

Thèse de Doctorat

Axel DÉsir-VIGNÉ

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Physiologie, biologie des organismes, populations, interactions

Spécialité : Biologie des organismes

Unité de recherche : UMR 1280 INRA-Université de Nantes

Soutenue le 10 juillet 2017

Rôle du stress du réticulum endoplasmique dans les altérations de la barrière épithéliale colique induites par un retard de croissance intra-utérin chez le rat.

JURY

Président du jury	Dr Khadija Ouguerram, Professeur des Universités, UMR 1280 INRA/Université de Nantes, Nantes
Rapporteurs :	Dr François BLACHIER, Directeur de recherche, UMR 914 PNCA, Paris Dr Hervé BLOTTIERE, Directeur de recherche, UMR 1319/ INRA-AgroParisTech, Jouy-en-Josas
Directeur de Thèse :	Dr Jean-Pierre SEGAIN, Directeur de recherche, UMR 1280 INRA-Université de Nantes

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTÉ DE MEDECINE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE
Année 2017

THÈSE DE DOCTORAT

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

**Discipline : Physiologie, biologie des organismes,
populations, interactions**

Spécialité : Biologie des organismes

**Rôle du stress du réticulum endoplasmique dans les
altérations de la barrière épithéliale colique induites par
un retard de croissance intra-utérin chez le rat.**

Présentée et soutenue publiquement par
Axel DESIR-VIGNE

JURY

Monsieur le docteur François Blachier (**Rapporteur**)
Monsieur le docteur Hervé Blottière (**Rapporteur**)
Madame la professeur Khadija Ouguerram (**Présidente du jury**)
Monsieur le docteur Jean-Pierre Segain (**Directeur de thèse**)

REMERCIEMENTS

Les travaux exposés au fil de ce mémoire de thèse ont été effectués au sein de l'UMR 1280 Physiopathologie des Adaptations Nutritionnelles (PhAN) sous la direction du Docteur Jean-Pierre Segain.

Je remercie tout d'abord Monsieur le Docteur François Blachier et Monsieur le Docteur Hervé Blottière d'avoir acceptés d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que pour leur intérêt envers mon travail de thèse.

Je remercie également Madame la Professeur Khadija Ouguerram d'avoir accepté d'examiner cette thèse ainsi pour son intérêt envers ce travail.

Mes remerciements vont tout naturellement au Docteur Jean-Pierre Segain, mon directeur de thèse, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse, pour ses conseils, son expertise et le temps qu'il a bien voulu me consacrer.

Je remercie Madame la Docteure Gwenola le Dréan, pour son aide précieuse, sa disponibilité, ses encouragements notamment au cours de ces dernier mois de thèse.

Merci à Pierre de Coppet et à Christian Bonnet auxquels je suis particulièrement redevable, pour leurs conseils, leurs compétences techniques et leurs qualités humaines durant ces années.

Je remercie Monsieur le professeur Dominique Darmaun et Madame la Docteure Patricia Parnet, tour à tour directeur et directrice du laboratoire durant mes années de thèse, pour leur accueil.

Je remercie la fondation SanTDige pour son soutien financier durant les derniers mois de ma thèse.

Merci à tous les membres du laboratoire PhAN, tous les chercheurs, techniciens et doctorants pour leur accueil, leur sympathie, leur disponibilité durant ces années.

J'adresse des remerciements plus appuyés aux autres étudiants, internes (aujourd'hui médecins) et doctorants ayant transité par cette Unité. Angèle, Camille, Emilie, votre amitié, votre estime m'ont permis de m'affirmer un peu plus et d'évoluer dès le départ dans de bonnes conditions. Charlotte, Marième, merci à vous. Pour votre écoute, votre amitié, vos coups de booste après mes minutes au « confessionnal », en espérant ne vous avoir pas trop cassé les oreilles en chantonnant.

Merci aux autres doctorantes du labo (Julie, Anne-Lise, Aurélie), aux post-docs (Marine, Diane), pour vos encouragements, votre sympathie.

Merci aux membres de ma famille pour leur soutien. Merci de m'avoir fait confiance, d'avoir presque toujours accepté mes choix à défaut de réellement les comprendre. Merci de m'avoir encouragé tout au long du chemin que j'ai entrepris.

A Romuald. Merci de me soutenir, de me « supporter » au quotidien, tout simplement. Merci de ta patience incommensurable, de ton optimisme, de ta présence. Les histones et le stress du RE n'ont en théorie plus de secret pour toi.

SOMMAIRE

RESUME	9
ABSTRACT	10
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	11
LISTE DES ABREVIATIONS	14
LISTE DES FIGURES	16
LISTE DES TABLEAUX	17
INTRODUCTION GENERALE	19
<u>PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	23
CHAPITRE I : LA FONCTION DE BARRIERE INTESTINALE	24
1. Structure anatomique de l'intestin	24
2. La fonction barrière de l'épithélium intestinal	26
3. La barrière physique ou barrière épithéliale	27
3.1. Les différents types cellulaires impliqués dans la fonction barrière	27
3.2. Renouvellement et différenciation de l'épithélium	28
3.3. Jonctions serrées et contrôle de la perméabilité paracellulaire de l'épithélium... 30	
3.4. Les cellules de Paneth et la production de peptides antimicrobiens	34
3.4.1. Les cellules de Paneth	34
3.4.2. Les peptides antimicrobiens.....	35
3.5. Les cellules caliciformes et le gel de mucus	36
3.5.1. Les cellules caliciformes	36
3.5.2. Le gel de mucus	36
4. Rôle du butyrate dans la l'homéostasie et le renouvellement de l'épithélium colique.	39
4.1. Origine du butyrate et absorption par le colonocyte	39
4.2. Rôle métabolo-épigénétique du butyrate.....	40
4.3. Rôle physiologique du butyrate.....	42
5. Altération du métabolisme du butyrate en condition pathologique	45
5.1. Les Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)	45
5.2. MICI et altérations du métabolisme du butyrate	46
5.3. Le cancer colorectal (CCR)	47
5.4. CCR et altération du métabolisme du butyrate.....	49
CHAPITRE II : STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET BARRIERE EPITHELIALE	52
1. Structure et fonction du réticulum endoplasmique	52
2. Stress du RE et réponse UPR	52
3. Transduction de la réponse UPR en condition de stress RE	53
3.1. PERK	54
3.2. ATF6.	55
3.3. La voie IRE1	56
4. Apoptose induite par le stress du RE	56
5. Régulation de la réponse UPR par acétylation	58
6. Stress du RE et pathologies digestives	60
6.1. Régulation de la réponse inflammatoire par la réponse UPR.....	60

6.2. Implication du stress du RE dans les MICI	61
6.2.1. MICI et défaut de la réponse UPR	61
6.2.2. Stress du RE, cellules à mucus et MICI	65
6.3. Stress RE et cancer	66
7. Thérapie des pathologies associées au stress RE par le phénylbutyrate.....	67
CHAPITRE III: BARRIERE EPITHELIALE COLIQUE ET MODIFICATIONS	
EPIGENETIQUES	71
1. Définition de l'épigénétique.....	71
2. Structure de la chromatine et régulation transcriptionnelle.....	72
3. Acétylation des histones	73
3.1. Les histones acétyl-transférases (HAT)	73
3.2. Les histones désacétylases (HDAC)	75
3.2.1. Régulation des activités HDAC	77
3.2.2. Inhibition des activités HDAC.....	77
4. Modifications de l'épigénome par les nutriments	79
CHAPITRE IV: ORIGINE DEVELOPPEMENTALE DE LA SANTE ET DES	
MALADIES DE L'ADULTE (DOHAD)	81
1. L'origine développementale de la santé et des maladies de l'adulte : bases	
théoriques et épidémiologiques	81
2. Le Retard de Croissance Intra-Utérin et l'origine fœtale des maladies de l'adulte.	83
2.1. Aspects cliniques, épidémiologiques et expérimentaux du RCIU	83
2.1.1. Définition et prévalence	83
2.1.2. Facteurs de risques	84
2.1.3. Conséquences néonatales et à court terme du RCIU	85
2.1.4. Conséquences à long terme du RCIU : programmation métabolique.....	86
3. Evidence de mécanismes épigénétiques dans le cadre de la programmation fœtale	87
3.1. Apports des modèles expérimentaux de RCIU.....	87
3.1.1. RCIU et rein	87
3.1.2. RCIU et foie	88
3.1.3. RCIU et muscle.....	89
3.1.4. RCIU et pancréas	89
3.2. Evidence chez l'homme.....	90
4. Le RCIU et la barrière épithéliale colique	90
4.1. Etudes épidémiologiques.....	90
4.2. Etudes expérimentales	91
5. Place du stress du RE dans l'étiologie du RCIU	93
6. Les modèles expérimentaux de RCIU	94
6.1. Modèles d'intervention chirurgicale.....	94
6.2. Modèles nutritionnels de retard de croissance.....	94
6.2.1. Restriction calorique	94
6.2.2. Restriction protidique.....	95
6.2.3. Déficit en fer	96

<u>PARTIE II : RESULTATS EXPERIMENTAUX</u>	98
OBJECTIF	100
Article 1	103
Article 2	135
Article 3	165
<u>PARTIE III : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION</u>	185
<u>PARTIE IV : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	198

RÉSUMÉ

Selon la théorie des origines développementales de la santé et des maladies (DOHaD), une perturbation de l'environnement nutritionnel pendant des périodes critiques de développement peut altérer le fonctionnement de différents organes et conditionner la survenue de pathologies chroniques à l'âge adulte. Les mécanismes moléculaires impliqueraient des régulations épigénétiques de l'expression de gènes jouant un rôle clé dans la plasticité tissulaire. Dans le cas du retard de croissance intra-utérin (RCIU), une réduction des apports nutritionnels placentaires augmente le risque de développer des maladies métaboliques à l'âge adulte, mais également des pathologies digestives. L'objectif de cette thèse était de déterminer l'impact d'un RCIU, obtenu par une dénutrition protéique de rates gestantes, sur la barrière épithéliale colique (BEC). Nous montrons qu'un RCIU induit à l'âge adulte, une diminution de l'utilisation du butyrate et des altérations de la BEC (une augmentation de la perméabilité, une diminution de la prolifération cellulaire et du nombre de cellules à mucus) associées à une augmentation des activités histones désacétylases (HDAC) et à une perte d'acétylation des histones. Les rats nés avec un RCIU ont une susceptibilité accrue à la colite et à la carcinogénèse. Nous démontrons qu'un stress du réticulum endoplasmique (RE) dans la BEC contribue aux anomalies épigénétiques. Enfin, nous proposons qu'un traitement périnatal par une combinaison de phénylbutyrate et de glutamine, visant à réduire le stress du RE, puisse améliorer les altérations de la BEC chez des individus nés avec un RCIU.

Mots clés

Programmation fœtale • Retard de Croissance Intra-Utérin • Côlon • Epigénétique • Stress du réticulum endoplasmique • Butyrate • Pathologies Coliques • DOHaD

ABSTRACT

According to the theory of the developmental origins of health and diseases (DOHaD), a poor nutritional environment during critical periods of development can alter the function of different organs favoring the occurrence of chronic pathologies in adulthood. Molecular mechanisms could involve epigenetic regulation of the expression of genes playing a key role in tissue plasticity. In the case of intrauterine growth retardation (IUGR), a reduction in placental nutrient intake increases the risk of developing metabolic diseases in adulthood, including digestive pathologies. The objective of this thesis was to determine the impact of an IUGR, obtained by protein undernutrition of pregnant rats, on the colonic epithelial barrier (CEB). We show that IUGR induces in adulthood, a decrease in butyrate utilization and BEC alterations (increased permeability, decreased cell proliferation and of Goblet cell number) associated with an increased histone deacetylase (HDAC) activity and a loss of histone acetylation. Rats born with IUGR have an increased susceptibility to experimental colitis and carcinogenesis. Interestingly, we demonstrate the presence of an endoplasmic reticulum (ER) stress in CEB that contributes to epigenetic abnormalities. Finally, we propose that perinatal treatment with a combination of phenylbutyrate and glutamine in order to reduce ER stress could improve CEB alterations in individuals born with IUGR.

Key words:

Fetal programming • Intrauterine growth retardation • Colon • Epigenetics • Endoplasmic reticulum stress • Butyrate • Colonic pathologies • DOHaD.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont donné lieu aux publications et communications suivantes:

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

Article 1:

Désir-Vigné A.,* Haure-Mirande V.,* de Coppet P., Bonnet C., Bossard C., Le Dréan G., Segain J.P. Metabolic and epigenetic modifications in the colonic epithelium following intrauterine growth restriction in rats increase the risk of colonic diseases. *En préparation pour soumission à Gastroenterology*).

*Ces auteurs ont contribué de façon équitable à l'étude.

Article 2:

Perinatal supplementation of 4-Phenylbutyrate and glutamine improves colonic epithelial barrier function in rats born with intrauterine growth restriction. **Axel Désir-Vigné**, Vianney Haure-Mirande, Pierre de Coppet, Dominique Darmaun, Gwénola Le Dréan, Jean-Pierre Segain. *Soumis pour publication dans Journal of Nutritional Biochemistry (JNB)*.

Article 3 :

Loss of histone acetylation induced by endoplasmic reticulum stress in colonic epithelial cells. **Axel Désir-Vigné**, Vianney Haure-Mirande, Pierre de Coppet, Jean-Pierre Segain. *En préparation pour soumission à The FASEB journal*.

Communications scientifiques

Communications orales

Désir-Vigné A., de Coppet P., Bonnet C., Segain J.P. 4-Phenylbutyrate prevents ER stress and colonic epithelial barrier dysfunctions in rats born with intrauterine growth restriction. **3^{ème} colloque de la Société Francophone sur les Origines Développementales, Environnementales et Epigénétiques de la Santé et des Maladies (SF DOHaD)**, Paris, 01-02 novembre 2016.

Désir-Vigné A., Haure-Mirande V., de Coppet P., Bonnet C., Le Dréan G., Segain J.P. Rôle du stress du réticulum endoplasmique dans les modifications épigénétiques de l'épithélium colique induit par un retard de croissance intra-utérin chez le rat, **Journées Francophones de Nutrition**, Marseille, 09-11 décembre 2015.

Désir-Vigné A., Haure-Mirande V., de Coppet P., Bonnet C., Le Dréan G., Segain J.P. Role of the endoplasmic reticulum stress in the loss of histone acetylation in colonic epithelium induced by intrauterine growth retardation, **Second Congress Epinantes**, Nantes, 06-07 octobre 2015.

Désir-Vigné A., De Coppet P., Bonnet C., Le Dréan G., Segain J-P. Rôle du stress du réticulum endoplasmique dans les modifications épigénétiques associées aux altérations de la barrière épithéliales coliques, **Journée Scientifique Jeunes Chercheurs de l'Institut des Maladies de l'Appareil Digestif**, Nantes, 08 juin 2015.

Désir-Vigné A., De Coppet P., Bonnet C., Le Dréan G., Segain J-P. Rôle du stress du réticulum endoplasmique dans les modifications épigénétiques associées aux altérations de la barrière épithéliales coliques. **33ème congrès du club d'étude des cellules épithéliales digestives (CECED)**, Nantes, 26-27 Mars 2015.

Désir-Vigné A., De Coppet P., Bonnet C., Le Dréan G., Segain J-P. Barrière Epithéliale Colique (BEC) et Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU), **Journée scientifique de l'Institut des Maladies de l'Appareil Digestif (IMAD)**, Nantes, 08 Juin 2014.

Communications affichées

Haure-Mirande V., Désir-Vigné A., de Coppet P., Bonnet C., Le Dréan G., Segain J.P. Le retard de croissance intra-utérin induit des altérations de la barrière épithéliale colique et augmente le risque de pathologie colique chez le rat. **Colloque «Nutrition, microbiote, métabolisme et cancer» réseau National Alimentation Cancer Recherche (NACRe)**, Paris, **15-16 octobre 2015.**

Julie Macher, Guillaume Poupeau, Christian Bonnet, Agnès David, Axel Désir-Vigné, Jean-Pierre Segain, Catherine Michel. Could early microbiota transplantation impact upon colonic barrier in rats born with intrauterine growth retardation? **3rd International Congress of Translational Research in Human Nutrition (ICTRHN)**, Clermont-Ferrand, 26-27 juin 2015.

Désir-Vigné A., Eutamène H., Ferrier L., Olivier I. Neonatal chronic stress triggers sex-specific divergent trajectories of gene expression in mouse adipose depots. **2nd colloque de la Société Francophone sur les Origines Développementales, Environnementales et Epigénétiques de la Santé et des Maladies (SF DOHaD)**, Nantes, 6-7 novembre 2014.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACL	ATP Citrate Lyase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGCC	Acide gras à chaîne courte
AOM	Azoxyméthane
ARN	Acide ribonucléique
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adénosine triphosphate
BIP	Binding immunoglobulin protein
CBC	Crypt Base Columnar
CCR	Cancer colorectal
CEC	Cellule épithéliale colique
CEI	Cellule épithéliale intestinale
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CHOP	C/EBP homologous protein
CpG	Dinucléotides Cytosine-Guanine
DNMT	DNA méthyltransférase
DOHaD	Origine développementale de la santé et des maladies de l'adulte
DSS	Dextran Sulfate de Sodium
DT2	Diabète de type 2
EIF2α	Eukaryotic Initiation Factor 2
ERAD	ER-associated degradation
GRP78	78 kDa glucose-regulated protein
HAT	Histone acétyl transférase
HDAC	Histone désacétylase
HMT	Histone méthyltransférase
I-κB	Inhibitor Kappa B
IKKβ	I κ B kinase β
IRE1α	Inositol-requiring enzyme 1
JAM	Junctional adhesion molecules
JNK	Jun N-terminal kinase
LRC	Label-retaining cells
MAPK	Mitogen-activated protein (MAP) kinase
MC	Maladie de Crohn
MCT1	Transporteur des monocarboxylates 1
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PAG	Petit pour l'âge gestationnel
PBA	Phénylbutyrate
PDX-1	Pancreatic duodenal homeobox 1
PERK	Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
RCH	Rectocolite Hémorragique
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
RE	Réticulum endoplasmique
REL	Réticulum endoplasmique lisse
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
ROS	Reactive oxygen species
S1P	Site-1-protease
S2P	Site-2-protease

SERCA	Sarcoendoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
SMCT1	(sodium-coupled monocarboxylate transporter 1)
TFF	Trefoil factor 3
TJ	Jonctions serrées
TLR	Toll-like receptor
TRAF-2	TNF receptor-associated factor 2
TUDCA	Tauroursodeoxycholic acid
UPR	Unfolded protein response
XBP1s	Spliced X-box binding protein 1 (forme épissée de XBP1)
XBP1u	Unspliced X-box binding protein 1(forme totale de XBP1)

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Coupe histologique de paroi intestinale (coloration éosine/hématoxyline)	24
Figure 2 : Coupes histologiques de muqueuse au niveau de l'intestin grêle et du côlon	25
Figure 3 : Les cellules épithéliales différenciées de l'intestin.	27
Figure 4 : Anatomie de l'épithélium au niveau de l'intestin grêle.	29
Figure 5 : Structure du système jonctionnel entre deux cellules épithéliales intestinales	31
Figure 6 : Voie de signalisations conduisant à la contraction et à la déstabilisation du cytosquelette d'acto-myosine.	33
Figure 7 : Structure des cellules caliciformes et synthèse du gel de Mucus.....	37
Figure 8 : Métabolisme du butyrate dans une cellule épithéliale colique	41
Figure 9 : Modèle d'acétylation des histones par le butyrate.	42
Figure 10 : Mécanismes explicatifs du butyrate paradoxe.	44
Figure 11 : Représentation de la séquence adénome-carcinome.	49
Figure 12 : Représentation schématique de la réponse UPR.	54
Figure 13 : Voies pro-apoptotiques induites par le stress du RE.....	58
Figure 14 : Réponse UPR et inflammation.	61
Figure 15 : Mécanisme d'action du Phénylbutyrate	68
Figure 16 : Action du phénylbutyrate (PBA) sur le cycle de l'urée.	69
Figure 17 : L'hypothèse du phénotype économe	82
Figure 18 : Protocole de RCIU induit chez le rat par dénutrition protéique de rates pendant la gestation et la lactation	103
Figure 19 : Protocole mis en place chez les rats RCIU afin de déterminer l'impact du RCIU sur l'épithélium colique	103
Figure 20 : Modèle mécanistique des altérations induites au niveau de l'épithélium colique dans le modèle de RCIU chez le rat.....	193

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Effets de différentes cytokines sur la perméabilité intestinale et la régulation des jonctions serrées	34
Tableau 2: Protocole expérimentaux reliant le stress du RE au développement de MICI.....	64
Tableau 3: Famille des histones lysine acétyltransférases	74
Tableau 4 : Histones désacétylases (HDAC)	76
Tableau 5 : Liste non exhaustive des inhibiteurs des HDAC	78
Tableau 6 : Régulation épigénétique par des composés bioactifs des aliments	80
Tableau 7 : Liste non exhaustive des facteurs de risque de survenue d'un RCIU	85
Tableau 8 : Etudes épidémiologiques mettant en évidence une corrélation entre le poids de naissance et des maladies chroniques à l'âge adulte	86
Tableau 9 : Etudes épidémiologiques sur le risque de pathologies coliques suite à un RCIU ou pendant l'enfance.....	91
Tableau 10 : Symptomatologie retrouvée dans le cadre d'un RCIU induit par restriction protidique maternelle chez le rat.....	95

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Il est maintenant admis que des perturbations de l'environnement nutritionnel au cours de fenêtres critiques du développement telles que les périodes pré-natales et post-natales, prédisposent à la survenue de pathologies chroniques à l'âge adulte. Ce concept de l'origine développementale des pathologies de l'adulte (DOHaD) ou programmation métabolique propose qu'un environnement nutritionnel fœtal altéré conduise à un ensemble de réponses adaptatives du métabolisme du fœtus permettant l'optimisation de sa croissance dans un environnement délétère. Ces réponses adaptatives altèrent néanmoins le développement et le fonctionnement de certains organes qui prédisposent à la survenue de pathologies chroniques à l'âge adulte (Barker, 1992 ; Gluckman et Hanson, 2008). Les mécanismes moléculaires de cette programmation fœtale impliqueraient des modifications épigénétiques de l'expression de gènes jouant un rôle prépondérant dans la différenciation et le développement d'organes clés (Burdge et al, 2007; Gluckman et Hanson, 2008). Ces modifications épigénétiques sont caractérisées par leur pérennité : elles peuvent être transmises au cours des divisions cellulaires, et ainsi modifier le fonctionnement des organes à long terme.

Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) est un archétype de la théorie de la programmation fœtale. Le RCIU se caractérise par une altération de la croissance fœtale secondaire à une réduction des échanges placentaires aboutissant à un poids de naissance inférieur à 2,5 kg. Il s'agit d'un problème clinique de première importance qui concerne près de 80 000 naissances chaque année en France. Cette condition est une cause majeure de mortalité et de morbidité néonatale. En accord avec la théorie du DOHaD, la réduction des apports nutritionnels (principalement en acides aminés) subie in utero par les enfants nés avec un RCIU augmente le risque de pathologies à court et à long terme. Ainsi, durant la période néonatale, le nouveau-né RCIU est notamment plus susceptible à l'intolérance alimentaire et à l'entérococolite nécrosante. A l'âge adulte, de nombreuses études épidémiologiques et cliniques témoignent de la relation entre le RCIU et le risque accru de syndrome métabolique, de diabète, d'insulino-résistance ou d'hypertension.

Les modèles animaux de RCIU ont également permis de confirmer ce lien de causalité et de mettre en évidence l'existence d'une programmation métabolique dans de nombreux organes tels que le rein, le foie, le pancréas ou encore le muscle. A contrario, peu de données issues de ces modèles permettent, en l'état actuel des connaissances, d'affirmer les effets d'une telle programmation sur la physiopathologie intestinale. Les données épidémiologiques et cliniques étudiant la relation entre le faible poids de naissance et le risque de développer des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) ou un cancer colorectal (CCR) sont de plus, inconsistantes sinon contradictoires (Sandhu et al, 2002 ; Nielsen et al, 2005 ; Hughes et al,

2010). Au cours des dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence l'importance de facteurs environnementaux et des modifications épigénétiques de l'expression des gènes dans la pathogénèse des MICI et du CCR. En particulier, des modifications du métabolisme énergétique de l'épithélium colique sont observées dans ces pathologies (Thibault et al, 2007). Ainsi, une diminution de l'utilisation du butyrate, source principale d'énergie du colonocyte, est observée au profit de celle du glucose. Des études récentes ont aussi identifié des modifications épigénétiques dans ces pathologies : des modifications des niveaux de méthylation de l'ADN ou de l'acétylation d'histones ont notamment été mises en évidence. En dépit de l'importance des facteurs environnementaux et des modifications épigénétiques et métaboliques dans l'étiologie de ces pathologies, l'impact de l'environnement nutritionnel fœtal dans ces modifications et dans la pathogénèse de ces maladies n'a pas été très étudié. En utilisant un modèle de RCIU induit par dénutrition protéique de rates gestantes, notre unité a précédemment montré qu'un RCIU perturbait à l'âge adulte la fonction barrière intestinale, diminuant l'expression des mucines (Fanca-Berthon et al, 2009), augmentant la perméabilité intestinale et le passage d'endotoxines (Le Dréan et al, 2014).

Notre **hypothèse générale** est que l'environnement nutritionnel périnatal pourrait induire une programmation métabolique au niveau de l'épithélium colique à l'instar de celle observée dans d'autres tissus. Cette programmation se traduirait par des modifications épigénétiques et du métabolisme énergétique de l'épithélium colique pouvant contribuer à la survenue de pathologies digestives à l'âge adulte.

En utilisant un modèle de RCIU induit par dénutrition protéique de femelles gestantes, les **objectifs** du projet de thèse ont été de rechercher si le RCIU pouvait induire des modifications du métabolisme énergétique de l'épithélium colique et d'analyser les mécanismes épigénétiques à l'origine de cette programmation.

La période néonatale constitue non seulement une fenêtre de vulnérabilité aux perturbations de l'environnement fœtale mais représente aussi une fenêtre d'opportunité de prévention de ces altérations. En ce sens, nous nous proposons dans un second temps de mettre en place une stratégie nutritionnelle durant la période néonatale visant à prévenir les altérations de la barrière épithéliale colique induite par un RCIU.

Dans la troisième partie de nos travaux, les résultats obtenus nous ont poussés à nous interroger sur la relation liant le stress du Réticulum Endoplasmique (RE) et l'activation des histones désacétylases ainsi que la perte d'acétylation d'H4K16. Nous postulons ici qu'il existe un mécanisme de régulation au cours duquel le stress du RE pourrait moduler la

machinerie épigénétique, conduisant ainsi à l'activation des HDAC et à la perte d'acétylation d'H4K16.

Avant d'exposer les résultats issus de cette thèse et d'en tirer les conclusions, un état de l'art sera tout d'abord effectué sur la barrière épithéliale colique et ses altérations en conditions physiopathologiques. Nous traiterons par la suite des modifications épigénétiques auxquelles est sujette la barrière en insistant plus particulièrement sur les modifications post-traductionnelles des histones et leurs implications dans les pathologies coliques. Enfin, nous ferons un rappel bibliographique sur le RCIU et son incidence dans le développement de pathologies chroniques (plus particulièrement de pathologies coliques) à l'adulte.

PARTIE I
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : LA FONCTION DE BARRIÈRE INTESTINALE

1. STRUCTURE ANATOMIQUE DE L'INTESTIN

La paroi de l'ensemble du tube digestif peut être anatomiquement divisée en quatre couches concentriques (de la lumière du tube vers l'intérieur de l'organisme): la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (**Figure 1**).

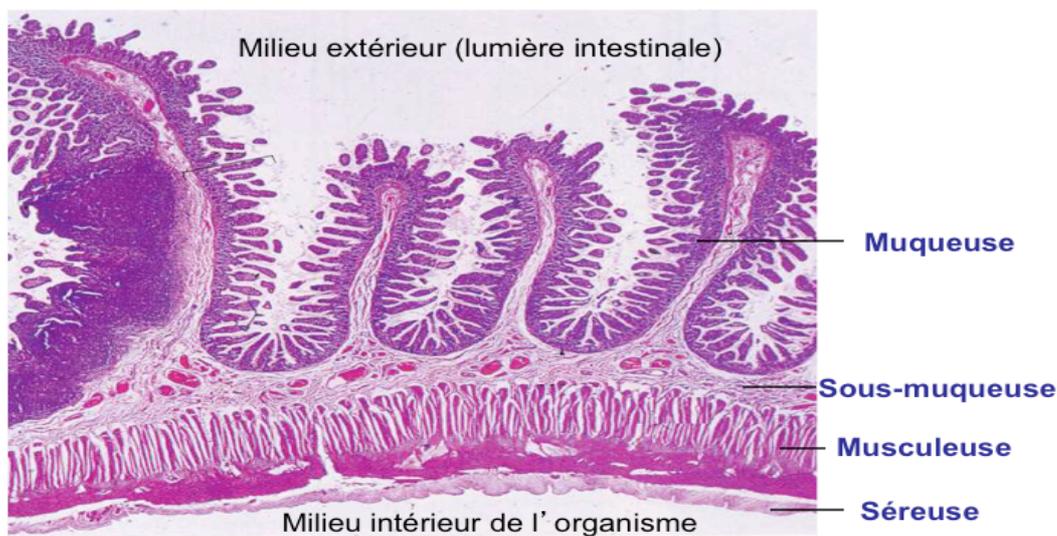


Figure 1: Coupe histologique de paroi intestinale (coloration éosine/hématoxyline)

La **muqueuse** est la couche directement en contact avec l'environnement extérieur qui doit assurer une fonction double de digestion des aliments pour fournir les nutriments essentiels à l'organisme et de barrière contre les agents nocifs (microbes, antigènes, toxiques). Elle est constituée de trois zones distinctes:

- L'épithélium, constitué d'une monocouche de cellules épithéliales comprenant différents types cellulaires aux fonctions distinctes (absorptives, endocrines et sécrétrices) que nous décrirons plus en détails ci-après.
- La lamina propria (ou chorion) jouant un rôle à la fois de soutien et dans la défense immune de la barrière intestinale. Elle est constituée de fibroblastes, de vaisseaux lymphatiques et sanguins et de cellules immunes disséminées.
- La musculaire muqueuse constituée d'une couche de muscles lisses est responsable des replis de la muqueuse.

La **sous-muqueuse** est composée de tissu conjonctif invaginé d'un réseau artériel, veineux et lymphatique dense ; de glandes ; et de cellules neuroganglionnaires réunies au sein du plexus sous-muqueux.

La **muscleuse** se compose de deux couches de fibres musculaires lisses : une couche musculaire lisse longitudinale et une couche musculaire lisse circulaire. Entre ces deux couches se trouve le plexus nerveux myentérique (ou plexus d'Auerbach).

La **séreuse ou adventice** est une tunique fine et continue, formée par une couche simple de cellules épithéliales délimitant le tractus digestif du reste de l'abdomen.

L'organisation de l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon est globalement similaire. Cependant, au niveau de l'intestin grêle, l'épithélium est structuré en invaginations appelées **cryptes de Lieberkühn** et en protrusions appelées **villosités** (**Figure 2**). Les villosités augmentent considérablement la surface de la muqueuse intestinale permettant ainsi une absorption optimale des nutriments. On y trouve majoritairement des entérocytes qui sont les cellules absorbatives. Les cryptes constituent un compartiment prolifératif, abritant un pool de cellules souches pluripotentes à l'origine des différents types cellulaires de l'épithélium. A l'inverse du grêle, la muqueuse colique ne comporte pas de villosités mais présente un épithélium de surface plat dont la fonction est principalement la réabsorption d'eau et d'ions.

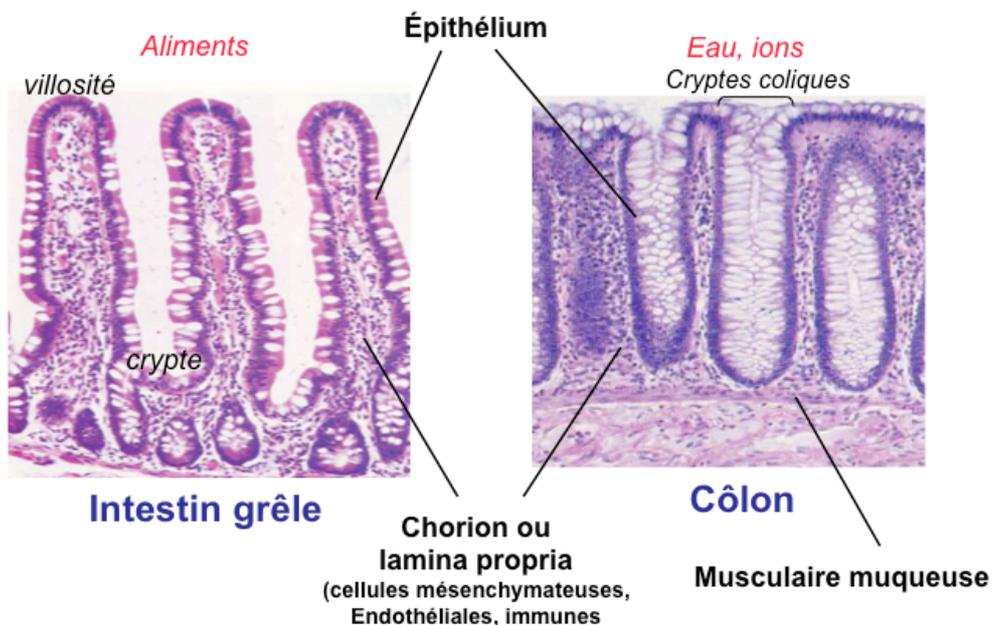


Figure 2: Coupes histologiques de muqueuse au niveau de l'intestin grêle et du côlon

2. LA FONCTION BARRIÈRE DE L'ÉPITHELIUM INTESTINAL

La barrière épithéliale intestinale représente la plus grande surface d'échange entre l'organisme et le milieu extérieur. Elle atteint près de 200 m² chez l'homme adulte. Cette muqueuse joue un rôle de filtre sélectif en permettant le passage et l'absorption des intrants nutritifs depuis la lumière intestinale jusqu'à la circulation générale tout en assurant aussi un rôle de barrière, qui prévient l'entrée dans l'organisme des microorganismes pathogènes (bactéries, champignons, virus), des antigènes et des xénobiotiques.

La fonction de barrière s'articule autour de quatre unités fonctionnelles étroitement liées et finement régulées permettant de garantir le maintien homéostatique de ce tissu :

- la **barrière mécanique**, correspondant au transit intestinal et ayant pour fonction principale d'assurer le cheminement du bolus alimentaire, de limiter la prolifération des bactéries dans l'intestin et leur translocation à travers la muqueuse intestinale,

- la **barrière écologique** composée par le microbiote intestinal (bactéries, virus, parasites et champignons commensaux): Par compétition, par ses productions de substances bactéricides ou par occupation de niches écologiques, le microbiote intestinal s'oppose aux microorganismes pathogènes. Il prend activement part à la fonction barrière en modulant l'expression de gènes impliqués dans l'absorption des nutriments, dans le métabolisme des xénobiotiques, dans la maturation intestinale et dans la mise en place d'un système immunitaire compétent,

- la **barrière immunologique**, composée par les cellules immunitaires organisées au sein du tissu lymphoïde associé au tube digestif (ou GALT : gut-associated lymphoid tissue) qui sécrètent des immunoglobulines et des cytokines nécessaires à la mise en place des réponses immunitaires contre les micro-organismes pathogènes, tout en maintenant une tolérance vis-à-vis des bactéries commensales et des antigènes alimentaires,

- la **barrière physique**, constituée de l'épithélium et des sécrétions des cellules qui le composent:

L'épithélium intestinal est la première ligne de défense de la barrière intestinale. Il se compose d'une monocouche de cellules épithéliales polarisées et soudées entre elles par un système de jonctions intercellulaires qui régule la perméabilité paracellulaire, la polarité et la cohésion de l'épithélium. L'épithélium est un acteur central dans le dialogue entre le contenu luminal (microbiote, divers antigènes) et le système immunitaire sous-jacent ;

Le mucus constitue une véritable barrière physique et chimique contre l'invasion de l'épithélium intestinal par des agents pathogènes présents dans la lumière du tube digestif et le protège des forces appliquées par le passage du bol alimentaire et des selles. Il se compose

essentiellement de mucines produites par les cellules caliciformes (ou en gobelet, goblet cells en anglais) et de molécules ayant une action antibactérienne ou bactériostatique produites par les cellules de Paneth, les entérocytes et les colonocytes ainsi que d'immunoglobulines (principalement d'IgA) sécrétées par les plasmocytes.

Au cours des chapitres suivants, nous nous focaliserons essentiellement sur la barrière physique et nous nous attacherons à en décrire les composantes, l'épithélium colique et son système jonctionnel ainsi que le gel de mucus.

3. LA BARRIÈRE PHYSIQUE OU BARRIÈRE EPITHELIALE

3.1. Les différents types cellulaires impliqués dans la fonction barrière

L'épithélium intestinal est constitué de 7 types cellulaires (**Figure 3**) dont les quatre principaux sont d'une part, des cellules absorbives (ou entérocytes ou colonocytes) et d'autre part des cellules sécrétrices comprenant les cellules caliciformes (ou goblet cell), les cellules de Paneth, et les cellules entéroendocrines.

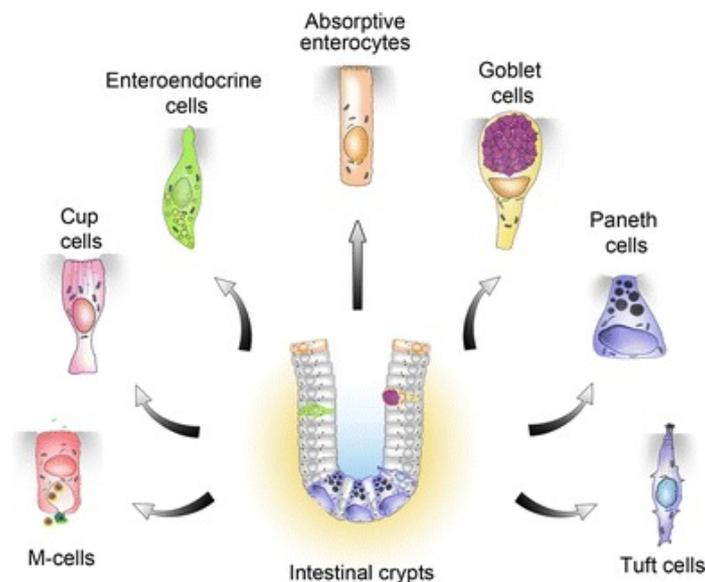


Figure 3: Les cellules épithéliales différenciées de l'intestin. D'après (Gerbe et al, 2012)

Les **entérocytes** (au niveau du grêle) et les **colonocytes** (au niveau du côlon) constituent 80 % de la population des cellules de l'épithélium. Ce sont des cellules hautement polarisées ayant pour fonction l'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes issus de l'alimentation mais également des processus de fermentations microbiennes. Elles sont

également impliquées dans la défense antimicrobienne en assurant le transport trans-cellulaire d'immunoglobulines (principalement d'IgA) sécrétées au niveau basal par les plasmocytes vers la lumière, ou en sécrétant des molécules antimicrobiennes (lysozyme, phosphatase alcaline intestinale, défensines).

Les **cellules caliciformes** aussi appelées **cellules à mucus** ou **cellules en Gobelet** permettent la synthèse des constituants du mucus (mucines et peptides en trèfle) et de peptides qui assurent une protection physique et chimique de l'épithélium.

Les **cellules de Paneth** assurent la défense non spécifique de l'épithélium contre les micro-organismes via la sécrétion de peptides antimicrobiens.

Les **cellules entéroendocrines** représentent environ 1% des cellules constituant l'épithélium. Elles sont à l'origine de la sécrétion d'hormones et de peptides neuromédiateurs tels que la CCK, le GLP-1 ou le PYY qui coordonnent différents processus tels que la motilité gastrique ou la prise alimentaire. Quinze sous-types de cellules peuvent être distingués selon la spécificité de leur sécrétome intervenant dans l'homéostasie du système digestif.

En dehors de ces 4 types cellulaires prédominants, l'épithélium abrite 3 types cellulaires d'abondance plus faible et dont, pour certains, les fonctions restent à être élucider. Les **cellules M (microfold)**, spécifiques de l'intestin grêle, sont caractérisées par une absence de microvilli, une localisation circonscrite aux follicules lymphoïdes ou plaque de Peyer ainsi qu'une invagination de la membrane basale abritant des cellules immunitaires. Les cellules M permettent le transfert par transcytose des antigènes luminaux aux cellules présentatrices d'antigènes situées dans l'invagination basale. Les **cellules Cup** (constituant 6 % de l'épithélium intestinal), se distinguent par la présence d'une bordure en brosse réduite et une forte activité phosphatase alcaline semblant indiquer un rôle dans la régulation de l'absorption intestinale des lipides ou dans la prévention de la translocation bactérienne. Les **cellules Tuft** constituent 0.4 % de l'épithélium intestinal. Elles seraient impliquées dans la chémoréception du contenu luminal et constitueraient le seul type cellulaire intestinal capable de synthétiser des opioïdes et la β -endorphine régulant la motricité intestinale et la perception de la douleur (Gerbe et al, 2011).

Ci-après, nous décrirons plus en détails la physiologie et la structure les cellules de Paneth et les cellules caliciformes. Ces types cellulaires participent de façon directe et active à la fonction barrière de l'intestin.

3.2. Renouveau et différenciation de l'épithélium

L'épithélium intestinal est le tissu de l'organisme qui se renouvelle le plus rapidement. Le renouvellement des cellules constituant l'épithélium intestinal s'effectue à partir de cellules souches pluripotentes situées à la base des cryptes (**Figure 4**). Celles-ci donnent naissance à des progéniteurs transitoires qui migrent et se différencient le long de l'axe crypto-villositaire en cellules absorbatives, caliciformes et entéroendocrines. Ces cellules différenciées sont ensuite éliminées à l'apex des villosités par un mécanisme apoptotique (l'anoïkis), puis exfoliées dans la lumière intestinale en 2 à 3 jours chez le rat et en 4 à 5 jours chez l'homme. Les progéniteurs transitoires donnent également naissance aux cellules de Paneth mais celles-ci migrent vers le fond des cryptes. Elles ont une durée de vie plus longue (environ 20 jours) et sont éliminées par phagocytose.

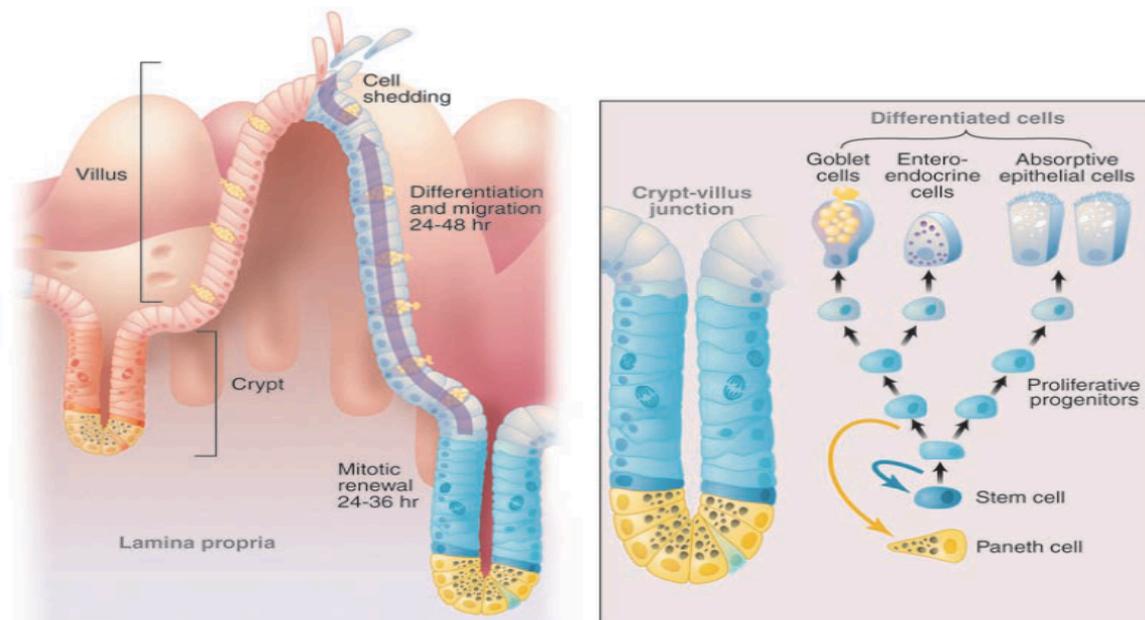


Figure 4: Anatomie de l'épithélium au niveau de l'intestin grêle. A gauche, détails de la structure en cryptes et villosités. A droite, détails d'une crypte et de la division et différenciation des cellules souches en différents types cellulaires (voir texte). D'après (Radtke et al, 2005)

Le nombre et la position des cellules souches sont sujets à discussion. Les cryptes coliques contiendraient 3 à 4 cellules souches quand les cryptes de l'intestin grêle en abriteraient entre 4 et 16. Il semblerait que deux populations de cellules souches cohabiteraient au sein de l'épithélium intestinal :

Les **cellules LRC** (*label-retaining cells*) sont caractérisées par une différenciation lente et seraient localisées au-dessus des cellules de Paneth, en position +4 à partir de la base de la crypte (Potten et al, 1997; Sangiorgi et al, 2008). Leurs marqueurs spécifiques sont Bmi1 (complexe répresseur Polycomb-1), Tert et Hopx (Sangiorgi et al, 2008).

Les cellules **CBC** (*Crypt Base Columnar*) qui constituent l'autre niche de cellules souches intestinales, sont situées au fond des cryptes et enchâssées entre les cellules de Paneth. Ces cellules se caractérisent par une division rapide (toutes les 24h) et un marqueur spécifique Lgr5 (Leucine-rich repeat-containing G Protein-coupled receptor 5). Ce récepteur membranaire des R-spondines est impliqué dans la voie de signalisation Wnt (Barker et al, 2007).

La biologie des cellules souches a fait l'objet ces deux dernières décennies de nombreux travaux qui ont mis en évidence les voies de signalisation et les facteurs de transcription impliqués dans la pluripotence, la prolifération et la différenciation cellulaire de l'épithélium intestinal. Les voies Notch et Wnt jouent notamment un rôle essentiel dans la prolifération et différenciation des cellules souches vers les lignées sécrétrices ou vers la lignée absorptive. Pour plus de détails, nous conseillons au lecteur de se référer aux nombreuses revues de la littérature (Haegerbarth et al, 2009; Pinto et al, 2005; van der Flier et al, 2009).

3.3. Jonctions serrées et contrôle de la perméabilité de l'épithélium intestinal

L'espace compris entre deux cellules adjacentes est fermé par des jonctions intercellulaires permettant l'étanchéité et la cohésion mécanique entre les cellules. Trois types de jonctions intercellulaires réunies sous le terme de complexe jonctionnel épithélial, assurent cette fonction barrière : les jonctions serrées (Tight Junction (**TJ**) ou zonula ocludens), les jonctions dites adhérentes (adherens Junction ou zonula adhaerens) et les desmosomes (**Figure 5**).

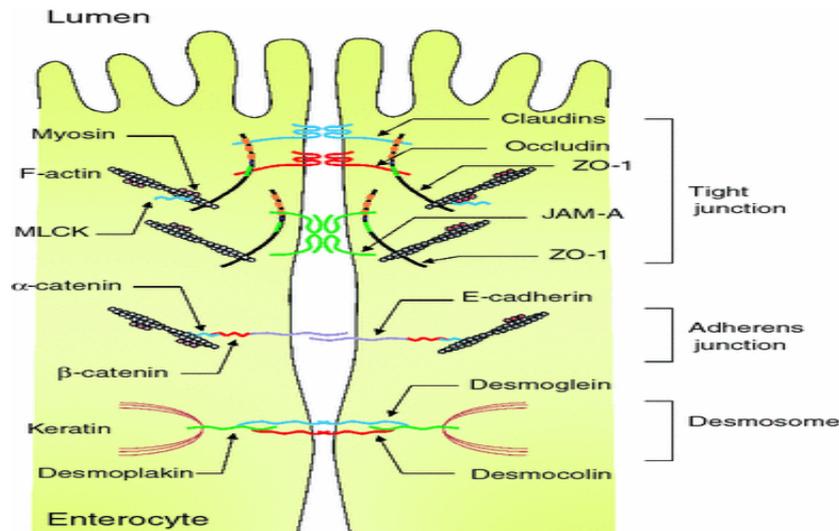


Figure 5: Structure du système jonctionnel entre deux cellules épithéliales intestinales.
(Suzuki 2013)

Les jonctions serrées sont les plus apicales et jouent un rôle central dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire de l'épithélium intestinal permettant un passage sélectif d'ion, de soluté et d'eau et restreignant la diffusion des lipides et des protéines entre les domaines apicaux et baso-latéraux des cellules et le passage des macromolécules de taille supérieure à 600Da (Farquhar et al, 1963; Tsukita et al, 2001). Les jonctions serrées sont composées de quatre protéines transmembranaires : l'occludine, les claudines, les JAM et la tricelluline. Celles-ci sont associées aux protéines cytoplasmiques ZO interagissant avec le cytosquelette d'actine et les jonctions adhérentes.

La structure et la fonction des jonctions serrées sont régulées par le cytosquelette d'acto-myosine et par différentes voies de signalisation. L'anneau périjonctionnel d'acto-myosine joue un rôle pivot non seulement dans le maintien des jonctions serrées, mais aussi dans leur ouverture. La phosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC2) induit une contraction de l'anneau périjonctionnel d'acto-myosine entraînant l'ouverture des jonctions serrées et une augmentation de la perméabilité (Turner et al, 1997). De même, les travaux de Stevenson et ses collaborateurs mettent en lumière la relation entre la phosphorylation des protéines qui constituent les jonctions serrées et notamment de ZO-1, et la régulation des jonctions serrées (Stevenson et al, 1989). La phosphorylation de l'occludine module également la perméabilité intestinale en induisant sa délocalisation des jonctions serrées vers le cytoplasme (Raleigh et al, 2011).

Les voies de signalisation **RhoA/Rho-associated protéine kinase (ROCK)**, **protéine kinase C (PKC)** et **Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)** modulent l'expression et la phosphorylation des protéines des jonctions serrées ainsi que la phosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC) et permettent ainsi la maintenance, l'assemblage, le désassemblage des jonctions et la modulation de la perméabilité paracellulaire en réponse à ces stimuli. ROCK, effecteur de RhoA est le régulateur principal de la perméabilité intestinale. Il permet la phosphorylation de l'occludine et des Claudines, induisant ainsi une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Yamamoto et al, 2008). ROCK est aussi à l'origine de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine 2 (MLC2), phénomène à l'origine de la contraction du réseau d'acto-myosine et de l'ouverture des jonctions serrées. Cette phosphorylation de MLC2 est d'autant plus amplifiée par l'inactivation de la myosine light chain Phosphatase (MYPT1 ou MLCP) par ROCK et les sérines kinases MRCK (effecteurs de Cdc42) ainsi que par l'activité de la myosine light chain kinase (MLCK) (Yu et al, 2010). Outre la voie Rho, différentes études suggèrent que les voies **PKC** pourraient intervenir à la fois dans la formation, le maintien et la perméabilité des jonctions. La stimulation des cPKC (classical PKC) et nPKC (novel PKC) par l'ester de phorbol (PMA) entraîne le désassemblage des TJ mais l'inhibition de ces PKC empêche la formation des jonctions serrées (Hecht et al, 1994; Jain et al, 2011; Suzuki et al, 2009). Enfin, les **MAPK** sont également capables, de phosphoryler les protéines impliquées dans les jonctions serrées. Ainsi, MAPK phosphoryle la claudine-1 et module la perméabilité paracellulaire (Fujibe et al, 2004).

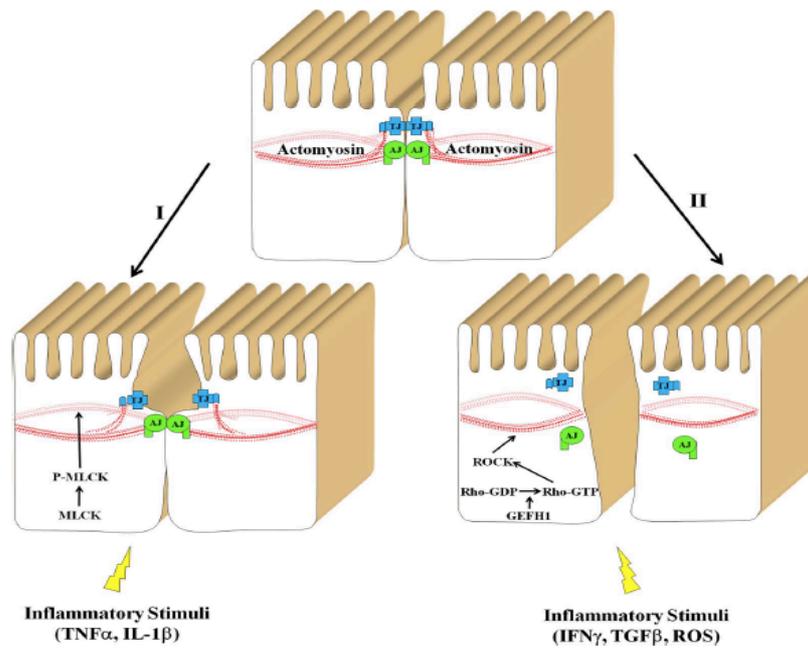


Figure 6: Voie de signalisations conduisant à la contraction et à la déstabilisation du cytosquelette d'acto-myosine. La voie I implique la MLCK et induit une contraction de l'anneau d'acto-myosine et l'ouverture des jonctions serrées (TJ). La voie II implique la voie Rho/ROCK induit une forte contraction et une désorganisation du cytosquelette d'acto-myosine et du complexe jonctionnel (TJ et AJ, Aderens junction). D'après (Ivanov et al, 2010).

De nombreux stimuli extracellulaires comprenant notamment des nutriments tels que le glucose, les acides gras insaturés et les acides aminés ou des hormones, régulent les jonctions serrées et la fonction barrière de l'épithélium (Suzuki 2013). De plus, dans des situations pathologiques comme l'inflammation, les cytokines (**Tableau 1**) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par les cellules immunitaires et les cellules épithéliales intestinales modulent la perméabilité paracellulaire en induisant l'ouverture des jonctions serrées et la contraction du cytosquelette d'acto-myosine via la voie MLCK ou en désorganisant le complexe jonctionnel et le cytosquelette d'actine via la voie Rho/RhoKinase (**Figure 6**) (Ivanov et al, 2010; McKenzie et al, 2007). Les cytokines peuvent aussi moduler la perméabilité en modifiant l'expression ou la distribution cellulaire des protéines constituant les jonctions serrées et l'expression des gènes associés.

Le tableau 1 suivant répertorie les cytokines qui régulent l'expression des jonctions serrées et modulent la perméabilité intestinale ainsi que les mécanismes sous-jacents.

Cytokines	Perméabilité	Lignée cellulaire	Mécanismes
IFN- γ	Augmentée	T84	Vacuolarisation dépendante de la myosine, MLC/Rho/ROCK ↔ Claudine 1 et 4 (Bruewer et al, 2003; Bruewer et al, 2004; Bruewer et al, 2005)
TNF- α	Augmentée	Caco-2 HT29/B6	↑NF- κ B, MLCK, pMLC ↓ ZO-1 (Ma et al, 2004; Ma et al, 2005; Ye et al, 2006) ↑ Claudine 2 (Mankertz et al, 2009)
IL-1	Augmentée	Caco-2	NF- κ B ↓ occludine ↑MLC (Al-Sadi et al, 2007; Al-Sadi et al, 2008)
IL-4	Augmentée	T84	↑ Claudine 2 (Wisner et al, 2008)
IL-6	Augmentée	Intestin Caco-2	↓ ZO-1 (Yang et al, 2003) ↑ Claudine 2 (Suzuki et al, 2011)
IL-13	Augmentée	T84; HT29/B6	↑ Claudine 2 (Prasad et al, 2005; Weber et al, 2010)
IL-10	Diminuée	T84	Neutralisation l'IFN- γ (Madsen et al, 1997)
IL-17	Diminuée	T84	↑ Claudine 2 (Kinugasa et al, 2000)
TGF- β	Diminuée	T84	↑ Claudine 1 (Howe et al, 2002) Neutralisation l'IFN- γ (Hering et al, 2011)
		HT29/B6	↑ Claudine 4 (Hering et al, 2011)

Tableau 1: Effets de différentes cytokines sur la perméabilité intestinale et la régulation des jonctions serrées.

↓↑ : Respectivement, diminution ou augmentation de l'expression transcriptomique ou protéique des jonctions serrées.

↔ Altération de la distribution de la protéine. D'après (Suzuki 2013)

3.4. Les cellules de Paneth et la production de peptides antimicrobiens

3.4.1. La cellule de Paneth

Les **cellules de Paneth** se caractérisent par leur forme pyramidale et la présence à leur pôle apical de granules de sécrétion éosinophiles. Résidant à la base des **cryptes**, **elles** assurent la défense non spécifique de l'épithélium contre les micro-organismes via la sécrétion d'un large panel de peptides antimicrobiens (défensines, ribonucléase, lysozyme...). Cette réponse participe à la barrière non-immune et permet d'éliminer les micro-organismes pathogènes mais également de contrôler la colonisation de la muqueuse par la flore commensale. Ces

cellules sont spécifiques de l'intestin grêle et ne sont pas retrouvées en condition physiologique au sein du côlon.

3.4.2. Peptides antimicrobiens

Les cellules de Paneth mais également les entérocytes et les colonocytes sont capables de synthétiser un ensemble de peptides et d'enzymes antimicrobiens à large spectre. Cette réponse participe à l'immunité innée et permet de réagir rapidement à une infection.

Parmi ces peptides antimicrobiens, les **défensines** occupent une place prépondérante. Il s'agit de petits peptides cationiques (3-4 kDa) caractérisés par la présence de six résidus cystéine et des feuilletts β stabilisés par trois ponts disulfure. On distingue deux types de défensines. Les β défensines et les α défensines, ayant une structure tridimensionnelle similaire et qui ne diffèrent que par leur taille et l'agencement de leurs ponts disulfures. Le mécanisme d'action des défensines intestinales n'est pas connu mais en raison de leurs fortes homologues avec les défensines produites par les neutrophiles circulants et les Natural Killer, il semblerait qu'elles agissent en induisant la perméabilisation des membranes cellulaires et l'activation d'autolysines bactériennes. En condition physiologique normale, les cellules de Paneth ne sont retrouvées qu'au niveau intestinal. Dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), incluant la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique, la présence de cellules de Paneth au sein de l'épithélium colique permet de répondre à l'inflammation et à la dysbiose par la production d' α -défensines et de lysozyme (Cunliffe et al, 2001; Fahlgren et al, 2003; Muller et al, 2005). Les cellules épithéliales (entérocytes et colonocytes) sécrètent également des β -défensines tout au long du tractus digestif. La synthèse des défensines HD5 et HD6 est spécifique des seules cellules de Paneth tandis que les β -défensines HBD sont produites par les colonocytes.

D'autres peptides antimicrobiens participent à la défense de l'épithélium :

- le **lysozyme**, enzyme produite par les cellules de Paneth ayant une action antimicrobienne essentiellement contre les bactéries Gram+ dont elle lyse le réseau de peptidoglycane,
- la phospholipase A2 **PLA2**, enzyme possédant une action antimicrobienne à large spectre exerçant la dégradation des phospholipides bactériens,
- la **Cathelicidine** (dont le seul représentant chez l'homme est LL-37) constitue un peptide antimicrobien ayant un large spectre d'action dirigé contre les bactéries Gram+ ainsi que les bactéries gram- ou encore la levure *Candida albicans*. Son expression est induite par les acides gras à courte chaîne (AGCC), en particulier par le butyrate. De façon notable, la

synthèse des peptides antimicrobiens inductibles est tributaire de la reconnaissance des MAMP (microbial-associated molecular pattern) par les récepteurs TLR (Toll-like receptors). Les études réalisées sur des souris KO NOD2^{-/-}, indiquent l'implication de NOD2 dans la synthèse de l' α -défensine par les cellules de Paneth (Vaishnava et al, 2008). De même, l'expression de HDB-2 par les entérocytes semble dépendante de l'activation des TLR (Vora et al, 2004).

3.5. Les cellules caliciformes et le gel de mucus

3.5.1. Les cellules caliciformes

Les **cellules caliciformes** sont des cellules à pôle muqueux ouvert qui se caractérisent par leur pôle basal effilé et leur pôle apical renflé comportant des nombreuses granules de sécrétion. Le pôle basal concentre un cytoplasme réduit, le noyau, l'appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique rugueux (RER) très développé en lien avec leur importante capacité de synthèse. Les cellules caliciformes synthétisent des mucines (MUC) qui sont sécrétées au pôle apical et forment un gel de surface assurant une protection de l'épithélium. La proportion de ces cellules augmente du duodénum (4%) vers le côlon (16%).

3.5.2. Le gel de mucus

Le gel de mucus présente une épaisseur d'environ 200 μ m chez l'homme. Le mucus limite la translocation de micro-organismes potentiellement pathogènes et des macromolécules de grande taille, tout en étant nécessaire à l'adhésion du microbiote commensal (Katayama et al, 1997). Ce mucus permet aussi une lubrification de la surface du tractus digestif qui contribue à l'expulsion des fèces et lutte contre les forces de cisaillement induites par le passage du contenu digestif. Le mucus participe de façon non négligeable à l'apport énergétique du microbiote commensal et donc à son maintien (Derrien et al, 2008; Salyers et al, 1977; van Passel et al, 2011). Le mucus est issu de la polymérisation des MUC (**Figure 7**), protéines caractérisées par la présence d'un domaine riche en proline, thréonine, serine (domaine PTS ou domaine MUC) ainsi que de très nombreuses chaînes oligosaccharidiques. Le poids moléculaire des mucines varie entre 250 kD dans le cas de MUC2 et 30000 kD pour le polymère de MUC2. Chez l'homme, il existe 19 gènes codant pour les mucines, appelés *MUC* dont l'expression de chacun est plus ou moins spécifique de l'organe considéré. Les mucines peuvent être classifiées en deux groupes : les mucines

transmembranaires couvrant le pôle apical des entérocytes, constituant le glycocalyx et les mucines dites « sécrétées » formant de larges polymères à l'origine du gel de mucus. Au niveau du côlon, le mucus est essentiellement composé de MUC2.

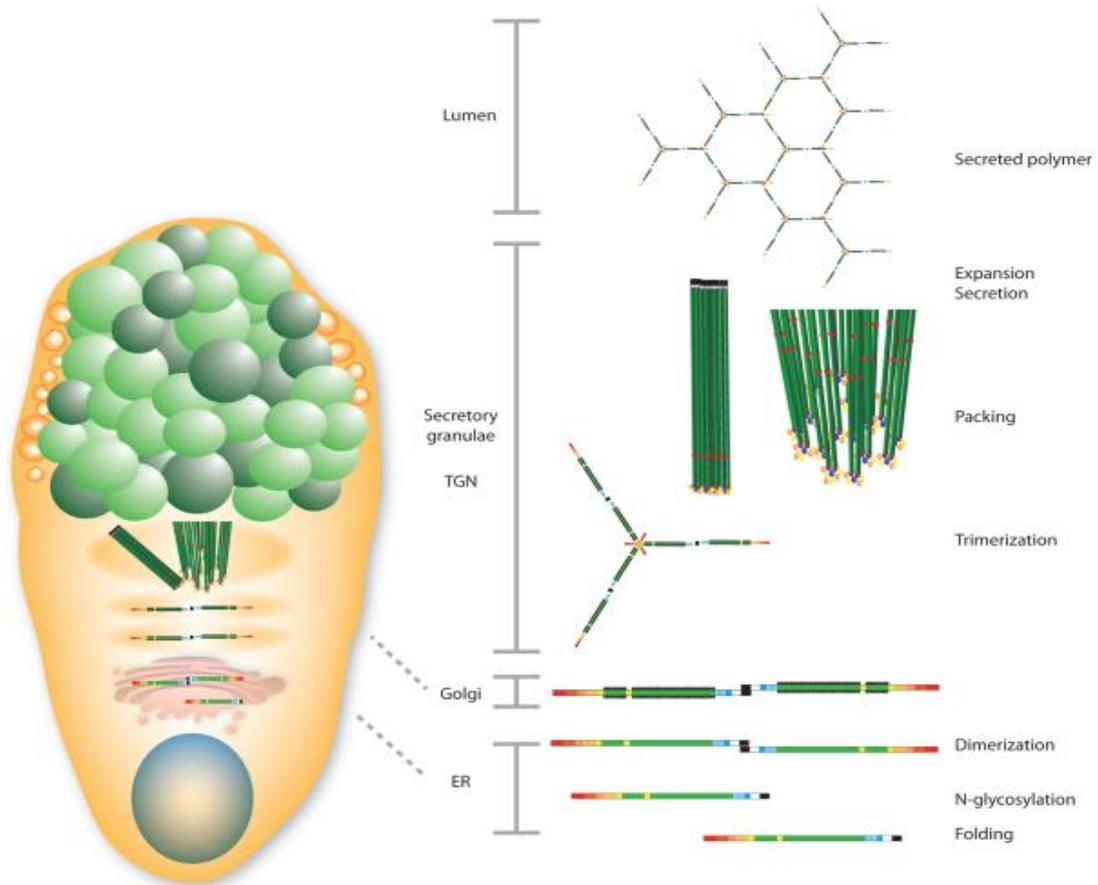


Figure 7: Structure des cellules caliciformes et synthèse du gel de Mucus. D'après (Birchenough et al, 2015)

Les travaux initiés par Atuma et ses collaborateurs mettent en évidence la présence de deux couches distincte de mucus (Atuma et al, 2001). La couche de mucus interne ou **inner mucus layer** est fermement liée à l'épithélium. Relativement dépourvue de micro-organismes, elle est constituée d'un réseau dense de MUC2. A l'inverse, la couche de mucus externe (**outer mucus layer**) est caractérisée par un réseau de MUC2 plus lâche du fait de clivages protéolytiques. Hydrosoluble, plus étendue, elle est colonisée par le microbiote intestinal (Johansson et al, 2008).

D'autres éléments sécrétés par les cellules de Paneth et les cellules caliciformes viennent compléter la composition du gel de mucus. Le peptide en trèfle de type 3, **TFF 3** ou intestinal trefoil factor (ITF) désigne un petit peptide caractérisé par la présence de 3 ponts disulfures.

Ce peptide est connu pour son rôle dans le maintien de l'intégrité de la couche de mucus et la réparation de l'épithélium. Les souris surexprimant TFF3 ont une résistance accrue aux altérations de la barrière épithéliale et à l'ulcération. A l'inverse, les souris déficientes en TFF3 présentent une susceptibilité accrue à la colite induite au dextran sulfate de sodium (DSS) et une capacité de réparation de l'épithélium amoindrie (Mashimo et al, 1996). La résistine **RELM β** est une cytokine riche en cystéines, synthétisée par les cellules caliciformes. Elle module la synthèse et la sécrétion de MUC2 et contribue par ce biais à la structuration du réseau de mucines. Elle permet de plus, une prévention de la colite chimio-induite par le trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) chez la souris (Hogan et al, 2006; Krimi et al, 2008). La **Fc- γ Binding Protein (Fcgbp)** contribue quant à elle, à la stabilisation et à la viscosité du réseau de mucines (Johansson et al, 2009). Enfin, les **peptides antimicrobiens** produits par les cellules de Paneth sont aussi retrouvés dans le gel de mucus et expliquent la stérilité relative de la couche interne.

L'importance du gel de mucus dans la fonction barrière s'illustre chez la souris MUC2^{-/-}. Ces souris sont dépourvues de gel de mucus, permettant aux bactéries d'être directement en contact avec les cellules de l'épithélium, et présentent une inflammation intestinale importante (Van der Sluis et al, 2006) et des cancers coliques (Velcich et al, 2002). En condition pathologique, des altérations de l'expression des mucines ont été mises en évidence. C'est ainsi que la rectocolite hémorragique (RCH) est associée à une réduction de l'expression des mucines et notamment de MUC2 chez l'homme (Dorofeyev et al, 2013; Tytgat et al, 1996). A contrario, dans la maladie de Crohn (MC), il a été observé une hypertrophie des cellules mucosécrétrices, associée à une augmentation de la sécrétion de mucus (Swidsinski et al, 2007). Un faisceau de données tend à indiquer une corrélation entre un défaut du réseau de mucus et le développement de cancer colorectaux. L'expression de MUC2 est diminuée dans le cas d'adénocarcinome colorectaux mais on assiste à l'expression de novo de MUC5AC habituellement absent au niveau du côlon (Blank et al, 1994; Sylvester et al, 2001).

En somme, les mucines et les molécules antimicrobiennes sont les principales composantes fonctionnelles de la barrière épithéliale. Les caractéristiques de ces molécules: grande taille, nombreux ponts disulfure, domaines fortement glycosylés (Godl et al, 2002; Herrmann et al, 1999; Sheehan et al, 1996; Taylor et al, 2008), les rendent très sensibles au mauvais repliement pendant leur biosynthèse au sein du réticulum endoplasmique (RE). Les cellules caliciformes et de Paneth sont donc plus vulnérables aux stress cellulaires et en particulier au stress du RE provenant de l'accumulation de protéines mal repliées dans la

lumière du RE (Heazlewood et al, 2008; McGuckin et al, 2011). Ces cellules activent une réponse cellulaire intégrée, la réponse aux protéines mal repliées (Unfolded Protein Response: UPR), visant à restaurer l'homéostasie de la cellule.

Au chapitre suivant, nous détaillerons l'importance de ce stress et de la réponse UPR dans la physiologie des cellules à caliciformes et dans l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale et nous présenterons leurs significances dans le contexte des pathologies coliques.

4. ROLE DU BUTYRATE DANS LA L'HOMÉOSTASIE ET LE RENOUVELLEMENT DE L'ÉPITHÉLIUM COLIQUE

4.1. Origine du butyrate et absorption par le colonocyte

Les AGCC sont des acides monocarboxyliques (C1-C6) issus de la fermentation bactérienne colique de polysaccharides non digestibles au niveau de l'intestin grêle. Les principaux AGCC retrouvés dans le côlon sont l'acétate, le propionate, et le butyrate ainsi que dans des proportions moindres, les acides valérique, formique, caproïque, et des iso-acides. Parmi les AGCC, le butyrate joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie du côlon en régulant un large éventail de fonctions physiologiques et cellulaires que nous décrirons ci-après.

Les fibres butyrogènes comprennent un ensemble hétérogène de polysaccharides non digestibles et non absorbables au niveau de l'intestin grêle. Cette famille de composés comprend des polysaccharides non amyliques tels que la pectine, la cellulose ou l'hémicellulose, des alganes (carraghénanes, agar), des polysides d'origine animale (chitosan et chitine issue de la carapace de crustacées), des oligosaccharides indigestibles (fructooligosaccharide, galactooligosaccharide) et enfin les amidons résistants (Boffa et al, 1992; Nilsson et al, 2010). Les sources principales de ces composés sont les céréales et leurs produits dérivés, les fruits et légumes ainsi que les aliments amyliques.

La nature exacte des bactéries produisant le butyrate reste discutée. La plupart des producteurs de butyrate dans le côlon humain appartiennent au phylum des *Firmicutes* et en particulier au genre *Clostridium* (Louis et al, 2009; Vital et al, 2014). Les deux espèces bactériennes les plus dominantes dans le côlon humain, *Faecalibacterium prausnitzii* et *Eubacterium rectale*, jouent un rôle prépondérant dans la production de butyrate (Benus et al, 2010; Duncan et al, 2002). Les autres espèces bactériennes productrices de butyrate appartiennent aux genres *Roseburia spp.* et *Butyrivibrio spp.* (*R. hominis*, *R. inulinivorans*, *R. intestinalis*) ainsi qu'au genre *Anaerostipes spp.* (*A. butyraticus*, *A. caccae* et *A. hadrus*)

(Vital et al, 2014). Quelques bactéries du phylum des *Bacteroidetes* telles que *B. caccae*, *B. fragilis* et *B. intestinalis* sont également capables de produire du butyrate. Certaines de ces espèces telles que *E. rectale*, *F. prausnitzii* et *R. intestinalis* colonisent préférentiellement la couche de mucus et augmentent par conséquent la biodisponibilité du butyrate pour les cellules épithéliales du côlon. D'autres espèces telles que *A. caccae* se développent dans la lumière du côlon.

Les concentrations lumenales en butyrate varieraient entre 10–20 mmol.kg⁻¹ de contenu. L'absorption du butyrate par l'épithélium colique est rapide et efficace ce qui complique la quantification des concentrations lumenales en butyrate. L'ensemble des mécanismes par lesquels les AGCC et plus particulièrement le butyrate, sont absorbés par les colonocytes est encore débattu. Deux principaux transporteurs de monocarboxylates sont impliqués dans le transport du butyrate : **MCT1 (monocarboxylate transporter isoform 1)**, un transporteur couplé aux protons (Hadjigapiou et al, 2000; Lambert et al, 2002; Ritzhaupt et al, 1998; Stein et al, 2000) et **SMCT1 (sodium-coupled monocarboxylate transporter 1)**, un transporteur couplé au sodium (Coady et al, 2004; Miyauchi et al, 2004). Ces transporteurs sont respectivement codés par les gènes *SLC16A1* et *SLC5A8*. L'inhibition de l'expression de MCT1 par des siRNA ou l'utilisation d'un inhibiteur spécifique (l' α -cyano-4-hydroxycinnamate) abolit le transport et l'absorption du butyrate confirmant ainsi le rôle prépondérant d'MCT1 dans cette fonction (Cuff et al, 2005; Stein et al, 2000). Enfin, l'expression de MCT1 est elle-même régulée par le butyrate, amplifiant ainsi son propre transport en cas d'augmentation des teneurs lumenales en AGCC (Cuff et al, 2002).

4.2. Rôle métabolo-épigénétique du butyrate

Le butyrate constitue la principale source d'énergie des colonocytes en fournissant 75% de l'énergie qui leur est nécessaire. Après absorption dans les colonocytes, le butyrate subit une β -oxydation mitochondriale aboutissant à la formation de corps cétoniques et d'acétyl-CoA. Ce dernier entre ensuite dans le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire pour la production d'ATP nécessaire à la structure et à la fonction de la barrière épithéliale colique (**Figure 8**).

