



Université de Montréal

**Rôles et régulation des enzymes antioxydantes  
paraoxonases au niveau intestinal et implication dans les  
maladies inflammatoires de l'intestin**

par

Louis-Philippe Précourt

Département de nutrition

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de doctorat  
en nutrition

Février 2011

© Louis-Philippe Précourt, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Rôles et régulation des enzymes antioxydantes paraoxonases au niveau intestinal et  
implication dans les maladies inflammatoires de l'intestin

Présentée par :  
Louis-Philippe Précourt

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Dominique Garrel, président-rapporteur  
Dr Emile Levy, directeur de recherche  
Dre May Faraj, membre du jury  
Dr Abdelouahed Khalil, examinateur externe  
Dre Christiane Malo, représentante du doyen de la FES

## Résumé

Le stress oxydant joue un rôle majeur dans le développement et l'évolution des maladies inflammatoires de l'intestin. Le corps humain est doté d'une panoplie d'enzymes antioxydantes ayant pour fonction de protéger l'intégrité cellulaire. De nouvelles enzymes au fort potentiel antioxydant, les paraoxonases (PON) 1, 2 et 3, ont récemment été identifiées tout au long du tube digestif, mais leurs rôles y restent inconnus. Les cellules intestinales Caco-2/15, qui ont la capacité de se différencier et d'acquérir les caractéristiques physiologiques de l'intestin grêle, ont été utilisées dans le présent travail pour étudier la régulation des PON. Les cellules ont été traitées avec différents effecteurs physiologiques (cytokines, LPS, stress oxydant) et pharmacologiques (fibrates, thiazolidinédiones) et l'expression des leurs gènes et protéines a été évaluée. Les résultats ont mis en lumière la modulation distincte de l'expression des PON par le stress oxydant et l'inflammation. Ceci suggère que chaque PON peut jouer un rôle différent au niveau intestinal et être impliquée dans le maintien de l'homéostasie. La régulation de l'expression des PON a également été largement explorée dans un article de revue. Pour définir le rôle de PON2, celle-ci étant potentiellement la plus importante pour l'homéostasie intestinale, les cellules Caco-2/15 ont été infectées à l'aide de lentivirus contenant des ARN d'interférence, ce qui a fortement réduit l'expression de PON2. En l'absence de PON2, les cellules Caco-2/15 étaient plus susceptibles face à un stress oxydant, la réponse inflammatoire était exacerbée et la perméabilité cellulaire paraissait altérée. Toutes ces composantes sont majeures dans le développement des maladies inflammatoires de l'intestin chez l'humain. De plus, des cellules Caco-2/15 de la PON2, ce qui a renforcé la force de la défense antioxydante cellulaire. Les résultats suggèrent que les PON jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale et pourraient être impliquées dans l'étiologie et la pathogenèse des maladies inflammatoires de l'intestin.

**Mots-clés** : paraoxonase, intestin, régulation, inflammation, stress oxydant, peroxydation lipidique, invalidation par lentivirus

## **Abstract**

Oxidative stress is a major part of the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD). The endogenous antioxidative defence is formed of multiple enzymes that have to protect cellular integrity. Paraoxonases (PON1, 2 and 3) are antioxidant enzymes that have recently been identified throughout the digestive tract, but their roles remain unclear in the intestine. Intestinal Caco-2/15 cells, which have the capacity to differentiate and exhibit the functionality of the small intestine, were used to study PON's regulation. Cells were treated with various physiological effectors (cytokines, lipopolysaccharides, oxidative stress) and pharmacological molecules (fibrates, thiazolidinediones) and gene and protein expression were determined. Results obtained showed that PONs are distinctly modulated especially by inflammation and oxidative stress and suggests that they could play different roles in the maintenance of intestinal homeostasis. PONs regulation has also been the main topic of a review article. Our results and the literature pointed to PON2 as the most important PON for intestinal health. To better define PON2 functions in the intestine, PON2 expression was knocked-down using lentiviral infection and plasmids containing anti-PON2 shRNA. In the relative absence of PON2, Caco-2/15 cells were more susceptible towards induction of oxidative stress, the inflammatory response was exacerbated and cell permeability seemed altered. All of these components are major players involved in the development of human IBD. Moreover, Caco-2/15 cells were treated with purified PON2, which increased their antioxidative defence. All of these results suggest that PONs are implicated in the antioxidative and anti-inflammatory response in intestinal epithelial cells and makes them potentially important players for the aetiology and pathogenesis of IBD.

