

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

Soutenue publiquement le 12 janvier 2023

**Par Mme Pauline ZARNITZKY**

**Conformément aux dispositions réglementaires en vigueur**

**tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**REGULATION DE L'EXPRESSION DE L'E-CADHERINE PAR PPAR $\gamma$  DANS  
L'EPITHELIUM COLIQUE DES PATIENTS ATTEINTS DE RCH**

---

**Membres du jury :**

**Président :**

**Monsieur le Professeur Christophe CARNOY**

Professeur des Universités – Faculté de Pharmacie, Université de Lille  
Pharmacien, Praticien Hospitalier – Centre Hospitalier Universitaire de Lille

**Directeur, conseiller de thèse :**

**Monsieur le Docteur Bertrand Meresse**

Chargé de recherche INSERM – INFINITE U1286 – Lille

**Assesseur(s) :**

**Madame le Docteur Julie DEMARET**

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier – CHU de Lille Université de  
Lille – Faculté de Pharmacie

**Monsieur le Docteur Etienne BROCHOT**

Maître de Conférences des Universités – Praticien hospitalier CHU  
Amiens – Université de Picardie Jules Vernes – Faculté de Pharmacie

**Monsieur le Docteur Benjamin DECKMYN**

Maître de Conférences des Universités – Praticien hospitalier – Groupement des hôpitaux de  
l'institut Catholique de Lille  
Lille – l'institut Catholique de Lille



### Université de Lille

Président  
Premier Vice-président  
Vice-présidente Formation  
BEAUCOURT  
Vice-président Recherche  
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens  
O'CONNOR  
Vice-président Ressources humaines  
Directrice Générale des Services

Régis BORDET  
Etienne PEYRAT  
Christel  
  
Olivier COLOT  
Kathleen  
  
Jérôme FONCEL  
Marie-Dominique SAVINA

### UFR3S

Doyen  
Premier Vice-Doyen  
Vice-Doyen Recherche  
Vice-Doyen Finances et Patrimoine  
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires  
D'HARANCY  
Vice-Doyen RH, SI et Qualité  
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie  
Vice-Doyen Territoires-Partenariats  
Vice-Doyenne Vie de Campus  
Vice-Doyen International et Communication  
Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX  
Guillaume PENEL  
Éric BOULANGER  
Damien CUNY  
Sébastien  
  
Hervé HUBERT  
Caroline LANIER  
Thomas MORGENROTH  
Claire PINÇON  
Vincent SOBANSKI  
Dorian QUINZAIN

### Faculté de Pharmacie

Doyen  
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études  
Assesseur aux Ressources et Personnels  
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement  
Assesseur à la Vie de la Faculté  
Responsable des Services  
Représentant étudiant

Delphine ALLORGE  
Benjamin BERTIN  
Stéphanie DELBAERE  
Anne GARAT  
Emmanuelle LIPKA  
Cyrille PORTA  
Honoré GUISE

### Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

### Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie	86
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques	87
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85

M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

### Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81

Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

### Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27

Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85

M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

### Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

### Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

### Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

### Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87
M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85
M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85

### Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
------	-----	--------	------------------------

M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière
----	-------------	---------	---

**Faculté de Pharmacie de Lille**

3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille

03 20 96 40 40

<https://pharmacie.univ-lille.fr>

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



# Remerciements

*Au président de jury de thèse,*

**Monsieur le Docteur Christophe CARNOY**

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse et de juger mon travail. Je tiens à vous remercier pour votre bienveillance, votre disponibilité et vos conseils. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

*A mes assesseurs,*

**Madame le Docteur Julie DEMARET**

Tu me fais l'honneur de participer à mon jury de thèse. Je te remercie pour ta présence. Sois assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

**Monsieur le Docteur Etienne BROCHOT**

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous prie d'accepter ma sincère reconnaissance et mon plus profond respect.

**Monsieur le Docteur Benjamin DECKMYN**

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de l'intérêt que vous avez porté à ce sujet. Soyez assuré de ma plus sincère considération et de mon profond respect.

*A mon directeur de thèse,*

**Monsieur le docteur Bertrand MERESSE,**

Merci pour ton encadrement, ta rigueur, tes idées débordantes et ta gentillesse. Je me réjouis de poursuivre ma thèse de Sciences avec toi. Sois assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

*A toute l'équipe INFINITE :*

Merci pour votre accueil chaleureux, votre soutien et votre bonne humeur. Merci à celles et ceux qui m'ont écouté, encouragé, aidé et conseillé aux différentes étapes de ce travail.

Je remercie, tout particulièrement, **Marie**, pour ton aide dans ce travail et pour toutes les autres formes de soutiens, conseils avisés et assistance que tu m'as donné si généreusement.

Merci aussi à **Adeline**, pour ta relecture attentive de ce manuscrit, tes suggestions bienvenues ainsi que pour ton oreille attentive lors de nos pauses goûter.

Je te remercie **Fatima** pour tes précieux conseils et de m'avoir si patiemment transmis tes connaissances sur la culture des organoïdes intestinaux.

Je remercie, **Silvia**, qui a toujours répondu promptement à mes questions vastes et maladroites sur PPAR $\gamma$ .

*Je dédie cette thèse :*

**Aux copains internes**, merci d'avoir rendu le nord si accueillant ! **Laura, Laure, Mélanie, Fethi, Benjamin** et **Chloé** : merci pour votre soutien, vos conseils...et merci pour nos soirées !

**Aux copains du nord** ! Si heureuse d'avoir rencontré des locaux ! Merci à **Jeanne** de me suivre à chaque proposition d'activités touristiques, de sport ou de spectacles. Merci à **Lulu** d'être disponible pour remplir mon appartement de plantes !

**Aux copains Rouennais**, et particulière à **Louis**, tu as été un partenaire de choc !

A **Mathilde**, tu es une grande amie, merci pour ton soutien sans faille.

A **Gatien**, merci de me rendre heureuse...et pour ton humour toujours si subtil.

**A mes grands-parents**, je vous remercie d'avoir pris autant soin de moi à Rouen et de m'avoir soutenu pendant ces longues études. Merci pour l'amour que vous me portez.

A vous **mes petits parents**, merci pour tout...et peut-être, particulièrement d'avoir fait un boulot aussi formidable avec moi !

A **Benjamin**, mon petit frère...qui n'est plus si petit ! Merci pour cette complicité ! Je suis fière d'être ta sœur !

# Table des matières

Listes des figures .....	16
Liste des tableaux : .....	16
Liste des abréviations .....	17
Introduction.....	20
<b>La RCH, une maladie multifactorielle complexe :</b> .....	22
L'homéostasie de l'épithélium colique : .....	22
Destruction de la barrière épithéliale colique au cours de la RCH : .....	23
La RCH, une maladie de la barrière intestinale : .....	23
La RCH, une maladie dysimmunitaire : .....	25
<b>PPAR<math>\gamma</math>, au cours de la RCH :</b> .....	29
Structure et fonction de PPAR $\gamma$ : .....	29
Les ligands de PPAR $\gamma$ : .....	32
Le rôle de PPAR $\gamma$ dans la RCH : .....	35
<b>Rôle de l'E-cadhérine dans le maintien de la barrière intestinale :</b> .....	39
L'E-cadhérine, principale constituante des jonctions adhérentes : .....	39
L'E-cadhérine serait diminuée dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH : .....	40
Polymorphismes génétiques dans les gènes codant et régulant l'expression de l'E-cadhérine : .....	41
La diminution de l'E-cadhérine est responsable d'une augmentation de la perméabilité intestinale : .....	41
La diminution de l'E-cadhérine entrainerait une diminution de l'immunosurveillance : .....	41
La diminution de l'E-cadhérine est un marqueur de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) : .....	42
Régulation de l'expression de l'E-cadhérine : .....	42
Objectif du projet de recherche : .....	44
Matériels et Méthodes : .....	46
Prélèvements : .....	46
Culture cellulaire : .....	46
Culture et entretien des lignées : .....	46
Stimulation des lignées : .....	47
Analyse protéique par Western-blot : .....	47
Quantification de l'ARNm par RT-qPCR : .....	48
Cytométrie en flux : .....	49
Immunohistochimie : .....	49

<b>Analyses statistiques :</b> .....	50
<b>Résultats :</b> .....	52
<b>Diminution de l'expression de l'E-cadhérine et de PPAR<math>\gamma</math> dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH :</b> .....	52
<b>Etude d'une régulation directe entre PPAR<math>\gamma</math> et l'E-cadhérine :</b> .....	57
<b>Inhibition de l'activité de PPAR<math>\gamma</math> avec l'antagoniste GW9662 :</b> .....	57
<b>Inhibition de l'activité de PPAR<math>\gamma</math> avec un agoniste inverse de PPAR<math>\gamma</math>, le T0070907 :</b> .....	59
<b>Inhibition du gène de PPAR<math>\gamma</math> par une transfection avec un plasmide sh RNA :</b> .	61
<b>Discussion</b> .....	64
<b>Diminution de l'expression de l'E-cadhérine et de PPAR<math>\gamma</math> dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH :</b> .....	64
<b>PPAR<math>\gamma</math> ne semble pas régulé pas directement l'expression de l'E-cadhérine dans les CE intestinales :</b> .....	66
<b>Vers l'hypothèse d'une régulation indirecte de PPAR<math>\gamma</math> sur l'E-cadhérine:</b> .....	68
<b>Conclusion</b> .....	70
<b>Bibliographie</b> .....	72
<b>Annexes</b> .....	80
<i><b>Annexe 1 :</b> expression des gènes ci-dessus par RT-qPCR dans les prélèvements de muqueuses des patients</i> .....	80
<i><b>Annexe 2 :</b> Expression de l'ARNm de l'E-cadhérine, lactase et TSL par RT-qPCR après stimulation par la rosiglitazone, un agoniste de PPAR<math>\gamma</math> pendant 24, expérience réalisé une fois en triplicate</i> .....	81
<i><b>Annexe 3 :</b> expression de l'ARNm de l'E-cadhérine et de PPAR<math>\gamma</math> à partir des CE isolées en fonction de la localisation</i> .....	82

# Listes des figures

Figure 1 : Phénotypes de la RCH. ....	20
Figure 2 : L'épithélium intestinal au carrefour des interactions entre la réponse inflammatoire et immunitaire, la microflore intestinale et les facteurs environnementaux. ....	21
Figure 3 : Coupe histologique de la muqueuse intestinale. ....	22
Figure 4 : Lésions endoscopiques et histologiques de la RCH .....	23
Figure 5 : Hypothèse étiologique actuelle de la RCH. D .....	28
Figure 6 : La famille des récepteurs nucléaires. ....	29
Figure 7 : La protéine PPAR $\gamma$ . ....	30
Figure 8 : Mécanisme d'action de base des récepteurs PPAR $\gamma$ . ....	30
Figure 9 : Mécanismes d'action exercés par l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ . ....	32
Figure 10 : Structure de la Rosiglitazone de PPAR $\gamma$ .....	33
Figure 11 : Test de transcription cellulaire sensible à l'activation et à la répression montrant l'effet des ligands PPAR $\gamma$ agoniste (rosiglitazone), antagoniste (GW9662) et agoniste inverse (T0070907) (5 $\mu$ M) dans les cellules HEK293T. ....	34
Figure 12 : Structure chimique du GW9662 (2-chloro-5-nitrobenzanilide) et de T0070907 (2-Chloro-5-nitro-N-4-pyridinyl-benzamide). ....	34
Figure 13 : Mécanismes moléculaires de l'activation PPAR $\gamma$ par le 5-ASA. ....	36
Figure 14 : Effets de PPAR $\gamma$ sur les voies de signalisation inflammatoires. ....	38
Figure 15 : L'E-cadhérine et son interaction avec le cytosquelette. ....	40
Figure 16 : Expression de l'ARNm de l'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$ dans la muqueuse. ....	54
Figure 17 : Expression de l'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$ dans les CE isolées. ( .....	56
Figure 18 : Inhibition pharmacologique par le GW9662, un antagoniste de PPAR $\gamma$ , de l'activité de PPAR $\gamma$ dans les lignées Caco-2 et HT29. ....	58
<i>Figure 19 : Inhibition pharmacologique par le T0070907 , un agoniste inverse de PPAR<math>\gamma</math>, de l'activité de PPAR<math>\gamma</math> dans les lignées Caco-2. ....</i>	<i>60</i>
Figure 20 : inhibition de l'activité de PPAR $\gamma$ dans un modèle génétique .....	62

## Liste des tableaux :

Tableau 1: listes des amorces sens et antisens utilisées. ....	49
--	----

# Liste des abréviations

**AINS** : anti-inflammatoires non stéroïdien

**5-ASA** : acide 5-aminosalicylique

**CCR** : cancer colorectal

**CE** : cellule épithéliale

**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité

**CRP** : protéine C-réactive

**CTL** : contrôle

**DBD** : domaine de liaison à l'ADN

**DC** : cellule dendritique

**DMSO** : Dimethyl sulfoxyde

**DSS** : dextran sulfate sodium

**EMT** : transition épithéliomesenchymateuse

**HAS** : Haute Autorité de Santé

**HNF4A** : hépatocyte nuclear factor 4 $\alpha$

**IFN $\gamma$**  : interferon  $\gamma$

**IHC** : immunohistochimie

**LIE** : lymphocyte intraépithélial

**LP** : lamina propria

**LB** : lymphocyte B

**LT** : lymphocyte T

**MC** : maladie de Crohn

**MICI** : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

**PBMC** : Human peripheral blood mononuclear cells

**RT-qPCR** : reverse transcription quantitative real-time Polymerase chain reaction

**PNN** : polynucléaires neutrophiles

**PPAR** : peroxisome proliferator-activated receptor

**PPRE** : élément de réponse proliférateur des peroxysomes

**RCH** : rectocolite hémorragique

**ARN** : Acide ribonucléique

**RXR** : retinoid X receptor

**SI** : système immunitaire

**SNP** : single nucleotide polymorphism

**SVF** : Sérum de veau fœtal

**TLR** : toll like receptor

**TNBS** : 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid

**TNF** : facteur de nécrose tumorale

**TSLP** : Thymic stromal lymphopietin

**TZD** : thiazolidinediones

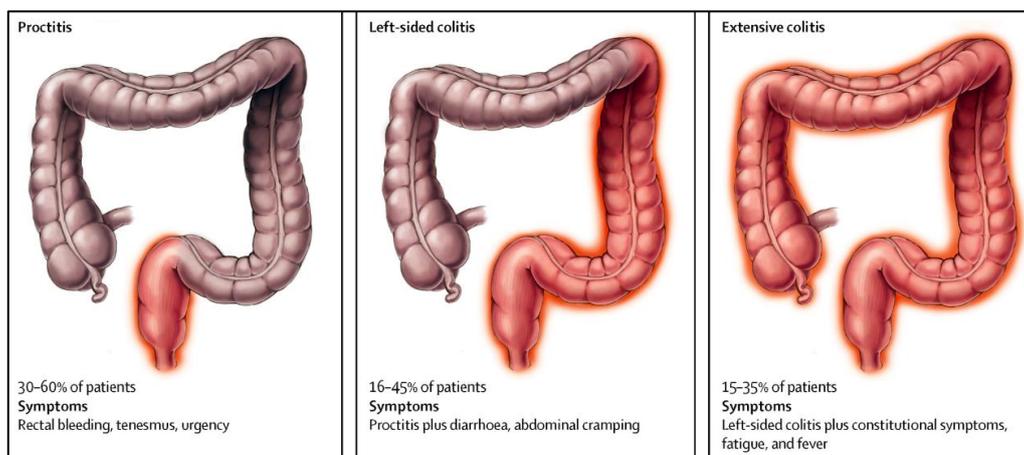
**UPR** : unfolded protein response

**XBP-1** : X-box binding protein-1



# Introduction

La rectocolite hémorragique (RCH), comme la maladie de Crohn (MC), est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI). La RCH se caractérise par des douleurs abdominales et des diarrhées chroniques sévères sanglantes, évoluant par poussées. Ces symptômes sont causés par des lésions de la muqueuse intestinale qui entraînent la formation d'ulcères et/ou une érosion diffuse sans intervalle de muqueuse saine. L'inflammation débute généralement par le rectum, et progresse de façon rétrograde sur une distance variable pouvant atteindre le caecum, au niveau du côlon droit (**Figure 1**).

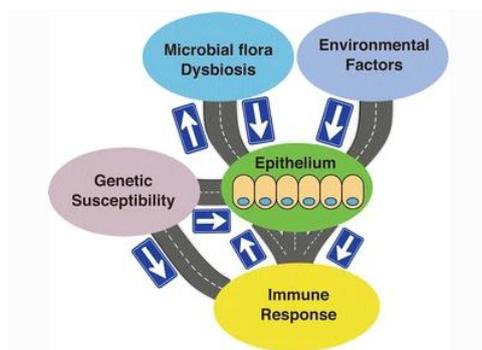


**Figure 1 : Phénotypes de la RCH.** La colite peut-être uniquement distale (60 % des cas). Elle colite peut aussi s'étendre jusqu'au côlon distal (16-45 % des cas). Dans 15-35 % des cas, la colite touche la totalité du côlon. Les symptômes et la stratégie de traitement peuvent différer selon l'étendue de la maladie. Illustration par Jill Gregory. D'après Ungaro et al, 2017

La maladie peut rester localisée ou s'étendre au fil du temps, sans qu'il existe de marqueur de pronostic de son évolution de la maladie. Contrairement à la MC, l'atteinte de la muqueuse est superficielle, essentiellement épithéliale, et se limite au côlon (Ungaro et al. 2017) La RCH est un problème majeur de santé publique. Alors que l'incidence et la prévalence augmentent dans le monde entier et qu'elle touche les jeunes adultes, il n'existe encore aucun traitement curatif. Pendant longtemps, les seuls traitements étaient basés sur l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA) (également connu sous le nom de la mésalazine), les corticoïdes et les immunosuppresseurs tels que, l'azathioprine, la 6-mercaptopurine et le méthotrexate. Depuis les années 2000, différentes biothérapies ont permis d'améliorer la qualité de vie des patients et d'atteindre une rémission profonde (clinique, biologique avec une normalisation de la CRP et de la calprotectine fécale, endoscopique et histologique avec un aspect normal de la muqueuse rectocolique) (Ungaro et al. 2017; Colombel et al. 2020). Dans les formes modérées à sévères en échec avec les traitements conventionnels, le besoin médical est actuellement couvert en 2<sup>ème</sup> ligne de traitement par les anti-TNF $\alpha$  (adalimumab, infliximab et golimumab) .

En 3ème ligne de traitement, après échec des traitements conventionnels et d'un anti-TNF $\alpha$ , on dispose actuellement de 3 alternatives : le vedolizumab (anti intégrine  $\alpha 4\beta 7$ ), le tofacitinib (anti-JAK 1 et JAK 2) et l'ustekinumab (anti-IL12/IL23). Ces traitements coûteux, ne sont toutefois que suspensifs et non curatifs. Il persiste un besoin de traitements efficaces et bien tolérés du fait des phénomènes d'échappement, des effets indésirables (allergie, infections à répétition, effet paradoxal cutané des anti-TNF $\alpha$ , exacerbation de manifestations extra-intestinales sous vedolizumab) et des contre-indications aux molécules actuellement disponibles. Une proportion non négligeable de malades sont réfractaires aux traitements, développent une colite aigue grave, une dysplasie, un cancer colorectal (CCR), et 20 à 30% subissent *in fine* une ablation du côlon (Jesus K Yamamoto-Furusho et Parra-Holguín 2021).

Si l'étiologie de la RCH reste inconnue, il est communément admis qu'il s'agit d'une pathologie multifactorielle complexe. L'hypothèse étiologique actuelle décrit la RCH comme une réponse inflammatoire et immunitaire anormale vis-à-vis de la microflore intestinale, déclenchée ou aggravée par des facteurs environnementaux, chez des individus génétiquement prédisposés (Ungaro et al. 2017). A l'interface entre ces éléments, l'épithélium intestinal, a un rôle clé dans les interactions entre la flore microbienne, les facteurs environnementaux, les facteurs génétiques et la réponse immunitaire (**Figure 2**). D'ailleurs, l'objectif thérapeutique de rémission profonde de la RCH passe impérativement par une cicatrisation complète de l'épithélium. L'épithélium colique pourrait être une cible pour développer des thérapies, ces dernières seraient alors des traitements de choix pour obtenir la cicatrisation muqueuse chez les patients en échec thérapeutique. Ce travail s'est, donc, concentré sur l'épithélium intestinal au cours de la RCH.

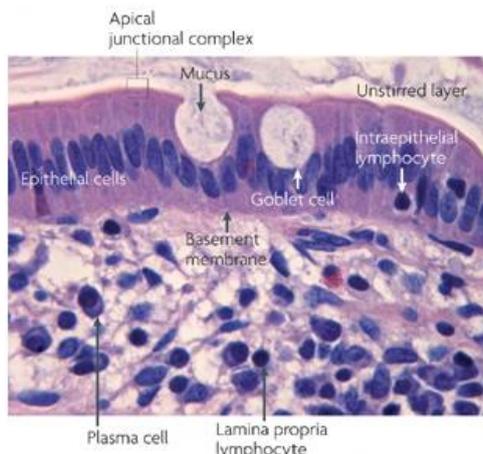


**Figure 2 : L'épithélium intestinal au carrefour des interactions entre la réponse inflammatoire et immunitaire, la microflore intestinale et les facteurs environnementaux.** d'après Okamoto et al, 2015

## La RCH, une maladie multifactorielle complexe :

### *L'homéostasie de l'épithélium colique :*

La paroi intestinale (de l'intestin grêle et du côlon) est composée de quatre compartiments : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. La muqueuse intestinale est constituée de trois couche : une monocouche de cellules épithéliales (CE) qui est en contact avec la lumière intestinale, une couche sous-jacente appelée lamina propria (LP) et puis la musculuse (**Figure 3**)



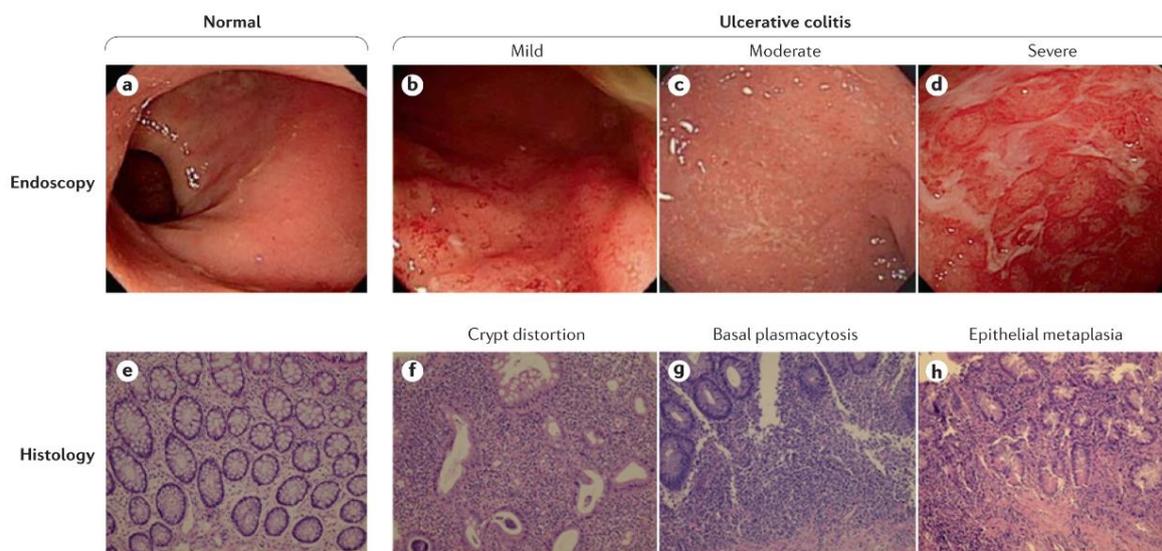
**Figure 3 : Coupe histologique de la muqueuse intestinale.** La muqueuse intestinale humaine est composée d'une simple couche de cellules épithéliales cylindriques, ainsi que de la lamina propria sous-jacente et de la muqueuse musculaire. Des cellules caliciformes, qui synthétisent et libèrent de la mucine, ainsi que d'autres types de cellules épithéliales différenciées, sont présentes. Les jonctions serrées scellent l'espace paracellulaire entre les cellules épithéliales. Les lymphocytes intraépithéliaux sont situés au-dessus de la membrane basale. La lamina propria est située sous la membrane basale et contient des cellules immunitaires, notamment des macrophages, des cellules dendritiques, des plasmocytes, des lymphocytes et, dans certains cas, des neutrophiles. Adapté d'après Jerrold R. Turner et al 2009

Les CE formant l'épithélium intestinal, sont étroitement reliées entre elles par des jonctions intercellulaires (jonctions serrées, adhérentes et desmosomes). La surface apicale des CE est recouverte par le mucus (Peterson et Artis 2014). L'épithélium est constitué d'invaginations appelées « cryptes de Lieberkühn ». Les cellules souches intestinales résident à la base de ces cryptes et sont responsables du renouvellement rapide de l'épithélium intestinal (tous les 4 à 5 jours). La majorité des CE coliques sont des colonocytes. Il existe aussi des CE spécialisées : les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth qui secrètent, respectivement, des mucines, des hormones digestives et des peptides antimicrobiens. Les cellules de Paneth sont principalement situées dans l'intestin grêle, mais elles peuvent être présentes en plus petit nombre dans le ceacum et le côlon transverse (leur présence dans le côlon distal est généralement associée à un état pathologique ) (Tanaka et al. 2001).