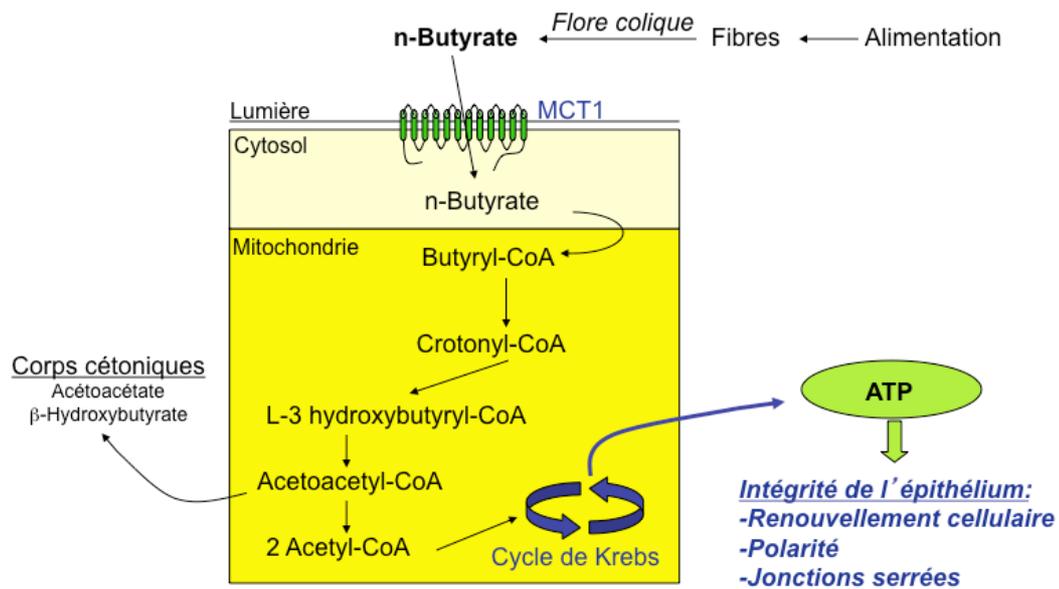


Figure 8: Métabolisme du butyrate dans une cellule épithéliale colique

Le butyrate joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie de l'épithélium en tant que modulateur épigénétique de l'expression du génome des colonocytes. Plus exactement, le butyrate régule l'acétylation des histones, modification post-traductionnelle jouant un rôle clé dans la structure et l'activité transcriptionnelle de la chromatine. L'acétylation des lysines N-terminales des histones permet la neutralisation des charges positives, ce qui réduit les interactions avec l'ADN et induit un relâchement de la chromatine permettant l'accès aux facteurs de transcription (Shahbazian et al, 2007). L'acétylation des histones est contrôlée par deux types d'enzymes aux activités antagonistes: les histones acétyl-tranfèreses (HAT) et les histones désacétylases (HDAC). En désacétylant les histones, les HDAC entraînent une condensation de la chromatine et une répression de la transcription.

Le butyrate régule l'acétylation des histones par deux mécanismes distincts: inhibition des HDAC et stimulation des HAT (**Figure 9**) (Donohoe et al, 2012a).

D'une part, **à forte dose**, le butyrate constitue un inhibiteur des activités HDAC (Hinnebusch et al, 2002; Sealy et al, 1978), qui induit de facto une acétylation des histones et une activation transcriptionnelle des gènes. D'autre part, **à faible dose** (0,5 mM), le butyrate régule l'expression de gènes de façon indirecte en tant qu'activateur des HATs. La β -oxydation du butyrate conduit à la synthèse d'acétyl-CoA qui entre dans le cycle des acides tricarboxyliques (Krebs) et permet la production de citrate. Le citrate peut alors être exporté dans le cytosol où il est utilisé par l'acyl-CoA lyase (ACL) pour la resynthèse d'acétyl-CoA. Ce dernier est alors transporté dans le noyau où il sert de cofacteur aux HAT pour acétyler les histones (Donohoe et al, 2012a; Donohoe et al, 2012b; Wellen et al, 2009). Dans une revue

récente, Bultman (Bultman 2014) a qualifié le butyrate de métabolite bactérien aux propriétés métabolo-épigénétiques, servant à la fois de source énergétique et de modulateur épigénétique de l'expression du génome du colonocyte. Cette notion illustre les nombreuses données de la littérature montrant l'interrelation entre métabolisme et épigénétique.

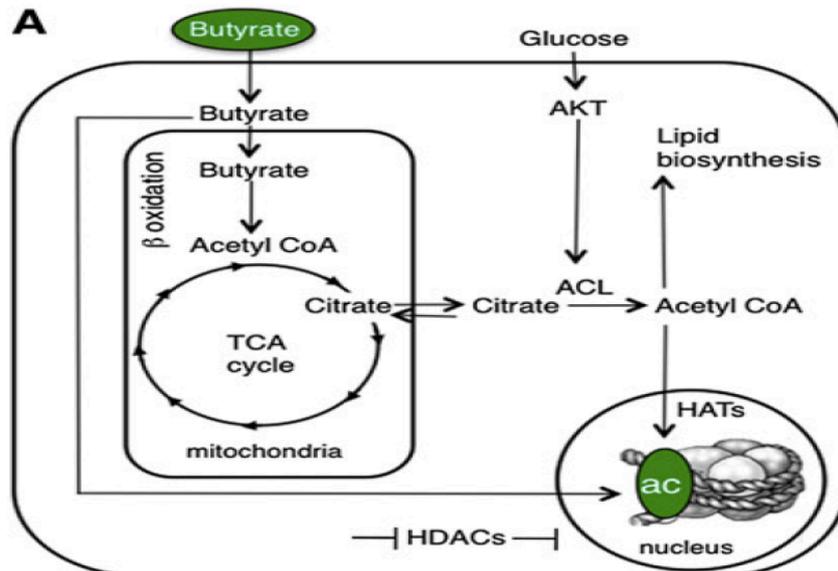


Figure 9: Modèle d'acétylation des histones par le butyrate. En plus de ses effets inhibiteurs sur les HDAC, le butyrate agit comme un donneur d'acétyl-CoA et stimule l'activité des HATs (Donohoe et al, 2012b).

4.3. Rôle physiologique du butyrate

En condition physiologique normale, le butyrate participe ainsi au maintien de l'homéostasie du tissu colique. Il dispose d'un effet trophique sur la muqueuse colique saine (Harig et al, 1989; Scheppach 1994; Tappenden et al, 1997). Il stimule l'expression des mucines et la sécrétion du mucus (Gaudier et al, 2004). Le butyrate joue aussi un rôle primordial dans la maturation des cellules épithéliales coliques (Harig et al, 1989; Mariadason et al, 2000; Tappenden et al, 1997) en stimulant la prolifération et la différenciation des colonocytes (Heerdt et al, 1994; Mariadason et al, 2000; Morita et al, 1982). Il régule la transcription de nombreux gènes impliqués notamment dans le métabolisme énergétique, la β-oxydation des lipides, la défense contre le stress oxydant (Vanhoutvin et al, 2009). Enfin, il joue un rôle important dans la régulation de l'immunité intestinale par ses effets anti-inflammatoires et immuno-modulateurs (Bohmig et al, 1997; Segain et al, 2000). A contrario, le butyrate dispose d'une action inhibitrice sur la croissance des cellules cancéreuses (Donohoe et al, 2012b; Gibson et al, 1992). L'incubation de cellules tumorales en présence de butyrate induit l'arrêt du cycle cellulaire et de leur prolifération et induit leur différenciation

ainsi que leur apoptose (Gamet et al, 1992; Mariadason et al, 2001; Shin et al, 2014; Siavoshian et al, 1997; Siavoshian et al, 2000). Connus sous le nom de « **butyrate paradoxe** », ces effets différents sur la croissance des colonocytes normaux en comparaison aux cellules cancéreuses tiennent au statut métabolique de la cellule.

Au sein des cellules non cancéreuses, le butyrate constitue la source principale d'énergie et permet la production d'acétyl CoA à l'origine de l'activation des HAT. Ces HAT permettent l'activation de gènes à l'origine de l'effet trophique constaté. A contrario, les cellules cancéreuses tirent leur énergie du glucose et de sa glycolyse (effet Warburg). Du fait de ce shift métabolique, le butyrate n'est plus catabolisé et s'accumule dans la cellule. Les fortes concentrations de butyrate dans le noyau entraînent une inhibition des HDAC et l'activation de gènes ayant pour effet l'inhibition de la croissance de ces cellules (**Figure 10**).

L'état métabolique de la cellule influence donc la concentration intranucléaire en butyrate et le niveau d'acétyl-CoA, déterminant les effets inhibiteurs du butyrate sur les HDAC ou stimulateurs sur les HATs. Si dans les deux cas, ces mécanismes conduisent à l'acétylation des histones et à l'activation des gènes, les gènes régulés semblent être différents (Donohoe et al, 2012b). Dans la cellule non-cancéreuse, l'activation des HAT aboutit à l'activation de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la production d'ATP et le métabolisme énergétique de la cellule. A l'inverse, dans les cellules cancéreuses, les effets inhibiteurs des HDAC induisent l'activation de gènes pro-apoptotiques et de gènes suppresseurs de tumeurs tel que p21, p27 ou Fas qui inhibent la croissance de ces cellules (Davie 2003; Donohoe et al, 2012b; Hinnebusch et al, 2002) (**Figure 10**)

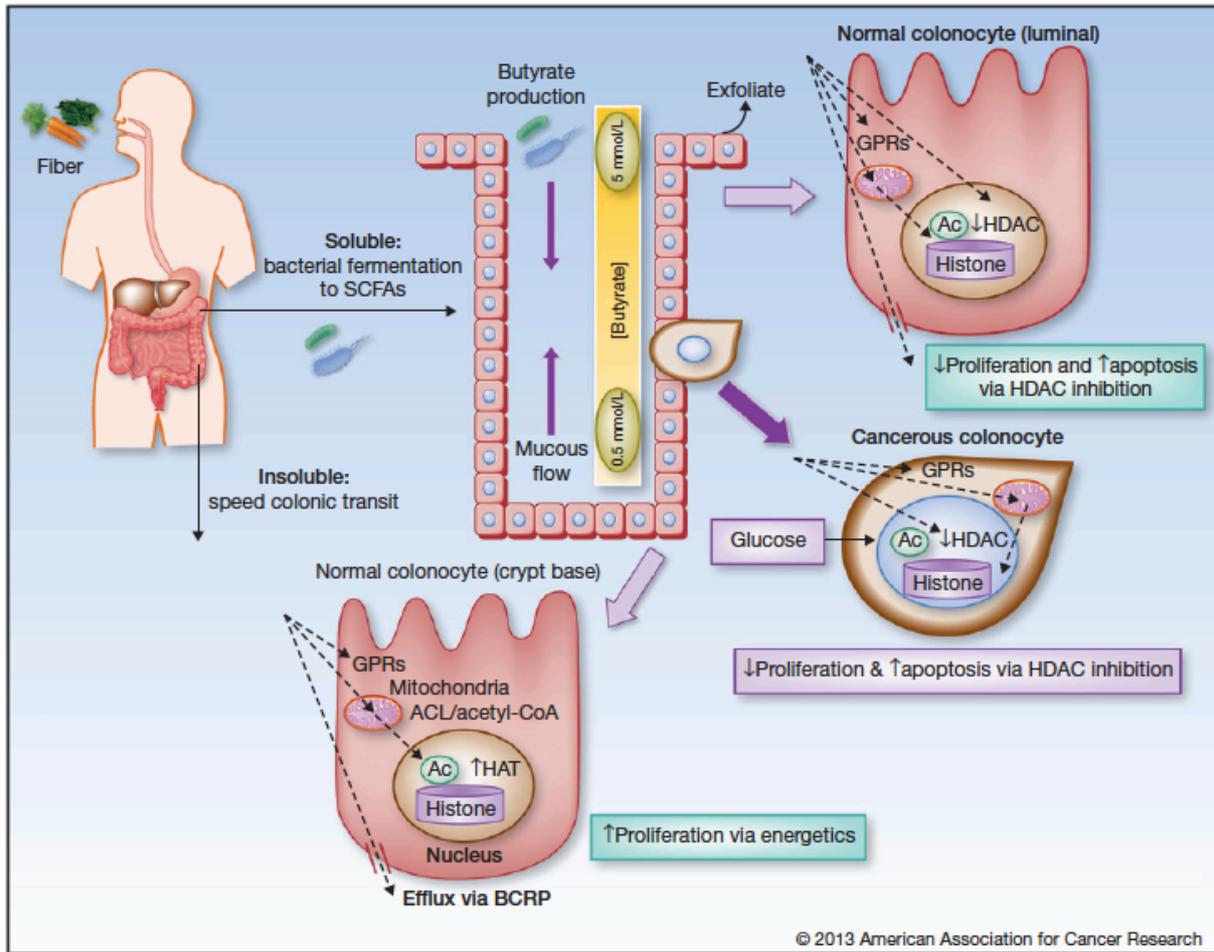


Figure 10 : Mécanismes explicatifs du butyrate paradoxe. D'après (Bultman 2014)

Le butyrate prend aussi part au renouvellement et à la maturation de l'épithélium colique. Le butyrate est présent le long du côlon selon un gradient oro-aboral (**Figure 10**). La concentration luminale de butyrate est en effet 6 fois plus importante au niveau du côlon proximal (son site de production) que dans le côlon distal. De même, un gradient de concentration est retrouvé le long de l'axe crypto-villositaire (**Figure 10**). La maintenance de ce gradient participe au renouvellement et à la maturation de l'épithélium colique (Gibson et al, 1992; Janne et al, 1977; Sakata 1987). Les faibles concentrations en butyrate présentes à la base des cryptes sont essentiellement dédiées au métabolisme énergétique des colonocytes. Elles sont aussi à l'origine de l'activation des HAT qui régule l'expression de gènes à l'origine de la prolifération des cellules présentes à la base des cryptes. A l'inverse, les fortes concentrations en butyrate présentes aux sommets des cryptes ont un effet inhibiteur des HDAC, propice à l'apoptose de ces cellules et à leur exfoliation (Bultman, 2014). Cependant une étude très récente montre qu'intrinsèquement, l'architecture des cryptes permet une protection des cellules souches en limitant leurs expositions aux fortes concentrations

luminales en butyrate (Kaiko et al, 2016). En utilisant des organoïdes de cryptes coliques en culture et des souris dont l'épithélium a été endommagé par du DSS, ces auteurs montrent que le butyrate inhibe la prolifération des cellules souches (effet HDAC inhibiteur) qui en condition physiologique normale, sont protégées par la métabolisation du butyrate par les cellules du haut de la crypte.

5. Altération du métabolisme du butyrate en condition pathologique

5.1. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

Les MICI incluent la Maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) qui sont caractérisées par des lésions inflammatoires atteignant le tractus digestif. La MC se caractérise par des lésions profondes trouvées en alternance avec des zones saines. Ces lésions sont trans pariétales et affectent l'ensemble des différentes couches composant la paroi digestive. La MC peut toucher l'ensemble du système digestif de la bouche à l'anus bien que dans la majorité des cas, l'inflammation se localise au niveau de l'iléon ou du côlon. La RCH engendre des lésions superficielles et hémorragiques atteignant la muqueuse et la sous-muqueuse, et s'étendent de manière continue sans intervalle de muqueuse saine. Ces lésions entraînent le plus souvent des abcès au niveau des cryptes et altèrent le renouvellement des cellules souches épithéliales.

L'étiologie des MICI est multifactorielle et comprend des facteurs génétiques, immunologiques et environnementaux (mode de vie, flore intestinale, alimentation) qui concourent à l'activation du système immunitaire intestinal. Les données issues du séquençage du génome humain ont permis de mettre en évidence des gènes associés aux MICI, en particulier le gène NOD2/CARD15 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain/ Caspase-Activating Recruitment Domain15). Majoritairement exprimé par les cellules immunitaires, les cellules épithéliales et les cellules de Paneth, NOD2 est un récepteur cytoplasmique impliqué dans l'immunité innée qui permet la reconnaissance des motifs muramyl-dipeptide (MDP) du peptidoglycane constituant les parois bactériennes. La stimulation de NOD-2 par le MDP active les voies de signalisations inflammatoires NF- κ B et MAPK et entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF et l'IL-6 et de peptides antimicrobiens. Dans le contexte de la maladie de Crohn, les mutations affectant le gène NOD2 entraîneraient une perte de reconnaissance des motifs MDP et des défauts de la fonction barrière de l'intestin. Les mécanismes par lesquels les mutations de NOD2 entraînent une augmentation du risque de MICI restent encore méconnus.

5.2. MICI et altérations de l'utilisation du butyrate

Au début des années 1980, Roediger et ses collaborateurs ont été les premiers à supposer qu'un déficit énergétique de la muqueuse intestinale pourrait être à l'origine de la RCH (Roediger 1980). Dans cette étude, l'oxydation du butyrate était réduite de 50% dans les colonocytes isolés de patients souffrant de RCH par rapport aux sujets sains. Au cours des décennies suivantes, de nombreuses études sont venues corroborer cette hypothèse, tant chez des patients atteints de MICI que dans des modèles de colites induites chez l'animal (Ahmad et al, 2000; Chapman et al, 1994; De Preter et al, 2012; Den Hond et al, 1998; Thibault et al, 2010). Une telle altération du métabolisme du butyrate a aussi été mise en évidence dans le cadre de la MC (Duffy et al, 1998). Des données plus récentes suggèrent néanmoins que cette altération du métabolisme du butyrate ne serait pas un facteur causal mais plutôt une conséquence de l'état inflammatoire de la muqueuse (Den Hond et al, 1998; Finnie et al, 1993).

Des observations indiquent une forte corrélation entre les niveaux d'expression de MCT1 et la capacité d'oxydation du butyrate par les colonocytes (Thibault et al, 2007). Une diminution de l'expression de MCT1 réduirait le transport du butyrate et consécutivement son oxydation dans le colonocyte. Chez les patients atteints de MICI, l'expression de MCT1 dans la muqueuse intestinale ainsi que l'oxydation du butyrate sont fortement diminuées et sont inversement corrélées à l'intensité de l'inflammation (Thibault et al, 2007). Ainsi, dans des biopsies de sujets sains, le traitement par le TNF à des concentrations égales à celles retrouvées chez les patients souffrant de MICI s'accompagne d'une diminution dose-dépendante de l'oxydation du butyrate (Nancey et al, 2005). De même, dans des cellules HT-29, le traitement par le TNF- α , et l'IFN- γ induit une diminution de l'expression protéique et transcriptomique de MCT1 ainsi qu'une diminution de l'oxydation du butyrate (Thibault et al, 2007).

En somme, le déficit d'oxydation du butyrate serait une conséquence de l'inflammation. La libération de cytokines pro-inflammatoires entraînerait une diminution de l'expression du transporteur MCT1 et consécutivement, une diminution du transport du butyrate et de son utilisation par les colonocytes. Par ailleurs, la réduction de la concentration intracellulaire de butyrate s'accompagnerait aussi d'une perte de l'inhibition des HDAC et par conséquent de la prolifération et de la différenciation cellulaire et de l'apoptose. De façon intéressante, une étude a suggéré que les HDAC seraient impliquées dans le développement du CCR associé à la colite (Glauben et al, 2008). En accord, dans le modèle de carcinogénèse

sur colite chimio-induite chez la souris par l'azoxyméthane combiné au DSS (AOM/DSS), le traitement par un inhibiteur de HDAC (ITF2357) réduit de manière significative la taille et le nombre des tumeurs. Cet effet s'accompagne d'une diminution de la production d'IFN- γ et d'une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 (Glauben et al, 2008). Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle d'études sur la caractérisation du statut d'acétylation des histones dans les MICI et dans les cancers associés aux MICI. Les études épigénétiques dans les MICI concernent surtout la méthylation de l'ADN et plus récemment les microARN en lien direct avec l'inflammation.

5.3. Le cancer colorectal (CCR)

Dans les pays industrialisés, le CCR est le troisième type de cancer le plus fréquent et la seconde cause de mortalité liés au cancer. Les facteurs de risque du CCR comprennent l'âge, les antécédents familiaux et un ensemble de facteurs environnementaux, nutritionnels et génétiques. Les CCR non-héréditaires, dits sporadiques, représentent 95% des formes de CCR. Des études épidémiologiques ont mis en évidence le rôle de l'alimentation et du mode de vie dans le risque de CCR sporadique: les apports caloriques élevés, la surconsommation de viande rouge et de graisses saturées sont corrélés au risque de CCR. A l'inverse, la consommation de fruits et légumes est inversement corrélée au risque de CCR. On estime qu'on pourrait réduire d'au moins 50% l'incidence du CCR par modifications des habitudes alimentaires.

Etablie par Vogelstein et ses collaborateurs (Vogelstein et al, 1988), la séquence adénome-carcinome est considérée comme le concept de base de la carcinogénèse colique. La première étape de la carcinogénèse colique est le passage d'un épithélium colique normal à une hyperprolifération de l'épithélium colique (**Figure 11**). **Les foyers de cryptes aberrantes (FCA)** constituent les premières anomalies décelables de la carcinogénèse colique (Takayama et al, 1998). Il s'agit de cryptes dilatées entourées d'un épithélium épaissi associé à un espace intercryptique augmenté (McLellan et al, 1988). **Les adénomes** sont des lésions épithéliales néoplasiques susceptibles d'évoluer vers un carcinome. Ils se caractérisent par des proliférations intra-épithéliales de cellules dysplasiques associées à une perte de contrôle de la prolifération et du cycle cellulaire. La plupart des CCR (50 à 85 %) se développe à partir d'un adénome. Le développement d'un **carcinome** se caractérise par une prolifération intraépithéliale puis intramuqueuse de cellules néoplasiques évoluant progressivement en profondeur dans la paroi colique par rupture de la lame basale.

Au cours de la séquence adénome-carcinome, une succession d'altérations génétiques et épigénétiques (méthylation de l'ADN et modifications post-traductionnelles des histones) induisant l'activation d'oncogènes et la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeur accompagne la transition progressive d'un épithélium colique normal au carcinome (**Figure 11**). Deux voies principales sont impliquées dans la carcinogénèse colorectale: D'une part, **l'instabilité chromosomique (CIN)** est observée dans 80 à 85% des cancers colorectaux sporadiques (cancer LOH+: loss of heterozygosity). La CIN se caractérise par le gain ou la perte d'une grande portion d'un chromosome qui aboutit à l'aneuploïdie ou à l'hyperploïdie des cellules malignes ainsi qu'à la mutation de gènes suppresseurs de tumeurs (Lengauer et al, 1997, 1998). Retrouvée dans 5 % des FCA, 70% des adénomes et dans 80 % des CCR sporadiques, la mutation par instabilité chromosomique du gène *APC* est un élément à l'origine de l'initialisation et de la promotion de la séquence adénome-carcinome (Levy et al, 1994; Otori et al, 1998; Powell et al, 1992). D'autre part, **l'instabilité des microsatellites (MSI)**, est observée dans 15% des cancers colorectaux sporadiques. Cette instabilité résulte de mutation des gènes contrôlant la réparation de l'ADN, principalement Mlh1, Msh2 et Msh6 (Ionov et al, 1993; Thibodeau et al, 1993; Thibodeau et al, 1998). Ces anomalies induisent une déficience du système de réparation de l'ADN, l'accumulation de mutations au niveau des microsatellites (séquence particulièrement sensible aux mutations) et surtout dans certains oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur (Markowitz et al, 1995; Rampino et al, 1997). CIN et MSI concourent aux altérations des voies de signalisation Wnt/APC/ β -catenin, RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT/mTOR, de TP53, et du TGF- β (**Figure 11**). Ces altérations jouent un rôle primordial dans l'initiation et la progression de la séquence adénome-carcinome. Pour plus de détails, nous conseillons au lecteur de se référer aux nombreuses revues de la littérature et plus particulièrement aux suivantes (Vogelstein et al, 1988; Walther et al, 2009).

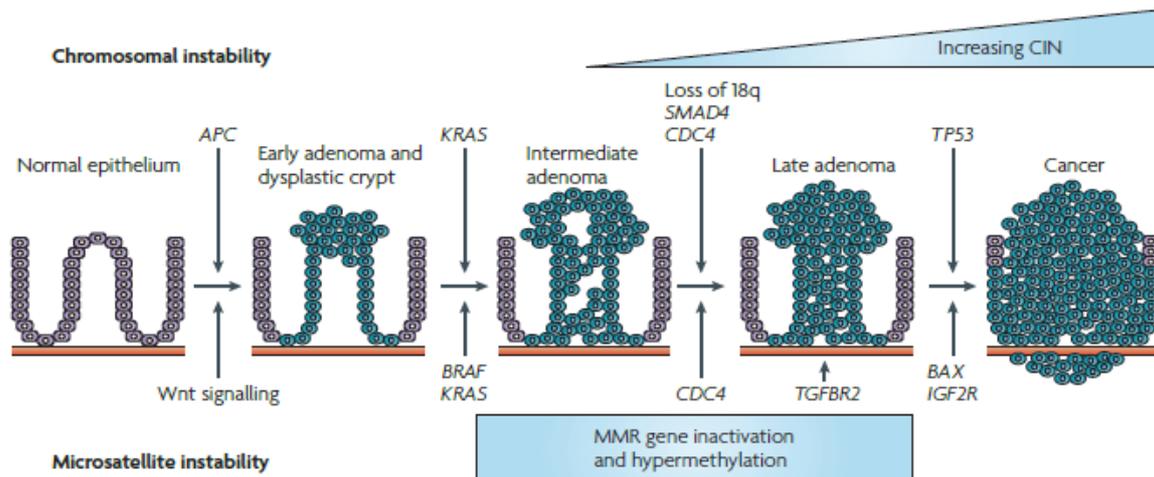


Figure 11 : Représentation de la séquence adénome-carcinome. Au cours de la carcinogénèse colique, les instabilités chromosomiques et microsatellitaires entraînent des altérations successives de différentes voies de signalisations conduisant progressivement au passage d'un épithélium colique normal à une hyperprolifération de l'épithélium colique. D'après (Vogelstein et al, 1988) et (Walther et al, 2009)

5.4. CCR et altération du métabolisme du butyrate

Il est maintenant admis que l'évolution des MICI à long terme constitue un facteur de risque de dysplasie et de CCR (Bernstein et al, 2001; Eaden et al, 2001). La diminution de l'oxydation du butyrate consécutive à la réduction de son absorption est associée à une réduction de ces effets sur le cycle cellulaire et la différenciation. Elle pourrait aussi diminuer l'inhibition de la voie NF- κ B, amplifier la réponse inflammatoire, et stimuler la carcinogénèse dépendante de cette voie (Greten et al, 2004). De façon similaire aux MICI, on indique une diminution de l'expression de MCT1 au cours de la séquence adénome-dysplasie-cancer colorectal chez l'homme (Lambert et al, 2002). Cette diminution de l'expression de MCT1 est associée à une augmentation de l'absorption du glucose via l'augmentation de l'expression de son transporteur préférentiel GLUT1. On note aussi une augmentation de l'activité d'enzymes impliquées dans la glycolyse (Board et al, 1990; Mazurek et al, 2002). Ces données mettent en lumière l'existence d'un switch du métabolisme énergétique caractérisé par l'utilisation préférentielle du glucose en tant que substrat énergétique (effet Warburg) aux dépens du butyrate au sein des cellules tumorales coliques. Nous spéculons que la perte progressive de l'expression de MCT1 et de l'utilisation du butyrate pourrait conduire à l'inhibition des effets anticancéreux du butyrate sur les cellules épithéliales coliques et participerait au développement du cancer. L'inflammation intestinale pourrait être un facteur inducteur du switch métabolique. Chez les patients souffrant de MICI, on dénote progressivement une

augmentation de l'expression de GLUT1 et une augmentation du métabolisme du glucose concomitamment à la diminution de l'expression de MCT1 et de l'oxydation du butyrate (Thibault et al, 2007).

Nous l'avons vu, SMCT1 (SLC5A8) permet aussi le transport du butyrate dans les colonocytes. En 2003, Li et ses collaborateurs ont identifié SLC5A8 comme gène suppresseur de tumeur. L'expression de ce transporteur est diminuée dans près de 60 % des cancers colorectaux et dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses (Li et al, 2003). Son expression est par ailleurs corrélée au taux de survie des patients souffrant de CCR (Paroder et al, 2006). Le silencing du gène SLC5A8 par hyperméthylation de son exon 1 consécutivement à l'activation de Dnmt1 semble intervenir de façon précoce dans la séquence adénome-carcinome puisqu'il est détecté dans 50% des foyers de cryptes aberrantes et des adénomes (Dong et al, 2005; Li et al, 2003; Thangaraju et al, 2008). La fonction de gène suppresseur de tumeur alloué à SLC5A8 tient de façon directe à sa capacité de transport du butyrate. La réexpression de SLC5A8 dans des cellules SW480 d'adénocarcinome humain (où l'expression de SLC5A8 est diminuée) rétablit le transport du butyrate et en conséquence l'inhibition des HDAC, l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16) et la surexpression de facteurs pro-apoptotiques conduisant à l'apoptose de ces cellules cancéreuses (Thangaraju et al, 2008).

S'il est reconnu que les HDAC ont un rôle important dans la maturation de l'épithélium intestinal, une augmentation de leur expression et de leur activité est une caractéristique des CCR (Wilson et al, 2006). Cette observation est à rapprocher de celle de la perte globale de l'acétylation d'H4K16 qui est considérée comme une marque épigénétique de nombreux cancers dont le CCR (Fraga et al, 2005b). Il est donc tentant de spéculer qu'un des facteurs associés à l'augmentation des activités HDAC et à la perte d'acétylation des histones dans les CCR sporadiques, puisse être la réduction de la biodisponibilité du butyrate et de ses effets inhibiteurs des HDAC. Outre la diminution de son utilisation par les colonocytes via la réduction d'expression des transporteurs MCT1 et SLC5A8, une diminution de l'apport en fibres dans l'alimentation et/ou du nombre d'espèces bactériennes productrices de butyrate a été rapportée dans des études épidémiologiques et du microbiote chez des patients avec un CCR mais aussi de MICI (Frank et al, 2007; Hansen et al, 2012; Hou et al, 2011; Schatzkin et al, 2007; Wang et al, 2012a). Une étude récente très intéressante a apporté pour la première fois des preuves convaincantes que l'effet protecteur des fibres vis-à-vis du CCR dépendait du microbiote et de la production de butyrate (Donohoe et al, 2014). Cette étude est basée sur un modèle de souris gnotobiotiques colonisées par une souche bactérienne productrice de

butyrate, *Butyrivibrio fibrosolvens*, et des mutants de cette souche incapables de produire du butyrate à partir de fibres. Seule la souche sauvage a permis de protéger les souris lors d'une carcinogénèse associée à la colite induite par l'AOM/DSS. De plus, cette étude démontre que cet effet protecteur est dépendant de la dose de butyrate produite par fermentation. Ainsi, les souris colonisées avec la souche bactérienne sauvage, ont été nourries avec des régimes pauvres (low-fiber) ou riches (high-fiber) en fibres. Les régimes "high-fiber" ont permis de produire des doses de butyrate suffisamment élevées pour obtenir un effet protecteur de la carcinogénèse à l'AOM/DSS. Surtout, cette étude montre que le butyrate s'accumule dans les cellules cancéreuses, inhibe les activités HDAC, induisant l'acétylation des histones et *in fine* affecte la prolifération et la survie des cellules. Si ces données plaident en faveur d'un effet protecteur du butyrate contre la cancérogenèse colique, certaines études suggèrent qu'il pourrait favoriser la sélection de cellules cancéreuses résistantes à son action, en particulier par capacité à le métaboliser (Serpa et al, 2010). Ainsi, des cellules de la lignée cancéreuse colique HCT15 cultivées *in vitro* en présence de butyrate dérivent vers des cellules capables de métaboliser le butyrate et résistantes à l'apoptose induite par le butyrate. Ces cellules cancéreuses sont particulièrement agressives puisqu'elles ont des capacités de croissance accrues lorsqu'elles sont greffées en sous-cutané chez la souris et ont des capacités métastatiques (poumon) lorsqu'elles sont injectées par voie intraveineuse (Serpa et al, 2010). En accord avec ces propriétés, ces cellules ont une surexpression de gènes impliqués dans la prolifération, l'angiogénèse et l'invasion (métalloprotéases). Une autre étude plus récente met en évidence le rôle de la production de butyrate par le microbiote dans le développement du CCR dans des souris APC^{Min/+}MSH2^{-/-} mutées pour le gène APC et déficientes pour l'enzyme MSH2 (MutS homolog 2) impliquée dans la réparation de l'ADN (Belcheva et al, 2014). Cette étude suggère que l'effet du butyrate pourrait dépendre du fond génétique et du stade de la carcinogénèse et souligne la complexité des interactions entre l'alimentation, le microbiote et la génétique dans les effets préventifs ou promoteurs du CCR.

En résumé, on peut raisonnablement proposer, que le défaut de production (par diminution des bactéries butyrogénès ou de l'apport en fibres) et/ou d'utilisation du butyrate par l'épithélium colique entraîne des modifications métaboliques et épigénétiques qui constituent des marqueurs d'altérations de la fonction de la barrière épithéliale colique. Ces modifications pourraient favoriser l'apparition précoce de lésions néoplasiques dont la transition adénome-carcinome serait favorisée par le contexte inflammatoire.

CHAPITRE 2 : STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET BARRIERE EPITHELIALE

1. STRUCTURE ET FONCTION DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE

Le **réticulum endoplasmique** (RE) est formé d'un réseau membraneux de citernes et de tubules qui s'étend à travers le cytoplasme des cellules, en continuité avec l'enveloppe nucléaire. On distingue le RE rugueux (RER) et le RE lisse (REL) ou agranulaire de par leurs structures physiques et leurs fonctions. Le REL est principalement impliqué dans la synthèse des phospholipides membranaires, la régulation du calcium (stockage/relargage) et la détoxification des xénobiotiques via des enzymes de métabolisation (e.g cytochrome P450) (Schroder et al, 2005). Le RER, plus riche en ribosomes, a pour fonction d'assurer la synthèse, le repliement, la maturation et l'adressage des protéines dans les différents compartiments cellulaires et la membrane plasmique. Le RE assure cette fonction grâce à un environnement pro-oxydant propice à la formation de ponts disulfures, à des concentrations élevées en calcium et en ATP ainsi qu'à l'action de nombreuses protéines (enzymes, chaperonnes, foldases, lectines) et de facteurs d'oxydoréduction (e.g. glutathion). Le RER dispose d'un système de contrôle-qualité qui va s'assurer du bon repliement et de la conformation correcte des protéines. Les protéines ayant acquis une bonne conformation sont exportées vers l'appareil de Golgi. A contrario, les protéines mal repliées sont acheminées vers le cytosol et dégradées par le protéasome. Ce processus est appelé ERAD (dégradation protéique associée au RE) (Ellgaard et al, 2003). Le RE constitue également la principale réserve de calcium de la cellule. La lumière du RE contient une concentration en calcium pouvant être cinquante mille fois supérieure à la concentration cytosolique (environ 5 mM contre 0,1 μ M dans le cytosol) (Schroder et al, 2005). Cette fonction de stockage est assurée par le biais du transporteur actif transmembranaire SERCA (P-type ATPases, Ca^{2+} spécifique ou SR Ca^{2+} -ATPase) : une pompe calcique ATP-dépendante, qui permet le transport du calcium du cytosol vers la lumière du RE. De nombreuses activités enzymatiques de chaperonnes et "foldases" résidentes du RE sont tributaires de fortes concentrations en calcium (Baksh et al, 1991; Gilchrist et al, 1993; Lebeche et al, 1994; Lievremont et al, 1997)

2. STRESS DU RE ET REPONSE UPR

Des conditions physiologiques de forte demande de synthèse protéique ou des situations anormales (troubles du statut redox, de l'homéostasie du calcium, carence en glucose, surcharge en cholestérol, anomalies de glycosylation des protéines) peuvent interférer avec les processus de synthèses des protéines natives et induire leur accumulation dans le RE (Pallet et al, 2009). Cette accumulation de protéines mal repliées va ainsi induire une situation de stress appelée **stress du RE**. Pour pallier au stress du RE, assurer la fidélité du repliement des protéines et empêcher l'accumulation de protéines mal conformées, le RE va déclencher une réponse adaptative complexe appelée réponse UPR (Unfolded-Protein response). Comme nous le verrons, la réponse UPR implique trois principaux effecteurs situés sur la membrane du RE. Cette réponse UPR va aboutir *in fine* à des modifications de la traduction et de la transcription de la cellule permettant de résoudre le stress du RE (Schroder et al, 2005). Le stress du RE peut-être induit par des molécules « stresseurs », très utilisées dans les études *in vitro* ou *in vivo*, comme la tunicamycine, un inhibiteur de glycosylation des protéines ou la thapsigargine, un inhibiteur de la SERCA. Ces stresseurs provoquent une accumulation de protéines mal formées dans le RE, déclenchant ainsi son stress et la réponse UPR.

La réponse UPR joue un rôle physiologique important dans le maintien de l'homéostasie des cellules. Elle participe notamment à la régulation du nutrient sensing (Kuhn et al, 2001; Scheuner et al, 2001), à la synthèse de pro-insuline (Scheuner et al, 2001), à la différenciation de lymphocytes B (Reimold et al, 2000; Zhang et al, 2005) ainsi qu'au développement embryonnaire. (Reimold et al, 2000; Scheuner et al, 2001). Une réponse UPR adaptée est particulièrement nécessaire dans les cellules ayant une activité de synthèse protéique élevée telles que les cellules en Gobelet et de Paneth.

3. TRANSDUCTION DE LA REPONSE UPR EN CONDITION DE STRESS DU RE

Dans les cellules eucaryotes, la réponse UPR est initiée par 3 senseurs/effecteurs transmembranaires du RE assurant la transduction du signal : La protéine kinase PERK (double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase), la protéine IRE1 α (Inositol-Requiring Enzyme 1 α) et le facteur de transcription ATF6 (activating transcription factor 6). Ces trois senseurs disposent à leurs extrémités N-terminal d'un domaine permettant la fixation à la protéine chaperonne GRP78 (glucose-regulated proteine 78, encore nommée BiP ou HSPA5) située dans la lumière du RE (**Figure 12**). Dans des conditions

physiologiques normales et en absence de stress du RE, ces senseurs transmembranaires sont maintenus dans un état inactif sous le contrôle de GRP78. La présence de protéines mal- ou non- repliées va entraîner sa dissociation des facteurs PERK, ATF6 et IRE1 et ainsi leur activation (Bertolotti et al, 2000; Gething et al, 1995; Melnick et al, 1994). Ils entraînent l'induction de voies de régulation traductionnelle et transcriptionnelle permettant de faire face au stress du RE (**Figure 12**). Cependant, si ce processus adaptatif échoue et que le stress se prolonge, les voies induisant la mort cellulaire programmée, seront alors activées.

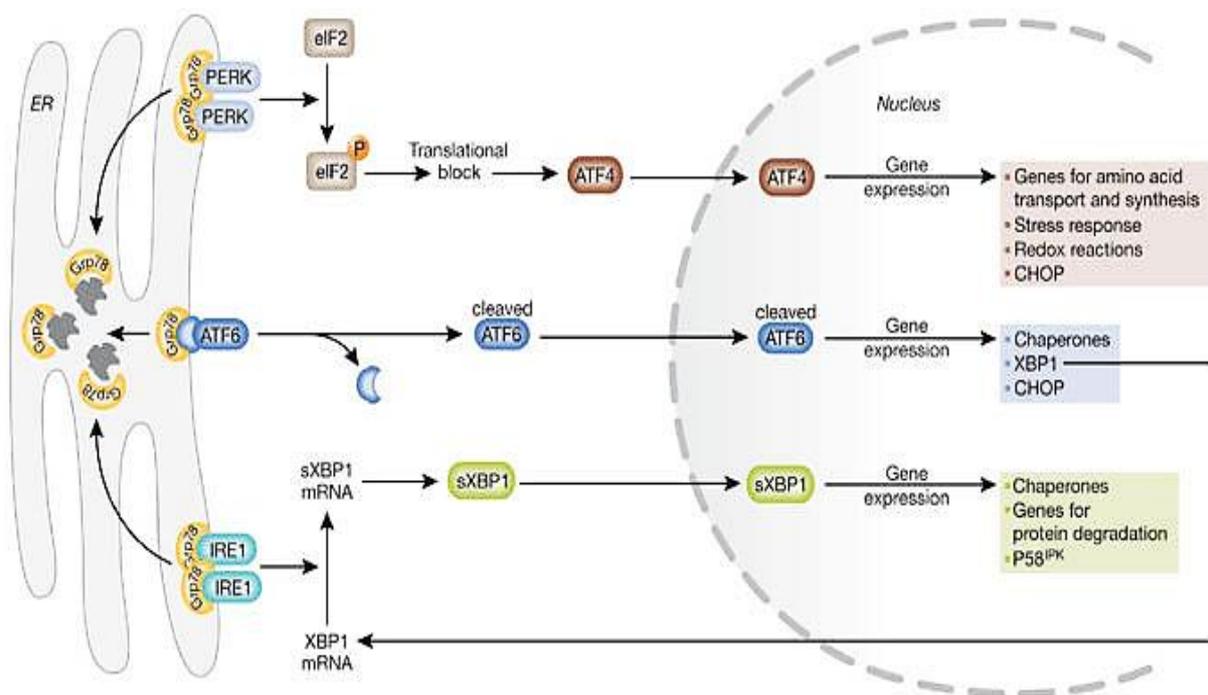


Figure 12: Représentation schématique de la réponse UPR. D'après (Szegezdi et al, 2006)

3.1. PERK atténue la traduction des ARNm.

PERK est une protéine ayant un poids moléculaire de 125 kDa caractérisée par la présence à sa partie C-terminale d'un domaine protéine kinase et à son extrémité N-terminale d'un domaine de dimérisation, d'un domaine permettant sa fixation à la protéine chaperonne BiP et d'une séquence de signalisation au réticulum endoplasmique. En réponse au stress du réticulum, PERK s'homodimérise ce qui conduit à sa trans-autophosphorylation et à l'activation de son domaine kinase. PERK peut alors phosphoryler, et ainsi inactiver, le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (eukaryotic Initiation Factor 2 α). L'inactivation de ce facteur atténue la traduction de nombreux ARNm permettant une réduction drastique de la synthèse protéique et donc de la quantité de protéines néo-synthétisées qui pourraient

engorger un RE déjà surpassé (Prostko et al, 1992; Prostko et al, 1993). A l'encontre de l'inhibition de la traduction, PERK permet la traduction sélective de certains ARNm et notamment de près d'un tiers des ARNm impliqués dans la réponse UPR (Harding et al, 1999; Harding et al, 2000). Parmi ceux-ci figure ATF4 (Activated Transcription Factor 4), qui active la transcription de chaperonnes telles que GRP78 et GRP94 ainsi que des protéines impliquées dans la mort cellulaire telles que les facteurs de transcription CHOP (C/EBP HOMologous Protein), GADD34 (growth arrest DNA damage 34) ou encore ATF3. Outre la phosphorylation de eIF2 α , PERK assure aussi la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2 Related Factor 2). Cette forme active de Nrf2 se fixe sur des séquences ARE (antioxidant response element) engendrant la transcription de gènes cibles permettant d'améliorer la survie de la cellule en limitant le stress oxydatif (Cullinan et al, 2004; Nguyen et al, 2003).

3.2. ATF6 active la transcription de gènes impliqués dans le repliement des protéines

ATF6 est une protéine transmembranaire de type II présente sous deux isoformes: l'isoforme α (ATF6 α) possédant deux séquences de localisation golgienne (GLS) dans la partie C-terminale, l'isoforme β (ATF6 β) n'en possédant qu'une. La partie N-terminale cytoplasmique de la protéine comprend un domaine d'activation de la transcription et un motif leucine-zipper. ATF6 possède également deux sites sensibles aux protéases S1P et S2P.

Il semblerait que seule l'isoforme ATF6 α soit requise pour l'activation de gènes cibles, impliqués dans l'homéostasie du RE et la dégradation des protéines mal formées (Adachi et al, 2008). Le stress du RE aboutit à la translocation d'ATF6 vers l'appareil de Golgi où elle est clivée par les protéases SP1 et SP2 (Ye et al, 2000). La protéase SP1 clive ATF6 au niveau de son domaine luminal aboutissant à la libération de sa partie C-terminale. La métalloprotéase S2 permet quant à elle, la libération d'un domaine bZIP de 50kDa situé à l'extrémité N-terminale cytoplasmique d'ATF6. Ce fragment peut alors transloquer vers le noyau où il assurera la fonction de facteur de transcription en se fixant sur les éléments de réponse au stress RE (ER stress response element : ERSE I et II) ou sur l'élément ATF/CRE (Yoshida et al, 2001b). ATF6 induit la transcription de chaperonnes et foldases du RE tel que GRP78 et GRP94 mais aussi de la protéine disulfide isomérase (PDI) qui catalyse la formation des ponts disulfures, dans le but d'augmenter la stabilité des protéines.

3.3. La voie IRE1 entraîne une régulation transcriptionnelle de la réponse UPR.

IRE1 est une protéine de 110 kDa possédant deux isoformes. L'expression de l'isoforme IRE1- α est ubiquitaire, tandis que l'expression de l'isoforme β est circonscrite au tissu épithélial intestinal. L'extrémité C-terminale de la protéine possède un domaine sérine/thréonine kinase et un domaine endoribonucléasique (RNase).

Lors d'un stress du RE, l'activation d'IRE1 entraîne sa dimérisation et son autophosphorylation ainsi que l'activation de son domaine RNase. L'activité endonucléase d'IRE1 va alors induire l'épissage d'un intron de 26 paires de bases de la forme non épissée de l'ARNm codant pour X-box binding protein (unspliced XBP1 ou XBP1u) conduisant un changement de son cadre de lecture et à la forme épissée (ou splicée), l'ARNm XBP1s. Cet épissage aboutit à la conversion de la protéine XBP1u de 267 acides aminés à une protéine XBP1s de 371 acides aminés correspondant à la forme active d'XBP1 (Calton et al, 2002; Yoshida et al, 2001a). Il s'agit d'un facteur de transcription appartenant à la famille ATF/CREB qui régule l'expression des gènes disposant d'une séquence CRE (cAMP responsive element), ERSE ou UPRE (UPR element). Les gènes cibles de ce facteur de transcription comprennent des chaperonnes et foldases du RE, des gènes associés au système ERAD, ou liés au métabolisme et à la biosynthèse des lipides constituant la membrane. La transcription du gène codant pour la forme non splicée XBP1u est par ailleurs sous le contrôle d'ATF6 (Lee et al, 2002; Yoshida et al, 2001a). De façon remarquable, XBP1 permet sa propre transcription : le promoteur du gène XBP1 dispose en effet, d'une séquence UPRE. Ce rétrocontrôle positif permet de maintenir la voie de signalisation IRE1/XBP1 après la répression des voies ATF6 et PERK (Ogawa et al, 2004; Rutkowski et al, 2004).

4. APOPTOSE INDUITE PAR LE STRESS DU RE

En situation de stress non résolu, les trois transducteurs de la réponse UPR peuvent mettre en place des voies pro-apoptotiques en réponse à des signaux intra ou extracellulaires (**Figure 13**). La voie extracellulaire ou extrinsèque est principalement médiée par IRE1. Elle comprend essentiellement le recrutement de caspases ainsi que l'initiation de la cascade caspases. Les études suggèrent que cette cascade ne serait initiée que par le biais de la caspase 12 localisée au RE (Nakagawa et al, 2000). Les cellules murines caspase-12^{-/-} présentent une résistance à l'apoptose en réponse à un stress RE. D'un point de vue mécanistique, en réponse au stress RE la procaspase-12 se dissocie de TRAF2 (TNF α receptor-associated factor 2), à mesure qu'IRE1 forme un complexe hétérotrimérique avec cette dernière. Ce complexe induit

l'activation en cascade des caspases 12, 9 et 3 à l'origine de la mort cellulaire par apoptose (Hitomi et al, 2004; Morishima et al, 2002; Yoneda et al, 2001). Une autre voie apoptotique extrinsèque médiée par IRE1 coexiste avec la précédente. Par interaction avec ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), le complexe IRE1/TRAF2 induit une cascade d'évènements aboutissant à la phosphorylation et l'activation de la Jun amino-terminal kinase (JNK) (Urano et al, 2000; Verma et al, 2012). JNK induit l'apoptose par phosphorylation de Bim et l'inactivation des protéines anti-apoptotiques Bcl2 par phosphorylation (**Figure 13**).

La voie de signalisation intracellulaire ou intrinsèque de l'apoptose est tributaire de l'équilibre entre facteurs pro et anti-apoptotiques. En réponse au stress du RE les protéines pro-apoptotiques de la famille BH3, Bax et Bak s'oligomérisent et s'insèrent au sein de la membrane du RE. Le pore ainsi formé induit une fuite de calcium vers le cytoplasme et de façon consécutive, l'activation des Calpaïnes. Celles-ci vont induire le clivage de la pro-caspase 12. La caspase 12 ainsi active va cliver la pro-caspase 9, cette dernière étant à l'origine de l'activation de la procaspase-3 à l'origine de l'apoptose. L'accumulation de calcium dans le cytoplasme se solde par la même occasion, par un afflux de calcium dans la mitochondrie et l'ouverture du Pore de Transition de Perméabilité (PTP). Cette ouverture permet le relargage du cytochrome c mitochondrial qui, une fois dans le cytosol, s'associe à Apaf-1 (Apoptosis Activating Factor) et active la pro-caspase 3 à l'origine de l'apoptose. L'ouverture du PTP entraîne de plus, un recrutement de la protéine pro-apoptotique Bax ainsi que la perte du potentiel membranaire mitochondrial.

La présence de PERK au sein des membranes des mitochondries associées au RE (Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes) reliant RE et mitochondrie permet le déclenchement d'une des voies apoptotiques intrinsèques (Verfaillie et al, 2012). L'activation d'ATF4 par PERK induit la transcription de CHOP. Ce facteur de transcription de la famille bZIP, pouvant aussi être activé par ATF6 (Harding et al, 2000; Okada et al, 2002), induit la transcription de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques telles que DR5 (Death Receptor 5), Bim et TRB3 (Tribbles-Related Protein 3) (Ohoka et al, 2005; Puthalakath et al, 2007; Yamaguchi et al, 2004) mais aussi la répression simultanée de la transcription des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl2.

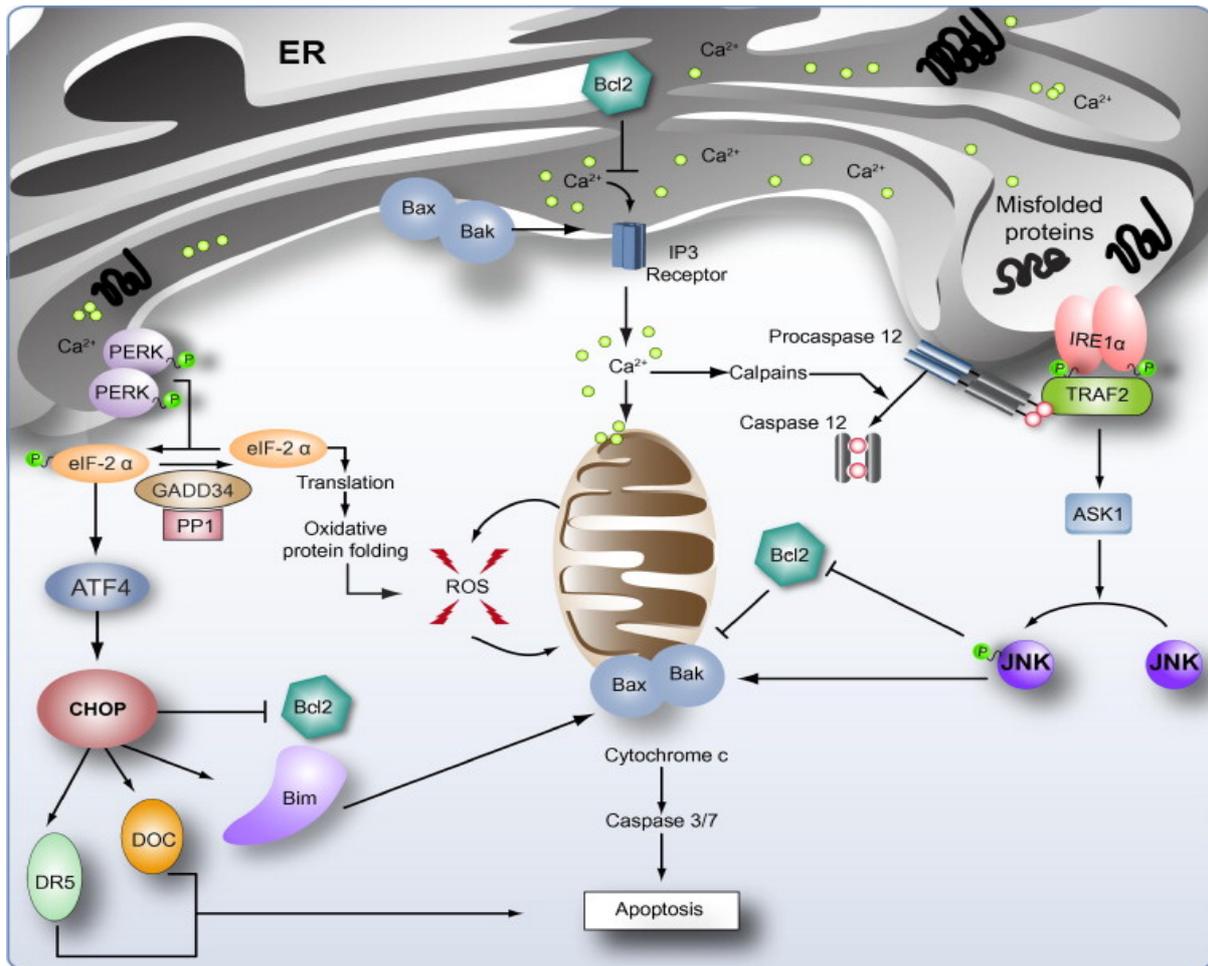


Figure 13: Voies pro-apoptotiques induites par le stress du RE. D'après (Malhi et al, 2011)

5. REGULATION DE LA REPONSE UPR PAR ACÉTYLATION

On a longtemps pensé que l'acétylation des protéines n'était limitée qu'au cytosol et au noyau, compartiments cellulaires où étaient disponibles les HDAC, les HAT et le donneur de groupement acétyle, l'acétyl-CoA. En 2007, Costantini et al rapportent l'acétylation de protéines directement dans le RE (Costantini et al, 2007). Ko et al identifient par la suite deux HAT résidentes du RE (Ko et al, 2009). Ces deux études ont permis de mettre en évidence la présence d'enzymes de la machinerie épigénétique directement dans le RE. Par la suite, d'autres études ont permis l'identification de protéines résidentes du RE régulées par acétylation (Kahali et al, 2010). Ces protéines incluent des chaperonnes et foldases impliquées dans le repliement des protéines mais aussi des senseurs de la réponse UPR (Kahali et al, 2010). L'acétylation de ces protéines jouerait un rôle crucial dans la régulation de la réponse UPR et du stress du RE. Une attention toute particulière est portée sur la protéine GRP78.

Deux études distinctes menées par Kahali et al., puis par Yao et al., en 2010, indiquent la régulation de GRP78 par les HDAC. L'inhibition des HDAC par le varinostat ou le panabinostat est en effet associée à une acétylation de GRP78 dans plusieurs lignées cellulaires (Kahali et al, 2010; Rao et al, 2010). Cette acétylation de GRP78 entraîne sa dissociation des senseurs de la réponse UPR et permet l'activation de cette réponse. Poursuivant leurs travaux, Kahali et ses collaborateurs ont démontré en 2012, la co-localisation des HDAC 1, 2 et 3 dans le RE et leur fixation à GRP78. L'inhibition de chacune de ces HDAC par des siRNA est associée à l'acétylation de GRP78 et de façon concomitante, à l'activation de PERK et d'ATF6 mais pas d'IRE (pas de splicing de XBP1) (Kahali et al, 2012). Enfin, l'acétylation de GRP78 régule aussi sa localisation cellulaire et joue un rôle prépondérant dans la croissance tumorale (Li et al, 2016). Par ailleurs, Wang et Ouyang indiquent que la protéine active XBP1s est aussi régulée par acétylation et désacétylation médiées respectivement par p300 (KAT3B) et Sirt1 (Wang et al, 2011). L'acétylation d'XBP1 est associée à une augmentation de sa stabilité et à l'augmentation de son activité transcriptionnelle, à l'inverse sa désacétylation par Sirt1 conduit à la diminution de son activité (Wang et al, 2011). En résumé, ces données montrent l'existence d'une régulation de la réponse UPR par des enzymes de la machinerie épigénétique.

Outre ces acétylations post-traductionnelles, il est intéressant de noter que des modifications épigénétiques des histones permettent une régulation de la réponse UPR au niveau transcriptionnel. A ce titre, la méthylation et l'acétylation de l'histone 4 dans la région promotrice du gène codant pour GRP78 sont associées à son activation transcriptionnelle (Baumeister et al, 2005; Baumeister et al, 2009).

A l'inverse de ces données suggérant une régulation épigénétique de la réponse UPR, il ne semble pas exister de données tangibles attestant d'une régulation de la machinerie épigénétique par des acteurs de la réponse UPR. Comme nous le verrons, cette piste de recherche fera l'objet d'une étude développée au cours de ce travail de thèse.

6. STRESS DU RE ET PATHOLOGIES DIGESTIVES

6.1. Régulation de la réponse inflammatoire par la réponse UPR

Un faisceau de données indique une implication majeure du stress du RE et de la réponse UPR dans les réponses inflammatoires et en particulier dans les MICI (Li et al, 2005).

La réponse UPR peut activer les voies de signalisation NF- κ B et JNK impliquées dans la réponse inflammatoire (Pahl et al, 1995) (**Figure 14**). En réponse au stress RE, IRE1 α recrute TRAF2 qui à son tour active la protéine kinase JNK (c-Jun N-terminal kinase). JNK ainsi activée phosphoryle le facteur de transcription AP1 (activator protein 1) permettant la transcription de gènes codant pour de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (Urano et al, 2000). La délétion d'IRE1 prévient l'activation de JNK. D'autre part, le complexe IRE1 α -TRAF2 permet aussi l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Hu et al, 2006). En condition normale, NF- κ B est maintenu inactif par liaison avec son inhibiteur I- κ B (inhibitor of NF- κ B). Le complexe IRE1 α -TRAF2 permet le recrutement de la kinase IKK (I- κ B kinase) qui est à l'origine de la phosphorylation d'I- κ B, induisant ainsi sa dégradation par le protéasome. La forme libre de NF- κ B permet sa translocation dans le noyau où il peut alors réguler la transcription de nombreux gènes comme ceux codant pour des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. La voie PERK peut également conduire à l'activation de NF- κ B via l'atténuation de la traduction induite par phosphorylation d'eIF2 α . La demi-vie d'I- κ B étant inférieure à celle de NF- κ B, l'arrêt de la traduction entraîne une augmentation du ratio NF- κ B/I- κ B permettant la translocation de NF- κ B libre vers le noyau (Deng et al, 2004; Jiang et al, 2003). De même, la voie ATF6 permet aussi l'activation de la voie de signalisation NF- κ B (Yamazaki et al, 2009) via l'induction de C/EBP β et de la voie mTOR-Akt (Nakajima et al, 2011). Enfin, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par le stress du RE sont d'importants médiateurs de l'inflammation capables d'activer la voie NF- κ B (Los et al, 1995; Morgan et al, 2011). S'il semble avéré que la réponse UPR est à l'origine de l'initiation d'une réponse pro-inflammatoire, il semblerait qu'il existe une régulation de la réponse UPR par les médiateurs inflammatoires. Certaines cytokines notamment le TNF α , le LPS, l'IL-1 β , l'IL-6 ou l'IFN- γ activent la réponse UPR (Lin et al, 2005; Xue et al, 2005; Zhang et al, 2006b).

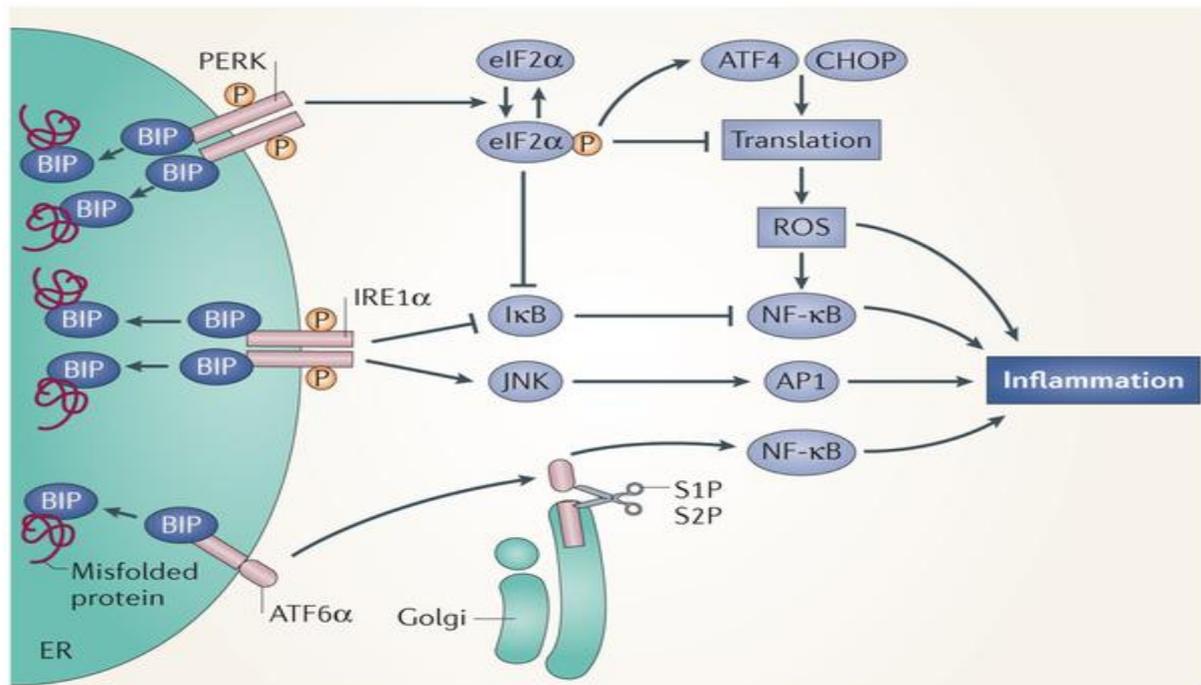


Figure 14: Réponse UPR et inflammation. La réponse UPR mise en place en réponse au stress du réticulum endoplasmique induit l'activation des voies pro-inflammatoire JNK et NFκB. Adapté de (Wang et al, 2014a).

6.2. Implication du stress du RE dans les MICI

Le stress du RE et une réponse UPR mal-adaptée participent à l'étiologie de plus de 50 pathologies, incluant des pathologies neurodégénératives (maladie de Parkinson, Alzheimer, maladie de Huntington...), des pathologies métaboliques (diabète de type II, artériosclérose, obésité), certains cancers dont le CCR et les MICI (Schroder et al, 2005).

6.2.1. MICI et défaut de la réponse UPR

Récemment, des défauts de la réponse UPR ont été mis en évidence dans l'étiologie de MICI. Ces défauts vont particulièrement impacter le fonctionnement des cellules caliciformes et de Paneth dont le rôle fondamental dans la barrière intestinale provient de la synthèse et de la production soutenue de mucines et de peptides antimicrobiens (Kaser et al, 2010a).

Les études génétiques réalisées chez l'homme ont permis l'identification d'anomalies génétiques primaires dans plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans l'homéostasie du RE. De tels polymorphismes ont ainsi été mis en évidence dans les gènes codant pour XBP1 (Kaser et al, 2008), AGR2 (Zheng et al, 2006) et ORMDL3 (Barrett et al, 2008; McGovern et al, 2010) et sont associés à une susceptibilité accrue aux MICI.

Kaser et ses collaborateurs identifient en 2008, des polymorphismes touchant un nucléotide unique (SNP) dans le gène codant pour XBP1 qui sont liés à un risque accru de

développer la MC et la RCH (Kaser et al, 2008). En accord avec ces données, la délétion conditionnelle d'XBP1 dans l'épithélium intestinal de souris (souris XBP1^{-/-} (IEC)) entraîne un stress du RE et une entérite spontanée. Cette entérite s'illustre sur le plan histologique par la présence de nombreux abcès cryptiques et d'ulcérations ainsi qu'une forte infiltration de cellules immunitaires (neutrophiles et monocytes). La double délétion d'XBP1 s'accompagne d'une déplétion importante des cellules de Paneth et caliciformes. On note également une stimulation des voies JNK et NF-κB et de la production de cytokines pro-inflammatoires. Les souris XBP1^{-/-} (IEC) ne manifestent pas de colites spontanées, mais ont une sensibilité accrue à la colite induite par le DSS.

AGR2 (anterior gradient protein-2) est une disulfide isomérase (PDI) essentiellement exprimée dans le RE des cellules caliciformes et dans une moindre mesure, dans les cellules de Paneth et les cellules entéroendocrines. Elle assure la formation des ponts disulfures essentielle à la bonne conformation des mucines comme MUC2. Les souris AGR2^{-/-} ont une iléo-colite spontanée rappelant la MC (Park et al, 2009; Zhao et al, 2010). Ces souris présentent une profonde perturbation de l'homéostasie des cellules de Paneth et caliciformes, et en particulier une inhibition la synthèse de MUC2 (Zhao et al, 2010). L'ensemble de ces altérations est associé à un stress du RE illustré par l'augmentation de GRP78 et d'XBP1s ainsi qu'une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Zhao et al, 2010).

Un polymorphisme du gène codant pour ORMDL3 (orosomucoïd-1-like 3) a été associé aux MICI. Néanmoins, ni la fonction d'ORMDL3, ni les mécanismes liant cette protéine aux MICI ne sont véritablement connus (Barrett et al, 2008). ORMDL3 est un membre d'une famille de protéines transmembranaires localisées dans le RE et serait impliquée dans l'homéostasie calcique (effet inhibiteur de la pompe SERCA) et dans la réponse UPR (Cantero-Recasens et al, 2010).

Outre ces polymorphismes identifiés chez l'homme, des modèles animaux semblent indiquer que d'autres éléments de la réponse UPR pourraient prendre part à l'étiologie des MICI (**Tableau 2**). C'est notamment le cas d'IRE1, un des trois senseurs de la réponse UPR. Bertolotti et ses collaborateurs mettent en évidence une susceptibilité accrue à la colite induite par le DSS ainsi qu'une augmentation de nombreux marqueurs inflammatoires dans le tractus digestif d'animaux IRE1β^{-/-}, l'isoforme intestinale d'IRE1 (Bertolotti et al, 2001). Ces animaux présentent par ailleurs un stress du RE associé à une accumulation du précurseur de muc2 dans la lumière du RE des cellules caliciformes (Bertolotti et al, 2001; Tsuru et al, 2013).

D'autres études mettent en évidence l'implication potentielle d'autres protéines du RE dans l'homéostasie de la barrière intestinale (**Tableau 2**), comme par exemple ATF6 et OASIS (old astrocyte specifically induced substance). Ces deux facteurs de transcription à domaine bZIP (basic leucine zipper) sont des protéines transmembranaires de type II, clivées et activées par les Site 1 et 2 protéases (S1P et S2P) au niveau du Golgi en réponse à un stress du RE. Ces facteurs jouent, respectivement, un rôle important dans la transcription de protéines chaperonnes et la différenciation des cellules à mucus. Ainsi, le knockout d'ATF6 s'accompagne chez la souris, d'un stress du RE au niveau des cellules épithéliales intestinales et d'une sensibilité accrue à la colite induite par le DSS (Cao et al, 2013). De même, le knockout du gène codant pour OASIS entraîne l'apparition d'un stress du RE associé à des altérations du RE dans les cellules caliciformes et un défaut de la différenciation et de la maturation de ce type cellulaire (Asada et al, 2012). Ces animaux présentent une susceptibilité accrue à la colite au DSS, ainsi qu'une augmentation des marqueurs apoptotiques et inflammatoires dans l'épithélium colique (Hino, 2014). En accord avec le rôle de ces facteurs de transcription dans l'homéostasie de la barrière, un défaut de leur activation via la mutation du gène codant pour la Site-1 protéase SP1, entraîne une susceptibilité accrue à la colite (Brandl et al, 2009).

	Association génétique	Modèles animaux	
		Modèle	Phénotype
XBP1	MICI (Kaser et al, 2008)	Délétion conditionnelle du gène dans les cellules épithéliales coliques : Xbp1 ^{ΔIEC} (Kaser et al, 2008)	<ul style="list-style-type: none"> - Entérite spontanée - Sensibilité accrue à la colite chimio-induite au DSS - Stress RE - Déplétion des cellules de Paneth et caliciforme
ORMDL3	MICI (Barrett et al, 2008; McGovern et al, 2010)	-	-
AGR2	MICI (Zheng et al, 2006)	Souris Agr2 ^{-/- ΔIEC} (Park et al, 2009; Zhao et al, 2010)	<ul style="list-style-type: none"> - Iléo-colite spontanée - Stress RE - Altérations des cellules de Paneth et cellules caliciformes - Défaut de la synthèse de MUC2
IRE1β	-	Souris Ire1β ^{-/-} (Bertolotti et al, 2001; Tsuru et al, 2013)	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité accrue à la colite chimio-induite au DSS - Stress RE: uprégulation de Grp78
ATF6α	-	Atf6α ^{-/-} Souris (Cao et al, 2013)	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité accrue à la colite chimio-induite au DSS. - Stress RE
S1P	-	Mutagénèses ENU (Brandl et al, 2009)	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité accrue à la colite chimio-induite au DSS - Downrégulation de Grp78 et Grp94
OASIS		Oasis ^{-/-} Souris (Asada et al, 2012; Hino et al, 2014)	<ul style="list-style-type: none"> - Susceptibilité accrue à la colite induite au DSS - Augmentation des marqueurs du stress du RE et des marqueurs inflammatoires
Muc2	-	Mutagénèses ENU Souris Winnie and Eeyore (Eri et al, 2011; Heazlewood et al, 2008; Shkoda et al, 2007)	<ul style="list-style-type: none"> - Colite spontanée - Accumulation du précurseur de MUC2 - Stress RE

Tableau 2: Protocole expérimentaux reliant le stress du RE au développement de MICI.

6.2.2. Stress du RE, cellules à mucus et MICI

Les différentes études décrites ci-dessus attestent donc de l'implication d'un défaut de la réponse UPR dans la pathogénèse des MICI, aussi bien dans la RCH que dans la MC. La première confirmation de cette association reste la présence d'un stress du RE dans l'iléon et la muqueuse colique de patients souffrant de MC et de RCH (Bogaert et al, 2011; Heazlewood et al, 2008; Kaser et al, 2008; Treton et al, 2011).

Les cellules à caliciformes et de Paneth jouent un rôle crucial dans la fonction de la barrière épithéliale intestinale de par leurs sécrétions respectives de mucines et de molécules antimicrobiennes (MAM). Les mucines et les MAM sont des protéines qui, du fait de leur grande taille, de leur richesse en ponts disulfures, en résidus cystéine et en domaines fortement glycosylés (Asker et al, 1998; Godl et al, 2002; Herrmann et al, 1999; Sheehan et al, 1996; Taylor et al, 2008), sont très sensibles au mauvais repliement pendant leur biosynthèse au sein du RE. Les cellules caliciformes et de Paneth sont donc plus vulnérables aux stress cellulaires et en particulier au stress du RE. Un stress RE chronique ou une réponse UPR mal adaptée dans ces cellules est susceptible de participer à l'étiologie de maladies inflammatoires (Cao 2016; Kaser et al, 2010b) notamment : en réduisant l'efficacité de la barrière muqueuse due à la diminution de la sécrétion de molécules antimicrobiennes et des mucines, en induisant l'apoptose des cellules de l'épithélium et en initiant la formation de signaux inflammatoires initiés par la réponse UPR (Heazlewood et al, 2008; Park et al, 2009; Zhang et al, 2008). Des dysfonctions des cellules à mucus constituent des marqueurs retrouvés dans la RCH (Heazlewood et al, 2008; Hinoda et al, 1998; Longman et al, 2006) et la MC (Buisine et al, 2001; Dorofeyev et al, 2013). Les tissus coliques de patients souffrant de RCH se caractérisent par une accumulation anormale du précurseur de MUC2 dans les cellules caliciformes et par une augmentation de l'expression protéique de GRP78 (Shkoda et al, 2007) (Heazlewood et al, 2008). Ces cellules présentent par ailleurs un RE distendu synonyme de la présence d'un stress RE.

La mutagénèse de *MUC2* induite chez les souris Winnie et Eeyore entraîne une accumulation du précurseur de MUC2 dans le RE des cellules caliciformes et une diminution de la sécrétion de mucines. Ces animaux présentent une symptomatologie proche de la RCH et s'illustrent par la survenue d'une colite spontanée et conséquemment, d'un cancer associé à la colite. Ces perturbations de la biosynthèse de MUC2 sont associées à un stress du RE (augmentation de l'expression de GRP78 et XBP1s) (Eri et al, 2011; Heazlewood et al, 2008). On dénote par ailleurs, une activation du système immunitaire inné et adaptatif caractérisée

par une forte réponse Th17-dépendante, similaire à celle retrouvée chez les patients atteints de RCH (Eri et al, 2011).

