

**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE**

Soutenu publiquement le 30 Septembre 2016  
**Par M. Anthony MARTIN MENA**

Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990  
tient lieu de  
**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

***Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) régule  
l'expression de l'isoforme 2 de la Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) dans  
les cellules épithéliales intestinales du colon.***

---

**Directeur du mémoire : M. le Docteur Benjamin BERTIN**  
Maitre de conférences des Universités  
Faculté de Pharmacie, Université de Lille 2

**Membres du jury :**

**Président :** **M. le Professeur Bertrand DÉCAUDIN**  
Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier  
Faculté de Pharmacie, Université de Lille 2  
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

**Assesseurs :** **M. le Professeur Jean-Marc CHILLON**  
Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier  
Faculté de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne  
Centre hospitalier Universitaire d'Amiens

**M. le Professeur Luc DUBREUIL**  
Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier  
Faculté de Pharmacie, Université de Lille 2  
Centre Hospitalier de Tourcoing

**Mme. le Docteur Céline VERBRIGGHE**  
Pharmacien, Praticien Hospitalier  
Groupe Hospitalier Public du Sud de l'Oise



**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE**

Soutenu publiquement le 30 Septembre 2016  
**Par M. Anthony MARTIN MENA**

Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990  
tient lieu de  
**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

***Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) régule  
l'expression de l'isoforme 2 de la Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) dans  
les cellules épithéliales intestinales du colon.***

---

**Directeur du mémoire : M. le Docteur Benjamin BERTIN**  
Maitre de conférences des Universités  
Faculté de Pharmacie, Université de Lille 2

**Membres du jury :**

**Président : M. le Professeur Bertrand DÉCAUDIN**  
Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier  
Faculté de Pharmacie, Université de Lille 2  
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

**Assesseurs : M. le Professeur Jean-Marc CHILLON**  
Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier  
Faculté de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne  
Centre hospitalier Universitaire d'Amiens

**M. le Professeur Luc DUBREUIL**  
Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier  
Faculté de Pharmacie, Université de Lille 2  
Centre Hospitalier de Tourcoing

**Mme. le Docteur Céline VERBRIGGHE**  
Pharmacien, Praticien Hospitalier  
Groupe Hospitalier Public du Sud de l'Oise



## Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



### Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Eric KERCKHOVE Professeur Eric BOULANGER Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Damien CUNY Professeur Benoit DEPRez Professeur Murielle GARCIN Monsieur Pierre RAVAUx Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Antoine HENRY
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

### Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Damien CUNY
Vice-Doyen, 1 <sup>er</sup> assesseur :	Professeur Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie	Dr. Annie Standaert
Assesseur en charge de la recherche	Pr. Patricia Melnyk
Assesseur délégué à la scolarité	Dr. Christophe Bochu
Assesseur délégué en charge des Relations internationales	Pr. Philippe Chavatte
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante	M. Thomas Morgenroth
Chef des services administratifs :	Monsieur Cyrille PORTA

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie Clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie Clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

## Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie Clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie Thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et économie Pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Droit et économie Pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie Organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

## Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

## Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie Thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie Cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie

M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie Industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie Cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie Cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacologie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie Thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie Pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WILLEMAGNE	Baptiste	Chimie Organique
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL

### Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie Pharmaceutique

### Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	CUCCHI	Malgorzata	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et économie Pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

### AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEKYNDT	Bérengère	Pharmacie Galénique
M.	PEREZ	Maxime	Pharmacie Galénique



## ***Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**



## Remerciements

M. le Professeur Bertrand Décaudin, pour avoir accepté d'être mon Président de jury mais également pour toute l'aide que vous m'avez apportée durant mes 4 années d'internat, pour votre disponibilité et vos réponses aux nombreux mails que je vous avais envoyés.

M. le Professeur Jean Marc Chillon, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse ainsi que pour l'aide que vous m'avez apportée durant ma première année d'internat dans l'Oise.

M. le Professeur Luc Dubreuil pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse de pharmacie, d'être mon directeur de thèse d'Université et pour vos disponibilités.

Mme le Docteur Céline Verbrigghe, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je vous remercie également pour votre patience, votre enseignement, votre encadrement, votre volonté de toujours faire en sorte que je trouve par moi même les informations, vos nombreux conseils ainsi que d'avoir participé à faire de mon année creilloise, une année inoubliable.

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

M. le Docteur Benjamin Bertin pour accepté de m'encadrer durant mes années de recherche en temps qu'interne IPR, de son enseignement et surtout de m'avoir montré la bonne voie pour que je ne sombre pas dans le coté obscur de la recherche. Tu m'as fait découvrir la recherche avec ces qualités et ces défauts. Et j'espère avant la fin de ma thèse d'Université que j'arriverai enfin à ne plus me tromper entre « ses » et « ces »...

Tous les membres du laboratoire UMR995 pour les 3 années que je viens de passer à vos côtés. Je ne sais pour quelle raison, ceux sont les remerciements les plus difficiles à écrire pour moi. Peut être le fait de savoir que je reste encore un an avec vous. Je garde de magnifique souvenir avec vous. Que ça soit les membres permanents : Laurent, Caroline D, Caroline G, Annie, Boualem, Arnaud, Marie, Emilie, Cécile, Mathilde, Chantal, Aurélien, François, Mohamed (chacun sa mère), Madjid (mon baba du labo, un peu érotomane sur les bords), Silvia Cruz et ses 20 personnalités, Béatrice et Audrey, qui sans toi, mes 3 années n'auront vraiment pas été pareil. Tu as été toujours présente pour me corriger, m'aider dans mes manips, me soutenir, m'écouter, rire et soutenir les Stark. Je voudrais également remercier les autres personnes qui sont parties ou sont moins présentes au laboratoire : mon petit Rat (Laura) qui m'a énormément aidé durant mon internat, Solène, Fifounette, Nico (As-tu réussi depuis à détecter la sérotonine par Western Blot ?), Lucifer (même si rien ne peut plus t'étonner me concernant #tricotin #tatouageloup #coeurdepirate #donald), La Princesse, Charbel, Bol de riz, Moulan et pour finir ma petite Jessicatastrophe! Tu auras réussi à faire plus de bêtises que l'ensemble du labo (Che palle!). Merci encore à vous tous.

Tous les membres de la PUI de Creil. En arrivant à Creil, je vous avouerai que j'ai pleuré à la fin de ma première journée en temps qu'interne. Comment un breton du bout du monde pouvait se retrouver en pleine campagne picarde en novembre sans connaître personne. Mais votre accueil, votre gentillesse m'ont remonté le moral. Vous avez été tous formidables avec moi. Que ça soit les pharmaciens (Céline, Mr Tran, Ferdinand, Benédikte, Sylvie, Mme Avot, Mr Pitré), les préparatrices/préparateurs (Samira, Isabelle, Cindy, Laetitia,

Cynthia, Catherine, Léa, Jean-Marie, Frédérique, Fleur, Amar, Béa, etc), mes chers co-internes (Xavier, Ahmed et Cécile) et mes externes (Medhiment et Thanganyl). Merci infiniment de cette année. J'en garderais des souvenirs plein la tête. Je vous avouerai, que lorsque je suis parti le dernier jour, j'ai pleuré de nouveau.

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

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

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

Tous mes amis de la faculté de pharmacie de Rennes et mes amis rennais, avec qui j'aurais passé des moments de folies entre deux cours. J'ai tellement de souvenir en tête que je ne pourrais malheureusement pas tous les écrire ici. Outre les jeudi-vendredi matin difficiles, je retiendrai les principaux : mes TP avec ma bibi adorée, écouter le répertoire de Claude François avec ma Tonymette en haut de l'amphi, les trajets en voiture avec Marie Mousset (la nana toujours au taquet sur les potins), les délires avec l'argument et le petit argument, mon baptême faluche, mes soirées faluchards, mes crits, mes 2 années au sein de la corpo avec Panpan, Vice, Lolo, Mursic, Cam (c'est la baseee), Céline, Olier, Bérééééééééééé, Mr Queltier, Patoche, Peter, la petite Soiz, Somatostatine et tous les autres pharma. Je pense aussi aux carabins, dentaires et les sciences qui nous accompagnaient durant nos soirées et événements. Parmi ces personnes, Aurore, qui deviendra ma fillote de faluche! J'aurais passé avec toi, durant mes premiers mois de 4<sup>ème</sup> année pharma, les soirées et certains moments les plus ouf de ma vie étudiante ! Et je ne t'oublie pas ma petite vache (Kimmy) et tous les moments qu'on a vécu ensemble, on s'est tout de suite entendu dès les premiers jours de notre 2<sup>ème</sup> année même si lors de notre rencontre, tu saignais du nez et tu as réussi à m'en mettre sur ma veste blanche. Je vous remercie vous tous. Vous m'avez fait passé peut-être les 5 années les plus folles de ma vie. Je remercierai également tous mes amis des autres facultés de pharmacie de France que j'ai pu rencontrer lors de congrès ou d'assemblée générale, je pense à Alex de Poitiers, Julie, Dylan de PXI (même si je ne comprends toujours pas le rapport entre Dylan et Kevin, ton vrai nom), les Rouennais, les Grenoblois, les Clermontois, les Marseillais, les Nancéens, les Lillois (Florentin le premier !), les Nantais, les parisiens et enfin Bambi, mon petit amienois (#regardnoir) et sa copine Marie. Merci à tous, pour tous ses souvenirs que je vais garder toute ma vie en tête !

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

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

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

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

Enfin je terminerai par remercier les deux êtres qui me tiennent le plus aux cœurs, Morgane et Rafael, mes deux piliers, toujours présents pour moi, pour me changer les idées, pour accompagner lors des moments de joies comme durant mes difficultés. Voilà 10 mois que nous formons une famille et qu'ils me font comprendre que la chose la plus importante dans ce monde se trouve juste devant moi. Le bonheur ne se trouve pas ou ne se gagne pas, non, le bonheur se construit jour après jour et ils sont présents pour cimenter chaque jour ce bonheur.

Ce travail a fait l'objet :

De 2 communications internationales affichées :

- « *The nuclear receptor PPAR $\gamma$  controls the expression of the short isoform of TSLP in the colon.*». **Martin Mena A**, Langlois A, Speca S, Djouina M, Desreumaux P, Dubuquoy L, Bertin B. French Society of Immunology, Lille, Novembre 2014

- « *PPAR $\gamma$  controls the expression of the short form TSLP in the colon.*». **Martin Mena A**, Langlois A, Speca S, Desreumaux P, Dubuquoy L, Bertin B. Digestive Disease Week. San Diego (USA), Mai 2016

## Abréviations

5-ASA= 5-aminosalicylate  
ADN= Acide désoxiribonucléique  
AF= Fonction activatrice  
AIEC= Adherent invasive escherichia coli  
ANCA= Auto-anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles  
ASCA= Anticorps anti-Saccharomyces cerevisiæ  
ASMR = Amélioration du service médical rendu  
ARNm= Acide ribonucléique messenger  
AVC= Accident cardio-vasculaire  
CEI= Cellule épithéliale intestinale  
ChIP= Immunoprécipitation de la chromatine  
CRP= Protéine C réactive  
DBD= DNA binding domain  
DR= Domain response  
DSS= Dextran sodium sulfate  
IDM= Infarctus du myocarde  
IRM= Imagerie à résonance magnétique  
JAK= Janus kinase  
LBD= Ligand binding domain  
MC= Maladie de Crohn  
MICI= Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin  
NKT= Lymphocyte T Natural Killer  
PPAR= Peroxisome proliferator activated receptor  
PPRE= Peroxisome proliferator response element  
RCH= Rectocolite hémorragique  
SSPARMs= Selective PPAR $\gamma$  modulators  
TGF $\beta$ = Transforming growth factor- $\beta$   
TMF= Transplantation de microbiote fécal  
TNF= Tumor necrosis factor  
TSLP= Thymic stromal lymphopoeitin  
TSLPR= TSLP Receptor  
VS= Vitesse de sédimentation

# Table des matières

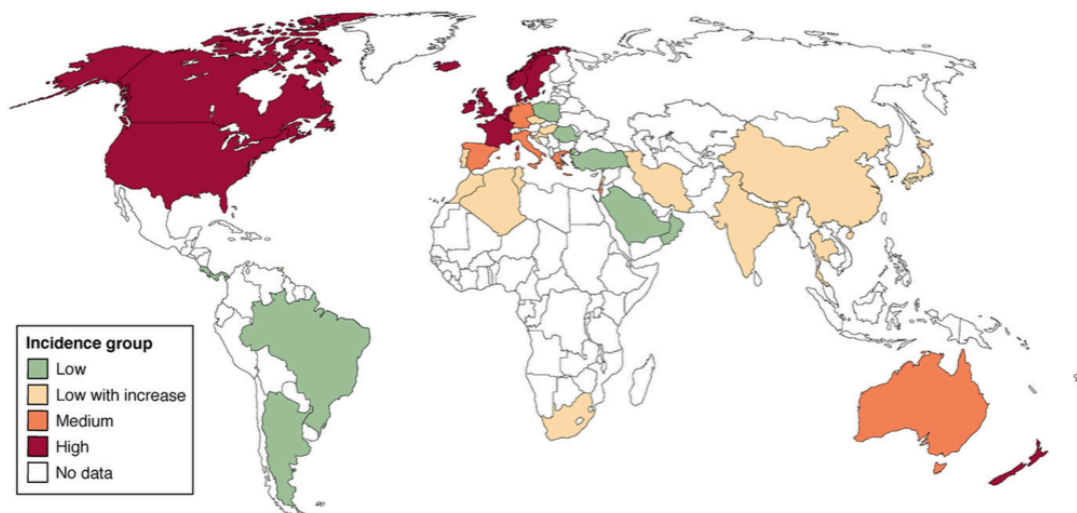
<b>Remerciements .....</b>	<b>7</b>
<b>Abréviations .....</b>	<b>11</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>12</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>14</b>
<b>I. Les MICI .....</b>	<b>14</b>
<b>II. La rectocolite hémorragique .....</b>	<b>15</b>
A. Généralités .....	15
B. Clinique de la maladie .....	15
1. Manifestations digestives .....	16
2. Manifestations extra-digestives .....	16
C. Evolutions et complications de la RCH .....	17
1. Evolution de la RCH .....	17
2. Complication de la RCH .....	17
D. Diagnostic de la RCH .....	18
1. Examens biologiques .....	18
a) Analyses des selles .....	18
b) Analyses sanguines .....	18
2. Imagerie médicale/ examens endoscopiques .....	19
3. Classement de gravité de la RCH .....	19
E. Traitements de la RCH .....	19
1. Les traitements anti-inflammatoires .....	20
a) Les dérivés salicylés .....	20
b) Les corticoïdes .....	20
2. Les autres traitements .....	21
a) Les immunomodulateurs .....	21
b) Les biothérapies .....	22
c) Les traitements contre-indiqués .....	23
d) Traitements chirurgicaux .....	23
e) L'alimentation .....	24
f) Traitement à l'étude : la transplantation de microbiote fécal .....	25
3. Éducation thérapeutique .....	25
4. Soutien psychologique .....	25
<b>III. L'homéostasie intestinale .....</b>	<b>26</b>
A. La muqueuse intestinale .....	26
B. Le récepteur PPAR $\gamma$ .....	27
1. Fonction et structure .....	27
2. Les ligands de PPAR $\gamma$ .....	29
3. Expression et rôle de PPAR $\gamma$ dans le côlon .....	30
4. PPAR $\gamma$ : cible thérapeutique pour la RCH .....	31
C. La TSLP .....	31
1. Généralités .....	31
2. Les isoformes de la TLSP .....	32
3. Le récepteur à la TSLP : TSLPR .....	32
4. Régulation de la TSLP .....	33
5. Fonction de la TSLP .....	34
a) Rôle homéostasique .....	34
b) Rôle pro-inflammatoire de type Th2 .....	34
c) Rôle de peptide anti-microbien .....	34
d) Rôle de la TSLP dans l'intestin .....	35
<b>Hypothèses de travail et but du projet .....</b>	<b>36</b>
<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>38</b>
<b>I. Culture cellulaire .....</b>	<b>38</b>
<b>II. Traitement des cellules .....</b>	<b>38</b>
<b>III. Muqueuses et cellules épithéliales humaines .....</b>	<b>39</b>

IV. Extraction de l'ARN et des protéines.....	39
V. Traitement DNase et RT-PCR .....	39
VI. Q-PCR en fast past.....	40
VII. Immunoprécipitation des protéines.....	40
VIII. Western Blot.....	41
IX. Étude in silico du promoteur de la TSLP .....	41
X. ChIP (Chromatin ImmunoPrecipitation).....	41
XI. Etude du gène rapporteur.....	42
XII. Analyses Statistiques.....	43
<b>Résultats .....</b>	<b>44</b>
<b>I. L'expression de la TSLP est dépendante du récepteur nucléaire PPAR<math>\gamma</math> dans les cellules Caco-2 et T84.....</b>	<b>44</b>
A. L'expression du gène codant la TSLP est diminuée dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$ .....	44
B. Effets des agonistes de PPAR $\gamma$ sur les cellules Caco-2 et T84.....	44
C. Effets des agonistes de PPAR $\gamma$ sur les cellules Caco-2 ShLuc et ShPPAR $\gamma$ .....	45
<b>II. L'expression de la TSLP 2 est dépendante de PPAR<math>\gamma</math> dans les cellules Caco-2 et T84.</b>	<b>46</b>
A. Expression génomique de la TSLP 2.....	46
B. Expression protéique de la TSLP 2 .....	47
<b>III. Le promoteur de la TSLP 2 possède plusieurs éléments de réponse pouvant accueillir le récepteur nucléaire PPAR<math>\gamma</math>.....</b>	<b>48</b>
A. Le promoteur de la TSLP 2 possède plusieurs éléments de réponse PPRE .....	48
B. Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ se fixe sur un élément de réponse au niveau du promoteur de la TSLP 2.....	48
C. La fixation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ sur le PPRE DR3 permet d'induire une augmentation significative de l'activité de la luciférase. ....	49
<b>IV. La diminution de l'expression du gène codant la TSLP est corrélée à une diminution de l'expression du gène codant PPAR<math>\gamma</math> dans les muqueuses saines et lésées de patients atteints de RCH. ....</b>	<b>51</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>53</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>58</b>
<b>Annexe 1 .....</b>	<b>65</b>
<b>Annexe 2 .....</b>	<b>67</b>

# Introduction

## I. Les MICI

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), représentées par la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC), sont caractérisées par une inflammation chronique de la muqueuse intestinale. Cette inflammation inappropriée est liée à une hyperactivité du système immunitaire digestif. Elles touchent le plus souvent les adultes jeunes et évoluent par poussées entrecoupées de rémissions plus ou moins prolongées selon les patients. Toutefois elles peuvent intervenir à tout âge et 15% des cas concernent des enfants. Leur fréquence est très variable selon les pays. Les pays industrialisés (Europe du Nord Ouest et USA) comptent parmi les pays avec les taux les plus importants. Chaque année en France, ce sont entre 5 à 10 nouveaux cas de MC et autant de RCH qui sont diagnostiquées pour 100 000 habitants (**Figure 1**) (1). Toutefois, la prévalence reste stable ces dernières années. Au niveau des pays en cours de développement (pays du Maghreb, Afrique du Sud...), cette prévalence augmente de façon exponentielle (1).



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

La physiopathologie, probablement multifactorielle, fait intervenir des facteurs génétiques, microbiens, environnementaux et immunologiques (2). En effet, plusieurs facteurs de risques sont suspectés :

- Facteurs génétiques : les différentes analyses du génome faites sur les patients atteints de MICI montrent clairement l'identification de près de 163 gènes de prédisposition (3). Ce nombre élevé de gènes prouve que les facteurs génétiques ont donc un impact modéré sur la survenue de MICI. Cependant, la mutation du gène NOD2/CARD15 multiplierait par 40 le risque de développer une MC. Les MICI ne sont pas des maladies génétiques à proprement parlées mais il existe une susceptibilité génétique pour ces maladies. En effet, il n'y a pas de transmission



directe de la maladie des parents aux enfants. Cependant ces maladies peuvent toucher plusieurs membres d'une même famille. Le pourcentage de forme familiale varie entre 5 et 20% (4). Concernant la RCH, la population d'origine juive a une incidence plus élevée (5 à 6 fois plus que le reste de la population). Les personnes ayant des gènes de « susceptibilité » ont plus de risques que les autres à contracter une RCH : on parle de prédisposition génétique.

- Facteurs environnementaux : la part environnementale tient une place plus que prépondérante dans les facteurs de risque. Il suffit d'observer la prévalence entre les pays industrialisés et les pays en voie de développement pour en être convaincu. Autre argument en faveur de l'environnement : en France comme en Europe, il existe un gradient Nord/Sud, avec une prévalence plus importante dans le nord (Haut de France) que dans le sud. La pollution, avec les micro-particules, les métaux lourds (aluminium) ou encore le tabac peuvent être responsables de la survenue des MICI. Néanmoins, il existe une particularité avec le tabac. En effet, les personnes fumeuses ont moins de risque de contracter une RCH alors que la MC est exacerbée lorsque le patient fume. Il y aurait donc un effet « protecteur » de la cigarette pour les patients susceptibles de contracter une RCH. Cependant, très récemment, une étude montrerait que le tabac n'est pas aussi protecteur qu'on pourrait l'envisager, sur le risque de développement de RCH (5).

- Microbiote intestinal : très longtemps délaissé et mal connu, de nombreuses études montrent aujourd'hui que le microbiote intestinal agirait comme un organe à part entière (6). Un déséquilibre de ce dernier pourrait être le point de départ des MICI. L'une des hypothèses la plus communément admise pour expliquer l'origine des MICI est la rupture d'un équilibre essentiel au niveau de l'intestin : la tolérance orale. Sous l'influence de divers facteurs génétiques et environnementaux, il y aurait un déséquilibre de ce microbiote qui provoquerait ensuite une perte de tolérance vis à vis de cette flore commensale et l'initiation ainsi que le maintien d'une réaction inflammatoire non appropriée. Parmi les bactéries du microbiote pouvant être responsables des MICI, sont retrouvées les AIEC (*Adherent Invasive Escherichia coli*), sous-types d'*Escherichia coli*, qui sont plus adhérentes aux cellules de la paroi intestinales mais également plus invasives (7).