**Keywords** : paraoxonase, intestine, regulation, inflammation, oxidative stress, lipid peroxidation, lentiviral knockdown

## Table des matières

Liste des tableaux .....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations .....	viii
Remerciements .....	xii
I-Introduction .....	1
1. Rôles de l'intestin.....	2
2. Problématique de recherche .....	5
2.1. Les maladies inflammatoires de l'intestin.....	5
2.2 Importance des maladies inflammatoires de l'intestin au Canada .....	6
2.3. Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin .....	9
2.4. Importance des maladies inflammatoires de l'intestin en pédiatrie .....	11
3. Principaux facteurs de risque des maladies inflammatoires de l'intestin .....	12
3.1. Facteurs de risque environnementaux .....	13
3.2. Principaux gènes de susceptibilité .....	15
3.3. La nutrition comme facteur de risque des MII.....	17
3.4. La nutrition comme traitement des MII .....	17
4. Le stress oxydant.....	20
4.1. La défense antioxydante endogène .....	20
4.2. Régulation de la défense antioxydante.....	24
4.3. Implication du stress oxydant dans les MII.....	27
4.4. Stress oxydant et inflammation .....	32
5. Les paraoxonases .....	34
5.1. PON1 .....	35
5.2. PON2.....	49
5.3. PON3 .....	54
5.4. Polymorphismes des paraoxonases .....	59
5.4.1. Polymorphismes de PON1 .....	59

5.4.2. Polymorphismes de PON2 et PON3 .....	63
6. Régulation de l'expression des paraoxonases .....	64
6.1. Régulation de PON1 .....	65
6.1.1. Habitudes de vie et alimentation .....	65
6.1.2. Inflammation .....	74
6.1.3. Stress oxydant .....	77
6.1.4. Stress oxydant et inflammation dans diverses pathologies .....	78
6.1.5. Régulation pharmacologique .....	79
6.2. Régulation de PON2 .....	87
6.2.1. Inflammation et stress oxydant .....	88
6.2.2. Nutrition et pharmacologie .....	91
6.3. Régulation de PON3 .....	93
6.3.1. Inflammation et stress oxydant .....	93
7. Connaissances sur les paraoxonases et l'intestin .....	94
II-Projet de recherche .....	98
1. Hypothèse .....	100
2. Objectifs principaux .....	101
3. Méthodologie .....	102
3.1. Culture cellulaire .....	102
3.2. Vérification de l'intégrité cellulaire .....	104
3.3. Traitements cellulaires .....	105
3.4. Extraction d'ARN et analyse de l'expression protéique par RT-PCR .....	107
3.5. Immunobuvardage de type Western .....	110
3.6. Marqueurs de stress oxydant .....	112
3.7. Production et titrage des lentivirus .....	113
3.8. Invalidation de PON2 dans les cellules Caco-2/15 .....	116
3.9. Activité des enzymes antioxydantes endogènes .....	118
3.10. Analyses statistiques .....	119
4. Articles scientifiques .....	120

4.1. Article 1.....	121
4.1.1. Apport original et contribution des co-auteurs.....	121
4.2. Article 2.....	157
4.2.1. Apport original et contribution des co-auteurs.....	157
4.3. Article 3.....	197
4.3.1. Apport original et contribution des co-auteurs.....	197
4.4. Article 4.....	251
4.4.1. Apport original et contribution des co-auteurs.....	251
III-Discussion.....	324
IV-Bibliographie.....	354
Annexe I-Autres articles réalisés durant le doctorat.....	i
Annexe II-Liste des présentations.....	ii
Annexe III-Liste des bourses obtenues.....	vii



## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b> Incidence et prévalence des maladies inflammatoires de l'intestin.....	7
<b>Tableau II.</b> Incidence de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse au Canada en 2008.....	8
<b>Tableau III.</b> Amorces et conditions d'utilisation pour les réactions de PCR.....	109
<b>Tableau IV.</b> Anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type Western.....	111

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Facteurs environnementaux pouvant altérer le bon fonctionnement du tube digestif et le maintien de l'homéostasie intestinale.....	15
<b>Figure 2.</b> Cycle du GSH.....	22
<b>Figure 3.</b> Activation de Nrf2.....	25
<b>Figure 4.</b> Activation de NF- $\kappa$ B.....	33
<b>Figure 5.</b> Mécanisme d'action potentiel de PON1 pour l'hydrolyse de lipides oxydés.....	41
<b>Figure 6.</b> Actions multiples de PON1 pour la prévention de l'athérosclérose.....	48
<b>Figure 7.</b> Représentation d'un puits contenant un filtre poreux sur lequel les cellules Caco-2/15 sont déposées.....	104
<b>Figure 8.</b> Représentation d'un titrage de lentivirus à l'aide de dilutions sériées.....	115
<b>Figure 9.</b> Détermination de l'efficacité des constructions d'ARNi pour invalider l'expression de PON2.....	117

## Liste des abréviations

3-OC12-HSL	3-oxo-C12-homosérine lactone
5-ASA	5-aminosalicylate
8-OHdG	8-hydroxydéoxyguanosine
AHL	acyl-homosérines lactones
ADNc	ADN complémentaire
Apo A-I	apolipoprotéine A-I
Apo E	apolipoprotéine E
ARE	antioxydant response element
ARNi	ARN d'interférence
ARNm	ARN messenger
AhR	aryl hydrocarbon receptor
BHT	butylated hydroxytoluene
CAPE	caffeic acid phenethyl ester
CAT	catalase
CL-OH	hydroxyde de cholestéryl linoléate
CL-OOH	hydroperoxydes de cholestéryl linoléate
CRP	protéine C-réactive
DGAT1	diacylglycérol acyltransférase 1
DHC	dihydrocoumarin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
Fe/Asc	fer/ascorbate
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfide ou oxydé
G-Px	glutathion peroxydase
G-Réd	glutathion réductase
GAPDH	glyceraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène

HDL	lipoprotéines de haute densité
IFN- $\gamma$	interféron- $\gamma$
IL	interleukine
LCAT	lécithine cholestérol acyltransférase
LDL	lipoprotéines de faible densité
L-OH	hydroxyde d'acide linoléique
L-OOH	hydroperoxyde d'acide linoléique
LPS	lipopolysaccharides
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MDA	malondialdéhyde
MEM	minimal essential medium
MII	maladies inflammatoires de l'intestin
(O <sub>2</sub> <sup>-•</sup> )	Anion superoxyde
oxLDL	LDL oxydé
Ox-PAPC	1-palmitoyl-2-arachidonoyl- <i>sn</i> -phosphatidylcholine oxydé
PON	paraoxonases
PON1 <sup>-/-</sup>	souris invalidées pour PON1
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
PGC1 $\alpha$ et PGC1 $\beta$	PPAR $\gamma$ coactivator 1 $\alpha$ et $\beta$
ROS	radicaux libres
RE	réticulum endoplasmique
SAA	sérum amyloïde A
SOD	superoxydes dismutases
SOD-1	Cu/Zn-SOD
SOD-2	Mn-SOD
SOD-3	Cu/Zn-SOD extracellulaire
SVF	sérum de veau foetal
TAC	capacité antioxydante totale
TBA	acide thiobarbiturique

TBBL	thiobutyl butyrolactone
TLR	récepteurs Toll-like
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
uPA	activateur de plasminogène urokinase