6.3. ER stress and cancer

Le microenvironnement des tumeurs se caractérise par une hypoxie en lien avec une vascularisation réduite, une carence en nutriments, des changements de pH et un stress oxydant. Ce microenvironnement agit comme un facteur limitant pour la croissance tumorale. Les cellules cancéreuses s'adaptent à ce microenvironnement en activant la réponse UPR (Dong et al, 2011; Dufey et al, 2015). Surexprimés dans de nombreux types de tumeurs (Yadav et al, 2014), les acteurs de la réponse UPR jouent un rôle important dans l'angiogenèse et la dormance tumorale, l'instabilité génomique, la prolifération et la survie des cellules cancéreuses ainsi que dans leur résistance aux traitements (Dufey et al, 2015). Dans les cancers du foie ainsi que dans les cancers colorectaux et gastriques, la surexpression de GRP78 est corrélée chez les patients à une augmentation du risque de récurrence, et à un taux de survie plus faible (Fu et al, 2006; Luk et al, 2006; Xing et al, 2011; Zhang et al, 2006a). GRP78 joue un rôle clé dans la tumorigenèse en augmentant la prolifération des cellules cancéreuses, leur survie contre l'apoptose et par la mise en place d'une angiogenèse tumorale (Dong et al, 2008; Dong et al, 2011). Au cours de la tumorigenèse, la translocation de GRP78 à la surface des cellules tumorales colorectales stimule l'invasion et la migration tumorale (Li et al, 2013; Takahashi et al, 2011). La voie PERK/eIF2 α favorise la survie des cellules cancéreuses en facilitant leur adaptation à différentes conditions limitantes telles que l'hypoxie ou le stress oxydant (Bi et al, 2005; Cojocari et al, 2013; Koumenis et al, 2002). L'inhibition de la voie PERK/eIF2 α réduit la résistance des cellules cancéreuses à l'hypoxie (Bi et al, 2005; Blais et al, 2006). PERK joue aussi un rôle crucial dans l'angiogenèse tumorale en induisant la transcription de facteurs pro-angiogéniques tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le FGF-2 (Blais et al, 2006; Pereira et al, 2010; Wang et al, 2012b). L'inhibition de PERK chez la souris prévient la surexpression du VEGF, réduit la croissance, la vascularisation et la perfusion tumorale (Wang et al, 2012b). IRE et XBP1 sont surexprimés dans les tumeurs colorectales (Fujimoto et al, 2007; Jin et al, 2016) et sont associés à un faible taux de survie chez le patient atteint de CCR (Jin et al, 2016). Le "silencing" d'IRE par des siRNA inhibe la prolifération des cellules de carcinome colorectal, alors que son expression ectopique stimule leur prolifération (Jin et al, 2016). En résumé, l'augmentation des expressions de VEGF, IRE et XBP1 favorise l'angiogenèse

tumorale (Drogat et al, 2007; Romero-Ramirez et al, 2009). Surexprimée dans de nombreux types de cancers, la voie ATF6 est impliquée dans la prolifération des cellules cancéreuses (Arai et al, 2006), leur dormance (Schewe et al, 2008), dans le développement des tumeurs métastatiques et leur résistance aux traitements (Higa et al, 2014). De ce fait, la surexpression d'ATF6 est associée à une faible valeur pronostique dans le cadre du cancer colorectal (Higa et al, 2014; Lin et al, 2007).

7. THERAPIE DES PATHOLOGIES ASSOCIEES AU STRESS RE PAR LEPHENYLBUTYRATE

Au cours des dernières années, des études chez l'homme et dans des modèles animaux ont démontré l'efficacité de petites molécules désignées sous le nom de chaperonnes chimiques à traiter le stress RE dans différents contextes pathologiques comme les maladies neurodégénératives, le diabète de type 2 et en particulier l'inflammation intestinale (pour revue, voir (Vega et al, 2016)). Bien que les mécanismes par lesquels agissent ces chaperonnes ne soient pas totalement connus, elles pourraient permettre de stabiliser la structure native des protéines, d'accélérer leur maturation, de prévenir leur agrégation et de faciliter la dégradation protéasomale des protéines mal repliées, tout en stimulant l'activité des chaperonnes moléculaires endogènes. Parmi les chaperonnes chimiques les plus étudiées, le 4-phénylbutyrate (PBA) a montré son efficacité dans de nombreux modèles animaux de maladies associées au stress ER (Begam et al, 2016; Bondulich et al, 2016; Cao et al, 2013; Cao et al, 2016; Jian et al, 2016; Liu et al, 2004; Ono et al, 2009; Ozcan et al, 2006; Singh et al, 2006). Le PBA est un acide gras aromatique de faible poids moléculaire dont la structure dérive du butyrate et qui possède de multiples propriétés biologiques. En effet, outre ses propriétés de chaperonnes chimiques, c'est un inhibiteur bien connu des activités HDAC mais surtout un régulateur de la teneur plasmatique en ammoniacque utilisé en routine dans le traitement des désordres du cycle de l'urée (**Figure 15**).

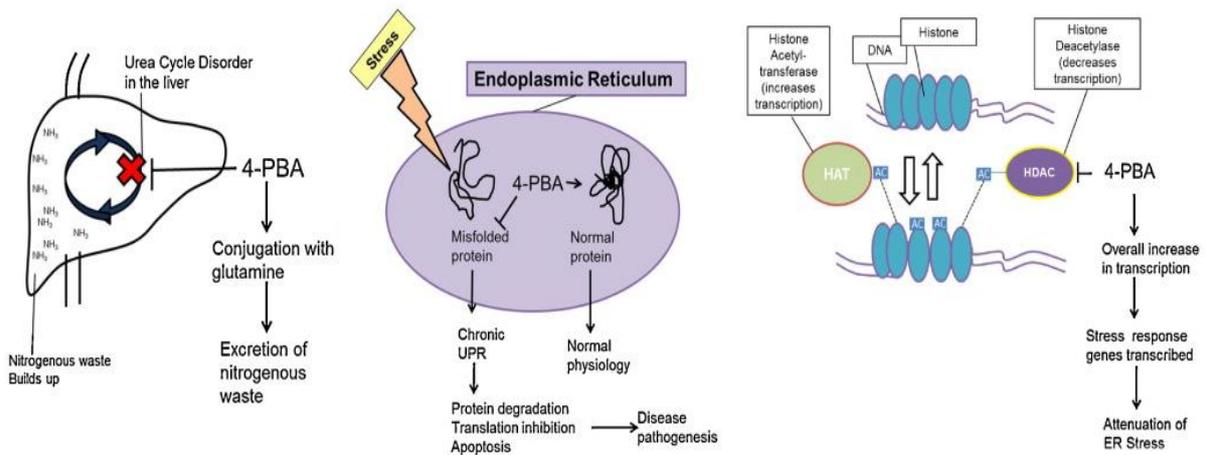


Figure 15: Mécanisme d'action du Phénylbutyrate.

Le PBA est une prodrogue approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) et l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de Santé) et connue sous le nom commercial de Buphenyl® aux Etats-Unis et d'Ammonaps® en France. Les désordres du cycle de l'urée dont la forme la plus courante est le déficit en ornithine transcarbamylase, sont caractérisés par une hyperammoniémie qui peut entraîner un retard mental chez le jeune enfant. Le PBA permet de diminuer la concentration plasmatique d'ammoniaque en interférant avec le cycle de l'urée (**Figure 16**). Il est métabolisé via la β -oxydation pour donner du phénylacétate. Ce dernier se conjugue à la glutamine pour donner la phénylacétylglutamine qui est alors éliminée par le rein. Si cette réaction permet de réduire l'ammoniémie, elle a l'inconvénient d'entraîner une déplétion en glutamine (Darmaun et al, 1998; Rouge et al, 2007). Le traitement des patients s'accompagne donc en généralement d'une supplémentation en acides aminés.

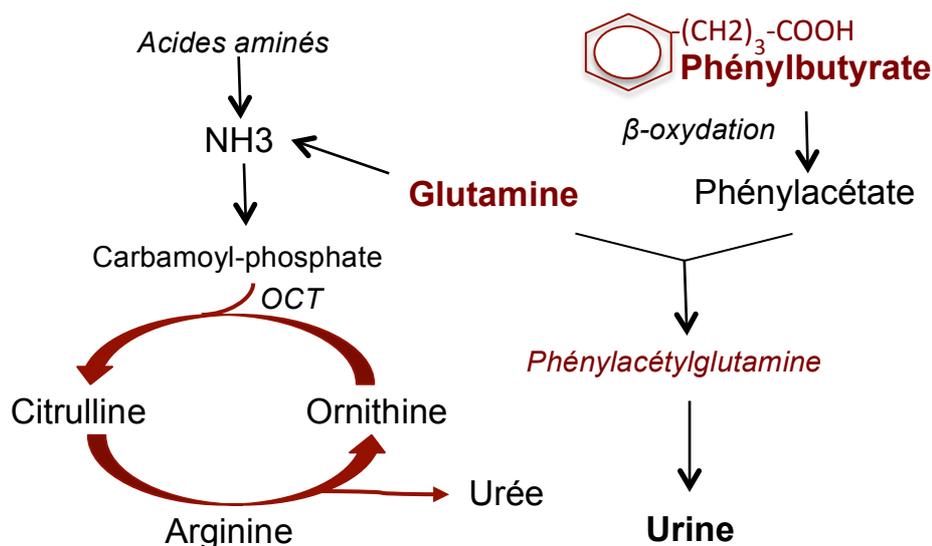


Figure 16: Action du phénylbutyrate (PBA) sur le cycle de l'urée. Le PBA entraîne une déplétion en glutamine réduisant la teneur en ammoniacque. OCT : Ornithine carbamyl transférase.

Outre sa propriété de chaperonne chimique, le PBA peut également réguler le stress du RE en modulant la transcription de gènes impliqués dans la réponse UPR (Wright et al, 2004). En effet, en tant qu'analogue du butyrate, le PBA a la capacité d'inhiber les HDAC et d'induire une augmentation globale de la transcription par acétylation des histones (Chung et al, 2003; Lea et al, 1995; Lea et al, 1998; Lea et al, 1999). Le PBA stimule ainsi, par exemple, la transcription des chaperonnes endogènes HSP70 et GRP78 dans un modèle de mucoviscidose (Choo-Kang et al, 2001; Singh et al, 2006; Wright et al, 2004). Enfin, comme nous l'avons déjà signalé (Paragraphe 5), l'inhibition des HDAC au niveau du cytoplasme et du RE par le PBA (ou autre inhibiteur de HDAC) peut réguler la réponse UPR, en maintenant ou stimulant (par des HAT) l'acétylation de protéines impliquées dans la réponse UPR (Costantini et al, 2007; Kahali et al, 2010; Kahali et al, 2011; Kahali et al, 2012; Ko et al, 2009; Wang et al, 2011).

On estime que le stress du RE serait associé ou impliqué dans la pathogénèse d'au moins une cinquantaine de pathologies, notamment celles présentant une accumulation de protéines mal formées comme les maladies neurodégénératives (Soto 2003). Le PBA fait actuellement l'objet d'essais cliniques pour le traitement de nombreuses maladies associées à un mauvais repliement des protéines, notamment dans la mucoviscidose, la sclérose latérale amyotrophique, les maladies de Huntington, de parkinson, et d'Alzheimer, mais aussi dans le

diabète de type 2 et certains cancers (plus de détails sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=phenylbutyrate+&Search=Search>).

Capable de passer la barrière hémato-encéphalique, le PBA constitue un agent thérapeutique dans le cadre des maladies neurodégénératives. L'accumulation de protéines mal conformées comme le peptide β -amyloïde et l' α -synucléine est associée à une perte neuronale respectivement dans la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. Dans un modèle de maladie de Parkinson induite par la surexpression d'un mutant mal-replié d' α -synucléine, l'administration orale de PBA atténue les manifestations motrices de la maladie (Ono et al, 2009; Zhou et al, 2011). Dans plusieurs modèles de maladie d'Alzheimer, le PBA permet une réduction des plaques amyloïdes et une amélioration des capacités cognitives (Cuadrado-Tejedor et al, 2013; Ricobaraza et al, 2009; Wiley et al, 2011). Le PBA dispose aussi d'un fort potentiel thérapeutique dans le cadre de maladies métaboliques et dans le cadre des maladies inflammatoires. Le stress du RE a été associé à la résistance à la leptine et à l'insuline, dans le diabète de type II et l'obésité (Boden et al, 2008; Ozcan et al, 2004). Dans un modèle d'obésité chez la souris, il a été montré que la présence d'un stress du RE dans l'hypothalamus, les cellules β pancréatiques et le tissu adipeux des animaux était associée à une résistance à la leptine et à l'insuline dans ces tissus (Ozcan et al, 2004; Ozcan et al, 2006; Ozcan et al, 2009). Le traitement de ces animaux par le PBA abolit la résistance à la leptine et à l'insuline et améliore l'état de la maladie (Ozcan et al, 2006; Ozcan et al, 2009; Xiao et al, 2011). Attendu que les cellules épithéliales coliques (CEC) semblent particulièrement sensibles au stress du RE, et qu'une réponse UPR mal adaptée peut conduire à une inflammation intestinale, le PBA dispose potentiellement d'application dans le traitement des MICI (Cao 2016). Dans un modèle de colite induite au DSS, l'administration de PBA permet une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α , l'IL-1 β et IL-6 (Ono et al, 2014). Dans des modèles de souris déficientes en ATF6 ou en P58 (une Co-chaperonne du RE), le stress du RE augmente la susceptibilité à la colite induite au DSS. L'administration de PBA permet de réduire le stress du RE et prévient l'inflammation intestinale (Cao et al, 2013). Il est cependant difficile de déterminer laquelle des propriétés de chaperonne ou d'inhibiteur de HDAC intervient dans les effets anti-inflammatoires du PBA, les deux n'étant pas mutuellement exclusives.

CHAPITRE 3: BARRIERE EPITHELIALE COLIQUE ET MODIFICATIONS EPIGENETIQUES

1. DEFINITION ET ROLE DE L'EPIGENETIQUE

Malgré un génome identique, les cellules souches totipotentes de l'organisme ont la capacité de donner naissance à des cellules différenciées présentant des phénotypes et des fonctions spécifiques du tissu auquel elles appartiennent. Les mécanismes épigénétiques, qui rassemble les mécanismes de régulation des gènes transmissibles, réversibles et indépendants de la séquence d'ADN, joue un rôle fondamental dans cette spécificité tissulaire. Ainsi, à côté du génome, l'établissement d'un épigénome spécifique contribue fortement au phénotype des organismes vivants.

Les principaux mécanismes épigénétiques incluent la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et les micro-ARN. Ils affectent l'expression du génome et contribuent à l'établissement du phénotype sans modification du génotype. Les événements épigénétiques jouent un rôle important dans tous les aspects de la biologie tant en conditions physiologiques que pathologiques. Ce sont les mécanismes mis en jeu par la cellule pour ajuster l'expression des gènes aux conditions environnementales, comme par exemple la disponibilité des nutriments et le métabolisme cellulaire. La plasticité des modifications épigénétiques (i.e., induction et suppression des marques épigénétiques) en fait une cible thérapeutique de choix dans de nombreuses pathologies telles que le diabète de type 2, l'obésité, l'inflammation, le cancer. Comme nous le verrons, cette plasticité joue un rôle fondamental au cours du développement du fœtus et lors de la maturation des organes pendant la période néonatale. En effet, l'établissement de l'épigénome au cours de ces périodes critiques va pouvoir être modulé (en bien ou en mal) par des facteurs environnementaux, comme les xénobiotiques, le stress et plus particulièrement la nutrition de la mère. Une fois établi, l'épigénome va être transmis au cours des divisions cellulaires tout au long de la vie de l'individu et va donc conditionner l'expression génique et le fonctionnement des organes à l'âge adulte. Cette plasticité épigénétique périnatale est à la base de la théorie des origines développementales de la santé et des maladies (DOHaD) qui sera abordée dans le chapitre suivant (Gluckman et al, 2007; Gluckman et al, 2009)).

Bien que la méthylation de l'ADN soit la plus stable et la plus étudiée des modifications épigénétiques, nous nous focaliserons sur les modifications post-traductionnelles des histones et sur les enzymes de la machinerie épigénétique impliquées dans la régulation de leur acétylation. En effet, les travaux faisant l'objet de cette thèse concernent exclusivement ces mécanismes. Nous ne développerons pas non-plus les ARN non codants. Pour plus d'informations, nous conseillons la lecture des revues de la littérature et notamment (Rissland et al, 2011; Spitale et al, 2011).

2. STRUCTURE DE LA CHROMATINE ET REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE

L'unité de base de la chromatine, le nucléosome, est composée d'un octamère d'histones, qui comprend deux sous-unités de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4, autour duquel s'enroule 146 pb de la double hélice d'ADN. Les histones sont des petites protéines basiques très conservées au cours de l'évolution. Neuf modifications post-traductionnelles, incluant acétylation, phosphorylation, méthylation ou sumoylation, affectent plus de 60 résidus sur les 4 histones. L'ensemble de ces modifications post-traductionnelles des histones permet de réguler l'expression de gènes en modulant l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à la chromatine.

Il a été démontré que le statut d'expression des gènes impliquait la combinaison de plusieurs modifications épigénétiques des histones. Les modifications post-traductionnelles agissent de façon synergique ou antagoniste afin d'entraîner une cascade d'évènements successifs dictant l'état de la chromatine (Jenuwein et al, 2001). La phosphorylation du résidu serine 10 porté par l'histone H3 (H3S10ph) permet par exemple l'acétylation d'H3K14 et empêche en contrepartie la méthylation d'H3K9. Ceci est associé à une activation transcriptionnelle (Lo et al, 2000; Lo et al, 2001). La phosphorylation d'H3S28 entraîne l'acétylation d'H3K9 (Bannister et al, 2011; Zhong et al, 2003). Enfin, il a été aussi suggéré que l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16) puisse être requise pour que l'acétylation des autres lysines de l'histone H4 se produise (Turner et al, 1989). Le «code histone» est un concept qui postule que les modifications épigénétiques constituent des marques reconnues par des complexes protéiques incluant des enzymes (ex : HDAC, HAT, HMT) qui vont en retour modifier les marques épigénétiques soit sur l'histone ou soit sur les histones voisines et conditionner l'action des facteurs de transcription.

3. ACÉTYLATION DES HISTONES

L'acétylation des histones constitue un processus dynamique contrôlé par deux familles d'enzymes ayant des actions antagonistes, les Histones acétyl-transférases (HAT) et les Histones désacétylases (HDAC).

3.1. Les Histone acétyl-transférases (HAT)

Les **HAT** catalysent l'incorporation d'un groupement acétyl sur le groupement ϵ -aminé de la chaîne latérale du résidu lysine d'une histone en utilisant l'acétyl-CoA comme substrat. Cette action aboutie à la neutralisation des charges positives présentes sur la partie N-terminale des histones, ce qui diminue les interactions électrostatiques entre les histones et l'ADN chargé négativement favorisant de facto l'ouverture de la chromatine et l'accès de la machinerie transcriptionnelle aux séquences d'ADN. De manière générale, l'acétylation des lysines entraîne l'activation de la transcription. Plus particulièrement, l'acétylation de la lysine 16 de l'histone 4 (H4K16) est corrélée au passage d'hétérochromatine à euchromatine et constitue un élément essentiel à la transcription. Les résidus acétylés portés par les histones peuvent être reconnus par des protéines à bromodomaine ayant la capacité de recruter à leur tour des HAT, des HDAC ou des complexes activateurs ou répresseurs.

Les HAT sont regroupées au sein de 6 grandes familles en fonction de leurs domaines catalytiques d'acétylation communs (**Tableau 3**). En particulier, la superfamille MYST regroupe des HAT impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires de la réparation de l'ADN à la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. Cette famille comprend 5 membres identifiés chez l'homme: Tip60, MOZ, MORF, HBO1 and MOF impliqués dans des complexes transcriptionnels. **KAT8 (MOF)** constitue l'HAT spécifiquement dédié à l'acétylation d'H4K16 (Hajji et al, 2010; Taipale et al, 2005). La famille CBP/p300 est constituée de deux membres : CREBBP (anciennement CBP) et EP300 (anciennement p300). La famille SRC/p60 (steroid receptor coactivateur) regroupe les histones acétyl-transférases, KAT13a, 13b et 13c.

Nom	Synonyme (ancienne dénomination)	Substrats
Famille GNAT		
Histone Acetyltransferase 1	KAT1, HAT1	
Lysine Acetyltransferase 2A	KAT2A, GCN5, (GCN5L2)	H3K9ac, H3K14ac, H4K5ac, H4K8ac, H4K91ac H4K16ac, H4K12ac,
Lysine Acetyltransferase 2B	KAT2B, GCN5L	
Elongator Acetyltransferase Complex Subunit 3	KAT9, ELP3, (PCAF)	H3K9ac, H3K18ac
Famille MYST		
Lysine Acetyltransferase 5	KAT5, HTATIP, PLIP, (TIP60)	H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H2AK5ac
Lysine Acetyltransferase 6A	KAT6A, MOZ, (MYST3)	H3K14ac
Lysine Acetyltransferase 6B	KAT6B, MORF, MOZ2, (MYST4)	
Lysine Acetyltransferase 7	KAT7, HBO1, (MYST2)	H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac
Lysine Acetyltransferase 8	KAT8, MOF, hMOF, (MYST1)	H4K16ac
Famille CBP/P300		
CREB Binding Protein	KAT3A, CREBBP, (CBP)	
E1A Binding Protein P300	KAT3B, EP300, (p300)	H3K27ac, H3K56ac, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac, H3K18ac, H3K122ac
Famille SRC/P60		
Nuclear Receptor Coactivateur 1	KAT13A, NCOA1, (SRC1)	
Nuclear Receptor Coactivateur 3	KAT13B, NCOA3, SRC-3, (ACTR)	
Nuclear Receptor Coactivateur 2	KAT13C, NCOA2, (TIF2)	
Facteurs de transcription		
General Transcription Factor IIIC Subunit 4	KAT12, GTF3C4, TFIIIC90	H3K14ac
TATA-Box Binding Protein Associated Factor 1	KAT4, TAF1, TAF2A, TAFII250	
Circadian Locomotor Output Cycles Protein Kaput	KAT13D, CLOCK, KIAA0334, bHLHe8	
Cyclic AMP-Dependent Transcription Factor ATF-2	ATF2, CREB2, CREBP1,	
Autres		
Testis-Specific Chromodomain Protein Y 1	CDY1A, CDY1B	
Chromodomain Y-Like Protein	CDY1, CDYL1	

Tableau 3: Famille des histones lysine acétyle-transférases

3.2. Les histones désacétylases (HDAC)

Les histones désacétylases ont une action antagoniste des HAT. En reversant l'acétylation des lysines, elles restaurent la charge positive des lysines favorisant ainsi la compaction de la chromatine (hétérochromatine) et la répression transcriptionnelle. Les HDAC sont réparties en deux familles, les **histones « classiques »** et les **sirtuines (Tableau 4)**.

Les HDAC classiques partagent des séquences similaires et requièrent du ZN^{2+} pour leur activité catalytique. Leur activité est inhibée par la trichostatine A (TSA). Les HDAC classiques sont subdivisées en 3 classes (classe I, II, IV) selon des analyses phylogénétiques et en fonction de leurs homologies avec les HDAC identifiées initialement chez la levure. La classe I rassemble les HDAC 1, 2, 3, 8 qui partagent des séquences homologues à Rpd3 (Reduced potassium dependency 3) identifiées chez la levure. Elles sont localisées essentiellement dans le noyau (excepté HDAC3), grâce à la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS) et à l'absence d'un signal d'exportation nucléaire (*nuclear export signal*). Leur expression tissulaire est ubiquitaire et une surexpression des HDAC 1,2 et 3 a été identifiée dans de nombreuses tumeurs notamment dans le CCR (Song et al, 2005; West et al, 2014; Wilson et al, 2006) et la prostate (Halkidou et al, 2004). Cette surexpression est associée à une répression du gène p21 et par conséquent à une dérégulation du cycle cellulaire. Les HDAC de classe II sont homologues à hda1 (histone deacetylase 1). La subdivision IIa regroupe les HDAC 4, 5, 7 9 disposant d'un seul domaine désacétylase à l'opposé des HDAC 6 et 10 de Classe IIb présentant deux domaines désacétylases. Les HDAC de classe II sont capables de migrer entre le noyau et le cytoplasme en réponse à divers signaux cellulaires : elles disposent d'un domaine NLS en N-terminal et d'un domaine NES en C-terminal. HDAC 11 constitue quant à elle, le seul membre de la classe IV, et ne peut être rattaché à aucun gène homologue identifié chez la levure. Les analyses phylogénétiques indiquent tout de même une forte homologie de cette HDAC avec les HDAC 3 et 8 suggérant une plus grande parenté d'HDAC 11 avec la classe I. La famille des **sirtuines (classe III)** constitue un groupe de sept HDAC (SIRT1-7) ne disposant pas de similitudes de séquence avec les HDAC « classiques ». Elles requièrent du NAD^+ en tant que cofacteur enzymatique et présentent de fortes homologies avec scSir2 identifié chez la levure. A contrario des HDAC classiques, leur activité ne peut être inhibée par la Trichostatine A. Les sirtuines 1 et 2 sont localisées dans le cytoplasme et le noyau, SIRT 6 et 7 ne sont présentes que dans le noyau. Les SIRT 3, 4 et 5 n'ont été identifiées que dans la mitochondrie (Michishita et al, 2005).

	Gène	Localisation cellulaire	Sites de modification des histones
Histone désacétylases 1	HDAC 1	Noyau	H3K56ac
Histone désacétylases 2	HDAC 2	Noyau	
Histone désacétylases 3	HDAC 3	Noyau	H3K4ac
Histone désacétylases 8	HDAC 8	Navette Noyau- Cytoplasme	
Histone désacétylases 4	HDAC 4	Navette Noyau- Cytoplasme	
Histone désacétylases 5	HDAC 5	Navette Noyau- Cytoplasme	
Histone désacétylases 7	HDAC 7	Navette Noyau- Cytoplasme Mitochondrie	
Histone désacétylases 9	HDAC 9	Navette Noyau- Cytoplasme	
Histone désacétylases 6	HDAC 6	Cytoplasme	
Histone désacétylases 10	HDAC 10	Cytoplasme	
NAD-dependent deacetylase sirtuin-1	Sirt-1	Noyau, Cytoplasme	H4K16ac, H3K9ac, H1K25ac
NAD-dependent deacetylase sirtuin-2	Sirt-2	Cytoplasme	H4K16ac, H3K56ac
NAD-dependent deacetylase sirtuin-3	Sirt-3	Mitochondrie, noyau	H3K56ac
NAD-dependent deacetylase sirtuin-4	Sirt-4	Mitochondrie	
NAD-dependent deacetylase sirtuin-5	Sirt-5	Mitochondrie	
NAD-dependent deacetylase sirtuin-6	Sirt-6	Noyau	H3K9ac, H3K56ac
NAD-dependent deacetylase sirtuin-7	Sirt-7	Nucléole	
Histone désacétylases 11	HDAC 11	Noyau / Cytoplasme	

Tableau 4 : Histones désacétylases (HDAC)

3.2.1. Régulation des activités HDAC

Les activités HDAC sont régulées via des modifications post-traductionnelles, des interactions protéines-protéines, leur localisation cellulaire ou encore leur recrutement dans différents complexes corépresseurs.

De nombreuses HDAC disposent de sites de phosphorylation potentiels permettant la régulation de leurs activités. HDAC 1 dispose par exemple, de deux résidus sérines Ser⁴²¹ et Ser⁴²³ dont la phosphorylation par la protéine kinase CK2, la protéine kinase A (PKA) ou la protéine kinase G est nécessaire à son activité désacétylase. La mutation de ces deux sites est associée à une réduction de l'activité enzymatique d'HDAC1 (Pflum et al, 2001). De même, la phosphorylation d'HDAC2 par CK2 est nécessaire à son activité enzymatique et à son association avec les corépresseurs mSin3 et Mi2 (Tsai et al, 2002). Les activités d'HDAC3 et d'HDAC8 semblent aussi être régulées par phosphorylation. In vivo, CK2 phosphoryle HDAC3 tandis que PKA est à l'origine de la phosphorylation d'HDAC8. La phosphorylation d'HDAC8 est associée à une réduction de son activité désacétylase, à contrario de ce qui a été observé pour les autres HDAC de classe I (Lee et al, 2004). Les HDAC de classe II, HDAC 4 et 5 sont par ailleurs phosphorylées par CaMK. Bien que cette phosphorylation ne semble pas influencer l'activité enzymatique de ces enzymes, elle constitue plutôt un prérequis à leur transport du compartiment nucléaire au cytoplasme (Wang et al, 2014b). Enfin, le traitement de cellules avec l'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphoserine/threonine phosphatases, induit une diminution des activités désacétylases et confirme la régulation des HDAC par phosphorylation (Galasinski et al, 2002). Outre la phosphorylation, la sumoylation constitue un des mécanismes de régulation des HDAC. Ainsi, la mutation du site de sumoylation d'HDAC4 est associée à une diminution de son activité désacétylases (Kirsh et al, 2002).

3.2.2. Inhibition des activités HDAC

Les inhibiteurs des HDAC (HDACi) désignent un groupe de composés qui bloquent l'activité des HDAC essentiellement en se fixant au site de liaison du zinc de leurs domaines catalytiques. L'inhibition des HDAC sous l'action de ces composés est réversible, exception faite pour deux inhibiteurs, la trapoxine et la dépodécine qui se lient de façons covalentes au site catalytique des HDAC. Il existe une grande diversité d'inhibiteurs d'HDAC, d'origines naturelles ou synthétiques qui peuvent être séparés en cinq classes selon leur structure chimique : Les acides hydroxamiques, les acides aliphatiques, les peptides cycliques, les benzamides et les cétones électrophiles (**Tableau 5**). Le nicotinamide, le sirtinol (Mai et al,

2005), la spilomycine (Neugebauer et al, 2008), ou encore la salermide (Lara et al, 2009) constitue les principaux inhibiteurs des sirtuines.

Class	Structure	IC ₅₀	Cibles
Acides Aliphatiques	Butyrate	mM	Classe I and II excepté HDAC6 et 10et 10
	Phenyl butyrate	mM	
	Acide Valproïque	mM	
Hydroxamates	Trichostatine A (TSA)	nM	Pan-inhibiteur
	Acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA, vorinostat)	nM	
	M-Carboxycinnamic Acid (CBHA)	μM	
	Dacinostat (LAQ-824)	nM	
	Belinostat (PDX-101)	nM	
	Panobinostat (LBH589)	nM	
	Resminostat (4SC-201)	nM	
Abexinostat (PCI -24781)	nM	Classes I et II	
Peptides cycliques	Romidepsine	nM	Classe I
	Depsipeptide	nM	
	Apicidine	nM	
	Trapoxine	nM	
	Dépuécine	nM	
Benzamides	Entinostat (MS-275)	μM	Classe I
	Mocetinostat (MGCD0103)	μM	Classe I/IV
	Tacedinaline (CI-994)	μM	Classe I
Cétones électrophiles	Trifluorométhylcétones	μM	
	A-cétone	μM	

Tableau 5 : Liste non exhaustive des inhibiteurs des HDAC. A partir de (Gallinari et al, 2007)

Le butyrate est le prototype des inhibiteurs d'HDAC (Boffa et al, 1978; Riggs et al, 1977). Il s'agit d'un inhibiteur non compétitif, spécifique des HDAC de classe I, II, dont l'action inhibitrice est réversible. Des dérivés du butyrate ayant de meilleures propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques ont été développés et constituent le groupe des acides aliphatiques. La tributyrine est par exemple, une prodrogue du butyrate. Le métabolite actif de ce composé inhibe les HDAC, augmente la différenciation et l'apoptose des cellules tumorales (Heidor et al, 2012; Heidor et al, 2014; Kuefer et al, 2004). L'acide valproïque (ou valproate), dérivé de l'acide valérique, inhibe les HDAC, et présente des activités similaires sur le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose des cellules (Gottlicher et al, 2001; Gurvich et al, 2004; Kanai et al, 2004; Yildirim et al, 2003). Enfin, comme déjà évoqué dans le chapitre précédent, le phénylbutyrate (PBa) inhibe les HDAC et module ainsi

l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Il réduit la prolifération cellulaire, augmente la différenciation et l'apoptose des cellules tumorales (Carducci et al, 1996).

Les inhibiteurs HDAC sont à l'origine d'une nouvelle classe de médicaments indiquée dans le cadre du traitement du cancer de par leur faculté à induire l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose des cellules cancéreuse et l'arrêt de leur prolifération. Des études récentes ont également mis en évidence les potentialités de certains de ces inhibiteurs dans des maladies ayant une forte composante inflammatoire telles que les MICI (Glauben et al,).

4. MODIFICATIONS DE L'ÉPIGÉNOME PAR LES NUTRIMENTS

De nombreux nutriments ont été identifiés comme étant capable de moduler l'activité des enzymes de la machinerie épigénétique, soit en agissant en tant qu'inhibiteurs, soit en tant que substrats (ou précurseurs) de ces enzymes (**Tableau 6**). De tels composés ouvrent de nouvelles perspectives en ce qui concerne la prévention et le traitement de maladies dont l'étiologie comprend des facteurs épigénétiques (e.g cancer et MICI). Les études répertoriées dans le tableau 6 suggèrent que des stratégies nutritionnelles pourraient endiguer les modifications épigénétiques mise en évidence dans ces pathologies et contribuer à la réactivation de gènes dérégulés. Ces études mettent en évidence l'importance de l'environnement nutritionnel périnatal dans la régulation épigénétique des gènes aussi bien à des stades précoces de développement qu'à l'âge adulte, mais aussi dans la transmissibilité des marques épigénétiques acquises.

Composés	Sources	Enzymes modulées	
Resveratrol	Raisins, Myrtilles, Mûres, Arachides	SIRT (activateur) DNMT (inhibiteur)	(Howitz et al, 2003; Qin et al, 2014; Stefanska et al, 2010)
Acide anacardique	Noix de cajou	HAT (inhibiteur)	(Balasubramanyam et al, 2003; Sun et al, 2006)
Curcumine	Curcuma	HAT & HDAC (inhibiteur) DNMT (inhibiteur)	(Chen et al, 2007; Guo et al, 2015; Liu et al, 2005; Liu et al, 2009; Marcu et al, 2006)
L'epigallocatechine gallate (EGCG) et les polyphénols du thé	Thé	HAT (inhibiteur) DNMT (inhibiteur)	(Choi et al, 2009; Fang et al, 2003; Nandakumar et al, 2011)
Genisteine	Soja	HAT / HDAC (inhibiteur) DNMT (inhibiteur)	(Day et al, 2002; Fang et al, 2005; Hong et al, 2004; Majid et al, 2008)
Sulforaphane	Broccoli, chou	HDAC (inhibiteur) DNMT (inhibiteur)	(Fan et al, 2012; Myzak et al, 2006a; Myzak et al, 2006b; Myzak et al, 2007; Traka et al, 2005)
Quercetine	Agrumes et Sarrasin	HDAC (inhibiteur) HAT (activateur) DNMT (inhibiteur) Sirt (activateur)	(Priyadarsini et al, 2011; Ravichandran et al, 2014; Ruiz et al, 2007; Tan et al, 2009)
Lycopene	Tomate	DNMT (inhibiteur)	(Fu et al, 2014)
Disulfure de Diallyle	Ail, ciboulette, poireau	HDAC (inhibiteur)	(Altonsy et al, 2012; Druesne et al, 2004a, 2004b; Druesne-Pecollo et al, 2007; Myzak et al, 2006a)
Fibres butyrogènes	Céréale, fruit, légumes, produits amylacés	Précurseur du butyrate (inhibiteur des HDAC)	(Boffa et al, 1992; Inoue et al, 2011; Soret et al, 2010)
Folates et donneurs de méthyl	Levure alimentaire, épinards, foies, haricots blancs secs	Précurseur du SAM (substrat des DNMT)	(Cooney et al, 2002; McKay et al, 2011; Waterland et al, 2003; Wolff et al, 1998)

Tableau 6: Régulation épigénétique par des composés bioactifs des aliments

CHAPITRE 4 : ORIGINE DEVELOPPEMENTALE DE LA SANTE ET DES MALADIES DE L'ADULTE (DOHAD)

1. L'ORIGINE DEVELOPPEMENTALE DE LA SANTE ET DES MALADIES DE L'ADULTE (DOHAD) : BASES THEORIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES

Le développement d'un fœtus est entièrement tributaire de son environnement et des échanges fœto-placentaires. Il est maintenant largement admis qu'un environnement in utero altéré et notamment une altération de l'environnement nutritionnel, présente des effets néfastes sur le fœtus à court terme mais aussi à long terme, à l'âge adulte.

Les études instituées à partir des cohortes d'Hertfordshire par l'épidémiologiste anglais David Barker et ses collaborateurs au cours des années 90 ont permis de mettre en évidence une association entre le faible poids à la naissance et le risque de développer des maladies chroniques à l'âge adulte telle qu'une hypertension, une insulino-résistance ou une dyslipidémie. Ces premières observations épidémiologiques ont été largement confirmées par les études réalisées sur différentes cohortes et notamment sur la cohorte hollandaise (The Nederland Cohorte Study) constituée d'individus conçus ou nés pendant la récession économique des années 1932-40, la 2^{ème} guerre mondiale (1940-44) et au cours de la famine survenue l'hiver 44-45 (The Hunger Winter). Cette famine se caractérise par la sévérité de la restriction calorique induite (400 à 800 kcal), circonscrite sur une courte période (de novembre 1944 à février 1945) et par sa résolution rapide. L'exposition à cette famine durant une phase critique du développement fœtal est associée à un risque plus élevé d'obésité, d'hypertension, d'insulino-résistance et de diabète à l'âge adulte (Ravelli et al, 1976; Ravelli et al, 1998; Ravelli et al, 1999; Roseboom et al, 2000b; Roseboom et al, 2000a; Roseboom et al, 2001).

L'ensemble de ces observations a permis de formuler l'hypothèse DOHaD, qui suggère l'existence d'une réponse adaptative du fœtus face à un environnement *in-utero* altéré. Cette hypothèse également connue sous le terme de « programmation métabolique fœtale » a reçu confirmation par le biais de nombreux modèles expérimentaux démontrant le lien entre l'environnement périnatal et le risque de développer des pathologies à l'âge adulte.

Les travaux conjoints de Hales et Barker ont ensuite permis d'émettre l'hypothèse du phénotype économe (« **thrifty phenotype hypothesis** ») (Hales et al, 1992, 2001). Cette hypothèse postule qu'en réponse à une période de restriction nutritionnelle, le fœtus en cours de l'organogénèse s'adapte à son environnement intra-utérin délétère, en minimisant sa

consommation de nutriments et en redirigeant les nutriments disponibles vers des organes critiques (cerveau, poumon) au détriment d'autres organes comme le foie, le pancréas. Ce **phénotype économe** conditionnerait à une plus grande susceptibilité à des troubles métaboliques à l'âge adulte (Hales et al, 1992, 2001). En effet, cette adaptation a pour objectif d'optimiser le métabolisme du fœtus au contexte nutritionnel qui lui est imposé tout en préparant aussi ce métabolisme au contexte nutritionnel post-natal. Si l'environnement nutritionnel post-natal est en adéquation avec celui de la vie utérine, l'adaptation métabolique sera favorable pour l'organisme. Cependant, si le contexte nutritionnel post-natal est riche (excès d'énergie et de nutriments), la réponse fœtale sera mal-adaptée. Ce « mismatch » entre l'environnement nutritionnel in utero et le contexte nutritionnel post-natal serait à l'origine des pathologies mises en évidence au cours des études épidémiologiques (**Figure 17**).

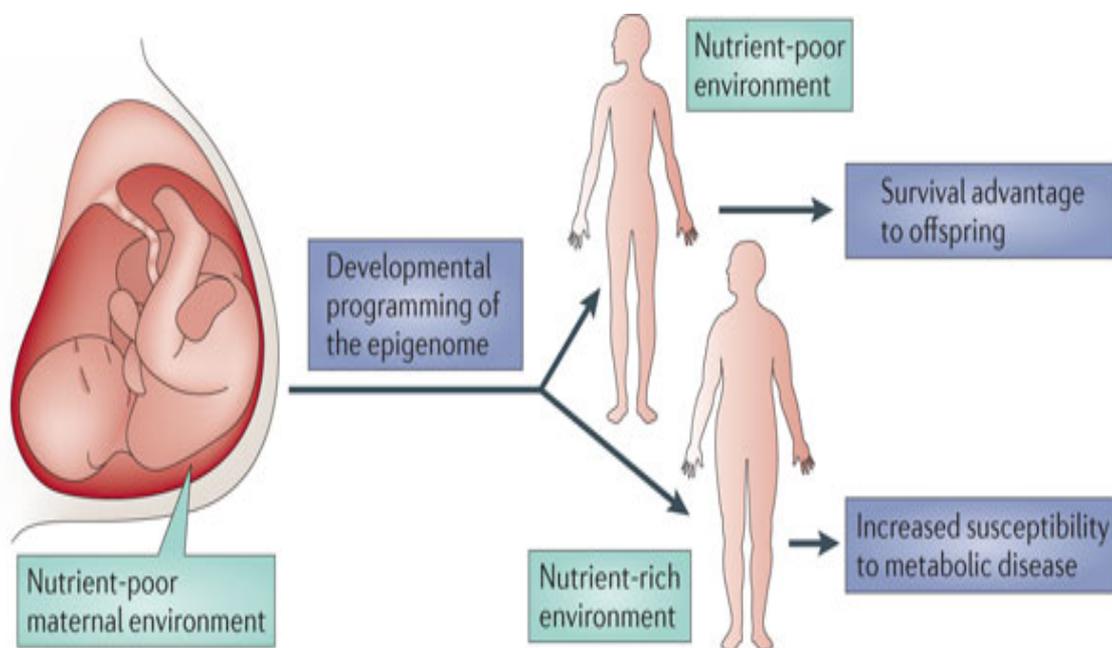


Figure 17: L'hypothèse du phénotype économe. Un environnement materno-fœtal pauvre peut entraîner un risque de pathologies métaboliques à l'âge adulte si l'environnement nutritionnel est enrichi. D'après (Walker et al, 2012)

Ce concept de phénotype économe a été étayé par l'étude d'une population de juifs éthiopiens (Falasha) ayant migré de la région de Gondar en Ethiopie vers Israël dans les années 1980. Cette migration s'est accompagnée d'une transition alimentaire, illustrée par le passage d'une nourriture basée sur les céréales vers un régime de type occidental riche en calories, graisses et sucres raffinés. Cette population présentait une prévalence de diabète de 18%, soit 30 fois plus que la population éthiopienne d'origine du fait du mismatch (de l'inadéquation) entre l'environnement in utero et l'environnement post-natal (Cohen et al, 1988). En cohérence

avec ces études, le rattrapage de croissance (ou catch up growth), appliqué aux nouveau-nés avec un retard de croissance intra-utérin (RCIU) dans le but de leur faire atteindre rapidement un poids normal, est associé à un risque plus important de développer des maladies cardiovasculaires, un syndrome métabolique à l'âge adulte et révèle le mismatch entre l'environnement in utero et post natal (Berends et al, 2013; Eriksson et al, 1999; Leon et al, 1996). Ces données ont donc des implications cliniques importantes dans la prise en charge des enfants nés avec un RCIU mais également d'enfants prématurés. Le RCIU constitue un exemple probant pour l'étude de l'hypothèse du DOHaD.

2. LE RETARD DE CROISSANCE INTRA-UTERIN ET L'ORIGINE FŒTALE DES MALADIES DE L'ADULTE

2.1. Aspects cliniques, épidémiologiques et expérimentaux du RCIU

2.1.1. Définition

Le RCIU se définit comme une altération de la croissance fœtale secondaire à un processus pathologique *in utero* qui empêche le fœtus d'atteindre son potentiel de croissance dicté par son programme génétique (Mandrizzato et al, 2008). Cette altération de la croissance fœtale aboutit à un nouveau-né ayant un faible poids de naissance, inférieur au 10^{ème} percentile (RCIU modéré) ou au 3^{ème} percentile (RCIU sévère), déterminé en fonction des courbes morpho-métriques de références. Des données récentes estiment la prévalence globale du RCIU dans les pays en voie de développement à 24,1% des naissances contre 5 à 10% dans les pays développés (Katz et al, 2013). En France, selon les données de l'enquête nationale périnatale française de 2010, la fréquence de RCIU était de 8,9 % sur l'ensemble des naissances vivantes (Blondel et al, 2012).

En néonatalogie, il n'existe pas de réel consensus concernant les notions de petit poids pour l'âge gestationnel (PGA ou en anglais, Small for Gestational Age, SGA) et de RCIU (en anglais, fetal growth restriction ou Intra-Uterine Growth Retardation, IUGR). L'appellation PGA désigne des enfants se caractérisant par un poids inférieur au 10^{ème} percentile d'une courbe de croissance de référence, qu'elle que soit l'origine de ce faible poids. Le RCIU quant à lui, prend obligatoirement en compte la présence de processus pathologiques à l'origine de la restriction de croissance constatée à partir de mesures morphométriques illustrant un ralentissement de la croissance fœtale ou une déviation longitudinale de sa trajectoire (entre 2 mesures espacées de trois semaines)(CNGOF 2013) (RCOG 2014).

Cette distinction faite entre ces deux notions semble importante du fait de la présence d'une morbidité et d'une mortalité périnatale plus importante dans le cadre du RCIU en comparaison à la population de fœtus PAG (Lausman et al, 2012). Au-delà de ces terminologies débattues ci-dessus, coexiste la notion plus consensuelle de faible poids de naissance (low birth weight) correspondant aux enfants avec un poids de naissance inférieur à 2500g indépendamment du choix d'une courbe de référence ou de l'âge gestationnel.

2.1.2. Facteurs de risques

L'étiologie du RCIU est multifactorielle (**Tableau 7**). Elle comprend des facteurs maternels, fœtaux ou placentaires aboutissants quelle que soit leur nature, à une insuffisance placentaire à l'origine d'une réduction chronique des apports en oxygène et en nutriments. Des apports nutritionnels inadéquats de la mère constituent la première cause de RCIU dans les pays en développement (Mandrizzato et al, 2008). Dans les pays développés où près de 20 % des femmes continuent de fumer au cours de leur grossesse, le tabagisme y compris passif est la première cause évitable de prématurité et de RCIU. Il augmente de 1,5 à 2,9 fois le risque de donner naissance à un enfant de petit poids (Cnattingius 2004; Goel et al, 2004; Leonardi-Bee et al, 2008). Certaines maladies maternelles chroniques telles que l'hypertension artérielle chronique, la pré-éclampsie ou le diabète pré-gestationnel figurent parmi l'étiologie du RCIU (Easterling et al, 1991; Xiao et al, 2003; Zetterstrom et al, 2006). La vasoconstriction caractéristique de ces conditions, réduit la circulation sanguine foeto-placentaire et les apports de micronutriments et d'oxygène entraînant ainsi un RCIU (Xiao et al, 2003). La présence d'infections congénitales a des effets délétères sur la croissance fœtale : les infections congénitales sont impliquées dans environ 5 à 15% des RCIU (Ergaz et al, 2005; Longo et al, 2014). Les causes placentaires comprennent essentiellement des malformations structurelles du placenta.

Facteurs de risques maternels, fœtaux et placentaires pour la survenue de RCIU

Facteurs maternels

- Insuffisance pondérale
- Faible prise de poids au court de la gestation
- Obésité
- Niveau socio-économique défavorisé
- Age <20 ou >35 ans
- Antécédents de PAG/RCIU
- Tabagisme, alcoolisme
- Hypertension
- Lieux de résidence (haute altitude)

Facteurs fœtaux

- Infections congénitales
- Aneuploïdies
- Mosaïcisme
- Aberrations chromosomiques fœtales (10 à 15%)
- Grossesses multiples

Facteurs placentaires

- Insuffisance vasculaire utéro-placentaire
- Pré-éclampsie et éclampsie
- Défaut de placentation
- Défaut d'invasion trophoblastique
- Anomalies du cordon
- Placenta circumvallate, placenta accrete, Infarctus du placenta

RCIU idiopathique : 20 à 30 %

Tableau 7 : Liste non exhaustive des facteurs de risque de survenue d'un RCIU.

2.1.3. Conséquences néonatales et à court terme du RCIU

Le RCIU augmente de façon significative le risque d'avoir besoin d'une intubation à la naissance, le risque de convulsions et de sepsis durant les premiers jours de vie (McIntire et al, 1999). De même, l'enfant né avec un RCIU demeure plus susceptible à l'intolérance alimentaire et à l'entéocolite nécrosante par rapport à la population générale (Bernstein et al, 2000; March et al, 2014). En cause, une immaturité du tube digestif qui s'illustre dès les premiers jours de vie par une diminution de la longueur du tractus intestinal, une altération des villosités et de la taille du foie (Longo et al, 2013). Le RCIU expose aussi à des dysfonctions métaboliques durant la période néonatale et notamment à l'hypoglycémie et l'hypocalcémie. Ces dysfonctions s'expliquent par des réserves appauvries en glycogène (source prédominante de glucose dans les premières heures de vie), par des stocks de graisse réduits associés à une oxydation des acides gras dysfonctionnelle (Longo et al, 2013). L'ensemble de ces facteurs de susceptibilité concourt à une augmentation de la mortalité et de la morbidité des enfants RCIU. Ces enfants présentent un risque de mortalité périnatale 4 à 10

fois plus élevé par rapport à la population générale (McIntire et al, 1999). 52% de la mortalité globale constatée est associée à un RCIU (Garite et al, 2004) (Froen et al, 2004; McIntire et al, 1999).

2.1.4. Conséquences à long terme du RCIU : mécanismes de la programmation métabolique

En plus de sa forte incidence sur la morbidité et la mortalité néonatale, le RCIU entraîne des conséquences sur la santé de l'individu à l'âge adulte. Comme mentionné en début de chapitre, les études épidémiologiques originelles de Barker et les nombreuses autres qui ont suivi, ont largement démontré que le RCIU est associé à un risque accru de développer des maladies métaboliques, coronariennes, une hypertension artérielle et un diabète de type 2 (DT2) (**Tableau 8**).

Etudes	Nombre de patients	Pays	Pathologies associées à l'âge adulte
(Barker et al, 1989b)	5654 (M)	R-U	Mort de maladies coronariennes
(Barker et al, 1989a)	3529 (F+M)	R-U	Mort de maladies cardiovasculaires
(Hales et al, 1991)	468 (M)	R-U	DT2, hypertension
(Phipps et al, 1993)	140 (M)	R-U	DT2
(Osmond et al, 1993)	15726(F+M)	R-U	Maladies cardiovasculaires
(Curhan et al, 1996a)	22846 (M)	USA	Obésité, DT2, hypertension
(Curhan et al, 1996b)	71100 (F)	USA	Obésité, DT2, hypertension
(Rich-Edwards et al, 1997)	121700 (F)	USA	Maladies cardiovasculaires
(Carlsson et al, 1999)	2237 (M)	Suède	DT2, intolérance au glucose
(de Rooij et al, 2006)	94 (F+M)	Pays -bas	Résistance à l'insuline, intolérance au glucose
(Silveira et al, 2008)	Meta-analyse		Syndrome métabolique
(White et al, 2009)	Meta-analyse		Maladie rénale chronique
(Xiao et al, 2010)	2019 (M+F)	Chine	Syndrome métabolique
(Meas et al, 2010)	1308 (M+F)	France	Syndrome métabolique, insulino-résistance

Tableau 8 : Etudes épidémiologiques mettant en évidence une corrélation entre le poids de naissance et des maladies chroniques à l'âge adulte (liste non exhaustive).

S'inscrivant dans l'hypothèse du DOHaD, les études expérimentales soutiennent que le RCIU instaurerait une programmation fœtale métabolique de nombreux organes impliqués dans le métabolisme énergétique tels que le foie, les cellules β du pancréas ou encore le tissu adipeux. Cette programmation serait sous-tendue par un ensemble des modifications épigénétiques (méthylations, acétylations de l'ADN, modifications des histones) au cours du

développement, transmissibles au cours des divisions cellulaires, qui altèrent l'expression de gènes jouant un rôle crucial dans la différenciation et la plasticité de nombreux tissus. Au cours des dernières années, des données expérimentales chez l'animal ont permis de mettre en évidence comment ces modifications épigénétiques vont, sous l'influence de changements nutritionnels, entraîner des altérations de l'homéostasie énergétique. A l'inverse, peu d'études réalisées chez l'homme ont permis de mettre en lumière les mécanismes à l'origine de cette programmation fœtale.

3. EVIDENCE DE MECANISMES EPIGENETIQUES DANS LE CADRE DE LA PROGRAMMATION FŒTALE

3.1. Apports des modèles expérimentaux de RCIU

3.1.1. RCIU et rein

Le RCIU augmente le risque d'insuffisance rénale et d'hypertension à l'âge adulte. Une perturbation de la néphrogénèse et une diminution du nombre de néphrons sont mises en évidence dans de nombreux modèles animaux (Mitchell et al, 2004; Vehaskari et al, 2001; Woods et al, 2001). La diminution du nombre de néphrons et les dysfonctions endothéliales induites par le RCIU sont notamment associées à une diminution de l'expression de la cyclooxygenase-2 et de la 11 β -hydroxystéroïde dehydrogenase-2 (11 β HD2) (Baserga et al, 2007; Baserga et al, 2010; Bertram et al, 2001). Des modifications du profil de méthylation de l'ADN et une diminution de la triméthylation d'H3K36 ont été mises en évidence dans le promoteur du gène codant pour la 11 β HD2 (Baserga et al, 2010). Une hypométhylation du gène codant pour la protéine P53 associée à une diminution des activités Dnmt1 est aussi décrite. Ces modifications épigénétiques conduisent à l'augmentation de l'expression de p53 à l'origine de l'apoptose des cellules rénales et de la diminution du nombre de néphrons (Pham et al, 2003). Bogdarina et ses collaborateurs indiquent une hypométhylation du gène codant pour le récepteur à l'angiotensine II (Agtr1b) dans la glande surrénale ce qui contribue à l'augmentation de son expression et à une réponse altérée à la pression artérielle chez le rat RCIU à l'âge adulte (Bogdarina et al, 2007).

3.1.2. RCIU et foie

Le RCIU induit au niveau du foie une diminution de la phosphorylation oxydative ainsi que de la production d'ATP (Ogata et al, 1990; Peterside et al, 2003). Une augmentation de l'expression du transporteur du glucose GLUT1 est aussi mise en évidence (Lane et al, 2001). Ces altérations fonctionnelles sont associées à des modifications épigénétiques qui perturbent l'expression de gènes clés impliqués dans le métabolisme des glucides et des lipides. Ainsi, Van Straten et ses collaborateurs soulignent la modification des profils de méthylation de l'ADN dans près de 200 régions promotrices de gènes en réponse au RCIU. Parmi ces gènes figure le gène codant pour LXR α (Liver X receptor α), un facteur de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie lipidique du foie (van Straten et al, 2010). Dans un modèle de RCIU induit par restriction protéique maternelle, les dysfonctions hépatiques sont associées à une hypométhylation du promoteur des gènes codants pour le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et pour celui du peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) (Lillicrop et al, 2005; Lillicrop et al, 2007). Ces diminutions de la méthylation de l'ADN sont associées à une diminution de l'activité DNMT1 et à l'augmentation de l'expression de ces gènes (Lillicrop et al, 2007). Le RCIU s'accompagne aussi de modifications post-traductionnelles des histones. Dans la région promotrice du gène codant pour le récepteur aux glucocorticoïdes, ces modifications concourent à son activation transcriptionnelle (Lillicrop et al, 2007). Une augmentation de l'acétylation d'H3K9, H3K14 et d'H3K18 concomitante à une diminution de l'expression de l'HDAC1 et de son activité, ont aussi été mises en évidence chez le rat RCIU (Fu et al, 2004). Ces perturbations épigénétiques modifient au long terme, l'expression du gène codant pour PPAR- γ coactivator (PGC-1) et pour la Carnitine-Palmitoyl Transférase I (CPTI). Ces protéines jouent un rôle crucial, respectivement dans la production de glucose hépatique et dans le transport des acides gras dans la mitochondrie (Fu et al, 2004). L'insulin-like growth factor-1 hépatique (IGF-1) est un facteur qui module la croissance et la sensibilité à l'insuline. Le RCIU s'accompagne d'une diminution de l'expression et les concentrations plasmatiques de l'IGF-1. La répression du gène codant pour l'IGF-1 est associée à des modifications de la méthylation et de l'acétylation des histones le long de ses régions promotrices (Fu et al, 2009).

3.1.3. RCIU et muscle

Chez le rat, le RCIU entraîne au niveau du muscle squelettique une réduction de la synthèse mitochondriale d'ATP consécutive à des dysfonctions de la phosphorylation oxydative. Ces perturbations diminuent la synthèse du glycogène, le transport du glucose et l'expression de son transporteur GLUT4 (Selak et al, 2003). Cette diminution de l'expression de GLUT4 est associée à une perte d'acétylation de l'H3K14 et à une augmentation de la diméthylation de l'H3K9 au niveau du promoteur de ce gène (Raychaudhuri et al, 2008). De façon intéressante, une diminution de l'expression de GLUT4 est aussi reportée chez l'homme et contribuerait à l'installation d'une insulino-résistance et d'un DT2 à l'âge adulte chez le sujet né avec un RCIU (Jaquet et al, 2001; Ozanne et al, 2005). Chez le rat RCIU, une diminution de l'expression de PGC-1 α est également mise en évidence et est associée à une hyperméthylation de la séquence promotrice de ce gène (Zeng et al, 2013).

3.1.4. RCIU et pancréas

Plusieurs études ont montré qu'un RCIU diminue la taille et la vascularisation du pancréas, réduit la prolifération des cellules β chez la progéniture et augmente leur apoptose (Berney et al, 1997; Petrik et al, 1999; Simmons et al, 2001). Ces perturbations phénotypiques s'accompagnent de modifications épigénétiques de gènes clés régulant le développement des cellules β . PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox 1) est un facteur de transcription nécessaire au développement précoce du pancréas ainsi qu'à la maturation et à la différenciation des cellules β . Chez les rats RCIU, la diminution de l'expression de PDX-1 est observée dès la naissance et persiste au cours de la vie. Cette diminution de l'expression de ce gène proviendrait en premier lieu, de modifications épigénétiques des histones au niveau de sa région promotrice. En particulier, une méthylation de l'histone H3K4, une perte d'acétylation de H3 et H4 et une diminution de la fixation du facteur de transcription USF1 ont été identifiées au niveau du gène codant pour PDX-1 dès la naissance (Park et al, 2008). Plus tardivement, ces modifications du code histone permettraient le recrutement progressif de complexes répresseurs qui induisent la méthylation du promoteur de ce gène et contribuent d'avantage à sa répression (Park et al, 2008). Thompson et ses collaborateurs mettent en évidence des modifications de profils de méthylation dans près de 1400 loci en réponse au RCIU. Ces modifications interviennent préférentiellement aux abords de gènes impliqués dans l'apoptose, la différenciation de cellules β , la vascularisation du pancréas et la sécrétion d'insuline (Thompson et al, 2010).

3.2. Evidence chez l'homme

Indubitablement, de nombreux modèles de perturbations nutritionnelles durant la période néonatale mettent en lumière les mécanismes épigénétiques à l'origine de la programmation métabolique. Cependant, chez l'homme peu d'études ont permis à ce jour, de mettre en lumière des modifications épigénétiques pérennes en réponse à des perturbations nutritionnelles. Tobi et ses collaborateurs indiquent des différences de méthylation de promoteur de gènes soumis à l'empreinte chez des patients ayant subi la famine hollandaise durant leur vie in utero (Heijmans et al, 2008; Tobi et al, 2009; Tobi et al, 2015).

4. RCIU ET LA BARRIERE EPITHELIALE COLIQUE

4.1. Etudes épidémiologiques

L'impact du faible poids de naissance sur le risque de pathologies métaboliques reste très largement documenté dans la littérature scientifique. A l'inverse, très peu d'études épidémiologiques se sont intéressées à l'impact du poids de naissance sur le risque de pathologies coliques (**Tableau 9**). L'une des premières observations faites en 1993 indique la diminution de la taille du tube digestif chez le fœtus humain atteint d'un RCIU. Cette diminution serait associée à une diminution des capacités digestives ainsi qu'à une immaturité fonctionnelle de l'appareil digestif. Ceci constituerait un élément explicatif d'une plus grande prédisposition des RCIU à l'intolérance alimentaire et à l'entérocologie nécrosante (Shanklin et al, 1993). En 2002, une étude met en évidence une corrélation entre le faible poids à la naissance et le risque de CCR à l'âge adulte (Sandhu et al, 2002). Une autre étude suggère le rôle protecteur d'une restriction des apports énergétiques durant l'enfance et l'adolescence dans le risque de CCR (Hughes et al, 2010). Nilsen et ses collaborateurs mettent en évidence en 2005, une association entre la taille à la naissance et le risque de CCR à l'âge adulte et ce, uniquement chez les hommes (Nilsen et al, 2005). A l'encontre de ces résultats, Cnattingius et ses collaborateurs n'indiquent aucune association entre poids à la naissance et risque de CCR (Cnattingius et al, 2009). L'étude de la cohorte française E3N indique quant à elle une association entre le grand poids à la naissance et le risque d'adénome du colon gauche mais pas d'association avec le faible poids de naissance. En 2013, dans son étude portant sur la cohorte de naissance d'Helsinki (1924-1944), Barker et ses collaborateurs ne mettent en évidence aucune corrélation entre le faible poids à la naissance et la susceptibilité au CCR. Etonnamment, une association entre la forme du placenta (surface placentaire ovale) et la

susceptibilité au CCR est mise en évidence (Barker et al, 2013). Une seule étude épidémiologique réalisée sur une cohorte de jumeaux en Norvège a établi une association entre le RCIU et le développement ultérieur d'un syndrome de l'intestin irritable (Bengtson et al, 2006). Aucune association n'a été identifiée entre le poids de naissance et le risque de RCH ou de MC au cours d'une étude sur une cohorte de femmes américaines (Khalili et al, 2013).

Retard de croissance	Risque de CCR	Risque de MICI	Risque de SII	Références
Intra-utérin	↑	Nd	nd	(Sandhu et al, 2002)
Intra-utérin	↑ (chez les hommes)	Nd	nd	(Nilsen et al, 2005)
Pendant l'enfance et l'adolescence	↓	Nd	nd	(Hughes et al, 2010)
Intra-utérin	nd	Nd	↑	(Bengtson et al, 2006)
Intra-utérin	=	Nd	nd	(Cnattingius et al, 2009)
Intra-utérin	=	Nd	nd	(Morois et al, 2011)
Intra-utérin	nd	=	nd	(Khalili et al, 2013)
Intra-utérin	=	Nd	nd	(Barker et al, 2013)

Tableau 9: Etudes épidémiologiques sur le risque de pathologies coliques suite à un retard de croissance intra-utérin ou pendant l'enfance.

4.2. Etudes expérimentales

La littérature scientifique portant sur l'impact du RCIU sur l'appareil digestif est essentiellement dominée par des études concernant l'intestin grêle. Les données portant sur l'impact du RCIU sur le tissu colique sont donc très lacunaires.

L'étude de Shrader et Zeman indique une altération de la structure des cryptes et des villosités en réponse à un RCIU induit par restriction protéique du rat. Le tube digestif de ces animaux présente une diminution significative du nombre de villi. Celles-ci sont par ailleurs moins

bien différenciées, plus petites, réparties de façons plus irrégulières. On note, par ailleurs une diminution du nombre de cellules à mucus. Enfin on assiste, essentiellement dans le duodénum, à une diminution de l'activité d'enzymes telles que la phosphatase alcaline intestinale, la phosphatase acide, la glutamyl transpeptidase ou encore la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate H déshydrogénase. Ces observations semblent indiquer une perturbation de l'homéostasie intestinale en réponse au RCIU (Shrader et al, 1969). Baserga et ses collaborateurs mettent en évidence une diminution de la taille de l'intestin grêle et du nombre de cellules par crypte dans un modèle de RCIU induit par ligature de l'artère utérine chez la rate gestante. En association avec ces changements, ils mettent en évidence une altération de l'expression de facteurs impliqués dans l'apoptose tissulaire. L'expression de Bcl-2 est diminuée dans l'intestin grêle des animaux RCIU et on dénote une augmentation de l'expression de Bax et p53 au niveau transcriptomique et protéique, ainsi qu'une augmentation de l'activité de la caspase-3 (Baserga et al, 2004). Dans un modèle de RCIU induit par restriction protéique durant la gestation, il a été démontré une augmentation de l'activité lactase ainsi qu'une diminution des activités maltase et sucrase (Weaver et al, 1998). En 2005, dans le cadre d'un modèle de RCIU obtenu par restriction calorique chez le rat, une étude indique une diminution de la taille et du poids de l'intestin grêle de rats RCIU et une augmentation des activités lactase et maltase allant de nouveau dans le sens d'une immaturité de l'appareil digestif (Qiu et al, 2005). Zhong et al, réaffirment les altérations de l'intestin grêle chez les porcs RCIU et indiquent une diminution de la hauteur des villosités (Zhong et al, 2010). Ils mettent également en évidence, au niveau du jéjunum des porcs RCIU, une augmentation de l'expression de la protéine de choc thermique HSP70, une chaperonne impliquée dans la réponse aux protéines mal repliées. Étonnamment, une diminution de l'expression de cette protéine est identifiée au niveau de l'iléon (Zhong et al, 2010). De même, Michiels et ses collaborateurs confirment une diminution du poids et de la longueur de l'intestin grêle chez des porcs RCIU. Ils mettent en évidence une augmentation des concentrations caecales en propionate et acétate ainsi que du pH laissant supposer une modification de la composition bactérienne chez ces animaux. On dénote en outre, une diminution de la capacité antioxydante plasmatique suggérant une réponse altérée face au stress oxydant (Michiels et al, 2013). Récemment, notre équipe a montré que la réponse de l'intestin grêle de rats RCIU adultes à un régime hyperlipidique (HF) était altérée (Lalles et al, 2012). Ainsi, contrairement aux rats contrôles, l'expression et l'activité de la phosphatase alcaline intestinale (IAP), une enzyme impliquée dans la détoxification du LPS et le contrôle de l'inflammation, ne sont pas induites chez les rats RCIU en réponse au régime HF. A

l'inverse, l'amino-peptidase N, une enzyme intervenant dans l'absorption du cholestérol, est augmentée chez les rats RCIU avec un régime HF (Lalles et al, 2012). Les rares études menées sur le côlon mettent en évidence que le RCIU induit une diminution de la longueur et du poids du côlon ainsi que du nombre de cellules caliciformes (Shrader et al, 1969; Wang et al, 2005; Xu et al, 1994). En 2009, dans notre laboratoire, Pascale Faça-Berthon a mis en évidence des altérations de la barrière colique chez des rats RCIU avec une réduction de la profondeur des cryptes et une augmentation du nombre de cryptes en division. De plus, l'expression de la mucine muc2 et l'expression de la mucine muc4 étaient également plus faibles dans le côlon des rats RCIU à l'âge adulte (Fanca-Berthon et al, 2009).

5. PLACE DU STRESS DU RE DANS L'ETIOLOGIE DU RCIU

Le stress ER a récemment été identifié comme faisant partie de l'étiologie du RCIU. Un environnement in utero délétère du fait notamment d'une hypoxie ou de la malnutrition induirait une réponse adaptative du tissu placentaire reposant sur un arrêt de la synthèse protéique et un stress du RE. Un stress du RE a été identifié dans des placentas issus de patientes ayant un RCIU ou un RCIU compliqué d'une pré-éclampsie (Mizuuchi et al, 2016; Yung et al, 2008; Yung et al, 2012b; Yung et al, 2012a). Ce stress s'accompagne de l'inhibition de la synthèse protéique par augmentation de la phosphorylation d'EIF2 α et la diminution de l'expression de kinases de la voie AKT/mTOR (Yung et al, 2008). On note en outre une diminution du facteur pro-angiogénique PlGF médiée par les voies ATF6 et ATF4 (Mizuuchi et al, 2016). Au cours des grossesses en altitude, où la pression partielle d'oxygène réduite, s'accompagne d'une diminution de la croissance fœtale, un stress du RE et une inhibition de la synthèse protéique ont été mis en évidence dans le tissu placentaire (Yung et al, 2012a). Chez la souris, l'induction d'un stress du RE par administration de tunicamycine chez la souris gestante s'accompagne de dysfonctions placentaires. Le placenta présente un stress RE, une taille et un poids réduits ainsi que des altérations de la vascularisation (Kawakami et al, 2014). L'expression des transporteurs placentaires du glucose Glut1 et Glut3 est altérée et est à l'origine de dysfonctions du transport fœto-placentaire du glucose. On note en outre une diminution de l'expression de facteurs pro-angiogéniques ou pro-vasculogéniques tel que VEGF, flit-1 et flik-1, et une augmentation du facteur induit par l'hypoxie : HIF-1 α . Ce stress du RE est associé à une diminution dose-dépendante du poids de naissance et du contenu en glycogène du foie de ces fœtus RCIU (Kawakami et al, 2014).

L'ensemble des modifications contribue à un mauvais développement du tissu placentaire, à une insuffisance placentaire et consécutivement, à une altération de la croissance fœtale. Il semblerait que ce stress RE puisse aussi persister chez le fœtus en développement mais aussi à l'âge adulte. Dans un modèle de restriction protéique maternelle induit chez le rat, le foie des embryons RCIU présente dès E19 une élévation de l'expression de GRP78 et GRP94 semblant indiquer un stress du RE (Sohi et al, 2013). A l'âge adulte, ce stress du RE persiste et s'illustre par l'augmentation de l'expression d'XBP1, de GRP78 et de GRP94. On retrouve par ailleurs une inhibition de la synthèse protéique consécutive à la phosphorylation d'EIF2 α (Sohi et al, 2013).

6. RCIU : MODELES ANIMAUX

L'environnement nutritionnel fœto-placentaire constitue le facteur limitant le plus important qui conditionne la croissance fœtale. En ce sens de nombreux modèles de RCIU sont basés sur une perturbation de l'environnement nutritionnel chez la femelle gestante. Devant la multitude de modèles de RCIU, nous nous cantonnerons aux seuls modèles nutritionnels et chirurgicaux.

6.1. Les modèles expérimentaux de RCIU

Les modèles de ligatures unilatérales ou bilatérales des artères utérines font partie des modèles les plus pertinents et les mieux caractérisés en ce qui concerne l'étude du RCIU (Janot et al, 2014). Mis en place dès 1964 par Wigglesworth et ses collaborateurs (Wigglesworth 1974), le modèle se base sur la ligature des arcades artérielles utérines au 17^{ème} jour de gestation maintenue jusqu'à la fin de celle-ci. Cette intervention induit une hypoperfusion utéro-placentaire durable, et par extension une diminution notable des apports en nutriments et oxygène au fœtus à l'origine du RCIU constatée dans le cadre de ce modèle. Les rats issus de ce modèle présentent à l'âge adulte obésité, intolérance au glucose, et altérations hépatiques (Simmons et al, 2001).

6.2. Modèles nutritionnels

6.2.1. Restriction calorique

Le modèle de restriction alimentaire globale découle des travaux de Woodall et de ses collaborateurs. Une restriction alimentaire de 70% de l'apport ad libitum chez des rates durant

toute la période de gestation entraîne un RCIU sévère (Woodall et al, 1996). À l'âge adulte, les animaux RCIU présentent une pression artérielle plus élevée ainsi qu'une augmentation de l'insuline plasmatique par rapport aux témoins. Les travaux de Garafano et al. ont permis de mieux préciser la notion de fenêtre critique et de fenêtre d'exposition. C'est ainsi qu'une restriction alimentaire de 50 % appliquée durant la phase de gestation E7-E14 n'affecte pas le poids de la descendance. A contrario, l'application de cette restriction durant les phases de gestation E15-E21 ou E7-E21 réduit de façon significative le poids à la naissance, 15 % et 20% respectivement, en comparaison à la population contrôle (Garofano et al, 1998).

6.2.2. Restriction protidique

Le modèle de restriction nutritionnelle en protéines chez la femelle gestante constitue l'un des modèles de perturbations nutritionnelles néonatales le plus robuste et le plus étudié dans la littérature (Langley-Evans 2009). Il existe de fortes similitudes entre les symptômes induits par ce modèle de RCIU et le syndrome métabolique et le diabète de type 2 chez l'humain (**Tableau 10**). Dans le cadre de ce modèle initialement décrit par Snoek en 1990, des rates gestantes sont nourries par un régime alimentaire hypoprotidique et isocalorique (4% ou 8% contre 20% pour les contrôles) pendant la gestation et/ou la lactation. (Snoeck et al, 1990). Cette restriction des apports protéiques entraîne un RCIU dont la sévérité dépend de l'importance de la restriction. Les rats vont à l'âge adulte, développer une hypertension, des altérations de la physiologie du pancréas (diminution de la prolifération des cellules β -pancréatiques et de la taille des îlots de Langerhans) associées à une insulino-résistance, une intolérance au glucose et une résistance hépatique à l'insuline. Les animaux RCIU issus de ce modèle présentent un syndrome métabolique retrouvé chez l'humain (Ozanne 2001).

Caractéristique phénotypique	Faible poids à la naissance Faible masse musculaire Vieillessement accéléré
Caractéristique physiologique	Diabète Insuline résistance / intolérance au glucose Hypertension Dyslipidémie
Caractéristique au niveau tissulaire	Réduction de la prolifération des cellules β et de la taille des îlots Insulino-résistance adipocytaire

Tableau 10 : Symptomatologie retrouvée dans le cadre d'un retard de croissance intra-utérin induit par restriction protidique maternelle chez le rat. (Adapté à partir de (Ozanne 2001))

6.2.3. Déficit en fer

La carence en fer est la carence alimentaire la plus répandue dans le monde et est retrouvée dans près de 50 % des grossesses. Des données indiquent une corrélation entre une carence en fer et le risque d'accouchement prématuré ou de faible poids à la naissance. (Scholl et al, 1994). De même, la ferritinémie maternelle programmerait au développement de maladie à l'âge adulte. Tant chez le rat (Gambling et al, 2004; Shepard et al, 1980) que chez la souris (Hubbard et al, 2013), une anémie ferriprive induite 4 semaines avant l'accouplement et pendant la gestation entraîne une restriction de la croissance fœtale, une diminution de la viabilité des fœtus et un sex-ratio caractérisé par une prédominance de femelles.

D'autres modèles de RCIU existent notamment, des modèles génétiques basés sur des animaux KO pour les gènes codant pour eNOS (Dilworth et al, 2012; Hefler et al, 2001; Kusinski et al, 2012), IGF I et II (Liu et al, 1993; Reid et al, 2002 ; DeChiara, 1990) ou d'autres basés sur des substances pharmacologiques (Benediktsson et al, 1993; Diaz et al, 2005; Lecarpentier et al, 2012; Neerhof et al, 2011; O'Regan et al, 2004; Tarrade et al, 2014).