## **II. La rectocolite hémorragique**

### **A. Généralités**

La rectocolite hémorragique touche environ 40 000 personnes en France. Cette maladie survient à tout âge, avec une majorité des cas chez l'adulte jeune (20-30 ans). Elle touche aussi bien les femmes que les hommes. La fréquence est plus élevée chez la population d'origine européenne et plus particulièrement dans la communauté juive (4).

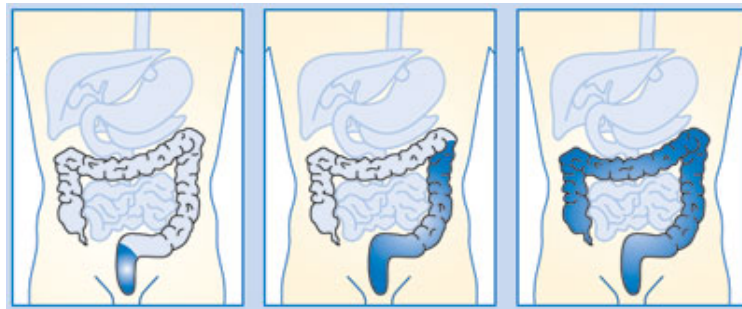
### **B. Clinique de la maladie**

Contrairement à la MC pour laquelle l'inflammation de la paroi du tube digestif

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

Elle peut se développer sous trois formes différentes (**Figure 2**) :

- la **colite distale** (60 % des cas) atteint le rectum et la région du sigmoïde
- la **colite latérale gauche** (25 % des cas) entraîne des lésions plus étendues que la RCH distale, mais n'affecte pas l'intégralité du côlon.
- la **RCH pancolique** (15 % des cas) touche aussi le rectum et la totalité du côlon.



**Figure 2** : Représentation d'une colite distale, latérale gauche et d'une pancolite. D'après gastro.medline.ch.

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

### 1. Manifestations digestives.

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

### 2. Manifestations extra-digestives

Les manifestations extra-digestives, les plus fréquemment associées aux manifestations digestives sont la perte de poids et la fièvre lors des poussées. Mais il existe d'autres manifestations qui sont principalement dues à la réaction anormale du système immunitaire (4). On retrouve ainsi :

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

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

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

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

### C. Evolutions et complications de la RCH

#### 1. Evolution de la RCH

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

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

#### 2. Complication de la RCH

Parmi les différentes complications on retrouve :

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

- Le mégacôlon toxique (ou colectasie). Il s'agit d'une complication grave. Il survient généralement au cours d'une poussée aiguë. La colectasie est provoquée par une distension (ou dilatation) du côlon de façon exagérée. Les manifestations cliniques du mégacôlon toxique sont diverses. On retrouve une déshydratation importante (soif, diminution du volume urinaire, peau qui perd son élasticité), une diminution de la pression artérielle, une augmentation du rythme cardiaque, de la

fièvre et des troubles de la conscience. Au cours de cette complication, il existe un risque de perforation du côlon et l'apparition d'une péritonite (inflammation de la membrane qui entoure les organes dans l'abdomen), dus à la fragilisation de la paroi colique par l'inflammation. A ce stade, le risque infectieux est très important et il y a urgence chirurgicale.

- La dernière complication est le surrisque de survenue d'un cancer colo-rectal. En effet, ce risque est plus élevé que le reste de la population. Il est augmenté chez les personnes ayant une pancolite et ayant leur maladie depuis de nombreuses années. Malheureusement ce risque est très difficile à estimer et augmente avec le temps. Les patients sont suivis régulièrement afin d'être pris en charge rapidement si un cancer colo-rectal venait à apparaître (8).

#### D. Diagnostic de la RCH

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

##### 1. Examens biologiques

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

###### *a) Analyses des selles*

L'analyse des selles consiste à confirmer que les diarrhées n'ont pas une origine microbienne (bactérienne, virale, parasitaire). Elle permettra également de mettre en évidence la présence de sang, signe d'une hémorragie intestinale. La calprotectine est également recherchée dans les selles. En effet, il s'agit d'un marqueur d'inflammation qui peut orienter le diagnostic vers la RCH. Cet examen est réitéré au cours de la prise en charge du patient afin d'évaluer l'efficacité du traitement mis en place.

###### *b) Analyses sanguines*

L'analyse sanguine va mettre en avant de nombreux signes évocateurs comme les signes d'inflammations : hyperleucocytoses et hyperthrombocytose, une vitesse de sédimentation (VS) augmentée, une augmentation de la Protéine C-Réactive (CRP) et une anémie (associée à une diminution des érythrocytes). Les anticorps ant-Saccharomyces cerevisiæ (ASCA) et les auto-anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA), spécifiques des MICI, peuvent être également recherchés (9). Leur mise en évidence peut aider le médecin à poser le diagnostic. Plus de 65% des patients atteints de RCH ont l'ANCA. La prise de sang peut aussi montrer une dénutrition.

## 2. Imagerie médicale/ examens endoscopiques

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

Il est possible de faire des radiographies de l'abdomen sans préparation ou après un « lavement baryté ». Ces radiographies permettent de mettre en évidence la présence de rétrécissements ou des dilatations du côlon. Les IRM (imagerie en résonance magnétique) peuvent être également utilisées.

## 3. Classement de gravité de la RCH

La stratégie de traitement des patients RCH est fonction du type et de la sévérité de la maladie. Les médecins utilisent le score Mayo pour évaluer la sévérité de la maladie. Ce score se divise en deux sous-scores (10).

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

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

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

## E. Traitements de la RCH

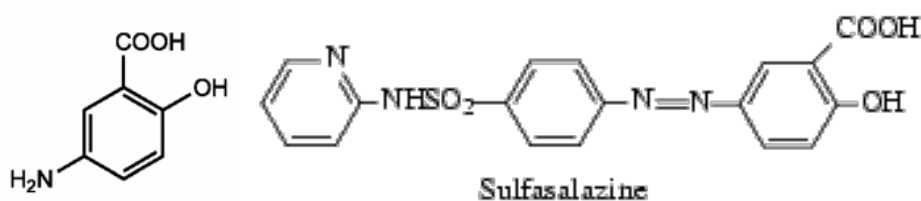
Comme indiqué précédemment, il n'existe actuellement pas de traitement curatif pour la RCH. La plupart des médicaments sont prescrits afin d'atténuer la réaction inflammatoire, traiter les symptômes de la maladie et diminuer les fréquences de rechutes. Le traitement mis en place est en fonction de la gravité de la maladie et doit être adapté à chaque patient. Les traitements différeront selon si le patient est en phase de rémission ou en poussée (11).

## 1. Les traitements anti-inflammatoires

### a) Les dérivés salicylés

La mésalazine (5-aminosalicylate ou 5-ASA) et la sulfasalazine sont les traitements de première intention pour la RCH (**Figure 3**). L'action du 5-ASA est topique et ne passe pas par la voie systémique. Ces médicaments sont capables de contrôler les symptômes au cours d'une poussée. La mésalazine est également prescrite au long cours comme un traitement d'entretien afin de diminuer l'apparition de poussées. Le 5-ASA est prescrit pour les formes mineures et modérées de la RCH.

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



**Figure 3** : Représentation de la mésalazine et de la sulfasalazine

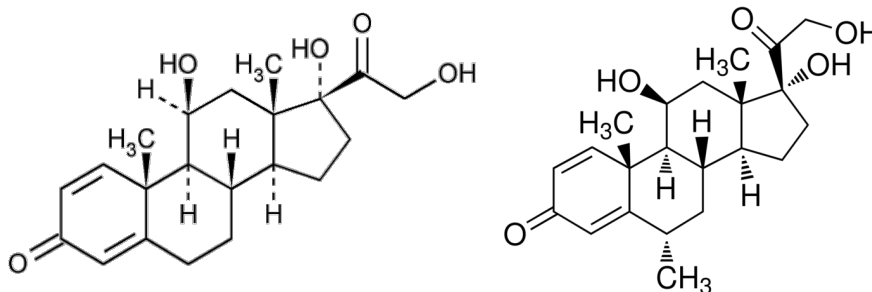
### b) Les corticoïdes

Les corticoïdes (prednisolone et méthylprednisolone) ne sont pas utilisés d'emblée (**Figure 4**). Ils sont généralement prescrits pour les formes sévères et uniquement quand les précédents traitements ne sont pas suffisamment efficaces. Ils réduisent l'inflammation avec plus de puissance et plus rapidement. Lorsqu'ils sont prescrits en cas de crises, ce n'est que pour une courte durée afin de pouvoir limiter les effets indésirables. En effet, cette classe de médicaments peut engendrer de nombreux effets indésirables : hypertension artérielle, trouble du sommeil et de l'humeur, risque accru d'infection, troubles digestifs, déminéralisation des os, troubles cutanés, perte de masse musculaire, prise de poids et gonflement du visage, troubles hormonaux. Ces traitements sont prescrits sous forme intraveineuse, par voie orale ou encore par voie locale sous forme de lavement. Comme pour toute corticothérapie, l'arrêt du traitement doit se faire progressivement.

Il peut exister une corticorésistance et/ou une corticodépendance. En effet, dans certains cas, les malades ne répondent pas aux corticoïdes. Il n'y a pas vraiment de dose pour définir cette corticorésistance mais elle apparaît le plus souvent pour des doses comprises entre 15 et 20 mg/jour. Lorsqu'un patient a une rechute de la maladie lorsque les doses de corticoïdes diminuent ou qu'une rechute

est observée dans les 30 jours qui suivent l'arrêt de la corticothérapie, on parle de corticodépendance.

L'ensemble de ces médicaments anti-inflammatoires nécessitent obligatoirement un suivi régulier des patients afin d'avoir une meilleure observance et vérifier qu'ils supportent/tolèrent bien leur traitement. Ce type de traitement ne doit jamais être arrêté précipitamment.



**Figure 4** : Représentation de la prednisolone et de la méthylprednisolone

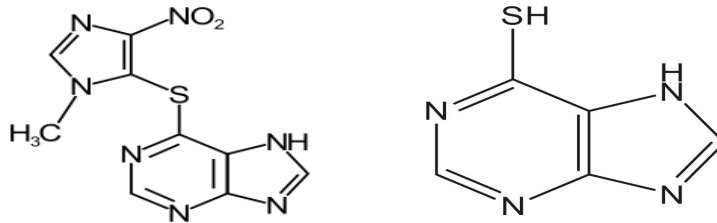
## 2. Les autres traitements

### a) Les immunomodulateurs

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

L'azathioprine (Imurel®) et la 6-mercaptopurine (Purinethol®) constituent un des traitements les plus efficaces pour prévenir les rechutes dans la RCH (**Figure 5**). Ils ont en réalité un rôle d'immunomodulateur. Ses 2 molécules sont généralement prescrites pour les formes de RCH les plus évolutives et les plus difficiles à traiter (poussées fréquentes et/ou sévères), dépendantes ou résistantes aux corticoïdes. Il s'agit de molécules qui vont mettre beaucoup de temps à agir (3 à 6 mois) et avant de conclure à l'échec de ce type de traitement, le médecin s'assurera de l'observance du traitement durant 3 mois, à une posologie adaptée.

L'azathioprine est prescrit à la posologie de 2 à 2,5 mg/kg/24h. La 6-mercaptopurine, son métabolite est utilisé à une posologie moindre (1-1,5 mg/kg/24h). Ces molécules peuvent être prescrites en monothérapie ou en association avec une corticothérapie au début, en attendant que le traitement soit efficace. Ces médicaments vont viser les cellules en division à renouvellement rapide (dont les cellules du système immunitaire) et donc provoquer certains effets indésirables : troubles digestifs, chute de cheveux temporaire, augmentation des risques infectieux, toxicité rénale (entraînant une insuffisance rénale), hypertension artérielle.



**Figure 5** : Représentation des molécules d'azathioprine et de 6-mercaptopurine

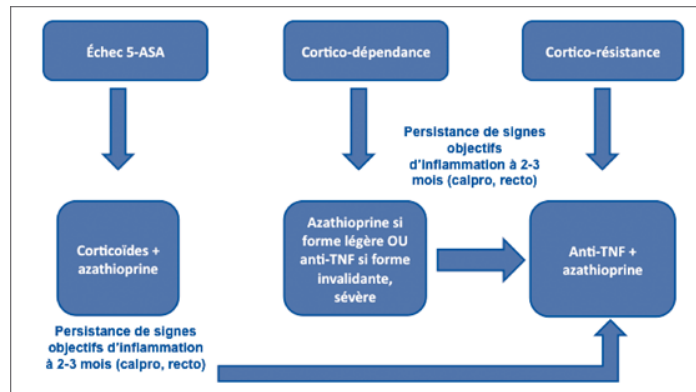
### b) Les biothérapies

Depuis une dizaine d'années, la recherche travaille sur le développement et l'utilisation de biothérapies chez les patients atteints de MICI, en cas d'échec thérapeutiques des premières lignes de traitements. Parmi ses biothérapies, on retrouve les anti-TNF $\alpha$  dont l'infliximab (Remicade<sup>®</sup>), l'adalimumab (Humira<sup>®</sup>) et le golimumab (Simponi<sup>®</sup>). Ils sont indiqués uniquement chez les patients qui n'ont pas répondu de façon correcte aux autres traitements dont la corticothérapie et les immunomodulateurs (**Figure 6**). Ils sont également envisagés si les traitements précédents sont mal tolérés ou contre-indiqués. Dans certains cas (hypercorticisme, maladie invalidante), il est possible d'éviter les thiopurines (du fait de leur temps d'efficacité) pour débiter les anti-TNF. Il faut cependant signaler que 20% des patients ne répondent pas à ce type de traitement et 30% d'autres patients ont un risque de perdre la réponse souhaitée (12–14).

En janvier 2015, le vedolizumab (Entyvio<sup>®</sup>), anticorps monoclonal humanisé anti- $\alpha 4\beta 7$ , a obtenu l'AMM dans le traitement de la RCH mais également dans celui de la maladie de Crohn. Cet anticorps fait partie de la famille des anti-intégrines tout comme le Natalizumab (Tysabri<sup>®</sup>). Ce traitement est proposé en cas d'échec thérapeutique avec les corticoïdes, les immunosuppresseurs et les anti-TNF. Les études ont montré que ce traitement induit une réponse clinique hautement significative, ainsi qu'une guérison des muqueuses chez les patients en échec thérapeutique en comparaison avec un placebo (phase 3 : GEMINI I) (15). Cependant, aucune étude n'a encore montré la comparaison en un traitement par vedolizumab et un traitement par anti-TNF. Ce traitement reste réservé à l'usage hospitalier et seuls les spécialistes en gastro-entérologie-hépatologie et médecine interne peuvent le prescrire. Il est souligné que le service médical rendu est insuffisant chez les patients naïfs de traitement anti-TNF mais il est important chez les patients en échec des corticoïdes, des immunomodulateurs et des anti-TNF. Chez les patients atteints de RCH modérée à sévère en échec thérapeutique, l'amélioration du service médicale rendu (ASMR) est considérée mineure (Commission de la transparence concernant le vedolizumab, janvier 2015).

La dernière classe des biothérapies est les inhibiteurs de la JAK (Janus Kinase) 1 et 3. La molécule clé est le Tofacitinib. La *Food and Drug Administration* (FDA) a déjà approuvé cette molécule pour la polyarthrite rhumatoïde. Les études cliniques de phase 2 sur la RCH ont montré des résultats très intéressants (16). Actuellement, une phase 3 pour le traitement de la RCH est en cours.





**Figure 6** : Proposition d'un algorithme de traitement pour les patients atteints de RCH (17)

### c) Les traitements contre-indiqués

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

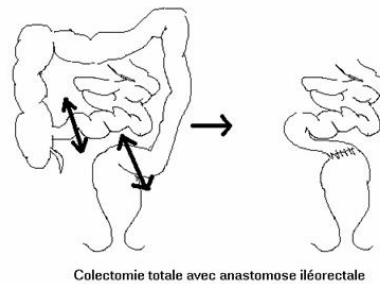
Il est donc important pour le patient de demander l'avis à son médecin ou son pharmacien avant l'introduction d'un nouveau médicament (4).

### d) Traitements chirurgicaux

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

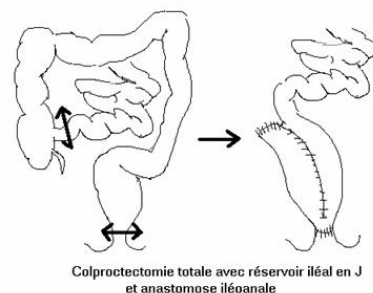
Il existe deux types d'intervention :

- La colectomie : suppression du côlon uniquement. L'intestin grêle est alors raccordé au rectum pour rétablir un transit intestinal normal. On parle d'anastomose iléo-rectale (**Figure 7**). Cette intervention sera préférée à la suivante pour les patients âgés ayant un problème de fonctionnement sphinctérienne, en cas de doute de maladie de Crohn ou encore les femmes en âges de procréer et désirant une grossesse (18).



**Figure 7 :** Représentation d'une colectomie totale avec anastomose iléorectale. *Société Nationale Française de Gastro-Entérologie*

- La coloproctectomie : suppression de la totalité des lésions. Le rectum et le côlon sont enlevés. Les patients ont ensuite une anastomose iléo-anale avec réservoir. Cette récente technique permet de reconstruire un réservoir, qui remplace le rectum, avec une partie de l'intestin grêle (**Figure 8**). Si le fait d'enlever la totalité du côlon supprime la pathologie, il existe malgré tout un risque d'inflammation du réservoir (pochite). Mais ce risque reste faible. L'anastomose iléo-anale avec réservoir en J est l'intervention de référence dans la RCH car elle permet d'arriver au double objectif de guérison de la maladie par ablation de la totalité de la muqueuse potentiellement malade, et de conservation de la fonction sphinctérienne. Pour cette raison, elle est faite (en 2 ou 3 temps opératoires) dans près 80 à 90% des RCH opérées (18).



**Figure 8 :** Représentation d'une coloproctectomie totale avec réservoir iléal en J et anastomose iléoanale. *Société Nationale Française de Gastro-Entérologie*

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

#### e) L'alimentation

L'influence de l'alimentation au cours d'une RCH est un sujet encore très discuté (19). Un régime « sans résidu » est conseillé en cas de poussée, afin de diminuer le nombre et le volume des selles. Ce régime diminue l'apport de fibres végétales ou animales. En dehors de poussée, le patient revient à une alimentation normale. Il est conseillé de consommer du poisson vivant en eau froide (riche en acide gras de la famille des oméga-3 aux propriétés anti-inflammatoires). L'alcool et le café sont déconseillés au moment des poussées.

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

La transplantation de microbiote fécal (TMF) est un traitement reconnu pour son efficacité contre les infections à *Clostridium difficile* multirésistant (20). De nombreuses études sont actuellement en cours afin de déterminer l'efficacité et l'innocuité d'un tel traitement pour des patients atteints de MICI et plus particulièrement de RCH (21). Il en ressort que la TMF permet une réponse clinique dans environ 2/3 des cas (65%) et une rémission clinique dans 40 % des cas. Il a été également noté une augmentation de la richesse et de la diversification de la flore intestinale du patient avec parfois un changement de cette flore. Malgré quelques effets indésirables, ce nouveau type de traitement pourrait être à l'avenir utilisé comme un traitement de référence pour alterner ou remplacer les traitements médicamenteux (22,23).

### 3. Éducation thérapeutique

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

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

Cette éducation thérapeutique a clairement pour but d'aider au mieux les patients à comprendre leur maladie, l'accepter et surtout à pouvoir mettre en évidence de possibles troubles ou signes et savoir les décrire à leur médecin ou leur pharmacien (24).

### 4. Soutien psychologique

La RCH reste une maladie grave de part son imprévisibilité, sa chronicité et ses risques de complications. L'ensemble peut engendrer chez les patients atteints de RCH un stress et une angoisse, deux facteurs reconnus pour déclencher des poussées. Un soutien psychologique est donc proposé pour ces patients, afin de maîtriser ces situations de stress, de paniques ou encore d'éviter un isolement social et psychologique. Ces périodes d'angoisse ne doivent jamais être sous-estimées par le corps médical ou l'entourage du patient. Ce soutien psychologique peut également être proposé au conjoint du patient. Il est également proposé en vue de traitements chirurgicaux (4).

### III. L'homéostasie intestinale

#### A. La muqueuse intestinale

La muqueuse intestinale représente deux types de barrière. La première est la barrière physique empêchant l'entrée des microorganismes constituant le microbiote intestinale ou encore les microorganismes pathogènes. Le mucus fait partie de cette barrière physique. La deuxième barrière est la barrière immunologique. En effet, la muqueuse intestinale est une zone très importante d'échange entre le microbiote intestinal et les cellules immunitaires présentes dans cette muqueuse. Les antigènes constamment présents sont les antigènes de la flore commensale et ceux alimentaires, normalement tolérés par notre système immunitaire. Les antigènes pathogènes sont également présents et provoquent une réaction du système immunitaire contre ces derniers. Dans ce contexte environnemental d'homéostasie, les cellules immunitaires doivent être capables « d'accepter/tolérer » les antigènes commensaux et de l'alimentation tout en combattant les antigènes pathogènes. Tout ceci est possible grâce à la communication qui existe entre le microbiote intestinal et les cellules immunitaires intestinales.

La cellule intestinale épithéliale (CEI) est située au centre de cette communication et joue un rôle à part entière dans cette communication et donc le développement et la régulation de l'homéostasie intestinale (25). Le microbiote intestinal est reconnu par la monocouche de CEI via les récepteurs de l'immunité innée (*Toll-like receptor*, *Nod-like receptor*) de ces dernières. Ces récepteurs vont pouvoir reconnaître des motifs antigéniques de la flore commensale (26). Afin de pouvoir contrôler leurs fonctions, les CEI sont capables de récupérer des métabolites de bactéries commensales (27). Selon le contexte et les signaux reçus, la CEI va répondre en augmentant la synthèse de mucus, de peptides anti-microbiens ainsi qu'en favorisant la sécrétion des immunoglobulines A. Tout ceci va permettre de maintenir un équilibre entre la flore commensale intestinale et la muqueuse intestinale (25) et c'est ce qui constitue ce contexte « homéostasie intestinale » (28).