*À Maude...*

## Remerciements

Je travaille maintenant sur les maladies inflammatoires de l'intestin depuis de nombreuses années. Durant ma maîtrise en microbiologie appliquée à l'Institut Armand-Frappier, j'ai pu étudier l'importance de la flore intestinale dans le développement de ces maladies, et évaluer le potentiel des probiotiques comme traitement. Pour mes travaux de doctorat, je me sens privilégié d'avoir eu la chance de me joindre à un laboratoire de grande qualité, dans une institution centenaire, et d'avoir été dirigé par un chercheur de renommée internationale. J'ai pu pousser plus loin mes connaissances sur les maladies inflammatoires de l'intestin, en étudiant l'implication potentielle du stress oxydant et plus particulièrement des enzymes antioxydantes paraoxonases dans ces pathologies.

Mon passage au sein de l'équipe du Dr Levy m'a permis de côtoyer une multitude d'individus fantastiques, ce qui a grandement facilité mon travail. Je remercie tous les gens avec qui j'ai eu la chance d'échanger des connaissances (et parfois des confidences!) et qui m'ont permis de devenir le jeune chercheur que je suis aujourd'hui. Merci Thierry, Rame, Élodie, Émilie, Geneviève M., les deux Alain, Michel... Un merci particulier à Carole et Danielle, votre présence réconfortante et votre aide a été précieuse. Merci Zola, pour ton travail acharné. Et finalement, merci Dr Levy pour votre support, votre compréhension et votre dévouement sans borne à la recherche et au bien-être des petits enfants.

Le long parcours que représente un doctorat ne permet pas seulement de se développer intellectuellement et d'acquérir des connaissances. François, Geneviève, nous avons eu la

chance de nous rencontrer et de développer une amitié solide et durable. Un de mes plus grands bonheurs aura été de vous côtoyer quotidiennement au laboratoire...

L'appui inconditionnel de mes parents, de mes frères et sœurs est inestimable... Vous ne vous en êtes peut-être même pas rendus compte, mais votre seule présence me fait un bien immense...

Durant ce long parcours, la vie change... Je sors grandi de mes études doctorales, et deux bébés en plus... Malgré, les heures de sommeil en moins, Juliette, Alice, je vous remercie tout simplement d'être là... Maude, tu es le pilier de ma vie... Je ne peux me passer de ta présence à mes côtés, de ton support, de ton écoute, de ta compréhension... Jamais je n'aurais pu réussir sans toi... Mon amour pour vous en incommensurable... Ma famille...



## **I-Introduction**

## 1. Rôles de l'intestin

Le tube digestif est un système complexe composé de différents organes ayant tous des rôles importants à jouer dans la digestion et l'absorption des nutriments. Le travail commence dès l'entrée des aliments dans la bouche, et l'estomac est responsable en grande partie de la digestion des aliments par son action mécanique et enzymatique. La digestion se poursuit ensuite au niveau intestinal et l'absorption des nutriments se déroule principalement dans le jéjunum. Le côlon est principalement responsable de l'absorption de l'eau et des sels minéraux<sup>1</sup>. Il s'agit aussi du site où la concentration de bactéries résidentes de la flore intestinale est la plus importante. Les bactéries peuvent permettre la fermentation de substances non digérées et entraîner la formation de nutriments essentiels comme la vitamine K<sup>2</sup> et les acides gras à chaînes courtes, qui sont le carburant de choix des colonocytes<sup>3</sup>.

Le tube digestif, et particulièrement l'intestin, a longtemps été perçu comme un simple site de transit des aliments dans lequel les nutriments étaient absorbés de manière passive. Il a depuis été bien démontré que l'homéostasie intestinale doit être maintenue, car le dérèglement des processus absorbatifs, un surplus de stress oxydant ou des phénomènes inflammatoires incontrôlés peuvent avoir des conséquences sérieuses au niveau intestinal tout en exerçant une influence sur différentes pathologies dans le corps en entier.