PARTIE II
RESULTATS EXPERIMENTAUX

OBJECTIFS

Les données bibliographiques qui ont été brièvement décrites, mettent en évidence l'importance des régulations épigénétiques dans les réponses adaptatives des cellules et des tissus à leur environnement. Ces mécanismes permettent une reprogrammation de l'expression du génome et *in fine*, du métabolisme cellulaire permettant la survie de l'organisme à court terme. Il est maintenant connu qu'une nutrition foetale altérée induit des modifications épigénétiques de l'expression de gènes jouant un rôle clé dans la différenciation et la plasticité tissulaire au cours du développement. Ces modifications altèrent la structure et le fonctionnement d'organes impliqués dans le métabolisme comme le foie, le pancréas ou le tissu adipeux et augmentent le risque de pathologies chroniques à l'âge adulte. L'hypothèse d'une programmation métabolique de l'épithélium intestinal été émise par Waterland (2007). Cependant, l'impact de cette programmation métabolique au niveau du côlon n'a pas été étudié de façon approfondie. Les données disponibles sont en effet peu nombreuses et contradictoires. Pourtant, l'épithélium intestinal pourrait être une cible potentielle de la programmation métabolique foetale. L'épithélium intestinal se renouvelle rapidement tout au long de la vie à partir de cellules souches multipotentes dont la biologie est régulée par des mécanismes épigénétiques. Ces mécanismes permettent d'adapter les cellules aux conditions environnementales délétères. Les cellules souches peuvent ainsi transmettre cette « empreinte épigénétique nutritionnelle » à toutes les cellules constituant l'épithélium au cours de la vie d'un individu.

Notre hypothèse générale est que l'environnement nutritionnel foetal pourrait induire une programmation métabolique au niveau de l'épithélium colique semblable à celle observée dans d'autres tissus. Cette programmation se traduirait par des modifications épigénétiques et métaboliques pouvant affecter la fonction de la barrière épithéliale et favoriser le développement de pathologies coliques.

Afin de vérifier cette hypothèse nous avons fait appel à un modèle de RCIU induit chez la rate gestante et allaitante par une restriction des apports protéiques (**Figure 18**). Les ratons ont un poids de naissance inférieur de 15 à 20 % par rapport à celui des animaux contrôles. Après le sevrage, les ratons RCIU et contrôles sont nourris avec le même régime et sacrifiés à différents âges (cinétique de la naissance jusqu'à 8 mois) (**Figure 19**).

A l'aide de ce modèle nous avons mené 2 études :

L'objectif de notre **première étude** était de vérifier l'hypothèse selon laquelle un retard de croissance induit chez le rat pourrait conduire à une programmation métabolique du colon caractérisée par des modifications métaboliques et épigénétiques. L'objectif était également de déterminer si une telle programmation pourrait altérer la fonction barrière de l'épithélium et augmenter la susceptibilité à une colite et une carcinogénèse expérimentale.

L'objectif de notre **seconde étude** était de mettre en place une stratégie nutritionnelle visant à prévenir les altérations de la barrière épithéliale colique induites par un RCIU dans le cadre de notre modèle de RCIU. Nous faisons l'hypothèse qu'une intervention nutritionnelle basée sur le phénylbutyrate et la glutamine administrée durant la période néonatale pourrait prévenir les altérations de la barrière épithéliale colique induites par le RCIU.

Les données de la littérature scientifique indiquent une régulation du stress du RE via des mécanismes épigénétiques. A l'inverse de ces données, des données bibliographiques récentes bien que préliminaires, suggèrent qu'il puisse exister une régulation de la machinerie épigénétique par le stress du RE et la réponse UPR. Au cours d'une **troisième étude**, nous avons voulu étudier le rôle du stress du RE dans les modifications de la machinerie épigénétique et la perte d'acétylation d'H4K16.

Au cours de ces trois études, des approches protéomiques, transcriptomiques et épigénétiques mais également physiologiques ont été utilisées. Les graphiques ci-dessous présentent les principaux protocoles expérimentaux mis en place pour répondre aux objectifs cités précédemment :

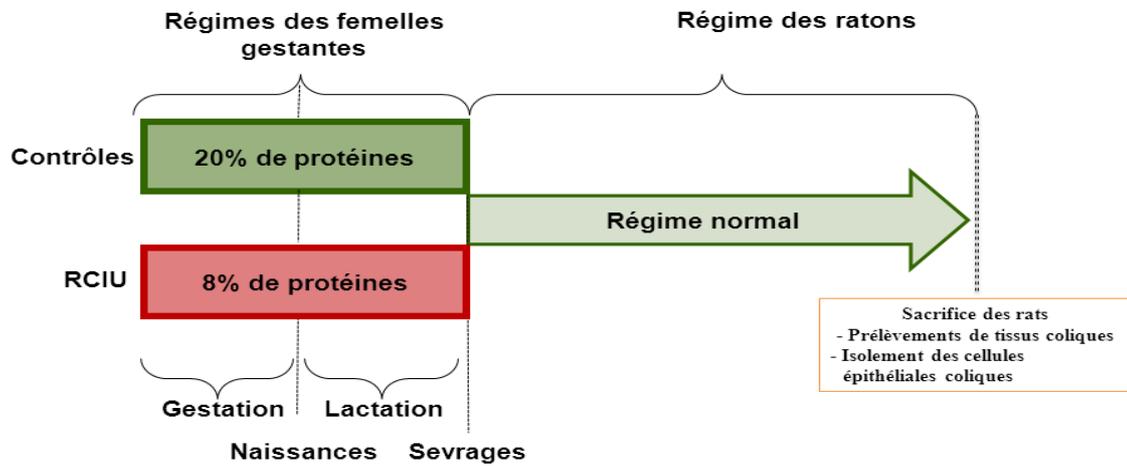


Figure 18: Protocole de RCIU induit chez le rat par dénutrition protéique de rates pendant la gestation et la lactation.

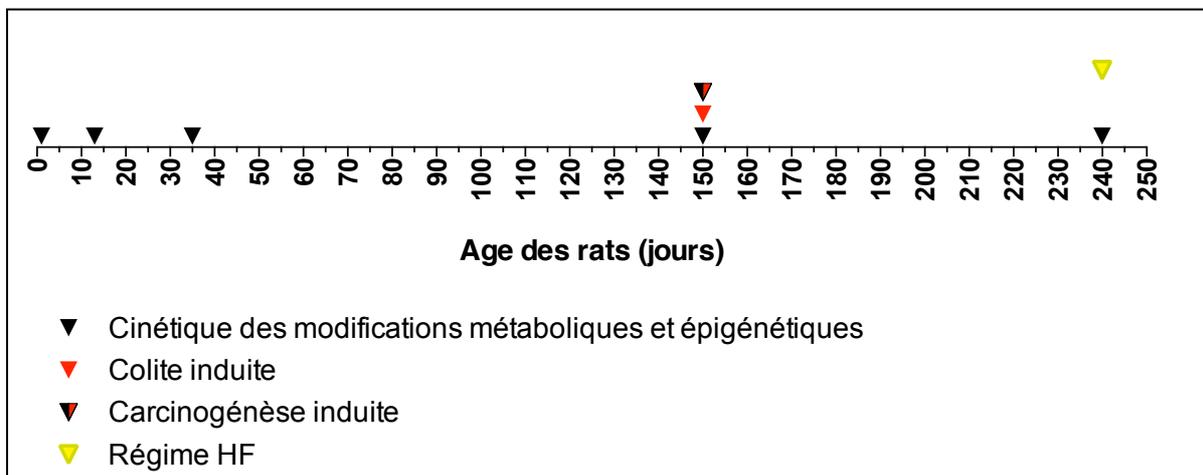


Figure 19: Protocole mis en place chez les ratons RCIU afin de déterminer l'impact du RCIU sur l'épithélium colique.

ARTICLE 1

Les modifications métaboliques et épigénétiques de l'épithélium colique après un retard de croissance intra-utérin augmentent chez le rat le risque de pathologies coliques (*en préparation pour soumission à Gastroenterology*).

Une nutrition foetale altérée, comme dans le cas d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU), peut induire des modifications épigénétiques de l'expression des gènes et du métabolisme dans les organes au cours du développement. Ces modifications altèrent à long terme la structure et la fonction des organes, conduisant à des pathologies à l'âge adulte, comme décrit par l'hypothèse de l'origine développementale des pathologies de l'adulte. L'objectif de cette étude était de déterminer le rôle du contexte nutritionnel foetal sur la barrière épithéliale colique et le risque de pathologies coliques à l'aide d'un modèle de RCIU, obtenu chez le rat par la dénutrition protéique de femelles gestantes. Nous avons constaté que les rats RCIU ont une perte progressive du transport et de l'utilisation du butyrate. Cette altération du métabolisme du butyrate est associée à l'activation des HDAC et à une perte d'acétylation sur la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16) au cours du vieillissement. Cette perte d'acétylation de l'H4K16 a été trouvée dans la région promotrice du transporteur butyrate MCT1. À l'âge adulte, les rats RCIU présentent des altérations de barrière épithéliale colique avec notamment, une diminution du renouvellement cellulaire, une augmentation de la perméabilité et de l'inflammation colique ainsi qu'une diminution des capacités anti oxydantes et une augmentation du stress du réticulum endoplasmique (RE). In vitro, l'induction d'un stress du RE dans les CEC HCT116 stimulait la réponse inflammatoire et induisait une perte d'acétylation de l'H4K16. Enfin, les rats RCIU adultes montrent également une augmentation de la susceptibilité à la colite et à la carcinogenèse expérimentales.

Metabolic and epigenetic modifications in the colonic epithelium following intrauterine growth restriction increase the susceptibility to colonic diseases in rat offspring

Vianney Haure-Mirande^{1,*}, Axel Désir-Vigné^{1,*}, Pierre de Coppet¹, Christian Bonnet¹, Céline Bossard², Gwenola Le Dréan¹, Jean-Pierre Segain¹

¹INRA-Université de Nantes, UMR 1280 PhAN, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif (IMAD), Centre de Recherche en Nutrition Humaine Ouest (CRNHO), F-44093 Nantes, France.

²Pathology Department, University Hospital, CHU-Hôtel Dieu, F-44093 Nantes, France.

*These authors equally contributed to this work

Running title: Fetal programming of colonic diseases

Corresponding author: Jean-Pierre Segain, PhD

Email: jean-pierre.segain@univ-nantes.fr

Mail address: INRA-Université de Nantes, UMR 1280 PhAN, CHU-Hôtel Dieu, F-44093 Nantes, France.

Grants: VHM and ADV are recipients of fellowships from INRA and the SanTDige foundation.

Conflicts of interest: None

Abstract

A poor fetal nutrition, as found during intrauterine growth restriction (IUGR), may induce a metabolic adaptation in developing organs through epigenic modulation of gene expression. This process, known as metabolic programming, can permanently alter the structure and function of organs, leading to chronic diseases in adulthood. The aim of this study was to investigate in a rat model of IUGR, the influence of maternal protein restriction on colonic epithelial barrier homeostasis and the risk of colonic pathologies in offspring at adulthood. We found that colonic epithelial cells (CEC) isolated from IUGR rats had a progressive loss of butyrate utilization that was associated with increased histone deacetylase activities and decreased acetylation of the lysine 16 of histone H4 (H4K16) during aging. Loss of H4K16 acetylation was found in the promoter region of butyrate transporter MCT1 and in LINE sequences. At 120 days of age, IUGR rats displayed alterations of colonic epithelial barrier including decreased cell proliferation and goblet cell number and increased permeability. CEC of IUGR rats exhibited signs of oxidative stress and reduced antioxidant capacity and increased mRNA expression of endoplasmic reticulum stress markers. Finally, 120-day-old IUGR rats showed an increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis and to colitis-associated cancer induced by DSS and azoxymethane. Our data provide evidence that IUGR leads to alterations of the colonic epithelial barrier increasing the risk of colonic disease in adulthood. The loss of H4K16 acetylation could represent an epigenetic mark of colonic epithelial barrier alterations induced by IUGR.

Introduction

The colonic epithelial barrier (CEB) function is crucial to prevent luminal microbes from invading the body and stimulating the mucosal immune system. CEB function includes a physical barrier formed by colonic epithelial cells (CEC) tightly linked to each other by the apical junctional complex and a chemical barrier sustained by production of a mucus layer by goblet cells. CEC are rapidly renewed (3-5 days) from stem cells that proliferate and differentiate into mature cell types that are finally eliminated by apoptosis in the colonic lumen (Radtke and Clevers, 2005). The fast turnover of CEC and the maintenance of CEB integrity represent a large energy demand, which is mainly provided by the short chain fatty acid (SCFA) butyrate (Roediger, 1982; Clausen, 1995).

Butyrate is produced at high levels (mM) in the colonic lumen by bacterial fermentation of dietary fibers. Butyrate is transported into CEC by various transporters, including monocarboxylate transporter 1 (*MCT1* or *SLC16A1*) and sodium-coupled monocarboxylate transporter 1 (*SMCT1* or *SCLC5A8*) and provides ATP to CEC via the mitochondrial β -oxidation and tricarboxylic acid cycle (Roediger, 1982; Clausen, 1995; Thibault, 2010). Situations in which luminal butyrate levels are reduced, including diversion colitis, fiber-free diet and germ-free conditions result in ATP depletion and mucosal atrophy (Harig, 1989; Sakata, 1987; Kripke, 1989; Donohoe, 2011). In such situations, butyrate treatment allowed recovery of the colonic epithelium by stimulating epithelial cell growth (Harig, 1989; Sakata, 1987; Kripke, 1989; Donohoe, 2011). In contrast to its *in vivo* effect, *in vitro* studies have extensively demonstrated that butyrate inhibits cell proliferation and induces differentiation and apoptosis of colon cancer cell lines (Hague, 1993; Heerdt, 1994; Siavoshian, 2000). In addition to these anti-tumor effects, butyrate also modulates inflammation, oxidative stress, and barrier function of the colonic epithelium (Segain, 2000; Hamer, 2008). Several data suggest that impairment of butyrate utilization by CEC may be an important factor in the pathogenesis of colonic diseases, such as colorectal cancer (CRC) and inflammatory bowel disease (IBD) (Thibault, 2010). For example, both butyrate transporters, *MCT1* and *SCLC5A8*, have been found downregulated in CRC and IBD patients (Lambert 2002; Li, 2003; Thibault, 2007). It is suggested that this may decrease intracellular availability of butyrate and thereby its regulatory effects upon CEC (Thibault, 2010).

Apart from its role in energy metabolism, the numerous cellular effects of butyrate may be explained by epigenetic regulation of gene expression in CEC (Mariadason, 2000; Davie, 2003; Donohoe, 2011). Epigenetic events, including DNA methylation and post-

transcriptional regulation of histones, are responsible for cell- and tissue-specific gene expression without altering DNA sequence. Butyrate is a well-known histone deacetylase (HDAC) inhibitor thereby allowing hyperacetylation of histones by histone acetyltransferase (HAT). Histone acetylation plays a key role in modulating chromatin structure and is generally associated with transcriptional activation. On the contrary, desacetylation is associated with transcriptional repression (Davie, 2003, Glozak and Seto, 2007). Thus, induction of histone acetylation at promoter of many genes may explain the pleiotropic effects of butyrate in CEC biology (Mariadason, 2000). In addition to HDAC inhibition, butyrate may also induce histone acetylation by stimulating HAT activity in normal colonocytes. Mitochondrial oxidation of butyrate provides citrate to cytosol that is converted to acetyl-CoA by ATP citrate lyase (ACL). In the nucleus, acetyl-CoA serves as a cofactor for HAT (Donohoe, 2012). This data suggests that modification of butyrate metabolism and/or availability may induce epigenetic reprogramming of gene expression in CEC resulting in alteration of CEB function (Mariadason, 2000; Donohoe, 2012). This is particularly relevant to IBD and CRC that display both metabolic and epigenetic modifications (Holm, 1995; Thibault, 2007; Chiba, 2012; Fraga, 2005). Epidemiological and experimental studies largely support the idea that dietary factors could contribute to metabolic and epigenetic modifications in these diseases (Renz, 2011).

However, the role of nutritional environment during critical periods of development, the fetal and postnatal periods, on colonic epithelium structure and function and on the risk of colonic diseases has been poorly investigated. Epidemiological and experimental studies have brought evidence that an altered nutritional environment during critical windows of developmental plasticity, may induce epigenetic adaptation of gene expression and metabolism in developing organs (Gluckman, 2008; Burdge, 2007). This process, known as a metabolic programming, can permanently alter the structure and function of tissues potentially leading to chronic diseases in adulthood (Gluckman, 2008; Burdge, 2007). These observations support the hypothesis of the developmental origins of health and adult disease (DOHaD) (Barker, 2004). A useful model to explore this hypothesis is the intrauterine growth retardation (IUGR), a frequent complication of pregnancy that may result from uteroplacental insufficiency decreasing nutrient supply. Infants born with IUGR are at increased risk of metabolic diseases, such as obesity, type-2 diabetes, and cardiovascular diseases in adulthood (Barker, 2004). The hypothesis that nutrition during the perinatal period may affect developmental epigenetic in the gut, causing metabolic programming of gastrointestinal

structure and function, was first proposed by Waterland (Waterland, 2006). Supporting this hypothesis, some epidemiological studies have suggested that IUGR may increase the risk of CRC and inflammatory bowel syndrome (IBS) (Nilsen, 2005; Bengtson, 2006). Furthermore, animal studies have reported that IUGR induced long-lasting alterations of intestinal barrier function (França-Berthon, 2009; Lallès, 2012; Le Dréan, 2014; Fung, 2016; Wang, 2016). In the rat model of IUGR induced by maternal protein restriction, we also showed alterations in postnatal maturation of the colonic epithelial barrier and in small intestinal functions (França-Berthon, 2009; Lallès, 2012; Le Dréan, 2014).

In the present study, we hypothesized that IUGR induces metabolic and epigenetic modifications in the colonic epithelium that alter barrier function and increase susceptibility to colonic diseases. We found that colonic epithelial cells (CEC) isolated from IUGR rats have a progressive loss of butyrate utilization during aging. Accordingly, CEC of IUGR rats had increased HDAC activity and reduced histone acetylation. IUGR rats displayed in adulthood, alterations of colonic epithelial barrier and increased markers of oxidative and endoplasmic reticulum stress. Finally, IUGR adult rat showed an increased susceptibility to experimental colitis and to colitis-associated cancer. To our knowledge, these data are the first to describe that IUGR induces a metabolic programming in the colon increasing the risk of colonic disease in adulthood.

Material and methods

Animals and experiments

All experiments were conducted in accordance with the European Union regulations for the care and use of animals for experimental procedures (2010/63/EU). The protocol was approved by the Committee on the Ethics in Animal Experiments of Pays de la Loire, France (Project N° 2012.174). Adult female and male Sprague Dawley rats (Charles River, Lyon, France) were housed individually under standard laboratory conditions.

Intra-uterine growth retardation

IUGR was generated in Sprague Dawley female rats, as previously described (Lallès, 2012). Briefly, pregnant dams were fed either a diet containing 20% protein (control group) or an isocaloric diet containing 8% protein (IUGR group) throughout pregnancy and lactation.

Control and IUGR rat offspring were weaned at 21 days of age and received a standard laboratory chow containing 20% protein (AIN93, Safe, France). The whole colon was collected, longitudinally opened and washed with cold PBS. Colonic epithelium was collected by scraping with glass slides and snap frozen in liquid nitrogen for further RNA and protein isolation. In some experiments on rats of 120 days of age, the whole colon was excised and processed for CEC isolation, RNA and protein extraction and histological and biochemical analysis as described below. Colonic permeability was evaluated on cecum tissue samples mounted in Ussing chambers, as previously described (Le Dréan, 2014).

Colonic epithelial cell (CEC) isolation

Proximal and distal colons were inverted, washed and incubated in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free Hank's buffered salt solution (CMF-HBSS) (Invitrogen) containing 1 mM dithiothreitol (DTT) under gentle agitation at 4°C, for 15 min. This medium was then replaced with CMF-HBSS containing 2 mM EDTA and 2mM EGTA and tissues were incubated under agitation at 4°C for 30 min. After vigorous vortexing for 30 s, the cell suspension was filtered through 100 μm cell strainers (BD Falcon) and cells were then collected by centrifugation at 800 rpm for 5 min. Cells from proximal and distal colon suspended in RPMI medium (Invitrogen), pooled and counted using a Malassez's chamber. Cell aliquots were immediately used for chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays or frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing for RNA isolation and biochemical analysis.

Induction of colitis and recovery experiments

Colitis was induced in adult rats of 120 days of age by addition of dextran sodium sulfate (DSS, MP Biomedicals) to the drinking water at 3.5 % for 5 days followed by 4 days of normal drinking water to allow recovery (McConnel, 2011). Rats were then euthanized and the distal colon was collected and processed for histology and immunohistochemistry as described below. Histological score of inflammation was determined as the sum of scores for epithelial damage and ulceration (score range 0-3), aberrant crypt architecture (0-3), goblet cell depletion (0-2), crypt abscesses (0-1) and inflammatory cell infiltration (0-3). Macrophages infiltrates were detected by immuno-staining tissue sections for the CD68-macrophage marker.

Induction of colitis-related colon carcinogenesis

Colitis-related colon carcinogenesis was induced in adult rats of 120 days of age as described (Tanaka, 2003). Rats were given a single intraperitoneal injection of azoxymethane (AOM, 10 mg/kg bodyweight, Sigma Chemical). Immediately after AOM injection, rats received 2.5% DSS in drinking water for 7 days and then no further treatment for 4 weeks. Rats were then euthanized and proximal and distal colons were collected for evaluation of aberrant crypt foci (ACF), mucin-depleted foci (MDF) and dysplastic lesions. Proximal and distal colon segments were spread flat on a filter paper and fixed in 4 % paraformaldehyde (pFA). Colons were first stained with methylene blue to determine ACF and then with the high-iron diamine-Alcian blue procedure (HID-AB) to evaluate MDF (Caderni, 2003). ACF and MDF were scored under a light microscope (magnification, x40) by 3 investigators unaware of the sample group. Distal colons were then cut lengthwise in 2 equal parts that were rolled and included in paraffin (MicroPICell platform, Nantes University). Tissue sections (5 µm) of the entire segments were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and whole slide images (magnification, x40) were acquired with a NanoZoomer slide scanner (Hamamatsu Photonics). Dysplasia was scored by an experienced pathologist (C.B.) following published recommendations (Boivin, 2003). The area of low- and high-grade dysplastic lesions and total colon area were measured using NDP.view 1.2.47 software (Hamamatsu Photonics) and the percentage of dysplastic areas per total colon was calculated (Shaker, 2010). Images were acquired with x10 objective using an Olympus microscope (BX51) equipped with a digital camera (DP50, Olympus).

Histology and Immunohistochemistry

Colons were opened longitudinally, washed with PBS, "swiss-rolled" and fixed in 4 % paraformaldehyde (pFA). Tissues were paraffin embedded (Leica microsystem) and processed for histology and immunohistochemistry using the Cellular and Tissular Imaging (MicroPICell) core facility of Nantes University. For histologic assessment and goblet cell counting, tissue sections (5 µm) were stained with H&E and periodic acid-Schiff (PAS), respectively, according to standard protocols. Images were acquired with x10 objective using an Olympus microscope (BX51) equipped with a digital camera (DP50, Olympus). Crypt depth and PAS-positive goblet cell number were measured in 10-15 full-size, well-oriented crypts per section. Crypt depth and the percentage of PAS-positive cells per crypt were averaged per animal prior to statistical analysis.

For immunohistochemistry, deparaffinized tissue sections were treated with 3% H₂O₂ and microwave-heated in citrate buffer (pH 6.0) for antigen retrieval. Sections were then blocked with 5% goat serum in PBS followed by incubation with the following primary antibodies: chicken anti-MCT1 (1:200, AB1286-I, Millipore), rabbit anti-active caspase-3 mAb (1:500, #9664, Cell Signaling Technology), mouse anti-PCNA mAb, (1:200, sc-56, Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-rat CD68 mAb (1:100, MCA341GA, BioRad). MCT1 staining was then performed using a biotinylated goat anti-chicken antibody (Vector Laboratories) and the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, CA). Active-caspase-3, PCNA and CD68 were stained using anti-rabbit or anti-mouse, HRP-conjugated antibodies (Nichinei Biosciences, Japan) and the DAB substrate (Vector Laboratories). Images were acquired using an Olympus microscope (BX51) equipped with a DP50 digital camera. The percentages of active-caspase-3- and PCNA-positive cells per crypt were determined in 10-15 full-size, well-oriented crypts per section.

DNA and RNA isolation and Real Time-quantitative Polymerase chain reaction (RT-qPCR)

DNA and Total RNA were co-extracted from isolated CEC or colonic epithelial scrapings using TRIzol reagent® (Invitrogen) and reverse-transcribed using random primers and the SuperScript III reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. RT-qPCR was performed in a Bio-Rad iCycler iQ system using the iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), as previously described (Le Dréan). Rat primer sequences are listed in Supplementary Table 1. Ct values were normalized to the expression level of β -actin and relative gene expression was calculated for each sample using the $\Delta\Delta$ Ct method. Mitochondrial cytochrome b gene levels were normalized to the nuclear gene, GAPDH.

Western Blot Analysis

Proteins were co-extracted with RNA from isolated CEC with TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. Samples were analyzed by Western blot using anti-Histone H4 acetyl (K16) antibody (1:1000; Abcam), anti-Histone H3 acetyl (K27) antibody (1:1000; Abcam), anti-Histone H4 acetyl (K8) antibody (1:1000; Abcam), anti COX IV antibody (Cell Signaling Technology) and a mouse monoclonal anti- β -actin antibody (1:10,000; Sigma). Immunoreactive bands were visualized with DyLight™ 680 and 800-conjugated antibodies

(KPL, Gaithersburg, MD). Band intensities were quantified by infrared scanning densitometry (Odyssey Imaging Systems, LI-COR, Lincoln, NE).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

Freshly isolated CEC (4×10^6) were cross-linked with 1 % pFA for 10 min at room temperature and then lysed with lysis buffer containing [10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS, 5 mM butyrate and protease inhibitors]. Chromatin was then sheared (DNA fragments were centered around 0.5 kilobase pairs) in a Bioruptor sonicator (Diagenode). One-tenth of the sheared chromatin was kept as the input reference. ChIP assays were performed using a ChIP assay kit (EMD Millipore) according to manual instructions. Chromatin was immunoprecipitated with an anti-acetyl histone H4 (Lys16) rabbit polyclonal antibody (1 μ g; EMD Millipore, 07-329) or a mouse anti-acetyl histone H3 (Lys9) mAb (5; Abcam, ab12179) or with no antibody as control. Precipitated DNA was reversed cross-linked and purified by phenol/chloroforme extraction. Precipitated and input DNA were analyzed by real-time PCR using a primer pair encompassing 189 nucleotides of the proximal region of the rat MCT1 gene promoter. In preliminary data we have found in the human HCT116 CEC line that this region contains H3 and H4 histones that are acetylated by butyrate (unpublished). Rat MCT1 promoter primers: Forward, 5'-caaaagcagctagcccagag-3'; Reverse, 5'-gtgtatgtatggcagggagg-3'. Immunoprecipitated chromatin was also analyzed with primers for Long Interspersed Nuclear Elements (LINE), which are DNA transposable sequences. LINE primers: Forward ,5'-ttggacacacggaagcagaatttc-3'; Reverse, 5'-gttctcttgggccagggatga-3' (Pogribny, 2006). Results are expressed as percent from input.

Cellular ATP measurement

Intracellular ATP was measured in isolated CEC (4×10^6) lysates using a bioluminescence kit according to manufacturer's instruction (ATP determination Kit, A-22066, ThermoFisher).

Total antioxidant capacity assay

The total antioxidant capacity of rat colonic tissues was evaluated using ABTS antioxidant assay kit (Zenbio, #AOX-1) following the manufacturer's procedure. Tissue lysates were assayed with ferryl myoglobin and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) and absorbance was read at 405nm and compared to the standard curve of Trolox reagent.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Oxidative stress level was evaluated by measuring lipid peroxidation and reactive compounds such as malondialdehyde (MDA) byproducts of lipid peroxidation in colonic tissue lysates. The amount of aldehydic byproducts was quantified by the thiobarbituric acid reaction. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) formed in samples, due to the reaction between MDA with thiobarbituric acid, were measured spectrophotometrically. TBARS levels were determined from MDA equivalence standard.

HDAC and HAT activity assays

HDAC and HAT activities were measured in nuclear lysates prepared from isolated CEC (2×10^6) using Epigenase™ and EpiQuik™ Assay Kits, respectively, according to the manufacturer's instruction (Epigentek, NY, USA). Fluorescence was read using a microplate reader (Victor III, Perkin Elmer). Results are expressed as ng of deacetylated (HDAC activity) or acetylated (HAT activity) per hour and per mg of protein.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. The significance of differences between groups was determined by Mann-Whitney *U* tests, using Prism® software (Prism 5.0, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Differences were considered significant if p -value < 0.05 .

Results

Butyrate utilization is downregulated during aging in CEC of IUGR rats.

We have previously described that the expression of the butyrate transporter MCT1 is correlated to its uptake and oxidation in CEC and that its expression is downregulated in intestinal inflammation (Thibault, 2007). To determine the impact of IUGR on butyrate utilization by CEC, we measured mRNA levels of MCT1 and of the short-chain acyl-CoA dehydrogenase (scACAD), a mitochondrial enzyme involved in butyrate oxidation, by RT-qPCR in CEC isolated from colons of rats at different ages. As compared to controls, IUGR rats displayed a reduction in MCT1 mRNA expression in CEC that started at 13 days of age and became significant from 35 to 240 days of age (Figure 1). ScACAD mRNA levels decreased in CEC of IUGR rats from 120 to 240 days of age in comparison to controls (Figure 1). These data suggest that butyrate utilization is reduced in IUGR colonocytes during aging.

Alterations of butyrate metabolism and mitochondria in CEC of 120-old-day IUGR rats

In accordance with the reduction of MCT1 mRNA levels (Figure 1), immunohistological analysis of colon sections showed that MCT1 protein expression was decreased in the colonic epithelium of IUGR rats as compared to control rats (Figure 2A). In contrast to the reduced expression of scACAD mRNA, mRNA expressions of transporters and enzymes involved in glycolysis, namely glucose transporter (GLUT)-1, hexokinase II and the lactate monocarboxylate transporter (MCT)-4 were similar in CEC from control and IUGR rats (Figure 2B). This data suggest that butyrate metabolism is specifically affected in CEC of IUGR rats. Because a reduction of MCT1 expression decreases butyrate uptake and oxidation by CEC (Thibault, 2007), this should lead to a reduction of ATP production in IUGR colonocytes. Measurement of intracellular ATP levels in CEC lysates effectively revealed a trend ($P=0.055$) to lower ATP levels in IUGR rats in comparison to controls (Figure 3C). However, reduced cellular ATP levels may also result from a decrease in mitochondria number and/or function. Thus, we evaluated mitochondrial content in CEC by qPCR quantification of mitochondrial DNA (cytochrome b gene) and western-blot analysis of the mitochondrial protein marker, cytochrome oxidase c protein (COX IV). We found reduced levels of both cytochrome b gene (Figure 3D) and COX IV protein (Figure 3E) in CEC from IUGR rats as compared to control CEC, indicating a reduction of mitochondrial content. Consistent with this, we found that Nuclear Factor Erythroid 2 Related Factor (NRF)-1 gene expression, a transcription factor involved in mitochondria biogenesis, was downregulated in CEC from IUGR rats (Figure 1F). However, a reduction of intracellular ATP levels may also arise from alteration of the mitochondrial respiratory chain. The succinate dehydrogenase (SDH, subunit A) is an enzyme of the respiratory chain, which is encoded by a nuclear gene and upregulated by butyrate in CEC (Vanthoutvin, 2009). RT-qPCR analysis revealed that SDH mRNA expression was downregulated in CEC of IUGR rats as compared to control rats (Figure 1F). Together, these data suggest that IUGR induces modifications of energy metabolism in the colonic epithelium of rat offspring in adulthood.

Increased HDAC activity and reduced histone acetylation in CEC of IUGR rats.

Since a downregulation of butyrate utilization by CEC could result in a reduction of its epigenetic effects, we sought to evaluate HDAC or HAT activities and acetylation levels of histones in CEC isolated from control and IUGR rat colons. We first measured HDAC and HAT activities in nuclear lysates of CEC isolated from the colons of rat offspring at the age of

120 days. HDAC activities were higher in CEC from IUGR rats as compared to control rats, whereas no difference in HAT activity was noticed between groups (Figures 3A). In parallel, we performed western-blot analysis of acetylation levels of different lysines of H3 and H4 histones in CEC nuclear lysates. We found a trend toward a decrease in acetylation of H3K9 and H4K8 in CEC from IUGR rats as compared to control rats (Figure 3B). No significant change in the acetylation state was noticed for H3K27 (Figure 3B). In contrast, a significant ($P<0.01$) loss of acetylation was found for H4K16 (Figure 3B). We then assessed H4K16 acetylation status in CEC of control and IUGR rat offspring at different ages. Western-blot analysis revealed a progressive loss of acetylation with aging, in both control and IUGR rats but the loss of H4K16 acetylation was much more pronounced in IUGR CEC, with a strong reduction of H4K16 acetylation at 120 and 240 days of age (Figure 3C). In preliminary experiments (unpublished data), we have found that the 5'proximal region of the transcriptional starting site of MCT1 gene promoter contained core histones with increased H3K9 and H4K16 acetylation in butyrate-treated CEC. Thus, we then sought to determine if the loss of histone acetylation could affect this region by ChIP assay of chromatin extracted from control and IUGR CEC. CHIP analysis showed a reduction in H4K16 acetylation in MCT1 promoter of IUGR CEC in comparison to control CEC (Figure 3D). We also noted a trend to a decrease in H3K9 acetylation in IUGR CEC that was not significant due to a great variability in control CEC (Figure 3D). We also wondered whether the loss of histone acetylation could globally affect the chromatin of CEC of IUGR rats. We thus performed ChIP analysis of H3K9 and H4K16 acetylation status of long interspersed nucleotide elements (LINE), which are transposable DNA elements. A strong reduction of both H3K9 and H4K16 was found in LINE sequence in the chromatin extracted from CEC of IUGR rats in comparison to controls (Figure 3D). Together, these data suggest IUGR induces epigenetic modifications in the colonic epithelium of rat offspring in adulthood, in particular a specific and global loss of H4K16 acetylation.

IUGR induces alterations of the colonic epithelial barrier.

As butyrate plays a major role in integrity and maturation of the colonic epithelium, we examined the impact of reduced butyrate utilization by CEC on colonic epithelial barrier function in adult rats at 120 days of age. Histo-morphometric analysis of colonic mucosa showed that crypt depth was significantly lower in IUGR rats compared with control rats (Figure 4A). Colonic permeability was assessed on colon tissues mounted in Ussing

chambers. A higher flux of FITC-dextran was measured in colonic tissues from IUGR rats in comparison to controls, indicating an increase paracellular permeability of IUGR colonic epithelium (Figure 4B). To further investigate IUGR effect on epithelial barrier homeostasis, we evaluated the percentage of proliferating and apoptotic cells in colonic crypts by immunohistology on colon tissue sections of control and IUGR rats. The percentage of active caspase-3 positive cells was not significantly different between IUGR and control rats, indicating no difference in the apoptotic rate of CEC between groups (Figure 4C). In contrast, immunostaining of PCNA revealed a decrease proportion of proliferative cells in the colonic epithelium of IUGR rats as compared to controls (Figures 4D and 4E). Furthermore, PAS staining of mucins revealed a drastic reduction in goblet cell number in colonic crypts of IUGR rats as compared to control rats, especially in the upper two-thirds of the crypt (Figure 4F and 4G). Altogether, these data suggest that the impairment in butyrate utilization by CEC of IUGR rats is associated with alteration of the colonic epithelial barrier function.

IUGR induces an oxidative stress in CEC and increases susceptibility to colitis

Reduced butyrate uptake should decrease its regulatory effects on inflammatory response and oxidative stress (Hammer, 2008), two conditions known to alter the colonic epithelial barrier. Therefore, we decided to analyze the redox status in CEC of 120 day-aged rats. The presence of oxidative stress was determined by measurement of TBARS that constitute a marker of lipid peroxidation, in colonic tissue lysates. TBARS levels were found significantly increased in the colonic mucosa of IUGR rats as compared to controls (Figure 5A). In parallel, evaluation of the total antioxidant capacity in CEC lysates normalized to Trolox equivalents, a vitamin E analog, showed that this one was significantly reduced in the colonic epithelium of IUGR rats (Figure 5B). We next analyzed mRNA expression of pro- and anti-oxidant genes, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and glutathione S-transferase (GST), respectively. Consistent with increased TBARS levels and decreased anti-oxidant capacity, RT-qPCR revealed increased and decreased mRNA levels of iNOS and GST, respectively in CEC of IUGR rats as compared to controls (Figures 5C). Oxidative and endoplasmic reticulum (ER) stress are key players in the pathogenesis of IBD and IBD-associated colorectal cancer (Kaser, 2008; Niederreiter, 2013). We analyzed mRNA expression of ER stress markers, the activated (spliced) and total (unspliced) mRNA form of XBP1, the ER chaperone GRP78, as well the transcription factor Oasis (also known as CREB3L1) which is involved in goblet cell differentiation (Asada, 2012). CEC from IUGR rats showed significant increased levels of spliced XBP1 mRNA as compared to control CEC (Figure 5D), whereas unspliced XBP1

mRNA levels were similar between groups (Figure 5D). In contrast, GRP78 and Oasis mRNA expressions were significantly downregulated in CEC from IUGR rats in comparison with controls (Figure 5D). Together these data suggest the presence of an ER stress in the colonic epithelium of IUGR rats at 120 days of age. We next sought to determine the capacity of mucosal recovery after DSS-induced injury in 120-day-old control and IUGR rats. Rats were treated with DSS for 5 days and examined after a recovery phase of 3 days. Histological scoring on H&E-stained colonic tissue sections showed that IUGR rats had a higher histological score of inflammation than control rats (Figure 5E). This was characterized by partially exfoliated surface epithelia, a loss of crypt architecture with scattered goblet cells and an intense immune cell infiltrate around the crypts. Immunohistological analysis of the CD68 macrophage marker revealed a higher macrophage infiltration in the colonic mucosa of IUGR rats (Figure 5F). This data suggest that IUGR rats have an increased susceptibility to DSS-induced colitis and/or decreased epithelium repair capacity.

IUGR increases the susceptibility to colitis-associated CRC.

Loss of H4K16 acetylation has been identified as an epigenetic mark of CRC (Fraga, 2005). Also, chronic intestinal inflammation increases the risk of CRC (Itzkowitz, 2004). Therefore, we decided to evaluate the susceptibility of IUGR rats to colitis-associated CRC induced by DSS and azoxymethane (AOM). Neoplastic lesions were evaluated by counting ACF and MDF in the whole colon of control and IUGR rats. Whereas no significant difference was found in ACF number between control and IUGR rats, IUGR rats had higher numbers of MDF than control rats (Figure 6A) after AOM/DSS treatment. Since neoplastic lesions were essentially found in the distal colon, dysplastic lesions were scored on H&E-stained distal colon sections. IUGR rat colons displayed higher areas of both low- and high-grade of dysplastic lesions than control rat colons (Figure 6B). The histology showed areas of dysplastic lesions characterized by crypt distortion, immune infiltrates, and mucosal erosion and tubular structures that were more extended in colons of IUGR rats than in controls (Figure 6C). Since both MCT1 and SLC5A8 butyrate transporters have found downregulated in IBD and CRC (Lambert 2002; Li, 2003; Thibault, 2007), we analyzed mRNA expressions of MCT1 and SLC5A8 in the distal colon of AOM/DSS-treated control and IUGR rats. As described above (Figure 1), IUGR rats had lower MCT1 mRNA levels than control rats (Figure 6D). AOM/DSS treatment did not affect MCT1 mRNA expression in IUGR rat colon but significantly downregulated MCT1 mRNA expression in the colon of control rats (Figure 6D). Colonic mRNA levels of SLC5A8 were not significantly different between control and

IUGR rats under basal conditions (Figure 6D). AOM/DSS treatment did not significantly affect basal levels of SLC5A8 neither in control nor in IUGR rat colons, respectively (Figure 6D). However, under AOM/DSS condition, SLC5A8 mRNA expression was found significantly lower in IUGR than in control rat colon (Figure 6D). Thus, these data suggest that IUGR rats have an increased susceptibility to colitis-associated CRC.

Discussion

IUGR is an important clinical problem that affects up to 10% of neonates, and frequently arises from reducing nutrient supply to the fetus. Individuals born with IUGR are at increased risk of developing metabolic diseases later in life, including type-2 diabetes, obesity and hypertension (Barker, 2004). Studies in animal models of IUGR support the hypothesis of a fetal programming origin of these diseases (Barker, 2004), showing that a sub-optimal nutrition during critical windows of development, the fetal and postnatal periods, alter the structure and function of key metabolic organs, including liver, skeletal muscle or pancreas in adulthood (Lillycrop, 2007; Raychaudhuri, 2008; Park, 2008). In these tissues, it was found that IUGR induces modifications of DNA methylation and histone code affecting the expression of glucocorticoid receptor, glucose transporter (GLUT)-4 and transcription factor pdx-1 (Lillycrop, 2007; Raychaudhuri, 2008; Park, 2008). In the present study, we provide evidence that IUGR may also program the colon and induce metabolic and epigenetic modifications affecting the structure and function of the colonic epithelial barrier in adulthood. A major effect of IUGR is the downregulation of the butyrate transporter MCT1 and the loss of H4K16 acetylation and the increased susceptibility of adult rats to intestinal inflammation and to colitis-associated CRC.

We found that rats born with IUGR have a reduction of markers of butyrate utilization, MCT1 and scACAD (i.e., uptake and oxidation, respectively) in CEC. This effect is associated with a decrease in cell proliferation and an increase in paracellular permeability. ATP production is essential to the rapid turnover of the colonic epithelium and for maintaining polarity and TJ structure of CEC. Reduction of butyrate uptake and oxidation and of mitochondrial content may account for the decrease ATP levels in IUGR CEC (Donohoe, 2012). Furthermore, we observed reduced expression of SDH, suggesting a decreased of the respiratory chain function. Mitochondrial dysfunction has also been reported in liver and pancreatic β -cells in IUGR rats and may impact on the cellular redox state such as oxidative

stress (Peterside, 2003; Simmons, 2005). Indeed, aberrant mitochondria become producers of excessive reactive oxygen species (ROS), which in turn may disrupt ATP synthesis and induce ER stress and inflammation (Kozlov, 2009). Accordingly, CEC of IUGR rats have increased levels of mRNA for iNOS and ER stress markers XBP1 and GRP78. Reciprocally, oxidative stress can also cause mitochondria damage and ER stress (Kozlov, 2009). This may be exacerbated by the fact that CEC from IUGR rats have reduced antioxidant capacities associated with decreased levels of GST mRNA. In addition, reduced intracellular levels of butyrate following MCT1 downregulation may decrease butyrate control of inflammatory response and oxidative stress (Segain, 2000; Thibault, 2007; Hamer, 2008). It is suggested that mitochondria, ROS, ER stress and inflammation support each other leading to a vicious circle (Kozlov, 2009). In accordance to these alterations of epithelial barrier, IUGR rats are more susceptible to DSS-induced colitis and display poor recovery after colitis characterized by an important macrophage infiltrate.

Interestingly, CEC from IUGR rats show an increased expression of ER stress markers. ER stress occurs when unfolded or misfolded proteins accumulate in the ER that may be caused by several environmental factors, such as bacteria, metabolic factors, hypoxia and inflammation (Kaser and Blumberg, 2010). To cope with ER stress, the cell activates the unfolded protein response (UPR). The UPR is particularly important in maintaining the homeostasis of the intestinal epithelial barrier. Indeed, a proper physiological UPR activation is necessary for actively secreting intestinal cells such as Paneth and goblet cells, which produce anti-microbial peptides and mucins, respectively (Kaser and Blumberg, 2010). Importantly, there are now strong evidence in human and animal studies that ER stress and UPR dysfunction, in particular the XBP1 pathway, may contribute to the development of IBD and IBD-associated colorectal cancer (Kaser, 2008; Niederreiter, 2013). In regard with the “thrifty phenotype” hypothesis (Hales and Barker, 2001), we can suppose that, in IUGR rats, fetal exposure to protein undernutrition could program ER function in a way to reduce protein synthesis demand. However, after weaning the gastrointestinal tract of IUGR pups is exposed to a nutrient-rich environment that may induce ER stress. Interestingly, it has been suggested that ER stress in placenta could contribute to IUGR pathophysiology (Yung, 2008).

Another consequence of downregulation of butyrate uptake may be to reduce its inhibitory effect on HDAC activity thereby increasing histone deacetylation. Accordingly, IUGR rats have increased HDAC activity without modification HAT activity in CEC. Interestingly, among histone acetylation modifications, IUGR induces a strong loss of H4K16

acetylation in CEC. Histone H4 is mainly acetylated on lysine 16 and plays a major role in chromatin stability, DNA repair and gene transcription (Sharma, 2010; Kapoor-Vazirani, 2008). Decreased acetylation of H4K16 is observed during aging and in cancer (Krishnan, 2011; Fraga, 2005). A progressive reduction of the level of H4K16 acetylation was also found in control rats, which is compatible with an aging effect and would mean that other mechanisms might amplify deacetylation of H4K16 in the colonic epithelium of IUGR rats. Increased production of ROS by ER and/or mitochondria stresses is a common feature of aging and ROS may induce alteration of the epigenome (Cyr, 2011). Furthermore, acetylation of H4K16 is involved in specific gene transcription and loss of H4K16 acetylation in promoter region contribute to epigenetic silencing of tumor suppressor genes (Kapoor-Vazirani, 2008). We found that CEC from IUGR rats have a decreased H4K16 acetylation in a region of MCT1 gene promoter just upstream the transcriptional starting site that is critical for MCT1 gene transcription (Thibault, 2007). This may be relevant to CRC, since a progressive downregulation of MCT1 expression is found during transition from normal colonic epithelium to adenocarcinoma (Lambert, 2002). Furthermore, we found a loss of H4K16 acetylation in LINE repetitive DNA sequence, suggesting a global effect on chromatin. The loss of H4K16 acetylation in repetitive DNA sequence is also a common epigenetic mark of several cancers including CRC (Fraga, 2005). In accordance with these data, we show that adult IUGR rats have an increased susceptibility to colitis-associated CRC. Interestingly, the expression of the butyrate transporter SLC5A8 that is considered a tumor suppressor gene (Li, 2003) was more downregulated in the colon of IUGR rats than in control rats after AOM/DSS-induced carcinogenesis.

In conclusion, our results demonstrate that IUGR induces metabolic and epigenetic modifications in CEC altering colonic epithelial barrier structure and function. The exposure of the colon to a post-natal “rich” nutritional environment could induce early alteration of mitochondrial and ER functions resulting in cellular redox stress and inflammation within the epithelial barrier. In respect with the major role of butyrate in the maintenance of colonic homeostasis, downregulation of butyrate utilization by CEC may constitute an important factor in the effect of IUGR. Indeed, butyrate is known to regulate epithelial proliferation and permeability, inflammatory response and oxidative stress. Decrease inhibitory effect of butyrate on HDAC activity would modify histone acetylation and thus gene expression and DNA stability. Together these effects may explain the increased susceptibility of IUGR rats to intestinal inflammation and CRC. Our findings strongly support the hypothesis of a developmental origin of gastrointestinal diseases (Waterland, 2006; Renz, 2011).

References

1. Asada R, Saito A, Kawasaki N, Kanemoto S, Iwamoto H, Oki M, Miyagi H, Izumi S, Imaizumi K. The endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in the terminal differentiation of goblet cells in the large intestine. *J Biol Chem.* 2012;287:8144-53.
2. Barker DJP. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl.* 2004;93:26-33.
3. Bengtson M-B, Rønning T, Vatn MH, Harris JR. Irritable bowel syndrome in twins: genes and environment. *Gut.* 2006;55:1754-9.
4. Bertolotti A, Wang X, Novoa I, Jungreis R, Schlessinger K, Cho JH, et al. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 2001;107:585-93.
5. Boivin GP, Washington K, Yang K, Ward JM, Pretlow TP, Russell R, Besselsen DG, Godfrey VL, Doetschman T, Dove WF, Pitot HC, Halberg RB, Itzkowitz SH, Groden J, Coffey RJ. Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology.* 2003;124:762-77.
6. Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br. J. Nutr.* 2007;97:1036-46.
7. Caderni G, Femia AP, Giannini A, Favuzza A, Luceri C, Salvadori M, et al. Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. *Cancer Res.* 2003;63:2388-92.
8. Chiba T, Marusawa H, Ushijima T. Inflammation-associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. *Gastroenterology.* 2012;143:550-63.
9. Clausen MR, Mortensen PB. Kinetic studies on colonocyte metabolism of short chain fatty acids and glucose in ulcerative colitis. *Gut.* 1995;37:684-9.
10. Cyr AR, Domann FE. The redox basis of epigenetic modifications: from mechanisms to functional consequences. *Antioxid. Redox Signal.* 2011;15:551-89.
11. Davie JR. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J. Nutr.* 2003;133(7 Suppl):2485S-2493S.
12. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Mol. Cell.* 2012;48:612-26.
13. Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O'Connell TM, Bunger MK, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab.* 2011;13:517-26.
14. Fañça-Berthon P, Michel C, Pagniez A, Rival M, Van Seuning I, Darmaun D, et al. Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats. *Pediatr. Res.* 2009;66:47-52.
15. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* 2005;37:391-400.
16. Fung CM, White JR, Brown AS, Gong H, Weitkamp JH, Frey MR, et al. Intrauterine Growth Restriction Alters Mouse Intestinal Architecture during Development. *PloS one.* 2016;11:e0146542.
17. Gluzak MA, Seto E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene.* 2007;26:5420-32.
18. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-

- life conditions on adult health and disease. *N. Engl. J. Med.* 2008;359:61–73.
19. Hague A, Manning AM, Hanlon KA, Huschtscha LI, Hart D, Paraskeva C. Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *Int. J. Cancer.* 1993;55:498–505.
 20. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br. Med. Bull.* 2001;60:5–20.
 21. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer R-J. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2008;27:104–19.
 22. Harig JM, Soergel KH, Komorowski RA, Wood CM. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. *N. Engl. J. Med.* 1989;320:23–8.
 23. Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH. Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1994;54:3288–93.
 24. Holm E, Hagmüller E, Staedt U, Schlickeiser G, Günther HJ, Leweling H, et al. Substrate balances across colonic carcinomas in humans. *Cancer Res.* 1995;55:1373–8.
 25. Itzkowitz SH, Harpaz N. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2004;126:1634–48.
 26. Kapoor-Vazirani P, Kagey JD, Powell DR, Vertino PM. Role of hMOF-dependent histone H4 lysine 16 acetylation in the maintenance of TMS1/ASC gene activity. *Cancer Res.* 2008;68:6810–21.
 27. Kaser A, Blumberg RS. Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2010;3:11–6.
 28. Kaser A, Lee A-H, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell.* 2008;134:743–56.
 29. Kozlov AV, Duvigneau JC, Miller I, Nürnberger S, Gesslbauer B, Kungl A, et al. Endotoxin causes functional endoplasmic reticulum failure, possibly mediated by mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1792:521–30.
 30. Kripke SA, Fox AD, Berman JM, Settle RG, Rombeau JL. Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short-chain fatty acids. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1989;13:109–16.
 31. Krishnan V, Chow MZY, Wang Z, Zhang L, Liu B, Liu X, et al. Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in Zmpste24-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108:12325–30.
 32. Lallès J-P, Orozco-Solís R, Bolaños-Jiménez F, de Coppet P, Le Dréan G, Segain J-P. Perinatal undernutrition alters intestinal alkaline phosphatase and its main transcription factors KLF4 and Cdx1 in adult offspring fed a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* 2012;23:1490–7.
 33. Lambert DW, Wood IS, Ellis A, Shirazi-Beechey SP. Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy. *Br J Cancer.* 2002;86:1262–9.
 34. Le Dréan G, Haure-Mirande V, Ferrier L, Bonnet C, Hulin P, de Coppet P, Segain JP. Visceral adipose tissue and leptin increase colonic epithelial tight junction permeability via a RhoA-ROCK-dependent pathway. *FASEB J.* 2014;28:1059–70.
 35. Li H, Myeroff L, Smiraglia D, Romero MF, Pretlow TP, Kasturi L, Lutterbaugh J, Rerko RM, Casey G, Issa JP, Willis J, Willson JK, Plass C, Markowitz SD. SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:8412–7.

36. Lillycrop KA, Slater-Jefferies JL, Hanson MA, Godfrey KM, Jackson AA, Burdge GC. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. *Br. J. Nutr.* 2007;97:1064–73.
37. Mariadason JM, Corner GA, Augenlicht LH. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res.* 2000;60:4561–72.
38. McConnell BB, Kim SS, Bialkowska AB, Yu K, Sitaraman SV, Yang VW. Krüppel-like factor 5 protects against dextran sulfate sodium-induced colonic injury in mice by promoting epithelial repair. *Gastroenterology.* 2011;140:540–549.
39. Niederreiter L, Fritz TM, Adolph TE, Krismer AM, Offner FA, Tschurtschenthaler M, et al. ER stress transcription factor Xbp1 suppresses intestinal tumorigenesis and directs intestinal stem cells. *The Journal of experimental medicine.* 2013;210:2041–56.
40. Nilsen TIL, Romundstad PR, Troisi R, Potischman N, Vatten LJ. Birth size and colorectal cancer risk: a prospective population based study. *Gut.* 2005;54:1728–32.
41. Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J. Clin. Invest.* 2008;118:2316–24.
42. Peterside IE, Selak MA, Simmons RA. Impaired oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria in growth-retarded rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003;285:E1258–1266.
43. Pogribny IP, Ross SA, Tryndyak VP, Pogribna M, Poirier LA, Karpinets TV. Histone H3 lysine 9 and H4 lysine 20 trimethylation and the expression of Suv4-20h2 and Suv-39h1 histone methyltransferases in hepatocarcinogenesis induced by methyl deficiency in rats. *Carcinogenesis.* 2006;27:1180–86.
44. Radke F, Clevers H. Self-renewal and Cancer of the Gut: Two sides of a coin. *Science.* 2005;305:1904–09.
45. Raychaudhuri N, Raychaudhuri S, Thamocharan M, Devaskar SU. Histone code modifications repress glucose transporter 4 expression in the intrauterine growth-restricted offspring. *J. Biol. Chem.* 2008;283:13611–26.
46. Renz H, von Mutius E, Brandtzaeg P, Cookson WO, Autenrieth IB, Haller D. Gene-environment interactions in chronic inflammatory disease. *Nat. Immunol.* 2011;12:273–7.
47. Roediger WE. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology.* 1982;83:424–9.
48. Sakata T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *Br. J. Nutr.* 1987;58:95–103.
49. Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut.* 2000;47:397–403.
50. Segain J-P, Raingeard de la Blétière D, Sauzeau V, Bourreille A, Hilaret G, Cario-Toumaniantz C, et al. Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis. *Gastroenterology.* 2003;124:1180–7.
51. Shaker A1, Swietlicki EA, Wang L, Jiang S, Onal B, Bala S, DeSchryver K, Newberry R, Levin MS, Rubin DC. Epimorphin deletion protects mice from inflammation-induced colon carcinogenesis and alters stem cell niche myofibroblast secretion. *J Clin*

- Invest. 2010;120:2081-93.
52. Sharma GG, So S, Gupta A, Kumar R, Cayrou C, Avvakumov N, et al. MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* 2010;30:3582–95.
 53. Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M, Bonnet C, Cherbut C, Galmiche JP, et al. Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut.* 2000;46:507–14.
 54. Simmons RA, Saponitsky-Kroyter I, Selak MA. Progressive accumulation of mitochondrial DNA mutations and decline in mitochondrial function lead to beta-cell failure. *J. Biol. Chem.* 2005;280:28785–91.
 55. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* 2003;94:965–73.
 56. Thibault R, Blachier F, Darcy-Vrillon B, de Coppet P, Bourreille A, Segain J-P. Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a transport deficiency. *Inflamm. Bowel Dis.* 2010;16:684–95.
 57. Thibault R, De Coppet P, Daly K, Bourreille A, Cuff M, Bonnet C, et al. Down-regulation of the monocarboxylate transporter 1 is involved in butyrate deficiency during intestinal inflammation. *Gastroenterology.* 2007;133:1916–27.
 58. Vanhoutvin SA, Troost FJ, Hamer HM, Lindsey PJ, Koek GH, Jonkers DM, Kodde A, Venema K, Brummer RJ. Butyrate-induced transcriptional changes in human colonic mucosa. *PLoS One.* 2009;4:e6759.
 59. Wang W, Degroote J, Van Ginneken C, Van Poucke M, Vergauwen H, Dam TM, et al. Intrauterine growth restriction in neonatal piglets affects small intestinal mucosal permeability and mRNA expression of redox-sensitive genes. *FASEB J.* 2016;30:863-73.
 60. Waterland RA. Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. *J. Pediatr.* 2006;149(5 Suppl):S137–142.
 61. Yang X-J, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene.* 2007;26:5310–8.
 62. Yung H, Calabrese S, Hynx D, Hemmings BA, Cetin I, Charnock-Jones DS, et al. Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction. *Am. J. Pathol.* 2008;173:451–62.
 63. Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 2004;279:25935–8.

Figure legends

Figure 1. Butyrate utilization is downregulated during aging in colonic epithelium of IUGR rats. RT-PCR analysis of mRNA expression of (A) the butyrate transporter MCT1 and (B) the butyrate β -oxidation enzyme scACAD in colonic epithelial cells (CEC) isolated from the colon of IUGR and control rats of different ages (n=8-15/group). Results are expressed relative to control mean value (normalized to β -actin). *P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; ns, not significant.

Figure 2. Alterations of butyrate metabolism and mitochondria in CEC of 120-old-day IUGR rats. (A) MCT1 immunostaining of colonic tissue sections from control and IUGR rats. (B) RT-qPCR analysis of mRNA expression of glycolytic markers, GLUT1, HKII and MCT4 in CEC isolated from control and IUGR rats (n=8/group). Results are expressed relative to control mean value (normalized to β -actin). (C) ATP levels in CEC isolated from control and IUGR rats (n=5/group). (D) Mitochondrial DNA quantification assayed by qPCR of cytochrome b gene (n=8/group). (E) Representative western blot and band densitometry of mitochondrial marker COX IV and β actin (n=4/group). Results are expressed relative to controls (normalized to β actin). (F) RT-qPCR analysis of mRNA expression of NRF1 and SDH in CEC isolated from control and IUGR rats (n=8/group). Results are expressed relative to control mean value (normalized to β -actin). *P<0.05; ** P<0.01. ns, not significant.

Figure 3. Increased HDAC activity and reduced histone acetylation in CEC of IUGR rats. CEC were isolated from the colon of control and IUGR rats at 120 days of age. (A) HDAC and HAT activities were measured in nuclear lysates from CEC. Results are expressed as ng of deacetylated or acetylated products /h /mg of protein (n=5/group). (B) Densitometric analysis of immunoblots of H3K9 and H3K27 acetylation (normalized to H3 histone) and of H4K8 and H4K16 acetylation (normalized to H4 histone) in nuclear lysates from CEC. Representative acetylated (green) and total (red) histone bands of western blots are shown under histograms. (n=5-6/group) (C) Densitometric analysis of immunoblots of H4K16 acetylation (normalized to H4 histone) in nuclear lysates from CEC isolated from rats at the indicated days of age (n=5-7/group). (D) CHIP analysis of H3K9 and H4K16 acetylation status in MCT1 promoter and LINE sequences in chromatin isolated from CEC of 120-day-

old rats. Results are expressed relative to input DNA. (n=8-9/group. *P<0.05; ** P<0.01; ns, not significant.

Figure 4. IUGR induces alterations of the colonic epithelial barrier. Colonic epithelial barrier function was evaluated in colons from control and IUGR rats at 120 days of age. (A) Crypt depth (expressed in μm) measured on H&E-stained colon sections. (n=5/group). (B) Colonic permeability to FITC-dextran measured in Ussing chambers (n=8/group). (C) Percentage of apoptotic cells per colonic crypt measured by immunostaining of active/cleaved caspase-3 on colonic tissue sections; (D) Percentage of proliferating cells per colonic crypt was measured by PCNA immunostaining on colonic tissue sections. (n=5/group). (E) Representative colons immunostained to detect PCNA (magnification $\times 200$). (F) Goblet (PAS) cell number per colonic crypt measured in colon sections stained for mucins with Periodic Acid Schiff (PAS) (magnification $\times 200$). (n=5 rats/group). (G) Representative photographs of PAS-stained colonic tissue section. *P<0.05; *** P<0.001; ns, not significant.

Figure 5: IUGR induces an oxidative stress in CEC and poor mucosal recovery after DSS-induced colitis

Redox status analysis and colitis/recovery experiments were performed in control and IUGR rats at 120 days of age. (A) Quantification of TBARS (marker of lipid peroxidation) in colonic tissue lysates. Results are expressed as malondialdehyde (MDA equivalents (n=5/group). (B) Total anti-oxidant capacity was measured in CEC lysates and expressed as Trolox equivalents (n=5/group). (C), and (D) RT-PCR analysis of iNOS, GST1, XBP1 spliced, XBP1 unspliced, GRP78 and Oasis mRNA expression in CEC (n=8-9/group). (E) Histological scores of inflammation were determined in H&E-stained colonic tissue sections of rats treated for 5 days with DSS followed by a recovery phase of 4 days with normal drinking water (n=6/group). (F) Immunostaining of CD68⁺ macrophages in colon tissue sections (magnification $\times 200$). * P<0.05; ns, not significant.

Figure 6: Increased susceptibility to colitis-associated CRC in IUGR rats.

Colitis-associated carcinogenesis was induced in adult rats of 120 days of age by a single intraperitoneal injection of azoxymethane (AOM) followed by 2.5% DSS in drinking water for 7 days and then no further treatment for 4 weeks. (A) Number of aberrant crypt foci (ACF) and mucin-depleted foci (MDF) in the whole colon of control and IUGR rats. (n=10

rats/group). (B) Number of low- and high-grade dysplastic lesions was measured in H&E-stained sections of distal colon from AOM/DSS-treated control and IUGR rats. Data are expressed as percent area of total colonic surface. (n=10/group). (C) Representative photographs of H&E stained sections of dysplastic mucosa from control and IUGR distal colon. (magnification x200). (D) RT-qPCR analysis of MCT1 and SLC5A8 mRNA expression in the distal colon of control and IUGR rats untreated or treated with AOM/DSS. (n=10/group). *P<0.05; *** P<0.001.

Table 1. Rat primers sequences used in real-time PCR

<i>Gene</i>	Foward	Reverse
<i>β-actin</i>	CTATCGGCAATGAGCGGTTCC	GCACTGTGTTGGCATAGAGGTC
<i>GSTα</i>	CGGTACTTGCCTGCCTTT G	ATTTGTTTTGCATCCACGGG
<i>iNOS</i>	CACCTTGGAGTTCACCCA G	ACCACTCGTACTTGGGATGC
<i>NRF1</i>	GTGGCTGATGGAGAGGTGGAA	TGCTTGCCTCGTCTGGATGG
<i>XBPIs</i>	GAGTCCGCAGCAGGTG	GCGTCAGAATCCATGGGA
<i>XBPIu</i>	TCTCAATCACAAGCCCATGA	GAGCAGCAAGTGGTGGATTT
<i>MCT1</i>	CAGTGCAACGACCAGTGAAGTG	ATCAAGCCACAGCCAGACAGG
<i>scACAD</i>	GACAAGGAACATCTCTTCCC	GAGTAGGCCAGGTAATCCAG
<i>GLUT1</i>	AGATGAAAGAAGAGGGTTCGG	GTAGAACACAGCATTGATGCC
<i>HKII</i>	GCGGTGCTGTGGCGAATC	AGCCTCCTCACTGCCTTATGG
<i>MCT4</i>	GCTCCTAAGACCTGTCCACATC	ATTGCGGTTTGGTGTTCCTGTC
<i>SLC5A8</i>	ATGTCCGCTGTCACTGTCCTG	GGTGCTGGTGATCCCGAGTC
<i>SDHα</i>	CCGCCGTGTTCCGTGTGG	CGTGACTCCTTCCGTGCTTCC
<i>Cytb</i>	TTCCGCCCAATCACCCAAATC	GCTGATGGAGGCTAGTTGACC
<i>GAPDH</i>	TTCAACGGCACAGTCAAGG	CTCAGCACCAGCATCACC

Figure 1

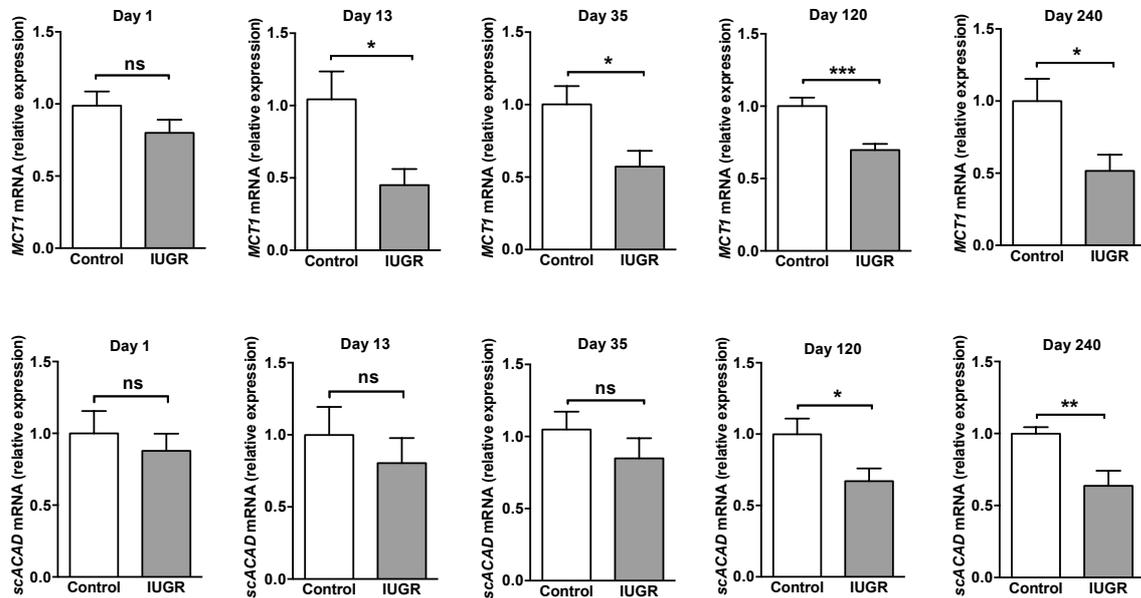


Figure 1. Butyrate utilization is downregulated during aging in colonic epithelium of IUGR rats.

RT-PCR analysis of mRNA expression of (A) the butyrate transporter MCT1 and (B) the butyrate β -oxidation enzyme scACAD in colonic epithelial cells (CEC) isolated from the colon of IUGR and control rats of different ages (n=8-15/group). Results are expressed relative to control mean value (normalized to β -actin). *P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; ns, not significant.

Figure 2

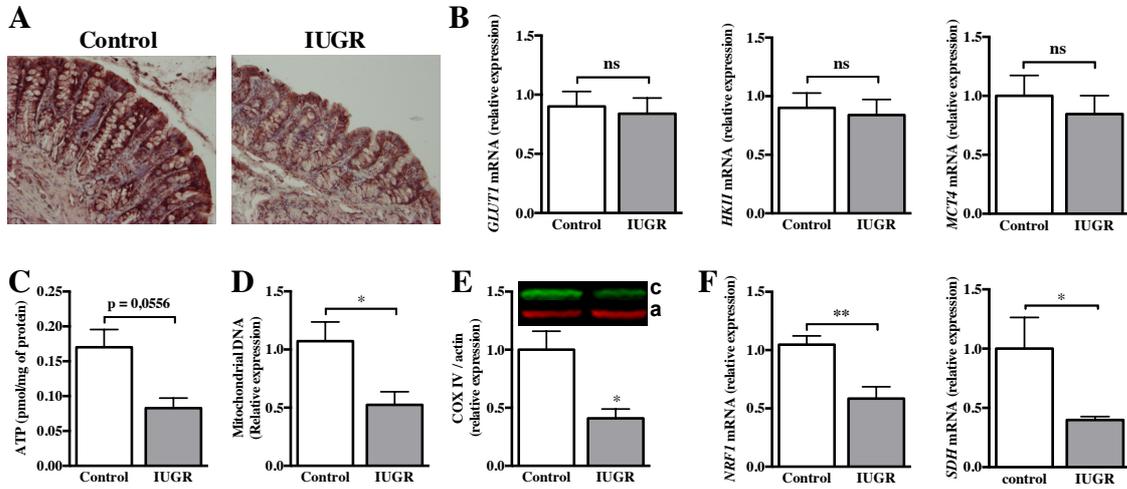


Figure 2. Alterations of butyrate metabolism and mitochondria in CEC of 120-old-day IUGR rats.

(A) MCT1 immunostaining of colonic tissue sections from control and IUGR rats. (B) RT-qPCR analysis of mRNA expression of glycolytic markers, GLUT1, HKII and MCT4 in CEC isolated from control and IUGR rats (n=8/group). Results are expressed relative to control mean value (normalized to β -actin). (C) ATP levels in CEC isolated from control and IUGR rats (n=5/group). (D) Mitochondrial DNA quantification assayed by qPCR of cytochrome b gene (n=8/group). (E) Representative western blot and band densitometry of mitochondrial marker COX IV and β actin (n=4/group). Results are expressed relative to controls (normalized to β actin). (F) RT-qPCR analysis of mRNA expression of NRF1 and SDH in CEC isolated from control and IUGR rats (n=8/group). Results are expressed relative to control mean value (normalized to β -actin). *P<0.05; ** P<0.01. ns, not significant.

Figure 3

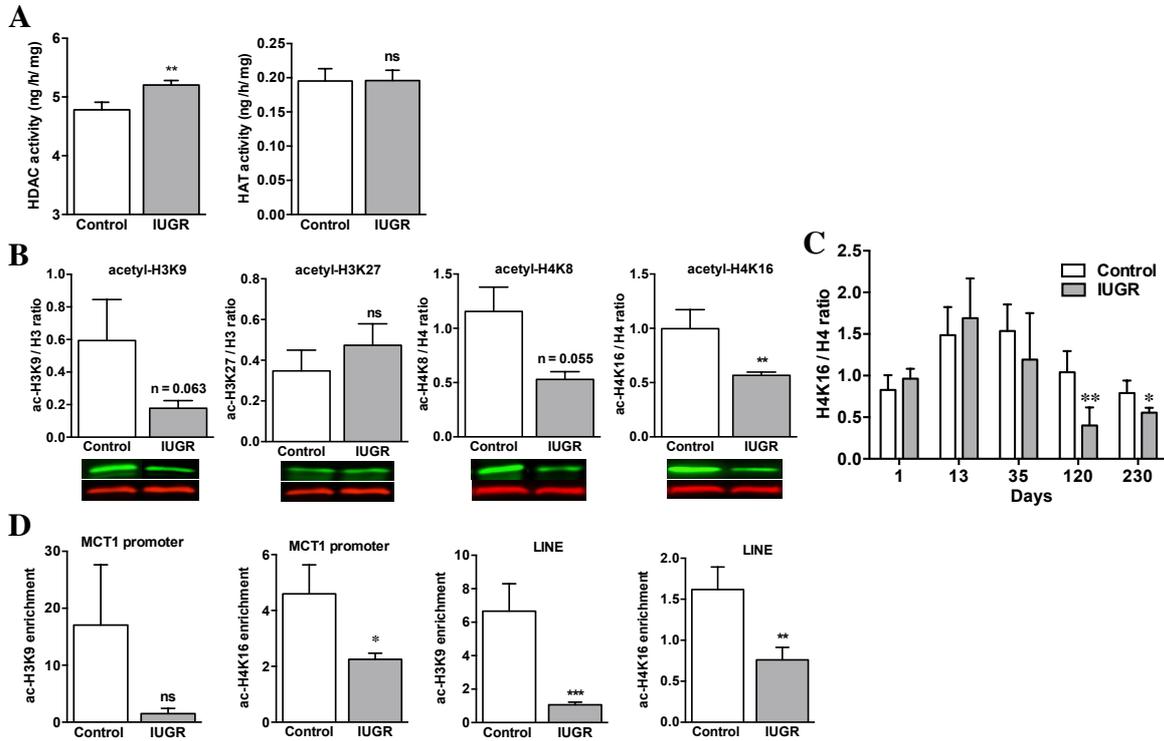


Figure 3. Increased HDAC activity and reduced histone acetylation in CEC of IUGR rats.

CEC were isolated from the colon of control and IUGR rats at 120 days of age. (A) HDAC and HAT activities were measured in nuclear lysates from CEC. Results are expressed as ng of deacetylated or acetylated products /h /mg of protein (n=5/group). (B) Densitometric analysis of immunoblots of H3K9 and H3K27 acetylation (normalized to H3 histone) and of H4K8 and H4K16 acetylation (normalized to H4 histone) in nuclear lysates from CEC. Representative acetylated (green) and total (red) histone bands of western blots are shown under histograms. (n=5-6/group) (C) Densitometric analysis of immunoblots of H4K16 acetylation (normalized to H4 histone) in nuclear lysates from CEC isolated from rats at the indicated days of age (n=5-7/group). (D) CHIP analysis of H3K9 and H4K16 acetylation status in MCT1 promoter and LINE sequences in chromatin isolated from CEC of 120-day-old rats. Results are expressed relative to input DNA. (n=8-9/group. *P<0.05; ** P<0.01; ns, not significant.