La CEI a la capacité de sécréter également des cytokines et des chimiokines au niveau du pôle basal et ainsi réguler les fonctions des cellules immunitaires de la muqueuse intestinale (25). Cette capacité va permettre d'orienter la différenciation des cellules dendritiques de la muqueuse intestinale vers un phénotype tolérogène (29–31). Parmi les différentes cytokines sécrétées, on retrouve la TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*) ou encore le TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ), deux protéines immunomodulatrices. Les cellules dendritiques tolérogènes vont par la suite orienter la différenciation des lymphocytes T naïfs vers un phénotype régulateur (Lymphocytes Treg FoxP3+). Ces lymphocytes sont des acteurs essentiels de la tolérance immunitaire (32).

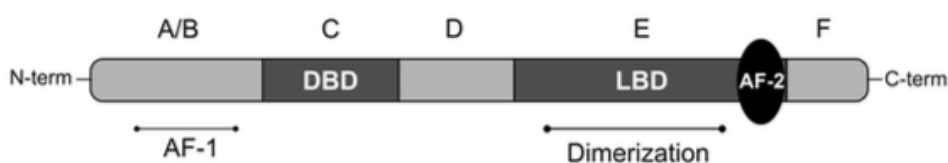
Ces résultats démontrent donc que les CEI sont des cellules de l'immunité innée à part entière (reconnaissance de motifs microbiens, sécrétion de cytokines, modulation de la réponse immune) impliquées dans le développement de l'homéostasie intestinale (25).

## B. Le récepteur PPAR $\gamma$

### 1. Fonction et structure

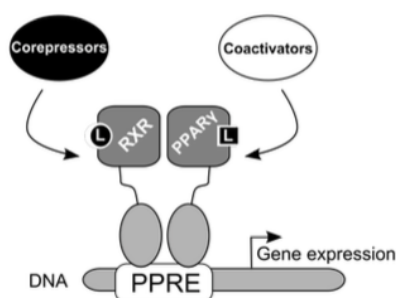
Les protéines *Peroxisome Proliferator Activated Receptor* (PPAR) appartiennent à la super famille des récepteurs nucléaires qui comprend 48 facteurs de transcription ligand dépendant chez l'homme. 3 récepteurs de ce type ont été isolés et caractérisés : PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  et PPAR $\gamma$ . Ces 3 membres sont codés par différents gènes situés sur différents chromosomes. Cette super famille comprend également les récepteurs aux rétinoïdes, aux stéroïdes, aux hormones thyroïdiennes ou encore à la vitamine D (33,34). Les récepteurs nucléaires ont une très grande importance dans l'organisme. En effet, ils sont impliqués dans la quasi-totalité des processus de développement biologique et physiologique et jouent également un rôle dans diverses maladies (34). Les récepteurs nucléaires se distinguent des autres facteurs de transcriptions par leur capacité à fixer des ligands hydrophobes qui vont modifier leur activité transcriptionnelle. Ainsi, les récepteurs nucléaires constituent une cible thérapeutique importante contre les désordres métaboliques, les maladies inflammatoires ou encore les cancers (35–37).

Les récepteurs nucléaires PPAR ont les caractéristiques structurales de la super famille des récepteurs nucléaires. Les différentes isoformes de PPAR possèdent 5 ou 6 régions structurales avec 4 domaines fonctionnels appelé A/B, C, D et E/F (**Figure 9**). PPAR $\gamma$  possède un domaine amino-terminal variable (A/B). On y retrouve la première fonction activatrice (AF-1) qui est indépendante de la présence du ligand de PPAR $\gamma$  et qui est la cible de phosphorylation par des kinases (38). On retrouve ensuite un domaine (C) constitué de 2 doigts de zinc fixant l'ADN (appelé DBD= DNA binding domain), une région charnière (D) également appelée *hinge* et servant de site d'amarrage pour des cofacteurs et enfin un domaine carboxy-terminal (E/F) qui va permettre la fixation spécifique du ligand ainsi que l'activation de la liaison du récepteur nucléaire à l'ADN (LBD=ligand binding domain). Ce dernier contient la seconde fonction activatrice (AF-2), dépendante de la présence du ligand. Le domaine LBD est composé de 12 hélices  $\alpha$  et d'un feuillet de 4 brins  $\beta$ , constituant une large cavité hydrophobe pouvant accueillir un ligand. Si un ligand se fixe, on observe une modification de conformation du domaine LBD, qui pourra à ce moment - là accueillir des corégulateurs transcriptionnels. En l'absence de ligand ou en présence d'antagoniste de PPAR, ce dernier interagit avec des co-répresseurs qui bloqueront la fixation des co-activateurs et l'initiation d'un complexe transcriptionnel. Ces co-régulateurs affecteront donc l'initiation à la transcription (augmentation ou diminution de la régulation transcriptionnelle) et l'abondance d'ARN messager des gènes cibles. (**Figure 9**).



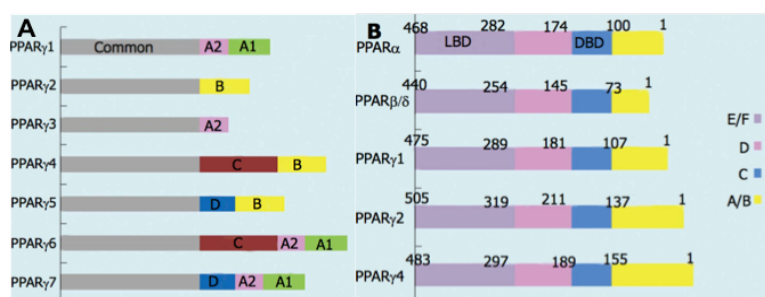
**Figure 9** : Représentation de l'organisation structurale spécifique des récepteurs nucléaires (39)

Afin que PPAR $\gamma$  puisse être activé, il est indispensable que ce dernier soit lié à son hétérodimère : le *9-cis-retinoic acid receptor* (RXR). Le complexe PPAR $\gamma$ /RXR va se fixer sur des endroits spécifiques de l'ADN localisés sur les régions promotrices de gènes cibles (en amont du gène), appelés *peroxisome proliferator response element* (PPRE) (**Figure 10**). Un PPRE, également appelé élément de réponse, est composé de la répétition d'une séquence consensus : AGGTCA, généralement espacée par un, deux ou trois nucléotides. Ces PPRE prendront le nom de DR1 lorsque qu'il n'y aura qu'un nucléotide qui sépare les deux séquences consensus, DR2 si deux nucléotides, etc.



**Figure 10** : Représentation schématique de la fixation du complexe PPAR $\gamma$ -RXR sur un élément de réponse au niveau du promoteur d'un gène (39)

Il existe au niveau des tissus humains, 7 transcrits différents du gène PPAR $\gamma$ . Cependant seules 3 protéines sont exprimées. Les isoformes 1, 3, 5 et 7 donnent une protéine structuralement identique : PPAR $\gamma$ 1, l'isoforme 2 donne la protéine PPAR $\gamma$ 2, qui diffère par leur domaine N-terminal (plus long de 28-30 acides aminés) et enfin les isoformes 4 et 6 donnent la protéine PPAR $\gamma$ 4 (**Figure 11A et 11B**) (38). L'isoforme 1 est exprimée dans un très grand nombre de tissus dont les tissus cardiaques, muscles squelettiques, cellules  $\beta$  du pancréas, la rate, l'intestin, les macrophages, etc. L'isoforme 2 est, quant à elle, majoritairement exprimée dans les tissus adipeux (blancs et bruns). L'isoforme 3 est exprimée abondamment dans les macrophages mais également dans le côlon et les adipocytes. La différence au niveau fonctionnel de ces deux isoformes (la 2 et la 3) n'est pas encore clairement comprise. Les isoformes 4, 5, 6 et 7 sont essentiellement exprimées au niveau des macrophages mais on retrouve également les transcrits 6 et 7 dans les tissus adipeux (38).



**Figure 11** : Représentation des 7 transcrits de PPAR $\gamma$  et des 4 protéines de PPAR $\gamma$  (38)

A l'origine, l'expression du récepteur PPAR $\gamma$  a été mise en évidence au niveau du tissu adipocytaire. En plus de jouer un rôle primordial dans le métabolisme lipidique et la sensibilité à l'insuline (40), il est indispensable dans la différenciation des adipocytes. PPAR $\gamma$  joue un rôle important dans l'organisme : il est capable d'intervenir sur la modulation de réponses immunitaires et inflammatoires. Il est exprimé dans des cellules immunitaires comme les lymphocytes B et T (41,42), les macrophages (43), les cellules dendritiques (44). Diverses études ont mis en évidence le rôle anti-inflammatoire de PPAR $\gamma$  et de ses ligands au niveau des cellules lymphoïdes et myéloïdes (40,45–47). Parmi elles, la première étude montra que les ligands de PPAR $\gamma$  étaient capables d'inhiber l'expression de gènes inflammatoires de macrophages (48,49).

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

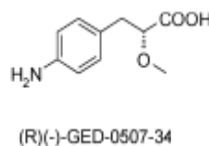
L'une des caractéristiques importante du récepteur PPAR $\gamma$  est sa capacité d'accueillir différents ligands (50–52). Cependant, il est important de souligner que beaucoup de ces ligands n'ont qu'une faible affinité avec le récepteur nucléaire. En effet, les concentrations de ligands nécessaires pour activer PPAR $\gamma$  sont supérieures aux concentrations physiologiques, ce qui amène à se demander si ceux-ci sont réellement des ligands endogènes. Une autre notion importante est l'existence, parmi tous ces agonistes, de modulateurs spécifiques de PPAR $\gamma$  (SPPARMs : *Selective PPAR modulators*) (53). En résumé, il est possible d'obtenir deux réponses différentes sur la transcription d'un gène suivant l'agoniste de PPAR $\gamma$  utilisé. Cette différence de réponse s'explique essentiellement par la forme des molécules qui va modifier la structure du récepteur nucléaire et donc modifier l'ancrage de co-facteurs différents (53).

Une équipe a montré via une étude par cristallographie (rayon X), que parmi les ligands naturels de PPAR $\gamma$ , se trouvent les acides gras oxydés. Ils sont capables de se fixer sur un résidu cystéine du site LBD de PPAR $\gamma$  via une liaison covalente et activer PPAR $\gamma$  (51). Cette découverte est très importante et ouvre la voie pour la synthèse de nouvelles molécules ayant des affinités avec PPAR $\gamma$ .

La famille de molécules chimiques reconnue pour faire partie des ligands de PPAR $\gamma$  est la famille des thiazolidinediones (54). Cette famille (surnommée « famille des glitazones ») est historiquement connue par la commercialisation de ces différents membres en tant que traitements anti-diabétiques. Parmi les molécules connues, sont retrouvées la troglitazone, la rosiglitazone et surtout la pioglitazone. Cependant, ses molécules ont été retirées du marché il y a quelques années à cause des effets secondaires délétères qu'elles pouvaient occasionner : rétention hydrosodée, hépatotoxicité, accroissement du risque d'accident cardio-vasculaire (AVC) ou infarctus du myocarde (IDM) (pour la rosiglitazone) (55) ou encore le faible risque de cancer de la vessie (pioglitazone). Cependant, ce risque de cancer de la vessie est contesté par de nouvelles études (56,57). La principale raison des effets secondaires s'explique par le fait que la connaissance de PPAR $\gamma$  dans l'organisme est encore mal connue et son activation reste un mécanisme biochimique très puissant pour lequel toutes les facettes n'ont pas encore été élucidées. Des études sur l'action des « glitazones » sur l'inflammation ont déjà été entreprises, en particulier sur des

modèles de rat exprimant des signes cliniques d'arthrite rhumatoïde. La pioglitazone et la rosiglitazone ont permis de diminuer les marqueurs d'inflammations synoviales et la sévérité de l'arthrite (58,59). Plus intéressant, une étude clinique randomisée double aveugle qui montrait l'efficacité d'un traitement par rosiglitazone en comparaison à un placebo chez des patients atteints de RCH (60).

Les travaux de Rousseaux et *al.* ont permis de mettre en évidence que PPAR $\gamma$  serait une cible (parmi d'autres) du 5-ASA (61). Pour rappel, le 5-ASA est le traitement de première intention pour les patients souffrant de RCH. Dans l'intérêt de synthétiser de nouveaux modulateurs spécifiques de PPAR $\gamma$ , le laboratoire de Philippe Chavatte a mis au point différentes molécules provenant d'un drug design du 5-ASA. Parmi ces molécules, le GED-0507-34-levo (acide amino-phényl-methoxy-propionique) a montré des résultats très intéressants (**Figure 12**) (62,63). Cette molécule prochainement en phase 3 pour le traitement de la RCH présente une activité anti-inflammatoire identique au 5-ASA mais à une concentration 30 fois inférieure à ce dernier.



**Figure 12** : Représentation de la molécule du GED-0507-34. (62)

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

Après le tissu adipeux, l'organe exprimant le plus PPAR $\gamma$  est le côlon et plus particulièrement les CEI du côlon. Il existe un gradient d'expression de PPAR $\gamma$  dans ce dernier. L'expression la plus élevée de PPAR $\gamma$  se situe au niveau du côlon proximal puis elle diminue progressivement lorsqu'on se dirige vers le côlon distal et est beaucoup plus faible dans l'intestin grêle (64). Ses différents rôles au niveau de la CEI ne sont encore pas entièrement connus mais il semble jouer un rôle sur la maturation, l'adhésion cellulaire et la motilité des colonocytes (64–66). PPAR $\gamma$  jouerait également un rôle dans l'homéostasie intestinale. En effet, différentes équipes de recherche, dont la nôtre, ont mis en évidence une augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$  dans les CEI de côlon en présence de la flore intestinale (67), de produits bactériens (LPS ou butyrate) (67,68), probiotiques (69–71). Tous ces résultats montrent qu'il existe bien un échange entre la CEI et le microbiote et PPAR $\gamma$  intervient dans cet échange.

Chez l'homme, le laboratoire a mis en évidence un déficit significatif de l'expression et de l'activité de PPAR $\gamma$  dans les cellules épithéliales intestinales de côlon de patients souffrants de RCH (67). Ce déficit, dont l'origine est encore inconnue, est limité au côlon et n'existe pas au cours de la MC. Il est présent en muqueuses saines et lésées de RCH, suggérant qu'il pourrait s'agir d'un facteur primitif participant à la survenue de la maladie. Le niveau d'expression de PPAR $\gamma$  joue un rôle important concernant le traitement de ces patients. Plus ce niveau sera élevé, meilleure sera la réponse au traitement (72).



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

De nombreux travaux, dont ceux du laboratoire, ont permis de révéler le rôle essentiel de PPAR $\gamma$  dans la régulation de l'inflammation intestinale, notamment au cours de la RCH. En effet, son activation atténuée de plus de 50% la pathologie dans un modèle de colite expérimentale chez la souris (73). Toujours sur ce modèle animal, l'inactivation du gène PPAR $\gamma$  dans l'épithélium intestinal provoque une augmentation de la sensibilité à la colite expérimentale induite par le DSS (Dextran Sodium Sulfate) (74). Comme cité précédemment, ce même récepteur nucléaire est significativement et spécifiquement diminué au niveau des CEI du côlon chez les patients souffrant de la RCH (67).

La première étude ayant mis en avant la possibilité de traiter les patients atteints de RCH par des agonistes de PPAR $\gamma$  remonte à une quinzaine d'années. Lewis *et al.* publia l'efficacité de la rosiglitazone chez les patients atteints de RCH et réfractaires au 5-ASA et aux corticoïdes (60). Ils confirmeront leur résultat sur une seconde étude randomisée et en double aveugle (précédemment citée). Une étude chinoise confirme également ces résultats avec une étude clinique combinant la rosiglitazone avec le 5-ASA contre le 5-ASA seul. Ils observèrent une meilleure efficacité lorsque le 5-ASA est combiné à la rosiglitazone et sans effets secondaires (75). Enfin, Pedersen et Brynskov ont comparé les effets cliniques d'un traitement par mésalazine ou par rosiglitazone en topique chez des patients atteints de RCH. Dans les 2 groupes, ils observèrent une réponse clinique (diminution du score Mayo) mais aucune différence entre les deux groupes (76).

L'ensemble de ces données révèle donc que le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  est un acteur incontournable dans la mise en place d'une homéostasie au niveau intestinale. Les différentes observations concernant l'implication de PPAR $\gamma$  au niveau du côlon font de ce récepteur nucléaire l'une des cibles des prochaines approches thérapeutiques à envisager pour soigner les patients souffrant de RCH.

### C. La TSLP

#### 1. Généralités

La TSLP est une cytokine épithéliale à 4 hélices  $\alpha$  faisant partie de la famille des interleukines 2 et est étroitement liée à l'IL-7. Elle fut initialement découverte en 1994 dans le surnageant de culture de lignées de cellules stromales thymiques de souris (77). Elle fut caractérisée et étudiée comme un facteur de croissance lymphocytaire des lignées B (78). Par la suite, la TSLP humaine fut isolée (79). En comparant les acides aminés, les sites de glycosylations ainsi que les résidus de cystéines, il a été montré qu'il existait une homologie de 43% entre les 2 TSLP (80). Le gène codant la TSLP est localisé sur le chromosome 5q22.1.

L'ARNm codant la TSLP est principalement exprimé au niveau des cellules épithéliales du thymus, du poumon, de la peau et de l'intestin. On la retrouve également dans les mastocytes, les cellules dendritiques ou les cellules stromales. Cependant l'ARNm codant la TSLP est absent dans les types cellulaires hématopoïétiques ou les cellules endothéliales (29,80). Chez l'homme comme chez la souris, la TSLP est constitutivement exprimée dans les CEI avec un haut niveau

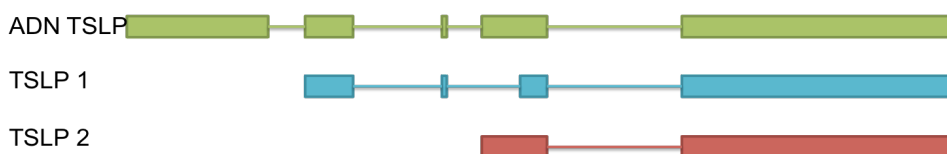
d'expression au niveau du côlon. Son expression, *in vitro*, peut être induite par des cytokines, micro-organismes ou productions microbiennes (29,81–86).

## 2. Les isoformes de la TSLP

Récemment, il a été mis en évidence l'existence de 2 isoformes distinctes de la TSLP. A partir du même gène, 2 ARNm de la TSLP de taille différente sont transcrits (87,88). Le premier variant est l'isoforme longue de la TSLP ou autrement appelé TSLP 1. Le deuxième variant est l'isoforme courte de la TSLP ou TSLP 2. Ces 2 isoformes sont constituées d'un nombre différent d'exons. La TSLP 1 a 4 exons alors que la TSLP 2 n'en compte que 2 (**Figure 13**). La TSLP 1 est une protéine de 159 acides aminés et son poids moléculaire est estimé à 18,1 kDa (kiloDalton). La TSLP 2, plus courte au niveau N-Terminal, a deux sites d'initiation de la traduction possible. En effet, il y a au début de la séquence codant la TSLP 2, deux méthionines (premier acide aminé obligatoire d'une protéine) très rapprochées. C'est pour cela qu'il peut y avoir 2 TSLP 2 avec un nombre différent d'acides aminés. Elles seront constituées soit de 60 acides aminés soit de 63 acides aminés, avec des poids moléculaires estimés à 7,1 kDa et 7,4 kDa.

La très grande majorité des publications qui traite de la TSLP, ne distingue pas les 2 isoformes et à quelques exceptions près, la totalité des publications ne décrit que la forme longue de la TSLP et les effets de cette dernière (89–92). Pourtant, les études décrivant la TSLP 2 montrent clairement que cette isoforme est exprimée constitutivement et qu'elle est l'isoforme prédominante au niveau des kératinocytes mais également au niveau des CEI et pulmonaires chez les patients sains (87,88). Dans un contexte inflammatoire, il est observé une très forte augmentation d'expression de la TSLP 1 et une faible augmentation de la TSLP 2. Ceci montre donc qu'en cas d'inflammation, l'expression de ces deux isoformes n'est pas régulée de la même façon (87,88,93,94). De plus il est montré également que la TSLP 2 a un effet anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo* (88).

Les différents rôles (anti-inflammatoire ou pro-inflammatoire) de la TSLP pourraient s'expliquer par l'existence de ces 2 isoformes ayant des actions opposées dans l'organisme.

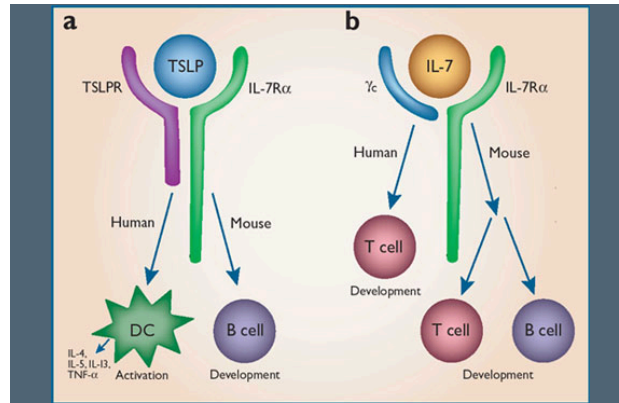


**Figure 13:** Représentation de l'ADN codant la TSLP et de ces 2 transcrits.

## 3. Le récepteur à la TSLP : TSLPR

La TSLP exerce ses fonctions biologiques via son récepteur : TSLPR (TSLP Récepteur). Le récepteur de la TSLP est un hétérodimère constitué d'une chaîne alpha 1 du récepteur TSLP (TSLPR $\alpha$ 1) et d'une chaîne alpha du récepteur à l'IL-7 (IL-7R $\alpha$ ) (**Figure 14**). En effet, le TSLPR seul a une faible affinité pour la TSLP mais une combinaison avec l'IL-7R $\alpha$  permet d'obtenir un site de fixation à la TSLP de forte affinité. Sa fixation sur son récepteur va déclencher des signaux de transductions ou de transcriptions comme STAT 1, STAT 3, STAT 5, JAK 1 ou JAK 6 (95).