L'épithélium intestinal, avec ses différentes cellules spécialisées, est indispensable au maintien de l'homéostasie intestinale. Les dysfonctionnements de cet épithélium sont au cœur de la physiopathologie des MICI, et plus particulièrement de la RCH (Roda 2010; Maloy et Powrie 2011).

### ***Destruction de la barrière épithéliale colique au cours de la RCH :***

Plusieurs études ont montré que le rôle de la CE en tant que barrière dynamique, physique, chimique et immunitaire était perturbé dans la RCH (Gibson 1997; Serigado et al. 2022; Goto et Ivanov 2013). Les lésions de l'épithélium intestinal sont décrites dans les stades très précoces de la maladie alors même que l'épithélium apparaît sain à l'endoscopie (Schulzke et al. 2006). Les lésions histologiques de l'épithélium colique, particulièrement évocatrices de la maladie sont i) une distorsion de l'architecture des cryptes, ii) une diminution de la densité des cryptes, iii) une plasmocytose dans la LP (plasmocytose basale) et iv) une métaplasie des cellules de Paneth (**Figure 4**).



**Figure 4 : Lésions endoscopiques et histologiques de la RCH** a Image endoscopique d'un côlon normal b-c-d Images endoscopiques de côlons de RCH à différents stades de la maladie : un érythème, des saignements, des érosions ou des ulcérations peuvent être observés selon la sévérité de l'inflammation. e histologie normale du côlon f distorsion des cryptes g plasmocytose basale, h métaplasie des CE et déplétion des cellules. Une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine a été réalisée dans les parties e-h, grossissement × 200. D'après (Kobayashi et al. 2020)

Ainsi, ces lésions histologiques, localisées dans l'épithélium intestinal, montrent qu'il existe à la fois une atteinte de la barrière épithéliale et une dérégulation de la réponse immunitaire.

### ***La RCH, une maladie de la barrière intestinale :***

Il est communément admis que la RCH est une maladie de la barrière intestinale provoquée par une anomalie de la CE en elle-même et/ou par un dysfonctionnement structurel de l'épithélium intestinal (**Figure 5, phase I**). Il s'agit de défauts i) de résolution du stress du

réticulum endoplasmique (RE), ii) de la mucosécrétion iii) des facteurs tréfoil et, enfin, iv) des défauts dans les protéines de jonctions entre les CE (Neurath 2014).

Plusieurs études de méta-analyses (GWAS, Genome-wide association study) ont identifié des gènes de susceptibilité à la RCH associés à des défauts de la barrière intestinale. Ainsi, dans le cadre du Wellcome Trust Case Control Consortium 2, une analyse d'association à l'échelle du génome a été menée sur 2 361 patients atteints de RCH et 5 417 témoins (The UK IBD Genetics Consortium et The Wellcome Trust Case Control Consortium 2 2009). Cette étude a permis d'identifier plusieurs gènes impliqués dans la mise en place et la fonction de barrière de l'épithélium intestinal, dont la dérégulation pourrait participer à la physiopathologie de la RCH. Trois gènes, en particulier, ont attiré notre attention : les gènes HNF4A, CDH1 et LAMB1. Ces trois gènes codent respectivement les protéines : HNF4A (hépatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ ), l'E-cadhérine et la laminine  $\beta$ 1. HNF4A est un facteur de transcription régulant la différenciation cellulaire le long de l'axe des cryptes. L'E-cadhérine est une protéine jouant un rôle important dans l'adhésion cellulaire. Alors qu'il existe un risque accru de développer un cancer colorectal chez les patients atteints de RCH, des polymorphismes de CDH1 ont aussi été associés à une susceptibilité au cancer colorectal (Adib et al. 2022). La laminine  $\beta$ 1 a un rôle dans l'adhésion et la différenciation cellulaire. Ainsi ces polymorphismes pourraient favoriser la perte de l'intégrité de la barrière intestinale lors de la RCH.

Des défauts de résolution du stress du RE dans les CE ont aussi été décrit dans la RCH. Le stress du RE est produit par l'accumulation de protéines mal conformées en son sein entraînant l'activation d'une réponse adaptative : la réponse UPR (unfolded protein response) (Ron et Walter 2007). Cette réponse UPR facilite le repliement, l'export et la dégradation des protéines dans des conditions de stress. Il existe des polymorphismes touchant un nucléotide unique (SNP) dans le gène codant pour XBP1 (*X-box binding protein-1*). La protéine XBP1 est impliqué dans de nombreux processus physiologiques, notamment dans l'inflammation. La présence de ce SNP est associée à un risque de développer une MICI (étude menée dans une cohorte de patients comprenant plus de 5 000 contrôles et 4 000 malades) (Kaser et al. 2008).

La perte de la mucosécrétion est aussi un phénomène décrit dans la RCH et est caractéristique de la maladie. La couche de mucus des patients atteints de RCH est plus fine, en particulier dans les zones inflammatoires. Les souris déficientes en MUC2 (MUC2<sup>-/-</sup>) ( la protéine MUC2 est la principale protéine formant le mucus colique ) développent des colites spontanées et sont utilisées comme modèle mimant la RCH humaine (Johansson et al. 2008).

Il a aussi été décrit des défauts dans les facteurs tréfoil (TFF1, 2 et 3), une famille de peptide qui jouent un rôle essentiel dans la protection et la réparation de l'épithélium intestinal

(Podolsky et Isselbacher 1984). Mashimo et al ont montré que les souris dépourvues de TFF3 avaient une altération de la cicatrisation de l'épithélium (Mashimo et al. 1996).

Des défauts des protéines de jonction entre les CE ont aussi été décrits dans plusieurs études (Salim et Söderholm 2011). Il existe notamment une diminution de l'expression des protéines constituant les jonctions serrées (dont les occludines et les claudines) et les molécules d'adhésion jonctionnelle, cependant nous ne savons pas si cette dérégulation est une cause ou une conséquence de la maladie (Zeissig et al. 2007; Krug, Schulzke, et Fromm 2014; Mehta et al. 2015).

Ces anomalies de l'épithélium conduisent à une augmentation de la perméabilité intestinale, et favorisent la translocation des bactéries de la flore commensale vers le milieu intérieur (**Figure 5, phase II**). L'excès de ces interactions entre le microbiote et le système immunitaire (SI) serait à l'origine d'une perte de tolérance vis-à-vis de la flore commensale, et éventuellement associés à une dysbiose (Johansson et al. 2014). En effet, des dysbioses ont été décrites chez les patients atteints de RCH, bien qu'à un degré plus faible que celles décrites dans la MC (Andoh et al. 2011). Là aussi, il est aussi difficile de déterminer si ces dysbioses sont des causes ou des conséquences de la RCH. Certains agents pathogènes dont *Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* entéro-invasif et entéro-adhérent, *Campylobacter spp*, *Clostridium difficile* sont liés à un risque plus élevé d'initiation et/ou de progression de la RCH (Kofla-Dłubacz et al. 2022).

Ainsi, dans la RCH la destruction de barrière la barrière intestinale favorise la translocation des bactéries, entraînant la stimulation des cellules immunitaires et aggravant le processus inflammatoire d'une réponse immunitaire déjà dérégulée dans cette maladie.

### **La RCH, une maladie dysimmunitaire :**

A ces anomalies de l'épithélium intestinal s'ajoutent aussi des anomalies de la réponse immunitaire : la RCH est une maladie dysimmunitaire (**Figure 5, phase III**). En effet, les patients atteints de MICI ont un risque plus élevé de développer d'autres maladies immunitaires chroniques dont le psoriasis, la spondylarthrite ankylosante et la cholangite sclérosante primitive que la population générale (Bernstein, Wajda, et Blanchard 2005). La réponse immunitaire chez ces patients est perturbée à plusieurs niveaux. Des anomalies génétiques impactant la réponse immunitaire sont connues comme prédisposant les patients à développer la maladie. D'autres désordres immunitaires sont aussi décrits dans la littérature, dont i) des voies de signalisation perturbées, ii) une perturbation de la réponse innée (augmentation de l'expression des récepteurs de type Toll (TLR) et un infiltrat massif de

polynucléaires neutrophiles (PNN), iii) un recrutement lymphocytaire massif T et B avec une augmentation des immunoglobulines de type 1 (IgG1).

Plusieurs études génomiques ont permis d'associer des loci chromosomiques spécifiques à la RCH et ainsi d'identifier des gènes candidats impliqués dans le développement des processus inflammatoires. Parmi les très nombreux gènes pointés par ces études, les gènes les plus pertinents codent pour des protéines permettant la reconnaissance et la présentation des antigènes bactériens et la coordination des réponses innées et adaptatives du système immunitaire (Cho 2008).

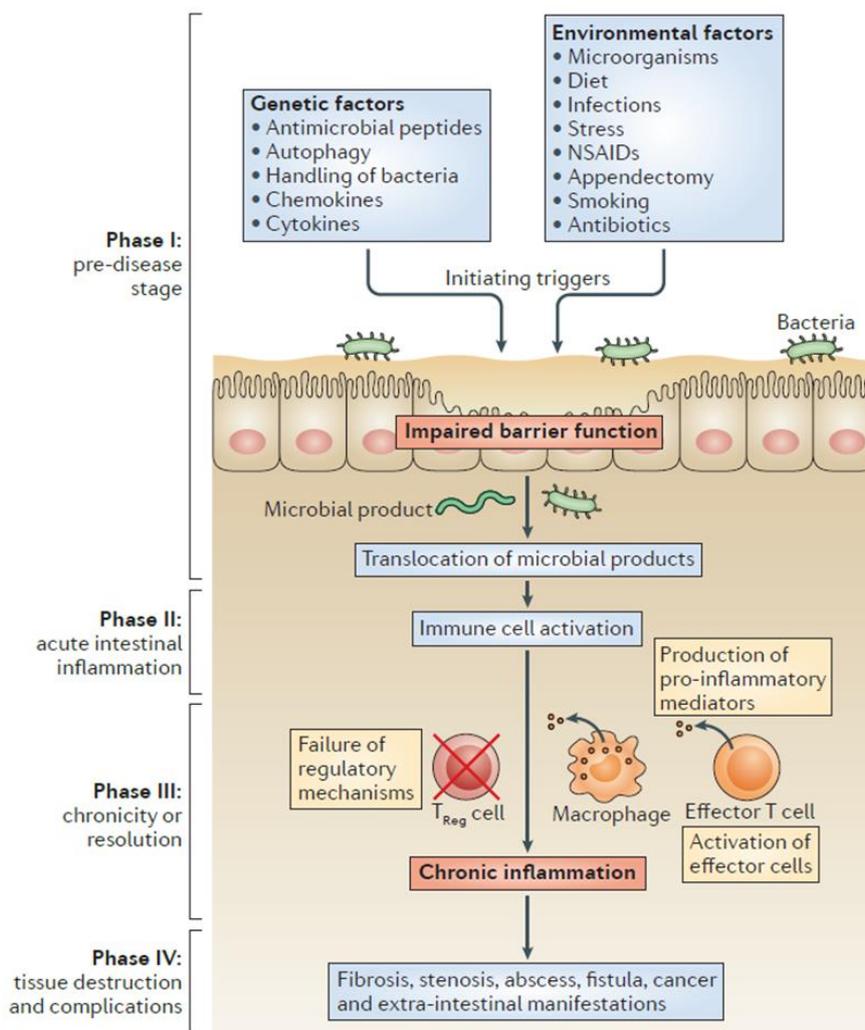
La voie de signalisation NF- $\kappa$ B est aussi dérégulée dans les MICI : une activation constitutive de NF- $\kappa$ B a été trouvée dans l'épithélium en zone inflammatoire chez patients atteints de MICI (Schreiber, Nikolaus, et Hampe 1998). Des polymorphismes et des mutations du gène NFKB1 ont également été associés aux MICI (Karban et al. 2004; Kaustio et al. 2017). Notons que les fonctions de la voie NF- $\kappa$ B sont différentes entre les cellules immunitaires innées et les CE. Contrairement à son rôle pro-inflammatoire dans les cellules myéloïdes, NF- $\kappa$ B a un rôle protecteur dans les CE intestinales et est nécessaire pour maintenir l'intégrité épithéliale et l'homéostasie immunitaire intestinale (Liu et al. 2017).

D'un point de vue mécanistique, cette activation excessive de la réponse immunitaire se traduit par une augmentation du taux de cytokines pro-inflammatoires. Les PNN infiltrent massivement l'épithélium colique lors de la RCH en phase active, aggravant encore davantage les lésions intestinales. Cet infiltrat de PNN est, d'ailleurs, un marqueur de diagnostic de la maladie (Kóvári et al. 2022). Les CE, les cellules mésenchymateuses et les macrophages vont synthétiser des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8 au lieu de TGF- $\beta$  et de PGE2. L'action conjointe de ces cytokines pro-inflammatoires et des antigènes pathogènes reconnus par les cellules dendritiques, vont induire la maturation complète de celles-ci et la synthèse d'IL-12 pro-inflammatoire au lieu de l'IL-10 entraînant la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes T effecteurs. Ces LT effecteurs amplifient l'inflammation en sécrétant à leur tour des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-4 et IL-17). Les cellules dendritiques métabolisent aussi la vitamine A pour produire de l'acide rétinoïque et induire l'expression de l'intégrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 et CCR9 sur les lymphocytes T et B activés. L'intégrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 interagit avec son ligand MadCAM1 exprimé au niveau des vaisseaux sanguins de l'intestin et augmente l'adhésion des lymphocytes à la paroi endothéliale, ce qui favorise leur extravasation du compartiment sanguin vers la muqueuse intestinale. Le récepteur aux chimiokines CCR9, dont le ligand CCL25 est constitutivement exprimé par les CE intestinales, participe à l'attraction des LIE dans l'épithélium. Bien que des défauts d'homing muqueux n'ont pas encore été mis en évidence chez les patients atteints de RCH, le védolizumab,

ciblant l'interaction  $\alpha 4\beta 7$  avec MAdCAM, sont devenues des outils majeurs dans la prise en charge de la RCH.

Les lymphocytes T folliculaires helper sont eux aussi augmentés dans la circulation des patients atteints de RCH (Xue et al. 2019). La réponse des lymphocytes B est également anormale avec, notamment, une expansion des lymphocytes B naïfs et des plasmocytes IgG<sup>+</sup> avec une diversité et une maturation réduites (Uzzan et al. 2022). Les immunoglobulines IgG1 sont augmentées de façon démesurée chez les patients atteints de RCH sans que l'on sache s'il existe une composante auto-immune ou si ce sont des IgG simplement pro-inflammatoires dû à la rupture de la barrière (Ungaro et al. 2017).

En condition physiologique, une lésion aigue de l'intestin entraîne une réponse inflammatoire, puis une cicatrisation visant à réparer les tissus endommagés et à restaurer la structure et les fonctionnalités normales de l'intestin. Cependant, ces mécanismes de résolution échouent en présence de lésions répétées dans la RCH et un cercle vicieux de lésions et de réparation continues se met en place conduisant à une dérégulation de la cicatrisation responsable, notamment, de l'apparition de fibrose (Gordon et al. 2014). Le renouvellement continu de l'épithélium peut aussi conduire à des mutations somatiques : des études montrent l'apparition de mutation somatiques dans les CE des patients atteints de RCH qui participeraient à l'amplification de l'inflammation (Nanki et al. 2020). Ces mutations peuvent aussi être à l'origine de CCR (Ungaro et al. 2017; Olén et al. 2020) (**Figure 5, phase IV**).



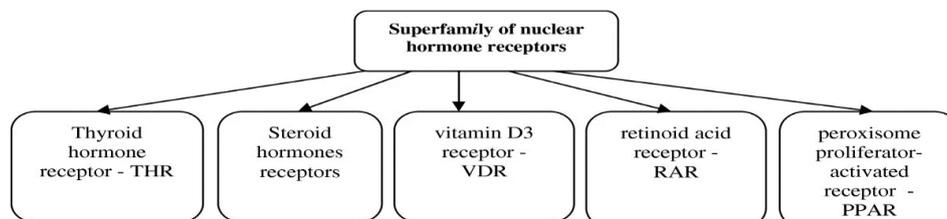
**Figure 5 : Hypothèse étiologique actuelle de la RCH.** Des facteurs génétiques et environnementaux altèrent la barrière intestinale. L'augmentation de la perméabilité intestinale favorise la translocation de bactéries commensales et de produits microbiens de la lumière intestinale dans la paroi intestinale, ce qui active des cellules immunitaires et la production de cytokines. Si l'inflammation aiguë des muqueuses ne peut pas être résolue, une inflammation intestinale chronique se développe. L'inflammation chronique peut entraîner des complications ainsi que la destruction des tissus. DC (cellule dendritique) ; AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens) ; cellule T<sub>Reg</sub>, (cellule T régulatrice). D'après Neurath 2014

Enfin, des travaux de notre laboratoire ont montré que la voie NF- $\kappa$ B, décrite précédemment comme étant aberrante dans la RCH, est régulée négativement par l'activation du récepteur activé par les proliférateurs de peroxydase  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). PPAR $\gamma$  est, par ailleurs, significativement diminué au niveau des CE du côlon chez les patients atteints de RCH (Dubuquoy et al. 2003). Ces résultats suggèrent que l'inflammation chronique lors de la RCH pourrait être due, du moins en partie, à une diminution de l'expression de PPAR $\gamma$  dans le côlon. Cette hypothèse est également appuyée par les résultats obtenus avec un modèle de souris déficientes en PPAR $\gamma$  où les animaux sont fortement prédisposés à développer des lésions intestinales associées à l'ischémie/reperfusion (Nakajima et al. 2001).

## PPAR $\gamma$ , au cours de la RCH :

### Structure et fonction de PPAR $\gamma$ :

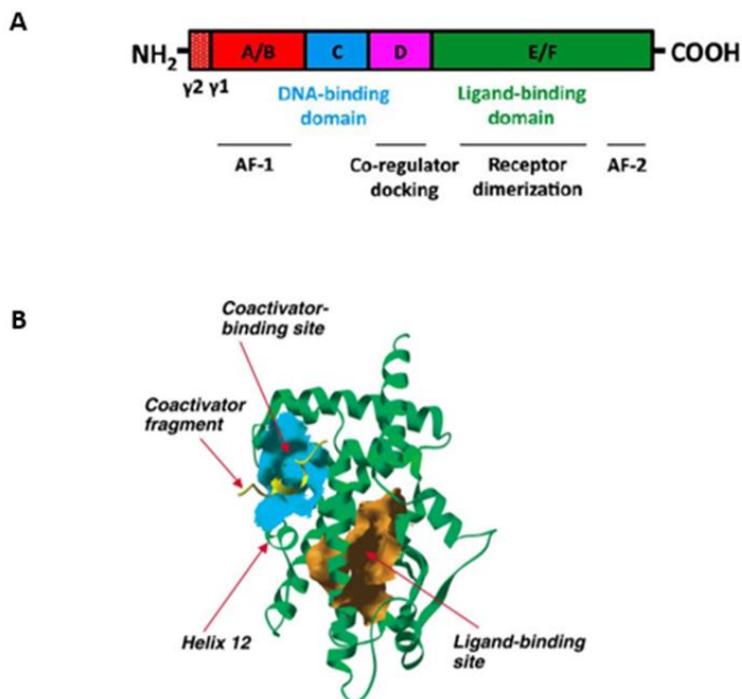
Les PPAR appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires (**Figure 6**). Ces récepteurs sont des facteurs de transcription dont l'activité est modulée par l'interaction avec un ligand spécifique. Les PPAR agissent au niveau moléculaire en modulant la transcription des gènes.



**Figure 6** : La famille des récepteurs nucléaires. d'après Grygiel-Górnjak 2014

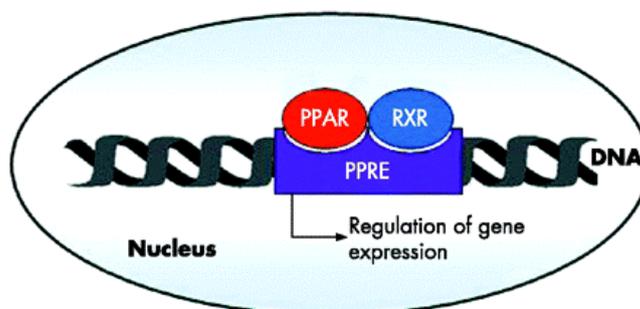
Il existe trois isotypes de PPAR : PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  et PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$ 1 et PPAR $\gamma$ 2 sont deux isoformes de PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$ 2 est exprimé uniquement dans le tissu adipeux alors que PPAR $\gamma$ 1 est exprimé dans les tissu adipeux et dans le côlon. Les différences fonctionnelles entre ces deux isoformes ne sont pas encore entièrement élucidées.

PPAR $\gamma$  a la structure classique des récepteurs nucléaires. Dans l'extrémité N-terminale, la région A/B contient la première fonction d'activation (AF-1), dont l'action est indépendante de la présence d'un ligand. Juxtaposé aux domaines AF-1 se trouve le domaine de liaison à l'ADN (DBD) qui contient deux doigts de zinc nécessaires à la liaison à l'ADN. Le DBD est connecté au domaine de liaison du ligand (LBD) via une région charnière flexible. Le domaine de liaison au ligand (LBD) est situé dans l'extrémité C-terminale (**Figure 7A**). Le LBD est une structure complexe qui est disposée dans un sandwich  $\alpha$ -hélicoïdal contenant 12 hélices  $\alpha$  et 4 éléments de brin  $\beta$  (**Figure 7B**). Le LBD chevauche le domaine AF-2, dont l'action dépend de la présence d'un ligand (Hernandez-Quiles, Broekema, et Kalkhoven 2021). La surface AF-2 est composée de trois éléments structurels de la LBD : l'hélice 3, l'hélice 5 et l'hélice critique 12.



**Figure 7 : La protéine PPAR $\gamma$ .** A) Le domaine A/B hypervariable contient le domaine d'activation indépendant du ligand (région AF-1). Le domaine C contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD). Le domaine D permet un changement de conformation après la liaison du ligand pour favoriser l'amarrage du corégulateur (coactivateur ou corépresseur). La région E/F contient le domaine de liaison au ligand (LBD) et le domaine de la fonction d'activation-AF2. B) Structure cristalline aux rayons X du domaine de liaison au ligand PPAR $\gamma$ . (AF-2). Adapté d'après Wei 2012 et Berger et Moller 2002.