Figure 4

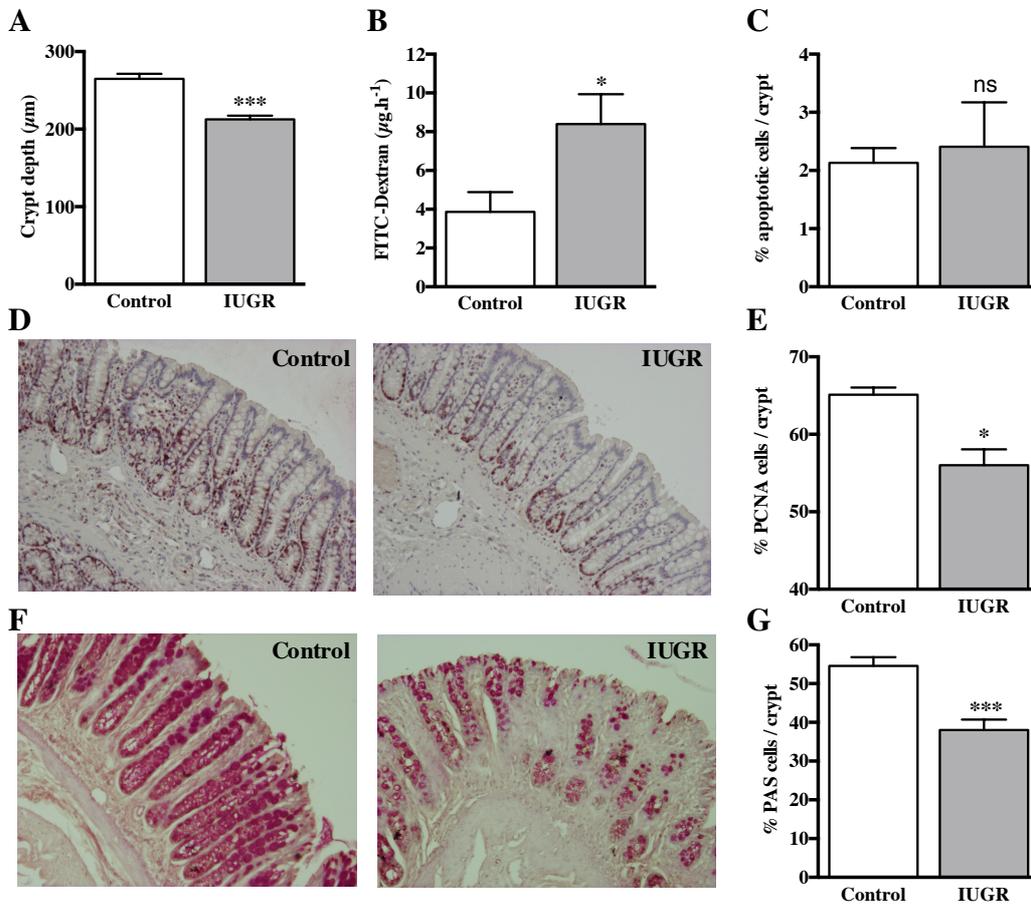


Figure 4. IUGR induces alterations of the colonic epithelial barrier.

Colonic epithelial barrier function was evaluated in colons from control and IUGR rats at 120 days of age. (A) Crypt depth (expressed in μm) measured on H&E-stained colon sections. (n=5/group). (B) Colonic permeability to FITC-dextran measured in Ussing chambers (n=8/group). (C) Percentage of apoptotic cells per colonic crypt measured by immunostaining of active/cleaved caspase-3 on colonic tissue sections; (D) Percentage of proliferating cells per colonic crypt was measured by PCNA immunostaining on colonic tissue sections. (n=5/group). (E) Representative colons immunostained to detect PCNA (magnification $\times 200$). (F) Goblet (PAS) cell number per colonic crypt measured in colon sections stained for mucins with Periodic Acid Schiff (PAS) (magnification $\times 200$). (n=5 rats/group). (G) Representative photographs of PAS-stained colonic tissue section. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; ns, not significant.

Figure 5

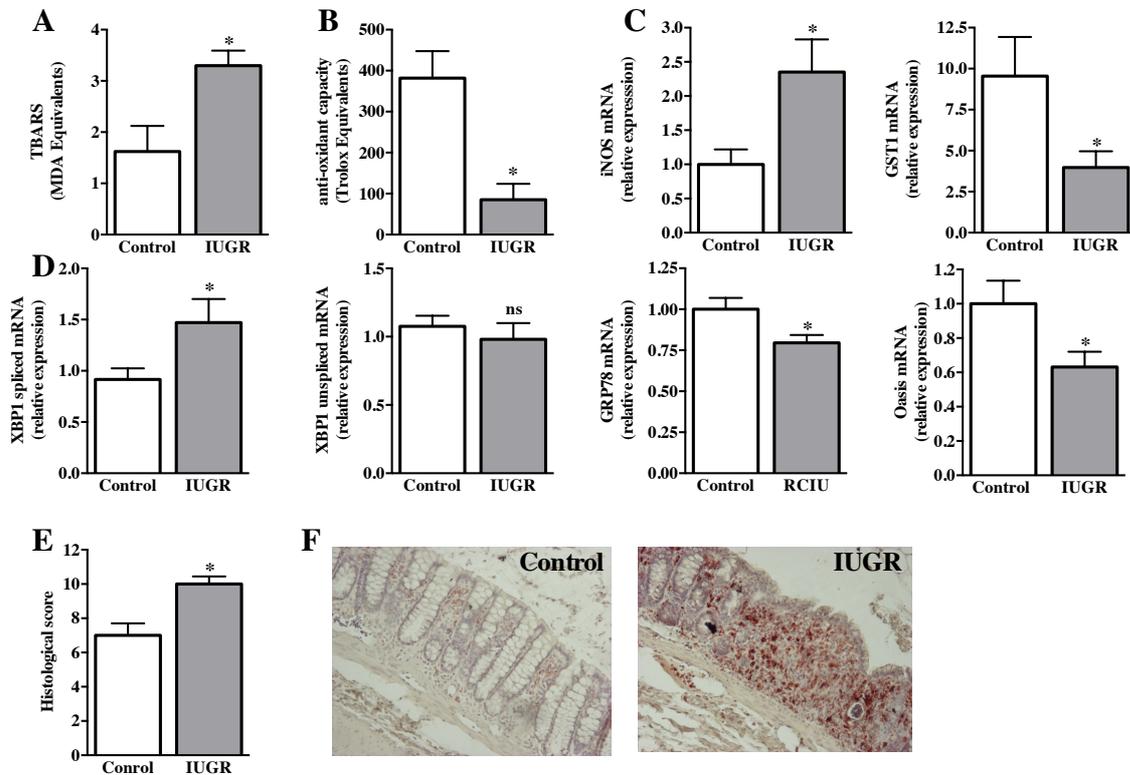


Figure 5: IUGR induces an oxidative stress in CEC and poor mucosal recovery after DSS-induced colitis

Redox status analysis and colitis/recovery experiments were performed in control and IUGR rats at 120 days of age. (A) Quantification of TBARS (marker of lipid peroxidation) in colonic tissue lysates. Results are expressed as malondialdehyde (MDA equivalents (n=5/group)). (B) Total anti-oxidant capacity was measured in CEC lysates and expressed as Trolox equivalents (n=5/group). (C), and (D) RT-PCR analysis of iNOS, GST1, XBP1 spliced, XBP1 unspliced, GRP78 and Oasis mRNA expression in CEC (n=8-9/group). (E) Histological scores of inflammation were determined in H&E-stained colonic tissue sections of rats treated for 5 days with DSS followed by a recovery phase of 4 days with normal drinking water (n=6/group). (F) Immunostaining of CD68⁺ macrophages in colon tissue sections (magnification $\times 200$). * P<0.05; ns, not significant.

Figure 6

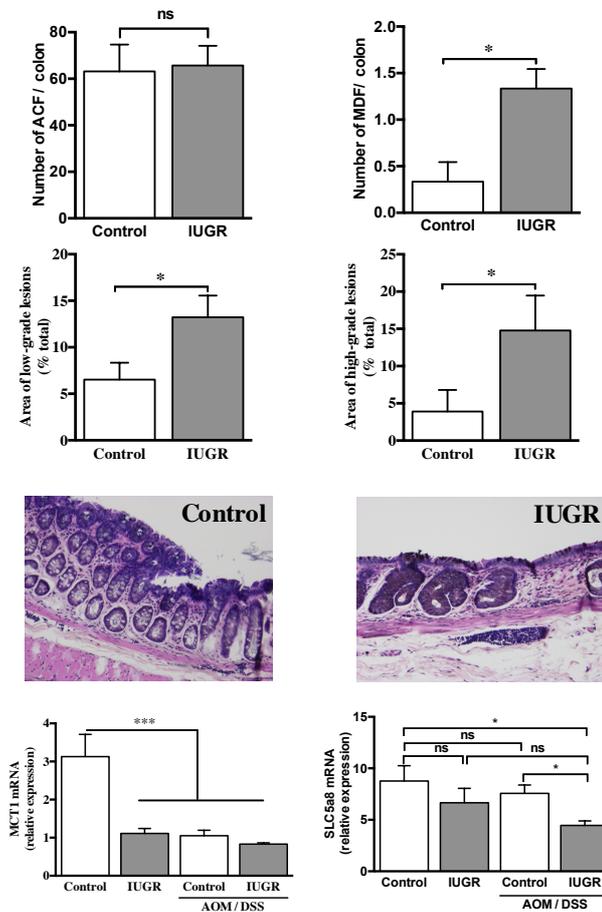


Figure 6: Increased susceptibility to colitis-associated CRC in IUGR rats.

Colitis-associated carcinogenesis was induced in adult rats of 120 days of age by a single intraperitoneal injection of azoxymethane (AOM) followed by 2.5% DSS in drinking water for 7 days and then no further treatment for 4 weeks. (A) Number of aberrant crypt foci (ACF) and mucin-depleted foci (MDF) in the whole colon of control and IUGR rats. (n=10 rats/group). (B) Number of low- and high-grade dysplastic lesions was measured in H&E-stained sections of distal colon from AOM/DSS-treated control and IUGR rats. Data are expressed as percent area of total colonic surface. (n=10/group). (C) Representative photographs of H&E stained sections of dysplastic mucosa from control and IUGR distal colon. (magnification x200). (D) RT-qPCR analysis of MCT1 and SLC5A8 mRNA expression in the distal colon of control and IUGR rats untreated or treated with AOM/DSS. (n=10/group). *P<0.05; *** P<0.001.

ARTICLE 2

Une supplémentation périnatale en 4-phénylbutyrate et en glutamine atténue le stress du réticulum endoplasmique et améliore la fonction barrière de l'épithélium colique chez les rats nés avec une restriction de croissance intra-utérine. *Soumis pour publication dans Journal of Nutritional Biochemistry (JNB)*

Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) peut altérer la structure et le fonctionnement de la barrière intestinale et augmenter le risque de maladie digestive à l'âge adulte. À l'aide d'un modèle de RCIU induit chez la rate gestante et allaitante par une restriction des apports protéiques, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de marqueurs de stress réticulum endoplasmique (RE) dans le côlon de la descendance RCIU. Ainsi, nous avons démontré que les rats RCIU de 120 jours présentaient une augmentation de l'expression de l'ARNm d'XBP1, un marqueur du stress RE. Nous avons également montré qu'un régime hyper lipidique (HF) induit un stress RE chez les animaux RCIU mais pas chez les rats témoins. Nous avons émis l'hypothèse que le stress RE pourrait contribuer aux altérations de la barrière du côlon, et que la supplémentation périnatale de modulateurs de ce stress, le phénylbutyrate et la glutamine (PG), pourrait prévenir ces altérations chez la descendance RCIU. Nous avons d'abord démontré qu'un stress du RE induit par la tunicamycine ou la thapsigargine augmentait la perméabilité paracellulaire de tissus coliques. Un traitement au PG permettait de prévenir cette augmentation. L'administration orale de PG à des rats concomitamment à une colite chimio-induite au dextran sulfate de sodium (DSS) permettait de réduire l'expression des ARNm des marqueurs de stress RE et favorisait la réparation de l'épithélium intestinal. Enfin, une supplémentation en PG durant la période périnatale lors de la gestation et de la lactation corrigeait partiellement l'augmentation de l'expression des marqueurs de stress RE et restaurait la profondeur des cryptes et le nombre de cellules caliciformes initialement diminués dans le côlon des rats RCIU. En contexte inflammatoire, durant une colite chimio-induite au DSS, la supplémentation en PG durant la période néonatale permet de réduire l'expression de l'ARNm d'XBPs et les scores histologiques d'inflammation chez les animaux RCIU.

En conclusion, ces données suggèrent qu'une supplémentation périnatale en phénylbutyrate et glutamine pourrait atténuer le stress RE et prévenir le dysfonctionnement de la barrière épithéliale chez les le nouveau-né RCIU.

Perinatal supplementation of 4-Phenylbutyrate and glutamine attenuates endoplasmic reticulum stress and improves colonic epithelial barrier function in rats born with intrauterine growth restriction

Axel Désir-Vigné¹, Vianney Haure-Mirande^{1,3}, Pierre de Coppet¹, Dominique Darmaun^{1,2}, Gwénola Le Dréan¹, Jean-Pierre Segain¹

¹INRA-Université de Nantes, UMR 1280 PhAN, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif (IMAD), Centre de Recherche en Nutrition Humaine Ouest (CRNHO), F-44093 Nantes, France.

²Nutrition Support Team, University hospital Hôtel-Dieu, F-44093 Nantes, France.

³Present address: Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, United States.

Running title: Perinatal prevention of intestinal barrier dysfunction

Corresponding author: Jean-Pierre Segain, PhD

Email: jean-pierre.segain@univ-nantes.fr

Mail address: INRA-Université de Nantes, UMR 1280 PhAN, CHU-Hôtel Dieu, F-44093 Nantes, France.

Grants: ADV is the recipient of fellowships from INRA and the SanTDige foundation.

Conflicts of interest: None

Abstract

Intrauterine growth restriction (IUGR) can affect the structure and function of the intestinal barrier and increase digestive disease risk in adulthood. Using a rat model of maternal dietary protein restriction, we previously found increased expression of endoplasmic reticulum (ER) stress markers in the colon of IUGR offspring. Here, we confirmed that 120-day-old IUGR rats displayed higher mRNA levels of the ER stress marker XBP1s and further showed that a high-fat diet induced a colonic ER stress in IUGR but not in control rats. We hypothesized that ER stress contributes to colonic barrier alterations and that perinatal supplementation of stress modulators, phenylbutyrate and glutamine (PG), could prevent these defects in IUGR offspring. We first demonstrated that ER stress induction by tunicamycin or thapsigargin increased the permeability of colonic tissues and that PG prevented this effect. Moreover, oral administration of PG to rats during dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis reduced mRNA levels of ER stress markers and improved intestinal recovery. Perinatal PG supplementation of IUGR dams during gestation and lactation partially prevented the increased expression of ER stress markers but completely reversed the strong reduction of crypt depth and goblet cell number observed in the colon of IUGR offspring. In DSS-induced injury and recovery experiments, the colon of IUGR rats showed higher XBP1s mRNA levels and histological scores of inflammation than IUGR rats with perinatal PG treatment. In conclusion, these data suggest that perinatal supplementation with PG could alleviate ER stress and prevent epithelial barrier dysfunction in IUGR offspring.

Keywords: Colon, IUGR, ER stress, epithelial barrier, colitis.

Chemical compounds: Phenylbutyrate (PubChem [CID:5258](#)); Glutamine (PubChem [CID:5961](#)); Tunicamycin (PubChem [CID:16760689](#)); Thapsigargin (PubChem [CID:446378](#));

1. Introduction

Intrauterine growth restriction (IUGR), which arises either from maternal undernutrition or poor fetal nutrition due to impaired placental function, leads to low birth weight below the 10th percentile for gestational age. IUGR is a common and important public health issue with a prevalence >30% in developing countries and around 8% in developed countries and is a leading cause of neonatal mortality and morbidity [1]. IUGR also increases the risk of developing chronic diseases in adulthood, including type-2 diabetes, obesity and cardiovascular diseases [2, 3]. Thus, IUGR is considered a relevant model for the study the developmental origins of health and disease (DOHaD) [2]. Epidemiological studies have reported that IUGR may also enhance the risk of developing gastrointestinal pathologies such as irritable bowel syndrome [4], inflammatory bowel disease (IBD) [5] and colorectal cancer (CCR) [6, 7]. Furthermore, recent animal studies have reported that IUGR induced long-lasting alterations of intestinal barrier function, including reduction of goblet and Paneth cell number and function, increased colonic permeability and impaired cell proliferation, differentiation and apoptosis [8-11]. In a well-established rat model of IUGR induced by maternal dietary protein restriction, we have found that IUGR offspring displayed in adulthood a maladaptive response to a high-fat (HF) diet characterized by a reduced expression and activity of intestinal alkaline phosphatase and a reduction of goblet cells in the jejunum [12]. In a transcriptomic analysis of colonic epithelial cells (CEC) isolated from IUGR rats, we found that HF diet induced in the colon of IUGR rats alterations of mitochondrial and endoplasmic reticulum (ER) genes expression, in particular markers of ER stress (GEO n°: GSE65051) [13]. In different models of IUGR, similar alterations have been reported in liver, muscle, and pancreas in different animal models of IUGR [14-17] and it was suggested that ER stress might be involved in IUGR pathophysiology and in long lasting effects upon several adult organs [18, 19].

ER stress is characterized by the accumulation of unfolded proteins in the ER lumen in response to an increase in protein synthesis or altered cellular homeostatic conditions disrupting protein folding. In response to this stress, cells initiate the unfolded protein response (UPR) attempting to restore protein folding and ER function. This intracellular signal transduction cascade is mediated by three ER sensors: inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase (PERK), and activating transcription factor 6 (ATF6) [20]. In the absence of ER stress, IRE1, PERK, and ATF6 are negatively regulated through their association with the molecular chaperone glucose-regulated protein 78 (GRP78), also known as BiP or HSPA5. In response to ER

stress, GRP78 dissociates and binds to unfolded proteins, allowing the activation of IRE1, PERK, and ATF6. IRE1 acts as an endonuclease to remove by an unconventional splicing, 26 nucleotides fragment from the unspliced X-box-binding protein 1 mRNA (XBP1u). The spliced XBP1 mRNA (XBP1s) is then translated to an active transcription factor. IRE1/XBP1 is the most conserved pathway of the UPR and has been suggested to play crucial roles in a wide range of biological processes including development, metabolism, immunity, and in pathological conditions such as diabetes or neurodegenerative diseases [21]. The UPR is particularly important in maintaining the homeostasis of the intestinal epithelial barrier. Indeed, a proper physiological UPR activation is necessary for actively secreting intestinal cells such as Paneth and goblet cells, which produce anti-microbial peptides and mucins, respectively [22]. Importantly, there are now strong evidence in human and animal studies that ER stress and UPR dysfunction, in particular XBP1 pathway, may contribute to the development of IBD and IBD-associated colorectal cancer [23-25].

Recent studies indicate that UPR pathway is a potential therapeutic target in ER stress-associated diseases including diabetes [26], obesity and dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice [27, 28]. It has been shown in animal models of diseases mentioned above that treatment with 4-phenylbutyrate (PBA), a chemical chaperone known to assist in protein folding, results in reduced UPR activation and amelioration of disease state [29, 30]. PBA is a Food and Drug Administration (FDA)-approved drug for the treatment of urea cycle disorder. After PBA is converted to phenylacetate in liver, phenylacetate combines with glutamine to produce phenylacetylglutamine, which is quantitatively excreted into urine. PBA thus serves as an ammonia scavenger, through the ‘trapping’ of glutamine (Gln) [31]. However, PBA has been shown to produce side effects, such as plasma Gln depletion and thus treatment of patients with urea cycle disorders are often combines PBA with amino acids supplementation [32]. Interestingly, it was recently reported that Gln can also attenuate ER stress and colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) in rats [33].

We hypothesized that perinatal protein undernutrition may program an ER stress causing alterations of the intestinal epithelial barrier in adulthood. The aim of this study was to determine whether perinatal administration of PBA associated with Gln (PG) in the context of maternal protein restriction could prevent IUGR-induced ER stress and the deleterious effects on intestinal barrier function in IUGR offspring. We first verified that PG treatment attenuated ER stress induction *ex vivo* on colonic tissues and *in vivo* on standard Sprague Dawley rats submitted to DSS-induced colitis. We then found that perinatal treatment with

PG alleviated ER stress in the colon of rats born with IUGR and improved the recovery of the epithelial barrier after DSS-induced injury.

2. Materials and methods

2.1. Animals and ethics statement

All animal studies were conducted in accordance with the European Union regulations for the care and use of animals for experimental procedures (2010/63/EU) and were approved by the Committee on Ethics in Animal Experiments of Pays de la Loire, France (Project N° 2012.173). Sprague Dawley rats (Janvier Labs, France) had free access to water and food and were maintained at a constant temperature ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) on a 12/12 h light/dark cycle.

2.2. IUGR induction and diets

IUGR was generated in Sprague Dawley female rats by maternal dietary protein restriction as previously described [12]. Briefly, pregnant rats (G1) were divided into 2 groups: a control (C) group fed a diet containing 20% (w/w) protein and an IUGR (I) group fed an isocaloric low-protein diet containing 8% protein (ABdiets, Arie Blok, the Netherlands; Table1). The 2 groups received these diets throughout gestation and lactation. After birth, litters were reduced to 8 male pups. At 21 days of age, all pups were weaned onto a standard chow containing 20% protein (AIN93, Safe, France; Table1). To investigate the impact of a HF diet on the expression of ER stress markers in colon, 120-day-old control and IUGR rats ($n=6/\text{group}$) were housed individually and either fed the standard chow or a HF diet containing 35.8 % (w/w) fat (Purified Diet 230 HF, Safe; Table1), for 21 days. Rats were euthanized by CO_2 asphyxiation followed by cervical dislocation. Proximal colons were collected, longitudinally opened and washed with cold PBS. Tissues were then snap frozen in liquid nitrogen for further RNA isolation and RT-qPCR analysis as described below.

2.3. Perinatal PG supplementation

For perinatal supplementation of PBA and Gln (PG treatment), pregnant (G1) dams were randomly allocated into the 4 following groups (4 dams / group) and received the different diets (Table 1) and supplements throughout pregnancy and lactation: 1) Control group (C): dams fed a diet containing 20% protein and drinking tap water; 2) PG-treated control group (CPG): dams fed a diet containing 20% protein and receiving Gln (1 g/kg/day) in drinking water and PBA (400 mg/kg/day) by gavage; 3) IUGR group (I): dams fed a diet containing 8% protein and drinking tap water; 4) PG-treated "IUGR" group (IPG): dams fed a diet

containing 8% protein and receiving Gln (1 g/kg/day) in drinking water and PBA (400 mg/kg/day) by gavage. Male rat offspring from the 4 experimental groups were weaned at 21 days of age and received a standard chow (AIN93, Safe, France. Table1). At 120 days of age, rats were submitted to DSS-induced colitis and recovery experiments as described below. The whole colon was removed, and colon samples (proximal and distal) were collected for RNA isolation and histological analysis.

2.4. *Ex vivo* induction and prevention of ER stress in colonic tissue

Cecum and proximal colons were collected from 120-day-old healthy Sprague Dawley rats (n=5). Proximal colons were opened, washed with PBS and cut into 0.5 x 0.5 cm pieces. Colonic pieces were distributed into 12-well plate, containing 2 mL of RPMI medium (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Tissues were pretreated with or without PBA and Gln (Sigma; 10 mM final concentration each) for 15 min at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator and incubated with tunicamycin (Tm) or thapsigargin (Tg) (Calbiochem, EMD Millipore; 6 µg/mL and 2µM, respectively) for 90 minutes. Tissues were then rinsed with PBS, and total RNA was isolated with Trizol® reagent (ThermoFisher Scientific) for RT-PCR analysis as described below. In parallel, permeability was evaluated on cecal tissue samples mounted in Ussing chambers (Physiologic Instrument, San Diego, CA), as previously described [9]. Tissues were bathed in oxygenated Krebs solution (Sigma) supplemented with 10 mM mannitol on the mucosal side and 10 mM glucose on the serosal side. Tissues were pretreated with PBA and Gln (10 mM final concentration each) for 15 min before addition of Tm or Tg (6 µg/mL and 2µM, respectively) and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled dextran-4-kDa (FD4, Sigma) on the mucosal side. Fluorescence was measured at the serosal side after 45 minutes to calculate the flux of FD4 (µg/h). Results are expressed as the percentage of FD4 flux in control tissues.

2.5. Colitis and recovery experiments

For colitis/recovery experiments, 120-day-old rats received drinking water alone or drinking water supplemented with 2.5% dextran sodium sulfate (DSS, MP Biomedicals) for five days. Animals were then switched to drinking water alone for three days to allow recovery. In experiments evaluating the effect of an oral administration of PBA/Gln (PG) association during colitis/recovery experiments, a group of healthy rats (120-day-old, n=10) received 2.5% DSS and Gln (1 g/kg/day) in drinking water and PBA (400 mg/kg/d) by gavage for 5 days followed by drinking water alone for 3 days to allow recovery. Rats were weighed daily

throughout the experimental period. At the end of the experiment, rats were euthanized by CO₂ asphyxiation and cervical dislocation. The whole colon was removed, opened longitudinally and washed with PBS. A tissue sample composed of 1 cm of the beginning of the distal colon was snap frozen in liquid nitrogen and further processed for RNA isolation. The remaining distal colon was "swiss-rolled" for histological analysis.

2.6. Histological assessment

"Swiss-rolled" colons were fixed in 4% paraformaldehyde for 24h. Tissues were paraffin embedded (Leica Microsystem®) and processed for histology and immunohistochemistry using the Cellular and Tissular Imaging (MicroPICell) core facility of Nantes University. Histologic assessment and goblet cell counting were performed on 5 µm tissue sections stained with hematoxylin and eosin (H&E) and periodic acid-Schiff (PAS), respectively, according to standard protocols [12]. Whole slide images (magnification, x40) were acquired with a NanoZoomer® slide scanner (Hamamatsu Photonics), and morphometric analyses were performed using NDP.view 1.2.47 software (Hamamatsu Photonics). Goblet cell number and crypt depth were measured in 10 full-size, well-oriented crypts per section. Measurements were averaged per animal prior to statistical analysis. Images were acquired with x10 objective using an Olympus microscope (BX51) equipped with a digital camera (DP50, Olympus).

2.7. Histological score of colitis

Histological score of inflammation was assessed on H&E stained sections by two investigators blinded to the treatment received. Scoring was adapted from [34] and determined as the sum of scores for intestinal architecture and crypt damages (0-3), immune cell infiltration (0-3) and percent involvement (0-4). Macrophage infiltration was assessed by immunostaining of the macrophage marker CD68. Briefly, after heat-treatment in citrate buffer (pH 6.0) for antigen retrieval, tissue sections were incubated with mouse anti-rat CD68 mAb (MCA341GA, BioRad) diluted (1:100) in PBS containing 3% BSA. After washes, sections were then stained with an anti-mouse HRP-conjugated antibody (Nichinei Biosciences, Japan) and the DAB substrate (Vector Laboratories). Sections were counterstained with H&E and images were acquired using an Olympus microscope (BX51) equipped with a DP50 digital camera.

2.8. RNA isolation and Real Time-quantitative Polymerase chain reaction (RT-qPCR)

RNA isolation and RT-qPCR were performed as previously described [12]. Briefly, one microgram of RNA was reverse-transcribed using Superscript III Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. RT-qPCR was performed using a Bio-Rad iCycler iQ system using the iQ SYBRGreen Supermix PCR kit (Bio-Rad Laboratories) and primers listed in Table 2. Ct values were normalized to the expression level of β -actin, and relative gene expression was calculated for each sample using the $\Delta\Delta$ Ct method [35].

2.9. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. The significance of differences between groups was determined by Mann-Whitney *U* tests, using Prism® software (Prism 5.0, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Differences were considered significant if p-value<0.05.

3. Results

3.1. Maternal dietary protein restriction increases mRNA expression of ER stress markers in the colon of IUGR offspring.

In the IUGR rat model of maternal protein restriction, preliminary data suggested that the presence of an ER stress in the colonic epithelium of adult IUGR rats [13]. To monitor the onset of ER stress during the life course of rat offspring, mRNA levels of the spliced form XBP1s were measured by RT-qPCR in the colon of control and IUGR rats at various ages. In comparison to control rats, we noticed a trend to an increase in XBP1s mRNA expression in the colon of IUGR rats by the age of 35 days ($P=0.054$) and a high significant increase in 120-day-old IUGR rats ($P<0.001$; Fig. 1A). We have previously reported that IUGR rats at 240-day presented a maladaptive response of the intestinal epithelium to a HF diet in comparison to control rats [12]. We assessed whether exposure to a HF diet exacerbates ER stress in the colon of 120-day-old IUGR rats. Twenty-one days of HF diet induced an increased expression of XBP1s in the colon of IUGR rats as compared to IUGR rats fed a normal diet ($P = 0.01$; Fig. 1B) whereas no differences were observed in control rats (Fig. 1B). Thus, this data suggests an increased susceptibility of IUGR rat colon to HF-induced ER stress. We therefore decided to analyze the effect of perinatal treatment in offspring at the age of 120 days.

3.2. Induction of ER stress in rat colonic tissues leads to an increase in colonic permeability that is prevented by PG treatment.

To verify the ability of PG to alleviate the ER stress, colonic tissues, collected from 120-day-old healthy rats, were incubated in culture medium with PG before stimulation with tunicamycin (Tm) or thapsigargin (Tg), two broadly used ER stressors. As expected, RT-qPCR analysis revealed that both Tm and Tg induced an increase in XBP1s mRNA expression in colonic tissues ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively; Fig. 2A). Pretreatment of tissues with PG abolished the effects of Tm and Tg on XBP1s mRNA expression (Fig. 2A, $P<0.05$). The levels of unspliced XBP1u mRNA in colonic tissues were not modified by any treatment (Fig. 2B).

Since induction of an ER stress has been associated with an increased intestinal permeability [36, 37], we evaluated if PG could prevent this effect. Treatment of colonic tissues mounted in Ussing chambers with either Tm or Tg induced a significant increase of the paracellular flux of FITC-dextran ($P<0.05$ and $P<0.001$, respectively; Fig. 2C). Notably, the increase in colonic permeability induced by Tm or Tg was abolished by pretreatment of tissues with PG ($P<0.05$ and $P<0.01$, respectively; Fig. 2C).

3.3. Oral administration of PG to rats alleviates ER stress during DSS-induced colitis and improves intestinal recovery.

Mucosal healing is considered an important therapeutic goal for IBD patients [38]. Since ER stress may contribute to intestinal inflammation, we sought to determine the capacity of an oral administration of PG to modulate ER stress and improve recovery after a mild colitis induced by DSS in a group of 120-day-old healthy rats. Rats received drinking tap water alone (Control rats) or drinking water containing 2.5% DSS without (DSS rats) or with PG treatment (DSS-PG rats) for 5 days. The rats were examined after a recovery phase of 3 days in which rats returned to normal drinking water. As expected, colons of rats treated with DSS had higher histological scores of inflammation than colons of untreated controls ($P<0.01$; Fig. 3A). Colonic mucosa of DSS-treated group showed ulceration areas and inflammatory cell infiltrates. The epithelium of these rats was partially exfoliated and presented a loss of goblet cells and crypt architecture (Fig. 3A). In DSS-PG rats, PG treatment allowed a significant reduction ($P<0.05$) of histological scores of inflammation. The colonic mucosa of these rats showed a normal appearance with a continuous epithelium. However, the decrease in goblet cell number and defect in crypt architecture observed after DSS administration were not completely reversed by PG treatment (Fig. 3A).

We next analyzed mRNA expression of ER stress markers in colonic tissues from the different rat groups. RT-qPCR analysis showed that in comparison to control rats, colonic tissues from DSS rats had higher XBP1s and GRP78 mRNA levels ($P<0.05$), highlighting that colonic ER stress was still present after the recovery phase (Fig. 3B). Interestingly, concomitant treatment with PG significantly prevented the increase in XBP1s and GRP78 mRNA expression induced by DSS ($P<0.001$ and $P<0.01$, respectively; Fig. 3B). In addition, while control and DSS rats had similar levels of IRE1 mRNA, PG treatment significantly decreased IRE1 mRNA in DSS-PG rats ($P<0.01$; Fig. 3B). This data suggests that oral administration of PG during colitis alleviates ER stress and improve mucosal healing.

3.4. PG treatment during perinatal period partially attenuates the increased expression of ER stress markers in the colon of IUGR offspring and prevents epithelial barrier defects

Our group has previously reported a reduction in the number of goblet cells in the colon of IUGR rats [39], a situation that is also associated with ER stress [40]. Thus, we evaluated whether an oral administration of PG during the perinatal period could prevent or attenuate ER stress and goblet cell depletion in the colon of IUGR rats at the age of 120 days.

We first analyzed the expression level of mRNA of ER stress markers in the colon of control and IUGR rats without or with perinatal PG treatment (CPG and IPG rats, respectively). RT-qPCR analysis confirmed a significantly increased expression of IRE1 and XBP1s mRNA in the colon of IUGR rats in comparison to Control rats ($P<0.05$ and $P<0.01$, respectively; Fig. 4A). However, GRP78 mRNA levels were similar between groups (Fig. 4A). In IUGR rats, perinatal PG treatment (IPG rats) significantly prevented the increase in colonic expression of IRE1 mRNA observed in IUGR rats ($P<0.01$) but did not affect mRNA expression levels of XBP1s and GRP78 (Fig. 4A). Surprisingly, in control rats, perinatal PG treatment (CPG rats) was associated with an increased expression of XBP1s mRNA ($P<0.01$) as compared with untreated control rats (C) (Fig 4A). However, IRE1 and GRP78 mRNA levels were similar in control and CPG rats (Fig. 4A).

We next explored the effect of perinatal PG treatment on crypt architecture and goblet cell density in the colon of control and IUGR adult rats. Histological analysis of H&E-stained colon sections showed a significant lower crypt depth in IUGR rats compared with control rats ($P<0.001$; Fig. 4B). Perinatal PG treatment in IPG rats prevented the decrease in crypt depth observed in IUGR rats but did not affect crypt depth in CPG rats (Fig. 4B). Furthermore, PAS staining of mucins revealed a drastic reduction in goblet cell number in

colonic crypts of IUGR rats as compared to control rats, especially in the upper two-thirds of the crypt ($P<0.001$; Fig. 4C and D). Perinatal PG treatment in IPG rats significantly restored goblet cell number and distribution, whereas PG treatment in CPG rats had no significant effect on goblet cell number as compared to control rats (Fig 4C and D). These data suggest that despite a slight modulation of some UPR target genes, perinatal PG treatment could improve epithelial barrier function in IUGR rats.

3.5. Perinatal PG treatment in the context of maternal protein restriction alleviates ER stress during DSS-induced colitis and improves intestinal recovery in IUGR offspring.

Given that results presented herein pointed to a beneficial effect of perinatal PG treatment in (1) attenuating ER stress and (2) preventing epithelial barrier defects in IUGR rats, we sought to determine if a perinatal PG treatment could improve recovery after colitis induced by DSS in adult IUGR. Thus, 120-day-old IUGR rats without or with perinatal PG treatment (IPG) received 2.5% DSS for 5 days followed by 3 days of regular drinking water to investigate ER stress and intestinal recovery.

As previously shown (Fig. 4A), perinatal PG supplementation in IPG rats only reduced the steady-state level of IRE1 mRNA observed in the colon of IUGR rats without affecting GRP78 and XBP1s mRNA expression (Fig. 5A). As for standard rats (Fig. 3), a DSS challenge increased the expression of GRP78 and XBP1s mRNAs in the colon of IUGR rats without modification of IRE1 expression level (I vs I-DSS; $P<0.05$; Fig. 5A). In IPG rats, this DSS-increased mRNA expression was significantly reduced for XBP1s but not for GPR78 (I-DSS vs IPG-DSS; $P<0.05$; Fig. 5A). No significant change was observed in colonic mRNA level of IRE1 among the different rat groups (Fig. 5A).

We performed histological scoring on H&E-stained colonic tissue sections of the different groups. Basal scores of inflammation were not different between I and IPG rats (Fig. 5B). DSS treatment significantly elevated histological scores of inflammation in both I and IPG rats (I vs I-DSS and IPG vs IPG-DSS, $P<0.01$; Fig. 5B). However, the scores of inflammation after DSS injury and recovery were significantly lower in IPG rats (I-DSS vs IPG-DSS, $P<0.05$; Fig 5A). Histological examination of I-DSS colonic sections showed partially exfoliated surface epithelia, a loss of crypt architecture with scattered goblet cells and an intense immune cell infiltrate around the crypts (Fig 5B). By contrast, colonic sections from IPG-DSS rats presented a moderate loss of crypts architecture and goblet cells, and decreased ulceration and immune cell infiltrate were observed (Fig 5B). Immunohistological analysis of the CD68 macrophage marker revealed a higher macrophage infiltration in the colonic

mucosa of I-DSS rats than in IPG-DSS rats (Fig. 5C). Despite a relatively modest impact on ER stress, when taken together, these results suggest that perinatal PG treatment attenuates DSS-induced injury and/or improves epithelium repair capacity in adult IUGR rats.

4. Discussion

To the best of our knowledge, the current study is the first to report in a rat model of IUGR, that maternal protein restriction affects the UPR pathway and generates an ER stress in the colon of offspring in adulthood. Colonic ER stress in IUGR rats is associated with alterations of the epithelial barrier illustrated by a reduction of crypt depth and goblet cell number. Moreover, we show that PG treatment in perinatal period can attenuate ER stress and reinforce intestinal epithelial barrier function in IUGR rat offspring. These data may hold promise as a preventive measure to reduce the long-term risk of intestinal disease.

IUGR is a known risk factor for necrotizing enterocolitis in the first few weeks of life, highlighting poor intestinal function of IUGR infants [41], and epidemiological data suggest that it may predispose to chronic gastrointestinal diseases in adulthood as well [4-7]. Also, recent studies in several animal models of IUGR have brought evidence for altered structure and function of the intestinal barrier [8-12]. Thus, in a mouse model of maternal hypertension induced by infusion of a thromboxane A₂-analog, it was recently shown that IUGR offspring present a decreased number of goblet and Paneth cells in the ileum [10]. In the present study, we confirm previous findings from our group showing that IUGR rats born from dams fed a low-protein diet have a reduction of crypt depth and goblet cell number in the colonic epithelium [8]. We further report that these alterations are associated with upregulation of the expression of the UPR genes, XBP1s and IRE1 in the colon of 120-day-old IUGR rats, thus suggesting the presence of an ER stress. A proper ER function is particularly important for goblet and Paneth cells which are key players of the intestinal barrier through the sustained synthesis of mucins and antimicrobial peptides, respectively [21, 22]. ER stress-induced goblet and Paneth cell dysfunction is increasingly recognized to be both a consequence as well as a primary factor in IBD [22-24, 40, 42]. In the present study, we also demonstrate that direct induction of ER stress by tunicamycin or thapsigargin results in an increase in colonic permeability, which is also a common feature in IBD.

While ER stress is associated with short-term adaptation to maternal insult in fetal life, recent studies suggest that ER stress may persist from fetal life into adulthood in offspring submitted to adverse *in utero* environment [43]. Consistent with the predictive adaptive response hypothesis, ER stress may be a consequence of the mismatch between the *in utero*

environment characterized by protein deprivation and the later exposure to nutritional affluence in which the demand for protein synthesis exceeds the ER capacity. Accordingly, we found that XBP1s mRNA expression rose by the age of 35 days in IUGR rats in the context of a diet enriched in protein. This is also underpinned by the finding that chronic exposure of IUGR rats to a HF diet increased the colonic expression of XBP1s mRNA attesting for an increased susceptibility to ER stress in the colon of IUGR rats. Interestingly, it was recently suggested that free fatty acids induce a mild ER stress in pancreatic β -cells that exacerbate local inflammation via the IRE1/XBP1s pathway [44]. We previously reported that 240-day-old IUGR-born rats had an inappropriate response of the intestinal epithelium to a HF diet associated with a reduction of goblet cell number [12] and an increased colonic permeability associated with a hypertrophy of adipose tissue surrounding the cecum and the proximal colon [9]. One could speculate that fatty acids, systemically or locally released, may generate a mild chronic ER stress contributing to alterations of the colonic epithelial barrier. This is consistent with recent data showing that HF diets induce an oxidative and ER stress in colonic goblet cells resulting in reduced protein synthesis and mucus barrier [45]. Our present data suggests that this effect could be amplified in IUGR rats. However, ER stress can also be induced by reactive oxygen species (ROS), which are mainly produced in the cell by mitochondria [20]. The concept of mitochondrial programming as an adaptive response to a poor intrauterine nutritional environment has also been underpinned by numerous studies showing mitochondrial dysfunction in muscle, liver or pancreas in adulthood [14-17]. Interestingly, it was reported that mitochondrial dysfunction leads to an increased production of ROS in the liver and pancreas of IUGR rat offspring [14, 16]. Liu et al. reported in pigs born with IUGR that mitochondrial dysfunctions in skeletal muscle are exacerbated when animals are fed a HF diet [17]. Importantly, a recent study showed that the small intestine of IUGR piglets displayed an increased permeability and a decreased mRNA expression of anti-oxidant enzymes [11]. Together, these data suggest that IUGR could predispose the intestinal barrier to an oxidative stress resulting from mitochondrial and ER dysfunctions.

Whatever the origin of ER stress in adult IUGR rat colon, we sought to explore whether perinatal administration of ER stress modulators, the chemical chaperone PBA associated with Gln (PG), could prevent IUGR-induced ER stress and its deleterious effects upon intestinal barrier function in IUGR offspring. Consistent with the protective role of ER chaperones in intestinal homeostasis, our data obtained *ex vivo* first indicate that PG reduces ER stress signaling induced by two ER stressors, Tm and Tg, in colonic tissues. Previous studies indicate that ER stress may impede barrier integrity and increase intestinal

permeability [36, 37]. Consistent with these studies, we found that Tm and Tg, effectively induce a rapid increase in colonic permeability assessed *ex vivo* in Ussing chambers. PG treatment of colonic tissues prevented ER stress-induced permeability. We further show the *in vivo* efficacy of an oral administration of PG to alleviate colonic ER stress and to improve intestinal recovery after a mild colitis induced in rats by DSS. Indeed PG treatment during colitis/recovery experiments reduces mRNA levels of UPR genes and histological scores of inflammation. Interestingly, previous studies demonstrated that PBA can attenuate ER stress and the epithelial barrier defects during DSS-induced colitis [27, 28], while similar effects were reported for Gln in rats with TNBS-induced colitis [33]. Taken together, these *ex vivo* and *in vivo* experiments form the rationale for the assessment of perinatal prevention of colonic defects in IUGR offspring at the age of 120 days. Perinatal administration of PG, only partially corrected ER stress in the colon of IUGR rats as suggested by the decrease of IRE1 mRNA expression. Surprisingly, PG treatment of control dams fed an adequate diet induced an increased expression of XBP1 mRNA in the colon of offspring suggesting the presence of an ER stress. It is difficult to interpret this effect and further investigation will be required. Despite the modest effect on ER stress, perinatal PG treatment significantly restores epithelial barrier integrity of IUGR rats by reinstating goblet cells number and crypt depth. Goblet cells provide mucosal protection and facilitate epithelial barrier repair, notably through production of mucins. Increased expression of mucins is observed during colitis, which may favor mucosal healing [46]. Herein, we show that perinatal PG treatment in the context of maternal protein restriction, improves recovery of the colonic epithelium after DSS-induced injury in IUGR rat offspring. This effect was associated with reduction of histological score of inflammation and immune cell infiltration. IUGR-born adult rats that received a perinatal PG treatment have reduced colonic mRNA levels of IRE1 ~~XBP1s~~ in comparison to untreated IUGR offspring. This finding could explain, at least in part, the beneficial effects on epithelial barrier recovery.

Indeed, PBA which is chemically related to the short-chain fatty acid butyrate, is also a well-known inhibitor of histone deacetylase (HDAC). Regulation of HDAC activities by butyrate has a crucial role in the maturation process of the colonic epithelium, which includes cell proliferation, differentiation, and apoptosis [47]. Interestingly, it was demonstrated that HDAC inhibition during DSS- and TNBS-induced colitis in mouse is a promising anti-inflammatory strategy [48]. However, HDAC are important chromatin modifying enzymes, which modulate gene expression through deacetylation of histones without altering DNA sequence. Epigenetic events, including DNA methylation and posttranscriptional

modifications of histones (e.g., acetylation), are particularly important during development. Epigenetics is responsible for cell- and tissue-specific gene expression during differentiation and for developmental plasticity in response to environmental cues such as nutrition [49]. Importantly, epigenetic mechanisms are at the basis of the fetal programming origin of disease hypothesis [50]. It has been reported that supplementation of maternal diet with methyl donors (e.g., methionine, folate, choline) increases the susceptibility to colitis in mouse offspring [51]. Therefore, it is conceivable that maternal supplementation with PBA could affect gene expression through HDAC inhibition during development and that early epigenetic modifications could influence epithelial barrier homeostasis. Further studies would be warranted to verify this hypothesis and to more deeply investigate potential side effects.

Despite the major adverse outcomes associated with IUGR in humans, no effective therapy is currently available for its prevention and treatment, except for low-dose aspirin [52, 53], predominantly because of the lack of understanding about the underlying mechanisms and the complexity of the pathophysiology of IUGR. During the neonatal period, morphogenesis, cell proliferation, differentiation, and apoptosis lead to extensive gut remodeling. This period confers to organs a great susceptibility to changes in the intrauterine environment but it also represents a critical window for putative therapies designed to correct the short and long-lasting consequences of IUGR. Perinatal improvement of ER function could prevent ER stress in intestinal epithelial cells, especially goblet and Paneth cells and thus attenuate epithelial barrier dysfunctions and the risk of gastrointestinal disease in individuals born with IUGR. The therapeutic potential of PBA is currently evaluated in clinical trials for the treatment of a number of diseases that are associated with protein misfolding, ER stress and inflammation, including Huntington's disease, obesity and type-2 diabetes [54, 55]. Chemical enhancement of ER function provides a groundbreaking approach to prevent ER stress and colonic epithelial barrier alterations associated with IUGR due to the safety profile for oral delivery PBA. To date, little is known about the effects of PBA in pregnancy and no information on teratology of this drug exists. A case report, however, indicates that a long-term treatment with PBA during pregnancy in a woman with a urea cycle disorder did not lead to deleterious consequences for the fetus [56]. In our study, PBA association with Gln was motivated by the observations of Darmaun and colleagues [32] suggesting that oral PBA administration produces depletion of plasma Gln depletion. Moreover, Gln supplementation remains particularly relevant in the context of our study since recent data suggest that Gln can improve colonic barrier repair and alleviate ER stress as well as inflammation in a mice colitis model [33]. Furthermore, new therapies to prevent or treat

IUGR by enhancing amino acid availability in maternal diets or maternal circulation indicate encouraging efficacy of Gln supplementation to correct IUGR [57]. Here, our data reinforce the role of perinatal Gln supplementation in preventing barrier dysfunction that could occur in IUGR at adulthood.

In conclusion, our data suggest that IUGR may program ER function, leading to an ER stress in the colon of adult offspring. In turn, ER stress may induce or participate to the alterations of intestinal barrier function. Based on our findings, the chemical chaperone PBA associated with Gln may warrant investigation as maternal dietary supplements for the prevention of gastrointestinal pathologies associated with IUGR. While the efficacy of PBA on colitis appears to involve the suppression of ER stress, further studies are required to elucidate the precise mechanisms of action.

Acknowledgments

We thank Mr. Christian Bonnet for skillful technical assistance and the MicroPicell-Biogenouest platform.

References

- [1] McIntire DD, Bloom SL, Casey BM, Leveno KJ. Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *The New England journal of medicine*. 1999;340(16):1234-8. Epub 1999/04/22. doi: 10.1056/nejm199904223401603. PubMed PMID: 10210706.
- [2] Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environmental health : a global access science source*. 2012;11:42. Epub 2012/06/22. doi: 10.1186/1476-069x-11-42. PubMed PMID: 22715989; PubMed Central PMCID: PMC3384466.
- [3] Hanson MA, Gluckman PD. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiological reviews*. 2014;94(4):1027-76. Epub 2014/10/08. doi: 10.1152/physrev.00029.2013. PubMed PMID: 25287859; PubMed Central PMCID: PMC4187033.
- [4] Bengtson MB, Ronning T, Vatn MH, Harris JR. Irritable bowel syndrome in twins: genes and environment. *Gut*. 2006;55(12):1754-9. Epub 2006/09/30. doi: 10.1136/gut.2006.097287. PubMed PMID: 17008364; PubMed Central PMCID: PMC1856463.
- [5] Khalili H, Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Richter JM, Fuchs CS, Chan AT. Early life factors and risk of inflammatory bowel disease in adulthood. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19(3):542-7. Epub 2013/02/23. doi: 10.1097/MIB.0b013e31828132f8. PubMed PMID: 23429446; PubMed Central PMCID: PMC3712531.
- [6] Nilsen TI, Romundstad PR, Troisi R, Potischman N, Vatten LJ. Birth size and colorectal cancer risk: a prospective population based study. *Gut*. 2005;54(12):1728-32. Epub 2005/04/22. doi: 10.1136/gut.2004.060475. PubMed PMID: 15843419; PubMed Central PMCID: PMC1774802.
- [7] Sandhu MS, Luben R, Day NE, Khaw KT. Self-reported birth weight and subsequent risk of colorectal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American*

- Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2002;11(9):935-8. Epub 2002/09/12. PubMed PMID: 12223442.
- [8] Fanca-Berthon P, Michel C, Pagniez A, Rival M, Van Seuning I, Darmaun D, et al. Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats. *Pediatric research*. 2009;66(1):47-52. Epub 2009/03/17. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181a2047e. PubMed PMID: 19287349.
- [9] Le Dréan G, Haure-Mirande V, Ferrier L, Bonnet C, Hulin P, de Coppet P, et al. Visceral adipose tissue and leptin increase colonic epithelial tight junction permeability via a RhoA-ROCK-dependent pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014;28(3):1059-70. Epub 2013/11/19. doi: 10.1096/fj.13-234203. PubMed PMID: 24243887.
- [10] Fung CM, White JR, Brown AS, Gong H, Weitkamp JH, Frey MR, et al. Intrauterine Growth Restriction Alters Mouse Intestinal Architecture during Development. *PloS one*. 2016;11(1):e0146542. Epub 2016/01/09. doi: 10.1371/journal.pone.0146542. PubMed PMID: 26745886; PubMed Central PMCID: PMC4706418.
- [11] Wang W, Degroote J, Van Ginneken C, Van Poucke M, Vergauwen H, Dam TM, et al. Intrauterine growth restriction in neonatal piglets affects small intestinal mucosal permeability and mRNA expression of redox-sensitive genes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2016;30(2):863-73. Epub 2015/10/31. doi: 10.1096/fj.15-274779. PubMed PMID: 26514167.
- [12] Lalles JP, Orozco-Solis R, Bolanos-Jimenez F, de Coppet P, Le Drean G, Segain JP. Perinatal undernutrition alters intestinal alkaline phosphatase and its main transcription factors KLF4 and Cdx1 in adult offspring fed a high-fat diet. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2012;23(11):1490-7. Epub 2012/03/13. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.10.001. PubMed PMID: 22405696.
- [13] Segain J LDG, Guardiola P, Haure-Mirande V, de Coppet P. Transcriptomic analysis of colonic epithelial cells in adult rats born with intra-uterine growth retardation. *GEO*. 2015:GEO accession n°: GSE65051.
- [14] Peterside IE, Selak MA, Simmons RA. Impaired oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria in growth-retarded rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2003;285(6):E1258-66. Epub 2003/11/11. doi: 10.1152/ajpendo.00437.2002. PubMed PMID: 14607783.
- [15] Park KS, Kim SK, Kim MS, Cho EY, Lee JH, Lee KU, et al. Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. *The Journal of nutrition*. 2003;133(10):3085-90. Epub 2003/10/02. PubMed PMID: 14519789.
- [16] Theys N, Bouckenoghe T, Ahn MT, Remacle C, Reusens B. Maternal low-protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2009;297(5):R1516-25. Epub 2009/09/18. doi: 10.1152/ajpregu.00280.2009. PubMed PMID: 19759337.
- [17] Liu J, Chen D, Yao Y, Yu B, Mao X, He J, et al. Intrauterine growth retardation increases the susceptibility of pigs to high-fat diet-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *PloS one*. 2012;7(4):e34835. Epub 2012/04/24. doi: 10.1371/journal.pone.0034835. PubMed PMID: 22523560; PubMed Central PMCID: PMC3327708.
- [18] Yung HW, Calabrese S, Hynx D, Hemmings BA, Cetin I, Charnock-Jones DS, et al. Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction. *The American journal of pathology*. 2008;173(2):451-62. Epub 2008/06/28. doi: 10.2353/ajpath.2008.071193. PubMed PMID: 18583310; PubMed Central PMCID: PMC2475782.
- [19] Vo T, Hardy DB. Molecular mechanisms underlying the fetal programming of adult disease. *Journal of cell communication and signaling*. 2012;6(3):139-53. Epub 2012/05/25. doi: 10.1007/s12079-012-0165-3. PubMed PMID: 22623025; PubMed Central PMCID: PMC3421023.

- [20] Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008;454(7203):455-62. Epub 2008/07/25. doi: 10.1038/nature07203. PubMed PMID: 18650916; PubMed Central PMCID: PMCPMC2727659.
- [21] Kaufman RJ, Cao S. Inositol-requiring 1/X-box-binding protein 1 is a regulatory hub that links endoplasmic reticulum homeostasis with innate immunity and metabolism. *EMBO molecular medicine*. 2010;2(6):189-92. Epub 2010/06/10. doi: 10.1002/emmm.201000076. PubMed PMID: 20533428; PubMed Central PMCID: PMCPMC3042734.
- [22] Kaser A, Blumberg RS. Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation. *Mucosal immunology*. 2010;3(1):11-6. Epub 2009/10/30. doi: 10.1038/mi.2009.122. PubMed PMID: 19865077; PubMed Central PMCID: PMCPMC4592136.
- [23] Niederreiter L, Fritz TM, Adolph TE, Krismer AM, Offner FA, Tschurtschenthaler M, et al. ER stress transcription factor Xbp1 suppresses intestinal tumorigenesis and directs intestinal stem cells. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(10):2041-56. Epub 2013/09/18. doi: 10.1084/jem.20122341. PubMed PMID: 24043762; PubMed Central PMCID: PMCPMC3782039.
- [24] Kaser A, Lee AH, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*. 2008;134(5):743-56. Epub 2008/09/09. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.021. PubMed PMID: 18775308; PubMed Central PMCID: PMCPMC2586148.
- [25] Bertolotti A, Wang X, Novoa I, Jungreis R, Schlessinger K, Cho JH, et al. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(5):585-93. Epub 2001/03/10. doi: 10.1172/jci11476. PubMed PMID: 11238559; PubMed Central PMCID: PMCPMC199427.
- [26] Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science (New York, NY)*. 2006;313(5790):1137-40. Epub 2006/08/26. doi: 10.1126/science.1128294. PubMed PMID: 16931765; PubMed Central PMCID: PMCPMC4741373.
- [27] Cao SS, Zimmermann EM, Chuang BM, Song B, Nwokoye A, Wilkinson JE, et al. The unfolded protein response and chemical chaperones reduce protein misfolding and colitis in mice. *Gastroenterology*. 2013;144(5):989-1000.e6. Epub 2013/01/23. doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.023. PubMed PMID: 23336977; PubMed Central PMCID: PMCPMC3751190.
- [28] Ono K, Nimura S, Nishinakagawa T, Hideshima Y, Enyoji M, Nabeshima K, et al. Sodium 4-phenylbutyrate suppresses the development of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Experimental and therapeutic medicine*. 2014;7(3):573-8. Epub 2014/02/13. doi: 10.3892/etm.2013.1456. PubMed PMID: 24520247; PubMed Central PMCID: PMCPMC3919895.
- [29] Perlmutter DH. Chemical chaperones: a pharmacological strategy for disorders of protein folding and trafficking. *Pediatric research*. 2002;52(6):832-6. Epub 2002/11/20. doi: 10.1203/00006450-200212000-00004. PubMed PMID: 12438657.
- [30] de Almeida SF, Picarote G, Fleming JV, Carmo-Fonseca M, Azevedo JE, de Sousa M. Chemical chaperones reduce endoplasmic reticulum stress and prevent mutant HFE aggregate formation. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(38):27905-12. Epub 2007/07/13. doi: 10.1074/jbc.M702672200. PubMed PMID: 17626021.
- [31] Burlina AB, Ogier H, Korall H, Trefz FK. Long-term treatment with sodium phenylbutyrate in ornithine transcarbamylase-deficient patients. *Molecular genetics and metabolism*. 2001;72(4):351-5. Epub 2001/04/05. doi: 10.1006/mgme.2001.3156. PubMed PMID: 11286510.
- [32] Darmaun D, Welch S, Rini A, Sager BK, Altomare A, Haymond MW. Phenylbutyrate-induced glutamine depletion in humans: effect on leucine metabolism. *The American journal of physiology*. 1998;274(5 Pt 1):E801-7. Epub 1998/06/05. PubMed PMID: 9612237.
- [33] Crespo I, San-Miguel B, Prause C, Marroni N, Cuevas MJ, Gonzalez-Gallego J, et al. Glutamine treatment attenuates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in TNBS-induced colitis. *PLoS one*. 2012;7(11):e50407. Epub 2012/12/05. doi: 10.1371/journal.pone.0050407. PubMed PMID: 23209735; PubMed Central PMCID: PMCPMC3508929.

- [34] Williams KL, Fuller CR, Dieleman LA, DaCosta CM, Haldeman KM, Sartor RB, et al. Enhanced survival and mucosal repair after dextran sodium sulfate-induced colitis in transgenic mice that overexpress growth hormone. *Gastroenterology*. 2001;120(4):925-37. Epub 2001/03/07. PubMed PMID: 11231946.
- [35] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001;25(4):402-8. Epub 2002/02/16. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PubMed PMID: 11846609.
- [36] Wu X, Sun L, Zha W, Studer E, Gurley E, Chen L, et al. HIV protease inhibitors induce endoplasmic reticulum stress and disrupt barrier integrity in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2010;138(1):197-209. Epub 2009/09/08. doi: 10.1053/j.gastro.2009.08.054. PubMed PMID: 19732776; PubMed Central PMCID: PMCPMC4644065.
- [37] Akiyama T, Oishi K, Wullaert A. Bifidobacteria Prevent Tunicamycin-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Subsequent Barrier Disruption in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Monolayers. *PloS one*. 2016;11(9):e0162448. Epub 2016/09/10. doi: 10.1371/journal.pone.0162448. PubMed PMID: 27611782; PubMed Central PMCID: PMCPMC5017626.
- [38] Peyrin-Biroulet L, Ferrante M, Magro F, Campbell S, Franchimont D, Fidler H, et al. Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO. I: Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & colitis*. 2011;5(5):477-83. Epub 2011/09/24. doi: 10.1016/j.crohns.2011.06.009. PubMed PMID: 21939925.
- [39] Fanca-Berthon P, Hoebler C, Mouzet E, David A, Michel C. Intrauterine growth restriction not only modifies the cecocolonic microbiota in neonatal rats but also affects its activity in young adult rats. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2010;51(4):402-13. Epub 2010/07/06. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181d75d52. PubMed PMID: 20601908.
- [40] Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, Price GR, Tauro SB, Taupin D, et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS medicine*. 2008;5(3):e54. Epub 2008/03/06. doi: 10.1371/journal.pmed.0050054. PubMed PMID: 18318598; PubMed Central PMCID: PMCPMC2270292.
- [41] Bozzetti V, Tagliabue PE, Visser GH, van Bel F, Gazzolo D. Feeding issues in IUGR preterm infants. *Early human development*. 2013;89 Suppl 2:S21-3. Epub 2013/07/28. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2013.07.006. PubMed PMID: 23886560.
- [42] Bogaert S, De Vos M, Olievier K, Peeters H, Elewaut D, Lambrecht B, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in inflammatory bowel disease: a different implication for colonic and ileal disease? *PloS one*. 2011;6(10):e25589. Epub 2011/10/27. doi: 10.1371/journal.pone.0025589. PubMed PMID: 22028783; PubMed Central PMCID: PMCPMC3196494.
- [43] Sohi G, Revesz A, Hardy DB. Nutritional mismatch in postnatal life of low birth weight rat offspring leads to increased phosphorylation of hepatic eukaryotic initiation factor 2 alpha in adulthood. *Metabolism: clinical and experimental*. 2013;62(10):1367-74. Epub 2013/06/19. doi: 10.1016/j.metabol.2013.05.002. PubMed PMID: 23768545.
- [44] Miani M, Colli ML, Ladriere L, Cnop M, Eizirik DL. Mild endoplasmic reticulum stress augments the proinflammatory effect of IL-1beta in pancreatic rat beta-cells via the IRE1alpha/XBP1s pathway. *Endocrinology*. 2012;153(7):3017-28. Epub 2012/04/25. doi: 10.1210/en.2011-2090. PubMed PMID: 22529213.
- [45] Gulhane M, Murray L, Lourie R, Tong H, Sheng YH, Wang R, et al. High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22. *Scientific reports*. 2016;6:28990. Epub 2016/06/29. doi: 10.1038/srep28990. PubMed PMID: 27350069; PubMed Central PMCID: PMCPMC4924095.
- [46] Renes IB, Verburg M, Van Nispen DJ, Taminiau JA, Buller HA, Dekker J, et al. Epithelial proliferation, cell death, and gene expression in experimental colitis: alterations in carbonic anhydrase I, mucin MUC2, and trefoil factor 3 expression. *International journal of colorectal disease*. 2002;17(5):317-26. Epub 2002/08/13. doi: 10.1007/s00384-002-0409-4. PubMed PMID: 12172925.
- [47] Mariadason JM, Corner GA, Augenlicht LH. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and

- curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer research*. 2000;60(16):4561-72. Epub 2000/09/02. PubMed PMID: 10969808.
- [48] Glauben R, Batra A, Stroh T, Erben U, Fedke I, Lehr HA, et al. Histone deacetylases: novel targets for prevention of colitis-associated cancer in mice. *Gut*. 2008;57(5):613-22. Epub 2008/01/16. doi: 10.1136/gut.2007.134650. PubMed PMID: 18194985.
- [49] Duncan EJ, Gluckman PD, Dearden PK. Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype? *Journal of experimental zoology Part B, Molecular and developmental evolution*. 2014;322(4):208-20. Epub 2014/04/11. doi: 10.1002/jez.b.22571. PubMed PMID: 24719220.
- [50] Gluckman PD, Hanson MA, Buklijas T, Low FM, Beedle AS. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. *Nature reviews Endocrinology*. 2009;5(7):401-8. Epub 2009/06/03. doi: 10.1038/nrendo.2009.102. PubMed PMID: 19488075.
- [51] Schaible TD, Harris RA, Dowd SE, Smith CW, Kellermayer R. Maternal methyl-donor supplementation induces prolonged murine offspring colitis susceptibility in association with mucosal epigenetic and microbiomic changes. *Human molecular genetics*. 2011;20(9):1687-96. Epub 2011/02/08. doi: 10.1093/hmg/ddr044. PubMed PMID: 21296867; PubMed Central PMCID: PMC3115577.
- [52] Leitich H, Egarter C, Husslein P, Kaidler A, Schemper M. A meta-analysis of low dose aspirin for the prevention of intrauterine growth retardation. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1997;104(4):450-9. Epub 1997/04/01. PubMed PMID: 9141582.
- [53] Roberge S, Odibo AO, Bujold E. Aspirin for the Prevention of Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction. *Clinics in laboratory medicine*. 2016;36(2):319-29. Epub 2016/05/29. doi: 10.1016/j.cll.2016.01.013. PubMed PMID: 27235915.
- [54] Hogarth P, Lovrecic L, Krainc D. Sodium phenylbutyrate in Huntington's disease: a dose-finding study. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2007;22(13):1962-4. Epub 2007/08/19. doi: 10.1002/mds.21632. PubMed PMID: 17702032.
- [55] Xiao C, Giacca A, Lewis GF. Sodium phenylbutyrate, a drug with known capacity to reduce endoplasmic reticulum stress, partially alleviates lipid-induced insulin resistance and beta-cell dysfunction in humans. *Diabetes*. 2011;60(3):918-24. Epub 2011/01/29. doi: 10.2337/db10-1433. PubMed PMID: 21270237; PubMed Central PMCID: PMC3046853.
- [56] Redonnet-Vernhet I, Rouanet F, Pedespan JM, Hocke C, Parrot F. A successful pregnancy in a heterozygote for OTC deficiency treated with sodium phenylbutyrate. *Neurology*. 2000;54(4):1008. Epub 2000/02/26. PubMed PMID: 10691008.
- [57] Lin G, Wang X, Wu G, Feng C, Zhou H, Li D, et al. Improving amino acid nutrition to prevent intrauterine growth restriction in mammals. *Amino acids*. 2014;46(7):1605-23. Epub 2014/03/25. doi: 10.1007/s00726-014-1725-z. PubMed PMID: 24658999.
- [58] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition*. 1993;123(11):1939-51. Epub 1993/11/01. PubMed PMID: 8229312.

Figure legends

Figure 1. XBP1s mRNA expression during life-course in the colon of control and IUGR rat offspring and in response to a HF diet.

(A) Colons were collected at the indicated days of age from control and IUGR offspring fed a standard chow and mRNA expression of XBP1s was analyzed by RT-qPCR.

*** $P < 0.001$. ns, not significant. Day1, $n = 15$ /group; Day13, $n = 14$ /group; Day35, $n = 10$ /group; Day120, $n = 15$ /group.

(B) Colons were collected from 120-day-old control (C) and IUGR (I) rats fed either a standard chow (normal diet, ND) or a HF diet (HFD) for 21 days. ** $P < 0.01$. ns, not significant. $N = 6$ /group.

Figure 2. PG treatment of colonic tissues prevents ER stress induction and ER stress-increased colonic permeability.

Rat colonic tissues were left untreated (Control) or pretreated or not with PG and stimulated or not with tunicamycin (Tm, $6\mu\text{g/mL}$) or thapsigargin (Tg, $2\mu\text{M}$), ex vivo. mRNA expression of (A) XBP1s and (B) XBP1u was analyzed by RT-qPCR and normalized to β -actin. (C) Colonic permeability to FITC-dextran (FD4) was measured in Ussing chambers. Results are expressed as the percentage of FD4 flux measured in control tissues.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. ns, not significant. ($n = 5$ /group).

Figure 3. PG treatment alleviates ER stress and improves recovery during DSS-induced colitis.

Sprague Dawley rats (120-day old) received drinking water alone (Control) or drinking water containing 2.5% DSS without (DSS) or with PG treatment (DSS-PG) for 5 days followed by a period of 3 days of drinking water for recovery. (A) Histological scores of inflammation and representative photographs of H&E-stained colon tissue sections (magnification, $\times 200$). (B) RT-PCR analysis of IRE1, XBP1s and GRP78 mRNA expression in colonic tissues. Results are expressed relative to control mean value and normalized to β -actin.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. ($n = 10$ /group).

Figure 4. Effect of perinatal PG treatment on ER stress, crypt architecture and goblet cell density in the colon of control and IUGR rat offspring.

ER stress and morphological characteristics of colonic epithelium were assessed in 120-day-old rats born from dams fed an adequate protein diet (Controls, C rats) or a protein restricted diet (IUGR, I rats) and from dams fed identical diets but orally treated with PG (CPG and IPG rats, respectively). (A) RT-PCR analysis of IRE1, XBP1s and GRP78 mRNA expression in colonic tissues. Results are expressed relative to control mean value and normalized to β -actin (n =7-10/group). (B) Crypt depth (expressed in μ m) measured on H&E-stained colon sections. (n=5 rats/group). (C) Goblet cell number per crypt and (D) representative photographs of colon sections stained for mucins with Periodic Acid Schiff (magnification \times 200). (n=5 rats/group).

*P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

Figure 5. Perinatal PG treatment alleviates ER stress during DSS-induced colitis and improves intestinal recovery in IUGR offspring.

At the age of 120 days, IUGR rats without or with a perinatal PG treatment received drinking water alone (I and IPG, respectively) or drinking water containing 2.5% DSS (I-DSS and IPG-DSS rats) for 5 days followed by a period of 3 days of drinking water for recovery.

(A) RT-PCR analysis of GRP78, IRE1 and XBP1s mRNA expression in colonic tissues. Results are expressed relative to the mean value in I rats and normalized to β -actin. (n= 6-8/group). (B) Histological scores of inflammation (n=5) and (C) representative H&E-stained colon sections. (D) Immunohistological analysis of CD68-positive macrophage infiltrates in colon tissue sections. Results are expressed as mean \pm SEM. *P<0.05; ** P<0.01.

Table 1. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Macronutrient	Mother diets		Offspring diets	
	Control (20% protein)	Low protein (8% protein)	Standard chow	High fat diet
Protein				
Casein	220	90	180	205
Carbohydrate				
Cornstarch	631	761	630	0
Sucrose				368
Fat				
Vegetable oil	43	43	37	
Lard				350
Cellulose	54	52	53	0
Vitamin mix ^a	10	10	10	10
Mineral mix ^a	40	40	40	59
Energy density (kcal/g)	3.8	3.8	3.6	5.3
% macronutrient kcal/g				
Protein	23	9.5	20.2	13.1
Carbohydrate	67	80.3	70.5	26.3
Fat	10	10.2	9.3	60.3

^a, Vitamin and mineral mixtures were formulated according to the AIN-93G recommendation for rodent diets [58].

Table 2. Primer sequences used in real-time PCR

Rat	Foward	Reverse
β-actin	ctatcggcaatgagcgggtcc	gcactgtgttgcatagaggtc
XBP1s	gagtcgccagcaggtg	gcgtcagaatccatggga
XBP1u	tctcaatcacaagcccatga	gagcagcaagtgggtgattt
GRP78	tcctgcgtcgggtattc	cgtgagttggttcttggc
IRE1β	tgaagtggacagtgaaggatgacc	cgacaaggagaggcgtgaacc

Figure 1

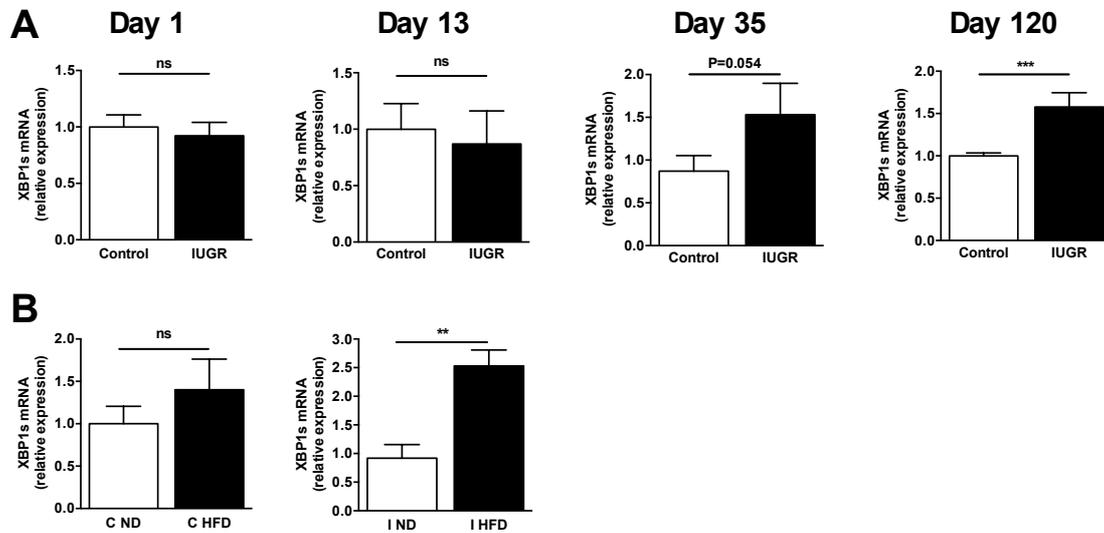


Figure 1. XBP1s mRNA expression during life-course in the colon of control and IUGR rat offspring and in response to a HF diet.

(A) Colons were collected at the indicated days of age from control and IUGR offspring fed a standard chow and mRNA expression of XBP1s was analyzed by RT-qPCR.

*** $P < 0.001$. ns, not significant. Day1, $n = 15/\text{group}$; Day13, $n = 14/\text{group}$; Day35, $n = 10/\text{group}$; Day120, $n = 15/\text{group}$.

(B) Colons were collected from 120-day-old control (C) and IUGR (I) rats fed either a standard chow (normal diet, ND) or a HF diet (HFD) for 21 days. ** $P < 0.01$. ns, not significant. $N = 6/\text{group}$.

Figure 2

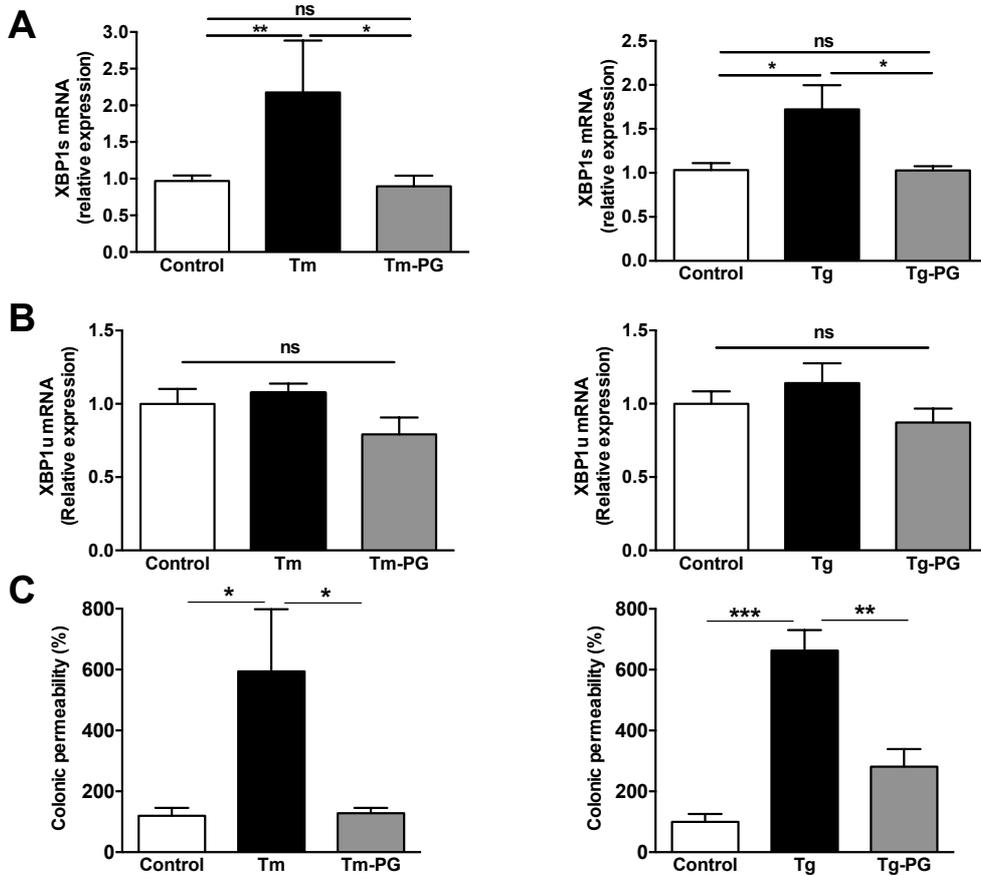


Figure 2. PG treatment of colonic tissues prevents ER stress induction and ER stress-induced colonic permeability.