Actuellement, il semblerait que le récepteur à la TSLP reconnaisse les deux isoformes même si aucune étude n'a montré le contraire. Beaucoup de cellules ont la capacité de répondre à la TSLP *in vivo* et *in vitro*. Parmi ces cellules, sont retrouvées les cellules hématopoïétiques : les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, les lymphocytes T Natural Killer (NKT), les mastocytes, les polynucléaires basophiles et les éosinophiles. La TSLP joue un rôle clé dans divers processus physiologiques.



**Figure 14** : Représentation du récepteur à la TSLP constitué du TSLPR et de l'IL-7R $\alpha$ .

#### 4. Régulation de la TSLP

Différents facteurs de transcriptions ont été mis en évidence dans le contrôle de la régulation de la TSLP. Les différentes études étudiant le rôle des récepteurs nucléaires sur l'expression de la TSLP n'ont généralement pas pris en compte l'existence des deux isoformes (exceptées quelques études) et se sont concentrées uniquement sur sa forme la plus retrouvée lors d'inflammation : la TSLP 1. Parmi eux, le NF- $\kappa$ B régule la TSLP au niveau pulmonaire (96) mais également au niveau des CEI (Caco-2 et HT-29) *in vitro* en réponse à l'IL-1(97). Il existerait 2 sites de liaisons (NF1 et NF2) dans la séquence promotrice du gène codant la TSLP. Le promoteur du gène codant la TSLP contient également plusieurs sites reconnus par l'AP-1 (autre facteur de transcription). Ces sites coopèrent avec les sites de liaisons de NF- $\kappa$ B pour moduler la réponse à l'IL-1. Un lien entre PPAR $\gamma$  et la régulation de la TSLP a déjà été mis en avant au cours d'un modèle de dermatite atopique chez la souris (98). Dans cette étude, les auteurs démontrent que le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  joue un rôle de rétro-contrôle négatif sur l'expression de la TSLP dans les kératinocytes. L'utilisation d'un agoniste de PPAR $\gamma$  (rosiglitazone) a pour effet de diminuer l'expression de la TSLP alors que l'antagoniste PPAR $\gamma$  (GW9662 20  $\mu$ M), permet d'induire son expression. Ce lien semble exister également dans l'intestin dans le cas des maladies cœliaques chez l'enfant. En effet, lors de ces maladies, un faible taux de PPAR $\gamma$  est observé en parallèle d'une importante expression de la TSLP (99). Le gluten aurait un rôle sur la dégradation de PPAR $\gamma$  et l'augmentation d'expression de la TSLP. Cela permet de renforcer l'idée que le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  puisse jouer un rôle sur l'expression de la TSLP.

D'autres récepteurs nucléaires ont également été impliqués dans la régulation de l'expression de la TSLP, notamment RXR (Retinoid X Receptor), RAR (Retinoid Acid Receptor) ou encore VDR (Vitamin D Receptor) (100) (101) (102). Ces

régulations ont été montrées uniquement dans des cellules épithéliales pulmonaires et de la peau. L'agoniste de RXR (9-*cis*-RA) semble réguler négativement l'expression de la TSLP alors que les agonistes de VDR (vitamine D3, MC903) la régulent positivement. Au niveau des kératinocytes, ces agonistes de VDR semblent se fixer sur les deux régions promotrices (TSLP 1 et TSLP 2) mais seule la TSLP 2 serait plus transcrite en présence de ces agonistes VDR (88,92).

## 5. Fonction de la TSLP

Suivant sa localisation, elle joue un rôle différent : soit un rôle homéostasique, soit un rôle pro-inflammatoire de type Th2. Il est clairement possible d'admettre l'hypothèse que les 2 transcrits donnent 2 protéines avec des fonctions totalement différentes.

### *a) Rôle homéostasique*

Au niveau central, la TSLP permet l'homéostasie lymphocytaire T dans le thymus via la sélection positive et la différenciation intra-thymique des lymphocytes T régulateurs (103). Aucun laboratoire n'a actuellement cherché à différencier les 2 transcrits de la TSLP au niveau central.

### *b) Rôle pro-inflammatoire de type Th2*

Au niveau périphérique, son rôle dans la modulation pro-inflammatoire Th2 a été clairement démontré lors de pathologies allergiques (89,90,104,105). Ce profil Th2 va permettre la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en lymphocytes Th2 et induire une réponse inflammatoire pro-Th2. Parmi ces pathologies, on retrouve la dermatite atopique (inflammation chronique de la peau) (91,92). En effet, la TSLP est fortement exprimée au niveau des lésions aiguës et chroniques de la peau alors qu'elle est absente dans la peau non lésée (106). La forte expression de la TSLP est également impliquée dans les allergies pulmonaires et l'asthme (106). Son rôle serait précoce dans la sensibilité des maladies allergiques pulmonaires, en stimulant les cellules dendritiques à promouvoir les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2 et les cytokines Th2 (106–108). La TSLP 1 semble être l'isoforme « pro-inflammatoire ». En effet, des études montrent que l'expression de la TSLP 1 serait régulée par NF-κB reconnu pour tenir un rôle clé dans l'induction de gènes pro-inflammatoires au cours des maladies inflammatoires observées sur la peau ou l'intestin (88,100,109).

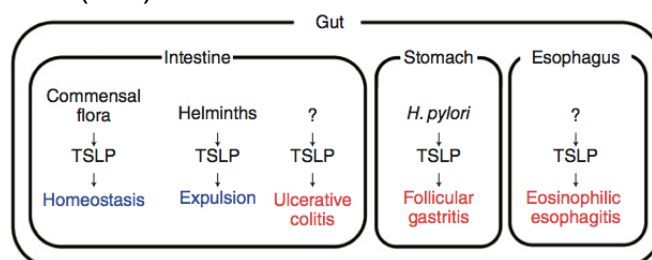
### *c) Rôle de peptide anti-microbien*

D'autres équipes de recherche se sont penchées sur un tout autre aspect de la fonction de la TSLP. En effet, ils ont émis l'hypothèse que la TSLP pouvait jouer un rôle de peptide anti-microbien. Sonesson et *al.* ont mis en évidence une activité anti-microbienne de la TSLP recombinante, préférentiellement sur les bactéries gram négatif (*E. coli* et *Ps. aeruginosa*) (110). Ils démontrent également que la région C-terminale, commune aux deux transcrits de la TSLP, serait la région où se situe l'activité anti-microbienne (110).

Bjerkan et *al.* sont allés plus loin et ont cherché à savoir laquelle des isoformes pouvait avoir une activité anti-microbienne. Ainsi, ils démontrent que la TSLP 2, en plus d'être l'isoforme prédominante dans les kératinocytes, joue un rôle de peptide anti-microbien (87).

#### d) Rôle de la TSLP dans l'intestin

Au niveau intestinal, le rôle de la TSLP est plus complexe. En effet, les deux rôles de la TSLP y sont retrouvés. Elle est constitutivement libérée/sécritée par les CEI. Lors d'infections par l'helminthe *Trichuris muris*, la TSLP permet une réponse pro-Th2 protectrice, via une augmentation d'OX40L par des cellules dendritiques (84) (**Figure 15**). Son rôle homéostasique a également été démontré dans la tolérance vis à vis de la flore commensale et la différenciation de cellules dendritiques tolérogènes (31,111). Ceci aboutit à la production de lymphocytes T régulateurs (**Figure 15**) et la modulation du profil inflammatoire Th1/Th17 (29). En effet, la TSLP va inhiber la production d'IL-12 et IL-23p40 des cellules dendritiques et ainsi réduire la polarisation Th1/Th17 et diminuer la production de cytokines inflammatoires (Th-17, IFN $\gamma$ ) (112,113). Chez les patients atteints de la maladie coeliaque, une diminution de la TSLP 2 dans la muqueuse intestinale est observée pour les malades non traités ou réfractaires en comparaison aux patients traités (94). Cette diminution de la TSLP pourrait contribuer à l'augmentation des enzymes dégradant la matrice des fibroblastes et de cytokines libérées par les lymphocytes T. Concernant les MICI, le rôle de la TSLP est encore mal connu (**Figure 15**). Son expression est diminuée voire absente au niveau des CEI chez les patients atteints de MC (29,32,85). Chez les patients atteints de RCH, il est retrouvé une diminution d'expression de la TSLP sur les tissus non inflammatoires alors que cette expression est augmentée au niveau des tissus inflammatoires en comparaison à des tissus de patients contrôles (83,114,115). Cette augmentation est due à une production de cytokines Th2 pro-inflammatoires (83). En parallèle de cette expression aberrante de la TSLP au cours des MICI, il a été montré une diminution des lymphocytes T régulateurs (116). Fornasa et *al.* démontrent que seule la TSLP 2 est présente dans le tissu sain intestinal alors que la TSLP 1 apparaît dans les zones inflammatoires de la muqueuse intestinale (88). Rimoldi et *al.* concluent leur recherche en émettant l'hypothèse qu'une concentration physiologique de la TSLP pourrait rétablir l'homéostasie intestinale et apporter une réel bénéfice thérapeutique pour les patients atteints de MICI (29). Une étude clinique a également montré qu'une réponse des lymphocytes Th2 et Trég induite par une infection helminthique via une voie potentiellement dépendante de la TSLP, permet de réduire les symptômes des personnes atteints de MICI (117).



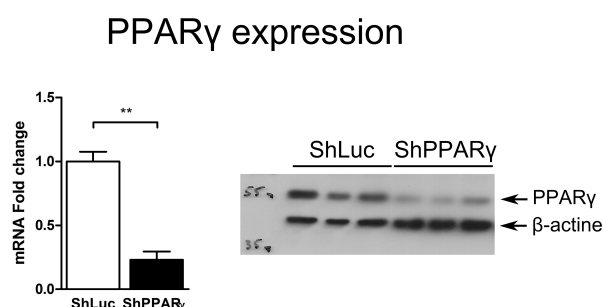
**Figure 15** : Rôles de la TSLP dans l'intestin d'après Takai (118)

## Hypothèses de travail et but du projet

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

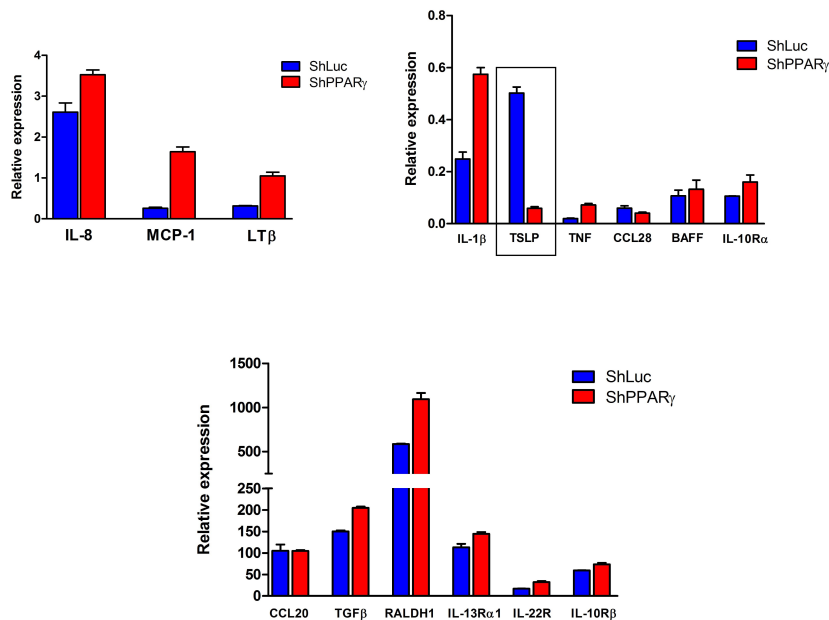
L'hypothèse de ce travail est que le défaut d'expression de ce facteur de transcription au sein des CEI perturberait les capacités de ces cellules à induire un phénotype tolérogène des cellules immunitaires de la muqueuse intestinale. Ainsi, le déficit de PPAR $\gamma$  pourrait être une des causes de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

Des expériences préliminaires ayant pour but d'identifier des facteurs jouant un rôle dans la mise en place d'un mécanisme de tolérance et étant modulés par la diminution d'expression de PPAR $\gamma$  dans les CEI ont ainsi été réalisées au laboratoire. Pour cela, des cellules Caco-2 ont été précédemment établies afin qu'elles expriment stablement un ARN anti-sens ou interférant contre le gène codant PPAR $\gamma$  (Caco-2 ShPPAR $\gamma$ ), dans le but de créer un « *knock-down* » de ce gène. La deuxième lignée exprime un ARN anti-sens contre le gène codant la luciférase, normalement absent dans ces cellules (cellules contrôles ; Caco-2 ShLuc). La diminution de l'expression de PPAR $\gamma$  a été contrôlée par qRT-PCR et western blot (Figure 16). Les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  expriment environ 70% moins d'ARNm codant PPAR $\gamma$ , provoquant une diminution significative de l'expression de la protéine PPAR $\gamma$ . Cette diminution d'expression du gène PPAR $\gamma$  dans la cellule Caco-2 ShPPAR $\gamma$  est équivalente à celle observée dans les CEI des patients atteints de RCH (67).



**Figure 16 : Le niveau d'expression de PPAR $\gamma$  est significativement diminué dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$ .** (A) Confirmation du déficit d'expression par RT-qPCR (\*\* :  $p < 0,01$  ;  $n = 6$ ) et western blot du gène codant PPAR $\gamma$  dans la lignée ShPPAR $\gamma$  en comparaison à ShLuc ( $n = 3$ ).

Ainsi, l'expression de différents facteurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires présents dans les CEI a été évaluée (**Figure 17**). Parmi les gènes différentiellement exprimés entre les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  et les cellules Caco-2 ShLuc, il a été mis en évidence que la TSLP pourrait être un candidat intéressant (**Figure 17**). En effet, son expression était fortement diminuée dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  en comparaison aux cellules contrôles.



**Figure 17 : Le niveau d'expression de différents gènes de cytokines anti-inflammatoires et pro-inflammatoires et de récepteurs.** Expression de l'ARNm des différents gènes évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 ShLuc et Caco-2 ShPPAR $\gamma$  (n=3).

**Les buts du projet sont donc :**

1. De confirmer le rôle de PPAR $\gamma$  dans le contrôle de l'expression de la TSLP dans des lignées de cellules épithéliales intestinales.
2. D'identifier l'isoforme de la TSLP pouvant être dépendante du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  au niveau des cellules épithéliales intestinales.
3. De rechercher la fixation et l'action de PPAR $\gamma$  sur le promoteur de la TSLP.
4. D'évaluer et de comparer l'expression de la TSLP chez les patients atteints de rectocolite hémorragique.

### I. Culture cellulaire

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

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

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

Pour les expériences de stimulation, les cellules étaient placées dans des plaques 6 puits. Chaque puits contenait 10<sup>6</sup> cellules. La veille des stimulations (16 heures avant), le milieu de culture des puits était remplacé par un milieu sans SVF afin de synchroniser les cellules.

### II. Traitement des cellules

Les cellules ont été traitées avec du 5-aminosalicylate (5-ASA 30 mM, Sigma) (61), de la pioglitazone (famille des thiazolidinediones, 10µM, Sigma) (119) et un nouveau modulateur de PPAR $\gamma$  développé au laboratoire et appelé GED (acide amino-phényl-methoxy-propionique) (GED 30 mM, Nogra Pharma, Italie) (63). Du milieu seul a été utilisé comme témoin négatif (=contrôle) pour les stimulations GED et 5-ASA. Le diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma) a servi de contrôle pour la stimulation par la pioglitazone. Après 24 heures de stimulation, les puits sont rincés à deux reprises par du PBS stérile. Les cellules sont lysées par l'ajout d'1 ml de Trizol® (Invitrogen) par puits. Les plaques sont ensuite congelées à -80°C en attendant l'extraction d'ARN et des protéines.



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

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

Un morceau de prélèvement est mis dans un tube contenant 1 ml de Trizol puis broyé (ultraturax ou Precellys). L'ARN est extrait par la technique du Trizol.

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

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

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

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

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

L'ARN est ensuite rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) par action de la rétrotranscriptase inverse, en utilisant le kit commercial Applied Biosystems (Warrington, Grande Bretagne), suivant les instructions du fabricant. 1 µg d'ARN total était mise en présence de transcriptase inverse (Multiscribe, cDNA Reverse Transcriptase), d'amorces aléatoires (*random primers*), de tampon (10X RT Buffer) pendant 10 minutes à 25°C, puis 2H à 37°C et enfin 5 minutes à 85°C.

## VI. Q-PCR en fast past

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

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

Les séquences d'amorces utilisées sont :

Gènes humains	Séquence des amorces sens	Séquences des amorces anti-sens
GAPDH	5'-GACACCCACTCCTCCACCTTT-3'	5'-TTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3'
PPAR $\gamma$	5'-GCTGTCATTATTCTCAGTGGAGAC-3'	5'-GTCTTCTTGATCACATGCAGTAG-3'
TSLP	5'-TGCCTTAGCTACTGGTGCC-3'	5'-ACGCCACAATCCTTGTAATTG-3'
TSLP 1	5'-GGGCTGGTGTTAACTTACGACTTCA-3'	5'-ACTCGGTACTTTTGGTCCCACTCA-3'
TSLP 2	5'-CGT-AAA-CTT-TGC-CGC-CTA-TGA-3'	5'-TTC-TTC-ATT-GCC-TGA-GTA-GCA-TTT-AT-3'
IL-8	5'-AAGGAACCATCTCACTGTGTGTAAC-3'	5'-AAATCAGGAAGGCTGCCAAGA-3'
IL-1b	5'-TTGTTGAGCCAGGCCTCTCT-3'	5'-CCAAATGTGGCCGTGGTT-3'

## VII. Immunoprécipitation des protéines

Cette technique consiste à sélectionner et concentrer la protéine d'intérêt. La différence avec la technique de culture habituelle se trouve dans le nombre de cellules utilisées par conditions (6 millions de cellules cultivées et traitées des boîtes de pétri 10 cm de diamètre spécial pour la culture cellulaire).

Après un traitement de 24H, ces cellules sont nettoyées deux fois au PBS. Les cellules sont ensuite décollées à l'aide d'un grattoir dans du PBS. Après centrifugation, les surnageants sont récupérés et traités avec un mix de tampon IPH (Tris 50 mM pH= 8, NaCl 150 mM, EDTA 5mM, NP40 0,5%) et d'inhibiteurs protéases pendant 1 heure dans la glace. Après une nouvelle centrifugation à vitesse maximale, le surnageant est de nouveau récupéré. 2  $\mu$ g d'anticorps contre la protéine d'intérêt est placé dans tubes et l'ensemble est incubé une nuit à 4°C. Le lendemain, un mélange de protéine A/G (bille de sépharose 50/50) est ajouté et le mélange est incubé 2H à 4°C. Enfin, les échantillons sont rincés 3 fois par du tampon IPH. Les échantillons sont analysés par la technique de Western Blot.

## VIII. Western Blot

Les différents échantillons de protéines sont dénaturés 5 minutes à 95°C (tampon de dénaturation : Tris HCl 50 mM pH 6,5, SDS 2,5%,  $\beta$  mercaptoéthanol 5%, glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,08%) puis déposés sur un gel d'acrylamide 15%. Après migration 1H30 à 130V (tampon de migration : Tris 3 g/L, Glycine 14,4 g/L, SDS 1 g/L), les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C extra (Amersham biosciences) en milieu liquide (tampon de transfert : Tris 3 g/L, Glycine 14,4 g/L, Éthanol 20%) 1H à 110V.

Cette membrane est saturée dans du TBS 1X (Tris Buffer Saline : 24,23 g Tris ; 80,06 g NaCl, pH 7,6)-Tween 0,1% Lait 5% BSA 0,5% 1H sous agitation à température ambiante. Elle est ensuite incubée une nuit à 4°C, sous agitation, en présence de l'anticorps primaire (PPAR $\gamma$  : C26H12 Rabbit mAb, Cell Signaling ; TSLP : Clone #258136 Mouse mAb, R&D Systems) dilué au 1/1000ème dans du TBS IX-Tween à 0,1% et de la BSA 5% pour l'anticorps anti-PPAR $\gamma$  ou du lait 5% pour l'anticorps anti-TSLP. 3 lavages de 10 minutes en TBS IX-Tween 0,4% sont effectués puis la membrane est incubée sous agitation avec l'anticorps secondaire (Goat IgG ; PPAR $\gamma$  : anti Rabbit Ig G Perox, Jackson ; TSLP : anti mouse IgG Perox, Jackson) dilué au 1/10 000ème dans du TBS IX-Tween 0,1%-lait 5%. De nouveau la membrane est lavée 3 fois 10 minutes avec du TBS IX-Tween 0,4%. Elle est incubée 1 minute avec le kit Immobilon Western Chemiluminescence HRP substrate (Millipore). La membrane est ensuite placée dans une cassette de révélation. Puis, le film chimioluminescent (GE Healthcare) est apposé dans la cassette le temps nécessaire. Enfin, le film est successivement immergé dans un bain révélateur, eau et un bain fixateur (Sigma).

## IX. Étude in silico du promoteur de la TSLP

Des séquences PPRE ont été recherchées *in silico* au niveau le promoteur du gène TSLP 2. Environ 1000 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription ont été analysés par différents logiciels NUBIScan (<http://www.nubiscan.unibas.ch/>), PPRE Search (<http://www.classicus.com/PPRE/>) afin d'identifier des éléments de réponses potentiels. La fonctionnalité des séquences PPRE prédites a été étudiée par deux approches complémentaires : *ChIP assay* (ImmunoPrécipitation de la Chromatine) et étude de gène rapporteur en transfection transitoire.