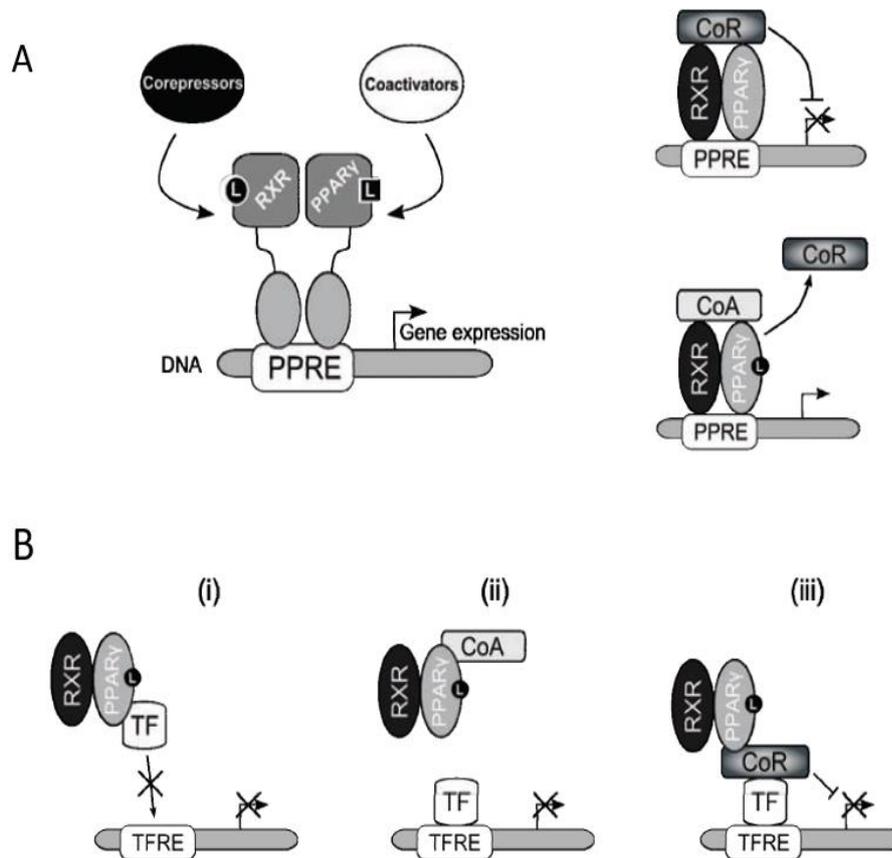
L'activation de PPAR $\gamma$  nécessite une hétérodimérisation avec le récepteur 9-cis-rétinoïque acide (RXR). L'hétérodimère PPAR/RXR se lie à des séquences d'ADN spécifiques situées dans la région promotrice des gènes cibles, appelées élément de réponse aux proliférateurs de peroxyosomes (PPRE) (Berger et Moller 2002) (**Figure 8**). Un PPRE est composé de la répétition d'une séquence consensus : AGGTCA, généralement espacée par un, deux ou trois nucléotides (appelés éléments DR1 et DR2), qui sont situés dans les régions promotrices et activatrices des gènes cible, ici PPAR $\gamma$ .



**Figure 8 : Mécanisme d'action de base des récepteurs PPAR $\gamma$ .** PPAR $\gamma$  est un récepteur nucléaire qui forme un hétérodimère avec le récepteur rétinolde X (RXR) permettant son hétérodimérisation et sa fixation, dans le noyau de la cellule, sur l'élément de réponse proliférateur des peroxyosomes (PPRE). PPAR $\gamma$  peut être activé par différents ligands naturels et synthétiques. Cette liaison régule l'expression des gènes impliqués dans le contrôle de nombreux processus biologiques, en particulier l'inflammation. D'après Dubuquoy et al. 2006

Ainsi, PPAR $\gamma$  régule l'expression d'un gène cible de 3 façons différentes (Bertin et al. 2013) :

- 1) En absence de ligand, l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  se lie au PPRE sur les gènes cibles et favorise des interactions stables avec les complexes corépresseurs (NCoR ou SMRT) qui recrutent des enzymes modifiant la chromatine (les histones désacétylases). Ces derniers rendent la chromatine inaccessible à la liaison des facteurs de transcription ou résistante à leurs actions et répriment ainsi activement la transcription (**Figure 9 A**).
- 2) Lors de la liaison du ligand, l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  subit un changement de configuration qui favorise la libération du corépresseur et le recrutement de coactivateurs (SRC1 et CBP). Les coactivateurs facilitent l'acétylation des queues d'histone, rendent la chromatine moins restrictive, entraînant une activation ligand-dépendant des gènes cibles (**Figure 9 A**).
- 3) Cependant, l'hétérodimère peut également agir sans se fixer sur un PPRE, son action répressive se fait directement sur d'autres facteurs de transcriptions. Parmi ces cibles potentielles, on retrouve les facteurs de transcriptions NF-kB ou encore AP-1, qui sont connus pour être 2 facteurs de transcriptions pouvant activer des gènes codant des cytokines ou molécules « pro-inflammatoires » (**Figure 9 B**).



**Figure 9 : Mécanismes d'action exercés par l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ .** A) PPAR $\gamma$  se lie au récepteur acide 9-cis-rétinoïque (RXR) et l'hétérodimère se lie aux éléments de réponse (PPRE) situés dans les gènes cibles pour activer la transcription. En l'absence de ligand (L), l'hétérodimère PPAR-RXR se lie au PPRE sur les gènes cibles, recrute des complexes de corépresseur et inhibe ainsi la transcription. La liaison du ligand (L) au récepteur induit la libération de complexes corépresseurs (CoR) et le recrutement de complexes coactivateur (CoA) entraînant l'activation transcriptionnelle des gènes sensibles au PPAR $\gamma$ . B) PPAR $\gamma$  peut également bloquer l'expression des gènes par plusieurs mécanismes de trans-répression ligand-dépendant. (i) Il peut interagir avec d'autres facteurs de transcription (TF), interférant ainsi avec leur liaison à leur réponse (TFRE) et l'activation de la transcription de leurs gènes cibles. (ii) PPAR $\gamma$  peut également concurrencer le TF pour les complexes coactivateurs (CoA) empêchant l'activation transcriptionnelle. (iii) PPAR $\gamma$  peut également stabiliser l'interaction entre un facteur de transcription et les complexes corépresseurs maintenant ainsi la structure de la chromatine dans un état répressif et inhibant la transcription des gènes cibles du TF. D'après Bertin et al.2013

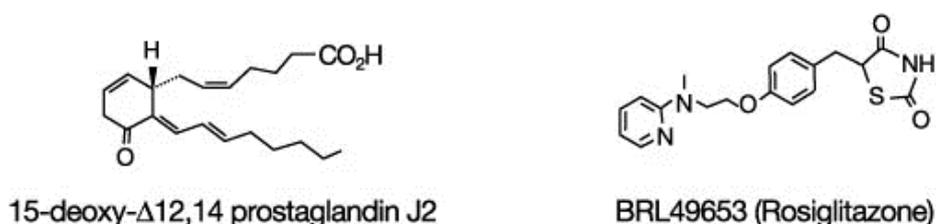
### Les ligands de PPAR $\gamma$ :

Les activités de PPAR $\gamma$  sont modulées par l'interaction avec un ligand. De nombreux ligands naturels et synthétiques de PPAR $\gamma$  sont connus (**Figure 10**). La reconnaissance du ligand par son récepteur nucléaire se fait par une reconnaissance spécifique de la structure chimique de ce dernier. La fixation du ligand va permettre la stabilisation de l'hélice 12 (qui contient l'AF-2) à l'état actif. Cette hélice 12 ne possède pas uniquement une position active et inactive : elle possède également des positions intermédiaires. Ces positions intermédiaires expliquent la grande variabilité des réponses pharmacologiques en fonction des ligands. La fonction des PPAR est aussi modifiée par un certain nombre de co-activateurs et de

corépresseurs, dont la présence peut respectivement stimuler ou inhiber la fonction des récepteurs

Ainsi, les ligands qui activent PPAR-RXR provoquent un échange de co-répresseurs contre des co-activateurs (**Figure 9A**). Les agonistes stabilisent un état actif de l'AF-2 en formant des liaisons hydrogène avec des résidus proches de l'hélice 12. Les agonistes complets forment une liaison hydrogène critique avec la chaîne latérale de Y473 sur l'hélice 12 pour renforcer la liaison avec le coactivateur, ils induisent donc une activation transcriptionnelle. Les antagonistes ne stabilisent pas l'hélice 12 et affichent des changements négligeables dans l'activation (Choi et al. 2011).

Les ligands naturels de PPAR $\gamma$  comprennent un certain nombre d'acides gras et de dérivés d'eicosanoïdes (Grygiel-Górniak 2014). Les agonistes synthétiques les plus largement utilisés de PPAR $\gamma$  sont des membres d'une classe d'agents antidiabétiques appelés thiazolidinediones, dont fait partie la rosiglitazone.

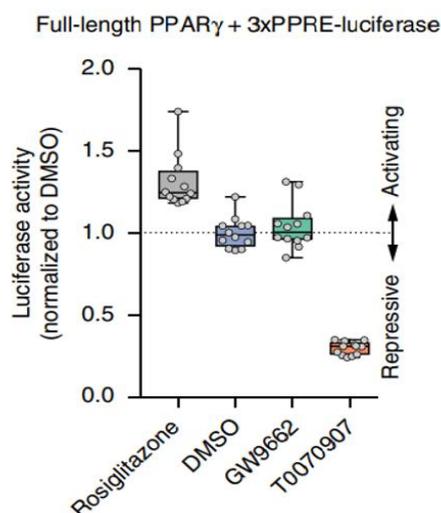


**Figure 10 : Structure de la Rosiglitazone de PPAR $\gamma$  d'après Kersten, Desvergne, et Wahli 2000**

Les thiazolidinediones (TZD) ou glitazones, des agonistes de PPAR $\gamma$ , augmentent la sensibilité à l'insuline et ont été utilisés dans le traitement du diabète de type 2 (Dumasia et al. 2005) avant d'être retirés du marché en 2011 en raison d'une balance bénéfice-risque défavorable. Ces nombreux effets indésirables (risque cardiovasculaire pour la rosiglitazone et, risque de cancers de la vessie pour la pioglitazone même si ce dernier est encore débattu) s'expliquent par les actions pléiotropes encore mal connues de PPAR $\gamma$  dans l'organisme.

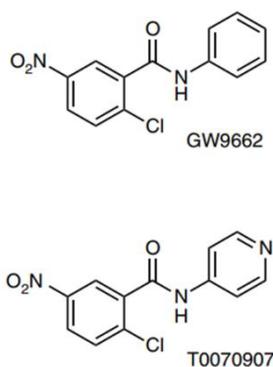
Il existe aussi des antagonistes synthétiques de PPAR $\gamma$  dont le GW9662, un antagoniste compétitif, et le T0070907, un agoniste inverse. Rappelons qu'un antagoniste est une molécule qui bloque ou diminue l'effet physiologique d'une autre molécule. L'antagoniste ne possédant pas de propriétés sur le récepteur, il empêche la fixation d'un ligand endogène. Un agoniste inverse est un agent qui interagit avec le même récepteur qu'un agoniste de ce même récepteur mais qui va produire l'effet pharmacologique opposé. En présence d'un agoniste, un agoniste inverse aura donc un effet inhibiteur supérieur à un antagoniste puisqu'il pourra à la fois inhiber l'effet agoniste et l'effet basal. Ainsi, dans un modèle *in vitro* où les cellules ont un PPRE en amont du gène de la luciférase (3xPPRE-luciférase), le T0070907 réprime la transcription du gène luciférase, tandis que le GW9662 n'a pas affecté la transcription du gène

luciférase par rapport aux cellules traitées avec le véhicule, le DMSO (Brust et al. 2018; Leesnitzer et al. 2002) (**Figure 11**).



**Figure 11 :** Test de transcription cellulaire sensible à l'activation et à la répression montrant l'effet des ligands PPAR $\gamma$  agoniste (rosiglitazone), antagoniste (GW9662) et agoniste inverse (T0070907) (5  $\mu$ M) dans les cellules HEK293T. D'après Brust et al.2018

Le GW9662 et le T0070907 (**Figure 12**) modifient, tous les deux, de manière covalente le domaine de liaison du ligand et inhibent ainsi de manière irréversible la liaison du ligand et l'activation de PPAR $\gamma$  (Leesnitzer et al. 2002) Ainsi le T0070907 empêche les interactions induites par les agonistes entre le LBD et les peptides dérivés du coactivateur de la même façon que le GW9662 mais contrairement à ce dernier, il favorise aussi le recrutement du peptide dérivé du corépresseur (NCoR). Le carbone dans le groupe phényle du GW9662, lui, ne permet pas les interactions avec le corépresseur.



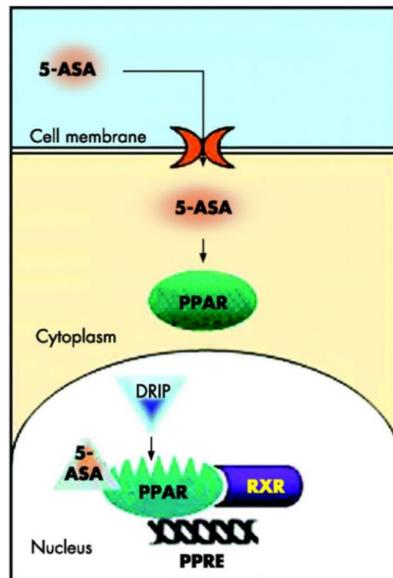
**Figure 12 :** Structure chimique du GW9662 (2-Chloro-5-nitro-N-4-phénylbenzamide) et de T0070907 (2-Chloro-5-nitro-N-4-pyridinyl-benzamide). GW9662 et T0070907 contiennent la même structure 2-chloro-5-nitro-N-phénylbenzamide mais diffèrent par un simple changement d'atome : le carbone dans le groupe phényle du GW9662 est remplacé par un groupe pyridyle contenant de l'azote dans le T0070907, d'après Brust et al. 2018.

### **Le rôle de PPAR $\gamma$ dans la RCH :**

Le côlon est le 2<sup>e</sup> organe, derrière le tissu adipeux, exprimant le plus PPAR $\gamma$ . Ce sont les CE du côlon qui expriment principalement PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$  étant exprimé dans une moindre mesure dans les macrophages et les lymphocytes de la muqueuse colique). Il existe un gradient d'expression de PPAR $\gamma$  : son expression est maximale au niveau du côlon distal puis diminue progressivement vers le côlon proximal et est beaucoup plus faible dans l'intestin grêle (W. Su et al. 2007). L'expression de PPAR $\gamma$  est limitée à la couche de l'épithélium de surface avec une expression faible, voire nulle, dans les cryptes des cellules coliques. Rappelons que les lésions de la RCH sont le plus souvent superficielles et débutent dans le rectum et peuvent s'étendre sur l'ensemble du colon sans jamais atteindre d'autres segments du tube digestif, ce qui peut laisser présager un rôle de PPAR $\gamma$  dans la physiopathologie de la maladie. Les mécanismes moléculaires sous-jacents responsables de la distribution spatiale de l'expression de PPAR $\gamma$  ainsi que de la régulation du promoteur de PPAR $\gamma$  dans les CE sont encore inconnus.

L'analyse de l'expression de PPAR $\gamma$  par RT-PCR, Western blot, et par immunohistochimie (IHC) dans le côlon des patients atteints de RCH a montré une diminution de PPAR $\gamma$  par rapport aux témoins (Dubuquoy et al. 2003). En 2011, Yamamoto-Furusho et al. a également décrit une expression réduite de l'ARNm de PPAR $\gamma$  (Jesús K. Yamamoto-Furusho et al. 2011). L'expression de PPAR $\gamma$  semble aussi être diminuée dans la muqueuse des patients avec une RCH active par rapport à ceux en rémission, ce qui suggère une corrélation négative entre PPAR $\gamma$  et la progression de la maladie (J. K. Yamamoto-Furusho et al. 2014) . L'origine de ce déficit n'est pas encore totalement comprise : une équipe a suggéré que ce déficit d'expression de PPAR $\gamma$  dans les colonocytes peut être favorisé par un déficit en production de cortisol (Bouguen et al. 2015).

Plusieurs résultats suggèrent que PPAR $\gamma$  est impliqué dans la physiopathologie de la RCH. Le premier argument est que l'effet anti-inflammatoire du 5-ASA, un traitement de première ligne de la RCH, est dépendant de l'expression de PPAR $\gamma$  (Ricote et al. 1998; Rousseaux et al. 2005). En effet, les souris hétérozygotes PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$  <sup>+/-</sup>) sont réfractaires à la thérapie 5-ASA. En utilisant la lignée cellulaire épithéliale du côlon HT-29, l'équipe de Rousseau et al a découvert que le 5-ASA induisait l'expression de PPAR $\gamma$ . Le 5-ASA est capable de se lier à PPAR $\gamma$ , d'induire sa translocation du cytosol des CE vers le noyau, de favoriser son changement conformationnel et de recruter un coactivateur (DRIP) conduisant à l'activation du PPRE (**Figure 13**).



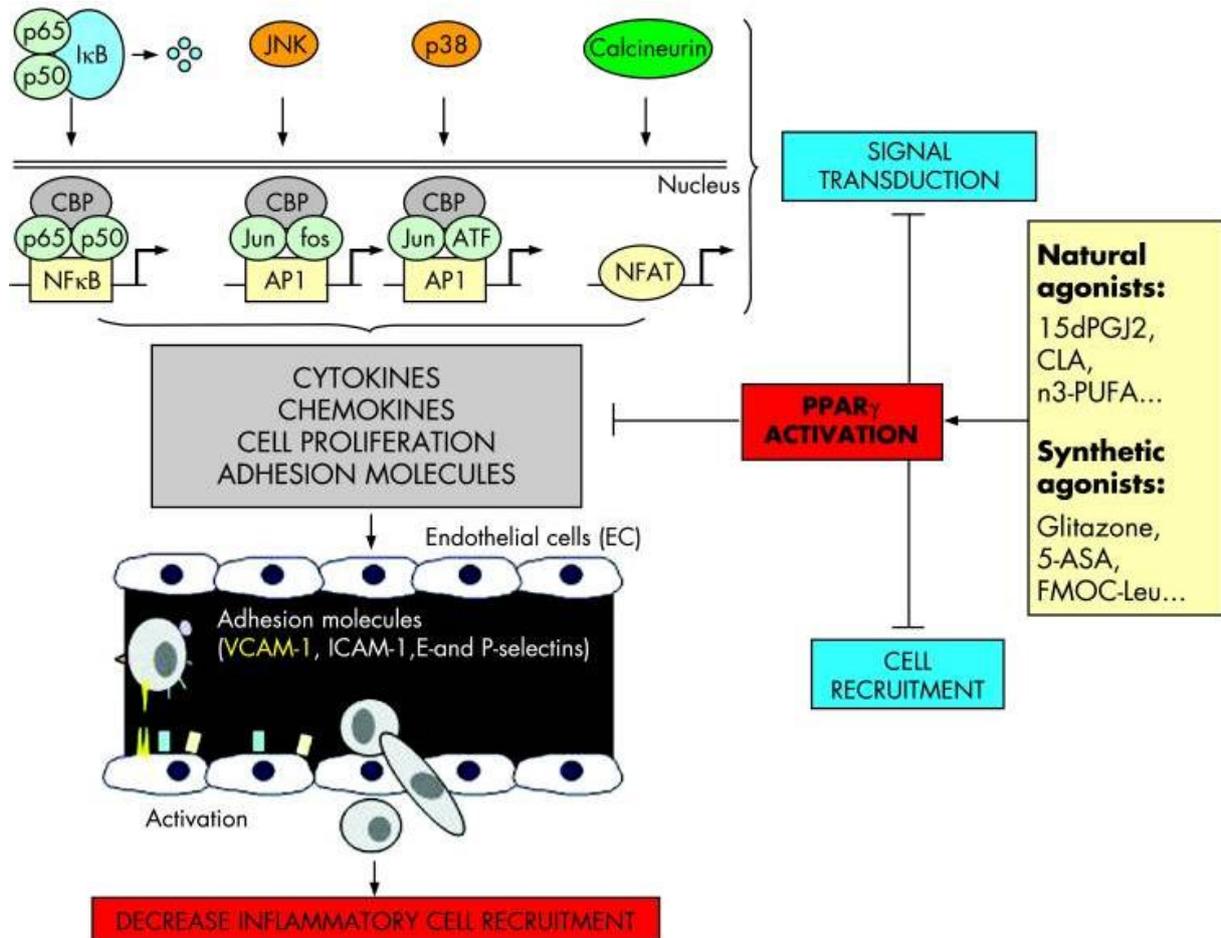
**Figure 13 : Mécanismes moléculaires de l'activation PPAR $\gamma$  par le 5-ASA.** Après administration, le 5-ASA traverse la membrane cellulaire de la CE par l'intermédiaire d'un transporteur et se lie au PPAR $\gamma$  dans le cytoplasme. Le 5-ASA induit alors sa translocation nucléaire, favorise un changement de conformation de PPAR $\gamma$ , et recrute le coactivateur DRIP, conduisant à la formation d'un hétérodimère entre PPAR $\gamma$  et le RXR et à l'activation des PPRE. D'après Dubuquoy et al 2006

Plusieurs travaux, dont certains de notre laboratoire, ont montré le rôle anti-inflammatoire des agonistes de PPAR $\gamma$  dans des modèles de colite murine et dans le traitement de la RCH chez l'Homme. Les TZD (troglitazone et la rosiglitazone) ont réduit la gravité de la maladie chez les souris atteintes de colite par rapport au groupe traité par placebo (C. G. Su et al. 1999). Ces résultats ont été confirmés et étendus plusieurs mois plus tard dans un autre modèle de colite expérimentale induite chez la souris par administration d'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS). Les TZD ont réduit l'intensité des lésions macroscopiques et histologiques, et les niveaux de marqueurs biologiques de l'inflammation du côlon, dont les voies NF $\kappa$ B et les kinases de stress impliquées dans la transduction de l'inflammation (Desreumaux et al. 2001). De très nombreuses études ont rapporté des résultats similaires à ceux décrits dans cette revue (L Dubuquoy 2006).

Des essais cliniques ont aussi montré le rôle anti-inflammatoire des agonistes de PPAR $\gamma$  dans le traitement de la RCH, chez l'Homme. Au début des années 2000, Lewis JD et al. a réalisé la première étude pilote utilisant un ligand PPAR comme traitement de la RCH (Lewis et al. 2001). L'objectif était d'évaluer l'efficacité de la rosiglitazone en tant que nouvel agent anti-inflammatoire pour le traitement de la RCH. 15 patients atteints de RCH légère à modérée réfractaire au 5-ASA ainsi qu'aux traitements conventionnels (corticoïdes et agents immunosuppresseurs) ont été recrutés. Après 12 semaines de traitement, une diminution d'activité de la maladie a été rapportée avec une rémission clinique obtenue chez quatre des 15 patients (27%). Parmi eux, trois ont également eu une rémission endoscopique (20 %). Ces résultats ont été reproduits en 2008 par la même équipe avec un essai clinique multicentrique en double aveugle comparant l'efficacité de la rosiglitazone versus placebo pendant 12

semaines chez 105 patients atteints de troubles légers à modérés. Après 12 semaines de traitement, la rémission clinique a été atteinte chez 9 patients (17%) traités par rosiglitazone et 1 patient (2%) traité par placebo. Les événements indésirables graves étaient rares. Comme prévu, la prise de poids et les œdèmes étaient plus fréquents dans le groupe rosiglitazone et aucune lésion hépatique ou insuffisance cardiaque significative n'a été observée dans cette étude (Lewis et al. 2008). Cependant, comme mentionné précédemment, des inquiétudes subsistent quant à la sécurité de l'utilisation des ligands de PPAR $\gamma$ . En 2010, la haute autorité de santé (HAS) a publié un avis défavorable au remboursement de la rosiglitazone dans la prise en charge du diabète de type 2 en raison de l'augmentation du risque d'insuffisance cardiaque et d'événements liés à une ischémie myocardique, en particulier d'infarctus du myocarde, ce qui a, aussi, arrêté les essais cliniques de la rosiglitazone dans le traitement de la RCH.

Les effets anti-inflammatoires des agonistes de PPAR $\gamma$  sont associés à leur capacité d'interférer avec les voies de signalisations inflammatoires en agissant sur les kinases et les facteurs de transcription, tels que le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), c-Jun, c-Fos, et le facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT) (**Figure 14**) (L Dubuquoy 2006). Ces interactions entraînent une inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) (Desreumaux et al. 2001), de chimiokines (Marx et al. 2000), de la prolifération des cellules inflammatoires (Harris et Phipps 2001) et de l'expression de certaines molécules d'adhésion vasculaire (Jackson et al. 1999) (**Figure 14**). Ainsi les agonistes de PPAR $\gamma$  diminuent l'activation nucléaire des réponses inflammatoires intestinales notamment, en diminuant l'activité de NF- $\kappa$ B.