Rat colonic tissues were left untreated (Control) or pretreated or not with PG and stimulated or not with tunicamycin (Tm, 6 μ g/mL) or thapsigargin (Tg, 2 μ M), ex vivo. mRNA expression of (A) XBP1s and (B) XBP1u was analyzed by RT-qPCR and normalized to β -actin. (C) Colonic permeability to FITC-dextran (FD4) was measured in Ussing chambers. Results are expressed as the percentage of FD4 flux measured in control tissues.

*P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001. ns, not significant. (n = 5/group).

Figure 3

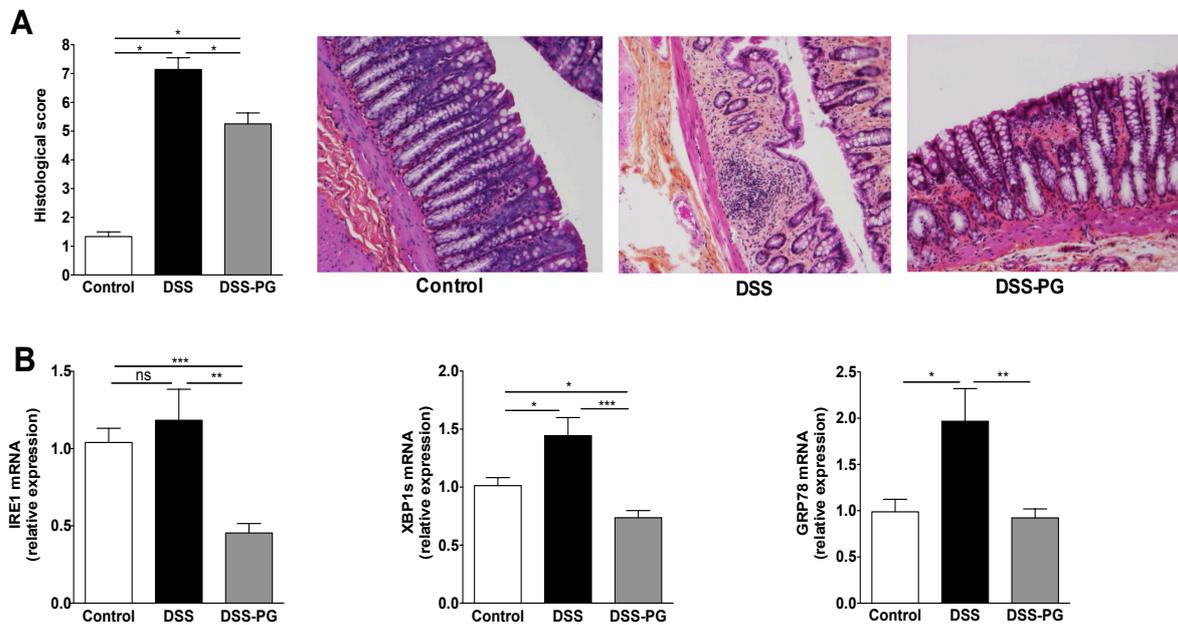


Figure 3. PG treatment alleviates ER stress and improves recovery during DSS-induced colitis.

Sprague Dawley rats (120-day old) received drinking water alone (Control) or drinking water containing 2.5% DSS without (DSS) or with PG treatment (DSS-PG) for 5 days followed by a period of 3 days of drinking water for recovery. (A) Histological scores of inflammation and representative photographs of H&E-stained colon tissue sections (magnification, x200). (B) RT-PCR analysis of IRE1, XBP1s and GRP78 mRNA expression in colonic tissues. Results are expressed relative to control mean value and normalized to β -actin.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. (n= 10/group).

Figure 4

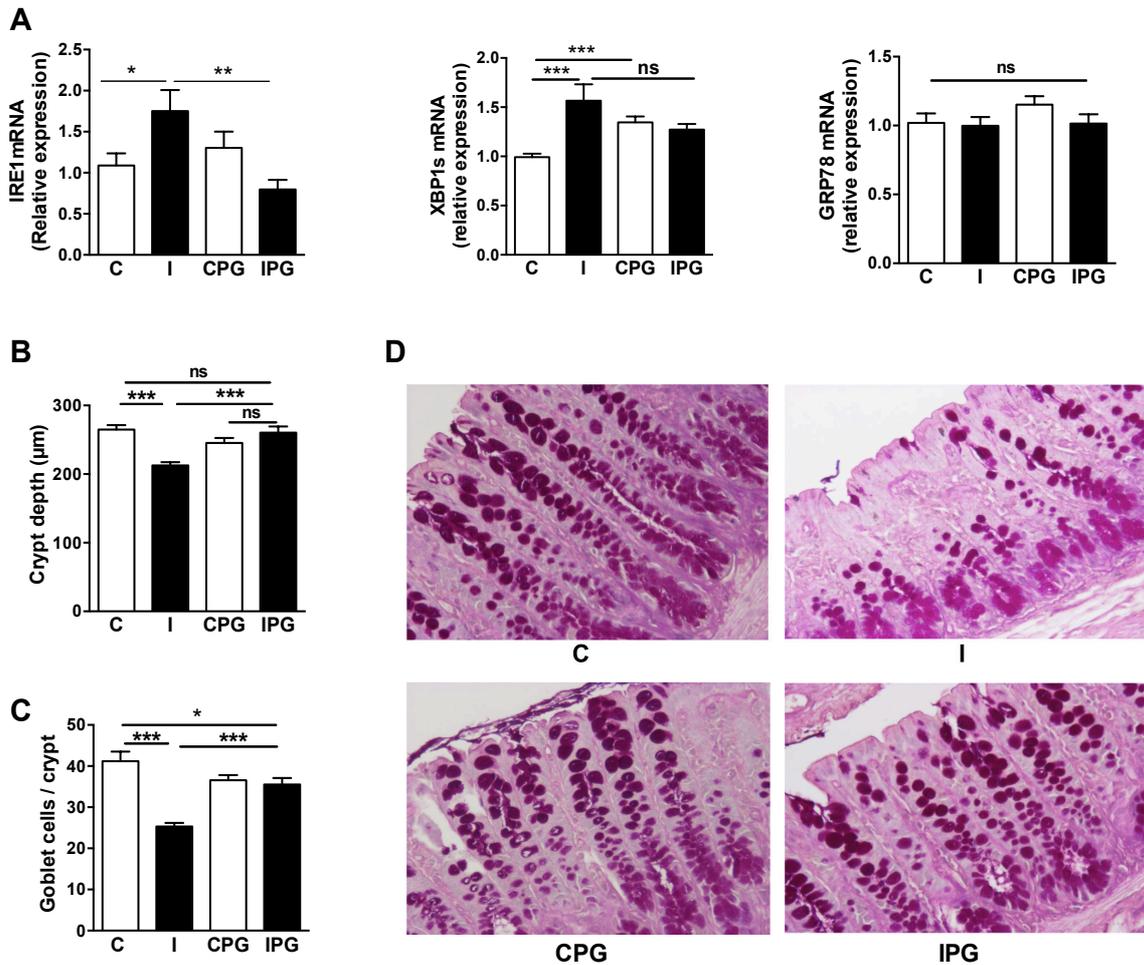


Figure 4. Effect of perinatal PG treatment on ER stress, crypt architecture and goblet cell density in the colon of control and IUGR rat offspring.

ER stress and morphological characteristics of colonic epithelium were assessed in 120-day-old rats born from dams fed an adequate protein diet (Controls, C rats) or a protein restricted diet (IUGR, I rats) and from dams fed identical diets but orally treated with PG (CPG and IPG rats, respectively). (A) RT-PCR analysis of IRE1, XBP1s and GRP78 mRNA expression in colonic tissues. Results are expressed relative to control mean value and normalized to β -actin (n=7-10/group). (B) Crypt depth (expressed in μ m) measured on H&E-stained colon sections. (n=5 rats/group). (C) Goblet cell number per crypt and (D) representative photographs of colon sections stained for mucins with Periodic Acid Schiff (magnification \times 200). (n=5 rats/group).

*P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

Figure 5

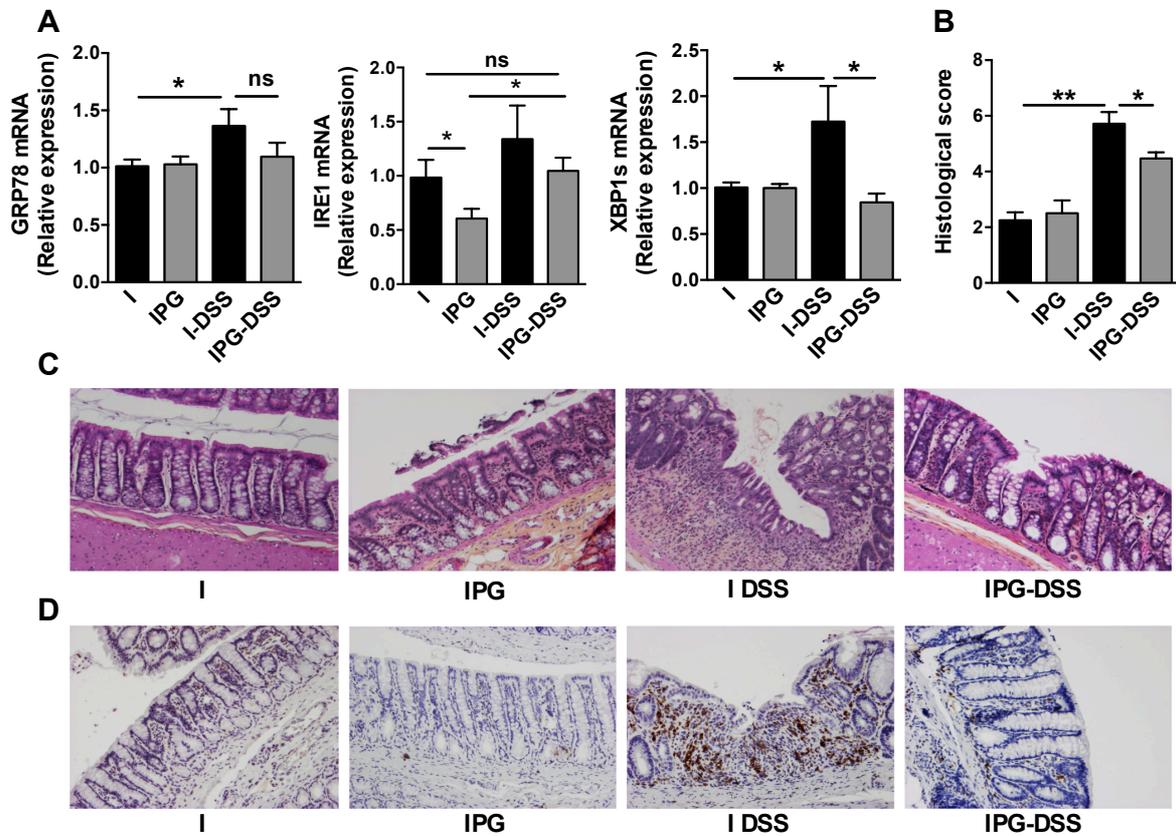


Figure 5. Perinatal PG treatment alleviates ER stress during DSS-induced colitis and improves intestinal recovery in IUGR offspring.

At the age of 120 days, IUGR rats without or with a perinatal PG treatment received drinking water alone (I and IPG, respectively) or drinking water containing 2.5% DSS (I-DSS and IPG-DSS rats) for 5 days followed by a period of 3 days of drinking water for recovery.

(A) RT-PCR analysis of GRP78, IRE1 and XBP1s mRNA expression in colonic tissues. Results are expressed relative to the mean value in I rats and normalized to β -actin. (n= 6-8/group). (B) Histological scores of inflammation (n=5) and (C) representative H&E-stained colon sections. (D) Immunohistological analysis of CD68-positive macrophage infiltrates in colon tissue sections. Results are expressed as mean \pm SEM. *P<0.05; ** P<0.01.

ARTICLE 3

Le stress du réticulum endoplasmique (RE) induit l'activation des HDAC et la désacétylation des histones. *Article en préparation.*

1. Introduction et objectif de l'étude menée

La fonction première du réticulum endoplasmique (RE) est la synthèse, la maturation, le repliement des protéines et leur exportation dans différents compartiments cellulaires (Gething and Sambrook, 1992). Certaines perturbations de l'homéostasie du RE telles que des anomalies de la glycosylation des protéines ou une accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE, sont à l'origine d'un stress du RE. En réponse à ce stress, toutes les cellules eucaryotes, de la levure à l'humain, mettent en place une réponse adaptative appelée réponse UPR (unfolded protein response) ayant pour objectif d'endiguer ce stress et de revenir à une situation physiologique normale (Mori, 2000, Schroder and Kaufman, 2005b, Kaufman, 1999). Cette réponse s'articule autour de voies de signalisations impliquant trois senseurs transmembranaires : PERK, ATF6 et IRE1 (Cox et al., 1993, Adachi et al., 2008, Okada et al., 2002, Yoshida et al., 2001b, Yoshida et al., 2001a). La voie IRE1 constitue la voie la mieux conservée de la réponse UPR. IRE1 α induit l'épissage alternatif de l'ARNm d'XBP1, générant ainsi un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes codant notamment pour des chaperonnes et foldases et des gènes associés au système de dégradation des protéines ERAD (ER-associated degradation) (Yoshida et al., 2001a, Calton et al., 2002). Dans des conditions physiologiques, ces trois effecteurs sont régulés négativement par leur association avec la protéine GRP78 (glucose regulated protein 78 kDa), également appelée BiP. En réponse au stress RE, GRP78 se lie aux protéines mal repliées et entraîne l'activation des voies de signalisations médiées par IRE1, PERK et ATF6. Une réponse UPR physiologique est particulièrement importante au sein de la barrière épithéliale intestinale. Une réponse UPR adaptée est en effet cruciale dans le maintien de l'homéostasie de cellules hautement sécrétrices telles que les cellules de Paneth et les cellules caliciformes (Cao, 2016). A contrario, un stress du RE ou une dysfonction de la réponse UPR contribuent à la pathogenèse de nombreuses maladies telles que les maladies dégénératives, le diabète, les MICI et le CCR (Cao, 2016, Ozcan et al., 2004, Kaser and Blumberg, 2010, Kaser et al., 2010, Wang and Kaufman, 2014).

L'acétylation post-traductionnelle des histones est un mécanisme épigénétique jouant un rôle pivot dans la régulation transcriptionnelle des gènes. Ainsi, l'acétylation des histones

par les histones acétyl transférase (HAT) est associée à une activation transcriptionnelle des gènes. A contrario, leur désacétylation par les Histones désacétylases (HDAC) est associée à une répression transcriptionnelle. Cependant, au cours des dernières années, plus de 1750 protéines non-histones telles que p53 ou NFκB ont été identifiées en tant que substrats des HDAC et des HAT (Choudhary et al., 2009). Dans le contexte de notre étude, l'acétylation de certains acteurs de la réponse UPR est nécessaire à l'activation de cette réponse. L'activité des chaperonnes protéiques GRP78 et HSP90 ainsi que celle d'XBP1 sont régulées par acétylation et désacétylation (Wang et al., 2011, Kahali et al., 2010, Kahali et al., 2012, Kahali et al., 2011, Rao et al., 2010, Aoyagi and Archer, 2005, Mollapour and Neckers, 2012, Choudhary et al., 2009). Plus particulièrement, l'inhibition des HDAC entraîne la l'acétylation et la libération de GRP78 de son site de fixation et permet l'activation des voies PERK et ATF6 (Rao et al., 2010, Kahali et al., 2010, Kahali et al., 2012, Kahali et al., 2011). De même, l'activité d'XBP1s est régulée par acétylation et désacétylation respectivement par p300 et SIRT1. P300 augmente l'acétylation et la stabilité de la protéine, et augmente son activité transcriptionnelle, lorsque sa désacétylation par SIRT1 inhibe son activité transcriptionnelle (Wang et al., 2011). Outre ces données, l'étude de Kahali et de ses collaborateurs suggère la présence des HDAC 1, 2, 3 au sein du RE où elles interagissent directement avec GRP78 et régulent la réponse UPR (Kahali et al., 2012). Pour l'heure, à l'inverse de ces données suggérant une régulation de la réponse UPR par des HDAC, on ignore clairement si un stress du RE pourrait activer des HDAC et entraîner des modifications épigénétiques au niveau de la chromatine. Néanmoins, une étude réalisée à partir de cellules HUVECs (Human umbilical vein ECs) indique une interaction directe entre la forme non splicée d'XBP1 (XBP1u) et HDAC3. Cette interaction contribuerait à l'activation d'HDAC3 entraînant l'activation d'NRF-2 et d'HO-1 (Martin et al., 2014). Une autre étude réalisée chez la levure, suggère que la protéine Hac1 (orthologue d'XBP1) interagit directement avec l'HDAC rpd3 et le corépresseur SIN3 régulant ainsi la transcription de gènes impliqués dans la différenciation des levures en condition de stress du RE (Schroder et al., 2004, Schroder and Kaufman, 2005b). Cette étude pionnière, nous indique que la réponse UPR pourrait réguler la transcription de gènes par activation des HDAC. La réponse UPR étant bien conservée chez les eucaryotes, la présence d'un tel mécanisme de régulation transcriptionnelle chez la levure laisse espérer l'existence d'un mécanisme similaire chez les eucaryotes supérieurs.

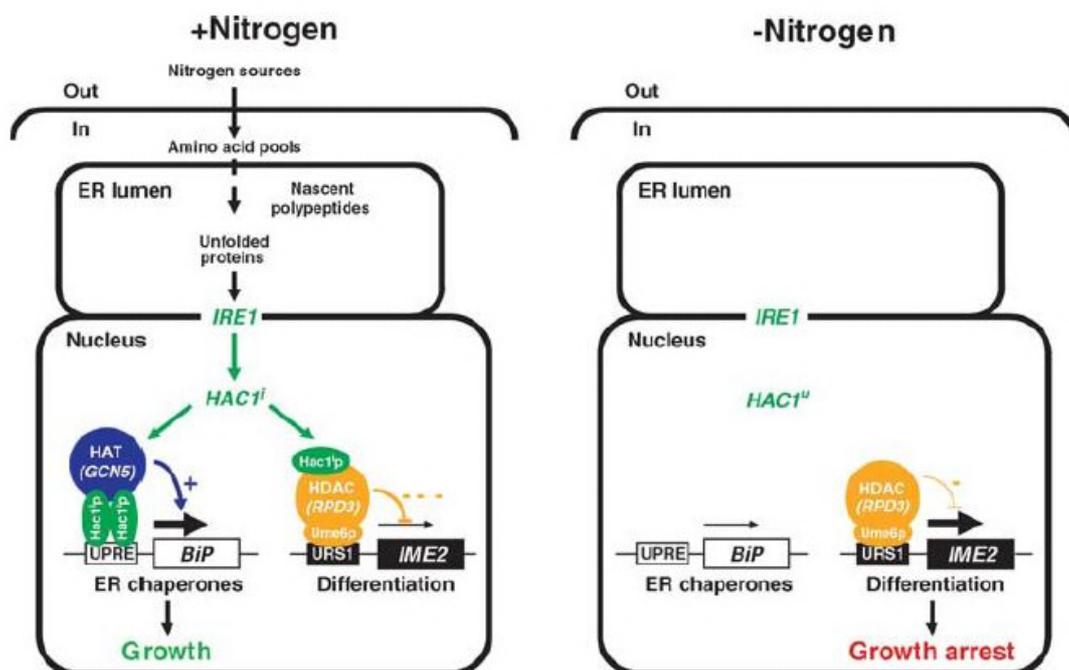


Figure 1 : L'activation de l'HDAC RPD3 par HAC1 est un mécanisme de régulation transcriptionnelle de la différenciation et de la croissance des levures en condition de stress RE. D'après (Schroder et al., 2004, Schroder and Kaufman, 2005b).

Au cours de notre première étude, nous avons démontré que le RCIU induisait des modifications métaboliques et épigénétiques dans les cellules épithéliales coliques altérant la structure et la fonction de la barrière épithéliale colique. Nous dénotions en outre, un stress du RE et une activation des HDAC conduisant à une perte d'acétylation d'H4K16 au sein de la barrière épithéliale colique des animaux RCIU. L'**hypothèse** de la présente étude est que le stress du RE pourrait contribuer aux modifications épigénétiques de la barrière épithéliale colique. En lien avec la première partie de nos travaux, notre **objectif** était plus particulièrement, de déterminer l'implication du stress du RE dans l'activation des HDAC et la perte d'acétylation d'H4K16. Il s'agissait également de mettre en évidence les mécanismes permettant l'activation des HDAC en contexte de stress du RE et de déterminer les acteurs de la réponse UPR à l'origine de cette activation.

Afin de répondre à ces interrogations, l'activation des HDAC et l'acétylation d'H4K16 ont été étudiées par induction d'un stress du RE par la tunicamycine : *in vivo*, par injection i.p chez le rat, *ex vivo* par traitement de tissus coliques et enfin *in cellulo* sur des cellules épithéliales coliques de la lignée HCT116.

2. Approche expérimentale et résultats expérimentaux

2.1. Protocoles expérimentaux et analyse statistique

Les protocoles expérimentaux réalisés ont été effectués conformément à la Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Ces protocoles ont été approuvés par le comité régional d'éthique en expérimentation animale des Pays de la Loire et le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS#5778-2016062011192046 v3). Des rats Sprague Dawley de 90 jours ont été utilisés au cours de cette étude. Après réception et allotissage des animaux, ces derniers ont été hébergés dans une salle conventionnelle à température contrôlée ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) et suivant un cycle jour/nuit de 12 :12 h. Le régime alimentaire était constitué d'un régime standard (A04, Safe, France) fourni ad libitum, à l'instar de l'eau.

Les données sont exprimées sous la forme de moyenne \pm SEM. L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide du logiciel statistique Graph Pad 4.0 Prism (Prism 5.0, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) pour la comparaison des moyennes intergroupes par le test t de Student (t-test).

2.2. Résultats expérimentaux

2.2.1. L'induction d'un stress du RE in vivo, active les HDAC et entraîne une perte d'acétylation d'H4K16.

Un stress du RE a été induit par injection intra-péritonéale de tunicamycine (3mg/kg), un inhibiteur de la N-glycosylation des protéines couramment utilisé dans la littérature afin d'induire un stress du RE. Les animaux contrôles ont reçu le véhicule approprié (NaCl 0,9%). Deux groupes de 8 rats ont ainsi été constitués : un groupe «control», et un groupe « tunicamycin ». Les animaux provenant des deux groupes expérimentaux ont été mis à mort 12h après l'injection, par asphyxie au CO₂ et dislocation cervical. Après laparotomie, le colon des animaux a été prélevé, incisé longitudinalement et lavé au PBS. Les colonocytes ont été isolés par « scrapping » de la muqueuse, puis conservé à -80°C . Les ARNm totaux ont été extraits par du Trizol® et rétro-transcrits en ADNc par la Superscript III. L'expression de gènes cibles a ensuite été analysée par q-PCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques. Les niveaux d'expression des ARNm de marqueurs de stress du RE, GRP78, XBP1s et CHOP ont été mesurés en vue de confirmer l'induction d'un stress du RE par l'injection de

tunicamycine. Les niveaux d'expression des HDAC 1, 3, 4 et 5, des sirtuines (SIRT) 1 et 2, ainsi que des HAT, KAT6B et KAT5 ont été évalués dans nos deux groupes expérimentaux. Les activités HDAC totales ont été mesurées dans les lysats nucléaires préparés à partir de colonocytes isolés et en utilisant le kit d'extraction nucléaire (Active Motif) de dosage des HDAC (Epigenase™, Epigentek; Euromedex) selon les instructions du fabricant. Le statut d'acétylation d'H4K16 a été estimé par western-blot avec un anticorps anti-H4K16 acétylée (anti-acetyl-Histone H4 (Lys16); #07-329, EMD Millipore) et normalisé par un anticorps anti-H4 totale (ab134212; Abcam). L'acétylation de H4K16 a également été analysée par immunohistochimie sur coupes de tissus coliques prélevés au niveau de la jonction caeco-colique des animaux et fixés au paraformaldéhyde à 4% et inclus en paraffine.

Chez les animaux ayant reçu une injection i.p de tunicamycine (3mg/kg), nous confirmons l'induction d'un stress du RE, comme en témoigne l'augmentation très significative de l'expression transcriptomique de GRP78, XBP1 et CHOP dans les colonocytes des animaux du groupe tunicamycin par rapport aux animaux contrôles ($p < 0,001$; $n=8$ /groupe) (figure 1a). L'induction d'un stress du RE s'accompagne parallèlement de changement dans l'expression transcriptomique d'HDAC. L'expression des gènes codant pour HDAC3, HDAC5 et pour SIRT1 est ainsi augmentée chez les animaux du groupe tunicamycin par rapport aux contrôles. En revanche, le stress du RE n'induit pas de modification de l'expression des deux HAT étudiées, KAT6B (MORF) et KAT5 (TIP60) (Figure 1b).

L'augmentation de l'expression des ARNm codant pour les HDAC 3 et 5 en réponse à un stress RE est associée à une augmentation des activités HDAC totales mesurées dans les lysats nucléaires (figure 1C). De façon concomitante, l'augmentation de ces activités HDAC est associée à une diminution significative de l'acétylation de H4K16 observée par western blot (figure 1D). Le marquage immunohistochimique de coupes de tissus coliques a confirmé la diminution de l'acétylation d'H4K16 au niveau de l'épithélium sous l'effet de la tunicamycine par rapport aux animaux traités par le véhicule (figure 1E).

L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'in vivo, un stress du RE au niveau du côlon pourrait induire une activation des HDAC et conduire de fait à une diminution de l'acétylation des histones et en particulier d'H4K16 au niveau de l'épithélium colique.

2.2.2. Un stress du RE induit par la tunicamycine sur des tissus coliques en culture, active les HDAC et induit une perte d'acétylation d'H4K16.

Cependant l'effet de la tunicamycine *in vivo* pourrait être indirect en ciblant d'autres tissus que le côlon qui en retour pourraient sécréter des molécules activant les HDAC. Afin de confirmer la spécificité des résultats précédents, nous avons induit un stress du RE par la tunicamycine sur des tissus coliques de rat maintenus en culture. Des rats Sprague Dawley de 90 jours ont été mis à mort par asphyxie au CO₂ et dislocation cervicale. Après laparotomie, les côlons proximaux de ces animaux ont été prélevés, incisés longitudinalement et lavés au PBS. A partir de ces tissus coliques, des sections de taille régulière ont été découpées, puis incubées dans du milieu RPMI supplémenté ou non en tunicamycine (3µg/ml) durant 3heures à 37°C. À l'issue de ce temps d'incubation, les tissus coliques ont été lavés au PBS. Les colonocytes ont ensuite été isolés par "scrapping". A partir de ces colonocytes isolés, nous avons analysé le niveau d'expression d'XBP1 par RT-qPCR, dosé les activités HDAC totales, et analysé le niveau d'acétylation d'H4K16 par western blot.

Le traitement des tissus par la tunicamycine induit bien un stress du RE au niveau des colonocytes isolés, comme en témoigne l'augmentation significative de l'expression transcriptomique de XBP1s par rapport à notre condition contrôle ($p < 0,05$, $n=6$) (figure 2a). Les activités HDAC totales étaient par ailleurs augmentées dans les tissus incubés avec de la tunicamycine par rapport aux contrôles ($p < 0,05$, $n=7$) (figure 2b). Par western blot, nous observons de façon concomitante, une diminution de l'acétylation d'H4K16 dans cette condition (figure 2C).

Ces résultats confirment ceux obtenus *in vivo* et montre qu'un stress du RE au niveau des colonocytes induit une augmentation des activités HDAC et la perte d'acétylation d'H4K16.

2.2.3. Un stress du RE induit une perte d'acétylation d'H4K16 dans des cellules épithéliales coliques HCT116

Afin de décortiquer les voies de signalisations reliant le stress du RE à l'activation des HDAC et à la perte d'acétylation de H4K16, nous avons conduit une étude *in vitro* en utilisant la lignée de cellules d'adénocarcinome colique, HCT116. Nous avons d'abord étudié la cinétique d'induction de la perte d'acétylation d'H4K16 par traitement des cellules à la tunicamycine (3µg/ml) pour les temps indiqués. Nous avons étudié l'expression d'XBP1 par RT-qPCR et l'acétylation de H4K16 par western blot, in-cell western et immunofluorescence.

Le traitement de cellules HCT116 à la tunicamycine induit une augmentation significative ($p < 0.01$; $n=3$) de l'expression de l'ARNm d'XBP1 quatre heures post-traitement (Figure 3A). Simultanément, l'analyse densitométrique des westerns blots démontre que l'expression

d'H4K16 acétylée est significativement réduite après trois heures d'incubation avec de la tunicamycine ($p < 0.05$; $n=3$). Cette perte d'acétylation est transitoire et n'est plus observée 4 heures post-traitement (figure 3B). La perte d'acétylation d'H4K16 est confirmée par in-cell western (figure 3C) et immunofluorescence (figure 3D) sur les cellules traitées à la Tunicamycine (3 mg/ml) durant trois heures.

2.2.4. Régulation de la phosphorylation et de la localisation cellulaire d'HDAC3 en réponse à un stress du RE.

Les activités HDAC sont essentiellement régulées par phosphorylation, par interaction protéine-protéine et par leur localisation cellulaire (Sengupta and Seto, 2004). Afin de mettre en évidence les mécanismes de régulation permettant de relier l'activation des HDAC au stress du RE, nous avons étudié la phosphorylation d'HDAC3 ainsi que sa localisation cellulaire en réponse à un stress du RE.

Dans un premier temps, nous avons étudié la cinétique de phosphorylation d'HDAC3 (p-HDAC3) en traitant des cellules HCT116 avec de la tunicamycine (3 μ g/ml) pour les temps indiqués (Figure 4A). L'analyse densitométrique des westerns blots suggère que la phosphorylation d'HDAC3 tend à augmenter trois heures après l'induction d'un stress du RE, bien que cette augmentation ne soit pas significative. (Figure 4A, $n=3$).

Dans un second temps, nous avons étudié la localisation cellulaire d'HDAC3 par immunofluorescence à partir de cellules préalablement transfectées avec un plasmide permettant la surexpression d'une HDAC3 "taguée" (Flag-HDAC3) puis traitées à la tunicamycine (3 μ g/ml) pendant trois heures. La localisation cellulaire de Flag-HDAC3 détectée par immunofluorescence avec un anticorps anti-Flag, suggère une translocation du cytoplasme vers le noyau en réponse à un stress du RE induit par la tunicamycine (figure 4B). Cette translocation nucléaire pourrait traduire une activation d'HDAC3.

Enfin, afin de confirmer l'implication des HDAC dans la perte d'acétylation d'H4K16, des cellules HCT116 ont été traitées à la tunicamycine durant 3 heures en présence ou non de Trichostatine A (TsA ; 0.5 μ M) un inhibiteur des HDAC de type I et II. L'acétylation d'H4K16 a été étudiée dans ces conditions expérimentales par immunofluorescence. A l'instar des résultats développés précédemment, la tunicamycine induit une augmentation significative des activités HDAC ($p < 0.01$, $n=3$) dosées dans les lysats nucléaires des cellules HCT116 (figure 4C). Enfin, le marquage par immunofluorescence d'acétyl-H4K16 montre une diminution de l'acétylation dans le noyau des cellules traitées à la tunicamycine qui est prévenue par le prétraitement des cellules avec la TsA (figure 4D). Ces résultats bien que

préliminaires suggèrent que la perte d'acétylation d'H4K16 serait essentiellement médiée par les HDAC de classes I et II. Il serait judicieux de tester également un inhibiteur des sirtuines.

2.2.5. Implication des acteurs de la réponse UPR dans la perte d'acétylation d'H4K16.

Partant du postulat que le stress du RE entraîne l'activation des HDAC et la perte de l'acétylation d'H4K16, nous avons souhaité déterminer quel(s) acteur(s) de la réponse UPR pourraient relier ces deux phénomènes. Nos observations concernant l'induction de la phosphorylation d'HDAC3 dans les cellules HCT116 traitées par la tunicamycine nous ont conduit à étudier l'implication de IRE et PERK, les deux senseurs de la réponse UPR dotés d'une activité kinase. Nous avons donc induit un stress du RE par traitement de cellules HCT116 avec de la tunicamycine (3µg/ml) en présence ou en absence d'inhibiteurs d'IRE1 et de PERK (le 4µ8C et le GSK 2606414 respectivement).

Nous l'avons vu précédemment, IRE1 est à l'origine du splicing et de l'activation d'XBP1 (Yoshida et al., 2001a). Nous avons voulu vérifier par RT-PCR que l'inhibition d'IRE1 par le 4µ8C, prévenait bien le splicing d'XBP1 (XBP1s). Le traitement de cellules HCT116 avec ce composé réduit l'expression d'XBP1s de façon très significative ($p < 0.001$) en condition basale (IREi vs control) mais aussi en réponse à la tunicamycine (IREi+Tm vs Tm) (figure 5A).

L'analyse par western blot de lysats de cellules HCT116 indique une diminution de l'acétylation d'H4K16 par la tunicamycine ($p < 0.05$). De façon notable, l'inhibition de la voie IRE par prétraitement de cellules avec le 4µ8C permet de prévenir la perte d'acétylation d'H4K16 ($p = 0.0039$, $n = 3$). (Figure 5B et 5BC). L'inhibiteur d'IRE 4µ8C n'a pas d'effet sur le niveau basal d'acétylation d'H4K16. A contrario, l'inhibition de PERK ne permet pas de prévenir la perte d'acétylation d'H4K16 (Figure 5A et 5B).

En conclusion, ces résultats semblent nous indiquer le rôle prépondérant de la voie IRE dans la perte d'acétylation d'H4K16 induite par le stress du RE.

3. Discussion

Les résultats de la présente étude nous ont permis de mettre en évidence des liens entre le stress du RE et les modifications de l'épigénome. Encore préliminaires, les résultats obtenus *in vivo*, *ex vivo* et *in cellulo* semblent indiquer qu'un stress du RE pourrait activer les HDAC entraînant une perte d'acétylation d'H4K16. Dans le contexte général de cette thèse,

ces résultats nous suggèrent que le stress du RE pourrait contribuer aux modifications épigénétiques constatées dans le cadre du RCIU (Article1).

Au cours de cette étude, notre attention s'est essentiellement concentrée sur l'activation d'HDAC3. Cette HDAC est capable de réaliser la désacétylation d'H4K16 (Lv et al., 2012). Localisée dans le RE, elle interagit avec GRP78 et permet l'activation de la réponse UPR (Kahali et al., 2012). Son expression transcriptomique est aussi augmentée en réponse au stress du RE induit in vivo par injection de tunicamycine (figure 1A). L'ensemble de ces arguments nous ont poussés à étudier cette HDAC plus particulièrement. Il conviendrait tout de même, d'avoir une vision plus exhaustive des HDAC activées en réponse à un stress du RE ainsi que des sirtuines pour lesquelles H4K16 représente aussi une cible.

La régulation des HDAC constitue un processus relativement complexe et peu étudié. En condition physiologique, il est néanmoins admis que les HDAC et en particulier HDAC3, sont régulées par phosphorylation (Tsai and Seto, 2002, Pflum et al., 2001, Lee et al., 2004), par interaction protéine-protéine (Zhang et al., 2005, Viatour et al., 2003, Sengupta and Seto, 2004), et par leur localisation cellulaire (Grozinger and Schreiber, 2000, Wang et al., 2000, Sengupta and Seto, 2004, Yang et al., 2002). Afin de déterminer les mécanismes reliant la réponse UPR et l'activation des HDAC, nous avons axé nos recherches sur les voies IRE et PERK. Notre hypothèse était qu'au moins un de ces deux senseurs serait à même d'activer les HDAC en contexte de stress du RE. En effet, à contrario d'ATF6, IRE et PERK disposent de domaine protéine kinase (Schroder and Kaufman, 2005a) qui pourrait aussi permettre la phosphorylation des HDAC et donc de réguler par conséquent leur activité. Nos recherches se dirigent d'autant plus vers la voie IRE1-XBP1 dans la mesure où IRE1 est aussi capable d'activer des voies de signalisation impliquant des protéines kinases telles que les voies ERK (Nguyen et al., 2004) ou JNK (Urano et al., 2000). Cependant, nous n'avons pas observé une augmentation significative de la phosphorylation d'HDAC3 dans les cellules HCT116 traitées à la tunicamycine (figure 4). Ceci pourrait provenir du faible nombre d'expériences (n=3) et/ou de la sensibilité de la méthode (western blot). La quantification intra-cellulaire de phospho-HDAC3 par cytomètre en flux permettrait une analyse plus fine de l'intensité et de la proportion de cellules montrant une activation d'HDAC3. Néanmoins, en réponse au stress du RE, on observe une translocation d'HDAC3 du cytoplasme vers le noyau suggérant son activation (figure 4B).

Encore plus précisément, nos résultats tendent à indiquer le rôle prépondérant de la voie IRE1/XBP1 dans la relation liant stress du RE et activation des HDAC. Nos observations indiquent que l'inhibition de cette voie par un inhibiteur sélectif, le 4 μ 8C, permet de prévenir

la perte d'acétylation d'H4K16 induite par un stress du RE dans les cellules HCT116 (figure 5B et C).

Ces travaux réalisés dans cette étude ne représentent qu'une étape initiale dans la caractérisation des mécanismes à l'origine de l'activation des HDAC. Ces observations préliminaires doivent être confirmées par des études déterminant l'implication d'IRE1 dans la phosphorylation et l'activation HDAC. Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, il conviendrait également d'étudier les interactions protéine-protéine par co-immunoprécipitation, en ciblant notamment des HDAC et des acteurs de la réponse UPR.

Bien que l'inhibition des HDAC de classe I et II par la TsA permette de prévenir la perte d'acétylation H4K16 induite par un stress RE (figure 4D), une participation des sirtuines (HDAC de classe III) n'est pas totalement à exclure dans ce phénomène. Les sirtuines 1,2 et 3 jouent en effet un rôle important dans la régulation de l'acétylation d'H4K16 (Pruitt et al., 2006, Vaquero et al., 2007). Nous notons une forte augmentation de l'expression de SIRT1 au niveau des colonocytes isolés des rats traités par la tunicamycine *in vivo* (figure 1). Ce résultat est en accord avec les travaux *in vivo* et *in cellulo* de Koga et ses collaborateurs indiquant aussi une activation de SIRT1 (Koga et al., 2015). Cette augmentation de l'expression de SIRT1 permet la désacétylation de p53 et de p65 et ne serait pas médiée par les voies de la réponse UPR mais via la voie PI3K/AKT/mTOR.

En somme, bien que préliminaires, nos travaux indiquent que le stress du RE via la branche IRE1 de la réponse UPR induirait une activation des HDAC et consécutivement, une perte de l'acétylation d'H4K16. Il est intéressant de noter que le stress du RE (et la production de ROS) et l'augmentation des activités HDAC, d'une part (Ladiges, 2014) et la perte d'acétylation d'H4K16, d'autre part (Krishnan, 2013 ; Sanders, 2013) sont des caractéristiques qui ont été reliées au vieillissement cellulaire et associées à une perte du « contrôle qualité » de la cellule et une instabilité génomique. Si on replace les données de cette étude dans le contexte du RCIU, ces résultats permettraient également de mettre en lumière de nouvelles conséquences physiopathologiques liées au RCIU. La perte d'acétylation d'H4K16 au niveau de l'épithélium colique des rats RCIU au cours du vieillissement que nous avons observé dans l'étude 1, soutient l'hypothèse d'un vieillissement accéléré chez ces animaux. Des études supplémentaires sont encore nécessaires afin de mieux caractériser les mécanismes et les acteurs à l'origine de cette relation.

Figure 1

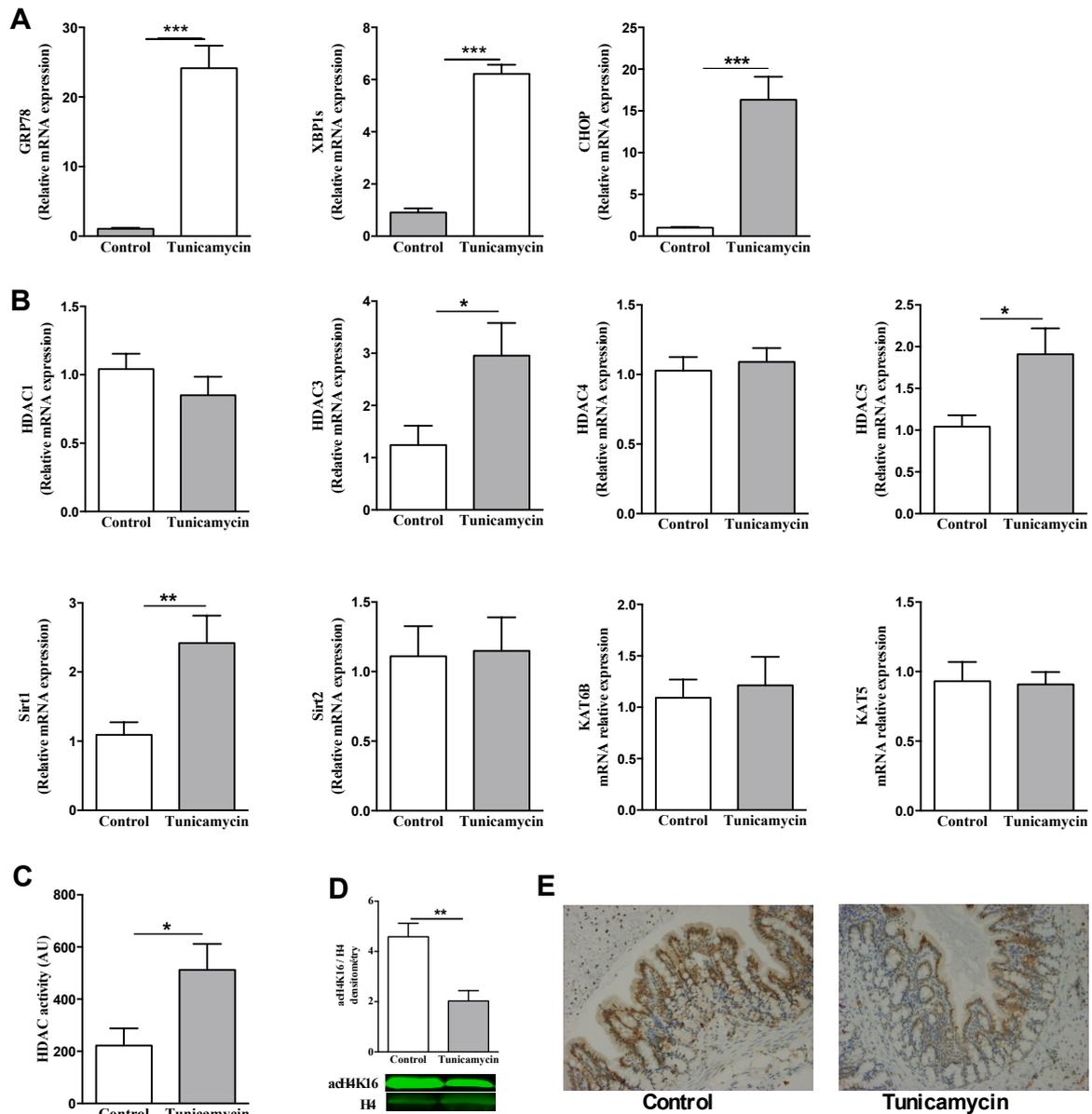


Figure 1 : L'induction d'un stress du réticulum endoplasmique in vivo, active les HDAC et induit une perte d'acétylation d'H4K16.

Analyse par RT-qPCR de l'expression relative des ARNm codant (A) pour des marqueurs du stress du RE (GRP78, XBP1 et CHOP), (B) pour les HDAC1, 3, 4, 5, et sirt1 et sirt2 et les HAT, KAT6B et KAT5 chez les rats contrôles ou ayant reçu une injection i.p de tunicamycine (3mg/kg). Les niveaux d'expressions de ces gènes cibles sont normalisés par la β -actine. (C) Dosage des activités HDAC totales mesurées à partir de lysats nucléaires de colonocytes isolés d'animaux contrôles ou ayant reçu une injection i.p de tunicamycine. (D) Immunoblots et analyse densitométrique des niveaux d'expression des formes acétylées d'H4K16

normalisés par l'expression de la forme H4 totale sur des lysats nucléaires de colonocytes isolés d'animaux contrôles ou ayant reçu une injection i.p de tunicamycine. (E) Marquage immunohistochimique d'acétyl-H4K16 sur des coupes de tissus coliques provenant d'animaux contrôles ou ayant reçus une injection i.p de tunicamycine. On notera le marquage nucléaire d'H4K16 au niveau de l'épithélium. (grossissement x200). n=8 par groupe. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Figure 2

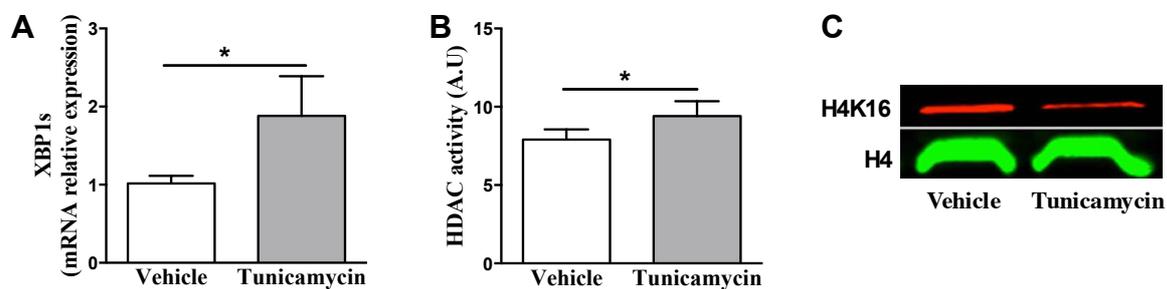


Figure 2 : Un stress du RE induit par la tunicamycine sur des tissus coliques en culture, active les HDAC et induit une perte d'acétylation d'H4K16.

Des colonocytes ont été isolés de tissus coliques de rats maintenus en culture et traités à la Tunicamycine ou par le véhicule pendant 3h à 37°C. (A) Analyse par RT-qPCR de l'expression relative de l'ARNm codant pour XBP1s. Les niveaux d'expressions de ces gènes cibles sont normalisés par la β -actine. n=6 par groupe. (B) Dosage des activités HDAC totales mesurées à partir de lysat nucléaires des colonocytes. n=7 par groupe. (C) Analyse par Western blot de l'acétylation d'H4K16 et de l'histone H4 par western blot et lecture au scanner infrarouge Licor Odyssey.*P<0.05.

Figure 3

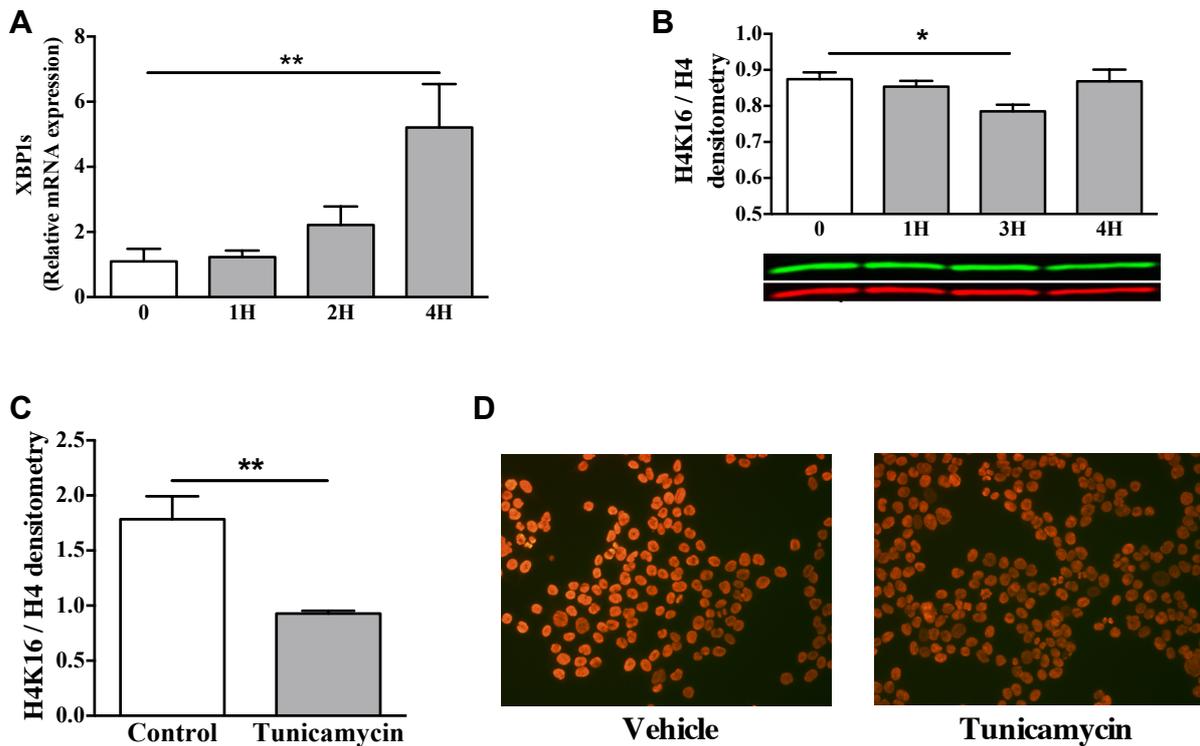


Figure 3 : Le stress du RE induit une perte d'acétylation d'H4K16 dans des cellules épithéliales colique HCT116

(A) Cinétique d'induction de l'ARNm d'XBP1s par la tunicamycine dans des cellules épithéliales coliques HCT116 analysée par RT-qPCR. Les niveaux d'expression d'XBP1s sont normalisés par la β -actine. $n=3$. (B) Cinétique d'induction de la perte d'acétylation d'H4K16 analysée par Western blot à partir de lysats nucléaires de cellules traitées à la tunicamycine ($3\mu\text{g/ml}$) pour les temps indiqués. Les niveaux d'expressions d'H4K16 sont normalisés par les taux d'expression de la forme totale d'H4 ($N=7$ par groupe). (C) Quantification des taux d'expression des formes acétylées d'H4K16 dans les cellules HCT116 traitées à la tunicamycine durant 3 heures par in-cell western au scanner infrarouge Licor Odyssey ($n=4$). (D) Détection d'H4K16 acétylée par immunofluorescence dans des cellules HCT116 non traitées (contrôle) ou traitées à la tunicamycine 3mg/ml durant 3h. (grossissement $\times 20$). $*P<0.05$, $**P<0.01$.

Figure 4

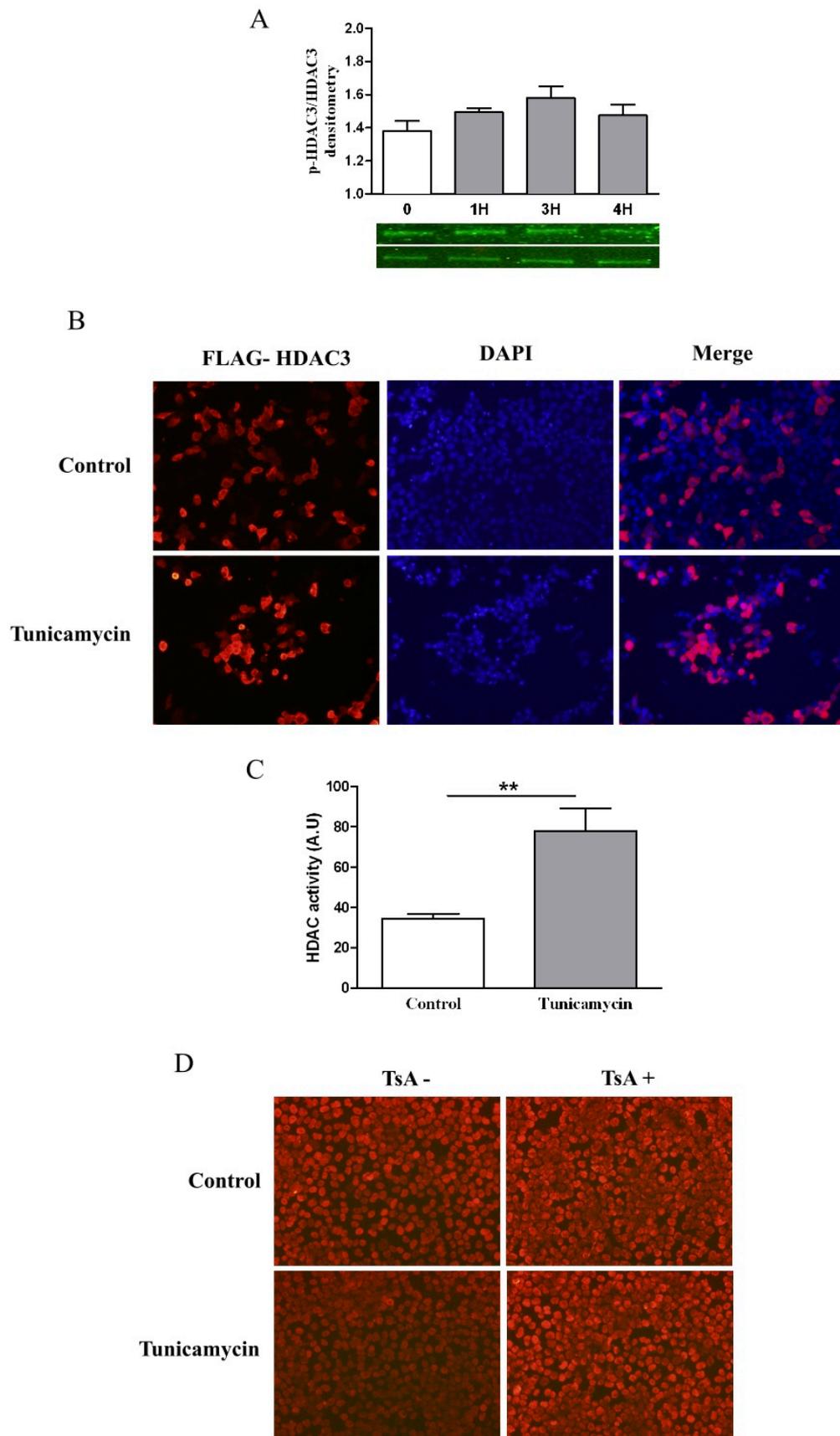


Figure 4 : le stress du RE active HDAC3 en régulant sa phosphorylation et sa localisation cellulaire.

(A) Cinétique d'induction de la phosphorylation d'HDAC3 analysée par Western blot sur des lysats nucléaires de cellules traitées à la tunicamycine (3 μ g/ml) pour les temps indiqués. Les niveaux d'expressions d'HDAC3 phosphorylée sont normalisés par les taux d'expression de la forme totale d'HDAC3 (n=3). (B) Détection de Flag-HDAC3 par immunofluorescence dans des cellules HCT116 préalablement transfectées avec un vecteur d'expression Flag-HDAC3 puis non traitées (contrôles) ou traitées à la tunicamycine 3mg/ml durant 3h. Les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-Flag (DKK). Les noyaux cellulaires ont été contre-colorés au DAPI. La localisation cellulaire d'HDAC3 a été visualisée par microscopie confocale (x40). (C) Dosage des activités HDAC totales mesurées à partir de lysats nucléaires de cellules traitées ou non à la tunicamycine durant 3 heures (n= 7 par groupe). (D) Détection d'H4K16 acétylée par immunofluorescence dans des cellules HCT116 prétraitées ou non par la TsA (0,5 mM) pendant 30 min, puis traitées ou non (contrôle) à la tunicamycine 3 μ g/ml durant 3h. L'acétylation d'H4K16 a été visualisée avec un microscopie à fluorescence équipé d'une caméra couleur (X10).

Figure 5

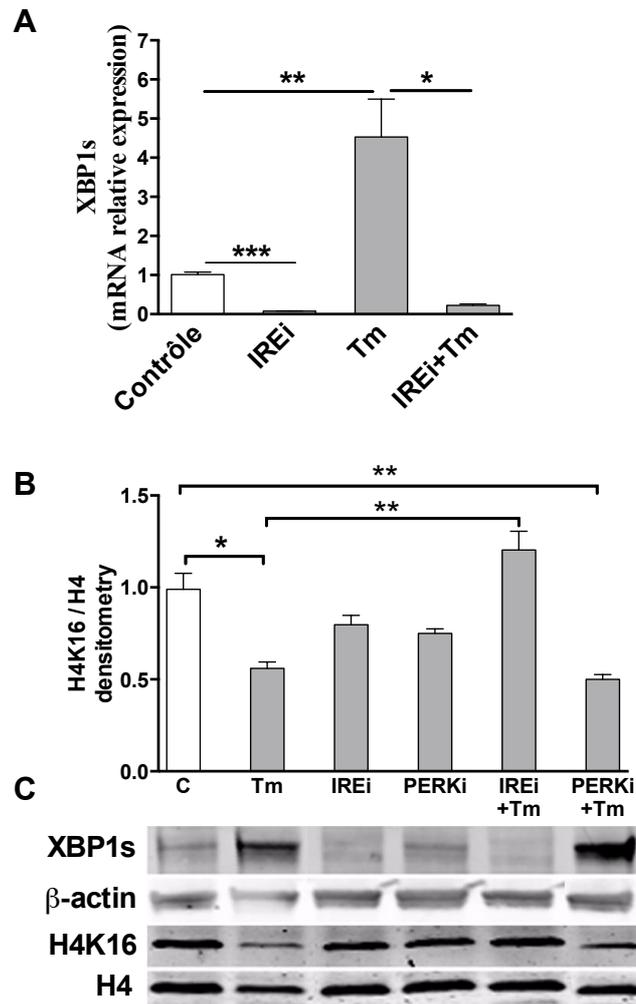


Figure 5 : La perte d'acétylation d'H4K16 consécutive à l'activation des HDAC par un stress du RE dépend de la voie IRE1.

(A) Analyse RT-qPCR de l'expression relative de l'ARNm codant pour XBP1s dans des cellules épithéliales coliques HCT116 traitées à la tunicamycine en présence d'un inhibiteur d'IRE1 (4 μ 8C). Les niveaux d'expression d'XBP1s sont normalisés par la β -actine. (n=3). (B) Analyse densitométrique et (C) immunoblots correspondants, des taux d'expression d'H4K16 acétylée dans les cellules HCT116 traitées à la tunicamycine. Les niveaux d'expression d'H4K16 sont normalisés par ceux de la forme totale d'H4. N=3 par groupe. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Références

- Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A. & Mori, K. 2008. Atf6 Is A Transcription Factor Specializing In The Regulation Of Quality Control Proteins In The Endoplasmic Reticulum. *Cell Struct Funct*, 33, 75-89.
- Aoyagi, S. & Archer, T. K. 2005. Modulating Molecular Chaperone Hsp90 Functions Through Reversible Acetylation. *Trends Cell Biol*, 15, 565-7.
- Barrett, J. C., Hansoul, S., Nicolae, et al. 2008. Genome-Wide Association Defines More Than 30 Distinct Susceptibility Loci For Crohn's Disease. *Nat Genet*, 40, 955-62.
- Bertolotti, A., Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J. H., West, A. B. & Ron, D. 2001. Increased Sensitivity To Dextran Sodium Sulfate Colitis In Ire1beta-Deficient Mice. *J Clin Invest*, 107, 585-93.
- Bogaert, S., De Vos, M., Olievier, K., Peeters, H., Elewaut, D., Lambrecht, B., Pouliot, P. & Laukens, D. 2011. Involvement Of Endoplasmic Reticulum Stress In Inflammatory Bowel Disease: A Different Implication For Colonic And Ileal Disease? *Plos One*, 6, E25589.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G. & Ron, D. 2002. Ire1 Couples Endoplasmic Reticulum Load To Secretory Capacity By Processing The Xbp-1 Mrna. *Nature*, 415, 92-6.
- Cao, S. S. 2016. Epithelial Er Stress In Crohn's Disease And Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 22, 984-93.
- Cao, S. S., Zimmermann, E. M., Chuang, B. M., Song, B., Nwokoye, A., Wilkinson, J. E., Eaton, K. A. & Kaufman, R. J. 2013. The Unfolded Protein Response And Chemical Chaperones Reduce Protein Misfolding And Colitis In Mice. *Gastroenterology*, 144, 989-1000.E6.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., Olsen, J. V. & Mann, M. 2009. Lysine Acetylation Targets Protein Complexes And Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science*, 325, 834-40.
- Cox, J. S., Shamu, C. E. & Walter, P. 1993. Transcriptional Induction Of Genes Encoding Endoplasmic Reticulum Resident Proteins Requires A Transmembrane Protein Kinase. *Cell*, 73, 1197-206.
- Gething, M. J. & Sambrook, J. 1992. Protein Folding In The Cell. *Nature*, 355, 33-45.
- Grozinger, C. M. & Schreiber, S. L. 2000. Regulation Of Histone Deacetylase 4 And 5 And Transcriptional Activity By 14-3-3-Dependent Cellular Localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7835-40.
- Heazlewood, C. K., Cook, M. C., Eri, R., Price, G. R., Tauro, S. B., Taupin, D., Thornton, D. J., Png, C. W., Crockford, T. L., Cornall, R. J., Adams, R., Kato, M., Nelms, K. A., Hong, N. A., Florin, T. H., Goodnow, C. C. & McGuckin, M. A. 2008. Aberrant Mucin Assembly In Mice Causes Endoplasmic Reticulum Stress And Spontaneous Inflammation Resembling Ulcerative Colitis. *Plos Med*, 5, E54.
- Kahali, S., Sarcar, B. & Chinnaiyan, P. 2011. The Emerging Role Of Histone Deacetylases (HDAC) In Upr Regulation. *Methods Enzymol*, 490, 159-74.
- Kahali, S., Sarcar, B., Fang, B., Williams, E. S., Koomen, J. M., Tofilon, P. J. & Chinnaiyan, P. 2010. Activation Of The Unfolded Protein Response Contributes Toward The Antitumor Activity Of Vorinostat. *Neoplasia*, 12, 80-6.

- Kahali, S., Sarcar, B., Prabhu, A., Seto, E. & Chinnaiyan, P. 2012. Class I Histone Deacetylases Localize To The Endoplasmic Reticulum And Modulate The Unfolded Protein Response. *Faseb J*, 26, 2437-45.
- Kaser, A. & Blumberg, R. S. 2010. Endoplasmic Reticulum Stress And Intestinal Inflammation. *Mucosal Immunol*, 3, 11-6.
- Kaser, A., Lee, A. H., Franke, A., Glickman, J. N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E. E., Higgins, D. E., Schreiber, S., Glimcher, L. H. & Blumberg, R. S. 2008. Xbp1 Links Er Stress To Intestinal Inflammation And Confers Genetic Risk For Human Inflammatory Bowel Disease. *Cell*, 134, 743-56.
- Kaser, A., Martinez-Naves, E. & Blumberg, R. S. 2010. Endoplasmic Reticulum Stress: Implications For Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol*, 26, 318-26.
- Kaufman, R. J. 1999. Stress Signaling From The Lumen Of The Endoplasmic Reticulum: Coordination Of Gene Transcriptional And Translational Controls. *Genes Dev*, 13, 1211-33.
- Koga, T., Suico, M. A., Shimasaki, S., Watanabe, E., Kai, Y., Koyama, K., Omachi, K., Morino-Koga, S., Sato, T., Shuto, T., Mori, K., Hino, S., Nakao, M. & Kai, H. 2015. Endoplasmic Reticulum (Er) Stress Induces Sirtuin 1 (Sirt1) Expression Via The Pi3k-Akt-Gsk3beta Signaling Pathway And Promotes Hepatocellular Injury. *J Biol Chem*, 290, 30366-74.
- Krishnan, V., Liu, B., Zhou, Z. 2013. 'Relax and Repair' to restrain aging.
- Ladiges, W. 2014. The quality control theory of aging. *Pathobiology of Aging & Age-related Diseases*, 4, 24835.
- Lee, H., Rezai-Zadeh, N. & Seto, E. 2004. Negative Regulation Of Histone Deacetylase 8 Activity By Cyclic Amp-Dependent Protein Kinase A. *Mol Cell Biol*, 24, 765-73.
- Lv, W. W., Wei, H. M., Wang, D. L., Ni, J. Q. & Sun, F. L. 2012. Depletion Of Histone Deacetylase 3 Antagonizes Pi3k-Mediated Overgrowth Of Drosophila Organs Through The Acetylation Of Histone H4 At Lysine 16. *J Cell Sci*, 125, 5369-78.
- Martin, D., Li, Y., Yang, J., Wang, G., Margariti, A., Jiang, Z., Yu, H., Zampetaki, A., Hu, Y., Xu, Q. & Zeng, L. 2014. Unspliced X-Box-Binding Protein 1 (Xbp1) Protects Endothelial Cells From Oxidative Stress Through Interaction With Histone Deacetylase 3. *J Biol Chem*, 289, 30625-34. *Aging*, 3, 943-54.
- Mollapour, M. & Neckers, L. 2012. Post-Translational Modifications Of Hsp90 And Their Contributions To Chaperone Regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1823, 648-55.
- Mori, K. 2000. Tripartite Management Of Unfolded Proteins In The Endoplasmic Reticulum. *Cell*, 101, 451-4.
- Nguyen, D. T., Kebache, S., Fazel, A., Wong, H. N., Jenna, S., Emadali, A., Lee, E. H., Bergeron, J. J., Kaufman, R. J., Larose, L. & Chevet, E. 2004. Nck-Dependent Activation Of Extracellular Signal-Regulated Kinase-1 And Regulation Of Cell Survival During Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol Biol Cell*, 15, 4248-60.
- Okada, T., Yoshida, H., Akazawa, R., Negishi, M. & Mori, K. 2002. Distinct Roles Of Activating Transcription Factor 6 (Atf6) And Double-Stranded Rna-Activated Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase (Perk) In Transcription During The Mammalian Unfolded Protein Response. *Biochem J*, 366, 585-94.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L. H. & Hotamisligil, G. S. 2004. Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, And Type 2 Diabetes. *Science*, 306, 457-61.

- Pflum, M. K., Tong, J. K., Lane, W. S. & Schreiber, S. L. 2001. Histone Deacetylase 1 Phosphorylation Promotes Enzymatic Activity And Complex Formation. *J Biol Chem*, 276, 47733-41.
- Pruitt, K., Zinn, R. L., Ohm, J. E., Mcgarvey, K. M., Kang, S. H., Watkins, D. N., Herman, J. G. & Baylin, S. B. 2006. Inhibition Of Sirt1 Reactivates Silenced Cancer Genes Without Loss Of Promoter Dna Hypermethylation. *Plos Genet*, 2, E40.
- Rao, R., Nalluri, S., Kolhe, R., Yang, Y., Fiskus, W., Chen, J., Ha, K., Buckley, K. M., Balusu, R., Coothankandaswamy, V., Joshi, A., Atadja, P. & Bhalla, K. N. 2010. Treatment With Panobinostat Induces Glucose-Regulated Protein 78 Acetylation And Endoplasmic Reticulum Stress In Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Ther*, 9, 942-52.
- Sanders, YY., Liu, H., Zhang, X., Hecker, L., Bernard, K., Desai, L., Liu, G., Thannickal, VJ. 2013. Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress. *Redox Biol*, 1, 8-16.
- Schroder, M., Clark, R., Liu, C. Y. & Kaufman, R. J. 2004. The Unfolded Protein Response Represses Differentiation Through The Rpd3-Sin3 Histone Deacetylase. *Embo J*, 23, 2281-92.
- Schroder, M. & Kaufman, R. J. 2005a. Er Stress And The Unfolded Protein Response. *Mutat Res*, 569, 29-63.
- Schroder, M. & Kaufman, R. J. 2005b. The Mammalian Unfolded Protein Response. *Annu Rev Biochem*, 74, 739-89.
- Sengupta, N. & Seto, E. 2004. Regulation Of Histone Deacetylase Activities. *J Cell Biochem*, 93, 57-67.
- Treton, X., Pedruzzi, E., Cazals-Hatem, D., Grodet, A., Panis, Y., Groyer, A., Moreau, R., Bouhnik, Y., Daniel, F. & Ogier-Denis, E. 2011. Altered Endoplasmic Reticulum Stress Affects Translation In Inactive Colon Tissue From Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, 141, 1024-35.
- Tsai, S. C. & Seto, E. 2002. Regulation Of Histone Deacetylase 2 By Protein Kinase Ck2. *J Biol Chem*, 277, 31826-33.
- Tsuru, A., Fujimoto, N., Takahashi, S., Saito, M., Nakamura, D., Iwano, M., Iwawaki, T., Kadokura, H., Ron, D. & Kohno, K. 2013. Negative Feedback By Ire1beta Optimizes Mucin Production In Goblet Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 2864-9.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P. & Ron, D. 2000. Coupling Of Stress In The Er To Activation Of Jnk Protein Kinases By Transmembrane Protein Kinase Ire1. *Science*, 287, 664-6.
- Vaquero, A., Sternglanz, R. & Reinberg, D. 2007. Nad+-Dependent Deacetylation Of H4 Lysine 16 By Class Iii HDAC. *Oncogene*, 26, 5505-20.
- Viatour, P., Legrand-Poels, S., Van Lint, C., Warnier, M., Merville, M. P., Gielen, J., Piette, J., Bours, V. & Chariot, A. 2003. Cytoplasmic IκBα Increases Nf-κB-Independent Transcription Through Binding To Histone Deacetylase (Hdac) 1 And Hdac3. *J Biol Chem*, 278, 46541-8.
- Wang, A. H., Kruhlak, M. J., Wu, J., Bertos, N. R., Vezmar, M., Posner, B. I., Bazett-Jones, D. P. & Yang, X. J. 2000. Regulation Of Histone Deacetylase 4 By Binding Of 14-3-3 Proteins. *Mol Cell Biol*, 20, 6904-12.
- Wang, F. M., Chen, Y. J. & Ouyang, H. J. 2011. Regulation Of Unfolded Protein Response Modulator Xbp1s By Acetylation And Deacetylation. *Biochem J*, 433, 245-52.
- Wang, M. & Kaufman, R. J. 2014. The Impact Of The Endoplasmic Reticulum Protein-Folding Environment On Cancer Development. *Nat Rev Cancer*, 14, 581-97.

- Yang, W. M., Tsai, S. C., Wen, Y. D., Fejer, G. & Seto, E. 2002. Functional Domains Of Histone Deacetylase-3. *J Biol Chem*, 277, 9447-54.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. & Mori, K. 2001a. Xbp1 Mrna Is Induced By Atf6 And Spliced By Ire1 In Response To Er Stress To Produce A Highly Active Transcription Factor. *Cell*, 107, 881-91.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M. & Mori, K. 2001b. Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Formation Of Transcription Factor Complex Ersf Including Nf-Y (Cbf) And Activating Transcription Factors 6alpha And 6beta That Activates The Mammalian Unfolded Protein Response. *Mol Cell Biol*, 21, 1239-48.
- Zhang, X., Ozawa, Y., Lee, H., Wen, Y. D., Tan, T. H., Wadzinski, B. E. & Seto, E. 2005. Histone Deacetylase 3 (Hdac3) Activity Is Regulated By Interaction With Protein Serine/Threonine Phosphatase 4. *Genes Dev*, 19, 827-39.
- Zheng, W., Rosenstiel, P., Huse, K., Sina, C., Valentonyte, R., Mah, N., Zeitlmann, L., Grosse, J., Ruf, N., Nurnberg, P., Costello, C. M., Onnie, C., Mathew, C., Platzer, M., Schreiber, S. & Hampe, J. 2006. Evaluation Of Agr2 And Agr3 As Candidate Genes For Inflammatory Bowel Disease. *Genes Immun*, 7, 11-8.

PARTIE III
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

L'hypothèse de l'origine fœtale des maladies de l'adulte ou «hypothèse de Barker» suggère qu'une altération du développement fœtal pendant la gestation est fortement corrélée au développement de pathologies chroniques à l'âge adulte (Barker et al, 1993; Hales et al, 1992). Les études épidémiologiques et de cohortes portant notamment sur la Dutch famine ont ainsi démontré une forte corrélation entre le faible poids de naissance (dont la cause principale est le retard de croissance intra-utérin) et le développement, à l'âge adulte, d'une obésité, d'une insulino-résistance, d'un diabète de type II, de maladies cardiovasculaires et d'une hypertension artérielle. Cette hypothèse a été étayée par de nombreux modèles de perturbations de l'environnement nutritionnel. Les modèles animaux de RCIU par exemple, confirment le lien entre un environnement nutritionnel fœtal altéré et la survenue d'altérations du métabolisme qui prédisposent à la survenue de pathologies chroniques à l'âge adulte. Les mécanismes moléculaires de cette programmation fœtale se basent sur des modifications épigénétiques de l'expression de gènes impliqués dans le développement d'organes clés tels que le foie, le rein ou le muscle. Ces modifications épigénétiques qui sont stables et transmises au cours des divisions cellulaires. Ainsi, pour un génome identique, l'épigénome établi *in utero* va permettre la modulation de son expression pour aboutir à un phénotype (phéno) spécifique d'un individu donné. Dans le cas du RCIU, ces modulations épigénétiques vont adapter le métabolisme des tissus à un environnement périnatal délétère, favorisant la survie à court terme du fœtus et l'adaptation du métabolisme du nouveau-né à un environnement postnatal de même nature. Cependant, lorsque cet environnement postnatal ne correspond pas à l'environnement prédit *in utero* du fait notamment d'apports caloriques excessifs, le métabolisme modelé *in utero* n'est plus adapté. Ce « mismatch » favoriserait progressivement l'installation de troubles métaboliques et de maladies chroniques.

Une dénutrition protéique périnatale induit une programmation métabolique de l'épithélium colique.