L'intestin est une plaque tournante pour la santé du corps en entier. L'impact d'un dysfonctionnement intestinal sur des problèmes de santé situés dans des sites extra-

intestinaux a été particulièrement bien démontré. À titre d'exemple, il est possible de souligner le transport du cholestérol. Il est maintenant connu que le cholestérol ne traverse pas la bordure en brosse de l'entérocyte de manière passive, mais dépend plutôt d'un grand nombre de transporteurs<sup>4</sup>, dont le plus important serait le Niemann Pick C1-Like 1<sup>5, 6</sup>. Il est important de mentionner également l'absorption des lipides alimentaires, qui est aussi un processus très complexe et étroitement régulé au niveau intestinal. Le dysfonctionnement d'une seule composante peut avoir des conséquences importantes : des mutations des gènes de la «microsomal transfer protein», de l'apolipoprotéine B-48 ou de la Sar 1 GTPase entraînent respectivement l'abétalipoprotéïnémie, l'hypobétalipoprotéïnémie et la rétention des chylomicrons<sup>7</sup>, toutes caractérisées par une malabsorption sévère des lipides<sup>8</sup>. Une malabsorption des graisses entraîne la déficience de nombreux nutriments cruciaux pour l'organisme, tels que les acides gras essentiels et les vitamines liposolubles, ayant de graves répercussions sur les fonctions de nombreux organes comme le système neurologique, de même que des conséquences sur la croissance et la densité osseuse<sup>9</sup>.

Un état pathologique extra-intestinal peut aussi contribuer au dysfonctionnement de l'intestin. Par exemple, une glycémie élevée peut entraîner une modulation de l'expression de protéines impliquées dans le transport du cholestérol, ce qui pourrait contribuer à l'hyperlipidémie souvent retrouvée chez les patients atteints de diabète de type 2<sup>10, 11</sup>.

L'intestin est aussi un organe très actif sur le plan immunitaire. En effet, il s'agit de l'organe qui contient la plus grande quantité de cellules immunitaires<sup>12</sup>, localisées principalement dans différents tissus lymphoïdes, comme les plaques de Peyer, les ganglions mésentériques, mais aussi sous forme de lymphocytes dispersés tout au long de l'intestin<sup>13, 14</sup>. Sur le plan immunitaire, la fonction la plus importante de l'intestin est de distinguer les antigènes d'origine alimentaire ou de la flore bactérienne, envers lesquels une tolérance doit être développée ou une réponse inflammatoire déclenchée<sup>13, 14</sup>. Une réponse inflammatoire amplifiée ou inappropriée face à tous ces antigènes peut entraîner d'importants problèmes de santé, comme c'est le cas des maladies inflammatoires de l'intestin (MII). Un état d'inflammation incontrôlée dans l'intestin peut aussi avoir des conséquences extra-intestinales, car il a été démontré que les individus souffrant de MII sont plus à risque de développer de l'athérosclérose de manière précoce<sup>15</sup> et pourraient être plus à risques de développer certains cancers<sup>16</sup>.

L'intestin est définitivement plus qu'un organe de transition dans lequel des aliments circulent et diffusent passivement. La complexité des mécanismes de l'absorption des lipides et de sa régulation le démontre bien. L'intestin est aussi très important au niveau du contrôle de l'immunité et le moindre dysfonctionnement peut considérablement affecter les sites locaux et extra-intestinaux. Parmi les pathologies les plus graves affectant le tractus gastro-intestinal et entretenant un mauvais fonctionnement du tube digestif et une perte d'homéostasie intestinale s'inscrivent sans contredit les MII.