**Figure 14 : Effets de PPAR $\gamma$  sur les voies de signalisation inflammatoires.** PPAR $\gamma$  inhibe la voie de signalisation NF $\kappa$ B par des interactions avec la protéine inhibitrice appelée I $\kappa$ B, et CBP, un coactivateur de p65. La voie MAPK est également régulée par PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$  diminue l'activation de JNK et p38 et inhibe les facteurs de transcription c-jun, c-fos et le facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT). La régulation de ces principales voies de signalisation entraîne une inhibition de la production de cytokines et de chimiokines, de la prolifération cellulaire et de l'expression des molécules d'adhésion (principalement VCAM-1), qui diminuent le recrutement des cellules inflammatoires dans les tissus enflammés. 15dPGJ2, 15-désoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandine J2; AGPI, acides gras polyinsaturés ; 5-ASA, acide 5-aminosalicylique. D'après Dubuquoy et al. 2006

Au vu des effets pléiotropiques de PPAR $\gamma$ , nous pouvons nous demander si les agonistes de PPAR $\gamma$  ont un effet thérapeutique sur la RCH autrement qu'en diminuant l'activité de NF- $\kappa$ B. L'équipe de Annicotte et al a mis en évidence l'existence d'un PPRE de PPAR $\gamma$  sur le promoteur du gène CDH1, codant pour la protéine E-cadhérine (Annicotte et al. 2006). Cette équipe a montré que CDH1 contient un PPRE fonctionnel sensible à PPAR $\gamma$  en présence d'inhibiteurs des histones déacétylases *in vitro* sur la lignée PC3 (lignée cellulaire humaine de carcinome de la prostate). La même équipe a aussi montré que l'utilisation d'agoniste de PPAR $\gamma$  augmentait l'expression de l'ARN et de la protéine E-cadhérine sur les lignées PC3 en présence d'acide valproïque (un inhibiteur des histones déacétylases). Or, comme vu précédemment, il a été montré que la mésalazine activait les récepteurs de PPAR $\gamma$  (Khare et al. 2019). Fait intéressant, le 5-ASA augmente aussi la N-glycosylation et *in fine* l'expression membranaire de l'E-cadhérine *in vitro* sur des lignées cellulaires HT-29 (Khare et al. 2019). L'équipe de Yang et al. a, aussi, démontré par des techniques d'IHC, de western-blot et RT-

qPCR que les agonistes de PPAR $\gamma$  permettaient d'augmenter l'expression de l'E-cadhérine *in vitro* sur des cellules primaires épithéliales nasales (P. Yang et al. 2019).

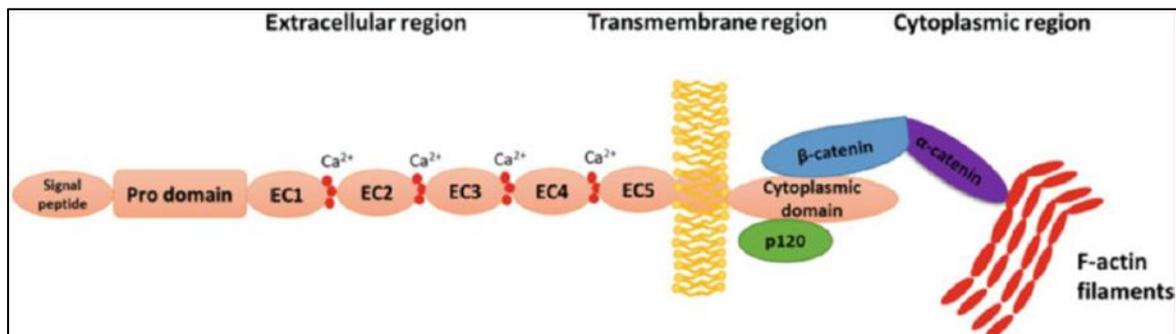
Ainsi, notre hypothèse est que les effets thérapeutiques des agonistes de PPAR $\gamma$  pourraient s'expliquer par sa liaison sur le PPRE du gène CDH1. L'E-cadhérine est la principale constituante des jonctions adhérentes, elle participe donc au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. Mais cette protéine n'a pas uniquement un rôle architectural. Son interaction avec l'intégrine  $\alpha E\beta 7$  ( $\alpha E$  est aussi nommée CD103) permet la rétention et l'activation des lymphocytes intraépithéliaux (LIE), une population de lymphocytes T résidents mémoires, dans l'épithélium intestinal (Olivares-Villagómez et Van Kaer 2018). La diminution de l'E-cadhérine est aussi un marqueur de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un processus impliqué dans la fibrose et le cancer (J. Yang et al. 2020). Ainsi, en se fixant sur le PPRE de CDH1 et en augmentant, *in fine*, l'expression de l'E-cadhérine, les agonistes de PPAR $\gamma$  participeraient au maintien des jonctions entre les cellules épithéliales, à l'immunosurveillance et préviendraient les complications à long terme de la RCH.

## **Rôle de l'E-cadhérine dans le maintien de la barrière intestinale :**

### ***L'E-cadhérine, principale constituante des jonctions adhérentes :***

Les jonctions adhérentes (JA) ou autrement appelées zonula-adherens permettent d'associer des éléments du cytosquelette d'une cellule à ceux d'une cellule adjacente au niveau de sites de liaison aux filaments d'actine (Mehta et al. 2015). Dans ces jonctions, des protéines transmembranaires d'adhérences, les cadhérines, sont enchâssées dans les membranes de chacune des cellules, et se font face dans l'espace intermembranaire. Les mécanismes d'adhérence des JA, complexes et en partie inconnus, sont dépendants de la présence du calcium. Cette spécificité a d'ailleurs donné leurs noms aux cadhérines : « Ca » pour calcium et « Adherin » pour adhésion en grec. Il existe une trentaine de cadhérines différentes, dont l'expression est spécifique à certains tissus. L'E-cadhérine est retrouvée dans les tissus épithéliaux. C'est une glycoprotéine transmembranaire avec quatre domaines extracellulaires (domaine EC) s'étendant de EC1 à EC4, un domaine extracellulaire proximal membranaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (**Figure 15**). Les 4 domaines EC contiennent des motifs chargés négativement qui peuvent se lier à trois molécules de Ca $^{2+}$ , renforçant ainsi les interactions entre les domaines extracellulaires. Le domaine cytoplasmique permet de renforcer la capacité adhésive en reliant la cadhérine plus ou moins directement au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des caténines, mais aussi en permettant l'interaction avec différentes protéines impliquées dans des voies de signalisation (notamment les voies Wnt,  $\beta$ -caténine, PI3K, Akt, Rho GTPase et NF- $\kappa$ B). Le

le complexe E-cadhérine est composé de sous-unités comprenant l' $\alpha$ -caténine, la  $\beta$ -caténine, la  $\gamma$ -caténine et la p120-caténine (Suzuki et Hirano 2016).



**Figure 15 : L'E-cadhérine et son interaction avec le cytosquelette.** L'E-cadhérine est une protéine transmembranaire. Le segment extracellulaire est composé de quatre motifs « cadhérine », nommés EC1 à EC4 depuis l'extrémité N-terminale. Trois ions calcium se lient entre deux motifs successifs. Le domaine cytoplasmique permet de renforcer la capacité adhésive de la cadhérine grâce à deux séquences conservées lui permettant d'interagir avec différentes caténines ( $\beta$ -caténine et p120). D'après Tiwari et al. 2018

### **L'E-cadhérine serait diminuée dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH :**

Plusieurs équipes, dont la nôtre, ont émis l'hypothèse que l'E-cadhérine pourrait être une cible thérapeutique de la RCH. En effet, deux études suggèrent que l'expression de l'E-cadhérine est diminuée dans la muqueuse intestinale des patients atteints de RCH (Zhao et al. 2015; Karayiannakis et al. 1998). En 1998, l'équipe de Karayiannakis et al a montré par IHC, sur des prélèvements provenant de pièces opératoires de patients, que l'expression de l'E-cadhérine était réduite dans la RCH et que son expression était deux fois plus faible dans l'épithélium colique lors des phases actives par rapport aux phases inactives de la maladie. Toutefois, une limite de ce travail est que cette équipe a évalué uniquement visuellement les différences d'intensité de marquage (même si cette évaluation a été faite par 3 observateurs différents) (Karayiannakis et al. 1998). En 2015, l'équipe de Zhao et al a montré une diminution de l'E-cadhérine dans les RCH actives par RT-qPCR, western-blot et IHC en travaillant sur des biopsies de patients (Zhao et al. 2015). Ils n'ont pas retrouvé une diminution de l'E-cadhérine dans les prélèvements provenant de RCH en phase active par IHC et RT-qPCR. Les résultats préliminaires de notre équipe, démontrés par RT-qPCR, vont aussi dans le sens d'une diminution de son expression dans la muqueuse intestinale de ces patients. Fait intéressant, nous n'avons pas retrouvé une diminution de l'E-cadhérine chez les patients atteints de la MC, suggérant que la diminution de l'E-cadhérine observée serait bien en lien avec la RCH et non pas seulement dû à l'inflammation chronique du tube digestif.

### ***Polymorphismes génétiques dans les gènes codant et régulant l'expression de l'E-cadhérine :***

Comme décrit plus haut, parmi les gènes de susceptibilité de la RCH, certains codent des protéines impliquées dans l'intégrité de la barrière intestinale, dont la protéine E-cadhérine. Des associations entre la RCH et des polymorphismes génétiques impliquant des gènes régulant son expression (HNF4A et 1ORF106) ont aussi été établies (The UK IBD Genetics Consortium et The Wellcome Trust Case Control Consortium 2 2009). Dans les modèles murins, la délétion du gène CDH1 entraîne des modifications de la forme des CE et de la morphologie des villosités, des altérations de la barrière intestinale, et enfin des perturbations de la prolifération et de la différenciation des CE (Bondow et al. 2012).

### ***La diminution de l'E-cadhérine est responsable d'une augmentation de la perméabilité intestinale :***

Plusieurs études ont démontré l'importance de l'E-cadhérine dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. Les interactions entre les CE étant assurées principalement par l'E-cadhérine via les JA, la perte aiguë d'E-cadhérine dans des modèles murins entraîne une diarrhée sanglante et des décès fréquents de ces animaux en quelques jours en raison de la perturbation de l'architecture épithéliale intestinale (Grill et al. 2015). L'inactivation spécifique du gène CDH1 dans l'épithélium intestinal via un système Villin-Cre, a entraîné des diarrhées provoquant une maladie potentiellement mortelle dans les 6 jours (dans un modèle murin) (Grill et al. 2015). La perte d'E-cadhérine a conduit les cellules à migrer plus rapidement le long de l'axe crypte-villosité et à perturber la différenciation cellulaire. La maturation et le positionnement des cellules caliciformes et des cellules de Paneth ont été gravement perturbés. Les souris ont aussi montré une déficience dans l'élimination des bactéries entéropathogènes de la lumière intestinale (Schneider et al. 2010). Une étude menée à l'aide de CE dérivées d'organoïdes coliques C1orf106<sup>-/-</sup> a montré une diminution des niveaux de E-cadhérine de surface et une augmentation des niveaux intracellulaires. De plus, les monocouches cellulaires C1orf106<sup>-/-</sup> présentaient une perméabilité accrue dans les essais de perméabilité à la luciférase et de résistance électrique transépithéliale (Mohan et al. 2018).

### ***La diminution de l'E-cadhérine entrainerait une diminution de l'immunosurveillance :***

L'interaction E-cadhérine avec l'intégrine  $\alpha E\beta 7$  permet la rétention et l'activation des lymphocytes intraépithéliaux (LIE) (Schon et al. 1999). Une étude récente a montré dans un modèle murin de cancers spontanés (APC<sup>min</sup>) que l'immunosurveillance des tumeurs par les LIE étaient dépendante de l'interaction CD103/E-cadhérine (Morikawa et al. 2021). Ainsi la diminution de l'E-cadhérine entrainerait une diminution de l'immunosurveillance et pourrait être un des facteurs favorisant le développement de CCR, une complication connue de la RCH.

### ***La diminution de l'E-cadhérine est un marqueur de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) :***

La diminution de l'E-cadhérine est aussi un marqueur d'EMT. L'EMT est un processus par lequel les CE différenciées subissent une conversion phénotypique en acquérant un phénotype de cellules mésenchymateuses (J. Yang et al. 2020). Outre leurs morphologies allongées, ces cellules ont une capacité migratoire et une production accrue de composants de la matrice extracellulaire. L'EMT est souvent étudiée en observant le taux de certaines protéines : la diminution de l'E-cadhérine et EpCam comme marqueurs épithéliaux et l'augmentation de la Vimentine et N-Cadhérine comme marqueurs mésenchymateux.

Il existe trois sortes différentes d'EMT: L'EMT de type 1 joue un rôle essentiel dans le développement embryonnaire et le développement des organes. L'EMT de type 2 est associée à la réparation en réponse à une inflammation, cette réparation peut être aberrante et évoluer vers la fibrose (Marconi et al. 2021). Lors de la RCH, la diminution de l'E-cadhérine pourrait être en lien avec des défauts de cicatrisation de la muqueuse (Gordon et al. 2014). L'EMT de type 3, quant à elle, est impliquée dans la progression du cancer, et peut être un marqueur de métastase lors de la progression des cancers disséminés (Craene et Berx 2013). En effet, une diminution de l'expression de l'E-cadhérine a aussi été décrite comme étant un mécanisme facilitant la motilité cellulaire en réduisant l'adhérence cellule-cellule (Demetter et al. 2000), et en favorisant la progression tumorale (Christou et al. 2017). En général, la perte ou l'expression hétérogène de l'E-cadhérine est liée aux stades avancés du cancer colorectal, à la progression et à la différenciation, aux métastases et à un mauvais pronostic (Bendardaf et al. 2019). Là aussi, la diminution de l'E-cadhérine pourrait être en lien avec l'augmentation du risque de développer un cancer colorectal chez les patients de RCH.

### ***Régulation de l'expression de l'E-cadhérine :***

Les mécanismes de dysfonctionnement ou la dérégulation de l'expression de l'E-cadhérine peuvent être génétiques, épigénétiques, transcriptionnels ou post-traductionnels (Tiwari et al. 2018) .

En ce qui concerne les modifications génétiques, comme vu précédemment, il existe un polymorphisme chez les patients atteints de RCH à proximité du gène CDH1, codant pour l'E-cadhérine et dans les gènes régulant son expression (HNF4A et 1ORF106) (The UK IBD Genetics Consortium et The Wellcome Trust Case Control Consortium 2 2009). Il a été montré que ces gènes régulent la stabilité des jonctions adhérentes entre les CE de la barrière intestinale en contrôlant les niveaux de E-cadhérine (Mohan et al. 2018).

Au niveau épigénétique, la diminution de l'E-cadhérine a déjà été associée à une inhibition de la transcription de CDH1 par méthylation du promoteur (Bex et al. 1995). Cette méthylation

du promoteur favoriserait un phénotype malin dans les CE des patients atteints de RCH au long cours. La méthylation du promoteur de CDH1 a été mise en évidence dans 93% des biopsies avec des lésions cancéreuses chez des patients atteints de RCH au long cours, cela par technique de RT-qPCR spécifique à la méthylation. Alors que seulement 6% des biopsies sans lésions cancéreuses de patients atteints de RCH au long cours avaient une méthylation dans le gène CDH1 (Azarschab et al. 2002). De plus, les échantillons avec des lésions cancéreuses présentaient une diminution de l'expression de l'E-cadhérine, alors que les échantillons sans lésions cancéreuses n'avaient pas de diminution de l'expression de cette protéine.

Certaines modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation et la glycosylation, peuvent aussi affecter la fonctionnalité de la protéine E-cadhérine au cours de la RCH. Comme vu, plus haut, le 5-ASA favorise l'expression membranaire de la E-cadhérine dans les CE en augmentant sa glycosylation (Khare et al. 2019).

L'ensemble de ces résultats :

- L'existence de polymorphismes génétiques impliquant les gènes codants (CDH1) et régulant l'expression de l'E-cadhérine (HNF4A et 1ORF106),
- Son rôle dans le maintien de la barrière intestinale, l'immunosurveillance et dans l'EMT
- Des résultats préliminaires suggérant une diminution dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH

Evoque un rôle central de l'E-cadhérine dans la physiopathologie de la RCH et suggère que la modulation de l'expression de l'E-cadhérine pourrait être une cible thérapeutique. Ainsi, si l'E-cadhérine est effectivement diminuée, il est important de comprendre comment afin de pouvoir normaliser son expression.

# Objectif du projet de recherche :

Dans ce travail nous avons étudié l'expression de PPAR $\gamma$  et de l'E-cadhérine dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH. Nous nous sommes appuyés sur :

- des travaux initiés dans notre laboratoire qui montraient une diminution de PPAR $\gamma$  dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH (Dubuquoy et al. 2003)
- des résultats préliminaires de la littérature suggérant une diminution de l'expression de l'E-cadhérine dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH (Zhao et al. 2015; Karayiannakis et al. 1998)
- et l'existence d'un PPRE de PPAR $\gamma$  dans le promoteur du gène CDH1 (Annicotte et al. 2006)

Notre hypothèse de travail était donc que la diminution de l'expression de PPAR $\gamma$  entraînerait moins de fixations de l'hétéromère PPAR $\gamma$ /RXR sur le PPRE dans le promoteur de CDH1 et donc moins d'activation de la transcription du gène CDH1 et *in fine* une diminution de l'expression de l'E-cadhérine. Les conséquences de cette diminution de l'E-cadhérine seraient une augmentation de la perméabilité intestinale et une diminution de l'immunosurveillance. Ces effets pourraient aussi expliquer les complications de la RCH au long terme comme la fibrose et le cancer colorectal.

Les travaux présentés ont donc cherché à confirmer la diminution de l'expression de PPAR $\gamma$  et surtout, de l'E-cadhérine dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH. Nous nous sommes assurés qu'il existait une corrélation positive entre l'expression de PPAR $\gamma$  et de l'E-cadhérine. Pour cela, l'expression de l'E-cadhérine a été étudiée dans des prélèvements coliques de patients atteints de RCH et de prélèvements coliques provenant de patients opérés pour autre indication qu'une MICI. Nous avons aussi un contrôle inflammatoire avec des prélèvements coliques provenant de patients atteints d'une MC pour nous assurer que nos résultats ne sont pas uniquement liés à l'inflammation caractéristiques des MICI.

Puis, nous nous sommes demandé si la corrélation entre PPAR $\gamma$  et l'E-cadhérine pouvait indiquer un lien de cause à effet. Nous avons donc essayé de mettre en évidence une régulation directe de PPAR $\gamma$  sur l'expression de l'E-cadhérine. Deux stratégies complémentaires ont été utilisées, pharmacologique et génétique, pour diminuer l'expression de PPAR $\gamma$  *in vitro* et étudier les conséquences sur l'expression de l'E-cadhérine.



# Matériels et Méthodes :

## Prélèvements :

Les pièces opératoires sont recueillies après signature d'un consentement éclairé (protocole N° DC-2008-642) chez des patients atteints de RCH ou de MC ayant subi une opération chirurgicale. Des pièces opératoires intestinales sont également recueillies chez des patients contrôles opérés pour une autre indication qu'une MICI en zone saine sous le contrôle d'un anatomopathologiste.

Les échantillons de muqueuse intestinale sont soit conservés à -80°C dans une solution de RNA later (Macherey-Nagel) pour une analyse transcriptomique, ou à sec pour l'analyse protéique à -80°C.

## Culture cellulaire :

### *Culture et entretien des lignées :*

Deux lignées de CE intestinales humaines sont utilisées : la lignée Caco-2 (n°ATCC HTB-37) et la lignée HT-29 (n°ATCC HTB-38) (American Type Culture Collection- ATCC, Manassas, VA). Ces cellules sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Dutscher, Brumath, France), 1% de pénicilline-streptomycine (Invitrogen) dans une étuve à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Les milieux de culture sont changés tous les 3-4 jours afin de préserver un milieu riche en nutriments et pauvre en déchets toxiques pour permettre une croissance cellulaire optimale. Chaque semaine, les monocouches confluentes sont traitées à la trypsine (Invitrogen) puis repiquées après une dilution au 1/10<sup>ème</sup> dans une flasque T175.

Pour notre étude, les cellules PPAR $\gamma$  « knock-down » (sh PPAR $\gamma$ ) et leur contrôle sh LUC (sh CTL), disponibles au laboratoire, sont 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 $\gamma$  (Martin Mena et al. 2017). Dans nos conditions de culture, ces cellules se développent sous la forme d'une multicouche non polarisée et indifférenciée.

### *Stimulation des lignées :*

Concernant les expériences de stimulation par le GW9662 et le T0070907 10<sup>6</sup> cellules Caco-2 et HT-29 sont mises en culture dans 2 ml de milieu de culture dans des plaques 6 puits. Avant stimulation, le milieu de culture des puits est remplacé par un milieu sans SVF afin de synchroniser les cellules. Les cellules sont ensuite stimulées par 10 $\mu$ M, 1 $\mu$ M et 0,1 $\mu$ M de GW9662 pendant 24h.

Relativement aux expériences de stimulation par l'agoniste inverse de PPAR $\gamma$  le T0070907 (Sigma), 10<sup>6</sup> cellules Caco-2 sont mises en culture dans 2 ml de milieu de culture dans des plaques 6 puits. Avant stimulation, le milieu de culture des puits est remplacé par un milieu sans SVF afin de synchroniser les cellules. Les cellules sont ensuite stimulées par 1 et 10 $\mu$ M de T0070907.

### **Analyse protéique par Western-blot :**

L'analyse est réalisée sur des extraits protéiques totaux des cellules stimulées dans différentes conditions.

Les cellules sont lavées avec du PBS deux fois et lysées avec du tampon RIPA (Sigma) supplémenté avec un mélange d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Sigma). Les protéines sont dosées par la méthode Bradford (Thermo scientific) de façon à déposer la même quantité de protéines pour tous les échantillons. 20 $\mu$ g de protéines sont déposées sur un gel gradient 4-20% de polyacrylamide (Biorad). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les sites de fixation non spécifiques sont alors bloqués pendant 30 minutes, sous agitation, à température ambiante dans une solution de lait dilué à 5% dans du TNT 1X (Tris NaCl Tween à 1%) Les membranes sont incubées sur la nuit avec différents anticorps primaires dilués dans du TNT-5% lait : un anticorps anti PPAR $\gamma$  (Cell Signaling Technology, 1/500) , un anticorps anti E-cadherine (Cell Signaling Technology au 1/1000), un anticorps anti  $\beta$ -actine (Santa Cruz Au 1/500<sup>e</sup>) et un anticorps anti phospho Smad 2 (Cell Signaling Technology au 1/1000).

Après trois lavages de 10 minutes dans du TNT, un anticorps secondaire est appliqué pendant 1 heure, sous agitation, à température ambiante sur les membranes : un anti rabbit IgG HRP (JacksonImmunoResearch) au 1/10 000 ou un anti mouse IgG HRP (Sigma) au 1/2000. Après trois autres lavages, les membranes sont révélées en chambre noire au moyen du kit SuperSignal West Pico PLUS Chemoluminescent Substrate (thermo scientific) contenant un substrat chimioluminescent de la peroxydase (ECL). Un film radiographique est ensuite apposé sur les membranes afin de récupérer une empreinte de chimioluminescence. La révélation des bandes peut aussi se faire sur l'appareil de mesure Vilber fusion FX (Vilber).

## Quantification de l'ARNm par RT-qPCR :

L'ARN des cellules stimulées est isolé à l'aide du kit nucleospin® RNA (Macherey Nagel) suivant les instructions du constructeur.

Les échantillons de muqueuse des pièces opératoires sont broyés à l'aide d'un homogénéiseur (Bead Mill 24 homogeniser Fisherbrand) dans du tampon de lyse RA1 puis l'ARN est extrait à l'aide du même kit.

Relativement à l'isolement des CE, le prélèvement est recueilli dans une boîte de pétri dans une solution de chélation basale (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.6mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8mM, NaCl 92.2mM et KCl 1.6mM). Les CE sont séparées des couches musculaires et graisseuses puis coupés en morceaux de 2 mm. Les fragments de tissu sont incubés pendant 20 min sous agitation lente à 4°C dans 20 ml de solution de chélation complète (la solution de chélation basale complétée avec sucrose 43.4mM, D-sorbitol 54.9mM, DTT 0,5mM et EDTA 10mM pendant 1 heure à 4°C sous agitation lente. Les CE sont ensuite détachées en flushant avec une pipette de 10ml et se retrouvent dans le surnageant. Celui-ci est récupéré puis centrifugé, et le culot est repris dans du RA1.

La qualité et la concentration des ARN isolés ont été mesurées à l'aide du NanoDrop 1000.

1 µg d'ARN est rétro-transcrit en ADNc via le kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies) selon les instructions du fournisseur.

La quantification des gènes (tableau 1) a été réalisée avec le kit Fast SYBR Green master mix (Life Technologies) sur le thermocycleur Step One Plus (Life Technologies).

La normalisation des résultats a été faite par rapport au gène de la β-actine, exprimée de façon constitutive. Les valeurs ont été représentées en terme de quantité relative de variation d'expression de l'ARNm (exprimée en 2 puissance (-ΔΔCt) par rapport aux conditions de contrôle (Fold), à l'exception des valeurs concernant les biopsies de patients qui ont été représentées uniquement en 2<sup>ΔCT</sup> par rapport à la β-actine).

