de la

population, etc) qui limitent l'interprétation de ces études.

Notre travail, établissant le rôle clé de PPAR γ pour la prévention du CCR par le 5-ASA, oriente vers le développement de nouveaux ligands de PPAR γ plus efficaces ou d'actions plus ciblées ou encore pour une utilisation en association afin d'obtenir des effets additifs ou synergiques. Le GED, agoniste de PPAR γ récemment développé aux laboratoires, présentant un pouvoir d'activation de PPAR γ plus puissant que le 5ASA pourrait trouver sa place dans cette indication. Les effets antinéoplasiques du GED *in-vivo* et *in-vitro* reste cependant à être confirmés.

8. Conclusion

PPAR γ présente un rôle clef dans le contrôle de l'homéostasie intestinale. Comme dans d'autres organes, PPAR γ contrôle de nombreuses fonctions cellulaires dans la cellule épithéliale intestinale, tels que l'inflammation, la maturation et la fonction cellulaire, ou du métabolisme. Grâce à une analyse transcriptomique nous avons pu identifier de nouveaux gènes cible de PPAR γ dans la cellule épithéliale intestinale, dont le gène lactase dont le déficit d'expression est responsable de l'intolérance au lactose. Nous avons pu montrer que les agonistes de PPAR γ étaient capables d'augmenter l'expression et l'activité de la lactase *in vitro* et *in vivo*, identifiant les agonistes de PPAR γ comme potentiellement le premier traitement pharmacologique de l'intolérance au lactose. Nous avons pu ensuite confirmer l'effet antinéoplasique du 5ASA, *in vivo* et *in vitro*, et confirmer que cet action était dépendante de PPAR γ . Nous poursuivons l'étude de nouveaux gènes cibles des PPAR γ dans la cellule épithéliale intestinale afin notamment d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de mieux comprendre les effets thérapeutiques ou indésirables des agonistes de PPAR γ .

9. Références

Adachi M, Kurotani R, Morimura K, et al. Peroxisome proliferator activated receptor gamma in colonic epithelial cells protects against experimental inflammatory bowel disease. *Gut*. 2006;55:1104-13.

Albasri A, Seth R, Jackson D, et al. C-terminal Tensin-like (CTEN) is an oncogene which alters cell motility possibly through repression of E-cadherin in colorectal cancer. *J Pathol*. 2009;218:57-65.

Albasri A, Al-Ghamdi S, Fadhil W, et al. Cten signals through integrin-linked kinase (ILK) and may promote metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2011;30:2997-3002.

Alexandre V, Davila AM, Bouchoucha M, et al. L'intolérance au lactose en 2011. *Hépto-gastro* 2011;18:581-594.

Al-Ghamdi S, Cachat J, Albasri A, et al. C-terminal tensin-like gene functions as an oncogene and promotes cell motility in pancreatic cancer. *Pancreas*. 2013;42:135-40.

Allred CD, Kilgore MW. Selective activation of PPARgamma in breast, colon, and lung cancer cell lines. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;235:21-9.

Altmann R, Hausmann M, Spöttl T, et al. 13-Oxo-ODE is an endogenous ligand for PPARgamma in human colonic epithelial cells. *Biochem Pharmacol*. 2007;74:612-22.

Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, et al. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *N Engl J Med*. 1997;36:17-24.

Appel LJ, Champagne CM, Harsha DW, et al. Writing Group of the PREMIER Collaborative Research Group. Effects of comprehensive lifestyle modification on blood pressure control: main results of the PREMIER clinical trial. *JAMA*. 2003;289:2083-2093.

Arita M, Clish CB, Serhan CN. The contributions of aspirin and microbial oxygenase to the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: novel oxygenase products from omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338:149-57.

Arola H, Koivula T, Jokela H, Isokoski M. Simple urinary test for lactose malabsorption. *Lancet*. 1982;2:524-5.