## **2. Problématique de recherche**

### **2.1. Les maladies inflammatoires de l'intestin**

L'expression « maladies inflammatoires de l'intestin » fait particulièrement référence à deux pathologies, soit la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. La maladie de Crohn est un désordre inflammatoire chronique qui peut survenir à n'importe quelle partie du tube digestif, de la bouche à l'anus. Les lésions inflammatoires sont discontinues et peuvent traverser la totalité de la paroi intestinale. Les personnes atteintes souffrent de symptômes variés, les plus fréquents étant des douleurs abdominales, de la diarrhée souvent sanguinolente, la malabsorption et la perte de poids. Des complications nécessitant la chirurgie peuvent parfois se produire, comme la formation de fistules, d'abcès ou de perforations. Un individu atteint de la maladie de Crohn ne souffre pas continuellement de ces symptômes. Des rechutes se manifestent à intervalles plus ou moins éloignés, séparés par des périodes de rémission<sup>17, 18</sup>. La colite ulcéreuse diffère de la maladie de Crohn en raison de deux caractéristiques particulières : elle n'atteint que le côlon, se manifestant généralement au niveau du rectum, et les lésions sont continues et n'atteignent que la muqueuse épithéliale, la couche superficielle de l'intestin. L'irritation de la muqueuse inflammée par la nourriture ingérée peut facilement entraîner des saignements. La colite ulcéreuse se déclare elle aussi de manière épisodique, avec des périodes de rémission entre chaque poussée inflammatoire. Les symptômes de la colite ulcéreuse sont très similaires à ceux de la maladie de Crohn et pour cette raison, environ 10% des cas de MII demeurent difficiles à catégoriser clairement et sont plutôt classés comme colites indéterminées<sup>17, 18</sup>.

Les MII sont présentes dans le monde entier, mais sont beaucoup plus importantes dans les zones industrialisées et dans les régions nordiques<sup>19</sup>. D'ailleurs, le Canada possède l'une des incidences de MII les plus élevées dans le monde<sup>20</sup>.

## **2.2 Importance des maladies inflammatoires de l'intestin au Canada**

Il y a plus de 200 000 canadiens qui sont atteints d'une MII (voir Tableau I, page 7). Près de 10 000 nouveaux cas de MII sont diagnostiqués à chaque année au pays et la prévalence approchant les 0,6% de la population se classe parmi les plus élevées du monde<sup>21</sup>. Le problème est aussi présent au Québec où l'on enregistre près de 50 000 personnes atteintes de l'une ou l'autre forme de MII dans la province (voir Tableau II, page 8). La fréquence élevée de l'occurrence des maladies inflammatoires de l'intestin dans les régions nordiques et industrialisées s'explique potentiellement par la théorie de l'hygiène, la déficience en vitamine D et les déterminants génétiques (voir section 3).

Les individus souffrant d'une MII ont une qualité de vie pouvant être grandement diminuée en fonction de la gravité et nécessitent un support médical adéquat. Ils sont aussi plus à risque de développer un cancer colorectal et d'autres maladies comme l'athérosclérose<sup>15</sup>, et le risque de mort prématurée est plus élevé<sup>21</sup>. Les MII ont des conséquences sérieuses sur la santé des patients et entraînent des coûts importants pour le système de santé.

Localisation	Maladie de Crohn		Colite ulcéreuse	
	Incidence par 100 000	Prévalence par 100 000	Incidence par 100 000	Prévalence par 100 000
Europe <sup>20</sup>	1,6 – 11,6	27 - 48	6,3 – 15,1	58 - 157
Europe du nord <sup>22</sup>	7,0	jusqu'à 214	11,8	jusqu'à 243
Europe du sud <sup>22</sup>	3,9	n/d	8,7	n/d
Régions du Sud <sup>20, 23</sup>	<1,0 – 4,2	n/d	<1,0 – 6,0	n/d
Minnesota <sup>24</sup>	7,9	174	8,6	214
Canterbury, Nouvelle-Zélande <sup>25</sup>	16,5	155	7,6	145
Canada <sup>20</sup>	16,3	338	12,9	267

**Tableau I.** Incidence et prévalence des maladies inflammatoires de l'intestin. Les maladies inflammatoires de l'intestin sont en général plus présentes dans les régions nordiques que dans les régions du sud. Comme la Nouvelle-Zélande, le Canada, présente une incidence et une prévalence parmi les plus élevées.

Adapté de <sup>21</sup>.