Gènes	Amorce sens	Amorces anti-sens
PPAR $\gamma$	CCA-TGG-TCA-TTT-CGT-TAA-AGG-C	TTC-AAT-ACC-ACG-ACG-TAC-AA
E-cadhérine	AGC-ATC-AGT-CAC-TTT-CAG-TGT	TTC-CCA-GGG-TCA-GAA-GGA-TTC-CTA-TG
$\beta$ -actine	GGT-CTG-AAA-CAT-GAT-CTG-GG	TGC-CTT-AGC-TAT-CTG-GTG-CC
TSLP	TGC-CTT-AGC-TAT-CTG-GTG-CC	ACG-CCA-CAA-TCC-TTG-TAA-TTG
Lactase	GCG-GCA-GAA-GCT-GAG-TAA-AT	AAG-GCT-GAA-GAG-CAG-ACT-GG
Kératine 18	GCTGGAAGATGGCGAGGACTT T	TGGTCTCAGACACCACTTTGCC
TFF3	TGGTGAAGACAGCAAGCCAA	ACAGTAGCGAGAGTGGTTGTG
A33	CCTGTCTGGAGGCTGCCAGT	AGGTGCAGGGCAGGGTGACA
IFN $\gamma$	TGA-CCA-GAG-CAT-CCA-AAA-GA	TTT-CGC-TTC-CCTG-TTT-TAGC
IL-21	GGA-GAG-GAT-TGT-CAT-CTG-TC	CAC-AGT-TTG-TCT-CTA-CAT-CTT-C
Granzyme B	CCC-TGG-GAA-AAC-ACT-CAC-ACA	CAC-AAC-TCA-ATG-GTA-CTG-TCG-T
ZEB1	GGC-ATA-CAC-CTA-CTC-AAC-TAC-GG	TGG-GCG-GTG-TAG-AAT-CAG-AGT-C
Fibronectine	AC-AAC-ACC-GAG-GTG-ACT-GAG-AC	GGA-CAC-AAC-GAT-GCT-TCC-TGA-G
$\alpha$ SMA	CCT-TCC-AGC-AGAT-GTG-GAT-CA	AAG-CAT-TTG-CGG-TGG-ACA-A

*Tableau 1: listes des amorces sens et antisens utilisées*

## Cytométrie en flux :

Le marquage membranaire de l'E-cadhérine par cytométrie en flux est réalisé après stimulation ou non des cellules Caco-2 sh LUC et Caco-2 sh PPAR $\gamma$ . Brièvement, les sites aspécifiques sont bloqués avec le human TruStain FcX (Sony) pendant 10min, puis les cellules sont incubées 25 min sur glace avec l'anticorps anti human e-cadhérine FITC (Sony) ou son isotype contrôle mouse IgG1 FITC dilués à 10 $\mu$ g/ml en PBS 2% SVF. Les cellules sont ensuite fixées avec une solution de fixation (BD Pharmingen) pendant 5 min à température ambiante. Après un lavage en PBS, les cellules sont resuspendues dans 300 $\mu$ l de PBS pour être analysées avec un cytomètre LSR Fortessa X20 (Becton Dickinson) et le logiciel Flow Jo.

## Immunohistochimie :

Les échantillons ont été fixés dans du paraformaldéhyde à 4 % puis inclus en paraffine et coupés au microtome en sections de 4 $\mu$ m. Après démasquage des sites antigéniques et blocage des peroxydases endogènes, les coupes ont été incubées avec un anticorps anti E-cadhérine (Invitrogen, clone 4A2C7) au 1/25ème et révélé avec un anticorps secondaire anti

mouse IgG couplé à une peroxydase. Ce marquage a été réalisé en collaboration avec le service d'anatomopathologie du CHU de Lille.

### **Analyses statistiques :**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel PRISM 6 (Graphpad software Inc.) Tous les tests portent sur des données métriques connues. Lorsque la taille de l'échantillon est supérieure à 30, des tests paramétriques ont été réalisés. Dans les échantillons plus petits, entre 8 et 30, une analyse graphique a été réalisée pour vérifier la normalité.

Les résultats ont été exprimés en moyenne +/- erreur standard à la moyenne (SEM). Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque  $p < 0,05$ . Les statistiques non significatives ne sont pas représentées.



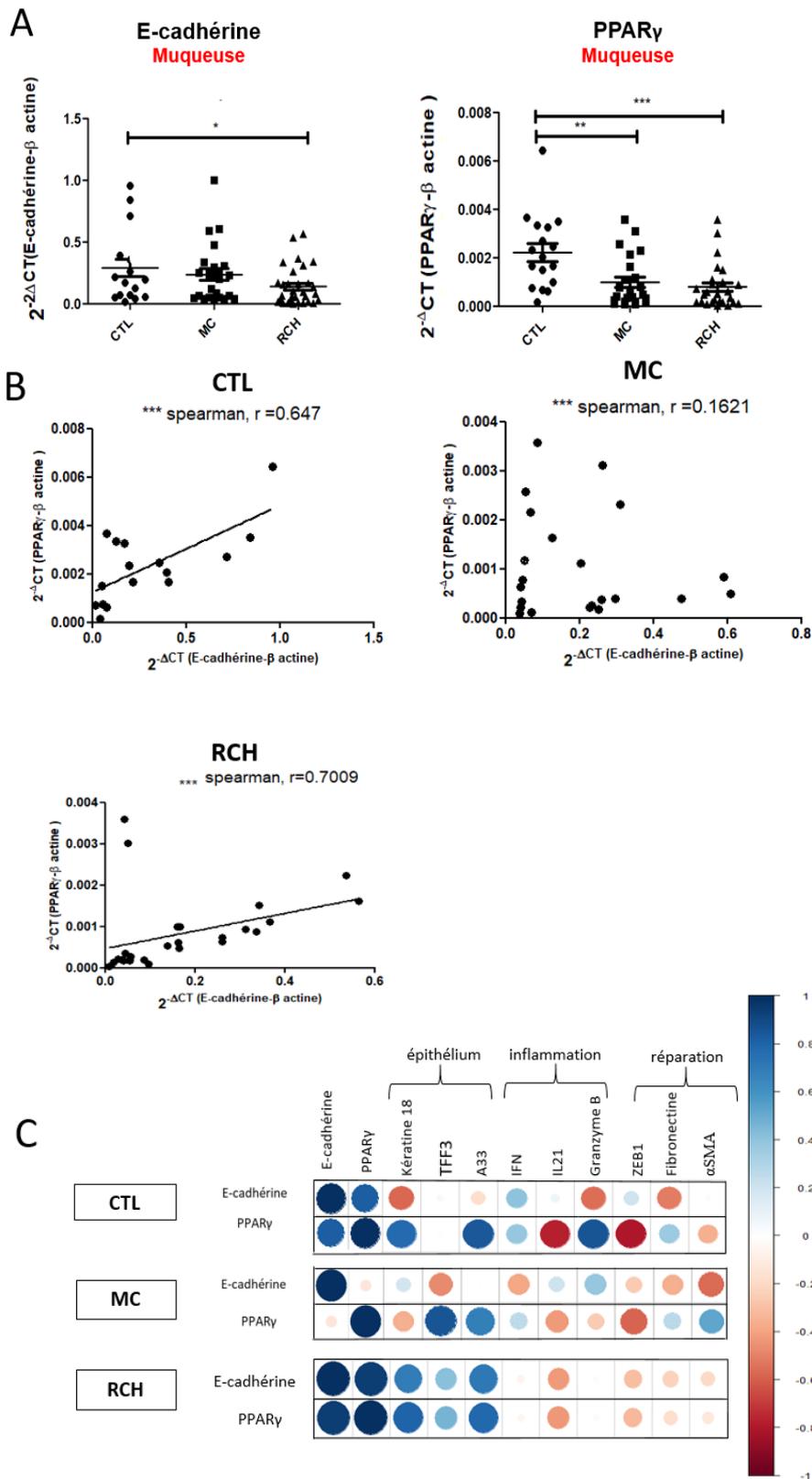
# Résultats :

## Diminution de l'expression de l'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$ dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH :

La première étape de ce travail a été de s'assurer que l'E-cadhérine était diminuée dans l'épithélium colique de pièces opératoires des patients atteints de RCH par rapport à l'épithélium colique provenant de patients opérés pour une autre indication qu'une MICI (CTL). Nous avons donc étudié l'expression du gène CDH1 par RT-qPCR dans la muqueuse colique, de la même façon que l'avait fait l'équipe de Zhao et al (Zhao et al. 2015). En plus, un 2<sup>e</sup> groupe contrôle, composé de prélèvements provenant de patients atteints de MC, permet de s'assurer que ces résultats ne sont pas uniquement liés à l'inflammation intestinale existant dans les MICI. La quantité d'ARNm de l'E-cadhérine est significativement diminuée dans la muqueuse colique des patients atteints de RCH par rapport au groupe CTL. Cette diminution n'a pas été retrouvée dans la muqueuse colique des patients atteints de MC. La quantité d'ARNm de PPAR $\gamma$  est aussi diminuée dans la muqueuse colique des patients atteints de RCH par rapport au groupe CTL. Contrairement aux résultats précédemment publiés par le laboratoire, l'ARNm de PPAR $\gamma$  dans la muqueuse des MC est diminuée par rapport au groupe CTL (**Figure 16A**). L'expression de PPAR $\gamma$  et l'E-cadhérine semblent être positivement et significativement corrélées dans le groupe RCH ( $r=0.7009$ ) et CTL ( $r =0.647$ ). Par contre, il n'existe pas *a priori* de corrélation dans le groupe MC ( $r=0,1621$ ) (**Figure 16B**).

Cependant, la quantité d'E-cadhérine peut être influencée par d'autres facteurs comme la quantité d'épithélium dans le prélèvement (quantifiée par l'expression des gènes kératine 18, TFF3 et A33), l'inflammation (IFN $\gamma$ , IL21 et GZMB) et/ou les mécanismes de réparation (ZEB1, fibronectine et  $\alpha$ SMA). Nous avons donc réalisé une matrice de corrélation sous la forme d'un corplot pour évaluer l'impact de ces variables sur l'expression de l'E-cadherine et de PPAR $\gamma$  (**Figure 16C**). Ainsi, l'expression du gène CDH1 semble être aussi corrélée positivement aux 3 gènes marqueurs de l'épithélium dans les prélèvements de RCH, cette corrélation n'a pas été retrouvée dans le groupe MC et CTL. L'ARNm de PPAR $\gamma$  est aussi corrélé aux 3 gènes marqueurs de l'épithélium dans les prélèvements de RCH. Il semble aussi exister une corrélation positive entre l'expression du gène de PPAR $\gamma$  et de 2 gènes sur 3 dans le groupe CTL (kératine 18 et A33) et MC (TFF3 et A33). Par contre, l'expression de l'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$  ne semble pas être influencée par l'inflammation et la réparation que ce soit dans le groupe RCH, MC et CTL. Les corrélations entre PPAR $\gamma$  et l'IL-21, granzyme B et ZEB 1 sont très probablement artéfactuelles compte tenue de la très faible expression de ces gènes dans le groupe CTL (**annexe 2**). Ainsi, les variations de la quantité d'épithélium entre les

échantillons pourraient influencer artificiellement les quantités d'ARNm d'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$ .



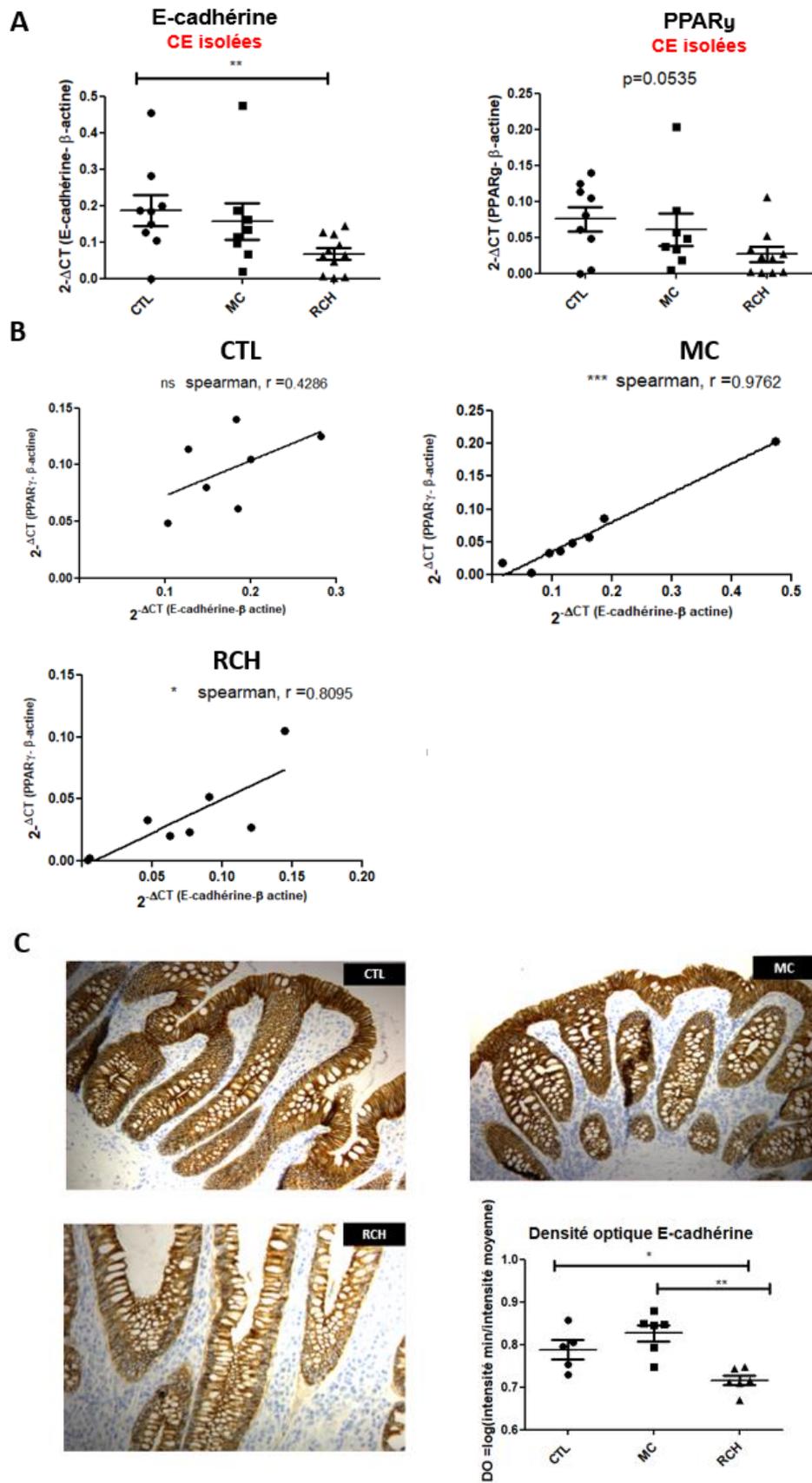
**Figure 16 : Expression de l'ARNm de l'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$  dans la muqueuse.** (A) par RT-qPCR, CTL (n= 17), RCH (n=30) et MC (n=26) (B) Corrélations de spearman des quantités d'ARNm d'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$  dans la muqueuse intestinale à partir de la muqueuse (C) Graphique représentant la matrice de corrélation entre l'expression de différentes ARNm entre les groupes CTL, MC et RCH. Les corrélations positives sont affichées en bleu et les corrélations négatives en rouge. L'intensité de la couleur et la taille des cercles sont proportionnelles aux coefficients de corrélation. A droite du corplot, la légende de couleurs montre les coefficients de corrélation et les couleurs correspondantes. Les statistiques non significatives ne sont pas représentées.

Pour s'affranchir des variations de quantité d'épithélium dans nos échantillons de muqueuse, nous avons décidé de vérifier nos résultats à partir de CE isolées. Avec cette stratégie, nous avons pu confirmer la diminution de l'expression de l'ARNm de l'E-cadhérine dans le groupe RCH par rapport au groupe CTL (**Figure 17A**). En revanche, l'expression de l'E-cadhérine n'est pas diminuée dans le groupe MC par rapport au CTL, suggérant que la diminution de l'E-cadhérine est spécifique à la RCH. Concernant PPAR $\gamma$ , nous n'avons pas mis en évidence de diminution significative sur les échantillons de CE isolées mais PPAR $\gamma$  semble bien être diminué dans le groupe RCH par rapport au groupe CTL, la p value étant très proche de 0.05 (**Figure 17A**).

En réalisant par la suite un test de corrélation de Spearman avec ces données, nous avons mis en évidence une corrélation forte ( $r=0.8095$ ) et significative (\*) entre l'expression de l'ARNm de PPAR $\gamma$  et de l'ARNm de l'E-cadhérine dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH (**Figure 17B**). La corrélation entre l'E-cadhérine et PPAR $\gamma$  était plus forte ( $r=0.9762$ ) et plus significative encore (\*\*\*) dans le groupe MC. Par contre, cette corrélation ne semble pas exister dans le groupe CTL.

A l'aide d'une quantification automatisée de la densité optique par le Cell Discoverer 7, nous avons pu confirmer la diminution de la protéine E-cadhérine chez les patients RCH par rapport au groupe CTL et MC par une technique d'IHC (**Figure 17C**).

L'ensemble de ces résultats montre qu'il existe bien une diminution significative de la quantité d'E-cadhérine (ARNm et protéine) dans l'épithélium intestinal chez les patients atteints de RCH mais pas dans la MC et chez les individus contrôles. Il existe aussi une corrélation forte et significative entre l'expression de PPAR $\gamma$  et de l'E-cadhérine dans les CE qui suggère que PPAR $\gamma$  pourrait réguler l'expression de l'E-cadhérine.



**Figure 17 : Expression de l'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$  dans les CE isolées.** (A) par RT-qPCR (CTL n= 9, MC n=8, RCH n=11) (B) Corrélation de spearman des quantités d'ARNm d'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$  dans les CE isolées de l'ensemble des patients (C) Marquage immunohistochimique de l'E-cadhérine représentatif de l'ensemble des patients (CTL n=5, MC n=6 et RCH n=5). Les statistiques non significatives ne sont pas représentées.

## Etude d'une régulation directe entre PPAR $\gamma$ et l'E-cadhérine :

Pour mettre en évidence une régulation directe de PPAR $\gamma$  sur l'expression de l'E-cadhérine, nous avons utilisé trois stratégies différentes. Tout d'abord, nous avons tenté d'inhiber l'expression de PPAR $\gamma$  avec un antagoniste de PPAR $\gamma$  (le GW9662) *in vitro* dans les lignées Caco-2 et HT29. Puis, nous avons testé un agoniste inverse de PPAR $\gamma$ , le T0070907 dans la lignée Caco-2. Enfin, nous avons utilisé la lignée intestinale Caco-2 où l'expression de PPAR $\gamma$  a été inhibée par une transfection stable avec un plasmide sh RNA ciblant le gène PPAR $\gamma$  (Martin Mena et al. 2017)

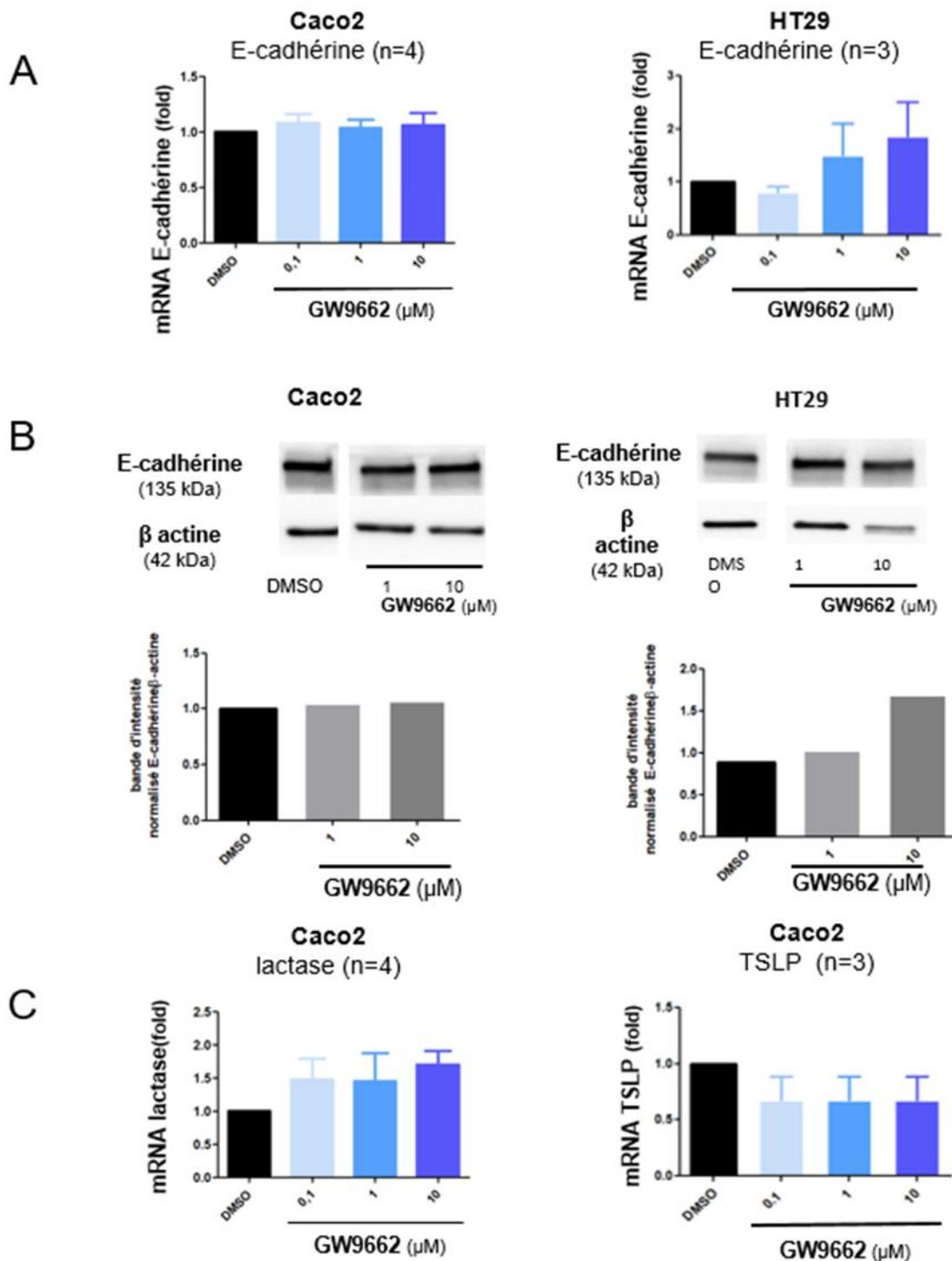
### ***Inhibition de l'activité de PPAR $\gamma$ avec l'antagoniste GW9662 :***

Nous avons d'abord tenté d'inhiber l'expression de PPAR $\gamma$  en traitant les lignées cellulaires Caco-2 et HT-29 avec un antagoniste de PPAR $\gamma$ , le GW9662.

Dans les 2 lignées après 24h de traitement, l'expression de l'E-cadhérine n'est pas diminuée, quelle que soit la concentration de GW9662 utilisée (0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M et 10 $\mu$ M) par RT-qPCR (**Figure 18A**) ou par western-blot (**Figure 18B**).

Pour vérifier que l'inhibition de PPAR $\gamma$  était bien efficace dans nos conditions expérimentales, nous avons aussi mesuré l'expression de deux gènes contrôles stimulés par des agonistes de PPAR $\gamma$  : la lactase (Fumery et al. 2017) et la TSLP (Martin Mena et al. 2017). Toutefois, ni le gène de la lactase ni celui de la TSLP sont diminués dans les lignées Caco-2 stimulées par le GW9662 (**Figure 18C**).

Ces résultats ne permettent donc pas de conclure sur l'existence d'une régulation directe de l'E-cadhérine par PPAR $\gamma$ .