- Arola H, Tamm A. Metabolism of lactose in the human body. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1994;202:21-5.
- Auwerx J. PPARgamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia.* 1999;42:1033-49
- Bantel H, Berg C, Vieth M, et al. Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF-kappaB in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:3452-7.
- Barbut S. Effects of milk powder and its components on texture, yield, and color of a lean poultry meat model system. *Poult Sci.* 2010;89:1320-4.
- Bassaganya-Riera J, Reynolds K, Martino-Catt S, et al. Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2004;127:777-91.
- Bassaganya-Riera J, Hontecillas R. CLA and n-3 PUFA differentially modulate clinical activity and colonic PPAR-responsive gene expression in a pig model of experimental IBD. *Clin Nutr.* 2006;25:454-65.
- Bertin B, Dubuquoy L, Colombel JF, Desreumaux P. PPAR-gamma in ulcerative colitis: a novel target for intervention. *Curr Drug Targets.* 2013;14:1501-7.
- Birge SJ Jr, Keutmann HT, Cuatrecasas P, et al. Osteoporosis, intestinal lactase deficiency and low dietary calcium intake. *N Engl J Med.* 1967;276:445-8.
- Bishop-Bailey D. PPARs and angiogenesis. *Biochem Soc Trans.* 2011;39:1601-5.
- Boirivant M, Pallone F, Di Giacinto C, et al. Inhibition of Smad7 with a specific antisense oligonucleotide facilitates TGF-beta1-mediated suppression of colitis. *Gastroenterology.* 2006;131:1786-98.
- Bonofiglio D, Aquila S, Catalano S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activates p53 gene promoter binding to the nuclear factor-kappaB sequence in human MCF7 breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2006;20:3083-92.
- Bos CL, Diks SH, Hardwick JC, et al. Protein phosphatase 2A is required for mesalazine-dependent inhibition of Wnt/beta-catenin pathway activity. *Carcinogenesis.* 2006;27:2371-82.
- Bren-Mattison Y, Meyer AM, Van Putten V, et al. Antitumorigenic effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in non-small-cell lung cancer cells are mediated by suppression of cyclooxygenase-2 via inhibition of nuclear factor-kappaB. *Mol Pharmacol.* 2008;73:709-17.
- Brown WA, Farmer KC, Skinner SA, et al. 5-aminosalicylic acid and olsalazine inhibit tumor growth in a rodent model of colorectal cancer. *Dig Dis Sci.* 2000;45:1578-84.

Campregher C, Honeder C, Chung H, et al. Mesalazine reduces mutations in transforming growth factor beta receptor II and activin type II receptor by improvement of replication fidelity in mononucleotide repeats. *Clin Cancer Res.* 2010;16:1950-6.

Casellas F, Aparici A, Casaus M, et al. Subjective perception of lactose intolerance does not always indicate lactose malabsorption. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010;8 :581-6.

Cesario RM, Stone J, Yen WC, et al. Differentiation and growth inhibition mediated via the RXR:PPARgamma heterodimer in colon cancer. *Cancer Lett.* 2006;240:225-33.

Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:681-6.

Consoli A, Formoso G. Do thiazolidinediones still have a role in treatment of type 2 diabetes mellitus? *Diabetes Obes Metab.* 2013;15:967-77.

Dahlqvist A. Assay of intestinal disaccharidases. *Scand J Clin Lab Invest.* 1984;44:169-72.

da Rocha Junior LF, Dantas AT, et al. PPAR γ Agonists in Adaptive Immunity: What Do Immune Disorders and Their Models Have to Tell Us? *PPAR Res.* 2013;2013:519724.

Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, et al. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med.* 2001;193:827-38.

Dubuquoy L, Dharancy S, Nutten S, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. *Lancet.* 2002;360:1410-8.

Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2003;124:1265-76.

Dubuquoy L, Rousseaux C, Thuru X, et al. PPARgamma as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut.* 2006;55:1341-9.

Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.* 2001;48:526-35.

Elrod HA, Sun SY. PPARgamma and Apoptosis in Cancer. *PPAR Res.* 2008;2008:704165

Enattah NS, Jensen TG, Nielsen M, et al. Independent introduction of two lactase-persistence alleles into human populations reflects different history of adaptation to milk culture. *Am J Hum Genet.* 2008;82:57-72.