## X. ChIP (Chromatin Immunoprecipitation)

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

L'ensemble de la technique est décrit en annexe 1. Elle est composée en outre, d'une étape de lyse cellulaire, d'une étape de sonication (pour casser l'ADN),

d'une étape d'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-PPAR $\gamma$ , d'une étape d'extraction et purification de l'ADN et enfin une étape d'amplification par PCR de l'ADN immunoprécipité avec des amorces encadrant des zones où PPAR $\gamma$  est susceptible de se fixer, au niveau du promoteur de la TSLP 2.

Les séquences d'amorces utilisées pour la reconnaissance des fragments sont (Annexe 1) :

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

## XI. Etude du gène rapporteur

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

Différents fragments d'ADN génomique ont été créés et ont permis le clonage de différents vecteurs. Le fragment correspondant aux 1000 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription du gène *tslp2* humain (construction « Prom TSLP2 ») a été obtenu par PCR sur de l'ADN génomique de extrait de cellules Caco-2 (oligonucléotide sens 5'-CGCTCGAGGGGATGTCTATCCTTTGCTAAAG-3' ; oligonucléotide antisens 5'-CGAAGCTTGGCGGAGGGCACTCGTCGCGAAAAG-3'). Le fragment correspondant aux 548 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription du gène *tslp2* humain (construction « Prom TSLP2 $\Delta$ 1 ») a été obtenu par PCR sur de l'ADN génomique d'extrait de cellules Caco-2 (oligonucléotide sens 5'-CGCTCGAGGGTACCTGAGTGGAAACTGTT-3' ; oligonucléotide antisens 5'-CGAAGCTTGGCGGAGGGCACTCGTCGCGAAAAG-3'). Les produits PCR ont été clonés en vecteur TOPO pCR4 (TOPO TA cloning, Invitrogen) puis séquencés afin de vérifier les éventuelles erreurs de Taq Polymérase. Pour chaque construction, un fragment sans mutation a été sous-cloné dans le vecteur pGL4.10[*Luc2*] (Promega) à l'aide des sites de restriction *XhoI/HindIII* introduits dans les oligonucléotides (soulignés dans la séquence).

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

Le lendemain, les cellules sont rincées avec du PBS puis on ajoute un tampon de lyse dilué à l'eau stérile. Si les cellules ne sont pas analysées tout de suite, elles sont placées à -80°C.

Deux étapes sont effectuées durant l'analyse :

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

Par la suite, le rapport activité luciférase/concentration protéine est fait. Cela permet de normaliser l'activité de la luciférase par rapport à la quantité de protéine présente dans les puits.

## **XII. Analyses Statistiques**

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

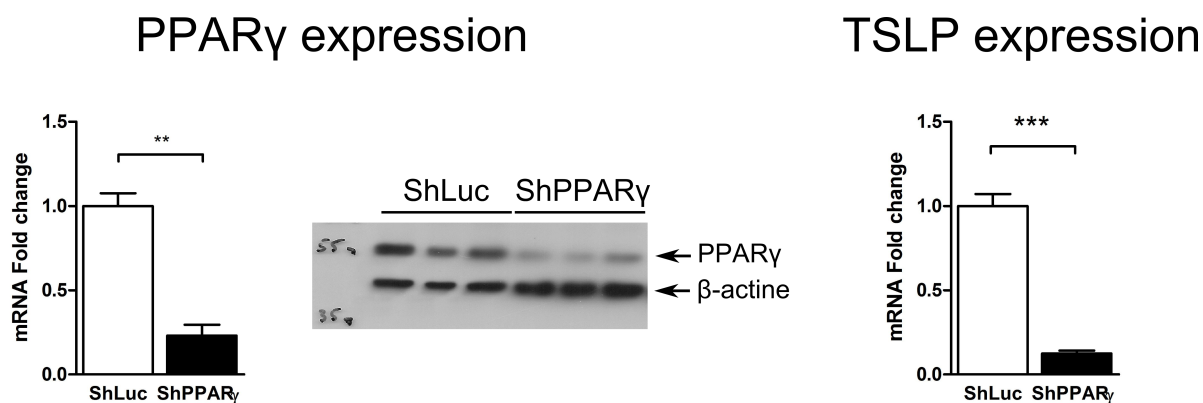
## Résultats

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

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

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

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



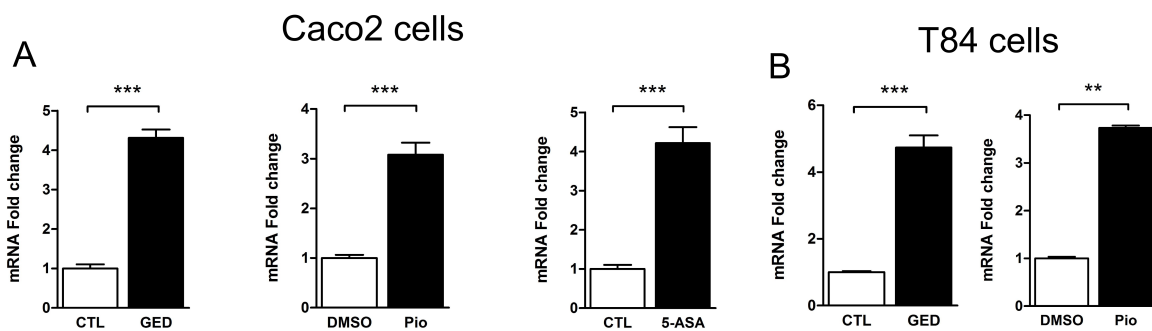
**Figure 18** : La diminution d'expression de PPAR $\gamma$  dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  est associée à une diminution d'expression de la TSLP. Expression de l'ARNm de la TSLP évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 ShLuc et Caco-2 ShPPAR $\gamma$ , somme de 5 expériences indépendantes (\*\*\*) :  $p < 0,0001$  ;  $n = 18$ ).

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

Afin d'établir le rôle de PPAR $\gamma$  dans la régulation de l'expression de la TSLP, 3 ligands agonistes de PPAR $\gamma$  ont été utilisés : la pioglitazone (10  $\mu$ M) (119), le 5-ASA (30 mM) (61) et le GED (30 mM) (63). Les cellules Caco-2 et T84 ont été stimulées 24 heures par un des agonistes.

Sur 3 expériences indépendantes, l'ensemble des agonistes de PPAR $\gamma$  induit une augmentation significative de l'expression de l'ARNm codant la TSLP dans les cellules Caco-2 ( $p < 0,001$  pour GED 30 mM, pioglitazone 10 $\mu$ M et 5-ASA 30 mM,  $n = 9-12$ ) (**Figure 19A**).

Une 2<sup>ème</sup> lignée de cellules épithéliales (T84) a été utilisée afin de confronter les résultats précédents. Tout comme pour les Caco-2, les agonistes de PPAR $\gamma$  induisent une augmentation significative de l'expression de l'ARNm codant la TSLP ( $p < 0,001$  pour GED 30mM,  $n = 12$  ;  $p < 0,01$  pour pioglitazone 10  $\mu$ M,  $n = 6$ ) (**Figure 19B**). Ces résultats proviennent de 2 expériences indépendantes.

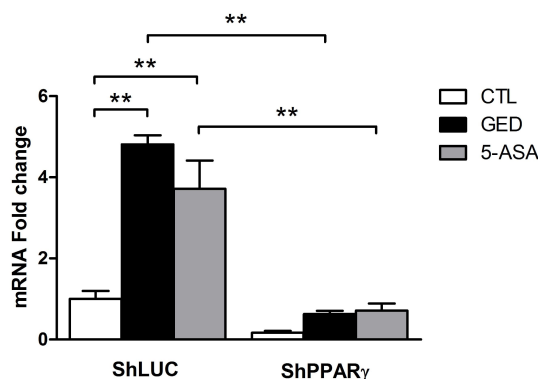


**Figure 19 : Les agonistes PPAR $\gamma$  augmentent l'expression du gène codant la TSLP dans les cellules Caco-2, T84** (A) Expression de l'ARNm codant la TSLP évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco2 en présence d'agonistes de PPAR $\gamma$  : GED 30 mM, pioglitazone 10  $\mu$ M (pio) et 5-ASA 30 mM (\*\*\*) :  $p < 0,001$  ; Mann Whitney ;  $n = 9-12$ ). (B) Expression de l'ARNm codant la TSLP évaluée par qRT-PCR dans les cellules T84 en présence d'agonistes de PPAR $\gamma$  : GED 30 mM et pioglitazone 10  $\mu$ M (\*\*\*) :  $p < 0,0001$ , \*\* :  $p < 0,01$  ; Mann Whitney ;  $n = 6-12$ ).

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

L'évaluation du niveau d'expression de l'ARNm de la TSLP sur les cellules Caco-2 ShLuc et Caco-2 ShPPAR $\gamma$  en présence des agonistes PPAR $\gamma$ , GED 30 mM et 5-ASA 30 mM, a été également réalisée. D'une part, l'expression de la TSLP est de nouveau significativement diminuée dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  en comparaison aux cellules Caco-2 ShLuc confirmant les résultats précédents. D'autre part, malgré le traitement des cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  par les agonistes PPAR $\gamma$ , le niveau d'expression de l'ARNm codant la TSLP n'atteint pas celui observé pour les cellules Caco-2 ShLuc stimulées par les agonistes PPAR $\gamma$  ( $p < 0,01$  pour GED 30 mM et 5-ASA 30 mM,  $n = 6$ ) (**Figure 20**). Ceci suggère que l'expression normale de PPAR $\gamma$  dans les cellules Caco-2 est indispensable à l'expression optimale de la TSLP.

Il faut noter cependant que l'action des agonistes PPAR $\gamma$  sur les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  augmentent l'expression de la TSLP de manière significative (statistiques non montrées). Ceci s'explique probablement par le fait que les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  expriment toujours une petite quantité de PPAR $\gamma$  (environ 30%), entraînant l'augmentation observée d'expression de l'ARNm codant la TSLP (**Figure 20**).



**Figure 20 : Les agonistes PPAR $\gamma$  augmentent l'expression du gène codant la TSLP dans les cellules Caco-2 ShLuc et Caco-2 ShPPAR $\gamma$ . Cependant, la présence d'agonistes de PPAR $\gamma$  au niveau des cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  ne permet pas d'atteindre les niveaux d'expression du gène codant la TSLP en comparaison aux cellules Caco-2 ShLuc. C) Expression de l'ARNm de la TSLP évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  en comparaison avec les Caco-2 ShLuc après stimulation par différents agonistes de PPAR $\gamma$  (GED 30 mM et 5-ASA 30 mM) (\*\* : p<0,01 ; Mann Whitney ; n=6).**

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

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

Les résultats précédents nous montrent clairement que le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  agit sur l'expression du gène codant la TSLP. Cependant, la littérature montre qu'il existe 2 isoformes de la TSLP (TSLP 1 et TSLP 2) (87,88). Il était donc intéressant de connaître quelle isoforme pouvait avoir son expression modifiée en présence des agonistes de PPAR $\gamma$  ou lors d'une diminution du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . Les deux isoformes ont été testées sur l'ensemble des expériences précédentes.

La première remarque est que la TSLP 1, l'isoforme longue, n'a jamais été détectée sur l'ensemble des expériences.

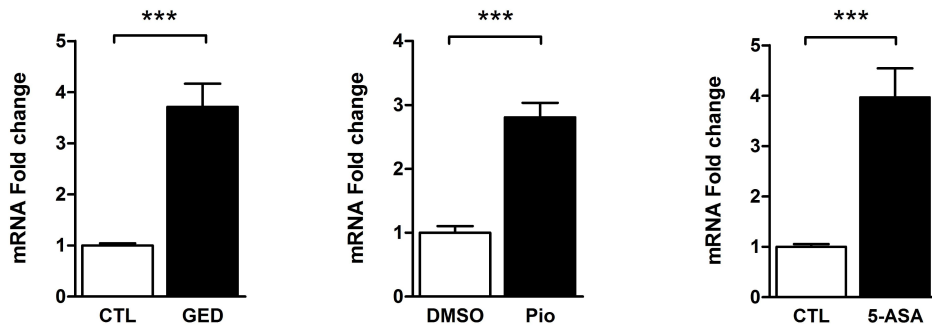
Seule l'isoforme courte de la TSLP est exprimée par les cellules épithéliales intestinales Caco-2 et T84. Son expression est significativement augmentée en présence des agonistes de PPAR $\gamma$ . (Caco-2 : p<0,001 pour GED 30 mM, pioglitazone 10 $\mu$ M et 5-ASA 30 mM, n=9-12 ; T84 : p<0,001 pour GED 30mM, n=12 et p<0,01 pour pioglitazone 10  $\mu$ M, n=6) (**Figure 21A et 21B**).

Au niveau des cellules Caco-2 ShLuc et ShPPAR $\gamma$ , les mêmes observations que pour la TSLP sont décrites, à savoir une diminution significative de l'expression du gène codant la TSLP 2 au niveau des cellules ShPPAR $\gamma$  par rapport aux cellules contrôles. Lorsque les Caco-2 ShPPAR $\gamma$  sont traitées avec les agonistes de PPAR $\gamma$ , une induction significative de l'expression du gène codant la TSLP 2 est observée sans jamais atteindre les niveaux d'expression de la TSLP 2 dans les cellules Caco-2 ShLuc (**Figure 21C**).



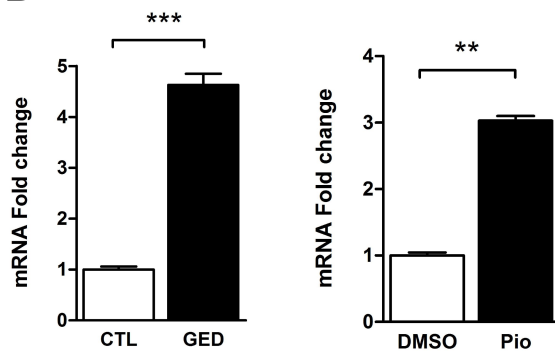
## Caco2 cells

A

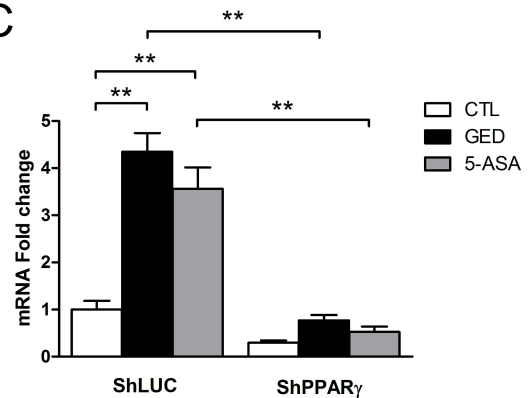


B

T84 cells



C

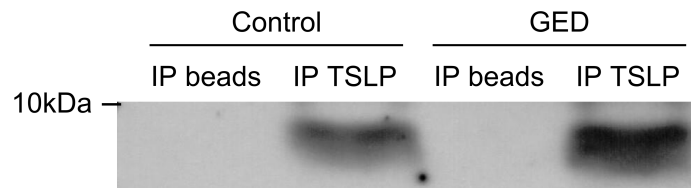


**Figure 21 : Les agonistes PPAR $\gamma$  augmentent uniquement l'expression du gène codant la TSLP 2 dans les cellules Caco-2, T84, Caco-2 ShLuc et Caco-2 ShPPAR $\gamma$ .** (A) Expression de l'ARNm codant la TSLP 2 évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 en présence d'agonistes de PPAR $\gamma$  : GED 30 mM, pioglitazone 10  $\mu$ M (pio) et 5-ASA 30 mM (\*\*\*:  $p < 0,001$  ; Mann Whitney ;  $n = 9-12$ ). (B) Expression de l'ARNm codant la TSLP 2 évaluée par qRT-PCR dans les cellules T84 en présence d'agonistes de PPAR $\gamma$  : GED 30 mM et pioglitazone 10  $\mu$ M (\*\*\*:  $p < 0,0001$ , \*\*:  $p < 0,01$  ; Mann Whitney ;  $n = 6-12$ ). (C) Expression de l'ARNm de la TSLP 2 évaluée par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  en comparaison avec les Caco-2 ShLuc après stimulation par différents agonistes de PPAR $\gamma$  (GED 30 mM et 5-ASA 30 mM) (\*\* :  $p < 0,01$  ; Mann Whitney ;  $n = 6$ ).

### B. Expression protéique de la TSLP 2

Pour confirmer les résultats obtenus par qRT-PCR, il est important de vérifier l'expression de la TSLP2 au niveau protéique sur les expériences précédentes. Le lysat cellulaire (1 millions de cellules par condition) a été analysé par Western Blot. La TSLP 2 n'a jamais été détectée. C'est pour cela qu'une autre technique a été envisagée en amont du western blot : l'immunoprécipitation des protéines. Cette technique a pour but de sélectionner et concentrer la protéine d'intérêt. Elle consiste à récupérer le lysat cellulaire d'un plus grand nombre de cellule (6 millions de cellules) et d'immunoprécipiter les protéines par un anticorps anti-TSLP. Ainsi, seule la TSLP (TSLP 2 plus particulièrement) est récupérée et analysée ensuite par Western Blot.

La TSLP 2 s'exprime dans les cellules Caco-2 contrôle et traitées par un agoniste de PPAR $\gamma$  (GED). La quantité de TSLP 2 est augmentée dans les cellules traitées par le GED en comparaison aux cellules contrôles (**Figure 22**).



**Figure 22 : Les agonistes PPAR $\gamma$  augmentent l'expression protéique de la TSLP 2 dans les cellules Caco-2.** Western blot d'échantillons protéiques provenant d'une immunoprécipitation avec un anticorps anti-TSLP (TSLP 2 : 7 kDa).

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

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

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

Une étude *in silico* a été effectuée dans un premier temps. Pour cela, 2 logiciels spécialisés (PPRE search et NUBIscan) ont été utilisés pour la recherche d'élément de réponse PPRE susceptible de fixer l'hétérodimère PPAR $\gamma$ -RXR. Cette étude est faite sur les 1000 premières paires de bases en amont du point d'initiation de la transcription. L'ensemble des résultats obtenus montre l'existence de 4 PPRES possibles au niveau du promoteur de la TSLP 2 (**Figure 23A**) : un DR1 situé sur la position -249 à -262, un DR2 situé sur la position -407 à -421 et enfin deux DR3 positionnés respectivement sur la position -443 à -458 et -770 à -785.

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

Différentes amorces ont été synthétisées pour mettre en évidence la fixation de l'hétérodimère PPAR $\gamma$ -RXR sur le promoteur de la TSLP 2. Ces différentes amorces d'oligonucléotides reconnaissent les zones où sont localisés les PPRES mis en évidence *in silico*. Les cellules ont été traitées par du GED 30mM pour observer son effet sur la fixation de PPAR $\gamma$ .

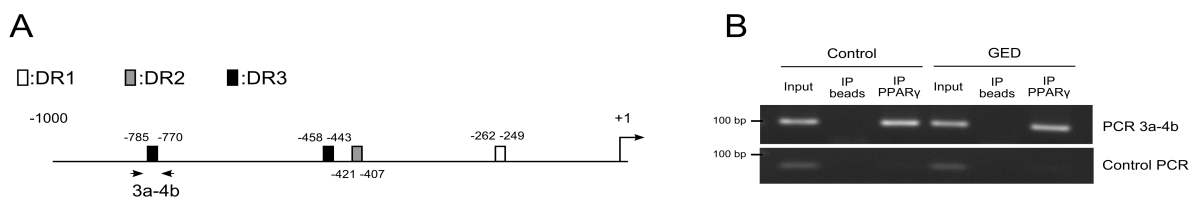
La technique d'immunoprécipitation de la chromatine (*ChIP*) a pour but de ne sélectionner uniquement que les fragments d'ADN où PPAR $\gamma$  s'est fixé. Pour cela, les fragments d'ADN sont mis en contact avec un anticorps anti-PPAR $\gamma$ . Ces fragments sont ensuite amplifiés par PCR avec les différentes amorces reconnaissant les zones au niveau du promoteur de la TSLP 2.

Les amorces 3a-4b, encadrant le DR3 le plus éloigné, sont les seules amorces à avoir donné des résultats. En effet, ces amorces ont permis d'amplifier

l'ADN de la zone où le DR3 est localisé, en condition contrôle et en condition traitée (**Figure 23B**). Ce qui signifie que l'ADN amplifié provient d'un fragment d'ADN sélectionné par l'immunoprécipitation et donc que PPAR $\gamma$  s'y fixe. Aucune différence n'est observée entre les 2 conditions (**Figure 23B**). L'hétérodimère PPAR $\gamma$ -RXR se fixe donc sur le promoteur de la TSLP 2 malgré l'absence de son agoniste.

Pour s'assurer que les bandes d'ADN visibles sur le gel sont bien des bandes spécifiques d'ADN où PPAR $\gamma$ -RXR se fixe, il est indispensable de faire un contrôle en utilisant des amorces qui peuvent amplifier une zone où PPAR $\gamma$ -RXR ne se fixe pas. Les amorces choisies sont celles amplifiant le gène codant la TSLP 2. Aucune bande n'apparaît lorsque ces amorces sont utilisées, ce qui confirme que les zones d'ADN où PPAR $\gamma$ -RXR ne se fixe pas, il n'y a aucune amplification.

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



**Figure 23 : (A) Représentation des mille premières paires de base en amont du point d'initiation à la transcription du gène codant la TSLP 2.** 4 éléments de réponses ont été mis en évidence par l'analyse *in silico*. **(B) PPAR $\gamma$  se fixe sur un élément de réponse du promoteur en amont du gène codant la TSLP 2 dans les cellules contrôles et les cellules traitées par GED 30 mM.** Mise en évidence de l'ADN amplifié par migration sur gel d'agarose 2%.