**Figure 18 : Inhibition pharmacologique par le GW9662, un antagoniste de PPAR $\gamma$ , de l'activité de PPAR $\gamma$  dans les lignées Caco-2 et HT29. (A) Expression de l'ARNm de l'E-cadhérine par RT-qPCR après stimulation par le GW9662 (B) Expression de l'E-cadhérine par western-blot après stimulation par le GW9662 (C) expression de l'ARNm de la LCT (code la protéine lactase) et de la TSLP après stimulation par le GW9662 dans la lignée Caco-2. Les statistiques non significatives ne sont pas représentées.**

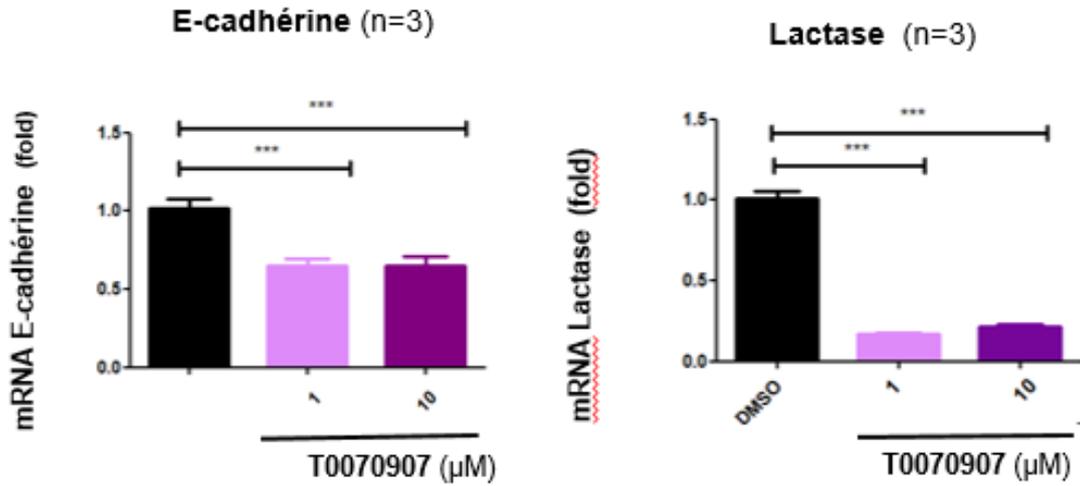
### ***Inhibition de l'activité de PPAR $\gamma$ avec un agoniste inverse de PPAR $\gamma$ , le T0070907 :***

GW9662 est un antagoniste, son effet inhibe l'expression d'un gène induit par un agoniste de PPAR $\gamma$ . En revanche, son action n'affecte pas l'expression basale des gènes dont le promoteur contient un ou plusieurs site(s) de fixation de PPAR $\gamma$  (PPRE) (**Figure 11**). L'absence d'effet du GW9662 sur l'expression de CDH1 et des gènes contrôles pourrait donc s'expliquer par le fait que nous travaillons en condition basale, sans stimuler les cellules Caco-2 et HT-29 avec un agoniste de PPAR $\gamma$ . De base, l'expression de CDH1 est élevée dans ces cellules et une stimulation avec de la rosiglitazone n'augmente que faiblement son expression (**Annexe 2**). Nous avons donc cherché à inhiber l'activité intrinsèque de PPAR $\gamma$  dans les cellules Caco-2 avec l'agoniste inverse T0070907. Contrairement au GW9662, T0070907 inhibe l'expression basale des gènes contrôlés par PPAR $\gamma$  et a, ainsi, l'effet inverse d'un agoniste (**Figure 11**).

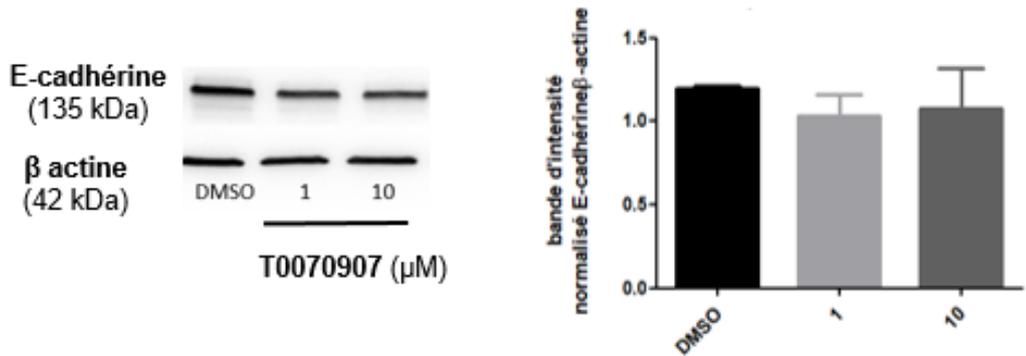
Après un traitement de 24 heures avec le T0070907, nous avons observé une diminution importante (10 fois) et significative de l'expression de la lactase (**Figure 19A**). La quantité d'ARNm de l'E-cadhérine est diminuée d'un facteur de 0,6 (**Figure 20A**). Cette diminution est statistiquement significative mais nous n'avons pas constaté d'effet sur la quantité de protéine par western blot (**Figure 19B**).

Les inhibiteurs pharmacologiques que nous avons utilisés inhibent l'activité de PPAR $\gamma$  mais pas son expression (**Figure 19C**). Leurs effets pourraient donc être différents de ceux induits par une baisse d'expression de PPAR $\gamma$ , comme celle observée chez les patients atteints de RCH.

A



B



C

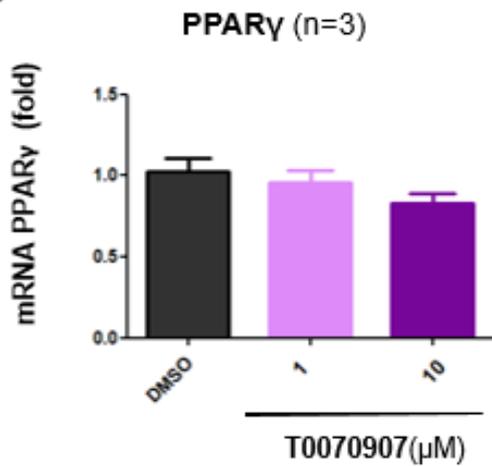


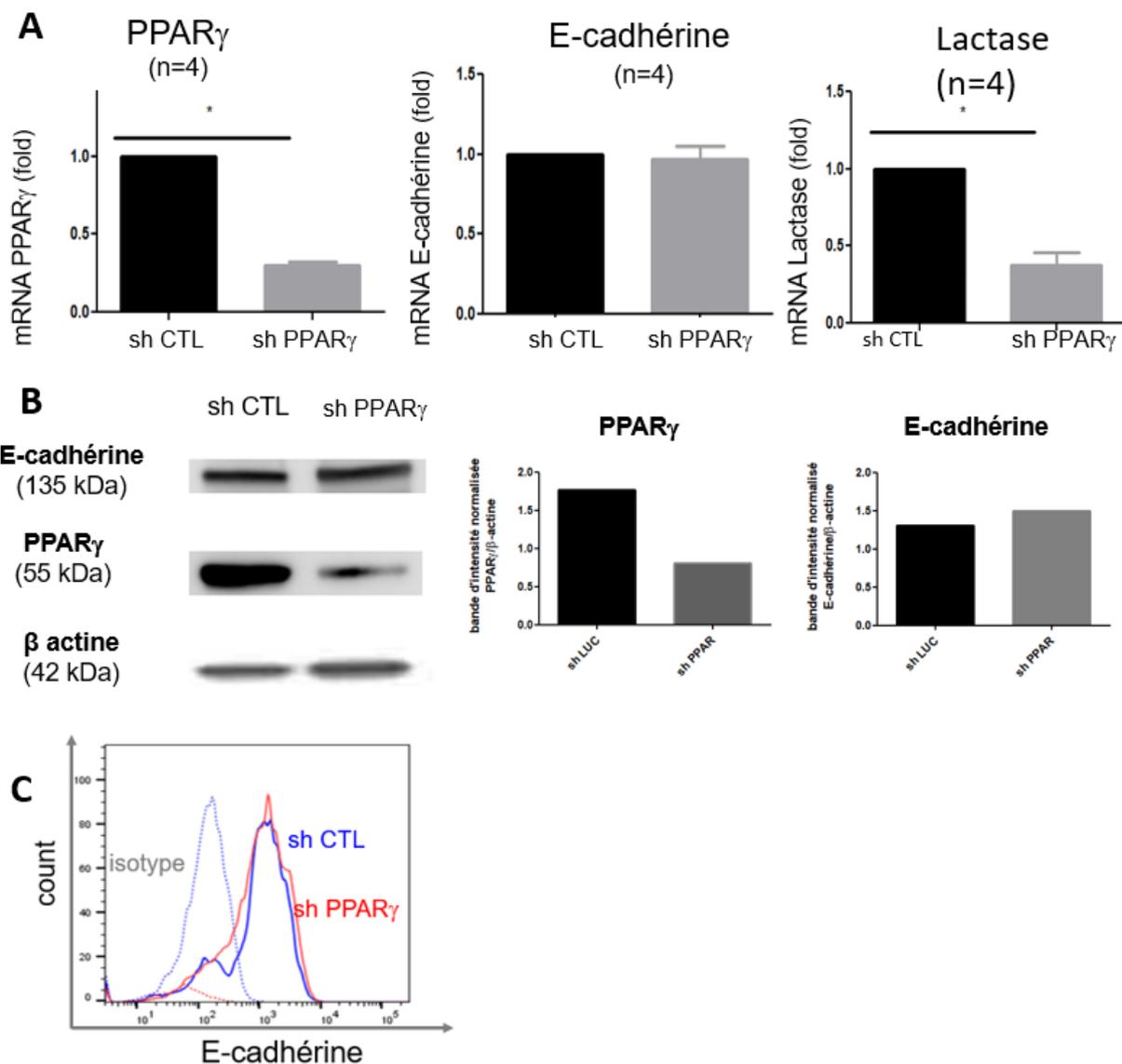
Figure 19 : Inhibition pharmacologique par le T0070907 , un agoniste inverse de PPAR $\gamma$ , de l'activité de PPAR $\gamma$  dans les lignées Caco-2. (A) Expression de l'ARNm de l'E-cadhérine et de la LCT (code la protéine lactase) par RT-qPCR (B) expression de l'E-cadhérine par western-blot, gel représentatif de deux expériences (C) expression de l'ARNm de PPAR $\gamma$ . Les statistiques non significatives ne sont pas représentées.

### ***Inhibition du gène de PPAR $\gamma$ par une transfection avec un plasmide sh RNA :***

Pour reproduire au mieux la baisse de l'expression de PPAR $\gamma$  dans l'épithélium intestinal des patients atteints de RCH, nous avons utilisé la lignée intestinale Caco-2 où l'expression de PPAR $\gamma$  a été inhibée par une transfection stable avec un plasmide contenant un petit ARN en épingle à cheveux (en anglais : short hairpin shRNA) qui cible le gène PPAR $\gamma$  (sh PPAR $\gamma$ ) ou un gène de la luciférase (sh CTL) (contrôle) (Martin Mena et al. 2017).

La quantité d'ARNm et de protéine de PPAR $\gamma$  est significativement diminuée dans les cellules sh PPAR $\gamma$  par rapport aux cellules sh CTL (**Figure 20A et 20B**). Cette diminution entraîne une baisse de l'expression basale de la lactase (divisée par 2) (**Figure 20B**). L'expression basale de l'E-cadhérine n'est en revanche pas impactée que ce soit au niveau de l'ARNm (**Figure 20A**), de la protéine (**Figure 20B**) et de l'expression membranaire (**Figure 20C**).

Ces résultats montrent qu'une diminution de l'expression de PPAR $\gamma$  ne diminue pas l'expression de l'E-cadhérine.



**Figure 20 : inhibition de l'activité de PPAR $\gamma$  dans un modèle génétique** (A) Quantification de l'ARNm de PPAR $\gamma$ , de l'E-cadhérine et de la lactase dans les Caco-2 sh CTL et sh PPAR $\gamma$  par RT-qPCR \* $p < 0.05$  (B) Quantification des protéines PPAR $\gamma$ , et E-cadhérine dans les Caco-2 sh CTL et sh PPAR $\gamma$  par western-blot (gel représentatif de 4 expériences) (C) Analyse de l'expression membranaire de l'E-cadhérine par cytométrie en flux (histogramme représentatif de 2 expériences). Les statistiques non significatives ne sont pas représentées



# Discussion

La RCH est une pathologie complexe, invalidante, dont l'incidence et la prévalence augmente dans le monde entier, touchant les jeunes adultes et dont il n'existe encore aucun traitement curatif. Au début des années 2000, les agonistes de PPAR $\gamma$ , les thiazolidinediones, ont été testés avec succès dans des modèles de colites murines (C. G. Su et al. 1999) puis dans le traitement de la RCH chez l'Homme (Lewis et al. 2001; 2008). En parallèle, notre laboratoire a montré que l'expression de PPAR $\gamma$  était diminuée dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH (Laurent Dubuquoy et al. 2003). Ce déficit, n'a pas été retrouvé dans la MC, suggérant que cette diminution est spécifique à la RCH. Les effets thérapeutiques de ces molécules, s'expliquent, du moins en partie, par leurs effets anti-inflammatoires en agissant sur la voie NF-kB (Ricote et al., 1998). Au début des années 2010, l'intérêt pour ces agonistes a été tempéré par les nombreux effets indésirables de ces molécules en raison des actions pléiotropes de PPAR $\gamma$  encore mal connues.

En parallèle des effets anti-inflammatoires de PPAR $\gamma$ , il a été décrit que les agonistes de PPAR $\gamma$  augmentaient *in vitro* l'expression de l'E-cadhérine (Annicotte et al. 2006). PPAR $\gamma$  régulerait directement l'expression du gène CDH1 en se fixant sur son promoteur qui contient un site PPRE (Annicotte et al. 2006). L'E-cadhérine, en tant que la principale constituante des jonctions adhérentes, est essentielle au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. Elle a aussi un rôle dans l'immunosurveillance : son interaction avec l'intégrine  $\alpha E\beta 7$  permet la rétention et l'activation des LIE dans l'épithélium intestinal (Olivares-Villagómez et Van Kaer 2018). La diminution de l'E-cadhérine est aussi un marqueur de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un processus impliqué dans la fibrose et le cancer (J. Yang et al. 2020). Ainsi, en se fixant sur le PPRE de CDH1 et en augmentant, *in fine*, l'expression de l'E-cadhérine, les agonistes de PPAR $\gamma$  participeraient au maintien des jonctions entre les cellules épithéliales, à l'immunosurveillance et préviendraient les complications à long terme de la RCH. Quelques rares publications rapportent une diminution de l'expression de l'E-cadhérine, dans les CE coliques des patients atteints de la RCH sans que les marquages par IHC soient totalement convaincants (Zhao et al. 2015; Karayiannakis et al. 1998).

Nous avons donc recherché s'il existait un lien entre la baisse de PPAR $\gamma$  et celle de l'E-cadhérine dans l'épithélium intestinal des patients RCH.

## **Diminution de l'expression de l'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$ dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH :**

Avant de rechercher un lien de régulation entre PPAR $\gamma$  et l'E-cadhérine, nous avons voulu confirmer les résultats de la littérature qui suggéraient une diminution de l'E-cadhérine

dans l'épithélium colique (Zhao et al. 2015; Karayiannakis et al. 1998). Nous avons aussi cherché à mettre en évidence une corrélation entre l'expression de PPAR $\gamma$  et de l'E-cadhérine dans l'épithélium colique.

La quantité d'ARNm d'E-cadhérine, mesurée par RT-qPCR, est bien diminuée dans la muqueuse colique des patients atteints de RCH par rapport au CTL. En revanche, elle n'est pas modifiée chez les patients atteints de MC. Pour s'affranchir d'un éventuel biais du aux variations de la quantité d'épithélium dans les échantillons de muqueuse, nous avons confirmé ce résultat à partir de CE isolées et par IHC sur des coupes intestinales de patients atteints de RCH et de MC et des individus contrôles.

Nous avons analysé des prélèvements de patients nécessairement à des stades sévères et non contrôlés de leurs maladies puisqu'une chirurgie était indiquée. Il serait donc intéressant d'analyser l'expression de l'E-cadhérine dans des biopsies endoscopiques prélevées chez des malades moins sévères plus représentatifs des patients atteints de RCH. Toutefois, la diminution de l'E-cadhérine dans le côlon de ce groupe de patient a déjà été rapportée. L'équipe de Zhao *et al* a mis en évidence une diminution de l'expression de l'E-cadhérine dans des biopsies de patients par RT-qPCR et western-blot (Zhao et al. 2015). Comme indiqué ci-dessus, la diminution de l'E-cadhérine chez les patients RCH pourrait donc être un mécanisme pathologique important dans cette pathologie

Nos travaux confirment aussi la diminution de PPAR $\gamma$  dans la muqueuse colique des patients atteints de RCH par rapport au groupe CTL. Cette diminution n'est pas significative dans les CE isolées peut-être à cause de l'effectif trop faible et/ou parce que PPAR $\gamma$  dans la muqueuse est aussi exprimé par d'autres cellules que les CE comme les macrophages (Odegaard et al. 2007). L'expression de PPAR $\gamma$  pourrait être aussi diminuée dans ces derniers.

Les variations d'expression de l'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$  entre les groupes de patients pourraient toutefois s'expliquer aussi par une différence dans la répartition de la localisation des prélèvements. En effet l'expression de PPAR $\gamma$  n'est pas constante sur le long du côlon : elle est élevée au niveau du côlon distal puis elle diminue progressivement vers le côlon proximal et est beaucoup plus faible dans l'intestin grêle (W. Su et al. 2007). Nous ne connaissons pas la localisation exacte des prélèvements de muqueuse colique mais nous avons accès à la localisation exacte des prélèvements d'où les CE sont isolées : les prélèvements provenant de MC proviennent généralement du côlon ascendant alors que les prélèvements provenant de RCH sont majoritairement au niveau du côlon descendant et du sigmoïde. Mais ces répartitions hétérogènes ne nous ont pas empêché de mettre en évidence une diminution de PPAR $\gamma$  dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH alors que la majorité des prélèvements provenant du côlon distal (et où l'expression de PPAR $\gamma$  est maximum). Il n'existe pas de données dans la littérature concernant un gradient d'expression de l'E-cadhérine. Nos résultats préliminaires tendent à montrer que la localisation n'influence

pas l'expression de l'E-cadhérine (**annexe 3**). Un plus grand nombre de prélèvements d'une même localisation devront être comparés.

De façon intéressante, il existe corrélation positive entre l'expression de PPAR $\gamma$  et l'E-cadhérine dans le groupe RCH dans les biopsies comme dans les CE isolées. Par contre, nous n'avons pas trouvé de corrélations significatives entre la quantité d'ARNm d'E-cadhérine et celles de cytokines inflammatoires ou de marqueurs de la régénération de la muqueuse, deux autres mécanismes connus pour influencer l'expression de l'E-cadherine. L'ensemble de ces résultats et le fait qu'un PPRE a été décrit sur le promoteur de CDH1 nous ont encouragé à rechercher une régulation directe de l'expression de CDH1 par PPAR $\gamma$ .

### **PPAR $\gamma$ ne semble pas régulé pas directement l'expression de l'E-cadhérine dans les CE intestinales :**

Trois stratégies différentes ont été testées pour mettre en évidence une régulation directe de PPAR $\gamma$  sur l'expression de l'E-cadhérine. Tout d'abord, nous avons tenté d'inhiber pharmacologiquement l'expression de PPAR $\gamma$  avec un antagoniste de PPAR $\gamma$  (le GW9662) et un agoniste inverse le T0070907 *in vitro*. Dans un second temps, nous avons utilisé la lignée intestinale Caco-2 où l'expression de PPAR $\gamma$  a été inhibée par une transfection stable avec un plasmide sh RNA ciblant le gène PPAR $\gamma$  (Martin Mena et al. 2017).

L'inhibition de l'expression de PPAR $\gamma$  avec le GW9662, un antagoniste de PPAR $\gamma$ , n'a pas impacté l'expression de l'E-cadhérine au niveau de l'ARNm et de la protéine dans la lignée Caco-2 et HT29. Mais ces expériences ne nous permettent pas de conclure puisque nous ne sommes pas parvenus à démontrer l'efficacité de l'antagoniste. En effet, aucun effet de GW9662 n'a été observé sur l'expression de nos gènes contrôles : TSLP et la lactase.

Toutefois, GW9662 est un antagoniste compétitif qui inhibe l'activité de PPAR $\gamma$  en empêchant la fixation du ligand. Cet inhibiteur est d'ailleurs souvent utilisé en combinaison avec un agoniste tel que avec la rosiglitazone (Leesnitzer et al. 2002). Dans notre milieu de culture, l'expression basale de l'E-cadherine est déjà très élevée dans les cellules Caco-2 et HT-29 et elle est très peu augmentée par l'ajout d'un agoniste (rosiglitazone) (annexe 2). L'absence d'effet de GW9662 pourrait donc aussi signifier qu'il n'y a pas d'agoniste de PPAR $\gamma$  dans notre milieu de culture qui stimulerait l'expression basale de l'E-cadhérine dans nos lignées.

En absence de ligand, l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  peut se lier au PPRE sur les gènes cibles. Il favorise alors des interactions stables avec les complexes corépresseurs (NCoR ou SMRT) qui recrutent des enzymes modifiant la chromatine (les histones désacétylases). Ces derniers rendent la chromatine inaccessible à la liaison des facteurs de transcription ou résistante à leurs actions et répriment ainsi activement la transcription. L'agoniste inverse T0070907 en se liant au complexe PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ /PPRE favorise le recrutement de corépresseur (NCoR) et favorise la répression de l'expression basale (non induite par un agoniste) du gène.

Nous avons donc utilisé ce deuxième inhibiteur pharmacologique T0070907 pour évaluer l'impact de PPAR $\gamma$  sur l'expression basale de l'E-cadhérine dans nos lignées. Cette fois, nous avons pu vérifier que l'activité de PPAR $\gamma$  était bien inhibée puisque l'expression de la lactase est diminuée par un facteur 10. Avec cet inhibiteur, la quantité d'ARNm d'E-cadhérine est aussi significativement diminuée, sans toutefois que cette diminution soit très importante (seulement divisée par 1,6). En revanche, le traitement par le T0070907 ne diminue pas l'expression de la protéine E-cadhérine. Il est possible que 24 heures de traitement ne soit pas suffisant pour voir un effet significatif sur la quantité de protéine car en plus de la faible diminution de la transcription de CDH1 la demi-vie de la protéine varie entre 5-10h en fonction des types cellulaires étudiés (Ireton et al. 2002; McCrea et Gumbiner 1991; Troxell et al. 1999). Ces expériences doivent donc être reproduites sur des temps plus longs. Il serait aussi important de s'assurer que le traitement au T0070907 n'a pas entraîné une mort cellulaire.

Une limite à ces expériences avec le T0070907 est que cet agoniste inverse ne mime pas la diminution de PPAR $\gamma$  mise en évidence dans la RCH. En effet, s'il existait un agoniste inverse endogène, responsable d'une diminution de l'expression de l'E-cadhérine, il faudrait aussi que ce ligand inhibe l'expression de PPAR $\gamma$  pour reproduire la diminution de PPAR $\gamma$  dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH. Nous nous sommes, donc, demandés s'il pouvait exister un rétro-contrôle de PPAR $\gamma$  sur lui-même, ce qui pourrait expliquer la diminution de l'expression de PPAR $\gamma$  dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH. Cela ne semble pas être le cas : après 24 heures de traitement, l'expression de PPAR $\gamma$  n'est pas modifiée, quelle que soit la concentration utilisée (1 $\mu$ M et 10 $\mu$ M) par RT-qPCR.

Pour reproduire l'observation physiopathologique : la baisse de l'expression de l'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$  dans l'épithélium des patients, nous avons utilisé le modèle Caco-2 sh PPAR $\gamma$ . En effet, l'expression de l'ARNm et de la protéine PPAR $\gamma$  sont diminuées d'environ 1/3 dans la lignée sh PPAR $\gamma$  par rapport à la lignée contrôle sh CTL comme ce qui a été observé dans l'épithélium colique dans la RCH. La diminution de PPAR $\gamma$  est fonctionnelle puisque l'expression du gène LCT (codant pour la lactase) est aussi diminuée dans la lignée Caco-2 sh PPAR $\gamma$  par rapport au Caco-2 sh CTL. L'expression de l'E-cadhérine n'est en revanche pas impactée que ce soit au niveau de l'ARNm, de la protéine et de l'expression membranaire. Ces résultats suggèrent que la diminution de l'expression de PPAR $\gamma$  n'altère pas l'expression basale de l'E-cadhérine.

Si l'effet de l'agoniste inverse T0070907 suggère un contrôle de l'expression basale de CDH1 par PPAR $\gamma$ , le modèle génétique sh Caco-2 plaide contre. Il est donc pour l'instant difficile de conclure définitivement quant à une régulation directe de l'expression de l'E-cadhérine par PPAR $\gamma$  à partir de nos résultats. Ces travaux doivent être complétés par des traitements plus longs (T0070907) et aussi sur d'autres lignées de CE pour exclure un effet cellulaire. Ces expériences mériteraient aussi d'être réalisées sur des organoïdes coliques humains pour

s'affranchir d'une éventuelle dérégulation des voies de signalisation dans les lignées tumorales.