Euhus DM, Hudd C, LaRegina MC, et al. Tumor measurement in the nude mouse. *J Surg Oncol.*

1986;31:229-34.

Eun CS, Han DS, Lee SH, et al. Probiotics may reduce inflammation by enhancing peroxisome proliferator activated receptor gamma activation in HT-29 cells. *Korean J Gastroenterol*. 2007;49:139-46.

Fajas L, Egler V, Reiter R, et al. PPARgamma controls cell proliferation and apoptosis in an RB-dependent manner. *Oncogene*. 2003;22:4186-93.

Feagan BG, Sandborn WJ, Mittmann U, et al. Omega-3 free fatty acids for the maintenance of remission in Crohn disease: the EPIC Randomized Controlled Trials. *JAMA*. 2008;299:1690-7.

Frieri G, Pimpo MT, Palumbo GC, et al. Rectal and colonic mesalazine concentration in ulcerative colitis: oral vs. oral plus topical treatment. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13:1413-7.

Fujisawa T, Sugiyama M, Tomimoto A, et al. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes tumorigenesis through activation of the beta-catenin / T cell factor (TCF) pathway in the mouse intestine. *J Pharmacol Sci*. 2008;108:535-44.

Fumery M, Singh S, Dulai PS, et al. Natural History of Adult Ulcerative Colitis in Population-based Cohorts: A Systematic Review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018;16:343-356.e3.

Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem*. 2003;278:34268-76.

Glass CK, Ogawa S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:44-55.

Greschik H, Moras D. Structure-activity relationship of nuclear receptor-ligand interactions. *Curr Top Med Chem*. 2003;3:1573-99.

Gupta RA, Brockman JA, Sarraf P, et al. Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells. *J Biol Chem*. 2001;276:29681-7.

Hollenberg AN, Susulic VS, Madura JP, et al. Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the leptin promoter. *J Biol Chem*. 1997;272:5283-90.

Hollox EJ, Poulter M, Zvarik M, et al. Lactase haplotype diversity in the Old World. *Am J Hum Genet*. 2001;68:160-172.

Hong I, Rho HS, Kim DH, Lee MO. Activation of LXR α induces lipogenesis in HaCaT cells. *Arch Pharm Res*. 2010;33:1443-9

- Hong SY, Shih YP, Li T, Carraway KL 3rd, et al. CTEN prolongs signaling by EGFR through reducing its ligand-induced degradation. *Cancer Res.* 2013;73:5266-76
- Hontecillas R, Wannemeulher MJ, Zimmerman DR, et al. Nutritional regulation of porcine bacterial-induced colitis by conjugated linoleic acid. *J Nutr.* 2002;132:2019-27.
- Hou Y, Moreau F, Chadee K. PPAR γ is an E3 ligase that induces the degradation of NF κ B/p65. *Nat Commun.* 2012;3:1300.
- Huang CH, Hou YC, Yeh CL, Yeh SL. A soybean and fish oil mixture with different n-6/n-3 PUFA ratios modulates the inflammatory reaction in mice with dextran sulfate sodium-induced acute colitis. *Clin Nutr.* 2015;34:1018-24.
- Ikeda I, Tomimoto A, Wada K, et al. 5-aminosalicylic acid given in the remission stage of colitis suppresses colitis-associated cancer in a mouse colitis model. *Clin Cancer Res.* 2007;13:6527-31.
- Järvelä IE. Molecular diagnosis of adult-type hypolactasia (lactase non-persistence). *Scand J Clin Lab Invest.* 2005;65:535-9.
- Järvelä I, Torniainen S, Kolho KL. Molecular genetics of human lactase deficiencies. *Ann Med.* 2009;41:568-75.
- Jeong Y, Xie Y, Lee W et al. Research resource: Diagnostic and therapeutic potential of nuclear receptor expression in lung cancer. *Mol Endocrinol.* 2012;26:1443-54.
- Katz M, Amit I, Citri A, Shay T, et al. A reciprocal tensin-3-cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration. *Nat Cell Biol.* 2007;9:961-9.
- Kim JH, Song J, Park KW. The multifaceted factor peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in metabolism, immunity, and cancer. *Arch Pharm Res.* 2015;38:302-12.
- Kiss M, Czimmerer Z, Nagy L. The role of lipid-activated nuclear receptors in shaping macrophage and dendritic cell function: From physiology to pathology. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:264-86.
- Koelink PJ, Robanus-Maandag EC, Devilee P, et al. 5-Aminosalicylic acid inhibits colitis-associated but not sporadic colorectal neoplasia in a novel conditional Apc mouse model. *Carcinogenesis.* 2009;30:1217-24.
- Kohno H, Yasui Y, Suzuki R, et al. Dietary seed oil rich in conjugated linolenic acid from bitter melon inhibits azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis through elevation of colonic PPAR γ expression and alteration of lipid composition. *Int J Cancer.* 2004;110:896-901.
- Kuokkanen M, Myllyniemi M, Vauhkonen M, et al. A biopsy-based quick test in the diagnosis of duodenal hypolactasia in upper gastrointestinal endoscopy. *Endoscopy.* 2006;38:708-12.