**C. La fixation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  sur le PPRE DR3 permet d'induire une augmentation significative de l'activité de la luciférase.**

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

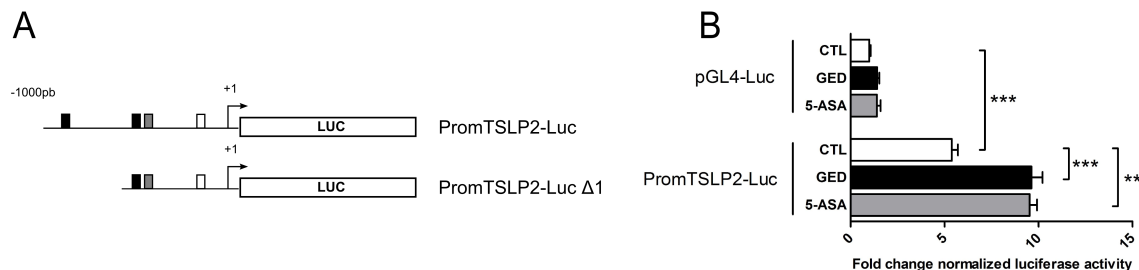
Dans un premier temps, un vecteur contenant la partie promotrice du gène de la TSLP 2, a été créé. Cette partie promotrice a été greffée en amont du gène codant la luciférase. Ce vecteur est nommé PromTSLP2-Luc (**Figure 24A**). Il a été transfecté dans des cellules Caco-2, qui ont été ensuite traitées par des agonistes de PPAR $\gamma$  (GED 30mM et 5-ASA 30 mM).

Une différence significative est observée entre les cellules transfectées par le vecteur contrôle (pGL4-Luc) et les cellules transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc ( $p < 0,001$ ,  $n = 15$ ). Il y a donc un élément présent sur la zone promotrice qui permet d'amplifier la transcription du gène codant la luciférase et ainsi augmenter son activité (**Figure 24B**).

Lorsque les cellules transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc sont traitées par un des agonistes de PPAR $\gamma$ , on retrouve également une augmentation

significative de l'activité de la luciférase (GED 30mM :  $p < 0,0001$ ,  $n = 9$  ; 5-ASA 30 mM :  $p < 0,01$ ,  $n = 6$ ). De plus, aucune différence sur l'activité de la luciférase n'est observée lorsque les cellules, transfectées par le vecteur contrôle, sont traitées par les agonistes de PPAR $\gamma$ .

L'hétérodimère PPAR $\gamma$ -RXR se fixe bien sur le promoteur de la TSLP 2 et la présence des agonistes de PPAR $\gamma$  permet d'amplifier l'activité de la luciférase.



**Figure 24 : (A) Représentation schématique des deux vecteurs lors des différentes transfections transitoires dans le cadre de l'étude du gène rapporteur. (B) Les cellules transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc présentent une activité significativement plus importante que les cellules transfectées par le vecteur pGL4-Luc. Résultat exprimé en fold change (\*\*\*) :  $p < 0,0001$  ; Mann Whitney ;  $n = 15$ ). Le traitement par les agonistes de PPAR $\gamma$  augmente significativement l'activité de la luciférase sur les cellules transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc (\*\*\*) :  $p < 0,0001$ , \*\* :  $p < 0,01$  ; Mann Whitney ;  $n = 6-9$ ).**

Un deuxième vecteur a été créé. Ce nouveau vecteur, appelé PromTSLP2-Luc Δ1, contient également le promoteur de la TSLP 2 à la seule différence que l'élément de réponse DR3 le plus éloigné du point d'initiation à la transcription a été enlevé (**Figure 24A**).

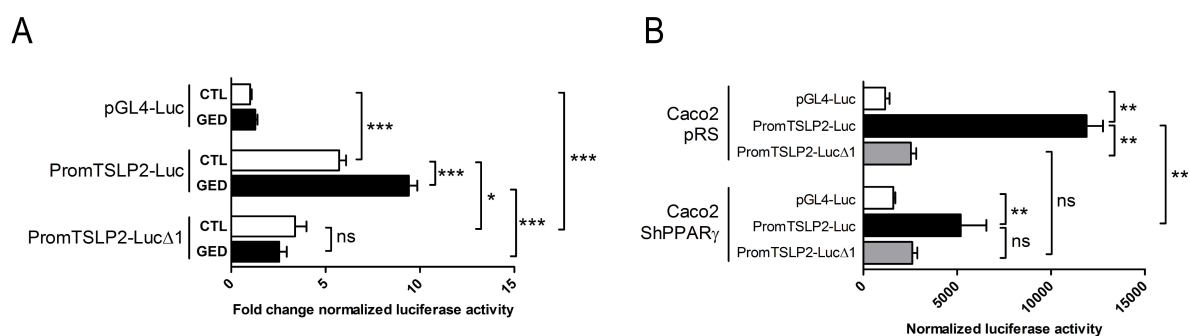
Les cellules ayant été transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc Δ1 ont une activité de la luciférase significativement supérieure par rapport aux cellules contrôles transfectées par le vecteur pGL4-Luc ( $p < 0,0001$ ,  $n = 12$ ). Cependant son activité est significativement plus faible que pour les cellules transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc ( $p < 0,05$ ,  $n = 14$ ) (**Figure 25A**). Il existe donc, au niveau du promoteur de la TSLP 2, plusieurs mécanismes permettant d'augmenter l'activité de la luciférase. Cependant, le fait d'enlever l'élément de réponse DR3, provoque une diminution importante de cette activité.

Ces cellules ont été également traitées par du GED 30 mM. Aucune augmentation de l'activité luciférase n'est observée sur les cellules transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc Δ1 lorsqu'elles sont traitées par le GED (**Figure 25A**). La disparition de l'élément de réponse DR3 dans le vecteur PromTSLP2-Luc Δ1 va empêcher la fixation du PPAR $\gamma$ -RXR sur le promoteur de la TSLP 2 et donc l'augmentation de l'activité de la luciférase. La présence DR3 est indispensable pour obtenir une augmentation de l'activité de la luciférase lorsque les cellules sont traitées par les agonistes de PPAR $\gamma$ .

Pour confirmer les résultats précédents, une nouvelle expérience a été effectuée. Elle consistait à observer l'activité de la luciférase sur des cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  transfectées par les 2 vecteurs (PromTSLP2-Luc et PromTSLP2-Luc Δ1). Elles ont été comparées à des cellules contrôles appelées Caco-2 pRS.

L'activité de la luciférase est significativement augmentée au niveau des cellules Caco-2 transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc par rapport aux cellules contrôles transfectées par le vecteur pGL4-Luc et aux cellules Caco-2 transfectées avec le vecteur PromTSLP2-Luc  $\Delta 1$  ( $p < 0,01$ ,  $n = 6$ ). Ces résultats confirment donc les précédents résultats entre les 2 vecteurs et l'importance d'avoir le dernier DR3 de la zone promotrice du gène codant la TSLP 2 (**Figure 25B**).

Au niveau des cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$ , les cellules transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc présentent une activité de la luciférase significativement diminuée par rapport aux cellules Caco-2 pRS transfectées par le même vecteur ( $p < 0,01$ ,  $n = 6$ ). La diminution du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  dans les cellules impactent donc l'activité de la luciférase (**Figure 25B**). En revanche, l'absence du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  ne perturbe pas l'activité de la luciférase pour les cellules ayant été transfectées avec le vecteur PromTSLP2-Luc  $\Delta 1$ .



**Figure 25 :** (A) Les cellules transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc $\Delta 1$  ont une activité de la luciférase significativement plus faible que les cellules transfectées par le vecteur PromTSLP2-Luc et les agonistes de PPAR $\gamma$  n'ont pas d'effet sur l'activité de la luciférase. Résultat exprimé en fold change (\* :  $p < 0,05$ , \*\*\* :  $p < 0,0001$  ; Mann Whitney ;  $n = 12-14$ ). (B) L'absence de PPAR $\gamma$  influence l'activité de la luciférase au niveau des cellules Caco-2 ShPPAR $\gamma$  (\*\* :  $p < 0,01$  ; Mann Whitney ;  $n = 6$ ).

Tous ces résultats montrent clairement que le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  avec RXR se fixe sur l'élément de réponse DR3 et qu'ils permettent d'induire l'expression de la luciférase et ainsi augmenter significativement l'activité de la luciférase.

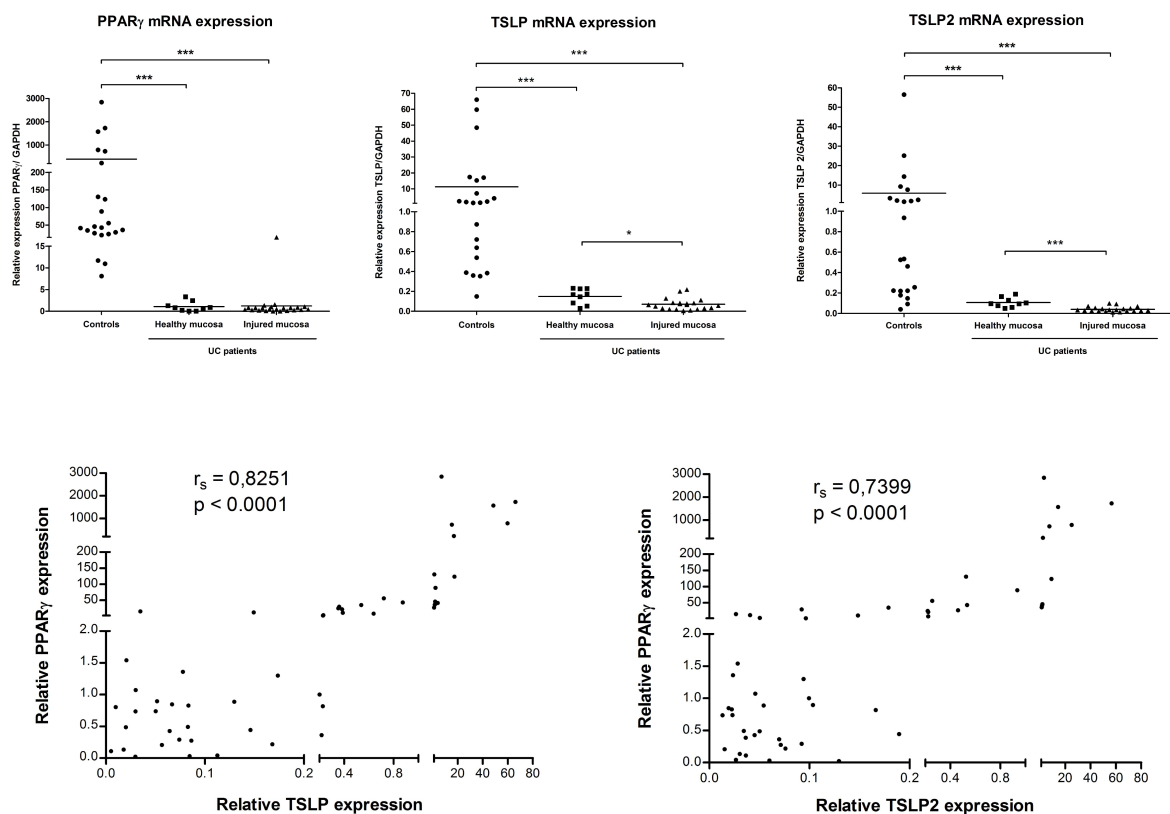
#### **IV. La diminution de l'expression du gène codant la TSLP est corrélée à une diminution de l'expression du gène codant PPAR $\gamma$ dans les muqueuses saines et lésées de patients atteints de RCH.**

Pour conclure sur l'hypothèse d'un lien entre PPAR $\gamma$  et l'expression de l'ARNm codant la TSLP 2, cette expression a été évaluée dans le côlon de patients contrôles (opérés pour une diverticulite) et des patients atteints de RCH. Pour rappel, les CEI de patients atteints de RCH ont un déficit d'expression de PPAR $\gamma$  par rapport aux CEI des patients contrôles (67) (**figure 26**). L'hypothèse testée est donc la suivante : ce déficit peut-il avoir un impact sur l'expression de la TSLP et plus particulièrement la TSLP 2 chez les patients atteints de RCH ? L'expression de la TSLP et de la TSLP 2 a tout d'abord été testée sur des CEI extraites de pièces

opératoires de côlons de patients contrôles et atteints de RCH. Aucune expression de la TSLP ou TSLP 2 n'a pu être mesurée à partir de ces extraits, aussi bien pour les patients contrôles que les patients atteints de RCH. Les essais se sont donc portés sur des prélèvements de muqueuses entières de côlon.

Le déficit de PPAR $\gamma$  est retrouvé au niveau des muqueuses inflammatoires des patients atteints de RCH (**Figure 26**). Il existe une diminution significative de l'expression de l'ARNm codant la TSLP et la TSLP 2 entre les muqueuses de patients contrôles et les muqueuses saines et lésées des patients atteints de RCH ( $p < 0,0001$ , Mann Withney, muqueuses patients témoins :  $n=18$ , muqueuses saines patients RCH :  $n=9$ , muqueuses lésées patients RCH :  $n=21$ ) (**Figure 26**). Cette diminution est corrélée avec la diminution d'expression de PPAR $\gamma$  observée (TSLP :  $p < 0,0001$  et  $r = 0,7345$  ; TSLP 2 :  $p < 0,0001$  et  $r = 0,6024$ ) (**Figure 26**).

Ces résultats suggèrent que le défaut d'expression de la TSLP chez les patients atteints de RCH pourrait être lié au défaut d'expression de PPAR $\gamma$ .



**Figure 26 : Une diminution de l'expression de la TSLP et de la TSLP 2 est observée dans les muqueuses saines et lésées de patients atteint de RCH. Ces diminutions sont corrélées avec la diminution de l'expression du gène codant PPAR $\gamma$ . Expression de l'ARNm de PPAR $\gamma$ , de la TSLP et de la TSLP 2 évaluées par qRT-PCR au niveau des muqueuses saines ( $n=9$ ) et lésées ( $n=21$ ) des patients RCH en comparaison avec des muqueuses de patients atteints de diverticulite (patients contrôles,  $n=18$ ) (\* :  $p < 0,05$ , \*\*\* :  $p < 0,0001$  ; Mann Whitney).**

## Discussion

L'ensemble du travail effectué durant ce projet montre pour la toute première fois un lien entre le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  et l'expression de la cytokine TSLP 2 au niveau de la cellule épithéliale colique. Les résultats convergent vers une régulation de l'expression de la TSLP 2 par le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ .

Suite aux premiers résultats obtenus entre la TSLP et PPAR $\gamma$ , la question d'identifier l'isoforme de la TSLP pouvant être dépendante de ce récepteur nucléaire, s'est posée. Parallèlement aux travaux Guilia Fornasa, notre étude a mis en évidence la présence d'une seule isoforme présente à l'état physiologique au niveau des cellules épithéliales intestinales : la TSLP 2 (88). Ces résultats *in vitro* ont été soutenus par les résultats obtenus sur les échantillons de patients contrôles. L'isoforme de la TSLP 1 n'a pas été détectée que ce soit sur les cultures cellulaires *in vitro* comme sur les échantillons de patients contrôles ou atteints de RCH. La TSLP 1 n'est pas exprimée de façon constitutive et serait surexprimée dans des conditions inflammatoires (88). Ceci explique donc son absence sur les différentes expériences *in vitro* effectuées. Une mauvaise qualité des amorces utilisées, pour amplifier le gène codant la TSLP 1 lors de la PCR, pourrait expliquer l'absence d'expression sur nos différentes expériences. Cependant, les oligonucléotides ont été testés sur un autre type cellulaire (cellules H292 : cellules épithéliales bronchiques) et une expression de la TSLP 1 a été mise en évidence lorsque ces cellules étaient stimulées par du poly (I:C), ARN (acide ribonucléique) double brin semblable à certains ARN double brin viraux.

Le modèle murin a permis de confirmer de nombreuses hypothèses concernant la TSLP, sa régulation et son côté délétère lors des inflammations sur les dermatites atopiques et l'inflammation pulmonaire (120). Cependant, il n'existe pas d'isoforme longue et courte dans ce modèle animal. Différentes expériences (*ex vivo* et *in vivo*) ont été, malgré tout, entreprises chez le modèle murin. Durant nos expériences, les colons de souris ont été mis en contact direct avec différents agonistes (5-ASA 30mg/kg *in vivo* et GED 30 mM *ex vivo*) de PPAR $\gamma$ . L'ensemble des résultats sur les souris est en accord avec ceux de cette thèse. En présence des agonistes de PPAR $\gamma$ , l'expression du gène codant la TSLP murine est significativement augmentée. Ces résultats n'ont cependant pas été intégrés à la thèse. En effet, du fait de l'absence d'isoforme 1 et 2 et qu'il existe que 43% d'homologie entre la TSLP murine et la TSLP humaine, il est difficile de conclure sur le véritable effet des agonistes de PPAR $\gamma$  sur la TSLP murine. Toutefois, il est possible de continuer cette recherche chez la souris. Il faudrait pour cela effectuer une comparaison d'expression de la TSLP des muqueuses et des CEI de colon de souris témoins avec des souris PPAR $\gamma^{\Delta IEC}$  (souris génétiquement modifiées par la technique *Cre-Lox*) n'exprimant plus le gène PPAR $\gamma$  spécifiquement au niveau des CEI (121).

Ce projet apporte un élément nouveau concernant la régulation de la TSLP 2 au niveau des CEI. Nos résultats montrent que le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  se fixe

en amont du gène codant la TSLP 2. PPAR $\gamma$  est présent sur la zone promotrice même en l'absence d'agoniste chimique de PPAR $\gamma$  (résultats *ChIP*). Ceci peut s'expliquer par la présence d'agonistes naturelles dans les cellules. L'étude du gène rapporteur par transfection transitoire permet de conclure que l'ajout d'agoniste de PPAR $\gamma$  permet d'avoir une réponse amplifiée sur l'induction du gène. Un défaut de PPAR $\gamma$  amène à une importante diminution d'expression de la TSLP 2. Les précédentes recherches autour de la régulation de la TSLP ont mis en évidence les actions de différents facteurs de transcriptions comme NF-kB ou encore AP-1 mais également des récepteurs nucléaires RXR, RAR ou VDR (92,96,97,100). Pour ces derniers (RXR, RAR et VDR), leurs actions ont été étudiées uniquement sur les cellules épithéliales pulmonaires et sur les kératinocytes. Les CEI exprimant ces récepteurs, il serait intéressant de tester leur influence sur l'expression de la TSLP 2.

Le rôle exact de la TSLP 2 n'est pas clairement élucidé dans la littérature. Si d'une part son côté tolérogène est mis en avant via une action sur les cellules dendritiques au niveau des muqueuses intestinales, Bjerkan et *al.* suggèrent une action différente avec la possibilité que la TSLP 2 présente les caractéristiques d'un peptide anti-microbien au niveau des kératinocytes. Cela implique que les cellules épithéliales ne sécrètent pas la TSLP 2 de la même façon. En effet, pour une action sur les cellules dendritiques, les cellules sécrètent les cytokines vers la muqueuse intestinale donc c'est une sécrétion au niveau du pôle basal de la cellule, alors qu'une action anti-microbienne, aurait une libération au niveau du pôle apical de la cellule. Il reste donc beaucoup de zones d'ombre sur son véritable rôle. Une technique de culture sur des filtres Transwell® permettrait de répondre à cette question. Cette culture permet de produire un environnement proche de l'état *in vivo* via une alimentation basolatérale des cellules polarisées et par conséquent une activité métabolique plus naturelle (Annexe 2). La culture des cellules Caco-2 et/ou T84 sur filtre semi-perméable permet d'avoir une sécrétion polarisée des protéines et de délimiter deux compartiments, l'un au pôle apical correspondant à la lumière intestinale, l'autre au pôle basolatéral représentant le milieu lymphatique/plasmatique. Ce système permet de mimer la situation "*in vivo*" et de mesurer la sécrétion de la TSLP 2 au niveau apical et au niveau basal. L'évaluation de la TSLP 2 se ferait par WB après une immunoprécipitation des protéines des surnageants. Une étude de l'activité anti-microbienne pourra également être envisagée avec une TSLP 2 recombinée sur des bouillons ou cultures de bactéries intestinales.

Actuellement, peu de données sont disponibles sur le lien entre l'expression de la TSLP et son implication dans le mécanisme des MICI. Les premiers résultats ont été obtenus par Rimoldi et *al.* (29) et ont montré une diminution de l'expression de la TSLP dans les CEI de patients atteints de maladie de Crohn. Bien qu'obtenus avec très peu de patients et sans analyse statistique, ces résultats étaient les premiers à suggérer qu'une perte d'expression de la TSLP au niveau intestinal pouvait être associée à un déficit de contrôle de l'immunité intestinale et au développement d'une inflammation chronique. L'hypothèse démontrée par les auteurs est que la TSLP est un acteur essentiel du dialogue entre les CEI et les DC



de la *lamina propria*. Au travers de ses capacités de polarisation des DC, cette cytokine permet la différenciation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs, indispensables au maintien de l'homéostasie intestinale. Son absence perturberait cet équilibre et participerait au développement d'une inflammation chronique. Les résultats obtenus au cours de ce travail s'appuient et renforcent cette hypothèse par la mise en évidence du lien entre PPAR $\gamma$  et la TSLP 2 dans nos lignées de CEI humaines. La question qui s'est naturellement posée est : existe-t-il une diminution d'expression de la TSLP 2 chez les patients atteints de RCH, pour lesquels le défaut de PPAR $\gamma$  dans les CEI est une caractéristique ?

Chez les patients atteints de RCH, Fornasa *et al.* mettent en évidence le rôle anti-inflammatoire de la TSLP 2 au niveau des CEI du colon. Cependant, au cours de la RCH, elle ne trouve pas de différence d'expression de la TSLP 2 entre les patients contrôles et les patients atteints de RCH. La différence se voit en revanche au niveau de la TSLP 1 qui est très fortement augmentée au cours de la RCH (88).