Province	Nombre de cas		
	Maladie de Crohn	Colite ulcéreuse	Total
Terre-Neuve	1,808	1,381	3,188
Île-du-Prince-Édouard	495	378	873
Nouvelle-Écosse	3,324	2,539	5,863
Nouveau-Brunswick	2,669	2,038	4,708
Québec	27,466	20,973	48,439
Ontario	45,660	34,864	80,524
Manitoba	4,244	3,240	7,484
Saskatchewan	3,588	2,740	6,329
Alberta	12,421	9,484	21,904
Colombie-Britannique	10,201	10,648	20,849
Territoires	373	285	658
Canada	112,249	88,570	200,819

**Tableau II.** Incidence de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse au Canada en 2008.

Les maladies inflammatoires de l'intestin sont un problème de santé de grande importance au Canada. La province de Québec ne fait pas exception, puisqu'elle possède près de 50 000 cas, soit le deuxième plus haut total après l'Ontario. En fait, les cas québécois représentent près de 25% de l'ensemble des cas du pays.

Adapté de <sup>21</sup>.



Au Canada, l'évaluation des coûts associés aux MII en 2008 s'élevait à 1,8 milliards de dollars, soit plus de 9000 dollars pour chaque individu atteint. Les patients souffrant de MII ont besoin d'un suivi médical important, incluant des visites régulières chez le gastroentérologue, et des hospitalisations sont souvent nécessaires lors des périodes de rechute. L'utilisation des nombreux médicaments est aussi très coûteuse. Ce sont cependant les frais indirects qui sont les plus coûteux. La perte de productivité des individus atteints de même que les absences du travail représentent un lourd fardeau pour la société<sup>21</sup>. L'ensemble de ces raisons justifie la recherche intensive de nouvelles molécules pour réduire et contrôler les symptômes des MII, de même que la recherche fondamentale pour mieux comprendre l'étiologie et la pathogenèse de ces maladies.

### **2.3. Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin**

Puisque les causes et les mécanismes de la maladie ne sont pas encore identifiés clairement, il n'y a pas de traitement pour guérir complètement la maladie de Crohn. Comparativement à la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse peut être guérie par l'ablation totale du côlon, puisque la maladie ne se déclare qu'en ce site anatomique. Cependant, il faut par la suite former une « poche » intestinale de manière à recueillir les matières fécales ou encore avoir recours à un sac externe. Il est malheureusement possible que cette poche s'inflamme à son tour et le patient souffre alors de pouchite.

Les interventions médicales réalisées chez les patients souffrant de MII visent donc d'abord à contrôler les symptômes et à maintenir la rémission le plus longtemps possible. Le médicament anti-inflammatoire le plus utilisé pour traiter les symptômes modérés de la maladie de Crohn et maintenir la rémission est le 5-aminosalicylate (5-ASA). Les corticostéroïdes et les immunosuppresseurs sont utilisés lorsque l'activité de la maladie est intense, mais leur utilisation est limitée puisqu'ils affectent le système immunitaire en entier entraînant de nombreux effets secondaires. L'usage de corticostéroïdes à long terme peut entre autres provoquer de l'ostéoporose et de l'hypertension artérielle<sup>17, 18, 26</sup>. Une nouvelle molécule est désormais disponible pour les cas sévères ou réfractaires aux thérapies conventionnelles. Il s'agit des agents anti-« tumor necrosis factor- $\alpha$  » (TNF- $\alpha$ ). Ils sont reconnus comme des agents pouvant induire et maintenir la rémission, réduire les hospitalisations et améliorer la qualité de vie des patients<sup>27</sup>. Ils sont par contre très coûteux et peuvent avoir des effets secondaires graves chez une faible proportion des individus, comme l'induction de lupus érythémateux<sup>28</sup>, de dermatite atopique<sup>29</sup> et même du cancer de la peau<sup>30</sup>.

Dans plusieurs cas, les symptômes sont difficiles à contrôler et la chirurgie devient l'approche privilégiée pour contrôler la maladie et tenter d'induire la rémission. Environ 40% des individus atteints de colite ulcéreuse subiront une chirurgie qui pourra guérir la maladie. Cependant, plus de 70% des patients atteints de la maladie de Crohn devront subir une chirurgie au cours de leur vie, et le tiers de ces personnes vivront tout de même d'autres périodes de rechute et devront possiblement subir d'autres interventions chirurgicales<sup>31</sup>.