Kulke MH, Demetri GD, Sharpless NE, et al. A phase II study of troglitazone, an activator of the PPARgamma receptor, in patients with chemotherapy-resistant metastatic colorectal cancer. *Cancer J*. 2002;8:395-9.

Lee JY, Plakidas A, Lee WH, et al. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*. 2003;44(3):479-86.

Leibowitz MD, Ardecky RJ, Boehm MF, et al. Biological characterization of a heterodimer-selective retinoid X receptor modulator: potential benefits for the treatment of type 2 diabetes. *Endocrinology*. 2006;147:1044-53.

Lewinsky RH, Jensen TG, Møller J, et al. T-13910 DNA variant associated with lactase persistence interacts with Oct-1 and stimulates lactase promoter activity in vitro. *Hum Mol Genet*. 2005;14:3945-53.

Lewis JD, Lichtenstein GR, Deren JJ, et al. Rosiglitazone for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2008;134:688-95.

Lian M, Luo W, Sui Y, Li Z, Hua J. Dietary n-3 PUFA Protects Mice from Con A Induced Liver Injury by Modulating Regulatory T Cells and PPAR- γ Expression. *PLoS One*. 2015;10:e0132741.

Liao YC, Chen NT, Shih YP, Dong Y, Lo SH. Up-regulation of C-terminal tensin-like molecule promotes the tumorigenicity of colon cancer through beta-catenin. *Cancer Res*. 2009;69:4563-6.

Lo SH. C-terminal tensin-like (CTEN): a promising biomarker and target for cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;51:150-4.

Lomer MC, Parkes GC, Sanderson JD. Review article: lactose intolerance in clinical practice--myths and realities. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27:93-103.

Liu J, Wang H, Zuo Y, et al. Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin. *Mol Cell Biol*. 2006;26:5827-37.

Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J Crohns Colitis*. 2017;11:649-670.

Marion-Letellier R, Butler M, Déchelotte P, et al. Comparison of cytokine modulation by natural peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands with synthetic ligands in intestinal-like Caco-2 cells and human dendritic cells--potential for dietary modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in intestinal inflammation. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:939-48.

Marion-Letellier R, Savoye G, Ghosh S. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *IUBMB Life*.

2015;67:659-67.

Matthews SB, Waud JP, Roberts AG, et al. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med J*. 2005;81:167-73.

Montalto M, Nucera G, Santoro L, et al. Effect of exogenous beta-galactosidase in patients with lactose malabsorption and intolerance: a crossover double-blind placebo-controlled study. *Eur J Clin Nutr*. 2005;59:489-93.

Monteleone G, Franchi L, Fina D, et al. Silencing of SH-PTP2 defines a crucial role in the inactivation of epidermal growth factor receptor by 5-aminosalicylic acid in colon cancer cells. *Cell Death Differ*. 2006;13:202-11.