Dans nos conditions expérimentales, aucune expression de la TSLP n'a pu être mesurée à partir de CEI extraites de pièces opératoires de patients contrôles ou RCH. Le protocole d'extraction ne semble pas mis en cause car ces cellules ont pu être utilisées pour mesurer l'expression de certains gènes dans d'autres projets menés au laboratoire. La qualité de la pièce opératoire utilisée (% de zone lésée) est très certainement un facteur important afin de pouvoir mesurer l'expression d'une cytokine qui reste tout de même faiblement exprimée. De nouvelles extractions sont envisagées en étant particulièrement vigilant sur les zones de pièces opératoires utilisées pour l'extraction. Les résultats d'expression obtenus à partir de fragments de muqueuses coliques sont quant à eux nettement plus concluants. En effet, ils montrent clairement une diminution significative de l'expression de la TSLP dans la muqueuse colique inflammée de patients atteints de RCH. De manière plus intéressante, ces mêmes résultats montrent que la diminution d'expression de la TSLP chez les patients RCH est également présente en territoire non inflammatoire, suggérant qu'il pourrait s'agir d'un mécanisme primitif de la pathologie. Cette observation renforce le lien entre PPAR $\gamma$  et la TSLP dans l'intestin et l'hypothèse que la perte d'homéostasie est un facteur étiologique chez les patients atteints de MICI. Elle corrobore également les résultats obtenus par Noble *et al.* (114).

Les MICI restent des maladies inflammatoires encore mal comprises. En effet, leur physiopathologie est encore loin d'être entièrement élucidée. La recherche fondamentale autour de ces maladies reste très importante pour mieux comprendre leurs physiopathologies. De cette recherche, il sera possible pour les laboratoires de trouver de nouvelles molécules/traitements curatifs à ces maladies. Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  fait partie de ces cibles thérapeutiques étudiées. En effet, le 5-ASA, cible de PPAR $\gamma$ , est le traitement de référence. L'un des principaux avantages du 5-ASA est qu'il ne pénètre pas la barrière intestinale. L'action reste donc locale et les effets indésirables sur le reste de l'organisme sont absents. Malheureusement, ce n'est pas le cas pour les molécules de la famille des thiazolidinediones. Malgré des études combinant le 5-ASA et la rosiglitazone ayant montré certes de meilleurs résultats en comparaison à un traitement 5-ASA seul et sans effets indésirables, les glitazones peuvent pénétrer la barrière intestinale et provoquer très probablement à

long temps les mêmes effets indésirables déjà répertoriés (75). C'est dans ce contexte que les laboratoires de recherche, dont celui du Professeur Philippe Chavatte, tentent de créer de nouvelles molécules pouvant avoir une meilleure efficacité que le 5-ASA, tout en évitant les effets indésirables systémiques. Le GED-0507-34-levo fait partie de ces molécules. Les premiers résultats montrent une meilleure activité que le 5-ASA avec un franchissement de la barrière intestinale mais qui reste faible pour provoquer des effets indésirables systémiques. Cette molécule est actuellement en phase 3 pour le traitement de la RCH.

Selon le contexte cellulaire ou les gènes ciblés, certains agonistes n'agissent pas. Le terme « SPPARMs » (*selective PPAR $\gamma$  modulators*) peut expliquer cet effet (53). Pour illustrer ce terme succinctement, la liaison du ligand PPAR $\gamma$  au domaine ligand du récepteur va tout d'abord dépendre de sa structure chimique. Une fois lié au récepteur, il en résulte une modification conformationnelle de PPAR $\gamma$  et une différence d'interaction avec ses cofacteurs et ses corépresseurs. Ces derniers sont, eux-mêmes, de nature et de concentration variables selon le contexte cellulaire. C'est pour cela, que l'action de deux agonistes de PPAR $\gamma$  peut induire une différence transcriptionnelle des gènes cibles dans un même type cellulaire (62). De plus, un même agoniste de PPAR $\gamma$  pourra induire fortement l'expression sur un type cellulaire donné et ne rien induire sur un second type cellulaire. Les SPPARMs peuvent ouvrir d'importantes perspectives thérapeutiques. Le choix de SPPARMs permettrait ainsi d'avoir une meilleure activité mais également une réponse ciblée sur un type cellulaire/un organe voulu, tout en minimisant les effets non désirés sur d'autres parties de l'organisme.

L'intérêt de PPAR $\gamma$  comme cible thérapeutique va bien au-delà d'un traitement contre la RCH. En effet, les agonistes de PPAR $\gamma$  peuvent également avoir un avenir contre d'autres pathologies et en particulier les cancers. En effet, le risque majeur de complication chez les patients atteints de RCH est le développement d'un cancer colorectal. Ce risque est de 2,5% entre 9 et 15 ans et atteint 21,4% au-delà de 15 ans d'évolution (8). Alors que de nombreuses données suggèrent que PPAR $\gamma$  possède des propriétés anti-prolifératives et suppressives de tumeurs (122), le rôle que pourrait jouer le défaut d'expression de ce récepteur sur cette évolution chez les patients RCH n'est pas clairement établi ou reconnu. Il a été démontré que la survie de patients atteints de cancer colorectal était améliorée si l'expression de PPAR $\gamma$  était détectable au niveau des cellules cancéreuses (123). Dans le même sens, il a été montré qu'une déficience de PPAR $\gamma$  spécifiquement au niveau de l'intestin augmentait le risque de cancérogenèse dans un modèle murin (124). L'utilisation d'agoniste de PPAR $\gamma$  préviendrait de la survenue de cancer colorectal dans différents essais cliniques (125). Parmi ces agonistes, le 5-ASA (61), traitement de première intention pour les patients atteints de RCH, posséderait un effet bénéfique et protecteur sur la survenue du cancer colorectal (125,126). De plus, le laboratoire a notamment montré, *in vitro* et dans un modèle murin, que l'effet anti-néoplasique du 5-ASA est dépendant de l'activation de PPAR $\gamma$  (127). Très récemment, l'activation de ce récepteur par la pioglitazone en association avec l'imatinib (Glivec<sup>®</sup>) a également permis d'obtenir des résultats spectaculaires sur la rémission de la leucémie

myéloïde chronique (128,129). Il y a donc un véritable intérêt de comprendre le rôle exact de PPAR $\gamma$  et les perspectives d'avenir de traitement anti-cancéreux.

Un traitement par la TSLP 2 n'est clairement pas envisageable pour un retour à l'homéostasie intestinale. Les MICI sont l'ensemble d'une multitude de dérèglements qui vont aboutir à la perte de la tolérance intestinale. L'étiologie de la RCH n'est pas due uniquement à une diminution d'expression de la TSLP 2. L'inflammation observée dans les zones malades est une résultante de la diminution de la TSLP 2 dans cette zone, mais ce n'est pas l'unique cause. Le projet montre bien que le défaut d'expression de PPAR $\gamma$  dans ces zones inflammatoires peut induire la diminution de certaines cytokines, facteurs responsables de l'homéostasie intestinale. De nombreuses questions restent encore en suspens. Par exemple, le laboratoire a tenté de connaître la raison de la baisse du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . Il a ainsi montré que l'expression du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  est également dépendant d'un autre récepteur nucléaire : LRH-1 (Liver Receptor Homolog 1) (130).

Actuellement, il n'existe aucun traitement commercialisé autour de la TSLP. Il y a cependant de nombreuses études pour rechercher des thérapeutiques. Cependant ces recherches se focalisent sur l'isoforme 1 de la TSLP même si sur les études, la différence entre les 2 isoformes n'est pas faite. Ils cherchent à empêcher la liaison de la TSLP à son récepteur et ainsi inhiber/ralentir l'apparition d'une réaction inflammatoire exagérée en cas d'asthme. L'étude de Gauveau et *al.* reste la plus intéressante en terme d'avancée thérapeutique. Dans une étude en double aveugle, ils ont montré que l'injection durant 5 à 12 semaines d'un anticorps monoclonal humanisé (AMG 157) dirigé contre la TSLP permet de réduire de façon significative la réponse précoce et tardive de l'asthme par l'induction d'un allergène (131).

## Bibliographie

1. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1785–94.
2. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2009 Nov 19;361(21):2066–78.
3. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012 Nov 1;491(7422):119–24.
4. Recto-coliteHemorragique-FRfrPub34v01-2.pdf.
5. To N, Ford AC, Gracie DJ. Systematic review with meta-analysis: the effect of tobacco smoking on the natural history of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016 Jul;44(2):117–26.
6. Seksik P, Landman C. Understanding Microbiome Data: A Primer for Clinicians. *Dig Dis*. 2015 Sep 14;33 Suppl 1:11–6.
7. Smith EJ, Thompson AP, O'Driscoll A, Clarke DJ. Pathogenesis of adherent-invasive *Escherichia coli*. *Future Microbiol*. 2013 Oct;8(10):1289–300.
8. Nowacki TM, Brückner M, Eveslage M, Tepasse P, Pott F, Thoennissen NH, et al. The risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 2015 Feb;60(2):492–501.
9. Kyriakidi KS, Tsianos VE, Karvounis E, Christodoulou DK, Katsanos KH, Tsianos EV. Neutrophil anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody proteins: bactericidal increasing protein, lactoferrin, cathepsin, and elastase as serological markers of inflammatory bowel and other diseases. *Ann Gastroenterol*. 2016 Sep;29(3):258–67.
10. Pineton de Chambrun G, Peyrin-Biroulet L, Lémann M, Colombel J-F. Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 Jan;7(1):15–29.
11. guide\_medecin\_rch\_web.pdf.
12. Ben-Horin S. Loss of response to anti-tumor necrosis factors: what is the next step? *Dig Dis*. 2014;32(4):384–8.
13. Ungar B, Chowers Y, Yavzori M, Picard O, Fudim E, Har-Noy O, et al. The temporal evolution of antidrug antibodies in patients with inflammatory bowel disease treated with infliximab. *Gut*. 2014 Aug;63(8):1258–64.
14. Ungar B, Kopylov U. Advances in the development of new biologics in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol*. 2016 Sep;29(3):243–8.
15. Lam MC, Bressler B. Vedolizumab for ulcerative colitis and Crohn's disease: results and implications of GEMINI studies. *Immunotherapy*. 2014;6(9):963–71.
16. Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, Vranic I, Su C, Rousell S, et al. Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2012 Aug 16;367(7):616–24.
17. Danese S, Colombel J-F, Peyrin-Biroulet L, Rutgeerts P, Reinisch W. Review article: the role of anti-TNF in the management of ulcerative colitis -- past, present and future. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013 May;37(9):855–66.
18. Mège D, Figueiredo MN, Manceau G, Maggiori L, Bouhnik Y, Panis Y. Three-stage Laparoscopic Ileal Pouch-anal Anastomosis Is the Best Approach for High-risk Patients with Inflammatory Bowel Disease: An Analysis of 185 Consecutive Patients. *J Crohns Colitis*. 2016 Feb 13;
19. Marion-Letellier R, Savoye G, Ghosh S. IBD: In Food We Trust. *J Crohns Colitis*. 2016 May 17;
20. Khoruts A, Sadowsky MJ. Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 Sep;13(9):508–16.
21. Pigneur B, Sokol H. Fecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease: the quest for the holy grail. *Mucosal Immunol*. 2016 Jul 27;
22. Shi Y, Dong Y, Huang W, Zhu D, Mao H, Su P. Fecal Microbiota Transplantation for Ulcerative Colitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2016;11(6):e0157259.
23. Laszlo M, Ciobanu L, Andreica V, Pascu O. Fecal transplantation indications in ulcerative colitis. Preliminary study. *Clujul Med*. 2016;89(2):224–8.

24. guide\_patient\_rch\_ald24\_1dec.pdf.
25. Goto Y, Ivanov II. Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk. *Immunol Cell Biol.* 2013 Mar;91(3):204–14.
26. Lavelle EC, Murphy C, O'Neill LAJ, Creagh EM. The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunol.* 2010 Jan;3(1):17–28.
27. Ren H, Musch MW, Kojima K, Boone D, Ma A, Chang EB. Short-chain fatty acids induce intestinal epithelial heat shock protein 25 expression in rats and IEC 18 cells. *Gastroenterology.* 2001 Sep;121(3):631–9.
28. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol.* 2003 Apr;3(4):331–41.
29. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol.* 2005 May;6(5):507–14.
30. Rimoldi M, Chieppa M, Larghi P, Vulcano M, Allavena P, Rescigno M. Monocyte-derived dendritic cells activated by bacteria or by bacteria-stimulated epithelial cells are functionally different. *Blood.* 2005 Oct 15;106(8):2818–26.
31. Iliev ID, Spadoni I, Mileti E, Matteoli G, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut.* 2009 Nov;58(11):1481–9.
32. Iliev ID, Mileti E, Matteoli G, Chieppa M, Rescigno M. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunol.* 2009 Jul;2(4):340–50.
33. Michalik L, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol.* 1999 Dec;10(6):564–70.
34. Laudet V, Gronemeyer H. *The Nuclear Receptor FactsBook.* Gulf Professional Publishing; 2001. 481 p.
35. Jin L, Li Y. Structural and functional insights into nuclear receptor signaling. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010 Oct 30;62(13):1218–26.
36. Sladek FM. Nuclear receptors as drug targets: new developments in coregulators, orphan receptors and major therapeutic areas. *Expert Opin Ther Targets.* 2003 Oct;7(5):679–84.
37. Greschik H, Moras D. Structure-activity relationship of nuclear receptor-ligand interactions. *Curr Top Med Chem.* 2003;3(14):1573–99.
38. Usuda D, Kanda T. Peroxisome proliferator-activated receptors for hypertension. *World J Cardiol.* 2014 Aug 26;6(8):744–54.
39. Bertin B, Dubuquoy L, Colombel J-F, Desreumaux P. PPAR-gamma in ulcerative colitis: a novel target for intervention. *Curr Drug Targets.* 2013 Nov;14(12):1501–7.
40. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:289–312.
41. Clark RB, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula SJ. The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol.* 2000 Feb 1;164(3):1364–71.
42. Padilla J, Leung E, Phipps RP. Human B lymphocytes and B lymphomas express PPAR-gamma and are killed by PPAR-gamma agonists. *Clin Immunol.* 2002 Apr;103(1):22–33.
43. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Jun 23;95(13):7614–9.
44. Gosset P, Charbonnier AS, Delerive P, Fontaine J, Staels B, Pestel J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2001 Oct;31(10):2857–65.
45. Welch JS, Ricote M, Akiyama TE, Gonzalez FJ, Glass CK. PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 May 27;100(11):6712–7.
46. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature.* 2007 Jun 28;447(7148):1116–20.

47. Ramon S, Bancos S, Thatcher TH, Murant TI, Moshkani S, Sahler JM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  B cell-specific-deficient mice have an impaired antibody response. *J Immunol*. 2012 Nov 15;189(10):4740–7.
48. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):79–82.
49. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):82–6.
50. Bull AW, Steffensen KR, Leers J, Rafter JJ. Activation of PPAR gamma in colon tumor cell lines by oxidized metabolites of linoleic acid, endogenous ligands for PPAR gamma. *Carcinogenesis*. 2003 Nov;24(11):1717–22.
51. Itoh T, Fairall L, Amin K, Inaba Y, Szanto A, Balint BL, et al. Structural basis for the activation of PPARgamma by oxidized fatty acids. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Sep;15(9):924–31.
52. Hihi AK, Michalik L, Wahli W. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci*. 2002 May;59(5):790–8.
53. Higgins LS, Depaoli AM. Selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) modulation as a strategy for safer therapeutic PPARgamma activation. *Am J Clin Nutr*. 2010 Jan;91(1):267S – 272S.
54. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*. 1995 Jun 2;270(22):12953–6.
55. Cariou B, Charbonnel B, Staels B. Thiazolidinediones and PPAR $\gamma$  agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab*. 2012 May;23(5):205–15.
56. Dong Y, Wang A. Pioglitazone does not increase the risk of type II diabetes in patients with bladder cancer: A retrospective study. *Oncol Lett*. 2016 Jul;12(1):89–92.
57. Korhonen P, Heintjes EM, Williams R, Hoti F, Christopher S, Majak M, et al. Pioglitazone use and risk of bladder cancer in patients with type 2 diabetes: retrospective cohort study using datasets from four European countries. *BMJ*. 2016;354:i3903.
58. Shiojiri T, Wada K, Nakajima A, Katayama K, Shibuya A, Kudo C, et al. PPAR gamma ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice. *Eur J Pharmacol*. 2002 Jul 19;448(2-3):231–8.
59. Koufany M, Moulin D, Bianchi A, Muresan M, Sebillaud S, Netter P, et al. Anti-inflammatory effect of antidiabetic thiazolidinediones prevents bone resorption rather than cartilage changes in experimental polyarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(1):R6.
60. Lewis JD, Lichtenstein GR, Deren JJ, Sands BE, Hanauer SB, Katz JA, et al. Rosiglitazone for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2008 Mar;134(3):688–95.
61. Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, Lefebvre P, Romano O, Auwerx J, et al. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Exp Med*. 2005 Apr 18;201(8):1205–15.
62. Pirat C, Farce A, Lebègue N, Renault N, Furman C, Millet R, et al. Targeting peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): development of modulators. *J Med Chem*. 2012 May 10;55(9):4027–61.
63. Rousseaux C, Dubuquoy C, El-Jamal N, Speca S, Bellinvia S, Viti F, et al. Preclinical Evaluation of Intestinal Anti-Inflammatory/Analgesic Properties and Phase I Clinical Trial of a New PPAR Agonist Ged-0507-34-Levo. *Gastroenterology*. 2011;140(5):S – 515.
64. Su W, Bush CR, Necela BM, Calcagno SR, Murray NR, Fields AP, et al. Differential expression, distribution, and function of PPAR-gamma in the proximal and distal colon. *Physiol Genomics*. 2007 Aug 20;30(3):342–53.
65. Gupta RA, Brockman JA, Sarraf P, Willson TM, DuBois RN. Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells. *J Biol Chem*. 2001 Aug 10;276(32):29681–7.
66. Chen L, Bush CR, Necela BM, Su W, Yanagisawa M, Anastasiadis PZ, et al. RS5444, a novel PPARgamma agonist, regulates aspects of the differentiated phenotype in nontransformed intestinal epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Jun 7;251(1-2):17–32.
67. Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, Rakotobe S, Karoui M, Colombel J-F, et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis.

Gastroenterology. 2003 May;124(5):1265–76.

68. Wächtershäuser A, Loitsch SM, Stein J. PPAR-gamma is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jun 7;272(2):380–5.

69. Lee SK, Kim HJ, Chi SG, Jang JY, Nam KD, Kim NH, et al. [*Saccharomyces boulardii* activates expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in HT-29 cells]. *Korean J Gastroenterol*. 2005 May;45(5):328–34.

70. Eun CS, Han DS, Lee SH, Jeon YC, Sohn JH, Kim YS, et al. [Probiotics may reduce inflammation by enhancing peroxisome proliferator activated receptor gamma activation in HT-29 cells]. *Korean J Gastroenterol*. 2007 Mar;49(3):139–46.

71. Voltan S, Martines D, Elli M, Brun P, Longo S, Porzionato A, et al. *Lactobacillus crispatus* M247-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acts as a signal transducing molecule activating peroxisome proliferator activated receptor-gamma in the intestinal mucosa. *Gastroenterology*. 2008 Oct;135(4):1216–27.

72. Yamamoto-Furusho JK, Jacintez-Cazares M, Furuzawa-Carballeda J, Fonseca-Camarillo G. Peroxisome proliferator-activated receptors family is involved in the response to treatment and mild clinical course in patients with ulcerative colitis. *Dis Markers*. 2014;2014:932530.

73. Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, 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 Apr 2;193(7):827–38.

74. Adachi M, Kurotani R, Morimura K, Shah Y, Sanford M, Madison BB, et al. Peroxisome proliferator activated receptor gamma in colonic epithelial cells protects against experimental inflammatory bowel disease. *Gut*. 2006 Aug;55(8):1104–13.

75. Liang H-L, Ouyang Q. A clinical trial of combined use of rosiglitazone and 5-aminosalicylate for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2008 Jan 7;14(1):114–9.

76. Pedersen G, Brynskov J. Topical rosiglitazone treatment improves ulcerative colitis by restoring peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Am J Gastroenterol*. 2010 Jul;105(7):1595–603.

77. Friend SL, Hosier S, Nelson A, Foxworthe D, Williams DE, Farr A. A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Exp Hematol*. 1994 Mar;22(3):321–8.

78. Levin SD, Koelling RM, Friend SL, Isaksen DE, Ziegler SF, Perlmutter RM, et al. Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism. *J Immunol*. 1999 Jan 15;162(2):677–83.

79. Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, Clifford T, Liu Mr null, Travis M, et al. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol*. 2001 Jul 1;167(1):336–43.

80. Quentmeier H, Drexler HG, Fleckenstein D, Zaborski M, Armstrong A, Sims JE, et al. Cloning of human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and signaling mechanisms leading to proliferation. *Leukemia*. 2001 Aug;15(8):1286–92.

81. He B, Xu W, Santini PA, Polydorides AD, Chiu A, Estrella J, et al. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity*. 2007 Jun;26(6):812–26.

82. Humphreys NE, Xu D, Hepworth MR, Liew FY, Grecis RK. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2443–9.

83. Tanaka J, Saga K, Kido M, Nishiura H, Akamatsu T, Chiba T, et al. Proinflammatory Th2 cytokines induce production of thymic stromal lymphopoietin in human colonic epithelial cells. *Dig Dis Sci*. 2010 Jul;55(7):1896–904.

84. Taylor BC, Zaph C, Troy AE, Du Y, Guild KJ, Comeau MR, et al. TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J Exp Med*. 2009 Mar 16;206(3):655–67.

85. Zaph C, Troy AE, Taylor BC, Berman-Booty LD, Guild KJ, Du Y, et al. Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature*. 2007 Mar 29;446(7135):552–6.

86. Zeuthen LH, Fink LN, Frokiaer H. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology*. 2008

Feb;123(2):197–208.