Les données de la littérature scientifique suggèrent indubitablement une programmation métabolique d'organes tels que le foie, le rein et le muscle par le RCIU. A contrario, les données faisant état d'une programmation de l'épithélium colique par le RCIU qui conduirait à une susceptibilité accrue aux pathologies digestives telles que les maladies chroniques de l'intestin (MICI) et le cancer colorectal (CCR) sont éparpillées et inconsistantes. Quelques

études épidémiologiques portant sur les relations entre le poids de naissance et les MICI ou le CCR concluent à des résultats contradictoires (cf pages 87-88). Il semble tout de même raisonnable de penser que le côlon puisse aussi faire l'objet d'une programmation métabolique en réponse au RCIU. En effet, bien que la génétique joue clairement un rôle dans l'étiologie des MICI, la nature exacte et l'importance de la prédisposition génétique est assez complexe à mettre en évidence. À ce jour, les études d'association génique (GWAS) ont identifié plus de 160 loci génétiques qui confèrent une prédisposition au MICI (Knights et al, 2013; Liu et al, 2015). En dehors de rares cas tels que les mutations du gène NOD2/CARD15, leur impact sur la survenue de MICI est à relativiser. Le fait que les polymorphismes génétiques seuls ne prédisent pas la maladie, mais confèrent simplement un risque de développer une MICI, souligne l'importance des facteurs environnementaux (microbiote, nutrition, stress) dans l'étiologie de ces maladies. Ces facteurs environnementaux pourraient jouer un rôle majeur dans les MICI et le CCR en modifiant l'épigénome (méthylation de l'ADN, modifications des histones) particulièrement au cours de fenêtre de vulnérabilité telle que la période néonatale (Kellermayer 2012, 2017). Les mécanismes épigénétiques sont particulièrement importants dans le renouvellement et la maturation de l'épithélium intestinal. Des modifications précoces de l'épigénome de cellules souches constituant l'épithélium colique peuvent avoir un effet durable sur la fonction barrière du colon et modifier la réponse de cette dernière vis-à-vis de facteurs environnementaux (nutriments, xénobiotique, stress, microbiote) faisant ainsi le lit de pathologies chroniques à l'âge adulte. Etudier l'hypothèse d'une programmation métabolique du tube digestif n'est pas chose aisée à démontrer car la régulation de la fonction barrière de l'intestin implique des types cellulaires différents pouvant être les cibles de modifications épigénétiques spécifiques.

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé le modèle de RCIU induit par une dénutrition protéique pendant la gestation et la lactation chez le rat afin d'étudier les conséquences à long terme d'une altération de l'environnement nutritionnel périnatal sur la programmation de la fonction barrière de l'épithélium colique. Il s'agissait aussi de définir et d'analyser les mécanismes moléculaires potentiellement à la base de cette programmation.

A l'instar de l'induction de la programmation métabolique de tissus tels que le foie, le muscle, le pancréas ou l'hypothalamus décrite dans le cadre de ce modèle de RCIU, au cours de notre première étude nous décrivons des modifications métaboliques et épigénétiques des cellules épithéliales coliques (CEC). Ces modifications contribueraient à perturber la fonction barrière

du colon et prédisposeraient les rats adultes à des pathologies coliques telles que l'inflammation et le CCR.

Le butyrate en tant que source énergétique et modulateur épigénétique joue un rôle clé dans l'homéostasie de l'épithélium colique. La programmation métabolique des CEC induite par le RCIU s'illustre essentiellement par une altération de l'utilisation du butyrate. Les rats nés avec un RCIU présentent au niveau de l'épithélium colique une diminution de l'expression de son transporteur MCT1 et de celle d'une enzyme clé de sa β -oxydation, la scACAD. La réduction de l'utilisation du butyrate contribuerait aux altérations de la barrière tout d'abord en diminuant les effets régulateurs du butyrate sur l'épithélium colique mais aussi en réduisant ses effets régulateurs épigénétiques.

Le butyrate est notamment nécessaire à la production d'énergie et au maintien des concentrations d'ATP produites par les mitochondries des colonocytes (Roediger 1980, 1982). La diminution de la production du butyrate chez les animaux germe-free s'accompagne par exemple, d'une diminution de la respiration mitochondriale, de la phosphorylation oxydative et de l'expression de gènes catalysant des étapes clés du métabolisme énergétique (Donohoe et al, 2011). A l'image de ces données, dans le cadre de notre modèle de RCIU, la diminution de l'utilisation du butyrate induirait chez le rat RCIU, un dysfonctionnement mitochondrial illustré par une diminution du nombre de mitochondries et de la synthèse d'ATP. A noter que des altérations du métabolisme du butyrate et des dysfonctions mitochondriales sont également mises en évidence dans le cadre des MICIs. En effet, les cellules épithéliales coliques des patients atteints de RCH présentent des altérations mitochondriales en amont de toutes autres anomalies structurales de l'épithélium (Delpre et al, 1989; Hsieh et al, 2006; Novak et al, 2015).

Le butyrate et la production d'ATP sont indispensables au renouvellement de l'épithélium colique et au maintien de la polarité des jonctions serrées (Kripke et al, 1989; Novak et al, 2015). La réduction de l'absorption du butyrate et de son oxydation peut expliquer la diminution du renouvellement de l'épithélium colique et de la prolifération des CEC observées chez les animaux RCIU. De même, le butyrate joue un rôle important dans la synthèse de MUC2 et l'homéostasie des cellules à mucus (Barcelo et al, 2000; Finnie et al, 1995; Gaudier et al, 2004). Une perturbation du métabolisme du butyrate pourrait être à l'origine de la diminution du nombre de cellules à mucus observée chez les animaux RCIU.

La mitochondrie est l'un des principaux organites cellulaires impliqués dans la production et la régulation des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Des études ont démontré que le RCIU peut conduire à une augmentation du stress oxydatif dans les

mitochondries des cellules hépatiques, pancréatiques et de l'hypothalamus ainsi qu'à une insuffisance de la fonction mitochondriale. Ces dommages médiés par les ROS et le stress oxydatif contribuent à l'altération de ces cellules (Alexandre-Gouabau et al, 2013; Peterside et al, 2003; Simmons et al, 2005). Notamment, dans le cadre d'un modèle de RCIU induit par restriction calorique, le stress oxydant observé au niveau de l'endothélium constitue un mécanisme explicatif de la programmation des rats RCIU à l'hypertension à l'âge adulte (Franco Mdo et al, 2002; Ojeda et al, 2012).

Par ailleurs, la production de ROS est connue pour altérer le fonctionnement de la mitochondrie, en particulier la chaîne respiratoire, ce qui amplifie la production de ROS. Nos résultats indiquent un stress oxydant au sein de la barrière épithéliale colique des rats RCIU illustré par une augmentation des TBARS et une augmentation de l'expression d'iNOS dont la production est normalement diminuée par la réponse antioxydant (Han et al, 2001). Ce stress est accentué par une diminution de la défense antioxydante. Cette augmentation du stress oxydant pourrait perturber la synthèse d'ATP et induire un stress du RE et une inflammation (Kozlov et al, 2009). Ceci est particulièrement pertinent dans notre contexte où nous avons en effet observé des niveaux d'ARNm de l'IL1- β et d'iNOS augmentés dans les CEC des rats RCIU. Inversement, l'inflammation peut également affecter les mitochondries et le stress du RE (Kozlov et al, 2009).

Comme nous l'avons vu dans la partie introductive de la thèse, le butyrate est aussi un modulateur épigénétique qui inhibe les activités HDAC et stimule les activités HATs régulant ainsi l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie de l'épithélium colique.

Dans le cadre du RCIU, la diminution de l'utilisation du butyrate est associée à une diminution des effets régulateurs épigénétiques de la molécule. En conséquence, on assiste à une augmentation des activités HDAC (probablement par diminution de leur inhibition) ainsi qu'à une perte d'acétylation des histones H3 et H4 et plus particulièrement d'H4K16. L'acétylation de l'H4K16 est associée à une activation transcriptionnelle de gènes spécifiques et la perte d'acétylation de l'H4K16 au niveau des promoteurs contribue à la répression de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (Kapoor-Vazirani et al, 2008). La perte d'acétylation mise en évidence est globale, affectant les séquences LINE du génome, et pourrait conduire à une instabilité génomique. A un niveau plus local, cette perte d'acétylation affecte le promoteur du gène codant pour MCT1. Nous avons en effet trouvé que le RCIU diminuait l'acétylation de l'H4K16 dans une région du promoteur du gène MCT1 importante pour sa transcription. En effet dans une étude indépendante, notre équipe a montré que le

butyrate induisait l'acétylation de H4K16 au niveau du promoteur de MCT1 et stimulait son activité transcriptionnelle (résultats non publiés). Cette perte d'acétylation pourrait contribuer à la diminution de l'expression de MCT1 et *in fine* à la diminution du transport du butyrate. Ceci est particulièrement pertinent dans l'analogie faite avec le CCR puisqu'une diminution progressive de l'expression de MCT1 est observée au cours de la cancérogénèse colorectale (Lambert et al, 2002).

L'ATP citrate lyase (ACL), enzyme impliquée dans la conversion du citrate en acétyl-CoA, joue aussi un rôle pivot dans l'acétylation des histones en fournissant leur substrat (acétyl-CoA) aux HAT (Donohoe et al, 2012a; Donohoe et al, 2012b; Wellen et al, 2009). La diminution d'ACL constatée chez les animaux RCIU pourrait aussi constituer un mécanisme explicatif de la perte d'acétylation d'H4K16 observée bien que nous n'ayons pas observé de modifications de l'activité des HATs dans ce contexte.

En plus des modifications du métabolisme du butyrate mise en évidence, la dénutrition protéique induite *in utero* pourrait avoir affecté le fonctionnement du RE, en particulier la machinerie de synthèse des protéines au niveau de la barrière épithéliale colique. Des données collectées précédemment au sein de notre laboratoire, ont particulièrement démontré une altération de la synthèse protéique dans les muscles des rats RCIU (Bourdon et al, 2016). A l'âge adulte, nos animaux RCIU présentent un stress du RE comme le montrent l'activation de la réponse UPR et l'augmentation de l'expression d'XBPs au niveau de leur épithélium colique. Un stress du RE et une réponse UPR adaptée sont nécessaires au fonctionnement des CEC. A l'inverse, une réponse mal adaptée et un stress non contrôlé font partie de l'étiologie des MICI et du CCR. En lien avec les données suggérant l'importance du butyrate dans l'homéostasie du tissu colique et attendu qu'une perturbation du métabolisme de cette molécule et un stress du RE sont mis en évidence dans le cadre des pathologies coliques, nous observons une augmentation de la susceptibilité à l'inflammation induite par le DSS et du cancer associé à la colite chez les animaux RCIU.

Effet « programming » du microbiote intestinal et incidence sur la fonction barrière de l'intestin.

Le microbiote intestinal module l'expression de gènes impliqués dans le système immunitaire, la biosynthèse du mucus, le turnover des cellules intestinales, la maturation de la muqueuse intestinale et le métabolisme énergétique (Chow et al, 2010; Chowdhury et al, 2007; Donohoe et al, 2011; Larsson et al, 2012; Patrignani et al, 2014). Comme nous l'avons vu

précédemment, l'activité fermentaire du microbiote intestinal permet la synthèse des AGCC et notamment du butyrate. En ce sens, un changement dans la densité, la composition et/ou l'activité de ce microbiote est susceptible d'altérer l'homéostasie de l'épithélium colique et est retrouvé dans de nombreuses pathologies intestinales. Compte tenu de l'importance de ce microbiote et de sa plasticité en réponse aux facteurs environnementaux notamment durant la période néonatale (Arrieta et al, 2014), il convient également de considérer une potentielle programmation de ce microbiote en réponse à la restriction protéique maternelle et au RCIU. L'hypothèse étant que le RCIU altérerait ou façonnerait un microbiote intestinal néonatal modifiant à long terme ses effets régulateurs sur la muqueuse intestinale, sur la programmation immunologique et le métabolisme du butyrate. Au sein de notre unité Franca-Berthon et ses collaborateurs ont particulièrement indiqué que le RCIU modifiait la composition et l'activité fermentaire du microbiote intestinal en période postnatale (Fanca-Berthon et al, 2010). Un effet « mémoire » de cette modification du microbiote intestinal subsisterait jusqu'à l'âge adulte et pourrait probablement participer à une plus grande sensibilité aux pathologies intestinales.

Evidence d'un vieillissement accéléré de la muqueuse colique en réponse au RCIU : théorie de la perte du contrôle qualité de la cellule

Selon la Théorie de la perte du contrôle qualité de la cellule énoncée par Ladige, le vieillissement est la résultante d'une perte du contrôle qualité de différents systèmes conçus pour assurer l'homéostasie de la cellule (Ladiges 2014). On observe ainsi au cours du vieillissement, une augmentation progressive des activités HDAC et du stress du RE (Ladiges 2014; Salminen et al, 2010; Willis-Martinez et al, 2010). De façon intéressante, la perte d'acétylation d'H4K16 est aussi une marque épigénétique du vieillissement (Krishnan et al, 2011) et du CCR (Fraga et al, 2005b). Les travaux de Fraga et de ses collaborateurs (Fraga et al, 2005b; Fraga et al, 2005a) montrent que l'acétylation d'H4K16 est diminuée dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines et dans deux tumeurs primaires (lymphome et adénocarcinome colorectal). Cette perte d'acétylation est spécifique à ce résidu, aucune différence n'étant observée dans le niveau d'acétylation des résidus lysine Lys5, Lys8 et Lys12 de l'histone H4. Les études de Dang (Dang et al, 2009) et de Sanders (Sanders et al, 2013) montrent quant à elles une hypoacétylation d'H4K16 au cours du vieillissement. Cette perte d'acétylation est associée à des défauts de la réparation de l'ADN et à une sénescence cellulaire prématurée (Krishnan et al, 2011).

Nos résultats mettent en évidence l'installation progressive de nombreuses altérations de l'homéostasie de la cellule (activation des HDAC, perte d'acétylation H4K16 et stress du RE) qui laisseraient supposer une perte du contrôle qualité chez les animaux RCIU. Dans le contexte du RCIU, on semble donc assister à une accélération ou une amplification des processus de vieillissement. Nos résultats sont en accord avec les données épidémiologiques issues de la cohorte Néerlandaise (Dutch famine) où il a été observé une augmentation des marqueurs biologiques du vieillissement (de Rooij et al, 2013). En somme, le RCIU chez le rat induirait un vieillissement accéléré de l'épithélium colique caractérisé par des altérations de la fonction barrière et une susceptibilité aux pathologies coliques (inflammation et cancer). Cette théorie est particulièrement pertinente avec le fait que l'âge est un facteur augmentant le risque d'apparition de ces maladies.

En conclusion, nos résultats démontrent que le RCIU induit des modifications métaboliques et épigénétiques dans les CEC altérant la structure et la fonction de la barrière épithéliale colique (**Figure 20**). L'exposition du côlon à un environnement nutritionnel post-natal « enrichi » pourrait induire un dysfonctionnement précoce de la mitochondrie et du RE entraînant un stress oxydant et une inflammation dans l'épithélium colique. Considérant le rôle majeur du butyrate dans le maintien de l'homéostasie colique, la diminution de l'utilisation du butyrate par les CEC pourrait constituer un facteur important dans l'effet du RCIU. La perte d'inhibition des activités HDAC entraînerait la perte d'acétylation de l'H4K16 et donc la modification de l'expression de gènes et une instabilité de l'ADN. L'ensemble de ces effets pourrait expliquer l'augmentation de la susceptibilité des rats RCIU à l'inflammation et au CCR. Nos données soutiennent fortement l'hypothèse d'une origine développementale de ces pathologies.

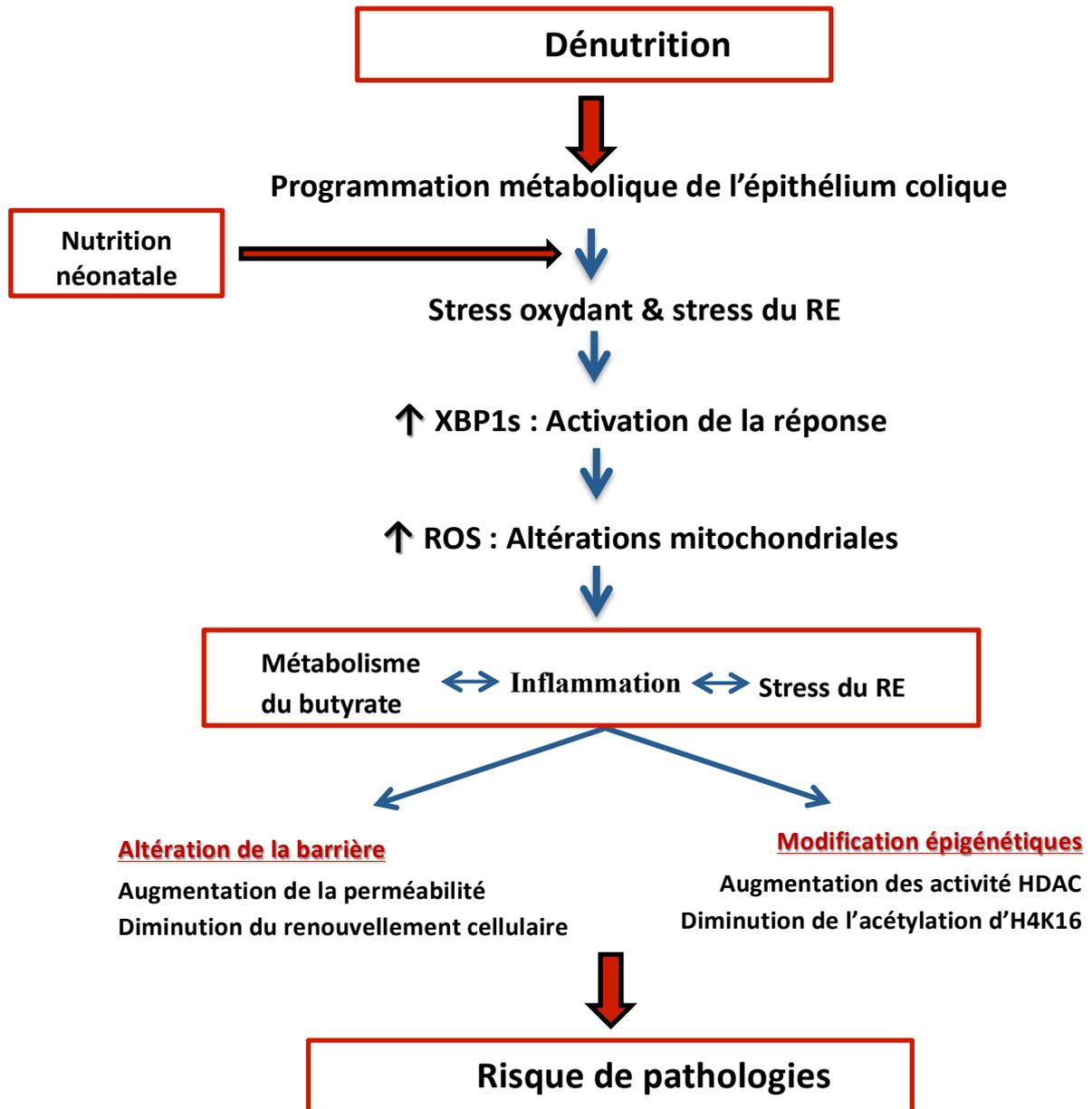


Figure 20: Modèle mécanistique des altérations induites au niveau de l'épithélium colique dans le modèle de RCIU chez le rat.

Rôle du stress du RE dans les modifications épigénétiques

Les données de la littérature indiquent une régulation du stress du RE et de la réponse UPR par les HDAC. Les HDAC 1, 2 et 3 ont par ailleurs été localisées dans le RE où elles régulent l'acétylation d'acteurs de la réponse UPR et l'activation de cette dernière. A contrario, seules deux études suggèrent, en l'état actuel des connaissances, une régulation des HDAC par le stress du RE (Martin et al, 2014; Schroder et al, 2004). Au cours de notre seconde étude, nous avons pour objectif d'étudier l'implication du stress RE dans les modifications de l'épigénome et en particulier dans la perte d'acétylation d'H4K16 et l'activation des HDAC. Il s'agissait également de mettre en évidence les mécanismes et les acteurs de la réponse UPR permettant l'activation des HDAC en contexte de stress du RE. L'**hypothèse** de notre étude était que le stress du RE pourrait contribuer aux modifications épigénétiques de la barrière épithéliale colique et participer à l'activation des HDAC et la perte d'acétylation d'H4K16 observées dans le cadre du RCIU. Nous montrons qu'un stress du RE peut induire une perte d'acétylation d'H4K16 via une activation des HDAC. La réponse UPR, et en particulier la voie IRE1, semble stimuler HDAC3 en induisant sa phosphorylation et sa translocation nucléaire à l'origine de son activation. L'activation de l'HDAC3, et sans doute d'autres HDAC, conduirait à la perte d'acétylation d'H4K16. En lien avec notre première étude, ces résultats sont particulièrement intéressants et nous indiquent que le stress du RE peut à lui seul induire chez les animaux RCIU, une perte d'acétylation d'H4K16 indépendamment de celle médiée par la perte des effets régulateurs du butyrate.

Stratégie nutritionnelle pour la prévention des altérations de la barrière épithéliale colique induite par un RCIU.

Au cours de notre troisième étude, nous avons mis en place une stratégie nutritionnelle basée sur des modulateurs du stress RE visant à prévenir les altérations de barrière épithéliale colique induit dans un contexte de dénutrition protéique périnatale dans notre modèle de RCIU chez le rat. Le rationnel était que le stress du RE observé à l'âge adulte chez des animaux nés avec un RCIU pouvait provenir d'une programmation du fonctionnement du RE. Conformément à la théorie de la programmation fœtale, notre hypothèse est que la réduction des apports en protéines au cours de la période néonatale pourrait programmer le RE à une capacité de synthèse réduite. Le stress du RE est observé après le sevrage, période où la nourriture fournie bien que normale, est trop riche en protéines par rapport au régime des mères durant la période néonatale. Nous pouvons supposer que le stress du RE interviendrait

consécutivement au "mismatch" entre l'environnement in utero caractérisé par une dénutrition protéique et un environnement nutritionnel postnatal relativement riche et dans lequel la demande de synthèse des protéines imposées au RE ne correspond plus à la capacité prédite in utero. L'apparition d'un stress du RE à l'âge adulte chez les rats nés avec un RCIU pourrait ainsi contribuer aux dysfonctionnements de la barrière épithéliale conduisant à une plus grande susceptibilité à l'inflammation à l'instar de ce qui est décrit dans les MICI. Dans un contexte inflammatoire, l'administration périnatale de phénylbutyrate et de glutamine atténue partiellement le stress du RE induit par la colite chez les animaux RCIU. L'administration périnatale de phénylbutyrate et de glutamine favorise la réparation de la muqueuse colique après une colite induite par DSS chez des rats RCIU.

Par ailleurs, l'inhibition de la synthèse des protéines et le stress du RE au niveau du placenta ont récemment été identifiés comme une partie de l'étiologie de l'IUGR. Une perturbation de l'environnement fœto-placentaire telle que l'hypoxie, peut entraîner un stress du RE, une inhibition de la synthèse protéique et un RCIU (Vo et al, 2012; Yung et al, 2012a). Alors que le stress du RE est associé à une adaptation à court terme de la vie fœtale à une perturbation de l'environnement in utero, des études récentes suggèrent que le stress du RE pourrait persister jusqu'à l'âge adulte.

De même, à l'âge adulte (8 mois), on observe chez les animaux RCIU une réponse mal adaptée à un régime hyperlipidique (HF), caractérisée par une réduction de l'activité phosphatase alcaline (Lallès, 2012). Une analyse du transcriptome (puce ADN) de cellules épithéliales coliques de ces rats montre que le régime HF induit chez les rats RCIU une altération des gènes impliqués dans le fonctionnement de la mitochondrie et surtout du RE, comme par exemple RETSAT et OASIS (Segain, 2015). Il est intéressant de noter que les souris KO pour OASIS présentent des anomalies de la barrière épithéliale colique semblables à celles observées dans notre modèle RCIU, à savoir une réduction du nombre des cellules à mucus et une susceptibilité accrue à la colite au DSS (Asada et al, 2012). Pour confirmer que la réponse mal adaptée de l'épithélium intestinal au régime HF est associée au stress du RE, nous avons gavé des rats contrôles et RCIU avec du palmitate, un acide gras saturé connu pour induire un stress du RE. Nous avons observé une induction plus forte du stress du RE au niveau de l'intestin grêle des rats RCIU.

Chez le rats, il a aussi été démontré que la restriction protéique maternelle durant la gestation et la lactation induisait une insulino résistance et une hypercholestérolémie à l'âge adulte associé à un stress du RE dans le foie de ces animaux (Sohi et al, 2013; Vo et al, 2012). Pour aller plus loin, d'autres modèles de perturbations néonatales laissent sous-entendre une

programmation du fonctionnement du RE dans différents organes. Ainsi, dans un modèle d'obésité maternelle induite chez le rat, il a particulièrement été mis en évidence un stress du RE dans le pancréas de la descendance à l'âge adulte (Soeda et al, 2016). Ce stress RE est particulièrement augmenté chez la descendance nourrie avec un régime High fat.

Le phénylbutyrate (PBA) est une prodrogue approuvée par la FDA (Food and Drug Administration). Son utilisation est indiquée dans les désordres du cycle de l'urée. Cette molécule permet de réduire les concentrations plasmatiques élevées en ammoniacque chez les patients atteints de cette pathologie. Outre ces applications, le PBA est aussi un inhibiteur des HDAC et une chaperonne chimique qui permet de prévenir l'agrégation des protéines mal repliées et le stress du RE. Le potentiel thérapeutique du PBA est actuellement évalué dans de nombreux essais cliniques pour le traitement de pathologies dont l'étiologie comprend un stress du RE, un mauvais repliement des protéines ou une inflammation associée au stress du RE. Ces pathologies comprennent notamment la maladie de Huntington, de d'Alzheimer, l'obésité et le diabète de type 2. Le traitement au PBA a démontré son efficacité dans le traitement de colite induite au DSS (Cao et al, 2013; Ono et al, 2014).

À ce jour, la sécurité d'emploi de ce médicament au cours de la grossesse n'a pas été établie. Il n'existe aucune information sur la tératogénicité de ce médicament. L'excrétion de phénylacétate dans le lait humain n'a pas non plus été étudiée. Suivant le principe de précaution, l'utilisation du PBA est contre-indiquée chez la femme enceinte. Malgré ce manque d'information, une étude de cas indique qu'un traitement à long terme avec une PBA pendant la grossesse n'a pas entraîné de conséquences néfastes pour le fœtus (Redonnet-Vernhet et al, 2000). Cette étude pourrait suggérer l'innocuité de l'administration de cette molécule durant la grossesse. Des résultats supplémentaires demeurent nécessaires afin d'établir l'impact réel de ce traitement.

L'association du PBA avec de la glutamine a été motivée par les observations de Darmaun et ses collègues suggérant que l'administration orale de PBA induit une déplétion des concentrations plasmatiques en glutamine. Dans notre contexte, cette déplétion en glutamine serait susceptible d'accentuer le RCIU d'autant plus que la restriction protéique maternelle se caractérise déjà par la réduction du transport et du métabolisme des acides aminés. La supplémentation en glutamine est également pertinente dans le cadre de notre étude compte tenu du rôle de cet acide aminé dans la réparation de barrière colique et dans l'atténuation du stress du RE et de l'inflammation (Crespo et al, 2012; Vicario et al, 2007; Wang et al, 2015; Wang et al, 2016; Xue et al, 2011). Enfin, de nouvelles thérapies pour prévenir ou traiter le RCIU tablent sur une amélioration de la disponibilité des acides aminés

dans les régimes maternels et suggèrent l'efficacité de la supplémentation en glutamine dans la prévention du RCIU. Au cours de notre étude, nous n'avons pas étudié les effets de la supplémentation sur les modifications épigénétiques identifiées précédemment chez les animaux RCIU. Compte tenu des propriétés inhibitrices du PBA sur les HDAC, il convient d'étudier la capacité de notre traitement périnatal à reverser les modifications épigénétiques mises en évidence chez les animaux RCIU.

PARTIE IV
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2008), 'ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum', *Cell Struct Funct*, 33 (1), 75-89.
- Ahmad, M. S., Krishnan, S., Ramakrishna, B. S., Mathan, M., Pulimood, A. B., and Murthy, S. N. (2000), 'Butyrate and glucose metabolism by colonocytes in experimental colitis in mice', *Gut*, 46 (4), 493-9.
- Al-Sadi, R., Ye, D., Dokladny, K., and Ma, T. Y. (2008), 'Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability', *J Immunol*, 180 (8), 5653-61.
- Al-Sadi, R. M. and Ma, T. Y. (2007), 'IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability', *J Immunol*, 178 (7), 4641-9.
- Alexandre-Gouabau, M. C., Courant, F., Moyon, T., Kuster, A., Le Gall, G., Tea, I., . . . Darmaun, D. (2013), 'Maternal and cord blood LC-HRMS metabolomics reveal alterations in energy and polyamine metabolism, and oxidative stress in very-low birth weight infants', *J Proteome Res*, 12 (6), 2764-78.
- Altonsy, M. O., Habib, T. N., and Andrews, S. C. (2012), 'Diallyl disulfide-induced apoptosis in a breast-cancer cell line (MCF-7) may be caused by inhibition of histone deacetylation', *Nutr Cancer*, 64 (8), 1251-60.
- Arai, M., Kondoh, N., Imazeki, N., Hada, A., Hatsuse, K., Kimura, F., . . . Yamamoto, M. (2006), 'Transformation-associated gene regulation by ATF6alpha during hepatocarcinogenesis', *FEBS Lett*, 580 (1), 184-90.
- Arrieta, M. C., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E. M., and Finlay, B. (2014), 'The intestinal microbiome in early life: health and disease', *Front Immunol*, 5, 427.
- Asada, R., Saito, A., Kawasaki, N., Kanemoto, S., Iwamoto, H., Oki, M., . . . Imaizumi, K. (2012), 'The endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in the terminal differentiation of goblet cells in the large intestine', *J Biol Chem*, 287 (11), 8144-53.
- Asker, N., Axelsson, M. A., Olofsson, S. O., and Hansson, G. C. (1998), 'Dimerization of the human MUC2 mucin in the endoplasmic reticulum is followed by a N-glycosylation-dependent transfer of the mono- and dimers to the Golgi apparatus', *J Biol Chem*, 273 (30), 18857-63.
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., and Holm, L. (2001), 'The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280 (5), G922-9.
- Baksh, S. and Michalak, M. (1991), 'Expression of calreticulin in Escherichia coli and identification of its Ca²⁺ binding domains', *J Biol Chem*, 266 (32), 21458-65.
- Balasubramanyam, K., Swaminathan, V., Ranganathan, A., and Kundu, T. K. (2003), 'Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300', *J Biol Chem*, 278 (21), 19134-40.
- Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (2011), 'Regulation of chromatin by histone modifications', *Cell Res*, 21 (3), 381-95.
- Barcelo, A., Claustre, J., Moro, F., Chayvialle, J. A., Cuber, J. C., and Plaisancie, P. (2000), 'Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon', *Gut*, 46 (2), 218-24.
- Barker, D. J., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D., and Wadsworth, M. E. (1989a), 'Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease', *Bmj*, 298 (6673), 564-7.
- Barker, D. J., Winter, P. D., Osmond, C., Margetts, B., and Simmonds, S. J. (1989b), 'Weight in infancy and death from ischaemic heart disease', *Lancet*, 2 (8663), 577-80.
- Barker, D. J., Osmond, C., Thornburg, K. L., Kajantie, E., and Eriksson, J. G. (2013), 'The shape of the placental surface at birth and colorectal cancer in later life', *Am J Hum Biol*, 25 (4), 566-8.
- Barker, D. J., Gluckman, P. D., Godfrey, K. M., Harding, J. E., Owens, J. A., and Robinson, J. S. (1993), 'Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life', *Lancet*, 341 (8850), 938-41.
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., . . . Clevers, H. (2007), 'Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5', *Nature*, 449 (7165), 1003-7.

- Barrett, J. C., Hansoul, S., Nicolae, D. L., Cho, J. H., Duerr, R. H., Rioux, J. D., . . . Daly, M. J. (2008), 'Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease', *Nat Genet*, 40 (8), 955-62.
- Baserga, M., Bertolotto, C., Maclennan, N. K., Hsu, J. L., Pham, T., Laksana, G. S., and Lane, R. H. (2004), 'Uteroplacental insufficiency decreases small intestine growth and alters apoptotic homeostasis in term intrauterine growth retarded rats', *Early Hum Dev*, 79 (2), 93-105.
- Baserga, M., Hale, M. A., Wang, Z. M., Yu, X., Callaway, C. W., McKnight, R. A., and Lane, R. H. (2007), 'Uteroplacental insufficiency alters nephrogenesis and downregulates cyclooxygenase-2 expression in a model of IUGR with adult-onset hypertension', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292 (5), R1943-55.
- Baserga, M., Kaur, R., Hale, M. A., Bares, A., Yu, X., Callaway, C. W., . . . Lane, R. H. (2010), 'Fetal growth restriction alters transcription factor binding and epigenetic mechanisms of renal 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in a sex-specific manner', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 299 (1), R334-42.
- Baumeister, P., Dong, D., Fu, Y., and Lee, A. S. (2009), 'Transcriptional induction of GRP78/BiP by histone deacetylase inhibitors and resistance to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis', *Mol Cancer Ther*, 8 (5), 1086-94.
- Baumeister, P., Luo, S., Skarnes, W. C., Sui, G., Seto, E., Shi, Y., and Lee, A. S. (2005), 'Endoplasmic reticulum stress induction of the Grp78/BiP promoter: activating mechanisms mediated by YY1 and its interactive chromatin modifiers', *Mol Cell Biol*, 25 (11), 4529-40.
- Begam, M., Abro, V. M., Mueller, A. L., and Roche, J. A. (2016), 'Sodium 4-phenylbutyrate reduces myofiber damage in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy', *Appl Physiol Nutr Metab*, 41 (10), 1108-11.
- Belcheva, A., Irrazabal, T., Robertson, S. J., Streutker, C., Maughan, H., Rubino, S., . . . Martin, A. (2014), 'Gut microbial metabolism drives transformation of MSH2-deficient colon epithelial cells', *Cell*, 158 (2), 288-99.
- Benediktsson, R., Lindsay, R. S., Noble, J., Seckl, J. R., and Edwards, C. R. (1993), 'Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension', *Lancet*, 341 (8841), 339-41.
- Bengtson, M. B., Ronning, T., Vatn, M. H., and Harris, J. R. (2006), 'Irritable bowel syndrome in twins: genes and environment', *Gut*, 55 (12), 1754-9.
- Benus, R. F., van der Werf, T. S., Welling, G. W., Judd, P. A., Taylor, M. A., Harmsen, H. J., and Whelan, K. (2010), 'Association between *Faecalibacterium prausnitzii* and dietary fibre in colonic fermentation in healthy human subjects', *Br J Nutr*, 104 (5), 693-700.
- Berends, L. M., Fernandez-Twinn, D. S., Martin-Gronert, M. S., Cripps, R. L., and Ozanne, S. E. (2013), 'Catch-up growth following intra-uterine growth-restriction programmes an insulin-resistant phenotype in adipose tissue', *Int J Obes (Lond)*, 37 (8), 1051-7.
- Berney, D. M., Desai, M., Palmer, D. J., Greenwald, S., Brown, A., Hales, C. N., and Berry, C. L. (1997), 'The effects of maternal protein deprivation on the fetal rat pancreas: major structural changes and their recuperation', *J Pathol*, 183 (1), 109-15.
- Bernstein, C. N., Blanchard, J. F., Kliewer, E., and Wajda, A. (2001), 'Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study', *Cancer*, 91 (4), 854-62.
- Bernstein, I. M., Horbar, J. D., Badger, G. J., Ohlsson, A., and Golan, A. (2000), 'Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network', *Am J Obstet Gynecol*, 182 (1 Pt 1), 198-206.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., and Ron, D. (2000), 'Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response', *Nat Cell Biol*, 2 (6), 326-32.
- Bertolotti, A., Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J. H., . . . Ron, D. (2001), 'Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice', *J Clin Invest*, 107 (5), 585-93.
- Bertram, C., Trowern, A. R., Copin, N., Jackson, A. A., and Whorwood, C. B. (2001), 'The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2

- 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero', *Endocrinology*, 142 (7), 2841-53.
- Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., . . . Koumenis, C. (2005), 'ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth', *Embo j*, 24 (19), 3470-81.
- Birchenough, G. M., Johansson, M. E., Gustafsson, J. K., Bergstrom, J. H., and Hansson, G. C. (2015), 'New developments in goblet cell mucus secretion and function', *Mucosal Immunol*, 8 (4), 712-9.
- Blais, J. D., Addison, C. L., Edge, R., Falls, T., Zhao, H., Wary, K., . . . Bell, J. C. (2006), 'Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress', *Mol Cell Biol*, 26 (24), 9517-32.
- Blank, M., Klussmann, E., Kruger-Krasagakes, S., Schmitt-Graff, A., Stolte, M., Bornhoeft, G., . . . et al. (1994), 'Expression of MUC2-mucin in colorectal adenomas and carcinomas of different histological types', *Int J Cancer*, 59 (3), 301-6.
- Blondel, B., Lelong, N., Kermarrec, M., and Goffinet, F. (2012), '[Trends in perinatal health in France between 1995 and 2010: Results from the National Perinatal Surveys]', *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 41 (2), 151-66.
- Board, M., Humm, S., and Newsholme, E. A. (1990), 'Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells', *Biochem J*, 265 (2), 503-9.
- Boden, G., Duan, X., Homko, C., Molina, E. J., Song, W., Perez, O., . . . Merali, S. (2008), 'Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals', *Diabetes*, 57 (9), 2438-44.
- Boffa, L. C., Vidali, G., Mann, R. S., and Allfrey, V. G. (1978), 'Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate', *J Biol Chem*, 253 (10), 3364-6.
- Boffa, L. C., Lupton, J. R., Mariani, M. R., Ceppi, M., Newmark, H. L., Scalmati, A., and Lipkin, M. (1992), 'Modulation of colonic epithelial cell proliferation, histone acetylation, and luminal short chain fatty acids by variation of dietary fiber (wheat bran) in rats', *Cancer Res*, 52 (21), 5906-12.
- Bogaert, S., De Vos, M., Olievier, K., Peeters, H., Elewaut, D., Lambrecht, B., . . . Laukens, D. (2011), 'Involvement of endoplasmic reticulum stress in inflammatory bowel disease: a different implication for colonic and ileal disease?', *PLoS One*, 6 (10), e25589.
- Bogdarina, I., Welham, S., King, P. J., Burns, S. P., and Clark, A. J. (2007), 'Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension', *Circ Res*, 100 (4), 520-6.
- Bohmig, G. A., Krieger, P. M., Saemann, M. D., Wenhardt, C., Pohanka, E., and Zlabinger, G. J. (1997), 'n-butyrate downregulates the stimulatory function of peripheral blood-derived antigen-presenting cells: a potential mechanism for modulating T-cell responses by short-chain fatty acids', *Immunology*, 92 (2), 234-43.
- Bondulich, M. K., Guo, T., Meehan, C., Manion, J., Rodriguez Martin, T., Mitchell, J. C., . . . Hanger, D. P. (2016), 'Tauopathy induced by low level expression of a human brain-derived tau fragment in mice is rescued by phenylbutyrate', *Brain*, 139 (Pt 8), 2290-306.
- Bourdon, A., Parnet, P., Nowak, C., Tran, N. T., Winer, N., and Darmaun, D. (2016), 'L-Citrulline Supplementation Enhances Fetal Growth and Protein Synthesis in Rats with Intrauterine Growth Restriction', *J Nutr*, 146 (3), 532-41.
- Brandl, K., Rutschmann, S., Li, X., Du, X., Xiao, N., Schnabl, B., . . . Beutler, B. (2009), 'Enhanced sensitivity to DSS colitis caused by a hypomorphic Mbtps1 mutation disrupting the ATF6-driven unfolded protein response', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (9), 3300-5.
- Bruewer, M., Hopkins, A. M., Hobert, M. E., Nusrat, A., and Madara, J. L. (2004), 'RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin', *Am J Physiol Cell Physiol*, 287 (2), C327-35.

- Bruewer, M., Utech, M., Ivanov, A. I., Hopkins, A. M., Parkos, C. A., and Nusrat, A. (2005), 'Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process', *Faseb j*, 19 (8), 923-33.
- Bruewer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, C. A., Madara, J. L., Hopkins, A. M., and Nusrat, A. (2003), 'Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms', *J Immunol*, 171 (11), 6164-72.
- Buisine, M. P., Desreumaux, P., Leteurtre, E., Copin, M. C., Colombel, J. F., Porchet, N., and Aubert, J. P. (2001), 'Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease', *Gut*, 49 (4), 544-51.
- Bultman, S. J. (2014), 'Molecular pathways: gene-environment interactions regulating dietary fiber induction of proliferation and apoptosis via butyrate for cancer prevention', *Clin Cancer Res*, 20 (4), 799-803.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., . . . Ron, D. (2002), 'IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA', *Nature*, 415 (6867), 92-6.
- Cantero-Recasens, G., Fandos, C., Rubio-Moscardo, F., Valverde, M. A., and Vicente, R. (2010), 'The asthma-associated ORMDL3 gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress', *Hum Mol Genet*, 19 (1), 111-21.
- Cao, A. L., Wang, L., Chen, X., Wang, Y. M., Guo, H. J., Chu, S., . . . Peng, W. (2016), 'Ursodeoxycholic acid and 4-phenylbutyrate prevent endoplasmic reticulum stress-induced podocyte apoptosis in diabetic nephropathy', *Lab Invest*, 96 (6), 610-22.
- Cao, S. S. (2016), 'Epithelial ER Stress in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis', *Inflamm Bowel Dis*, 22 (4), 984-93.
- Cao, S. S., Zimmermann, E. M., Chuang, B. M., Song, B., Nwokoye, A., Wilkinson, J. E., . . . Kaufman, R. J. (2013), 'The unfolded protein response and chemical chaperones reduce protein misfolding and colitis in mice', *Gastroenterology*, 144 (5), 989-1000.e6.
- Carducci, M. A., Nelson, J. B., Chan-Tack, K. M., Ayyagari, S. R., Sweatt, W. H., Campbell, P. A., . . . Simons, J. W. (1996), 'Phenylbutyrate induces apoptosis in human prostate cancer and is more potent than phenylacetate', *Clin Cancer Res*, 2 (2), 379-87.
- Carlsson, S., Persson, P. G., Alvarsson, M., Efendic, S., Norman, A., Svanstrom, L., . . . Grill, V. (1999), 'Low birth weight, family history of diabetes, and glucose intolerance in Swedish middle-aged men', *Diabetes Care*, 22 (7), 1043-7.
- Chapman, M. A., Grahn, M. F., Boyle, M. A., Hutton, M., Rogers, J., and Williams, N. S. (1994), 'Butyrate oxidation is impaired in the colonic mucosa of sufferers of quiescent ulcerative colitis', *Gut*, 35 (1), 73-6.
- Chen, Y., Shu, W., Chen, W., Wu, Q., Liu, H., and Cui, G. (2007), 'Curcumin, both histone deacetylase and p300/CBP-specific inhibitor, represses the activity of nuclear factor kappa B and Notch 1 in Raji cells', *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 101 (6), 427-33.
- Choi, K. C., Jung, M. G., Lee, Y. H., Yoon, J. C., Kwon, S. H., Kang, H. B., . . . Yoon, H. G. (2009), 'Epigallocatechin-3-gallate, a histone acetyltransferase inhibitor, inhibits EBV-induced B lymphocyte transformation via suppression of RelA acetylation', *Cancer Res*, 69 (2), 583-92.
- Choo-Kang, L. R. and Zeitlin, P. L. (2001), 'Induction of HSP70 promotes DeltaF508 CFTR trafficking', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281 (1), L58-68.
- Chow, J., Lee, S. M., Shen, Y., Khosravi, A., and Mazmanian, S. K. (2010), 'Host-bacterial symbiosis in health and disease', *Adv Immunol*, 107, 243-74.
- Chowdhury, S. R., King, D. E., Willing, B. P., Band, M. R., Beever, J. E., Lane, A. B., . . . Gaskins, H. R. (2007), 'Transcriptome profiling of the small intestinal epithelium in germfree versus conventional piglets', *BMC Genomics*, 8, 215.
- Chung, Y. L., Lee, M. Y., Wang, A. J., and Yao, L. F. (2003), 'A therapeutic strategy uses histone deacetylase inhibitors to modulate the expression of genes involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis', *Mol Ther*, 8 (5), 707-17.

- Cnattingius, S. (2004), 'The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes', *Nicotine Tob Res*, 6 Suppl 2, S125-40.
- Cnattingius, S., Lundberg, F., and Iliadou, A. (2009), 'Birth characteristics and risk of colorectal cancer: a study among Swedish twins', *Br J Cancer*, 100 (5), 803-6.
- CNGOF, College national des gynécologues et obstétriciens français (2013), 'Le retard de croissance intra-utérin', *Recommandation pour la pratique clinique*, 2013.
- Coady, M. J., Chang, M. H., Charron, F. M., Plata, C., Wallendorff, B., Sah, J. F., . . . Lapointe, J. Y. (2004), 'The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na⁺-monocarboxylate cotransporter', *J Physiol*, 557 (Pt 3), 719-31.
- Cohen, M. P., Stern, E., Rusecki, Y., and Zeidler, A. (1988), 'High prevalence of diabetes in young adult Ethiopian immigrants to Israel', *Diabetes*, 37 (6), 824-8.
- Cojocari, D., Vellanki, R. N., Sit, B., Uehling, D., Koritzinsky, M., and Wouters, B. G. (2013), 'New small molecule inhibitors of UPR activation demonstrate that PERK, but not IRE1alpha signaling is essential for promoting adaptation and survival to hypoxia', *Radiother Oncol*, 108 (3), 541-7.
- Cooney, C. A., Dave, A. A., and Wolff, G. L. (2002), 'Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring', *J Nutr*, 132 (8 Suppl), 2393s-400s.
- Costantini, C., Ko, M. H., Jonas, M. C., and Puglielli, L. (2007), 'A reversible form of lysine acetylation in the ER and Golgi lumen controls the molecular stabilization of BACE1', *Biochem J*, 407 (3), 383-95.
- Crespo, I., San-Miguel, B., Prause, C., Marroni, N., Cuevas, M. J., Gonzalez-Gallego, J., and Tunon, M. J. (2012), 'Glutamine treatment attenuates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in TNBS-induced colitis', *PLoS One*, 7 (11), e50407.
- Cuadrado-Tejedor, M., Ricobaraza, A. L., Torrijo, R., Franco, R., and Garcia-Osta, A. (2013), 'Phenylbutyrate is a multifaceted drug that exerts neuroprotective effects and reverses the Alzheimer's disease-like phenotype of a commonly used mouse model', *Curr Pharm Des*, 19 (28), 5076-84.
- Cuff, M., Dyer, J., Jones, M., and Shirazi-Beechey, S. (2005), 'The human colonic monocarboxylate transporter Isoform 1: its potential importance to colonic tissue homeostasis', *Gastroenterology*, 128 (3), 676-86.
- Cuff, M. A., Lambert, D. W., and Shirazi-Beechey, S. P. (2002), 'Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1', *J Physiol*, 539 (Pt 2), 361-71.
- Cullinan, S. B. and Diehl, J. A. (2004), 'PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress', *J Biol Chem*, 279 (19), 20108-17.
- Cunliffe, R. N., Rose, F. R., Keyte, J., Abberley, L., Chan, W. C., and Mahida, Y. R. (2001), 'Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease', *Gut*, 48 (2), 176-85.
- Curhan, G. C., Willett, W. C., Rimm, E. B., Spiegelman, D., Ascherio, A. L., and Stampfer, M. J. (1996a), 'Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men', *Circulation*, 94 (12), 3246-50.
- Curhan, G. C., Chertow, G. M., Willett, W. C., Spiegelman, D., Colditz, G. A., Manson, J. E., . . . Stampfer, M. J. (1996b), 'Birth weight and adult hypertension and obesity in women', *Circulation*, 94 (6), 1310-5.
- Dang, W., Steffen, K. K., Perry, R., Dorsey, J. A., Johnson, F. B., Shilatifard, A., . . . Berger, S. L. (2009), 'Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan', *Nature*, 459 (7248), 802-7.
- Darmaun, D., Welch, S., Rini, A., Sager, B. K., Altomare, A., and Haymond, M. W. (1998), 'Phenylbutyrate-induced glutamine depletion in humans: effect on leucine metabolism', *Am J Physiol*, 274 (5 Pt 1), E801-7.
- Davie, J. R. (2003), 'Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate', *J Nutr*, 133 (7 Suppl), 2485s-93s.

- Day, J. K., Bauer, A. M., DesBordes, C., Zhuang, Y., Kim, B. E., Newton, L. G., . . . Lubahn, D. B. (2002), 'Genistein alters methylation patterns in mice', *J Nutr*, 132 (8 Suppl), 2419s-23s.
- De Preter, V., Arijs, I., Windey, K., Vanhove, W., Vermeire, S., Schuit, F., . . . Verbeke, K. (2012), 'Impaired butyrate oxidation in ulcerative colitis is due to decreased butyrate uptake and a defect in the oxidation pathway', *Inflamm Bowel Dis*, 18 (6), 1127-36.
- de Rooij, S. R. and Roseboom, T. J. (2013), 'The developmental origins of ageing: study protocol for the Dutch famine birth cohort study on ageing', *BMJ Open*, 3 (6).
- de Rooij, S. R., Painter, R. C., Phillips, D. I., Osmond, C., Michels, R. P., Godsland, I. F., . . . Roseboom, T. J. (2006), 'Impaired insulin secretion after prenatal exposure to the Dutch famine', *Diabetes Care*, 29 (8), 1897-901.
- Delpre, G., Avidor, I., Steinherz, R., Kadish, U., and Ben-Bassat, M. (1989), 'Ultrastructural abnormalities in endoscopically and histologically normal and involved colon in ulcerative colitis', *Am J Gastroenterol*, 84 (9), 1038-46.
- Den Hond, E., Hiele, M., Evenepoel, P., Peeters, M., Ghoois, Y., and Rutgeerts, P. (1998), 'In vivo butyrate metabolism and colonic permeability in extensive ulcerative colitis', *Gastroenterology*, 115 (3), 584-90.
- Deng, J., Lu, P. D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Sonenberg, N., . . . Ron, D. (2004), 'Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2', *Mol Cell Biol*, 24 (23), 10161-8.
- Derrien, M., Collado, M. C., Ben-Amor, K., Salminen, S., and de Vos, W. M. (2008), 'The Mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal tract', *Appl Environ Microbiol*, 74 (5), 1646-8.
- Diaz, V., Lebras-Isabet, M. N., and Denjean, A. (2005), 'Effect of Nomega-nitro-L-arginine methyl ester-induced intrauterine growth restriction on postnatal lung growth in rats', *Pediatr Res*, 58 (3), 557-61.
- Dilworth, M. R., Kusinski, L. C., Baker, B. C., Renshall, L. J., Baker, P. N., Greenwood, S. L., . . . Sibley, C. P. (2012), 'Crossing mice deficient in eNOS with placental-specific Igf2 knockout mice: a new model of fetal growth restriction', *Placenta*, 33 (12), 1052-4.
- Dong, D., Ni, M., Li, J., Xiong, S., Ye, W., Virrey, J. J., . . . Lee, A. S. (2008), 'Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development', *Cancer Res*, 68 (2), 498-505.
- Dong, D., Stapleton, C., Luo, B., Xiong, S., Ye, W., Zhang, Y., . . . Lee, A. S. (2011), 'A critical role for GRP78/BiP in the tumor microenvironment for neovascularization during tumor growth and metastasis', *Cancer Res*, 71 (8), 2848-57.
- Dong, S. M., Lee, E. J., Jeon, E. S., Park, C. K., and Kim, K. M. (2005), 'Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum', *Mod Pathol*, 18 (2), 170-8.
- Donohoe, D. R. and Bultman, S. J. (2012a), 'Metaboloeigenetics: interrelationships between energy metabolism and epigenetic control of gene expression', *J Cell Physiol*, 227 (9), 3169-77.
- Donohoe, D. R., Collins, L. B., Wali, A., Bigler, R., Sun, W., and Bultman, S. J. (2012b), 'The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation', *Mol Cell*, 48 (4), 612-26.
- Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T. M., Bunker, M. K., and Bultman, S. J. (2011), 'The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon', *Cell Metab*, 13 (5), 517-26.
- Donohoe, D. R., Holley, D., Collins, L. B., Montgomery, S. A., Whitmore, A. C., Hillhouse, A., . . . Bultman, S. J. (2014), 'A gnotobiotic mouse model demonstrates that dietary fiber protects against colorectal tumorigenesis in a microbiota- and butyrate-dependent manner', *Cancer Discov*, 4 (12), 1387-97.
- Dorofeyev, A. E., Vasilenko, I. V., Rassokhina, O. A., and Kondratiuk, R. B. (2013), 'Mucosal barrier in ulcerative colitis and Crohn's disease', *Gastroenterol Res Pract*, 2013, 431231.
- Drogat, B., Auguste, P., Nguyen, D. T., Bouche-careilh, M., Pineau, R., Nalbantoglu, J., . . . Moenner, M. (2007), 'IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A

- expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo', *Cancer Res*, 67 (14), 6700-7.
- Druesne-Pecollo, N., Chaumontet, C., Pagniez, A., Vaugelade, P., Bruneau, A., Thomas, M., . . . Martel, P. (2007), 'In vivo treatment by diallyl disulfide increases histone acetylation in rat colonocytes', *Biochem Biophys Res Commun*, 354 (1), 140-7.
- Druesne, N., Pagniez, A., Mayeur, C., Thomas, M., Cherbuy, C., Duee, P. H., . . . Chaumontet, C. (2004a), 'Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21(waf1/cip1) expression in human colon tumor cell lines', *Carcinogenesis*, 25 (7), 1227-36.
- (2004b), 'Repetitive treatments of colon HT-29 cells with diallyl disulfide induce a prolonged hyperacetylation of histone H3 K14', *Ann N Y Acad Sci*, 1030, 612-21.
- Dufey, E., Urra, H., and Hetz, C. (2015), 'ER proteostasis addiction in cancer biology: Novel concepts', *Semin Cancer Biol*, 33, 40-7.
- Duffy, M. M., Regan, M. C., Ravichandran, P., O'Keane, C., Harrington, M. G., Fitzpatrick, J. M., and O'Connell, P. R. (1998), 'Mucosal metabolism in ulcerative colitis and Crohn's disease', *Dis Colon Rectum*, 41 (11), 1399-405.
- Duncan, S. H., Hold, G. L., Harmsen, H. J., Stewart, C. S., and Flint, H. J. (2002), 'Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov.', *Int J Syst Evol Microbiol*, 52 (Pt 6), 2141-6.
- Eaden, J. A., Abrams, K. R., and Mayberry, J. F. (2001), 'The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis', *Gut*, 48 (4), 526-35.
- Easterling, T. R., Benedetti, T. J., Carlson, K. C., Brateng, D. A., Wilson, J., and Schmucker, B. S. (1991), 'The effect of maternal hemodynamics on fetal growth in hypertensive pregnancies', *Am J Obstet Gynecol*, 165 (4 Pt 1), 902-6.
- Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003), 'Quality control in the endoplasmic reticulum', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4 (3), 181-91.
- Ergaz, Z., Avgil, M., and Ornoy, A. (2005), 'Intrauterine growth restriction-etiology and consequences: what do we know about the human situation and experimental animal models?', *Reprod Toxicol*, 20 (3), 301-22.
- Eri, R. D., Adams, R. J., Tran, T. V., Tong, H., Das, I., Roche, D. K., . . . McGuckin, M. A. (2011), 'An intestinal epithelial defect conferring ER stress results in inflammation involving both innate and adaptive immunity', *Mucosal Immunol*, 4 (3), 354-64.
- Eriksson, J. G., Forsen, T., Tuomilehto, J., Winter, P. D., Osmond, C., and Barker, D. J. (1999), 'Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study', *Bmj*, 318 (7181), 427-31.
- Fahlgren, A., Hammarstrom, S., Danielsson, A., and Hammarstrom, M. L. (2003), 'Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis', *Clin Exp Immunol*, 131 (1), 90-101.
- Fan, H., Zhang, R., Tesfaye, D., Tholen, E., Looft, C., Holker, M., . . . Cinar, M. U. (2012), 'Sulforaphane causes a major epigenetic repression of myostatin in porcine satellite cells', *Epigenetics*, 7 (12), 1379-90.
- Fanca-Berthon, P., Hoebler, C., Mouzet, E., David, A., and Michel, C. (2010), 'Intrauterine growth restriction not only modifies the cecocolonic microbiota in neonatal rats but also affects its activity in young adult rats', *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 51 (4), 402-13.
- Fanca-Berthon, P., Michel, C., Pagniez, A., Rival, M., Van Seuning, I., Darmaun, D., and Hoebler, C. (2009), 'Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats', *Pediatr Res*, 66 (1), 47-52.
- Fang, M. Z., Chen, D., Sun, Y., Jin, Z., Christman, J. K., and Yang, C. S. (2005), 'Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy', *Clin Cancer Res*, 11 (19 Pt 1), 7033-41.
- Fang, M. Z., Wang, Y., Ai, N., Hou, Z., Sun, Y., Lu, H., . . . Yang, C. S. (2003), 'Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines', *Cancer Res*, 63 (22), 7563-70.

- Farquhar, M. G. and Palade, G. E. (1963), 'Junctional complexes in various epithelia', *J Cell Biol*, 17, 375-412.
- Finnie, I. A., Taylor, B. A., and Rhodes, J. M. (1993), 'Ileal and colonic epithelial metabolism in quiescent ulcerative colitis: increased glutamine metabolism in distal colon but no defect in butyrate metabolism', *Gut*, 34 (11), 1552-8.
- Finnie, I. A., Dwarakanath, A. D., Taylor, B. A., and Rhodes, J. M. (1995), 'Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate', *Gut*, 36 (1), 93-9.
- Fraga, M. F. and Esteller, M. (2005a), 'Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications', *Cell Cycle*, 4 (10), 1377-81.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., . . . Esteller, M. (2005b), 'Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer', *Nat Genet*, 37 (4), 391-400.
- Franco Mdo, C., Dantas, A. P., Akamine, E. H., Kawamoto, E. M., Fortes, Z. B., Scavone, C., . . . Nigro, D. (2002), 'Enhanced oxidative stress as a potential mechanism underlying the programming of hypertension in utero', *J Cardiovasc Pharmacol*, 40 (4), 501-9.
- Frank, D. N., St Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., and Pace, N. R. (2007), 'Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (34), 13780-5.
- Froen, J. F., Gardosi, J. O., Thurmann, A., Francis, A., and Stray-Pedersen, B. (2004), 'Restricted fetal growth in sudden intrauterine unexplained death', *Acta Obstet Gynecol Scand*, 83 (9), 801-7.
- Fu, L. J., Ding, Y. B., Wu, L. X., Wen, C. J., Qu, Q., Zhang, X., and Zhou, H. H. (2014), 'The Effects of Lycopene on the Methylation of the GSTP1 Promoter and Global Methylation in Prostatic Cancer Cell Lines PC3 and LNCaP', *Int J Endocrinol*, 2014, 620165.
- Fu, Q., Yu, X., Callaway, C. W., Lane, R. H., and McKnight, R. A. (2009), 'Epigenetics: intrauterine growth retardation (IUGR) modifies the histone code along the rat hepatic IGF-1 gene', *Faseb j*, 23 (8), 2438-49.
- Fu, Q., McKnight, R. A., Yu, X., Wang, L., Callaway, C. W., and Lane, R. H. (2004), 'Uteroplacental insufficiency induces site-specific changes in histone H3 covalent modifications and affects DNA-histone H3 positioning in day 0 IUGR rat liver', *Physiol Genomics*, 20 (1), 108-16.
- Fu, Y. and Lee, A. S. (2006), 'Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy', *Cancer Biol Ther*, 5 (7), 741-4.
- Fujibe, M., Chiba, H., Kojima, T., Soma, T., Wada, T., Yamashita, T., and Sawada, N. (2004), 'Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions', *Exp Cell Res*, 295 (1), 36-47.
- Fujimoto, T., Yoshimatsu, K., Watanabe, K., Yokomizo, H., Otani, T., Matsumoto, A., . . . Ogawa, K. (2007), 'Overexpression of human X-box binding protein 1 (XBP-1) in colorectal adenomas and adenocarcinomas', *Anticancer Res*, 27 (1a), 127-31.
- Galasinski, S. C., Resing, K. A., Goodrich, J. A., and Ahn, N. G. (2002), 'Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions', *J Biol Chem*, 277 (22), 19618-26.
- Gallinari, P., Di Marco, S., Jones, P., Pallaoro, M., and Steinkuhler, C. (2007), 'HDAC, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics', *Cell Res*, 17 (3), 195-211.
- Gambling, L., Andersen, H. S., Czopek, A., Wojciak, R., Krejpcio, Z., and McArdle, H. J. (2004), 'Effect of timing of iron supplementation on maternal and neonatal growth and iron status of iron-deficient pregnant rats', *J Physiol*, 561 (Pt 1), 195-203.
- Gamet, L., Daviaud, D., Denis-Pouxviel, C., Remesy, C., and Murat, J. C. (1992), 'Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29', *Int J Cancer*, 52 (2), 286-9.
- Garite, T. J., Clark, R., and Thorp, J. A. (2004), 'Intrauterine growth restriction increases morbidity and mortality among premature neonates', *Am J Obstet Gynecol*, 191 (2), 481-7.

- Garofano, A., Czernichow, P., and Breant, B. (1998), 'Postnatal somatic growth and insulin contents in moderate or severe intrauterine growth retardation in the rat', *Biol Neonate*, 73 (2), 89-98.
- Gaudier, E., Jarry, A., Blottiere, H. M., de Coppet, P., Buisine, M. P., Aubert, J. P., . . . Hoebler, C. (2004), 'Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287 (6), G1168-74.
- Gerbe, F., Legraverend, C., and Jay, P. (2012), 'The intestinal epithelium tuft cells: specification and function', *Cell Mol Life Sci*, 69 (17), 2907-17.
- Gerbe, F., van Es, J. H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., . . . Jay, P. (2011), 'Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium', *J Cell Biol*, 192 (5), 767-80.
- Gething, M. J., Blond-Elguindi, S., Buchner, J., Fourie, A., Knarr, G., Modrow, S., . . . Sambrook, J. (1995), 'Binding sites for Hsp70 molecular chaperones in natural proteins', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 60, 417-28.
- Gibson, P. R., Moeller, I., Kagelari, O., Folino, M., and Young, G. P. (1992), 'Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells in vitro', *J Gastroenterol Hepatol*, 7 (2), 165-72.
- Gilchrist, J. S. and Pierce, G. N. (1993), 'Identification and purification of a calcium-binding protein in hepatic nuclear membranes', *J Biol Chem*, 268 (6), 4291-9.
- Glauben, R., Batra, A., Stroh, T., Erben, U., Fedke, I., Lehr, H. A., . . . Siegmund, B. (2008), 'Histone deacetylases: novel targets for prevention of colitis-associated cancer in mice', *Gut*, 57 (5), 613-22.
- Gluckman, P. D., Hanson, M. A., and Beedle, A. S. (2007), 'Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective', *Am J Hum Biol*, 19 (1), 1-19.
- Gluckman, P. D., Hanson, M. A., Buklijas, T., Low, F. M., and Beedle, A. S. (2009), 'Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases', *Nat Rev Endocrinol*, 5 (7), 401-8.
- Godl, K., Johansson, M. E., Lidell, M. E., Morgelin, M., Karlsson, H., Olson, F. J., . . . Hansson, G. C. (2002), 'The N terminus of the MUC2 mucin forms trimers that are held together within a trypsin-resistant core fragment', *J Biol Chem*, 277 (49), 47248-56.
- Goel, P., Radotra, A., Singh, I., Aggarwal, A., and Dua, D. (2004), 'Effects of passive smoking on outcome in pregnancy', *J Postgrad Med*, 50 (1), 12-6.
- Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., . . . Heinzl, T. (2001), 'Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells', *Embo j*, 20 (24), 6969-78.
- Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z. W., Egan, L. J., . . . Karin, M. (2004), 'IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer', *Cell*, 118 (3), 285-96.
- Guo, Y., Shu, L., Zhang, C., Su, Z. Y., and Kong, A. N. (2015), 'Curcumin inhibits anchorage-independent growth of HT29 human colon cancer cells by targeting epigenetic restoration of the tumor suppressor gene DLEC1', *Biochem Pharmacol*, 94 (2), 69-78.
- Gurvich, N., Tsygankova, O. M., Meinkoth, J. L., and Klein, P. S. (2004), 'Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation', *Cancer Res*, 64 (3), 1079-86.
- Hadjiagapiou, C., Schmidt, L., Dudeja, P. K., Layden, T. J., and Ramaswamy, K. (2000), 'Mechanism(s) of butyrate transport in Caco-2 cells: role of monocarboxylate transporter 1', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279 (4), G775-80.
- Haegebarth, A. and Clevers, H. (2009), 'Wnt signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin', *Am J Pathol*, 174 (3), 715-21.
- Hajji, N., Wallenborg, K., Vlachos, P., Fullgrabe, J., Hermanson, O., and Joseph, B. (2010), 'Opposing effects of hMOF and SIRT1 on H4K16 acetylation and the sensitivity to the topoisomerase II inhibitor etoposide', *Oncogene*, 29 (15), 2192-204.
- Hales, C. N. and Barker, D. J. (1992), 'Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis', *Diabetologia*, 35 (7), 595-601.

- (2001), 'The thrifty phenotype hypothesis', *Br Med Bull*, 60, 5-20.
- Hales, C. N., Barker, D. J., Clark, P. M., Cox, L. J., Fall, C., Osmond, C., and Winter, P. D. (1991), 'Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64', *Bmj*, 303 (6809), 1019-22.
- Halkidou, K., Cook, S., Leung, H. Y., Neal, D. E., and Robson, C. N. (2004), 'Nuclear accumulation of histone deacetylase 4 (HDAC4) coincides with the loss of androgen sensitivity in hormone refractory cancer of the prostate', *Eur Urol*, 45 (3), 382-9; author reply 89.
- Han, Y. J., Kwon, Y. G., Chung, H. T., Lee, S. K., Simmons, R. L., Billiar, T. R., and Kim, Y. M. (2001), 'Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF-kappa B activation: role of H₂O₂ and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages', *Nitric Oxide*, 5 (5), 504-13.
- Hansen, L., Skeie, G., Landberg, R., Lund, E., Palmqvist, R., Johansson, I., . . . Olsen, A. (2012), 'Intake of dietary fiber, especially from cereal foods, is associated with lower incidence of colon cancer in the HELGA cohort', *Int J Cancer*, 131 (2), 469-78.
- Harding, H. P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999), 'Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase', *Nature*, 397 (6716), 271-4.
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000), 'Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells', *Mol Cell*, 6 (5), 1099-108.
- Harig, J. M., Soergel, K. H., Komorowski, R. A., and Wood, C. M. (1989), 'Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation', *N Engl J Med*, 320 (1), 23-8.
- Heazlewood, C. K., Cook, M. C., Eri, R., Price, G. R., Tauro, S. B., Taupin, D., . . . McGuckin, M. A. (2008), 'Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis', *PLoS Med*, 5 (3), e54.
- Hecht, G., Robinson, B., and Koutsouris, A. (1994), 'Reversible disassembly of an intestinal epithelial monolayer by prolonged exposure to phorbol ester', *Am J Physiol*, 266 (2 Pt 1), G214-21.
- Heerdt, B. G., Houston, M. A., and Augenlicht, L. H. (1994), 'Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines', *Cancer Res*, 54 (12), 3288-93.
- Hefler, L. A., Reyes, C. A., O'Brien, W. E., and Gregg, A. R. (2001), 'Perinatal development of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice', *Biol Reprod*, 64 (2), 666-73.
- Heidor, R., Ortega, J. F., de Conti, A., Ong, T. P., and Moreno, F. S. (2012), 'Anticarcinogenic actions of tributyrin, a butyric acid prodrug', *Curr Drug Targets*, 13 (14), 1720-9.
- Heidor, R., Furtado, K. S., Ortega, J. F., de Oliveira, T. F., Tavares, P. E., Vieira, A., . . . Moreno, F. S. (2014), 'The chemopreventive activity of the histone deacetylase inhibitor tributyrin in colon carcinogenesis involves the induction of apoptosis and reduction of DNA damage', *Toxicol Appl Pharmacol*, 276 (2), 129-35.
- Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., Susser, E. S., . . . Lumey, L. H. (2008), 'Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (44), 17046-9.
- Hering, N. A., Andres, S., Fromm, A., van Tol, E. A., Amasheh, M., Mankertz, J., . . . Schulzke, J. D. (2011), 'Transforming growth factor-beta, a whey protein component, strengthens the intestinal barrier by upregulating claudin-4 in HT-29/B6 cells', *J Nutr*, 141 (5), 783-9.
- Herrmann, A., Davies, J. R., Lindell, G., Martensson, S., Packer, N. H., Swallow, D. M., and Carlstedt, I. (1999), 'Studies on the "insoluble" glycoprotein complex from human colon. Identification of reduction-insensitive MUC2 oligomers and C-terminal cleavage', *J Biol Chem*, 274 (22), 15828-36.
- Higa, A., Taouji, S., Lhomond, S., Jensen, D., Fernandez-Zapico, M. E., Simpson, J. C., . . . Chevet, E. (2014), 'Endoplasmic reticulum stress-activated transcription factor ATF6alpha requires the disulfide isomerase PDIA5 to modulate chemoresistance', *Mol Cell Biol*, 34 (10), 1839-49.
- Hinnebusch, B. F., Meng, S., Wu, J. T., Archer, S. Y., and Hodin, R. A. (2002), 'The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation', *J Nutr*, 132 (5), 1012-7.

- Hino, K., Saito, A., Asada, R., Kanemoto, S., and Imaizumi, K. (2014), 'Increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis in the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS deficient mice', *PLoS One*, 9 (2), e88048.
- Hinoda, Y., Akashi, H., Suwa, T., Itoh, F., Adachi, M., Endo, T., . . . Imai, K. (1998), 'Immunohistochemical detection of MUC2 mucin core protein in ulcerative colitis', *J Clin Lab Anal*, 12 (3), 150-3.
- Hitomi, J., Katayama, T., Taniguchi, M., Honda, A., Imaizumi, K., and Tohyama, M. (2004), 'Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12', *Neurosci Lett*, 357 (2), 127-30.
- Hogan, S. P., Seidu, L., Blanchard, C., Groschwitz, K., Mishra, A., Karow, M. L., . . . Rothenberg, M. E. (2006), 'Resistin-like molecule beta regulates innate colonic function: barrier integrity and inflammation susceptibility', *J Allergy Clin Immunol*, 118 (1), 257-68.
- Hong, T., Nakagawa, T., Pan, W., Kim, M. Y., Kraus, W. L., Ikehara, T., . . . Ito, T. (2004), 'Isoflavones stimulate estrogen receptor-mediated core histone acetylation', *Biochem Biophys Res Commun*, 317 (1), 259-64.
- Hou, J. K., Abraham, B., and El-Serag, H. (2011), 'Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature', *Am J Gastroenterol*, 106 (4), 563-73.
- Howe, K., Gauldie, J., and McKay, D. M. (2002), 'TGF-beta effects on epithelial ion transport and barrier: reduced Cl⁻ secretion blocked by a p38 MAPK inhibitor', *Am J Physiol Cell Physiol*, 283 (6), C1667-74.
- Howe, K. L., Reardon, C., Wang, A., Nazli, A., and McKay, D. M. (2005), 'Transforming growth factor-beta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced increased permeability', *Am J Pathol*, 167 (6), 1587-97.
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., . . . Sinclair, D. A. (2003), 'Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan', *Nature*, 425 (6954), 191-6.
- Hsieh, S. Y., Shih, T. C., Yeh, C. Y., Lin, C. J., Chou, Y. Y., and Lee, Y. S. (2006), 'Comparative proteomic studies on the pathogenesis of human ulcerative colitis', *Proteomics*, 6 (19), 5322-31.
- Hu, P., Han, Z., Couvillon, A. D., Kaufman, R. J., and Exton, J. H. (2006), 'Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression', *Mol Cell Biol*, 26 (8), 3071-84.
- Hubbard, A. C., Bandyopadhyay, S., Wojczyk, B. S., Spitalnik, S. L., Hod, E. A., and Prestia, K. A. (2013), 'Effect of dietary iron on fetal growth in pregnant mice', *Comp Med*, 63 (2), 127-35.
- Hughes, L. A., van den Brandt, P. A., Goldbohm, R. A., de Goeij, A. F., de Bruine, A. P., van Engeland, M., and Weijnen, M. P. (2010), 'Childhood and adolescent energy restriction and subsequent colorectal cancer risk: results from the Netherlands Cohort Study', *Int J Epidemiol*, 39 (5), 1333-44.
- Inoue, S., Mochizuki, K., and Goda, T. (2011), 'Jejunal induction of SI and SGLT1 genes in rats by high-starch/low-fat diet is associated with histone acetylation and binding of GCN5 on the genes', *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 57 (2), 162-9.
- Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D., and Perucho, M. (1993), 'Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis', *Nature*, 363 (6429), 558-61.
- Ivanov, A. I., Parkos, C. A., and Nusrat, A. (2010), 'Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation', *Am J Pathol*, 177 (2), 512-24.
- Jain, S., Suzuki, T., Seth, A., Samak, G., and Rao, R. (2011), 'Protein kinase C zeta phosphorylates occludin and promotes assembly of epithelial tight junctions', *Biochem J*, 437 (2), 289-99.
- Janne, P., Carpentier, Y., and Willems, G. (1977), 'Colonic mucosal atrophy induced by a liquid elemental diet in rats', *Am J Dig Dis*, 22 (9), 808-12.