Nos résultats montrent, aussi, que les mécanismes d'actions des antagonistes de PPAR $\gamma$  sont plus complexes que décrit dans l'introduction.

### **Vers l'hypothèse d'une régulation indirecte de PPAR $\gamma$ sur l'E-cadhérine:**

Comme vu précédemment, la diminution de l'E-cadhérine est un marqueur d'EMT (J. Yang et al. 2020). PPAR $\gamma$  est aussi lié à l'EMT via le TGF- $\beta$ , le facteur TGF- $\beta$  étant connu pour son rôle d'inducteur de l'EMT. Le TGF- $\beta$  et PPAR $\gamma$  se répriment mutuellement, notamment, via la voie SMAD (Wei et al. 2010). Il a été démontré que la stimulation de PPAR $\gamma$  inhibe l'EMT induite par le TGF- $\beta$  *in vitro* et diminue l'inflammation intestinale et l'EMT dans le modèle de colite induite par le DSS (Di Gregorio et al. 2017). Ainsi, la diminution de PPAR $\gamma$  entrainerait une levée de son inhibition sur le TGF- $\beta$ . La voie de signalisation serait alors « moins inhibée » par PPAR $\gamma$  et le TGF $\beta$  induirait une augmentation de l'EMT et, *in fine*, une diminution de l'expression de l'E-cadhérine. Différents protocoles pour induire l'EMT ont été testés sur les Caco-2 (données non montrées). Aucune des stratégies pour induire l'EMT n'a. Une étude suggère aussi que les Caco-2 seraient résistantes à l'EMT (Buckley, Medina, et Ehrhardt 2010). Nous envisageons donc d'utiliser des organoïdes intestinaux humains pour vérifier cette hypothèse.

L'inflammation pourrait aussi co-réprimer l'expression de l'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$ . Il pourrait être pertinent de regarder si l'expression de l'E-cadhérine et PPAR $\gamma$  est corrélée à l'expression de l'IL-6 et du TNF $\alpha$ . En effet, PPAR $\gamma$  inhibe la production de ces cytokines (Villapol 2018) qui sont-elles même connues pour diminuer l'expression de l'E-cadhérine *in vitro* (Saito et al. 2014; Kamitani et al. 2011). Si PPAR $\gamma$  est moins exprimé, la transcription de ces cytokines est plus importante et elle entrainerait la diminution de l'expression de l'E-cadhérine. Nous envisageons aussi d'utiliser des organoïdes intestinaux humains pour vérifier cette hypothèse. L'expression de PPAR $\gamma$  peut aussi être modulée par des cytokines pro-inflammatoire, même si le mécanisme moléculaire est encore inconnu (X. Y. Yang, Wang, et Farrar 2008).



# Conclusion

Cette étude est la première à avoir montré formellement une diminution de l'E-cadhérine dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH. Alors qu'une corrélation forte et significative entre la quantité d'ARNm d'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$  a été mise en évidence, qu'il existe un PPRE sur le promoteur de CDH1 et que l'augmentation de l'activité de PPAR $\gamma$  par des agonistes augmente l'expression de l'E-cadhérine *in vitro* (Annicotte et al. 2006), il ne semble pas que la diminution de PPAR $\gamma$  explique directement la diminution de l'expression de l'E-cadhérine en condition basale chez les patients RCH. En effet, lorsque l'expression de PPAR $\gamma$  est inhibée génétiquement, l'expression de l'E-cadhérine n'est pas impactée que ce soit au niveau de l'ARNm, de la protéine et de l'expression membranaire. Pour autant, nous ne pouvons pas exclure formellement une régulation directe de PPAR $\gamma$  sur l'E-cadhérine car l'inhibition de PPAR $\gamma$  par un agoniste inverse, le T0070907, a entraîné une diminution subtile mais significative de l'E-cadhérine au niveau de l'ARNm. Il est nécessaire de compléter ce travail pour infirmer ou confirmer ce mécanisme.



# Bibliographie

- Adib, Elio, Talal El Zarif, Amin H. Nassar, Elie W. Akl, Sarah Abou Alaiwi, Tarek H. Mouhieddine, Edward D. Esplin, et al. 2022. « CDH1 Germline Variants Are Enriched in Patients with Colorectal Cancer, Gastric Cancer, and Breast Cancer ». *British Journal of Cancer* 126 (5): 797-803. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01673-7>.
- Andoh, Akira, Hirotsugu Imaeda, Tomoki Aomatsu, Osamu Inatomi, Shigeki Bamba, Masaya Sasaki, Yasuharu Saito, Tomoyuki Tsujikawa, et Yoshihide Fujiyama. 2011. « Comparison of the Fecal Microbiota Profiles between Ulcerative Colitis and Crohn's Disease Using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis ». *Journal of Gastroenterology* 46 (4): 479-86. <https://doi.org/10.1007/s00535-010-0368-4>.
- Annicotte, Jean-Sébastien, Irena Iankova, Stéphanie Miard, Vanessa Fritz, David Sarruf, Anna Abella, Marie-Laurence Berthe, et al. 2006. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Regulates E-Cadherin Expression and Inhibits Growth and Invasion of Prostate Cancer ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (20): 7561-74. <https://doi.org/10.1128/MCB.00605-06>.
- Azarschab, Pia, Rainer Porschen, Michael Gregor, Nikolaus Blin, et Karlheinz Holzmann. 2002. « Epigenetic Control of the E-Cadherin Gene (CDH1) by CpG Methylation in Colectomy Samples of Patients with Ulcerative Colitis ». *Genes, Chromosomes and Cancer* 35 (2): 121-26. <https://doi.org/10.1002/gcc.10101>.
- Bendardaf, Riyad, Fatemeh Saheb Sharif-Askari, Narjes Saheb Sharif-Askari, Kari Syrjänen, et Seppo Pyrhönen. 2019. « Cytoplasmic E-Cadherin Expression Is Associated With Higher Tumour Level of VEGFA, Lower Response Rate to Irinotecan-Based Treatment and Poorer Prognosis in Patients With Metastatic Colorectal Cancer ». *Anticancer Research* 39 (4): 1953-57. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13305>.
- Bernstein, Charles N., Andre Wajda, et James F. Blanchard. 2005. « The Clustering of Other Chronic Inflammatory Diseases in Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Study ». *Gastroenterology* 129 (3): 827-36. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.06.021>.
- Bertin, Benjamin, Laurent Dubuquoy, Jean-Frédéric Colombel, et Pierre Desreumaux. 2013. « PPAR-Gamma in Ulcerative Colitis: A Novel Target for Intervention ». *Current Drug Targets* 14 (12): 1501-7. <https://doi.org/10.2174/13894501113149990162>.
- Berx, G., A. M. Cleton-Jansen, F. Nollet, W. J. de Leeuw, M. van de Vijver, C. Cornelisse, et F. van Roy. 1995. « E-Cadherin Is a Tumour/Invasion Suppressor Gene Mutated in Human Lobular Breast Cancers. » *The EMBO Journal* 14 (24): 6107-15. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00301.x>.
- Bondow, Benjamin J., Mary L. Faber, Kevin J. Wojta, Emily M. Walker, et Michele A. Battle. 2012. « E-Cadherin Is Required for Intestinal Morphogenesis in the Mouse ». *Developmental Biology* 371 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.06.005>.
- Bouguen, Guillaume, Audrey Langlois, Madjid Djouina, Julien Branche, Dine Koriche, Edmone Dewaeles, Alice Mongy, et al. 2015. « Intestinal Steroidogenesis Controls PPAR $\gamma$  Expression in the Colon and Is Impaired during Ulcerative Colitis ». *Gut* 64 (6): 901-10. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307618>.
- Brust, Richard, Jinsai Shang, Jakob Fuhrmann, Sarah A. Mosure, Jared Bass, Andrew Cano, Zahra Heidari, et al. 2018. « A Structural Mechanism for Directing Corepressor-Selective Inverse Agonism of PPAR $\gamma$  ». *Nature Communications* 9 (1): 4687. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07133-w>.
- Buckley, Stephen T., Carlos Medina, et Carsten Ehrhardt. 2010. « Differential Susceptibility to Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) of Alveolar, Bronchial and Intestinal Epithelial Cells in Vitro and the Effect of Angiotensin II Receptor Inhibition ». *Cell and Tissue Research* 342 (1): 39-51. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1029-x>.
- Cho, Judy H. 2008. « The Genetics and Immunopathogenesis of Inflammatory Bowel Disease ». *Nature Reviews Immunology* 8 (6): 458-66. <https://doi.org/10.1038/nri2340>.

- Choi, Jang Hyun, Alexander S. Banks, Theodore M. Kamenecka, Scott A. Busby, Michael J. Chalmers, Naresh Kumar, Dana S. Kuruville, et al. 2011. « Antidiabetic Actions of a Non-Agonist PPAR $\gamma$  Ligand Blocking Cdk5-Mediated Phosphorylation ». *Nature* 477 (7365): 477-81. <https://doi.org/10.1038/nature10383>.
- Christou, Niki, Aurélie Perraud, Sabrina Blondy, Marie-Odile Jauberteau, Serge Battu, et Muriel Mathonnet. 2017. « E-Cadherin: A Potential Biomarker of Colorectal Cancer Prognosis ». *Oncology Letters* 13 (6): 4571-76. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6063>.
- Colombel, Jean-Frédéric, Geert D'haens, Wan-Ju Lee, Joel Petersson, et Remo Panaccione. 2020. « Outcomes and Strategies to Support a Treat-to-Target Approach in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review ». *Journal of Crohn's and Colitis* 14 (2): 254-66. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz131>.
- Craene, Bram De, et Geert Berx. 2013. « Regulatory Networks Defining EMT during Cancer Initiation and Progression ». *Nature Reviews Cancer* 13 (2): 97-110. <https://doi.org/10.1038/nrc3447>.
- Demetter, Pieter, Martine De Vos, Nancy Van Damme, Dominique Baeten, Dirk Elewaut, Stefan Vermeulen, Marc Mareel, et al. 2000. « Focal Up-Regulation of E-Cadherin-Catenin Complex in Inflamed Bowel Mucosa but Reduced Expression in Ulcer-Associated Cell Lineage ». *American Journal of Clinical Pathology* 114 (3): 364-70. <https://doi.org/10.1093/ajcp/114.3.364>.
- Desreumaux, Pierre, Laurent Dubuquoy, Sophie Nutten, Michel Peuchmaur, Walter Englaro, Kristina Schoonjans, Benoit Derijard, et al. 2001. « Attenuation of Colon Inflammation through Activators of the Retinoid X Receptor (R $\alpha$ r)/Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (P $\alpha$ r $\gamma$ ) Heterodimer ». *Journal of Experimental Medicine* 193 (7): 827-38. <https://doi.org/10.1084/jem.193.7.827>.
- Di Gregorio, Jacopo, Roberta Sferra, Silvia Specca, Antonella Vetuschi, Caroline Dubuquoy, Pierre Desreumaux, Simona Pompili, et al. 2017. « Role of Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  and PPAR $\gamma$  on Epithelial-to-Mesenchymal Transition in DSS-Induced Colorectal Fibrosis ». Édité par Masaru Katoh. *PLOS ONE* 12 (2): e0171093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171093>.
- Dubuquoy, L. 2006. « PPAR as a New Therapeutic Target in Inflammatory Bowel Diseases ». *Gut* 55 (9): 1341-49. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.093484>.
- Dubuquoy, Laurent, Emmelie Å Jansson, Samir Deeb, Sabine Rakotobe, Mehdi Karoui, Jean-Frédéric Colombel, Johan Auwerx, Sven Pettersson, et Pierre Desreumaux. 2003. « Impaired Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  in Ulcerative Colitis ». *Gastroenterology* 124 (5): 1265-76. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00271-3](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00271-3).
- Dumasia, Rupal, Kim Eagle, Eva Kline-Rogers, Niquole May, Leslie Cho, et Debabrata Mukherjee. 2005. « Role of PPAR- $\gamma$ ; Agonist Thiazolidinediones in Treatment of Pre-Diabetic and Diabetic Individuals: A Cardiovascular Perspective ». *Current Drug Target -Cardiovascular & Hematological Disorders* 5 (5): 377-86. <https://doi.org/10.2174/156800605774370362>.
- Gibson, Peter R. 1997. « 2 Ulcerative Colitis: An Epithelial Disease? » *Baillière's Clinical Gastroenterology* 11 (1): 17-33. [https://doi.org/10.1016/S0950-3528\(97\)90051-8](https://doi.org/10.1016/S0950-3528(97)90051-8).
- Gordon, Ilyssa O., Neha Agrawal, John R. Goldblum, Claudio Fiocchi, et Florian Rieder. 2014. « Fibrosis in Ulcerative Colitis: Mechanisms, Features, and Consequences of a Neglected Problem ». *Inflammatory Bowel Diseases* 20 (11): 2198-2206. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000080>.
- Goto, Yoshiyuki, et Ivaylo I Ivanov. 2013. « Intestinal Epithelial Cells as Mediators of the Commensal-Host Immune Crosstalk ». *Immunology & Cell Biology* 91 (3): 204-14. <https://doi.org/10.1038/icb.2012.80>.
- Grill, Jessica I., Jens Neumann, Felix Hiltwein, Frank T. Kolligs, et Marlon R. Schneider. 2015. « Intestinal E-Cadherin Deficiency Aggravates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis ». *Digestive Diseases and Sciences* 60 (4): 895-902. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3551-x>.
- Grygiel-Górniak, Bogna. 2014. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Their Ligands: Nutritional and Clinical Implications - a Review ». *Nutrition Journal* 13 (1): 17. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17>.
- Harris, Sarah G., et Richard P. Phipps. 2001. « The Nuclear Receptor PPAR Gamma Is Expressed by Mouse T Lymphocytes and PPAR Gamma Agonists Induce Apoptosis ». *European Journal of*

- Immunology* 31 (4): 1098-1105. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200104\)31:4<1098::AID-IMMU1098>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200104)31:4<1098::AID-IMMU1098>3.0.CO;2-I).
- Hernandez-Quiles, Miguel, Marjoleine F. Broekema, et Eric Kalkhoven. 2021. « PPARgamma in Metabolism, Immunity, and Cancer: Unified and Diverse Mechanisms of Action ». *Frontiers in Endocrinology* 12 (février): 624112. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.624112>.
- Jackson, Simon M., Farhad Parhami, Xiao-Ping Xi, Judith A. Berliner, Willa A. Hsueh, Ronald E. Law, et Linda L. Demer. 1999. « Peroxisome Proliferator–Activated Receptor Activators Target Human Endothelial Cells to Inhibit Leukocyte–Endothelial Cell Interaction ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19 (9): 2094-2104. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.9.2094>.
- Johansson, Malin E V, Jenny K Gustafsson, Jessica Holmén-Larsson, Karolina S Jabbar, Lijun Xia, Hua Xu, Fayez K Ghishan, et al. 2014. « Bacteria Penetrate the Normally Impenetrable Inner Colon Mucus Layer in Both Murine Colitis Models and Patients with Ulcerative Colitis ». *Gut* 63 (2): 281-91. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303207>.
- Johansson, Malin E. V., Mia Phillipson, Joel Petersson, Anna Velcich, Lena Holm, et Gunnar C. Hansson. 2008. « The Inner of the Two Muc2 Mucin-Dependent Mucus Layers in Colon Is Devoid of Bacteria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (39): 15064-69. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>.
- Kamitani, Sumiko, Yasuhiro Yamauchi, Shin Kawasaki, Kazutaka Takami, Hajime Takizawa, Takahide Nagase, et Tadashi Kohyama. 2011. « Simultaneous Stimulation with TGF-B1 and TNF- $\alpha$  Induces Epithelial Mesenchymal Transition in Bronchial Epithelial Cells ». *International Archives of Allergy and Immunology* 155 (2): 119-28. <https://doi.org/10.1159/000318854>.
- Karayiannakis, Anastasios J., Konstantinos N. Syrigos, Jason Efstathiou, Ali Valizadeh, Masao Noda, Raymond J. Playford, Witold Kmiot, et Massimo Pignatelli. 1998a. « Expression of Catenins and E-Cadherin during Epithelial Restitution in Inflammatory Bowel Disease ». *The Journal of Pathology* 185 (4): 413-18. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199808\)185:4<413::AID-PATH125>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199808)185:4<413::AID-PATH125>3.0.CO;2-K).
- Karban, Amir S., Toshihiko Okazaki, Carolien I.M. Panhuysen, Thomas Gallegos, James J. Potter, Joan E. Bailey-Wilson, Mark S. Silverberg, et al. 2004. « Functional Annotation of a Novel NFKB1 Promoter Polymorphism That Increases Risk for Ulcerative Colitis ». *Human Molecular Genetics* 13 (1): 35-45. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh008>.
- Kaser, Arthur, Ann-Hwee Lee, Andre Franke, Jonathan N. Glickman, Sebastian Zeissig, Herbert Tilg, Edward E.S. Nieuwenhuis, et al. 2008. « XBP1 Links ER Stress to Intestinal Inflammation and Confers Genetic Risk for Human Inflammatory Bowel Disease ». *Cell* 134 (5): 743-56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.021>.
- Kaustio, Meri, Emma Haapaniemi, Helka Göös, Timo Hautala, Giljun Park, Jaana Syrjänen, Elisabet Einarsdottir, et al. 2017. « Damaging Heterozygous Mutations in NFKB1 Lead to Diverse Immunologic Phenotypes ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140 (3): 782-96. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.10.054>.
- Khare, Vineeta, Anita Krnjic, Adrian Frick, Christina Gmainer, Mario Asboth, Kristine Jimenez, Michaela Lang, Maximilian Baumgartner, Rayko Evstatiev, et Christoph Gasche. 2019. « Mesalamine and Azathioprine Modulate Junctional Complexes and Restore Epithelial Barrier Function in Intestinal Inflammation ». *Scientific Reports* 9 (1): 2842. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39401-0>.
- Kofla-Dłubacz, Anna, Tomasz Pytrus, Katarzyna Akutko, Patrycja Sputa-Grzegorzówka, Aleksandra Piotrowska, et Piotr Dziegiel. 2022. « Etiology of IBD—Is It Still a Mystery? » *International Journal of Molecular Sciences* 23 (20): 12445. <https://doi.org/10.3390/ijms232012445>.
- Kóvári, Bence, Ágnes Báthori, Mark S. Friedman, et Gregory Y. Lauwers. 2022. « Histologic Diagnosis of Inflammatory Bowel Diseases ». *Advances in Anatomic Pathology* 29 (1): 48-61. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000325>.
- Krug, Susanne M., Jörg D. Schulzke, et Michael Fromm. 2014. « Tight Junction, Selective Permeability, and Related Diseases ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 36 (décembre): 166-76. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.09.002>.

- Leesnitzer, Lisa M., Derek J. Parks, Randy K. Bledsoe, Jeff E. Cobb, Jon L. Collins, Thomas G. Consler, Roderick G. Davis, et al. 2002. « Functional Consequences of Cysteine Modification in the Ligand Binding Sites of Peroxisome Proliferator Activated Receptors by GW9662 ». *Biochemistry* 41 (21): 6640-50. <https://doi.org/10.1021/bi0159581>.
- Lewis, James D., Gary R. Lichtenstein, Julius J. Deren, Bruce E. Sands, Stephen B. Hanauer, Jeffrey A. Katz, Bret Lashner, et al. 2008. « Rosiglitazone for Active Ulcerative Colitis: A Randomized Placebo-Controlled Trial ». *Gastroenterology* 134 (3): 688-95. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.12.012>.
- Lewis, James D., Gary R. Lichtenstein, Robert B. Stein, Julius J. Deren, Thomas A. Judge, Franz Fogt, Emma E. Furth, et al. 2001. « An Open-Label Trial of the PPAR $\gamma$  Ligand Rosiglitazone for Active Ulcerative Colitis ». *The American Journal of Gastroenterology* 96 (12): 3323-28. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.05333.x>.
- Liu, Ting, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, et Shao-Cong Sun. 2017. « NF-KB Signaling in Inflammation ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2 (1): 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
- Maloy, Kevin J., et Fiona Powrie. 2011. « Intestinal Homeostasis and Its Breakdown in Inflammatory Bowel Disease ». *Nature* 474 (7351): 298-306. <https://doi.org/10.1038/nature10208>.
- Marconi, Guya D., Luigia Fonticoli, Thangavelu Soundara Rajan, Sante D. Pierdomenico, Oriana Trubiani, Jacopo Pizzicannella, et Francesca Diomedea. 2021. « Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis ». *Cells* 10 (7): 1587. <https://doi.org/10.3390/cells10071587>.
- Martin Mena, Anthony, Audrey Langlois, Silvia Specca, Lucil Schneider, Pierre Desreumaux, Laurent Dubuquoy, et Benjamin Bertin. 2017. « The Expression of the Short Isoform of Thymic Stromal Lymphopoietin in the Colon Is Regulated by the Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma and Is Impaired during Ulcerative Colitis ». *Frontiers in Immunology* 8 (septembre): 1052. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01052>.
- Marx, Nikolaus, François Mach, Alain Sauty, Josephine H. Leung, Mindy N. Sarafi, Richard M. Ransohoff, Peter Libby, Jorge Plutzky, et Andrew D. Luster. 2000. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Activators Inhibit IFN- $\gamma$ -Induced Expression of the T Cell-Active CXC Chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in Human Endothelial Cells ». *The Journal of Immunology* 164 (12): 6503-8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6503>.
- Mashimo, Hiroshi, Deng-Chyang Wu, Daniel K. Podolsky, et Mark C. Fishman. 1996. « Impaired Defense of Intestinal Mucosa in Mice Lacking Intestinal Trefoil Factor ». *Science* 274 (5285): 262-65. <https://doi.org/10.1126/science.274.5285.262>.
- Mehta, Shameer, Anke Nijhuis, Tomoko Kumagai, James Lindsay, et Andrew Silver. 2015. « Defects in the Adherens Junction Complex (E-Cadherin/  $\beta$ -Catenin) in Inflammatory Bowel Disease ». *Cell and Tissue Research* 360 (3): 749-60. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1994-6>.
- Mohan, Vishnu, Toru Nakata, A. Nicole Desch, Chloé Lévesque, Angela Boroughs, Gaelen Guzman, Zhifang Cao, et al. 2018. « *C1orf106* Is a Colitis Risk Gene That Regulates Stability of Epithelial Adherens Junctions ». *Science* 359 (6380): 1161-66. <https://doi.org/10.1126/science.aan0814>.
- Morikawa, Ryo, Yasuhiro Nemoto, Yuki Yonemoto, Shohei Tanaka, Yuria Takei, Shigeru Oshima, Takashi Nagaishi, et al. 2021. « Intraepithelial Lymphocytes Suppress Intestinal Tumor Growth by Cell-to-Cell Contact via CD103/E-Cadherin Signal ». *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 11 (5): 1483-1503. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.01.014>.
- Nakajima, Atsushi, Koichiro Wada, Hiroshi Miki, Naoto Kubota, Noriko Nakajima, Yasuo Terauchi, Shin Ohnishi, et al. 2001. « Endogenous PPAR $\gamma$  Mediates Anti-Inflammatory Activity in Murine Ischemia-Reperfusion Injury ». *Gastroenterology* 120 (2): 460-69. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.21191>.
- Nanki, Kosaku, Masayuki Fujii, Mariko Shimokawa, Mami Matano, Shingo Nishikori, Shoichi Date, Ai Takano, et al. 2020. « Somatic Inflammatory Gene Mutations in Human Ulcerative Colitis Epithelium ». *Nature* 577 (7789): 254-59. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1844-5>.