87. Bjerkan L, Schreurs O, Engen SA, Jahnsen FL, Bækkevold ES, Blix IJ, et al. The short form of TSLP is constitutively translated in human keratinocytes and has characteristics of an antimicrobial peptide. *Mucosal Immunol.* 2015 Jan;8(1):49–56.
88. Fornasa G, Tsilingiri K, Caprioli F, Botti F, Mapelli M, Meller S, et al. Dichotomy of short and long thymic stromal lymphopoietin isoforms in inflammatory disorders of the bowel and skin. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Aug;136(2):413–22.
89. Ziegler SF. The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders. *Current Opinion in Immunology.* 2010 Dec;22(6):795–9.
90. Roan F, Bell BD, Stoklasek TA, Kitajima M, Han H, Ziegler SF. The multiple facets of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) during allergic inflammation and beyond. *J Leukoc Biol.* 2012 Jun;91(6):877–86.
91. Indra AK. Epidermal TSLP: a trigger factor for pathogenesis of atopic dermatitis. *Expert Rev Proteomics.* 2013 Aug;10(4):309–11.
92. Xie Y, Takai T, Chen X, Okumura K, Ogawa H. Long TSLP transcript expression and release of TSLP induced by TLR ligands and cytokines in human keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 2012 Jun;66(3):233–7.
93. Harada M, Hirota T, Jodo AI, Doi S, Kameda M, Fujita K, et al. Functional analysis of the thymic stromal lymphopoietin variants in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009 Mar;40(3):368–74.
94. Biancheri P, Di Sabatino A, Rescigno M, Giuffrida P, Fornasa G, Tsilingiri K, et al. Abnormal thymic stromal lymphopoietin expression in the duodenal mucosa of patients with coeliac disease. *Gut.* 2015 Sep 4;
95. Borowski A, Vetter T, Kuepper M, Wohlmann A, Krause S, Lorenzen T, et al. Expression analysis and specific blockade of the receptor for human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) by novel antibodies to the human TSLP $\alpha$  receptor chain. *Cytokine.* 2013 Feb;61(2):546–55.
96. Lee H-C, Ziegler SF. Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NF $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 Jan 16;104(3):914–9.
97. Cultrone A, de Wouters T, Lakhdari O, Kelly D, Mulder I, Logan E, et al. The NF- $\kappa$ B binding site located in the proximal region of the TSLP promoter is critical for TSLP modulation in human intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol.* 2013 Apr;43(4):1053–62.
98. Jung K, Tanaka A, Fujita H, Matsuda A, Oida K, Karasawa K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -mediated suppression of dendritic cell function prevents the onset of atopic dermatitis in NC/Tnd mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2011 Feb;127(2):420–9.e6.
99. Sziksz E, Molnár K, Lippai R, Pap D, Onody A, Veres-Székely A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and thymic stromal lymphopoietin are involved in the pathophysiology of childhood coeliac disease. *Virchows Arch.* 2014 Sep 4;
100. Lee H-C, Headley MB, Iseki M, Ikuta K, Ziegler SF. Cutting edge: Inhibition of NF- $\kappa$ B-mediated TSLP expression by retinoid X receptor. *J Immunol.* 2008 Oct 15;181(8):5189–93.
101. Li M, Messaddeq N, Teletin M, Pasquali J-L, Metzger D, Chambon P. Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Oct 11;102(41):14795–800.
102. Li M, Hener P, Zhang Z, Kato S, Metzger D, Chambon P. Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Aug 1;103(31):11736–41.
103. Watanabe N, Wang Y-H, Lee HK, Ito T, Wang Y-H, Cao W, et al. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in human thymus. *Nature.* 2005 Aug 25;436(7054):1181–5.
104. Siracusa MC, Saenz SA, Wojno EDT, Kim BS, Osborne LC, Ziegler CG, et al. Thymic stromal lymphopoietin-mediated extramedullary hematopoiesis promotes allergic inflammation. *Immunity.* 2013 Dec 12;39(6):1158–70.
105. Watson B, Gauvreau GM. Thymic stromal lymphopoietin: a central regulator of allergic asthma. *Expert Opin Ther Targets.* 2014 Jul;18(7):771–85.
106. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, et al. Human



- epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol.* 2002 Jul;3(7):673–80.
107. Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, Yoon B-RP, Brewer A, Chartier S, et al. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med.* 2007 Feb 19;204(2):253–8.
  108. Bleck B, Tse DB, Gordon T, Ahsan MR, Reibman J. Diesel exhaust particle-treated human bronchial epithelial cells upregulate Jagged-1 and OX40 ligand in myeloid dendritic cells via thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol.* 2010 Dec 1;185(11):6636–45.
  109. Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med.* 2008 Jun;263(6):591–6.
  110. Sonesson A, Kasetty G, Olin AI, Malmsten M, Mörgelin M, Sørensen OE, et al. Thymic stromal lymphopoietin exerts antimicrobial activities. *Exp Dermatol.* 2011 Dec;20(12):1004–10.
  111. Li M, Zhang J, Wu Y, Li J. The regulation of thymic stromal lymphopoietin in gut immune homeostasis. *Dig Dis Sci.* 2011 Aug;56(8):2215–20.
  112. Shale M, Ghosh S. How intestinal epithelial cells tolerate dendritic cells and its relevance to inflammatory bowel disease. *Gut.* 2009 Sep;58(9):1291–9.
  113. Ziegler SF, Artis D. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nat Immunol.* 2010 Apr;11(4):289–93.
  114. Noble CL, Abbas AR, Cornelius J, Lees CW, Ho G-T, Toy K, et al. Regional variation in gene expression in the healthy colon is dysregulated in ulcerative colitis. *Gut.* 2008 Oct;57(10):1398–405.
  115. Ordonez F, Lacaille F, Canioni D, Talbotec C, Fournet J-C, Cerf-Bensussan N, et al. Pediatric ulcerative colitis associated with autoimmune diseases: a distinct form of inflammatory bowel disease? *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Oct;18(10):1809–17.
  116. Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, Cummins A, Barry S. Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol.* 2010 Jan;30(1):80–9.
  117. Maizels RM, Pearce EJ, Artis D, Yazdanbakhsh M, Wynn TA. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *J Exp Med.* 2009 Sep 28;206(10):2059–66.
  118. Takai T. TSLP expression: cellular sources, triggers, and regulatory mechanisms. *Allergol Int.* 2012 Mar;61(1):3–17.
  119. Momose Y, Meguro K, Ikeda H, Hatanaka C, Oi S, Sohda T. Studies on antidiabetic agents. X. Synthesis and biological activities of pioglitazone and related compounds. *Chem Pharm Bull.* 1991 Jun;39(6):1440–5.
  120. Hener P, Friedmann L, Metzger D, Chambon P, Li M. Aggravated TSLP-induced atopic dermatitis in mice lacking Dicer in adult skin keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2011 Nov;131(11):2324–7.
  121. Kundu P, Ling TW, Korecka A, Li Y, D'Arienzo R, Bunte RM, et al. Absence of intestinal PPAR $\gamma$  aggravates acute infectious colitis in mice through a lipocalin-2-dependent pathway. *PLoS Pathog.* 2014 Jan;10(1):e1003887.
  122. Peters JM, Shah YM, Gonzalez FJ. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer.* 2012 Mar;12(3):181–95.
  123. Ogino S, Shima K, Baba Y, Nosho K, Irahara N, Kure S, et al. Colorectal cancer expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG, PPAR $\gamma$ ) is associated with good prognosis. *Gastroenterology.* 2009 Apr;136(4):1242–50.
  124. McAlpine CA, Barak Y, Matisse I, Cormier RT. Intestinal-specific PPAR $\gamma$  deficiency enhances tumorigenesis in ApcMin/+ mice. *Int J Cancer.* 2006 Nov 15;119(10):2339–46.
  125. Zhao L-N, Li J-Y, Yu T, Chen G-C, Yuan Y-H, Chen Q-K. 5-Aminosalicylates reduce the risk of colorectal neoplasia in patients with ulcerative colitis: an updated meta-analysis. *PLoS ONE.* 2014;9(4):e94208.
  126. O'Connor A, Packey CD, Akbari M, Moss AC. Mesalamine, but Not Sulfasalazine, Reduces the Risk of Colorectal Neoplasia in Patients with Inflammatory Bowel Disease: An Agent-specific Systematic Review and Meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2015 Nov;21(11):2562–9.

127. Rousseaux C, El-Jamal N, Fumery M, Dubuquoy C, Romano O, Chatelain D, et al. The 5-aminosalicylic acid antineoplastic effect in the intestine is mediated by PPAR $\gamma$ . *Carcinogenesis*. 2013 Nov;34(11):2580–6.
128. Egan JM. Targeting Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia with a PPAR- $\gamma$  Agonist. *N Engl J Med*. 2015 Nov 12;373(20):1973–5.
129. Prost S, Relouzat F, Spentchian M, Ouzegdouh Y, Saliba J, Massonnet G, et al. Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR $\gamma$  agonists. *Nature*. 2015 Sep 17;525(7569):380–3.
130. Bouguen G, Langlois A, Djouina M, Branche J, Koriche D, Dewaeles E, et al. Intestinal steroidogenesis controls PPAR $\gamma$  expression in the colon and is impaired during UC. *Gut*. 2014 Jul 22;
131. Gauvreau GM, O'Byrne PM, Boulet L-P, Wang Y, Cockcroft D, Bigler J, et al. Effects of an anti-TSLP antibody on allergen-induced asthmatic responses. *N Engl J Med*. 2014 May 29;370(22):2102–10.

### Protocole pour la réalisation d'un ChIP

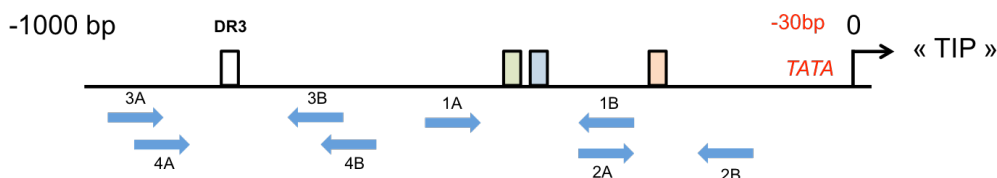
L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) se déroule en plusieurs étapes :

- Préparation des cellules :
  - Culture et traitement des cellules: Les cellules Caco-2 sont platées dans des boîtes de 15 cm de diamètre puis la veille des stimulations, le milieu de culture des boîtes est remplacé par un milieu sans SVF. Le lendemain, ces cellules ont été stimulées pendant 24h par un ligand agoniste de PPAR $\gamma$  (GED).
  - « Cross-linking » ou étape de fixation : Les cellules sont ensuite fixées par un traitement au formaldéhyde 10% pendant 30 minutes à température ambiante avec une agitation à mi-temps. L'action du formaldéhyde est stoppée par l'ajout de glycine 1,25M (préparée ex-tempo) durant 5 minutes.
  - Lyse cellulaire : L'étape suivante est réalisée sur la glace. Les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS 1X froid. Du PBS 1X associé à des inhibiteurs de protéases (cocktails d'inhibiteurs de protéases au 1/1000<sup>ème</sup> + PMSF 0,1M au 1/1000<sup>ème</sup>) est placé dans les boîtes. Les boîtes sont grattées et le PBS contenant les cellules est transféré dans un falcon. L'opération est répétée une deuxième fois. L'ensemble est centrifugé à 3000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré et le culot est repris dans du SDS buffer+ inhibiteurs de protéases (même mélange que précédemment).
  - Etape de sonication : Afin de pouvoir fragmenter la chromatine, une étape de sonication est nécessaire. Durant 10 minutes, il y a une alternance de phases ON et OFF d'une durée de 30 secondes. A la fin de cette sonication, 10% du volume est prélevé et congelé. Cet échantillon servira « d'Input » (= témoin) lors de la migration finale sur gel. Le reste du volume est séparé en 2 volumes égaux. Le premier servira d'immunoPrécipitation témoin et le deuxième d'immunoPrécipitation anti-PPAR $\gamma$ .
- Immunoprécipitation : L'étape d'immunoprécipitation a pour but de sélectionner uniquement les fragments de chromatine.
  - Pré-clearing : Cette étape va permettre de purifier la chromatine et empêcher que les anticorps anti-PPAR $\gamma$  ne se fixent n'importe où. La chromatine en suspension va être diluée dans de l'IP buffer avec du DNA carrier (ADN de sperme de saumon) et des billes de sépharose (Protéine A/G). L'ensemble est incubé durant 4H à 4°C sur une roue. Suite à cette étape, les tubes sont centrifugés 1 minute à 800g à 4°C. Les culots formés représentent les complexes non-spécifiques. Seuls les surnageants seront conservés.
  - ImmunoPrécipitation : Après avoir récupéré les surnageants de l'étape précédente, de l'IP buffer est de nouveau ajouté ainsi que des

anticorps anti-PPAR $\gamma$  pour le tube « IP anti-PPAR $\gamma$  » (aucun anticorps n'est placé dans la situation contrôle). En parallèle de cette étape, des billes de sépharoses sont saturées (billes + DNA carrier + BSA 10mg/ml). L'ensemble (tubes IP et tube billes saturées) est incubé toute la nuit sur roue à 4°C. Le lendemain, les billes de sépharose saturées et du DNA carrier sont placés dans les tubes (IP contrôle et IP anti-PPAR $\gamma$ ). Ils sont ensuite incubés 4H sur roue à 4°C et centrifugés 1 minute à 800g à 4°C. Les culots représentent cette fois-ci les complexes spécifiques recherchés. Les surnageants sont jetés.

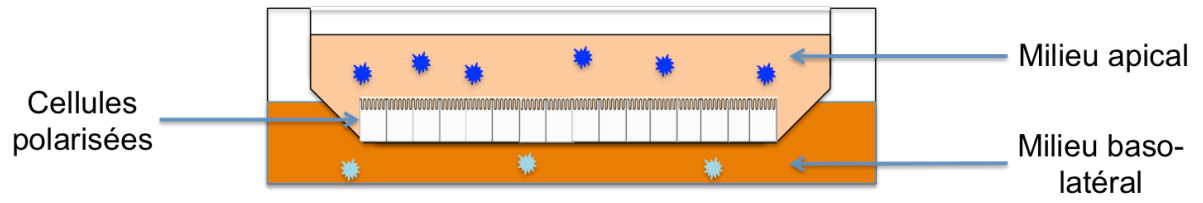
- Lavages : Les culots subissent plusieurs étapes de lavage successifs (Wash buffer 1 (X2), 2 (X2), 3 (X1) et 4 (X3), avec des centrifugations d'1 minute à 800g à 4°C.
- Extraction et purification de l'ADN :
  - o L'ADN purifié est extrait à l'aide de l'extraction buffer. Ce dernier est ajouté au culot, incubé durant 10 minutes puis les tubes sont centrifugés 5 minutes à 800g à 4°C. Puis l'extraction buffer contenant l'ADN est récupéré. Pour augmenter le rendement au maximum, cette opération est répétée 2 fois. La totalité de l'extraction buffer récupérée est ensuite incubée toute la nuit dans un bain marie à 65°C pour le « reverse cross-link », à savoir le détachement de l'anticorps PPAR $\gamma$  aux fragments de chromatine. Les « Input » préalablement récupérés la veille sont également placés dans le bain marie.
  - o Le lendemain, les culots d'ADN seront purifiés par un kit de purification (NucleoSpin Gel and PCR clean up).
- Analyse des fragments de chromatine par PCR : Les fragments sont amplifiés sur des PCR de 30 cycles. Le « mix PCR » ajouté aux différents échantillons est composé d'un Tampon 10X –MgCl<sub>2</sub>, dNTP 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 50mM, Taq platinum, oligonucléotides (reverse et forward), qsp eau stérile.

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



**Figure 27 : Représentation schématique des 1000 premières paires de base en amont du point d'initiation à la transcription du gène codant la TSLP 2 et des différentes amorces utilisées lors des expériences de ChIP.**

## Annexe 2



**Figure 28 : Représentation schématique des compartiments accessibles grâce à la technique de culture cellulaire sur filtre Transwell®**

## **Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques**

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE Cedex  
Tél. 03.20.96.40.40 - Fax 03.20.95.90.09

### DECISION D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Le Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques  
Vu le Décret n° 2012-172 du 03 février 2012 modifié relatif aux études spécialisées du troisième cycle de Pharmacie  
Vu la décision du Président de l'Université en date du 14 mai 2012 relative aux délégations de signature :

DECIDE

Article 1er : **Monsieur Anthony MARTIN MENA**

Est autorisé(e) à soutenir son mémoire en vue de l'obtention du D.E.S. de PHARMACIE option PHARMACIE HOSPITALIERE – PRATIQUE ET RECHERCHE sur le sujet suivant :

PEROXISOME PROLIFERATOR ACTIVATED RECEPTOR GAMMA (PPARY) REGULE L'EXPRESSION DE L'ISOFORME 2 DE LA THYMIC STROMAL LYMPHOPOIETIN (TSLP) DANS LES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES DU COLON

Article 2 : Ce mémoire peut tenir lieu de thèse en vue de l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie.

Article 3 : La soutenance aura lieu le **Vendredi 30 Septembre 2016 à 16h00 Amphi Curie**

Article 4 : Le jury est composé ainsi qu'il suit :

Président :

**Monsieur le Professeur Bertrand DECAUDIN**  
Praticien Hospitalier, CHRU de Lille  
Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie de Lille

Assesseurs :

**Monsieur le Professeur Jean Marc CHILLON**  
Praticien Hospitalier, CHU d'Amiens  
Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie d'Amiens

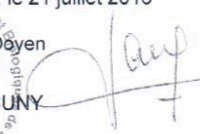
**Madame Céline VERBBRIGGHE**  
Praticien Hospitalier, GHPSO site de Creil

**Monsieur le Professeur Luc DUBREUIL,**  
Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie de Lille, PU- PH retraité

Lille, le 21 juillet 2016

Le Doyen

D. CUNY



Université de Lille 2  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE  
**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
Année Universitaire 2015/2016

**Nom : MARTIN MENA**  
**Prénom : Anthony**

**Titre de la thèse : *Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (PPAR $\gamma$ )* régule l'expression de l'isoforme 2 de la *Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)* dans les cellules épithéliales intestinales du colon.**

**Mots-clés :** Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), rectocolite hémorragique (RCH), inflammation, tolérance intestinale, Peroxysome Proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP).

---

**Résumé :**

L'origine des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) reste à ce jour inconnue. La perte de l'homéostasie intestinale comme facteur étiologique a été admise. L'un des acteurs essentiels à cette homéostasie est la cellule épithéliale intestinale (CEI). Le laboratoire a précédemment montré qu'il existe, spécifiquement chez les patients atteints de rectocolite hémorragique (RCH), un défaut d'expression du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma*) au niveau des CEI du colon. D'autres études ont permis de mettre en avant l'effet anti-inflammatoire d'un agoniste PPAR $\gamma$ , l'acide 5 amino-salicylique (5-ASA) au niveau des muqueuses de patients atteints de RCH. Notre hypothèse est que le déficit en PPAR $\gamma$  chez les patients atteints de RCH perturberait les fonctions immunomodulatrices de la CEI. Un travail préliminaire a permis de mettre en évidence un défaut d'expression d'une cytokine, la Lymphopoïétine Stromale Thymique (TSLP) dans des cellules ayant un déficit spécifique en PPAR $\gamma$  (Caco-2 ShPPAR $\gamma$ ). Le but de ce mémoire est de confirmer le rôle de PPAR $\gamma$  sur l'expression de la TSLP *in vitro* dans des lignées de CEI, d'évaluer et comparer l'expression de la TSLP chez des patients atteints de RCH par rapport à des patients contrôles.

---

**Directeur du mémoire :** Docteur BERTIN Benjamin, MCU  
Faculté de Pharmacie, Université de Lille 2

**Membres du jury :**

**Président :** Professeur DÉCAUDIN Bertrand, PU-PH,  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lille.  
CHRU, Lille.

**Assesseur(s) :** Docteur VERBRIGGHE Céline, PH,  
GHPSO site de Creil

Professeur DUBREUIL Luc, PU-PH  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lille.  
CH, Tourcoing.

**Membre extérieur :** Professeur CHILLON Jean-Marc, PU-PH  
UFR de pharmacie, Amiens.  
CHU, Amiens.

Université de Lille 2  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE  
**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
Année Universitaire 2015/2016

**Nom : MARTIN MENA**  
**Prénom : Anthony**

**Titre de la thèse : *Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (PPAR $\gamma$ )* régule l'expression de l'isoforme 2 de la *Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)* dans les cellules épithéliales intestinales du colon.**

**Mots-clés :** Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), rectocolite hémorragique (RCH), inflammation, tolérance intestinale, Peroxysome Proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP).

---

**Résumé :**

L'origine des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) reste à ce jour inconnue. La perte de l'homéostasie intestinale comme facteur étiologique a été admise. L'un des acteurs essentiels à cette homéostasie est la cellule épithéliale intestinale (CEI). Le laboratoire a précédemment montré qu'il existe, spécifiquement chez les patients atteints de rectocolite hémorragique (RCH), un défaut d'expression du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma*) au niveau des CEI du colon. D'autres études ont permis de mettre en avant l'effet anti-inflammatoire d'un agoniste PPAR $\gamma$ , l'acide 5 amino-salicylique (5-ASA) au niveau des muqueuses de patients atteints de RCH. Notre hypothèse est que le déficit en PPAR $\gamma$  chez les patients atteints de RCH perturberait les fonctions immunomodulatrices de la CEI. Un travail préliminaire a permis de mettre en évidence un défaut d'expression d'une cytokine, la Lymphopoïétine Stromale Thymique (TSLP) dans des cellules ayant un déficit spécifique en PPAR $\gamma$  (Caco-2 ShPPAR $\gamma$ ). Le but de ce mémoire est de confirmer le rôle de PPAR $\gamma$  sur l'expression de la TSLP *in vitro* dans des lignées de CEI, d'évaluer et comparer l'expression de la TSLP chez des patients atteints de RCH par rapport à des patients contrôles.

---

**Directeur du mémoire :** Docteur BERTIN Benjamin, MCU  
Faculté de Pharmacie, Université de Lille 2

**Membres du jury :**

**Président :** Professeur DÉCAUDIN Bertrand, PU-PH,  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lille.  
CHRU, Lille.

**Assesseur(s) :** Docteur VERBRIGGHE Céline, PH,  
GHPSO site de Creil

Professeur DUBREUIL Luc, PU-PH  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lille.  
CH, Tourcoing.

**Membre extérieur :** Professeur CHILLON Jean-Marc, PU-PH  
UFR de pharmacie, Amiens.  
CHU, Amiens.