- Janot, M., Cortes-Dubly, M. L., Rodriguez, S., and Huynh-Do, U. (2014), 'Bilateral uterine vessel ligation as a model of intrauterine growth restriction in mice', *Reprod Biol Endocrinol*, 12, 62.
- Jaquet, D., Vidal, H., Hankard, R., Czernichow, P., and Levy-Marchal, C. (2001), 'Impaired regulation of glucose transporter 4 gene expression in insulin resistance associated with in utero undernutrition', *J Clin Endocrinol Metab*, 86 (7), 3266-71.
- Jenuwein, T. and Allis, C. D. (2001), 'Translating the histone code', *Science*, 293 (5532), 1074-80.
- Jian, L., Lu, Y., Lu, S., and Lu, C. (2016), 'Chemical chaperone 4-phenylbutyric acid protects H9c2 cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis', *Mol Med Rep*, 13 (5), 4386-92.
- Jiang, H. Y., Wek, S. A., McGrath, B. C., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Cavener, D. R., and Wek, R. C. (2003), 'Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses', *Mol Cell Biol*, 23 (16), 5651-63.
- Jin, C., Jin, Z., Chen, N. Z., Lu, M., Liu, C. B., Hu, W. L., and Zheng, C. G. (2016), 'Activation of IRE1alpha-XBP1 pathway induces cell proliferation and invasion in colorectal carcinoma', *Biochem Biophys Res Commun*, 470 (1), 75-81.
- Johansson, M. E., Thomsson, K. A., and Hansson, G. C. (2009), 'Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein', *J Proteome Res*, 8 (7), 3549-57.
- Johansson, M. E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G. C. (2008), 'The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (39), 15064-9.
- Kahali, S., Sarcar, B., and Chinnaiyan, P. (2011), 'The emerging role of histone deacetylases (HDAC) in UPR regulation', *Methods Enzymol*, 490, 159-74.
- Kahali, S., Sarcar, B., Prabhu, A., Seto, E., and Chinnaiyan, P. (2012), 'Class I histone deacetylases localize to the endoplasmic reticulum and modulate the unfolded protein response', *Faseb j*, 26 (6), 2437-45.
- Kahali, S., Sarcar, B., Fang, B., Williams, E. S., Koomen, J. M., Tofilon, P. J., and Chinnaiyan, P. (2010), 'Activation of the unfolded protein response contributes toward the antitumor activity of vorinostat', *Neoplasia*, 12 (1), 80-6.
- Kaiko, G. E., Ryu, S. H., Koues, O. I., Collins, P. L., Solnica-Krezel, L., Pearce, E. J., . . . Stappenbeck, T. S. (2016), 'The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites', *Cell*, 165 (7), 1708-20.
- Kanai, H., Sawa, A., Chen, R. W., Leeds, P., and Chuang, D. M. (2004), 'Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neurons', *Pharmacogenomics J*, 4 (5), 336-44.
- Kapoor-Vazirani, P., Kagey, J. D., Powell, D. R., and Vertino, P. M. (2008), 'Role of hMOF-dependent histone H4 lysine 16 acetylation in the maintenance of TMS1/ASC gene activity', *Cancer Res*, 68 (16), 6810-21.
- Kaser, A. and Blumberg, R. S. (2010a), 'Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation', *Mucosal Immunol*, 3 (1), 11-6.
- Kaser, A., Martinez-Naves, E., and Blumberg, R. S. (2010b), 'Endoplasmic reticulum stress: implications for inflammatory bowel disease pathogenesis', *Curr Opin Gastroenterol*, 26 (4), 318-26.
- Kaser, A., Lee, A. H., Franke, A., Glickman, J. N., Zeissig, S., Tilg, H., . . . Blumberg, R. S. (2008), 'XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease', *Cell*, 134 (5), 743-56.
- Katayama, M., Xu, D., Specian, R. D., and Deitch, E. A. (1997), 'Role of bacterial adherence and the mucus barrier on bacterial translocation: effects of protein malnutrition and endotoxin in rats', *Ann Surg*, 225 (3), 317-26.

- Katz, J., Lee, A. C., Kozuki, N., Lawn, J. E., Cousens, S., Blencowe, H., . . . Black, R. E. (2013), 'Mortality risk in preterm and small-for-gestational-age infants in low-income and middle-income countries: a pooled country analysis', *Lancet*, 382 (9890), 417-25.
- Kawakami, T., Yoshimi, M., Kadota, Y., Inoue, M., Sato, M., and Suzuki, S. (2014), 'Prolonged endoplasmic reticulum stress alters placental morphology and causes low birth weight', *Toxicol Appl Pharmacol*, 275 (2), 134-44.
- Kellermayer, R. (2012), 'Epigenetics and the developmental origins of inflammatory bowel diseases', *Can J Gastroenterol*, 26 (12), 909-15.
- (2017), 'Challenges for epigenetic research in inflammatory bowel diseases', *Epigenomics*, 9 (4), 527-38.
- Khalili, H., Ananthakrishnan, A. N., Higuchi, L. M., Richter, J. M., Fuchs, C. S., and Chan, A. T. (2013), 'Early life factors and risk of inflammatory bowel disease in adulthood', *Inflamm Bowel Dis*, 19 (3), 542-7.
- Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X., and Reinecker, H. C. (2000), 'Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators', *Gastroenterology*, 118 (6), 1001-11.
- Kirsh, O., Seeler, J. S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., . . . Dejean, A. (2002), 'The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase', *Embo j*, 21 (11), 2682-91.
- Knights, D., Lassen, K. G., and Xavier, R. J. (2013), 'Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome', *Gut*, 62 (10), 1505-10.
- Ko, M. H. and Puglielli, L. (2009), 'Two endoplasmic reticulum (ER)/ER Golgi intermediate compartment-based lysine acetyltransferases post-translationally regulate BACE1 levels', *J Biol Chem*, 284 (4), 2482-92.
- Koumenis, C., Naczki, C., Koritzinsky, M., Rastani, S., Diehl, A., Sonenberg, N., . . . Wouters, B. G. (2002), 'Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha', *Mol Cell Biol*, 22 (21), 7405-16.
- Kozlov, A. V., Duvigneau, J. C., Miller, I., Nurnberger, S., Gesslbauer, B., Kungl, A., . . . Redl, H. (2009), 'Endotoxin causes functional endoplasmic reticulum failure, possibly mediated by mitochondria', *Biochim Biophys Acta*, 1792 (6), 521-30.
- Krimi, R. B., Kotelevets, L., Dubuquoy, L., Plaisancie, P., Walker, F., Lehy, T., . . . Marie, J. C. (2008), 'Resistin-like molecule beta regulates intestinal mucous secretion and curtails TNBS-induced colitis in mice', *Inflamm Bowel Dis*, 14 (7), 931-41.
- Kripke, S. A., Fox, A. D., Berman, J. M., Settle, R. G., and Rombeau, J. L. (1989), 'Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short-chain fatty acids', *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 13 (2), 109-16.
- Krishnan, V., Chow, M. Z., Wang, Z., Zhang, L., Liu, B., Liu, X., and Zhou, Z. (2011), 'Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in Zmpste24-deficient mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (30), 12325-30.
- Kuefer, R., Hofer, M. D., Altug, V., Zorn, C., Genze, F., Kunzi-Rapp, K., . . . Gschwend, J. E. (2004), 'Sodium butyrate and tributyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer', *Br J Cancer*, 90 (2), 535-41.
- Kuhn, K. M., DeRisi, J. L., Brown, P. O., and Sarnow, P. (2001), 'Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to a rapid transfer from a fermentable to a nonfermentable carbon source', *Mol Cell Biol*, 21 (3), 916-27.
- Kusinski, L. C., Stanley, J. L., Dilworth, M. R., Hirt, C. J., Andersson, I. J., Renshall, L. J., . . . Glazier, J. D. (2012), 'eNOS knockout mouse as a model of fetal growth restriction with an impaired uterine artery function and placental transport phenotype', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 303 (1), R86-93.
- Ladiges, W. (2014), 'The quality control theory of aging', *Pathobiol Aging Age Relat Dis*, 4.
- Lalles, J. P., Orozco-Solis, R., Bolanos-Jimenez, F., de Coppet, P., Le Drean, G., and Segain, J. P. (2012), 'Perinatal undernutrition alters intestinal alkaline phosphatase and its main transcription factors KLF4 and Cdx1 in adult offspring fed a high-fat diet', *J Nutr Biochem*, 23 (11), 1490-7.

- Lambert, D. W., Wood, I. S., Ellis, A., and Shirazi-Beechey, S. P. (2002), 'Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy', *Br J Cancer*, 86 (8), 1262-9.
- Lane, R. H., Kelley, D. E., Gruetzmacher, E. M., and Devaskar, S. U. (2001), 'Uteroplacental insufficiency alters hepatic fatty acid-metabolizing enzymes in juvenile and adult rats', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280 (1), R183-90.
- Langley-Evans, S. C. (2009), 'Nutritional programming of disease: unravelling the mechanism', *J Anat*, 215 (1), 36-51.
- Lara, E., Mai, A., Calvanese, V., Altucci, L., Lopez-Nieva, P., Martinez-Chantar, M. L., . . . Fraga, M. F. (2009), 'Salermide, a Sirtuin inhibitor with a strong cancer-specific proapoptotic effect', *Oncogene*, 28 (6), 781-91.
- Larsson, E., Tremaroli, V., Lee, Y. S., Koren, O., Nookaew, I., Fricker, A., . . . Backhed, F. (2012), 'Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88', *Gut*, 61 (8), 1124-31.
- Lausman, A., McCarthy, F. P., Walker, M., and Kingdom, J. (2012), 'Screening, diagnosis, and management of intrauterine growth restriction', *J Obstet Gynaecol Can*, 34 (1), 17-28.
- Le Dréan, G., Haure-Mirande, V., Ferrier, L., Bonnet, C., Hulin, P., de Coppet, P., and Segain, J. P. (2014), 'Visceral adipose tissue and leptin increase colonic epithelial tight junction permeability via a RhoA-ROCK-dependent pathway', *Faseb j*, 28 (3), 1059-70.
- Lea, M. A. and Tulsyan, N. (1995), 'Discordant effects of butyrate analogues on erythroleukemia cell proliferation, differentiation and histone deacetylase', *Anticancer Res*, 15 (3), 879-83.
- Lea, M. A. and Randolph, V. M. (1998), 'Induction of reporter gene expression by inhibitors of histone deacetylase', *Anticancer Res*, 18 (4a), 2717-22.
- Lea, M. A., Randolph, V. M., and Hodge, S. K. (1999), 'Induction of histone acetylation and growth regulation in erythroleukemia cells by 4-phenylbutyrate and structural analogs', *Anticancer Res*, 19 (3a), 1971-6.
- Lebeche, D., Lucero, H. A., and Kaminer, B. (1994), 'Calcium binding properties of rabbit liver protein disulfide isomerase', *Biochem Biophys Res Commun*, 202 (1), 556-61.
- Lecarpentier, E., Morel, O., Tarrade, A., Dahirel, M., Bonneau, M., Gayat, E., . . . Tsatsaris, V. (2012), 'Quantification of utero-placental vascularization in a rabbit model of IUGR with three-dimensional power Doppler angiography', *Placenta*, 33 (10), 769-75.
- Lee, H., Rezai-Zadeh, N., and Seto, E. (2004), 'Negative regulation of histone deacetylase 8 activity by cyclic AMP-dependent protein kinase A', *Mol Cell Biol*, 24 (2), 765-73.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., . . . Kaufman, R. J. (2002), 'IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response', *Genes Dev*, 16 (4), 452-66.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997), 'DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (6), 2545-50.
- (1998), 'Genetic instabilities in human cancers', *Nature*, 396 (6712), 643-9.
- Leon, D. A., Koupilova, I., Lithell, H. O., Berglund, L., Mohsen, R., Vagero, D., . . . McKeigue, P. M. (1996), 'Failure to realise growth potential in utero and adult obesity in relation to blood pressure in 50 year old Swedish men', *Bmj*, 312 (7028), 401-6.
- Leonardi-Bee, J., Smyth, A., Britton, J., and Coleman, T. (2008), 'Environmental tobacco smoke and fetal health: systematic review and meta-analysis', *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 93 (5), F351-61.
- Levy, D. B., Smith, K. J., Beazer-Barclay, Y., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1994), 'Inactivation of both APC alleles in human and mouse tumors', *Cancer Res*, 54 (22), 5953-8.
- Li, H., Myeroff, L., Smiraglia, D., Romero, M. F., Pretlow, T. P., Kasturi, L., . . . Markowitz, S. D. (2003), 'SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (14), 8412-7.
- Li, Y., Schwabe, R. F., DeVries-Seimon, T., Yao, P. M., Gerbod-Giannone, M. C., Tall, A. R., . . . Tabas, I. (2005), 'Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis

- factor-alpha and interleukin-6: model of NF-kappaB- and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis', *J Biol Chem*, 280 (23), 21763-72.
- Li, Z., Zhuang, M., Zhang, L., Zheng, X., Yang, P., and Li, Z. (2016), 'Acetylation modification regulates GRP78 secretion in colon cancer cells', *Sci Rep*, 6, 30406.
- Li, Z., Zhang, L., Zhao, Y., Li, H., Xiao, H., Fu, R., . . . Li, Z. (2013), 'Cell-surface GRP78 facilitates colorectal cancer cell migration and invasion', *Int J Biochem Cell Biol*, 45 (5), 987-94.
- Lievremont, J. P., Rizzuto, R., Hendershot, L., and Meldolesi, J. (1997), 'BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺', *J Biol Chem*, 272 (49), 30873-9.
- Lillicrop, K. A., Phillips, E. S., Jackson, A. A., Hanson, M. A., and Burdge, G. C. (2005), 'Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring', *J Nutr*, 135 (6), 1382-6.
- Lillicrop, K. A., Slater-Jefferies, J. L., Hanson, M. A., Godfrey, K. M., Jackson, A. A., and Burdge, G. C. (2007), 'Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications', *Br J Nutr*, 97 (6), 1064-73.
- Lin, W., Harding, H. P., Ron, D., and Popko, B. (2005), 'Endoplasmic reticulum stress modulates the response of myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon-gamma', *J Cell Biol*, 169 (4), 603-12.
- Lin, Y. H., Friederichs, J., Black, M. A., Mages, J., Rosenberg, R., Guilford, P. J., . . . Reeve, A. E. (2007), 'Multiple gene expression classifiers from different array platforms predict poor prognosis of colorectal cancer', *Clin Cancer Res*, 13 (2 Pt 1), 498-507.
- Liu, H. L., Chen, Y., Cui, G. H., and Zhou, J. F. (2005), 'Curcumin, a potent anti-tumor reagent, is a novel histone deacetylase inhibitor regulating B-NHL cell line Raji proliferation', *Acta Pharmacol Sin*, 26 (5), 603-9.
- Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J., and Efstratiadis, A. (1993), 'Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r)', *Cell*, 75 (1), 59-72.
- Liu, J. Z., van Sommeren, S., Huang, H., Ng, S. C., Alberts, R., Takahashi, A., . . . Weersma, R. K. (2015), 'Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations', *Nat Genet*, 47 (9), 979-86.
- Liu, X. L., Done, S. C., Yan, K., Kilpelainen, P., Pikkarainen, T., and Tryggvason, K. (2004), 'Defective trafficking of nephrin missense mutants rescued by a chemical chaperone', *J Am Soc Nephrol*, 15 (7), 1731-8.
- Liu, Z., Xie, Z., Jones, W., Pavlovicz, R. E., Liu, S., Yu, J., . . . Chan, K. K. (2009), 'Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent', *Bioorg Med Chem Lett*, 19 (3), 706-9.
- Lo, W. S., Duggan, L., Emre, N. C., Belotserkovskaya, R., Lane, W. S., Shiekhhattar, R., and Berger, S. L. (2001), 'Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription', *Science*, 293 (5532), 1142-6.
- Lo, W. S., Trievel, R. C., Rojas, J. R., Duggan, L., Hsu, J. Y., Allis, C. D., . . . Berger, S. L. (2000), 'Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14', *Mol Cell*, 5 (6), 917-26.
- Longman, R. J., Poulson, R., Corfield, A. P., Warren, B. F., Wright, N. A., and Thomas, M. G. (2006), 'Alterations in the composition of the supramucosal defense barrier in relation to disease severity of ulcerative colitis', *J Histochem Cytochem*, 54 (12), 1335-48.
- Longo, S., Borghesi, A., Tzialla, C., and Stronati, M. (2014), 'IUGR and infections', *Early Hum Dev*, 90 Suppl 1, S42-4.
- Longo, S., Bollani, L., Decembrino, L., Di Comite, A., Angelini, M., and Stronati, M. (2013), 'Short-term and long-term sequelae in intrauterine growth retardation (IUGR)', *J Matern Fetal Neonatal Med*, 26 (3), 222-5.

- Los, M., Schenk, H., Hexel, K., Baeuerle, P. A., Droge, W., and Schulze-Osthoff, K. (1995), 'IL-2 gene expression and NF-kappa B activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase', *Embo j*, 14 (15), 3731-40.
- Louis, P. and Flint, H. J. (2009), 'Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine', *FEMS Microbiol Lett*, 294 (1), 1-8.
- Luk, J. M., Lam, C. T., Siu, A. F., Lam, B. Y., Ng, I. O., Hu, M. Y., . . . Fan, S. T. (2006), 'Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27, Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values', *Proteomics*, 6 (3), 1049-57.
- Ma, T. Y., Boivin, M. A., Ye, D., Pedram, A., and Said, H. M. (2005), 'Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288 (3), G422-30.
- Ma, T. Y., Iwamoto, G. K., Hoa, N. T., Akotia, V., Pedram, A., Boivin, M. A., and Said, H. M. (2004), 'TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286 (3), G367-76.
- Madsen, K. L., Lewis, S. A., Tavernini, M. M., Hibbard, J., and Fedorak, R. N. (1997), 'Interleukin 10 prevents cytokine-induced disruption of T84 monolayer barrier integrity and limits chloride secretion', *Gastroenterology*, 113 (1), 151-9.
- Mai, A., Massa, S., Lavu, S., Pezzi, R., Simeoni, S., Ragno, R., . . . Sinclair, D. A. (2005), 'Design, synthesis, and biological evaluation of sirtinol analogues as class III histone/protein deacetylase (Sirtuin) inhibitors', *J Med Chem*, 48 (24), 7789-95.
- Majid, S., Kikuno, N., Nelles, J., Noonan, E., Tanaka, Y., Kawamoto, K., . . . Dahiya, R. (2008), 'Genistein induces the p21WAF1/CIP1 and p16INK4a tumor suppressor genes in prostate cancer cells by epigenetic mechanisms involving active chromatin modification', *Cancer Res*, 68 (8), 2736-44.
- Malhi, H. and Kaufman, R. J. (2011), 'Endoplasmic reticulum stress in liver disease', *J Hepatol*, 54 (4), 795-809.
- Mandruzzato, G., Antsaklis, A., Botet, F., Chervenak, F. A., Figueras, F., Grunebaum, A., . . . Stanojevic, M. (2008), 'Intrauterine restriction (IUGR)', *J Perinat Med*, 36 (4), 277-81.
- Mankertz, J., Amasheh, M., Krug, S. M., Fromm, A., Amasheh, S., Hillenbrand, B., . . . Schulzke, J. D. (2009), 'TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling', *Cell Tissue Res*, 336 (1), 67-77.
- March, M. I., Gupta, M., Modest, A. M., Wu, L., Hacker, M. R., Martin, C. R., and Rana, S. (2014), 'Maternal risk factors for neonatal necrotizing enterocolitis', *J Matern Fetal Neonatal Med*, 1-6.
- Marcu, M. G., Jung, Y. J., Lee, S., Chung, E. J., Lee, M. J., Trepel, J., and Neckers, L. (2006), 'Curcumin is an inhibitor of p300 histone acetyltransferase', *Med Chem*, 2 (2), 169-74.
- Mariadason, J. M., Corner, G. A., and Augenlicht, L. H. (2000), 'Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer', *Cancer Res*, 60 (16), 4561-72.
- Mariadason, J. M., Velcich, A., Wilson, A. J., Augenlicht, L. H., and Gibson, P. R. (2001), 'Resistance to butyrate-induced cell differentiation and apoptosis during spontaneous Caco-2 cell differentiation', *Gastroenterology*, 120 (4), 889-99.
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., . . . et al. (1995), 'Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability', *Science*, 268 (5215), 1336-8.
- Martin, D., Li, Y., Yang, J., Wang, G., Margariti, A., Jiang, Z., . . . Zeng, L. (2014), 'Unspliced X-box-binding protein 1 (XBP1) protects endothelial cells from oxidative stress through interaction with histone deacetylase 3', *J Biol Chem*, 289 (44), 30625-34.
- Mashimo, H., Wu, D. C., Podolsky, D. K., and Fishman, M. C. (1996), 'Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor', *Science*, 274 (5285), 262-5.

- Mazurek, S., Grimm, H., Boschek, C. B., Vaupel, P., and Eigenbrodt, E. (2002), 'Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome', *Br J Nutr*, 87 Suppl 1, S23-9.
- McGovern, D. P., Gardet, A., Torkvist, L., Goyette, P., Essers, J., Taylor, K. D., . . . Seielstad, M. (2010), 'Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci', *Nat Genet*, 42 (4), 332-7.
- McGuckin, M. A., Eri, R. D., Das, I., Lourie, R., and Florin, T. H. (2011), 'Intestinal secretory cell ER stress and inflammation', *Biochem Soc Trans*, 39 (4), 1081-5.
- McIntire, D. D., Bloom, S. L., Casey, B. M., and Leveno, K. J. (1999), 'Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants', *N Engl J Med*, 340 (16), 1234-8.
- McKay, J. A., Waltham, K. J., Williams, E. A., and Mathers, J. C. (2011), 'Folate depletion during pregnancy and lactation reduces genomic DNA methylation in murine adult offspring', *Genes Nutr*, 6 (2), 189-96.
- McKenzie, J. A. and Ridley, A. J. (2007), 'Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF-alpha-induced changes in endothelial morphology and permeability', *J Cell Physiol*, 213 (1), 221-8.
- McLellan, E. A. and Bird, R. P. (1988), 'Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon', *Cancer Res*, 48 (21), 6187-92.
- Meas, T., Deghmoun, S., Alberti, C., Carreira, E., Armoogum, P., Chevenne, D., and Levy-Marchal, C. (2010), 'Independent effects of weight gain and fetal programming on metabolic complications in adults born small for gestational age', *Diabetologia*, 53 (5), 907-13.
- Melnick, J., Dul, J. L., and Argon, Y. (1994), 'Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum', *Nature*, 370 (6488), 373-5.
- Michiels, J., De Vos, M., Missotten, J., Obyn, A., De Smet, S., and Van Ginneken, C. (2013), 'Maturation of digestive function is retarded and plasma antioxidant capacity lowered in fully weaned low birth weight piglets', *Br J Nutr*, 109 (1), 65-75.
- Michishita, E., Park, J. Y., Burneskis, J. M., Barrett, J. C., and Horikawa, I. (2005), 'Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins', *Mol Biol Cell*, 16 (10), 4623-35.
- Mitchell, E. K., Louey, S., Cock, M. L., Harding, R., and Black, M. J. (2004), 'Nephron endowment and filtration surface area in the kidney after growth restriction of fetal sheep', *Pediatr Res*, 55 (5), 769-73.
- Miyauchi, S., Gopal, E., Fei, Y. J., and Ganapathy, V. (2004), 'Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na(+)-coupled transporter for short-chain fatty acids', *J Biol Chem*, 279 (14), 13293-6.
- Mizuuchi, M., Cindrova-Davies, T., Olovsson, M., Charnock-Jones, D. S., Burton, G. J., and Yung, H. W. (2016), 'Placental endoplasmic reticulum stress negatively regulates transcription of placental growth factor via ATF4 and ATF6beta: implications for the pathophysiology of human pregnancy complications', *J Pathol*, 238 (4), 550-61.
- Morgan, M. J. and Liu, Z. G. (2011), 'Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling', *Cell Res*, 21 (1), 103-15.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., and Yasuhiko, Y. (2002), 'An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12', *J Biol Chem*, 277 (37), 34287-94.
- Morita, A., Tsao, D., and Kim, Y. S. (1982), 'Effect of sodium butyrate on alkaline phosphatase in HRT-18, a human rectal cancer cell line', *Cancer Res*, 42 (11), 4540-5.
- Morois, S., Mesrine, S., Besemer, F., Josset, M., Clavel-Chapelon, F., and Boutron-Ruault, M. C. (2011), 'Risks of colon and rectal adenomas are differentially associated with anthropometry throughout life: the French E3N prospective cohort', *Int J Epidemiol*, 40 (5), 1269-79.
- Muller, C. A., Autenrieth, I. B., and Peschel, A. (2005), 'Innate defenses of the intestinal epithelial barrier', *Cell Mol Life Sci*, 62 (12), 1297-307.
- Myzak, M. C. and Dashwood, R. H. (2006a), 'Histone deacetylases as targets for dietary cancer preventive agents: lessons learned with butyrate, diallyl disulfide, and sulforaphane', *Curr Drug Targets*, 7 (4), 443-52.

- Myzak, M. C., Dashwood, W. M., Orner, G. A., Ho, E., and Dashwood, R. H. (2006b), 'Sulforaphane inhibits histone deacetylase in vivo and suppresses tumorigenesis in Apc-minus mice', *FASEB J*, 20 (3), 506-8.
- Myzak, M. C., Tong, P., Dashwood, W. M., Dashwood, R. H., and Ho, E. (2007), 'Sulforaphane retards the growth of human PC-3 xenografts and inhibits HDAC activity in human subjects', *Exp Biol Med (Maywood)*, 232 (2), 227-34.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J. (2000), 'Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta', *Nature*, 403 (6765), 98-103.
- Nakajima, S., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Saito, Y., Kato, H., Huang, T., . . . Kitamura, M. (2011), 'Selective abrogation of BiP/GRP78 blunts activation of NF-kappaB through the ATF6 branch of the UPR: involvement of C/EBPbeta and mTOR-dependent dephosphorylation of Akt', *Mol Cell Biol*, 31 (8), 1710-8.
- Nancey, S., Moussata, D., Graber, I., Claudel, S., Saurin, J. C., and Flourie, B. (2005), 'Tumor necrosis factor alpha reduces butyrate oxidation in vitro in human colonic mucosa: a link from inflammatory process to mucosal damage?', *Inflamm Bowel Dis*, 11 (6), 559-66.
- Nandakumar, V., Vaid, M., and Katiyar, S. K. (2011), '(-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells', *Carcinogenesis*, 32 (4), 537-44.
- Neerhof, M. G., Synowiec, S., Khan, S., and Thaete, L. G. (2011), 'Pathophysiology of chronic nitric oxide synthase inhibition-induced fetal growth restriction in the rat', *Hypertens Pregnancy*, 30 (1), 28-36.
- Neugebauer, R. C., Uchiechowska, U., Meier, R., Hruby, H., Valkov, V., Verdin, E., . . . Jung, M. (2008), 'Structure-activity studies on splitomicin derivatives as sirtuin inhibitors and computational prediction of binding mode', *J Med Chem*, 51 (5), 1203-13.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J., and Pickett, C. B. (2003), 'Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43, 233-60.
- Nilsen, T. I., Romundstad, P. R., Troisi, R., Potischman, N., and Vatten, L. J. (2005), 'Birth size and colorectal cancer risk: a prospective population based study', *Gut*, 54 (12), 1728-32.
- Nilsson, A. C., Ostman, E. M., Knudsen, K. E., Holst, J. J., and Bjorck, I. M. (2010), 'A cereal-based evening meal rich in indigestible carbohydrates increases plasma butyrate the next morning', *J Nutr*, 140 (11), 1932-6.
- Novak, E. A. and Mollen, K. P. (2015), 'Mitochondrial dysfunction in inflammatory bowel disease', *Front Cell Dev Biol*, 3, 62.
- O'Regan, D., Kenyon, C. J., Seckl, J. R., and Holmes, M. C. (2004), 'Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287 (5), E863-70.
- Ogata, E. S., Swanson, S. L., Collins, J. W., Jr., and Finley, S. L. (1990), 'Intrauterine growth retardation: altered hepatic energy and redox states in the fetal rat', *Pediatr Res*, 27 (1), 56-63.
- Ogawa, N. and Mori, K. (2004), 'Autoregulation of the HAC1 gene is required for sustained activation of the yeast unfolded protein response', *Genes Cells*, 9 (2), 95-104.
- Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., and Hayashi, H. (2005), 'TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death', *Embo J*, 24 (6), 1243-55.
- Ojeda, N. B., Hennington, B. S., Williamson, D. T., Hill, M. L., Betson, N. E., Sartori-Valinotti, J. C., . . . Alexander, B. T. (2012), 'Oxidative stress contributes to sex differences in blood pressure in adult growth-restricted offspring', *Hypertension*, 60 (1), 114-22.
- Okada, T., Yoshida, H., Akazawa, R., Negishi, M., and Mori, K. (2002), 'Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response', *Biochem J*, 366 (Pt 2), 585-94.

- Ono, K., Nimura, S., Nishinakagawa, T., Hideshima, Y., Enyoji, M., Nabeshima, K., and Nakashima, M. (2014), 'Sodium 4-phenylbutyrate suppresses the development of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice', *Exp Ther Med*, 7 (3), 573-78.
- Ono, K., Ikemoto, M., Kawarabayashi, T., Ikeda, M., Nishinakagawa, T., Hosokawa, M., . . . Nakashima, M. (2009), 'A chemical chaperone, sodium 4-phenylbutyric acid, attenuates the pathogenic potency in human alpha-synuclein A30P + A53T transgenic mice', *Parkinsonism Relat Disord*, 15 (9), 649-54.
- Osmond, C., Barker, D. J., Winter, P. D., Fall, C. H., and Simmonds, S. J. (1993), 'Early growth and death from cardiovascular disease in women', *Bmj*, 307 (6918), 1519-24.
- Otori, K., Konishi, M., Sugiyama, K., Hasebe, T., Shimoda, T., Kikuchi-Yanoshita, R., . . . Esumi, H. (1998), 'Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue', *Cancer*, 83 (5), 896-900.
- Ozanne, S. E. (2001), 'Metabolic programming in animals', *Br Med Bull*, 60, 143-52.
- Ozanne, S. E., Jensen, C. B., Tingey, K. J., Storgaard, H., Madsbad, S., and Vaag, A. A. (2005), 'Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression', *Diabetologia*, 48 (3), 547-52.
- Ozcan, L., Ergin, A. S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., Nie, D., . . . Ozcan, U. (2009), 'Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance', *Cell Metab*, 9 (1), 35-51.
- Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R. O., . . . Hotamisligil, G. S. (2006), 'Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes', *Science*, 313 (5790), 1137-40.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., . . . Hotamisligil, G. S. (2004), 'Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes', *Science*, 306 (5695), 457-61.
- Pahl, H. L. and Baeuerle, P. A. (1995), 'A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B', *Embo j*, 14 (11), 2580-8.
- Pallet, N., Fougeray, S., Beaune, P., Legendre, C., Thervet, E., and Anglicheau, D. (2009), 'Endoplasmic reticulum stress: an unrecognized actor in solid organ transplantation', *Transplantation*, 88 (5), 605-13.
- Park, J. H., Stoffers, D. A., Nicholls, R. D., and Simmons, R. A. (2008), 'Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1', *J Clin Invest*, 118 (6), 2316-24.
- Park, S. W., Zhen, G., Verhaeghe, C., Nakagami, Y., Nguyenvu, L. T., Barczak, A. J., . . . Erle, D. J. (2009), 'The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (17), 6950-5.
- Paroder, V., Spencer, S. R., Paroder, M., Arango, D., Schwartz, S., Jr., Mariadason, J. M., . . . Carrasco, N. (2006), 'Na(+)/monocarboxylate transport (SMCT) protein expression correlates with survival in colon cancer: molecular characterization of SMCT', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (19), 7270-5.
- Patrignani, P., Tacconelli, S., and Bruno, A. (2014), 'Gut microbiota, host gene expression, and aging', *J Clin Gastroenterol*, 48 Suppl 1, S28-31.
- Pereira, E. R., Liao, N., Neale, G. A., and Hendershot, L. M. (2010), 'Transcriptional and post-transcriptional regulation of proangiogenic factors by the unfolded protein response', *PLoS One*, 5 (9).
- Peterside, I. E., Selak, M. A., and Simmons, R. A. (2003), 'Impaired oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria in growth-retarded rats', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285 (6), E1258-66.
- Petrik, J., Reusens, B., Arany, E., Remacle, C., Coelho, C., Hoet, J. J., and Hill, D. J. (1999), 'A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal

- rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II', *Endocrinology*, 140 (10), 4861-73.
- Pflum, M. K., Tong, J. K., Lane, W. S., and Schreiber, S. L. (2001), 'Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation', *J Biol Chem*, 276 (50), 47733-41.
- Pham, T. D., MacLennan, N. K., Chiu, C. T., Laksana, G. S., Hsu, J. L., and Lane, R. H. (2003), 'Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285 (5), R962-70.
- Phipps, K., Barker, D. J., Hales, C. N., Fall, C. H., Osmond, C., and Clark, P. M. (1993), 'Fetal growth and impaired glucose tolerance in men and women', *Diabetologia*, 36 (3), 225-8.
- Pinto, D. and Clevers, H. (2005), 'Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium', *Exp Cell Res*, 306 (2), 357-63.
- Potten, C. S., Booth, C., and Pritchard, D. M. (1997), 'The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor', *Int J Exp Pathol*, 78 (4), 219-43.
- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., . . . Kinzler, K. W. (1992), 'APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis', *Nature*, 359 (6392), 235-7.
- Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K. L., Powell, R. M., MacDonald, T. T., and Collins, J. E. (2005), 'Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells', *Lab Invest*, 85 (9), 1139-62.
- Priyadarsini, R. V., Vinothini, G., Murugan, R. S., Manikandan, P., and Nagini, S. (2011), 'The flavonoid quercetin modulates the hallmark capabilities of hamster buccal pouch tumors', *Nutr Cancer*, 63 (2), 218-26.
- Prostko, C. R., Brostrom, M. A., and Brostrom, C. O. (1993), 'Reversible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 alpha in response to endoplasmic reticular signaling', *Mol Cell Biochem*, 127-128, 255-65.
- Prostko, C. R., Brostrom, M. A., Malara, E. M., and Brostrom, C. O. (1992), 'Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 alpha and inhibition of eIF-2B in GH3 pituitary cells by perturbants of early protein processing that induce GRP78', *J Biol Chem*, 267 (24), 16751-4.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L. A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P. N., Huntington, N. D., . . . Strasser, A. (2007), 'ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim', *Cell*, 129 (7), 1337-49.
- Qin, W., Zhang, K., Clarke, K., Weiland, T., and Sauter, E. R. (2014), 'Methylation and miRNA effects of resveratrol on mammary tumors vs. normal tissue', *Nutr Cancer*, 66 (2), 270-7.
- Qiu, X. S., Huang, T. T., Shen, Z. Y., Deng, H. Y., and Ke, Z. Y. (2005), 'Effect of early nutrition on intestine development of intrauterine growth retardation in rats and its correlation to leptin', *World J Gastroenterol*, 11 (28), 4419-22.
- Radtke, F. and Clevers, H. (2005), 'Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin', *Science*, 307 (5717), 1904-9.
- Raleigh, D. R., Boe, D. M., Yu, D., Weber, C. R., Marchiando, A. M., Bradford, E. M., . . . Turner, J. R. (2011), 'Occludin S408 phosphorylation regulates tight junction protein interactions and barrier function', *J Cell Biol*, 193 (3), 565-82.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C., and Perucho, M. (1997), 'Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype', *Science*, 275 (5302), 967-9.
- Rao, R., Nalluri, S., Kolhe, R., Yang, Y., Fiskus, W., Chen, J., . . . Bhalla, K. N. (2010), 'Treatment with panobinostat induces glucose-regulated protein 78 acetylation and endoplasmic reticulum stress in breast cancer cells', *Mol Cancer Ther*, 9 (4), 942-52.
- Ravelli, A. C., van Der Meulen, J. H., Osmond, C., Barker, D. J., and Bleker, O. P. (1999), 'Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally', *Am J Clin Nutr*, 70 (5), 811-6.
- Ravelli, A. C., van der Meulen, J. H., Michels, R. P., Osmond, C., Barker, D. J., Hales, C. N., and Bleker, O. P. (1998), 'Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine', *Lancet*, 351 (9097), 173-7.

- Ravelli, G. P., Stein, Z. A., and Susser, M. W. (1976), 'Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy', *N Engl J Med*, 295 (7), 349-53.
- Ravichandran, S., Singh, N., Donnelly, D., Migliore, M., Johnson, P., Fishwick, C., . . . Moaddel, R. (2014), 'Pharmacophore model of the quercetin binding site of the SIRT6 protein', *J Mol Graph Model*, 49, 38-46.
- Raychaudhuri, N., Raychaudhuri, S., Thamocharan, M., and Devaskar, S. U. (2008), 'Histone code modifications repress glucose transporter 4 expression in the intrauterine growth-restricted offspring', *J Biol Chem*, 283 (20), 13611-26.
- RCOG, Royal College of Obstetricians and Gynecologists (2014), 'The investigation and management of the small-for-gestational age fetus.', *Guideline*, No. 31.
- Redonnet-Vernhet, I., Rouanet, F., Pedespan, J. M., Hocke, C., and Parrot, F. (2000), 'A successful pregnancy in a heterozygote for OTC deficiency treated with sodium phenylbutyrate', *Neurology*, 54 (4), 1008.
- Reid, G. J., Flozak, A. S., and Simmons, R. A. (2002), 'Placental expression of insulin-like growth factor receptor-1 and insulin receptor in the growth-restricted fetal rat', *J Soc Gynecol Investig*, 9 (4), 210-4.
- Reimold, A. M., Etkin, A., Clauss, I., Perkins, A., Friend, D. S., Zhang, J., . . . Glimcher, L. H. (2000), 'An essential role in liver development for transcription factor XBP-1', *Genes Dev*, 14 (2), 152-7.
- Rich-Edwards, J. W., Stampfer, M. J., Manson, J. E., Rosner, B., Hankinson, S. E., Colditz, G. A., . . . Hennekens, C. H. (1997), 'Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976', *Bmj*, 315 (7105), 396-400.
- Ricobaraza, A., Cuadrado-Tejedor, M., Perez-Mediavilla, A., Frechilla, D., Del Rio, J., and Garcia-Osta, A. (2009), 'Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model', *Neuropsychopharmacology*, 34 (7), 1721-32.
- Riggs, M. G., Whittaker, R. G., Neumann, J. R., and Ingram, V. M. (1977), 'n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells', *Nature*, 268 (5619), 462-4.
- Rissland, O. S. and Lai, E. C. (2011), 'RNA silencing in Monterey', *Development*, 138 (15), 3093-102.
- Ritzhaupt, A., Wood, I. S., Ellis, A., Hosie, K. B., and Shirazi-Beechey, S. P. (1998), 'Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport L-lactate as well as butyrate', *J Physiol*, 513 (Pt 3), 719-32.
- Roediger, W. E. (1980), 'The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease?', *Lancet*, 2 (8197), 712-5.
- (1982), 'Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon', *Gastroenterology*, 83 (2), 424-9.
- Romero-Ramirez, L., Cao, H., Regalado, M. P., Kambham, N., Siemann, D., Kim, J. J., . . . Koong, A. C. (2009), 'X box-binding protein 1 regulates angiogenesis in human pancreatic adenocarcinomas', *Transl Oncol*, 2 (1), 31-8.
- Roseboom, T. J., van der Meulen, J. H., Osmond, C., Barker, D. J., Ravelli, A. C., and Bleker, O. P. (2000a), 'Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine', *Am J Clin Nutr*, 72 (5), 1101-6.
- Roseboom, T. J., van der Meulen, J. H., van Montfrans, G. A., Ravelli, A. C., Osmond, C., Barker, D. J., and Bleker, O. P. (2001), 'Maternal nutrition during gestation and blood pressure in later life', *J Hypertens*, 19 (1), 29-34.
- Roseboom, T. J., van der Meulen, J. H., Osmond, C., Barker, D. J., Ravelli, A. C., Schroeder-Tanka, J. M., . . . Bleker, O. P. (2000b), 'Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944-45', *Heart*, 84 (6), 595-8.
- Rouge, C., Des Robert, C., Robins, A., Le Bacquer, O., Volteau, C., De La Cochetiere, M. F., and Darmaun, D. (2007), 'Manipulation of citrulline availability in humans', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293 (5), G1061-7.
- Ruiz, P. A., Braune, A., Holzwimmer, G., Quintanilla-Fend, L., and Haller, D. (2007), 'Quercetin inhibits TNF-induced NF-kappaB transcription factor recruitment to proinflammatory gene promoters in murine intestinal epithelial cells', *J Nutr*, 137 (5), 1208-15.

- Rutkowski, D. T. and Kaufman, R. J. (2004), 'A trip to the ER: coping with stress', *Trends Cell Biol*, 14 (1), 20-8.
- Sakata, T. (1987), 'Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors', *Br J Nutr*, 58 (1), 95-103.
- Salminen, A. and Kaarniranta, K. (2010), 'ER stress and hormetic regulation of the aging process', *Ageing Res Rev*, 9 (3), 211-7.
- Salyers, A. A., West, S. E., Vercellotti, J. R., and Wilkins, T. D. (1977), 'Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon', *Appl Environ Microbiol*, 34 (5), 529-33.
- Sanders, Y. Y., Liu, H., Zhang, X., Hecker, L., Bernard, K., Desai, L., . . . Thannickal, V. J. (2013), 'Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress', *Redox Biol*, 1, 8-16.
- Sandhu, M. S., Luben, R., Day, N. E., and Khaw, K. T. (2002), 'Self-reported birth weight and subsequent risk of colorectal cancer', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11 (9), 935-8.
- Sangiorgi, E. and Capecchi, M. R. (2008), 'Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells', *Nat Genet*, 40 (7), 915-20.
- Schatzkin, A., Mouw, T., Park, Y., Subar, A. F., Kipnis, V., Hollenbeck, A., . . . Thompson, F. E. (2007), 'Dietary fiber and whole-grain consumption in relation to colorectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study', *Am J Clin Nutr*, 85 (5), 1353-60.
- Scheppach, W. (1994), 'Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function', *Gut*, 35 (1 Suppl), S35-8.
- Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., . . . Kaufman, R. J. (2001), 'Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis', *Mol Cell*, 7 (6), 1165-76.
- Schewe, D. M. and Aguirre-Ghiso, J. A. (2008), 'ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (30), 10519-24.
- Scholl, T. O. and Hediger, M. L. (1994), 'Anemia and iron-deficiency anemia: compilation of data on pregnancy outcome', *Am J Clin Nutr*, 59 (2 Suppl), 492S-500S discussion 00S-01S.
- Schroder, M. and Kaufman, R. J. (2005), 'The mammalian unfolded protein response', *Annu Rev Biochem*, 74, 739-89.
- Schroder, M., Clark, R., Liu, C. Y., and Kaufman, R. J. (2004), 'The unfolded protein response represses differentiation through the RPD3-SIN3 histone deacetylase', *Embo j*, 23 (11), 2281-92.
- Sealy, L. and Chalkley, R. (1978), 'The effect of sodium butyrate on histone modification', *Cell*, 14 (1), 115-21.
- Segain J, Le Drean G, Guardiola P, Haure-Mirande V, de Coppet P. (2015), 'Transcriptomic analysis of colonic epithelial cells in adult rats born with intra-uterine growth retardation.', *GEO*, GEO accession n°: GSE65051.
- Segain, J. P., Raingeard de la Bletiere, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., . . . Galmiche, J. P. (2000), 'Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease', *Gut*, 47 (3), 397-403.
- Selak, M. A., Storey, B. T., Peterside, I., and Simmons, R. A. (2003), 'Impaired oxidative phosphorylation in skeletal muscle of intrauterine growth-retarded rats', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285 (1), E130-7.
- Serpa, J., Caiado, F., Carvalho, T., Torre, C., Goncalves, L. G., Casalou, C., . . . Dias, S. (2010), 'Butyrate-rich colonic microenvironment is a relevant selection factor for metabolically adapted tumor cells', *J Biol Chem*, 285 (50), 39211-23.
- Shahbazian, M. D. and Grunstein, M. (2007), 'Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation', *Annu Rev Biochem*, 76, 75-100.
- Shanklin, D. R. and Cooke, R. J. (1993), 'Effects of intrauterine growth on intestinal length in the human fetus', *Biol Neonate*, 64 (2-3), 76-81.

- Sheehan, J. K., Thornton, D. J., Howard, M., Carlstedt, I., Corfield, A. P., and Paraskeva, C. (1996), 'Biosynthesis of the MUC2 mucin: evidence for a slow assembly of fully glycosylated units', *Biochem J*, 315 (Pt 3), 1055-60.
- Shepard, T. H., Mackler, B., and Finch, C. A. (1980), 'Reproductive studies in the iron-deficient rat', *Teratology*, 22 (3), 329-34.
- Shin, J., Carr, A., Corner, G. A., Togel, L., Davalos-Salas, M., Tran, H., . . . Mariadason, J. M. (2014), 'The intestinal epithelial cell differentiation marker intestinal alkaline phosphatase (ALPi) is selectively induced by histone deacetylase inhibitors (HDACi) in colon cancer cells in a Kruppel-like factor 5 (KLF5)-dependent manner', *J Biol Chem*, 289 (36), 25306-16.
- Shkoda, A., Ruiz, P. A., Daniel, H., Kim, S. C., Rogler, G., Sartor, R. B., and Haller, D. (2007), 'Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation', *Gastroenterology*, 132 (1), 190-207.
- Shrader, R. E. and Zeman, F. J. (1969), 'Effect of maternal protein deprivation on morphological and enzymatic development of neonatal rat tissue', *J Nutr*, 99 (4), 401-12.
- Siavoshian, S., Blottiere, H. M., Le Foll, E., Kaeffer, B., Cherbut, C., and Galmiche, J. P. (1997), 'Comparison of the effect of different short chain fatty acids on the growth and differentiation of human colonic carcinoma cell lines in vitro', *Cell Biol Int*, 21 (5), 281-7.
- Siavoshian, S., Segain, J. P., Kornprobst, M., Bonnet, C., Cherbut, C., Galmiche, J. P., and Blottiere, H. M. (2000), 'Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression', *Gut*, 46 (4), 507-14.
- Silveira, V. M. and Horta, B. L. (2008), '[Birth weight and metabolic syndrome in adults: meta-analysis]', *Rev Saude Publica*, 42 (1), 10-8.
- Simmons, R. A., Templeton, L. J., and Gertz, S. J. (2001), 'Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat', *Diabetes*, 50 (10), 2279-86.
- Simmons, R. A., Saponitsky-Kroyter, I., and Selak, M. A. (2005), 'Progressive accumulation of mitochondrial DNA mutations and decline in mitochondrial function lead to beta-cell failure', *J Biol Chem*, 280 (31), 28785-91.
- Singh, O. V., Vij, N., Mogayzel, P. J., Jr., Jozwik, C., Pollard, H. B., and Zeitlin, P. L. (2006), 'Pharmacoproteomics of 4-phenylbutyrate-treated IB3-1 cystic fibrosis bronchial epithelial cells', *J Proteome Res*, 5 (3), 562-71.
- Snoeck, A., Remacle, C., Reusens, B., and Hoet, J. J. (1990), 'Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas', *Biol Neonate*, 57 (2), 107-18.
- Soeda, J., Mouralidarane, A., Cordero, P., Li, J., Nguyen, V., Carter, R., . . . Oben, J. A. (2016), 'Maternal obesity alters endoplasmic reticulum homeostasis in offspring pancreas', *J Physiol Biochem*, 72 (2), 281-91.
- Sohi, G., Revesz, A., and Hardy, D. B. (2013), 'Nutritional mismatch in postnatal life of low birth weight rat offspring leads to increased phosphorylation of hepatic eukaryotic initiation factor 2 alpha in adulthood', *Metabolism*, 62 (10), 1367-74.
- Song, J., Noh, J. H., Lee, J. H., Eun, J. W., Ahn, Y. M., Kim, S. Y., . . . Nam, S. W. (2005), 'Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer', *Apmis*, 113 (4), 264-8.
- Soret, R., Chevalier, J., De Coppet, P., Poupeau, G., Derkinderen, P., Segain, J. P., and Neunlist, M. (2010), 'Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats', *Gastroenterology*, 138 (5), 1772-82.
- Soto, C. (2003), 'Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases', *Nat Rev Neurosci*, 4 (1), 49-60.
- Spitale, R. C., Tsai, M. C., and Chang, H. Y. (2011), 'RNA templating the epigenome: long noncoding RNAs as molecular scaffolds', *Epigenetics*, 6 (5), 539-43.
- Stefanska, B., Rudnicka, K., Bednarek, A., and Fabianowska-Majewska, K. (2010), 'Hypomethylation and induction of retinoic acid receptor beta 2 by concurrent action of adenosine analogues and natural compounds in breast cancer cells', *Eur J Pharmacol*, 638 (1-3), 47-53.
- Stein, J., Zores, M., and Schroder, O. (2000), 'Short-chain fatty acid (SCFA) uptake into Caco-2 cells by a pH-dependent and carrier mediated transport mechanism', *Eur J Nutr*, 39 (3), 121-5.

- Stevenson, B. R., Anderson, J. M., Braun, I. D., and Mooseker, M. S. (1989), 'Phosphorylation of the tight-junction protein ZO-1 in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance', *Biochem J*, 263 (2), 597-9.
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., and Price, B. D. (2006), 'Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation', *FEBS Lett*, 580 (18), 4353-6.
- Suzuki, T. (2013), 'Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions', *Cell Mol Life Sci*, 70 (4), 631-59.
- Suzuki, T., Yoshinaga, N., and Tanabe, S. (2011), 'Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium', *J Biol Chem*, 286 (36), 31263-71.
- Suzuki, T., Elias, B. C., Seth, A., Shen, L., Turner, J. R., Giorgianni, F., . . . Rao, R. (2009), 'PKC ϵ regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (1), 61-6.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Theissig, F., Engelhardt, H., Bengmark, S., Koch, S., . . . Dorffel, Y. (2007), 'Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon', *Gut*, 56 (3), 343-50.
- Sylvester, P. A., Myerscough, N., Warren, B. F., Carlstedt, I., Corfield, A. P., Durdey, P., and Thomas, M. G. (2001), 'Differential expression of the chromosome 11 mucin genes in colorectal cancer', *J Pathol*, 195 (3), 327-35.
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., and Samali, A. (2006), 'Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis', *EMBO Rep*, 7 (9), 880-5.
- Taipale, M., Rea, S., Richter, K., Vilar, A., Lichter, P., Imhof, A., and Akhtar, A. (2005), 'hMOF histone acetyltransferase is required for histone H4 lysine 16 acetylation in mammalian cells', *Mol Cell Biol*, 25 (15), 6798-810.
- Takahashi, H., Wang, J. P., Zheng, H. C., Masuda, S., and Takano, Y. (2011), 'Overexpression of GRP78 and GRP94 is involved in colorectal carcinogenesis', *Histol Histopathol*, 26 (6), 663-71.
- Takayama, T., Katsuki, S., Takahashi, Y., Ohi, M., Nojiri, S., Sakamaki, S., . . . Niitsu, Y. (1998), 'Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer', *N Engl J Med*, 339 (18), 1277-84.
- Tan, S., Wang, C., Lu, C., Zhao, B., Cui, Y., Shi, X., and Ma, X. (2009), 'Quercetin is able to demethylate the p16INK4a gene promoter', *Chemotherapy*, 55 (1), 6-10.
- Tappenden, K. A., Thomson, A. B., Wild, G. E., and McBurney, M. I. (1997), 'Short-chain fatty acid-supplemented total parenteral nutrition enhances functional adaptation to intestinal resection in rats', *Gastroenterology*, 112 (3), 792-802.
- Tarrade, A., Lecarpentier, E., Gil, S., Morel, O., Zahr, N., Dahirel, M., . . . Chavatte-Palmer, P. (2014), 'Analysis of placental vascularization in a pharmacological rabbit model of IUGR induced by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor', *Placenta*, 35 (4), 254-9.
- Taylor, K., Barran, P. E., and Dorin, J. R. (2008), 'Structure-activity relationships in beta-defensin peptides', *Biopolymers*, 90 (1), 1-7.
- Thangaraju, M., Cresci, G., Itagaki, S., Mellinger, J., Browning, D. D., Berger, F. G., . . . Ganapathy, V. (2008), 'Sodium-coupled transport of the short chain fatty acid butyrate by SLC5A8 and its relevance to colon cancer', *J Gastrointest Surg*, 12 (10), 1773-81; discussion 81-2.
- Thibault, R., Blachier, F., Darcy-Vrillon, B., de Coppet, P., Bourreille, A., and Segain, J. P. (2010), 'Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a transport deficiency', *Inflamm Bowel Dis*, 16 (4), 684-95.
- Thibault, R., De Coppet, P., Daly, K., Bourreille, A., Cuff, M., Bonnet, C., . . . Segain, J. P. (2007), 'Down-regulation of the monocarboxylate transporter 1 is involved in butyrate deficiency during intestinal inflammation', *Gastroenterology*, 133 (6), 1916-27.
- Thibodeau, S. N., Bren, G., and Schaid, D. (1993), 'Microsatellite instability in cancer of the proximal colon', *Science*, 260 (5109), 816-9.
- Thibodeau, S. N., French, A. J., Cunningham, J. M., Tester, D., Burgart, L. J., Roche, P. C., . . . O'Connell, M. J. (1998), 'Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1', *Cancer Res*, 58 (8), 1713-8.

- Thompson, R. F., Fazzari, M. J., Niu, H., Barzilai, N., Simmons, R. A., and Grealley, J. M. (2010), 'Experimental intrauterine growth restriction induces alterations in DNA methylation and gene expression in pancreatic islets of rats', *J Biol Chem*, 285 (20), 15111-8.
- Tobi, E. W., Lumey, L. H., Talens, R. P., Kremer, D., Putter, H., Stein, A. D., . . . Heijmans, B. T. (2009), 'DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific', *Hum Mol Genet*, 18 (21), 4046-53.
- Tobi, E. W., Goeman, J. J., Monajemi, R., Gu, H., Putter, H., Zhang, Y., . . . Heijmans, B. T. (2015), 'Corrigendum: DNA methylation signatures link prenatal famine exposure to growth and metabolism', *Nat Commun*, 6, 7740.
- Traka, M., Gasper, A. V., Smith, J. A., Hawkey, C. J., Bao, Y., and Mithen, R. F. (2005), 'Transcriptome analysis of human colon Caco-2 cells exposed to sulforaphane', *J Nutr*, 135 (8), 1865-72.
- Treton, X., Pedruzzi, E., Cazals-Hatem, D., Grodet, A., Panis, Y., Groyer, A., . . . Ogier-Denis, E. (2011), 'Altered endoplasmic reticulum stress affects translation in inactive colon tissue from patients with ulcerative colitis', *Gastroenterology*, 141 (3), 1024-35.
- Tsai, S. C. and Seto, E. (2002), 'Regulation of histone deacetylase 2 by protein kinase CK2', *J Biol Chem*, 277 (35), 31826-33.
- Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001), 'Multifunctional strands in tight junctions', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2 (4), 285-93.
- Tsuru, A., Fujimoto, N., Takahashi, S., Saito, M., Nakamura, D., Iwano, M., . . . Kohno, K. (2013), 'Negative feedback by IRE1beta optimizes mucin production in goblet cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (8), 2864-9.
- Turner, B. M., O'Neill, L. P., and Allan, I. M. (1989), 'Histone H4 acetylation in human cells. Frequency of acetylation at different sites defined by immunolabeling with site-specific antibodies', *FEBS Lett*, 253 (1-2), 141-5.
- Turner, J. R., Rill, B. K., Carlson, S. L., Carnes, D., Kerner, R., Mrsny, R. J., and Madara, J. L. (1997), 'Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation', *Am J Physiol*, 273 (4 Pt 1), C1378-85.
- Tytgat, K. M., van der Wal, J. W., Einerhand, A. W., Buller, H. A., and Dekker, J. (1996), 'Quantitative analysis of MUC2 synthesis in ulcerative colitis', *Biochem Biophys Res Commun*, 224 (2), 397-405.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., and Ron, D. (2000), 'Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1', *Science*, 287 (5453), 664-6.
- Vaishnav, S., Behrendt, C. L., Ismail, A. S., Eckmann, L., and Hooper, L. V. (2008), 'Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (52), 20858-63.
- van der Flier, L. G. and Clevers, H. (2009), 'Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium', *Annu Rev Physiol*, 71, 241-60.
- Van der Sluis, M., De Koning, B. A., De Bruijn, A. C., Velcich, A., Meijerink, J. P., Van Goudoever, J. B., . . . Einerhand, A. W. (2006), 'Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection', *Gastroenterology*, 131 (1), 117-29.
- van Passel, M. W., Kant, R., Zoetendal, E. G., Plugge, C. M., Derrien, M., Malfatti, S. A., . . . Smidt, H. (2011), 'The genome of *Akkermansia muciniphila*, a dedicated intestinal mucin degrader, and its use in exploring intestinal metagenomes', *PLoS One*, 6 (3), e16876.
- van Straten, E. M., Bloks, V. W., Huijckman, N. C., Baller, J. F., van Meer, H., Lutjohann, D., . . . Plosch, T. (2010), 'The liver X-receptor gene promoter is hypermethylated in a mouse model of prenatal protein restriction', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298 (2), R275-82.
- Vanhoutvin, S. A., Troost, F. J., Hamer, H. M., Lindsey, P. J., Koek, G. H., Jonkers, D. M., . . . Brummer, R. J. (2009), 'Butyrate-induced transcriptional changes in human colonic mucosa', *PLoS One*, 4 (8), e6759.
- Vega, H., Agellon, L. B., and Michalak, M. (2016), 'The rise of proteostasis promoters', *IUBMB Life*, 68 (12), 943-54.

- Vehaskari, V. M., Aviles, D. H., and Manning, J. (2001), 'Prenatal programming of adult hypertension in the rat', *Kidney Int*, 59 (1), 238-45.
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., . . . Augenlicht, L. (2002), 'Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2', *Science*, 295 (5560), 1726-9.
- Verfaillie, T., Rubio, N., Garg, A. D., Bultynck, G., Rizzuto, R., Decuyper, J. P., . . . Agostinis, P. (2012), 'PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress', *Cell Death Differ*, 19 (11), 1880-91.
- Verma, G. and Datta, M. (2012), 'The critical role of JNK in the ER-mitochondrial crosstalk during apoptotic cell death', *J Cell Physiol*, 227 (5), 1791-5.
- Vicario, M., Amat, C., Rivero, M., Moreto, M., and Pelegri, C. (2007), 'Dietary glutamine affects mucosal functions in rats with mild DSS-induced colitis', *J Nutr*, 137 (8), 1931-7.
- Vital, M., Howe, A. C., and Tiedje, J. M. (2014), 'Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data', *MBio*, 5 (2), e00889.
- Vo, T. and Hardy, D. B. (2012), 'Molecular mechanisms underlying the fetal programming of adult disease', *J Cell Commun Signal*, 6 (3), 139-53.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., . . . Bos, J. L. (1988), 'Genetic alterations during colorectal-tumor development', *N Engl J Med*, 319 (9), 525-32.
- Vora, P., Youdim, A., Thomas, L. S., Fukata, M., Tesfay, S. Y., Lukasek, K., . . . Abreu, M. T. (2004), 'Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells', *J Immunol*, 173 (9), 5398-405.
- Walker, C. L. and Ho, S. M. (2012), 'Developmental reprogramming of cancer susceptibility', *Nat Rev Cancer*, 12 (7), 479-86.
- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., and Kerr, D. (2009), 'Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer', *Nat Rev Cancer*, 9 (7), 489-99.
- Wang, B., Wu, Z., Ji, Y., Sun, K., Dai, Z., and Wu, G. (2016), 'L-Glutamine Enhances Tight Junction Integrity by Activating CaMK Kinase 2-AMP-Activated Protein Kinase Signaling in Intestinal Porcine Epithelial Cells', *J Nutr*, 146 (3), 501-8.
- Wang, B., Wu, G., Zhou, Z., Dai, Z., Sun, Y., Ji, Y., . . . Wu, Z. (2015), 'Glutamine and intestinal barrier function', *Amino Acids*, 47 (10), 2143-54.
- Wang, F. M., Chen, Y. J., and Ouyang, H. J. (2011), 'Regulation of unfolded protein response modulator XBP1s by acetylation and deacetylation', *Biochem J*, 433 (1), 245-52.
- Wang, M. and Kaufman, R. J. (2014a), 'The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development', *Nat Rev Cancer*, 14 (9), 581-97.
- Wang, T., Huo, Y. J., Shi, F., Xu, R. J., and Hutz, R. J. (2005), 'Effects of intrauterine growth retardation on development of the gastrointestinal tract in neonatal pigs', *Biol Neonate*, 88 (1), 66-72.
- Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., . . . Zhao, L. (2012a), 'Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers', *Isme j*, 6 (2), 320-9.
- Wang, Y., Alam, G. N., Ning, Y., Visioli, F., Dong, Z., Nor, J. E., and Polverini, P. J. (2012b), 'The unfolded protein response induces the angiogenic switch in human tumor cells through the PERK/ATF4 pathway', *Cancer Res*, 72 (20), 5396-406.
- Wang, Z., Qin, G., and Zhao, T. C. (2014b), 'HDAC4: mechanism of regulation and biological functions', *Epigenomics*, 6 (1), 139-50.
- Waterland, R. A. and Jirtle, R. L. (2003), 'Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation', *Mol Cell Biol*, 23 (15), 5293-300.
- Weaver, L. T., Desai, M., Austin, S., Arthur, H. M., Lucas, A., and Hales, C. N. (1998), 'Effects of protein restriction in early life on growth and function of the gastrointestinal tract of the rat', *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 27 (5), 553-9.
- Weber, C. R., Raleigh, D. R., Su, L., Shen, L., Sullivan, E. A., Wang, Y., and Turner, J. R. (2010), 'Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity', *J Biol Chem*, 285 (16), 12037-46.

- Wellen, K. E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U. M., Bui, T. V., Cross, J. R., and Thompson, C. B. (2009), 'ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation', *Science*, 324 (5930), 1076-80.
- West, A. C. and Johnstone, R. W. (2014), 'New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment', *J Clin Invest*, 124 (1), 30-9.
- White, S. L., Perkovic, V., Cass, A., Chang, C. L., Poulter, N. R., Spector, T., . . . Huxley, R. R. (2009), 'Is low birth weight an antecedent of CKD in later life? A systematic review of observational studies', *Am J Kidney Dis*, 54 (2), 248-61.
- Wigglesworth, J. S. (1974), 'Fetal growth retardation. Animal model: uterine vessel ligation in the pregnant rat', *Am J Pathol*, 77 (2), 347-50.
- Wiley, J. C., Pettan-Brewer, C., and Ladiges, W. C. (2011), 'Phenylbutyric acid reduces amyloid plaques and rescues cognitive behavior in AD transgenic mice', *Aging Cell*, 10 (3), 418-28.
- Willis-Martinez, D., Richards, H. W., Timchenko, N. A., and Medrano, E. E. (2010), 'Role of HDAC1 in senescence, aging, and cancer', *Exp Gerontol*, 45 (4), 279-85.
- Wilson, A. J., Byun, D. S., Popova, N., Murray, L. B., L'Italien, K., Sowa, Y., . . . Mariadason, J. M. (2006), 'Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDAC regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer', *J Biol Chem*, 281 (19), 13548-58.
- Wisner, D. M., Harris, L. R., 3rd, Green, C. L., and Poritz, L. S. (2008), 'Opposing regulation of the tight junction protein claudin-2 by interferon-gamma and interleukin-4', *J Surg Res*, 144 (1), 1-7.
- Wolff, G. L., Kodell, R. L., Moore, S. R., and Cooney, C. A. (1998), 'Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in *Avy/a* mice', *Faseb j*, 12 (11), 949-57.
- Woodall, S. M., Breier, B. H., Johnston, B. M., and Gluckman, P. D. (1996), 'A model of intrauterine growth retardation caused by chronic maternal undernutrition in the rat: effects on the somatotrophic axis and postnatal growth', *J Endocrinol*, 150 (2), 231-42.
- Woods, L. L., Ingelfinger, J. R., Nyengaard, J. R., and Rasch, R. (2001), 'Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats', *Pediatr Res*, 49 (4), 460-7.
- Wright, J. M., Zeitlin, P. L., Cebotaru, L., Guggino, S. E., and Guggino, W. B. (2004), 'Gene expression profile analysis of 4-phenylbutyrate treatment of IB3-1 bronchial epithelial cell line demonstrates a major influence on heat-shock proteins', *Physiol Genomics*, 16 (2), 204-11.
- Xiao, C., Giacca, A., and Lewis, G. F. (2011), 'Sodium phenylbutyrate, a drug with known capacity to reduce endoplasmic reticulum stress, partially alleviates lipid-induced insulin resistance and beta-cell dysfunction in humans', *Diabetes*, 60 (3), 918-24.
- Xiao, R., Sorensen, T. K., Williams, M. A., and Luthy, D. A. (2003), 'Influence of pre-eclampsia on fetal growth', *J Matern Fetal Neonatal Med*, 13 (3), 157-62.
- Xiao, X., Zhang, Z. X., Li, W. H., Feng, K., Sun, Q., Cohen, H. J., . . . Yi, Z. (2010), 'Low birth weight is associated with components of the metabolic syndrome', *Metabolism*, 59 (9), 1282-6.
- Xing, X., Li, Y., Liu, H., Wang, L., and Sun, L. (2011), 'Glucose regulated protein 78 (GRP78) is overexpressed in colorectal carcinoma and regulates colorectal carcinoma cell growth and apoptosis', *Acta Histochem*, 113 (8), 777-82.
- Xu, R. J., Mellor, D. J., Birtles, M. J., Reynolds, G. W., and Simpson, H. V. (1994), 'Impact of intrauterine growth retardation on the gastrointestinal tract and the pancreas in newborn pigs', *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 18 (2), 231-40.
- Xue, H., Sufit, A. J., and Wischmeyer, P. E. (2011), 'Glutamine therapy improves outcome of in vitro and in vivo experimental colitis models', *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 35 (2), 188-97.
- Xue, X., Piao, J. H., Nakajima, A., Sakon-Komazawa, S., Kojima, Y., Mori, K., . . . Nakano, H. (2005), 'Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha', *J Biol Chem*, 280 (40), 33917-25.
- Yadav, R. K., Chae, S. W., Kim, H. R., and Chae, H. J. (2014), 'Endoplasmic reticulum stress and cancer', *J Cancer Prev*, 19 (2), 75-88.

- Yamaguchi, H. and Wang, H. G. (2004), 'CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells', *J Biol Chem*, 279 (44), 45495-502.
- Yamamoto, M., Ramirez, S. H., Sato, S., Kiyota, T., Cerny, R. L., Kaibuchi, K., . . . Ikezu, T. (2008), 'Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells', *Am J Pathol*, 172 (2), 521-33.
- Yamazaki, H., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Tagawa, Y., Okamura, M., Ogata, R., . . . Kitamura, M. (2009), 'Activation of the Akt-NF-kappaB pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response', *J Immunol*, 183 (2), 1480-7.
- Yang, R., Han, X., Uchiyama, T., Watkins, S. K., Yaguchi, A., Delude, R. L., and Fink, M. P. (2003), 'IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 285 (3), G621-9.
- Ye, D., Ma, I., and Ma, T. Y. (2006), 'Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290 (3), G496-504.
- Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U. P., Prywes, R., . . . Goldstein, J. L. (2000), 'ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs', *Mol Cell*, 6 (6), 1355-64.
- Yildirim, E., Zhang, Z., Uz, T., Chen, C. Q., Manev, R., and Manev, H. (2003), 'Valproate administration to mice increases histone acetylation and 5-lipoxygenase content in the hippocampus', *Neurosci Lett*, 345 (2), 141-3.
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., and Tohyama, M. (2001), 'Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress', *J Biol Chem*, 276 (17), 13935-40.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001a), 'XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor', *Cell*, 107 (7), 881-91.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. (2001b), 'Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response', *Mol Cell Biol*, 21 (4), 1239-48.
- Yu, D., Marchiando, A. M., Weber, C. R., Raleigh, D. R., Wang, Y., Shen, L., and Turner, J. R. (2010), 'MLCK-dependent exchange and actin binding region-dependent anchoring of ZO-1 regulate tight junction barrier function', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (18), 8237-41.
- Yung, H. W., Cox, M., Tissot van Patot, M., and Burton, G. J. (2012a), 'Evidence of endoplasmic reticulum stress and protein synthesis inhibition in the placenta of non-native women at high altitude', *Faseb j*, 26 (5), 1970-81.
- Yung, H. W., Calabrese, S., Hynx, D., Hemmings, B. A., Cetin, I., Charnock-Jones, D. S., and Burton, G. J. (2008), 'Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction', *Am J Pathol*, 173 (2), 451-62.
- Yung, H. W., Hemberger, M., Watson, E. D., Senner, C. E., Jones, C. P., Kaufman, R. J., . . . Burton, G. J. (2012b), 'Endoplasmic reticulum stress disrupts placental morphogenesis: implications for human intrauterine growth restriction', *J Pathol*, 228 (4), 554-64.
- Zeng, Y., Gu, P., Liu, K., and Huang, P. (2013), 'Maternal protein restriction in rats leads to reduced PGC-1alpha expression via altered DNA methylation in skeletal muscle', *Mol Med Rep*, 7 (1), 306-12.
- Zetterstrom, K., Lindeberg, S. N., Haglund, B., and Hanson, U. (2006), 'Chronic hypertension as a risk factor for offspring to be born small for gestational age', *Acta Obstet Gynecol Scand*, 85 (9), 1046-50.

- Zhang, J., Jiang, Y., Jia, Z., Li, Q., Gong, W., Wang, L., . . . Xie, K. (2006a), 'Association of elevated GRP78 expression with increased lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer', *Clin Exp Metastasis*, 23 (7-8), 401-10.
- Zhang, K. and Kaufman, R. J. (2008), 'From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response', *Nature*, 454 (7203), 455-62.
- Zhang, K., Wong, H. N., Song, B., Miller, C. N., Scheuner, D., and Kaufman, R. J. (2005), 'The unfolded protein response sensor IRE1alpha is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis', *J Clin Invest*, 115 (2), 268-81.
- Zhang, K., Shen, X., Wu, J., Sakaki, K., Saunders, T., Rutkowski, D. T., . . . Kaufman, R. J. (2006b), 'Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response', *Cell*, 124 (3), 587-99.
- Zhao, F., Edwards, R., Dizon, D., Afrasiabi, K., Mastroianni, J. R., Geyfman, M., . . . Lipkin, S. M. (2010), 'Disruption of Paneth and goblet cell homeostasis and increased endoplasmic reticulum stress in *Agr2*^{-/-} mice', *Dev Biol*, 338 (2), 270-9.
- Zheng, W., Rosenstiel, P., Huse, K., Sina, C., Valentonyte, R., Mah, N., . . . Hampe, J. (2006), 'Evaluation of AGR2 and AGR3 as candidate genes for inflammatory bowel disease', *Genes Immun*, 7 (1), 11-8.
- Zhong, S., Goto, H., Inagaki, M., and Dong, Z. (2003), 'Phosphorylation at serine 28 and acetylation at lysine 9 of histone H3 induced by trichostatin A', *Oncogene*, 22 (34), 5291-7.
- Zhong, X., Wang, T., Zhang, X., and Li, W. (2010), 'Heat shock protein 70 is upregulated in the intestine of intrauterine growth retardation piglets', *Cell Stress Chaperones*, 15 (3), 335-42.
- Zhou, W., Bercury, K., Cumiskey, J., Luong, N., Lebin, J., and Freed, C. R. (2011), 'Phenylbutyrate up-regulates the DJ-1 protein and protects neurons in cell culture and in animal models of Parkinson disease', *J Biol Chem*, 286 (17), 14941-51.

Thèse de Doctorat

Axel DÉ SIR-VIGNÉ

Rôle du stress du réticulum endoplasmique dans les altérations de la barrière épithéliale colique induites par un retard de croissance intra-utérin chez le rat.

Role of the endoplasmic reticulum stress in the alterations of the epithelial colonic barrier induced by intrauterine growth retardation in rats

Résumé

Selon la théorie des origines développementales de la santé et des maladies (DOHaD), une perturbation de l'environnement nutritionnel pendant des périodes critiques de développement peut altérer le fonctionnement de différents organes et conditionner la survenue de pathologies chroniques à l'âge adulte. Les mécanismes moléculaires impliqueraient des régulations épigénétiques de l'expression de gènes jouant un rôle clé dans la plasticité tissulaire. Dans le cas du retard de croissance intra-utérin (RCIU), une réduction des apports nutritionnels placentaires augmente le risque de développer des maladies métaboliques à l'âge adulte, mais également des pathologies digestives. L'objectif de cette thèse était de déterminer l'impact d'un RCIU, obtenu par une dénutrition protéique de rates gestantes, sur la barrière épithéliale colique (BEC). Nous montrons qu'un RCIU induit, à l'âge adulte, une diminution de l'utilisation du butyrate et des altérations de la BEC (augmentation de la perméabilité, diminution de la prolifération cellulaire et du nombre de cellules à mucus) associée à une augmentation des activités histone desacetylases (HDAC) et une perte d'acétylation des histones. Les rats nés avec un RCIU ont une susceptibilité accrue à la colite et à la carcinogénèse. Nous démontrons qu'un stress du réticulum endoplasmique (RE) dans la BEC contribue aux anomalies épigénétiques. Enfin, nous proposons qu'un traitement périnatal par une combinaison de phénylbutyrate et de glutamine, visant à réduire le stress du RE, puisse améliorer les altérations de la BEC chez des individus nés avec un RCIU.

Mots clé

DOHaD • Programmation fœtale • Retard de croissance intra-utérin • Colon • Épigénétique • Stress du réticulum endoplasmique • Butyrate • Pathologies coliques.

Abstract

According to the theory of the developmental origins of health and diseases (DOHaD), a poor nutritional environment during critical periods of development can alter the function of different organs favoring the occurrence of chronic pathologies in adulthood. Molecular mechanisms could involve epigenetic regulation of the expression of genes playing a key role in tissue plasticity. In the case of intrauterine growth retardation (IUGR), a reduction in placental nutrient intake increases the risk of developing metabolic diseases in adulthood, including digestive pathologies. The objective of this thesis was to determine the impact of an IUGR, obtained by protein undernutrition of pregnant rats, on the colonic epithelial barrier (CEB). We show that IUGR induces in adulthood, a decrease in butyrate utilization and BEC alterations (increased permeability, decreased cell proliferation and of Goblet cell number) associated with an increased histone deacetylase (HDAC) activity and a loss of histone acetylation. Rats born with IUGR have an increased susceptibility to experimental colitis and carcinogenesis. Interestingly, we demonstrate the presence of an endoplasmic reticulum (ER) stress in CEB that contributes to these epigenetic abnormalities. Finally, we propose that perinatal treatment with a combination of phenylbutyrate and glutamine in order to reduce ER stress could improve CEB alterations in individuals born with IUGR.

Key Words

DOHaD • Fetal programming • Intrauterine growth retardation • Colon • Epigenetics • Endoplasmic reticulum stress • Butyrate • Colonic pathologies.