Montgomery RK, Mulberg AE, Grand RJ. Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. *Gastroenterology*. 1999;116:702-31.

Motomura W, Okumura T, Takahashi N, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27Kip1 in human. Pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res*. 2000;60:5558-64.

Mueller E, Smith M, Sarraf P, et al. Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:10990-5.

Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, et al. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 1998;93:229-40.

Narisawa T, Fukaura Y. Prevention by intrarectal 5-aminosalicylic acid of N-methylnitrosourea-induced colon cancer in F344 rats. *Dis Colon Rectum*. 2003;46:900-3.

Neumann A, Weill A, Ricordeau P, et al. Pioglitazone and risk of bladder cancer among diabetic patients in France: a population-based cohort study. *Diabetologia*. 2012;55:1953-62.

Newcomer AD, McGill DB. Distribution of disaccharidase activity in the small bowel of normal and lactase-deficient subjects. *Gastroenterology*. 1966;51:481-8.

Norris AW, Chen L, Fisher SJ, et al. Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J Clin Invest*. 2003;112:608-18.

Ogino S, Shima K, Baba Y, et al. Colorectal cancer expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG, PPARgamma) is associated with good prognosis. *Gastroenterology*. 2009;136:1242-50.

Patel L, Pass I, Coxon P, et al. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Curr Biol*. 2001;11:764-8.

Peyrin-Biroulet L, Beisner J, Wang G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:8772-7.

Ponferrada A, Caso JR, Alou L, et al. The role of PPARgamma on restoration of colonic homeostasis after experimental stress-induced inflammation and dysfunction. *Gastroenterology*. 2007;132:1791-803.

Portincasa P, Di Ciaula A, Vacca M, et al. Beneficial effects of oral tilactase on patients with hypolactasia. *Eur J Clin Invest*. 2008;38:835-44.

Ravinuthala RS, Nori U. Rosiglitazone toxicity. *Ann Intern Med*. 2000;133:658.

Rings EH, de Boer PA, Moorman AF, et al. Lactase gene expression during early development of rat small intestine. *Gastroenterology*. 1992;103:1154-61.

Roberfroid MB. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:1660S-4S.

Rosado JL, Solomons NW. Sensitivity and specificity of the hydrogen breath-analysis test for detecting malabsorption of physiological doses of lactose. *Clin Chem*. 1983;29:545-8.

Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, et al. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Exp Med*. 2005;201:1205-15.

Rousseaux C, Dubuquoy C, Bellinva S, et al. Preclinical and Toxicological Assessments of the Novel Orally Bioavailable PPAR Ligand GED-0507-34-Levo for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2010;138: S-157.

Ruan X, Zheng F, Guan Y. PPARs and the kidney in metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294:F1032-47.

Rubin DT, Cruz-Correa MR, Gasche C, et al. Colorectal cancer prevention in inflammatory bowel disease and the role of 5-aminosalicylic acid: a clinical review and update. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:265-74.

Sahi T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1994;202:7-20.

Sarraf P, Mueller E, Jones D, et al. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med*. 1998;4:1046-52.

Sauer S. Ligands for the Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Trends*

Pharmacol Sci. 2015;36:688-704.

Schwab M, Reynders V, Loitsch S, et al. PPARgamma is involved in mesalazine-mediated induction of apoptosis and inhibition of cell growth in colon cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008;29:1407-14.

Sebastio G, Villa M, Sartorio R, et al. Control of lactase in human adult-type hypolactasia and in weaning rabbits and rats. *Am J Hum Genet*. 1989;45:489-97.

Sikka S, Chen L, Sethi G, et al. Targeting PPAR γ Signaling Cascade for the Prevention and Treatment of Prostate Cancer. *PPAR Res*. 2012;2012:968040.

Soeparto P, Stobo EA, Walker-Smith JA. Role of chemical examination of the stool in diagnosis of sugar malabsorption in children. *Arch Dis Child*. 1972;47:56-61.

Shoelson SE, Lee J, Yuan M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;3:S49-52.

Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, et al. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J*. 1996;15:5336-48.

Shearer BG, Billin AN. The next generation of PPAR drugs: do we have the tools to find them? *Biochim Biophys Acta*. 2007;1771:1082-93.

Specia S, Rousseaux C, Dubuquoy C, et al. Novel PPAR γ Modulator GED-0507-34 Levo Ameliorates Inflammation-driven Intestinal Fibrosis. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22:279-92.

Staerk Laursen L, Stokholm M, Bukhave K, et al. Disposition of 5-aminosalicylic acid by olsalazine and three mesalazine preparations in patients with ulcerative colitis: comparison of intraluminal colonic concentrations, serum values, and urinary excretion. *Gut*. 1990;31:1271-6.

Su W, Bush CR, Necela BM, et al. Differential expression, distribution, and function of PPAR-gamma in the proximal and distal colon. *Physiol Genomics*. 2007;30:342-53

Szanto A, Nagy L. The many faces of PPARgamma: anti-inflammatory by any means? *Immunobiology*. 2008;213:789-803.

Szilagyi A, Shrier I, Heilpern D, et al. Differential impact of lactose/lactase phenotype on colonic microflora. *Can J Gastroenterol*. 2010;24:373-9.

Tereszkowski CM, Simpson JA, Whiting SJ, et al. Body mass, vitamin D and alcohol intake, lactose intolerance, and television watching influence bone mineral density of young, healthy Canadian women. *J Am Coll Nutr*. 2012;31:24-31.

Tishkoff SA, Reed FA, Ranciaro A, et al. Convergent adaptation of human lactase persistence in

Africa and Europe. *Nat Genet.* 2007;39:31-40.

Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell.* 1998;93:241-52.

Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:289-312.

Troelsen JT. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1723:19-32.

Troelsen JT, Olsen J, Møller J, Sjöström H. An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. *Gastroenterology.* 2003;125:1686-94.

Vangaveti VN, Shashidhar VM, Rush C, et al. Hydroxyoctadecadienoic acids regulate apoptosis in human THP-1 cells in a PPAR γ -dependent manner. *Lipids.* 2014;49:1181-92.

Velayos FS, Terdiman JP, Walsh JM. Effect of 5-aminosalicylate use on colorectal cancer and dysplasia risk: a systematic review and metaanalysis of observational studies. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:1345-53.

Vesa TH, Marteau P, Korpela R. Lactose intolerance. *J Am Coll Nutr.* 2000;19:165S-175S.

Voltan S, Martines D, Elli M, et al. *Lactobacillus crispatus* M247-derived H₂O₂ acts as a signal transducing molecule activating peroxisome proliferator activated receptor-gamma in the intestinal mucosa. *Gastroenterology.* 2008;135:1216-27.

Yang WL, Frucht H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis.* 2001;22:1379-83.

Yasui Y, Hosokawa M, Sahara T, et al. Bitter melon seed fatty acid rich in 9c,11t,13t-conjugated linolenic acid induces apoptosis and up-regulates the GADD45, p53 and PPARgamma in human colon cancer Caco-2 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005;73:113-9.

Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest.* 1998;101:1163-74.

Weatherill AR, Lee JY, Zhao L, et al. Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. *J Immunol.* 2005;174:5390-7.

Wooten WJ, Price W. Consensus report of the National Medical Association. The role of dairy and dairy nutrients in the diet of African Americans. *J Natl Med Assoc.* 2004;96:5S-31S.

Wright MB, Bortolini M, Tadayyon M, et al. Minireview: Challenges and opportunities in

development of PPAR agonists. *Mol Endocrinol.* 2014;28:1756-68.

Zemel MB. Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:907S-912S.

Zemel MB, Thompson W, Milstead A, et al. Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Obes Res.* 2004;12:582-90.

Zemel MB, Miller SL. Dietary calcium and dairy modulation of adiposity and obesity risk. *Nutr Rev.* 2004;62:125-31

Zhao G, Etherton TD, Martin KR, et al. Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;336:909-17.