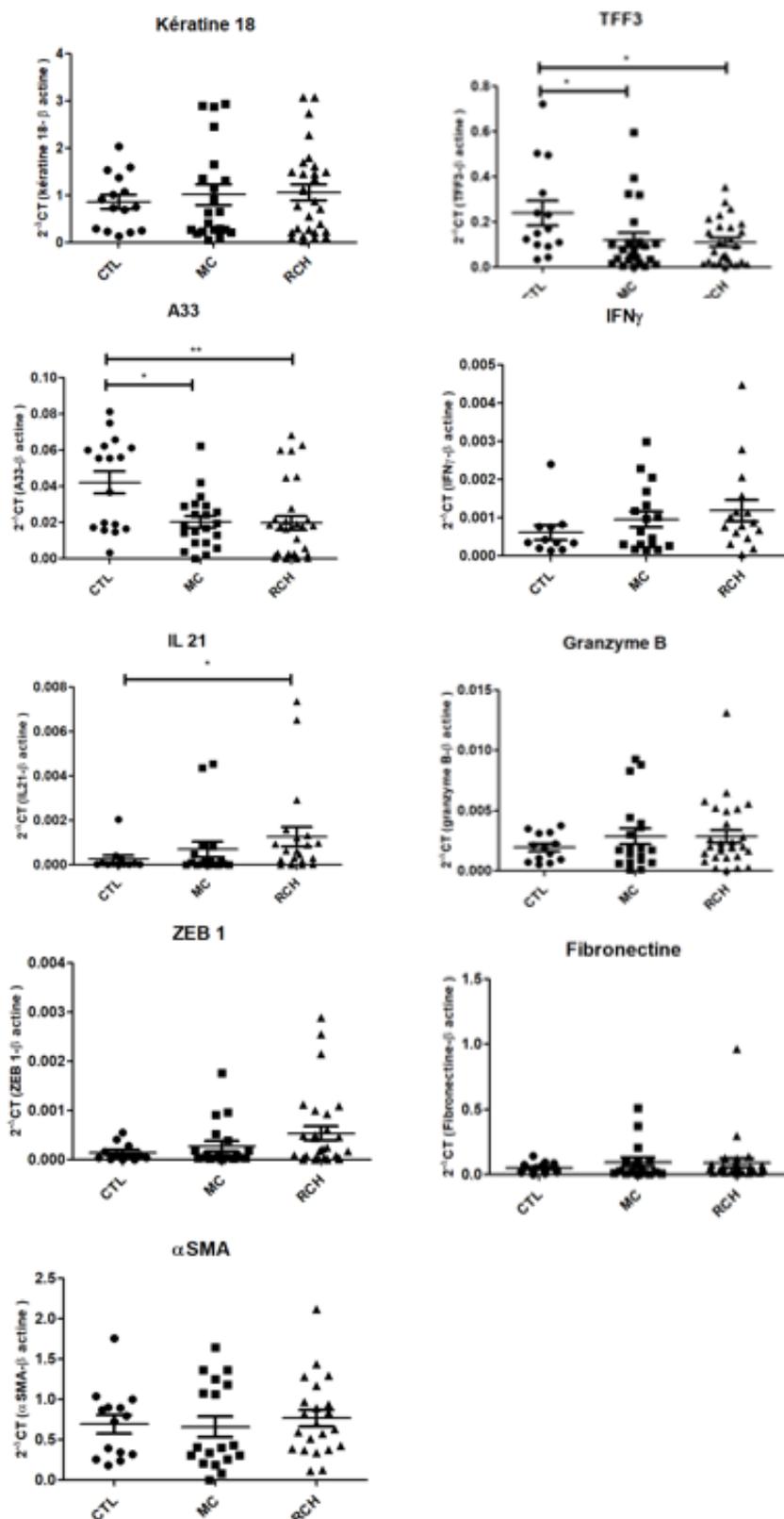
- Neurath, Markus F. 2014. « Cytokines in Inflammatory Bowel Disease ». *Nature Reviews Immunology* 14 (5): 329-42. <https://doi.org/10.1038/nri3661>.
- Odegaard, Justin I., Roberto R. Ricardo-Gonzalez, Matthew H. Goforth, Christine R. Morel, Vidya Subramanian, Lata Mukundan, Alex Red Eagle, et al. 2007. « Macrophage-Specific PPAR $\gamma$  Controls Alternative Activation and Improves Insulin Resistance ». *Nature* 447 (7148): 1116-20. <https://doi.org/10.1038/nature05894>.
- Olén, Ola, Rune Erichsen, Michael C Sachs, Lars Pedersen, Jonas Halfvarson, Johan Askling, Anders Ekblom, Henrik Toft Sørensen, et Jonas F Ludvigsson. 2020. « Colorectal Cancer in Ulcerative Colitis: A Scandinavian Population-Based Cohort Study ». *The Lancet* 395 (10218): 123-31. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32545-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32545-0).
- Olivares-Villagómez, Danyvid, et Luc Van Kaer. 2018. « Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier ». *Trends in Immunology* 39 (4): 264-75. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.11.003>.
- Peterson, Lance W., et David Artis. 2014. « Intestinal Epithelial Cells: Regulators of Barrier Function and Immune Homeostasis ». *Nature Reviews Immunology* 14 (3): 141-53. <https://doi.org/10.1038/nri3608>.
- Podolsky, Daniel K., et Kurt J. Isselbacher. 1984. « Glycoprotein Composition of Colonic Mucosa ». *Gastroenterology* 87 (5): 991-98. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(84\)80055-4](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(84)80055-4).
- Ricote, Mercedes, Jannet Huang, Luis Fajas, Andrew Li, John Welch, Jamila Najib, Joseph L. Witztum, Johan Auwerx, Wulf Palinski, et Christopher K. Glass. 1998. « Expression of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in Human Atherosclerosis and Regulation in Macrophages by Colony Stimulating Factors and Oxidized Low Density Lipoprotein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (13): 7614-19. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7614>.
- Roda, Giulia. 2010. « Intestinal Epithelial Cells in Inflammatory Bowel Diseases ». *World Journal of Gastroenterology* 16 (34): 4264. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i34.4264>.
- Ron, David, et Peter Walter. 2007. « Signal Integration in the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (7): 519-29. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>.
- Rousseaux, Christel, Bruno Lefebvre, Laurent Dubuquoy, Philippe Lefebvre, Olivier Romano, Johan Auwerx, Daniel Metzger, et al. 2005. « Intestinal Antiinflammatory Effect of 5-Aminosalicylic Acid Is Dependent on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  ». *Journal of Experimental Medicine* 201 (8): 1205-15. <https://doi.org/10.1084/jem.20041948>.
- Saito, Tomochika, Kota Yoshida, Kaori Matsumoto, Kohei Saeki, Yuiko Tanaka, Siew-Mei Ong, Nobuo Sasaki, Ryohei Nishimura, et Takayuki Nakagawa. 2014. « Inflammatory Cytokines Induce a Reduction in E-Cadherin Expression and Morphological Changes in MDCK Cells ». *Research in Veterinary Science* 96 (2): 288-91. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.02.005>.
- Salim, Sa'ad Y., et Johan D. Söderholm. 2011. « Importance of Disrupted Intestinal Barrier in Inflammatory Bowel Diseases ». *Inflammatory Bowel Diseases* 17 (1): 362-81. <https://doi.org/10.1002/ibd.21403>.
- Schneider, Marlon R., Maik Dahlhoff, David Horst, Benjamin Hirschi, Konrad Trülsch, Josef Müller-Höcker, Roger Vogelmann, et al. 2010. « A Key Role for E-Cadherin in Intestinal Homeostasis and Paneth Cell Maturation ». Édité par Hana Algül. *PLoS ONE* 5 (12): e14325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014325>.
- Schreiber, S, S Nikolaus, et J Hampe. 1998. « Activation of Nuclear Factor Kappa B in Inflammatory Bowel Disease ». *Gut* 42 (4): 477-84. <https://doi.org/10.1136/gut.42.4.477>.
- Schulzke, J.-D., C. Bojarski, S. Zeissig, F. Heller, A. H Gitter, et M. Fromm. 2006. « Disrupted Barrier Function through Epithelial Cell Apoptosis ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1072 (1): 288-99. <https://doi.org/10.1196/annals.1326.027>.
- Serigado, Joao M., Jennifer Foulke-Abel, William C. Hines, Joshua A Hanson, Julie In, et Olga Kovbasnjuk. 2022. « Ulcerative Colitis: Novel Epithelial Insights Provided by Single Cell RNA Sequencing ». *Frontiers in Medicine* 9 (avril): 868508. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.868508>.

- Su, Chinyu G., Xiaoming Wen, Shannon T. Bailey, Wen Jiang, Shamina M. Rangwala, Sue A. Keilbaugh, Anne Flanigan, Sreekant Murthy, Mitchell A. Lazar, et Gary D. Wu. 1999. « A Novel Therapy for Colitis Utilizing PPAR- $\gamma$  Ligands to Inhibit the Epithelial Inflammatory Response ». *Journal of Clinical Investigation* 104 (4): 383-89. <https://doi.org/10.1172/JCI7145>.
- Su, Weidong, Craig R. Bush, Brian M. Necela, Shelly R. Calcagno, Nicole R. Murray, Alan P. Fields, et E. Aubrey Thompson. 2007. « Differential Expression, Distribution, and Function of PPAR- $\gamma$  in the Proximal and Distal Colon ». *Physiological Genomics* 30 (3): 342-53. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00042.2007>.
- Suzuki, Shintaro T., et Shinji Hirano, éd. 2016. *The Cadherin Superfamily*. Tokyo: Springer Japan. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-56033-3>.
- Tanaka, Masanori, Hiroshi Saito, Tomomi Kusumi, Shinsaku Fukuda, Tadashi Shimoyama, Yoshihiro Sasaki, Koji Suto, Akihiro Munakata, et Hajime Kudo. 2001. « Spatial Distribution and Histogenesis of Colorectal Paneth Cell Metaplasia in Idiopathic Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 16 (12): 1353-59. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2001.02629.x>.
- The UK IBD Genetics Consortium et The Wellcome Trust Case Control Consortium 2. 2009. « Genome-Wide Association Study of Ulcerative Colitis Identifies Three New Susceptibility Loci, Including the HNF4A Region ». *Nature Genetics* 41 (12): 1330-34. <https://doi.org/10.1038/ng.483>.
- Tiwari, Prince, Arpita Mrigwani, Harpreet Kaur, Pallavi Kaila, Rajendra Kumar, et Purnananda Guptasarma. 2018. « Structural-Mechanical and Biochemical Functions of Classical Cadherins at Cellular Junctions: A Review and Some Hypotheses ». In *Biochemical and Biophysical Roles of Cell Surface Molecules*, édité par Kausik Chattopadhyay et Subhash C. Basu, 1112:107-38. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3065-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3065-0_9).
- Ungaro, Ryan, Saurabh Mehandru, Patrick B Allen, Laurent Peyrin-Biroulet, et Jean-Frédéric Colombel. 2017. « Ulcerative Colitis ». *The Lancet* 389 (10080): 1756-70. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32126-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32126-2).
- Uzzan, Mathieu, Jerome C. Martin, Luka Mesin, Alexandra E. Livanos, Tomas Castro-Dopico, Ruiqi Huang, Francesca Petralia, et al. 2022. « Ulcerative Colitis Is Characterized by a Plasmablast-Skewed Humoral Response Associated with Disease Activity ». *Nature Medicine* 28 (4): 766-79. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01680-y>.
- Villapol, Sonia. 2018. « Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma on Brain and Peripheral Inflammation ». *Cellular and Molecular Neurobiology* 38 (1): 121-32. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0554-5>.
- Wei, Jun, Asish K. Ghosh, Jennifer L. Sargent, Kazuhiro Komura, Minghua Wu, Qi-Quan Huang, Manu Jain, Michael L. Whitfield, Carol Feghali-Bostwick, et John Varga. 2010. « PPAR $\gamma$  Downregulation by TGF $\beta$  in Fibroblast and Impaired Expression and Function in Systemic Sclerosis: A Novel Mechanism for Progressive Fibrogenesis ». Édité par Joy Sturtevant. *PLoS ONE* 5 (11): e13778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013778>.
- Xue, Guohui, Yao Zhong, Lin Hua, Meijun Zhong, Xiaofeng Liu, Xueli Chen, Dian Gao, et Nanjin Zhou. 2019. « Aberrant Alteration of Follicular T Helper Cells in Ulcerative Colitis Patients and Its Correlations with Interleukin-21 and B Cell Subsets ». *Medicine* 98 (10): e14757. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014757>.
- Yamamoto-Furusho, J. K., M. Jacintez-Cazares, J. Furuzawa-Carballeda, et G. Fonseca-Camarillo. 2014. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Family Is Involved in the Response to Treatment and Mild Clinical Course in Patients with Ulcerative Colitis ». *Disease Markers* 2014: 1-7. <https://doi.org/10.1155/2014/932530>.
- Yamamoto-Furusho, Jesus K, et Norma N Parra-Holguín. 2021. « Emerging therapeutic options in inflammatory bowel disease ». *World Journal of Gastroenterology* 27 (48): 8242-61. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i48.8242>.
- Yamamoto-Furusho, Jesús K., Azucena Peñaloza-Coronel, Fausto Sánchez-Muñoz, Rafael Barreto-Zuñiga, et Aarón Dominguez-Lopez. 2011. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-

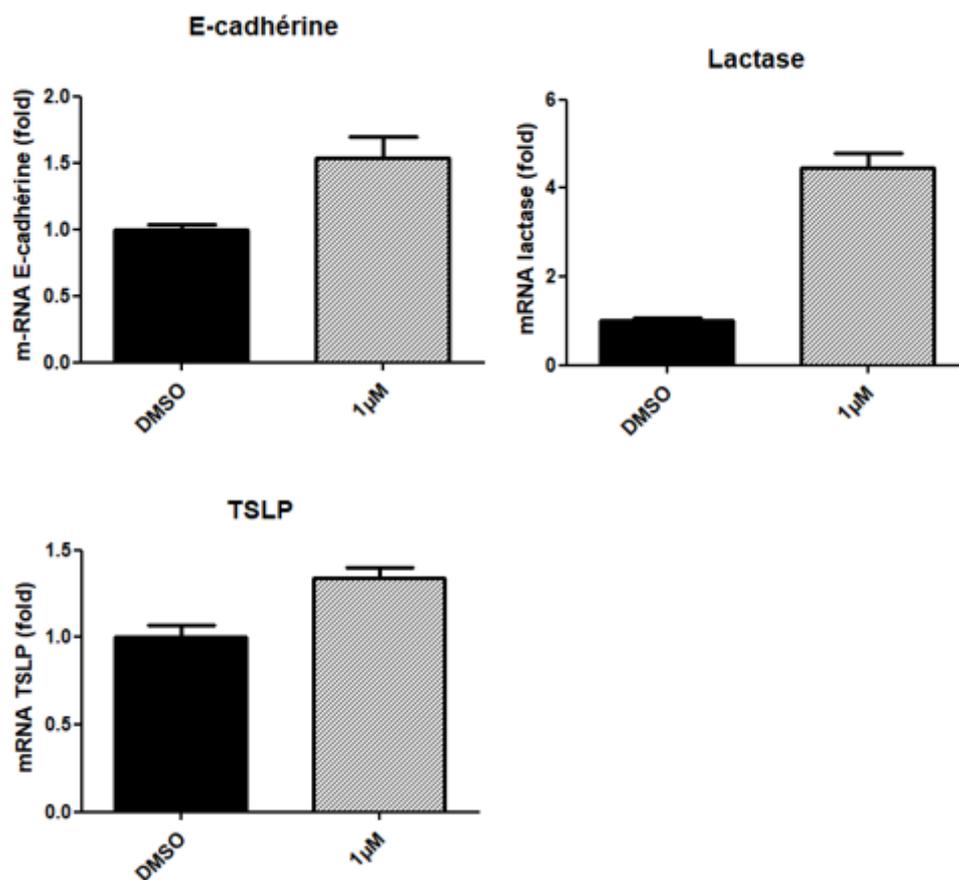
- Gamma (PPAR- $\gamma$ ) Expression Is Downregulated in Patients with Active Ulcerative Colitis »: *Inflammatory Bowel Diseases* 17 (2): 680-81. <https://doi.org/10.1002/ibd.21322>.
- Yang, Jing, Parker Antin, Geert Berx, Cédric Blanpain, Thomas Brabletz, Marianne Bronner, Kyra Campbell, et al. 2020. « Guidelines and Definitions for Research on Epithelial–Mesenchymal Transition ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (6): 341-52. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>.
- Yang, Pingli, Shan Chen, Gang Zhong, Weijia Kong, et Yanjun Wang. 2019. « Agonist of PPAR- $\gamma$  Reduced Epithelial-Mesenchymal Transition in Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps via Inhibition of High Mobility Group Box1 ». *International Journal of Medical Sciences* 16 (12): 1631-41. <https://doi.org/10.7150/ijms.35936>.
- Yang, Xiao Yi, Li Hua Wang, et William L. Farrar. 2008. « A Role for PPAR  $\gamma$  in the Regulation of Cytokines in Immune Cells and Cancer ». *PPAR Research* 2008: 1-12. <https://doi.org/10.1155/2008/961753>.
- Zeissig, S, N Burgel, D Gunzel, J Richter, J Mankertz, U Wahnschaffe, A J Kroesen, M Zeitz, M Fromm, et J-D Schulzke. 2007. « Changes in Expression and Distribution of Claudin 2, 5 and 8 Lead to Discontinuous Tight Junctions and Barrier Dysfunction in Active Crohn's Disease ». *Gut* 56 (1): 61-72. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.094375>.
- Zhao, Xinmei, Jinshui Fan, Fachao Zhi, Aimin Li, Chen Li, Alan E. Berger, Meher Preethi Boorgula, et al. 2015. « Mobilization of Epithelial Mesenchymal Transition Genes Distinguishes Active from Inactive Lesional Tissue in Patients with Ulcerative Colitis ». *Human Molecular Genetics* 24 (16): 4615-24. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv192>.



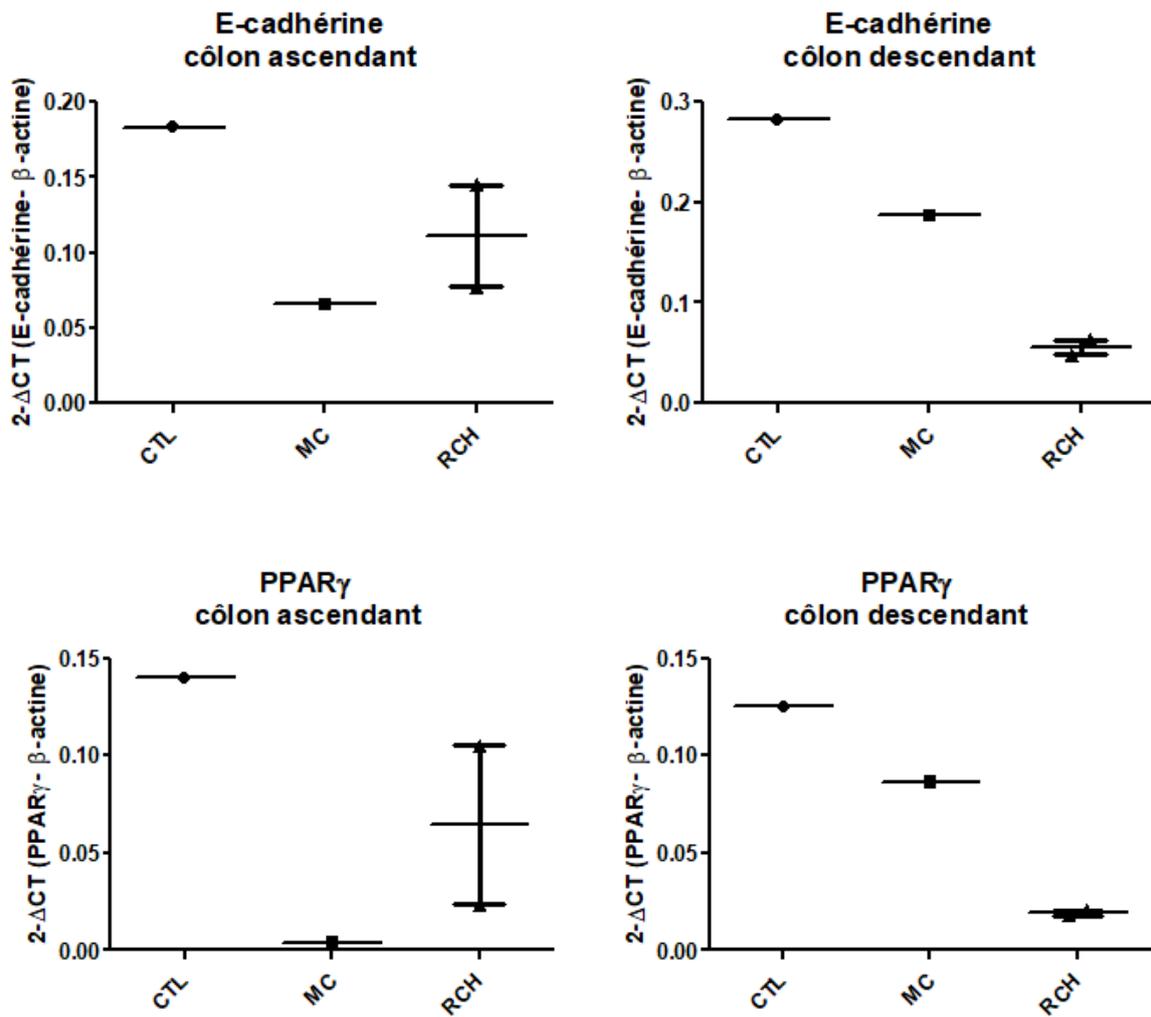
# Annexes



**Annexe 1 :** expression des gènes ci-dessus par RT-qPCR dans les prélèvements de muqueuses des patients



**Annexe 2 :** Expression de l'ARNm de l'E-cadhérine, lactase et TSL par RT-qPCR après stimulation par la rosiglitazone, un agoniste de PPAR $\gamma$  pendant 24, expérience réalisé une fois en triplicate



**Annexe 3 :** expression de l'ARNm de l'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$  à partir des CE isolées en fonction de la localisation

Université de Lille

FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE

**MEMOIRE DE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**

(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie)

Année Universitaire 2021/2022

**Nom : ZARNITZKY**

**Prénom : Pauline**

**Titre de la thèse :** Régulation de l'expression de l'E-cadhérine par PPAR $\gamma$  dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH

**Mots-clés :** rectocolite hémorragique, E-cadhérine, PPAR $\gamma$

---

**Résumé :**

**Introduction :** Ce travail étudie l'expression de l'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$  dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH (rectocolite hémorragique) par rapport à des individus contrôles (CTL) et des contrôles inflammatoires (maladie de Crohn, MC). Les objectifs sont *i*) de montrer qu'il existe une diminution significative de la quantité de l'E-cadhérine dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH, *ii*) que cette diminution est corrélée positivement à la diminution de PPAR $\gamma$  (déjà décrite dans notre laboratoire) et, enfin, *iii*) de mettre en évidence un lien de régulation directe entre PPAR $\gamma$  et l'E-cadhérine dans l'épithélium intestinal des patients atteints de RCH.

**Méthodes :** L'expression de l'E-cadhérine et de PPAR $\gamma$  ont été étudiées dans des prélèvements de côlons de patients (RCH, MC et CTL). Des lignées de cellules épithéliales Caco-2 où l'expression de PPAR $\gamma$  est inhibée par l'insertion d'un shRNA et des lignées de cellules épithéliales (Caco-2 et HT-29) stimulées par un antagoniste et un agoniste inverse de PPAR $\gamma$  ont été utilisées pour mettre en évidence un mécanisme de régulation de PPAR $\gamma$  sur l'E-cadhérine.

**Résultats :** Il existe une diminution significative de la quantité d'E-cadhérine (ARNm et protéine) dans l'épithélium colique des patients atteints de RCH. Bien qu'une corrélation forte et significative entre l'E-cadhérine et PPAR $\gamma$  a été mise en évidence sur les CE coliques, les résultats tendent à montrer que la diminution de PPAR $\gamma$  n'entraîne pas directement une diminution de l'E-cadhérine *in vitro*. En effet, lorsque l'expression de PPAR $\gamma$  est inhibée génétiquement, l'expression de l'E-cadhérine n'est pas impactée que ce soit au niveau de l'ARNm, de la protéine et de l'expression membranaire. Pour autant, nous ne pouvons pas exclure formellement une régulation directe de PPAR $\gamma$  sur l'E-cadhérine car l'inhibition de PPAR $\gamma$  par un agoniste inverse, le T0070907, a entraîné une diminution subtile mais significative de l'E-cadhérine au niveau de l'ARNm. Il est nécessaire de compléter ce travail pour infirmer ou confirmer ce mécanisme.

**Conclusion :** Ce projet pourrait amener à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de la RCH.

---

**Membres du jury :**

**Président :**

**Monsieur le Professeur Christophe CARNOY**

**Directeur, conseiller de thèse :**

**Monsieur le Docteur Bertrand MERESSE**

**Assesseurs :**

**Madame le Docteur Julie DEMARET**

**Monsieur le Docteur Benjamin DECKMYN**

**Membre extérieur :**

**Monsieur le Docteur Etienne BROCHOT**