Ces données démontrent encore une fois que beaucoup de travail reste à faire pour mieux comprendre ces maladies et en améliorer la prise en charge par les professionnels de la santé. La meilleure façon d'y parvenir est par l'augmentation des connaissances grâce à la recherche.

#### **2.4. Importance des maladies inflammatoires de l'intestin en pédiatrie**

Dans les MII, la majorité des gens sont diagnostiqués entre 15 et 25 ans ou 45 et 55 ans<sup>21</sup>. En 2008, le nombre de cas de MII pédiatriques au Canada était estimé à près de 5000, ce qui représente environ 2,5% du total des cas canadiens<sup>21</sup>. À l'hôpital Ste-Justine seulement, les gastroentérologues posent environ 60 nouveaux diagnostics de MII pédiatrique par année et l'incidence des années 2000 semble beaucoup plus importante que celle des années 80 (données internes, Dre Colette Deslandres). La qualité et le mode de vie des jeunes atteints de MII sont grandement affectés. Les adolescents seraient le groupe le plus grandement affecté par les MII sur le plan social et psychologique. La perte d'indépendance et d'autonomie, de même que la peur du jugement de leurs camarades seraient les aspects les plus difficiles à accepter sur le plan social<sup>32, 33</sup>. De plus, les différentes interventions médicales qu'ils doivent parfois subir peuvent ralentir leur progression dans le milieu scolaire<sup>32, 33</sup>.

Mis à part les aspects sociaux, les MII pédiatriques ont d'autres caractéristiques dont il faut tenir compte. En pleine période de croissance, une perte d'appétit ou des problèmes de

malabsorption dus à une MII peuvent avoir de graves conséquences. Plus du tiers des patients pédiatriques ont des déviations vers le bas de leur courbe staturale<sup>34</sup> et n'atteignent pas la taille adulte prédite<sup>35</sup>. Plus de 50% des enfants atteints de MII auront besoin de chirurgie, sans aucune garantie de guérison<sup>36, 37</sup>. Cependant, les nouveaux traitements comme les agents anti-TNF- $\alpha$  pourraient permettre d'augmenter l'efficacité de la prise en charge des patients pédiatriques pour repousser la chirurgie et augmenter leur qualité de vie<sup>38</sup>. La nutrition peut aussi jouer un rôle prépondérant dans le traitement des MII, et particulièrement pour les patients pédiatriques. En assurant un apport adéquat de macro- et micronutriments, certains problèmes secondaires aux MII comme l'ostéopénie et l'anémie peuvent ainsi être évitées<sup>36, 39</sup>.

### **3. Principaux facteurs de risque des maladies inflammatoires de l'intestin**

Les MII sont provoquées par une perte de l'homéostasie inflammatoire au niveau du tube digestif, causée par un ensemble de facteurs, parmi lesquels une réponse inappropriée du système immunitaire, une susceptibilité génétique et divers facteurs environnementaux<sup>40, 41</sup>. Le stress oxydant pourrait lui aussi avoir un rôle important à jouer dans l'étiologie et la pathogenèse des MII. Certaines théories avancent même que le stress oxydant pourrait être responsable de l'initiation des dommages, via un excès de radicaux libres ne pouvant être neutralisés<sup>42</sup>.

### 3.1. Facteurs de risque environnementaux

Les facteurs environnements sont d'une importance capitale pour le déclenchement des MII. En effet, les cas des MII sont en forte hausse depuis les années 1950, une période durant laquelle les habitudes de vie en milieu occidental ont aussi évolué très rapidement<sup>43</sup>. Les variations génétiques durant une période aussi courte sont cependant négligeables, alors il semblerait que les changements du mode de vie pourraient déclencher les MII chez les individus prédisposés génétiquement<sup>40, 44</sup>. Le corps humain n'aurait donc pas pu s'ajuster correctement à tous les changements de modes de vie des dernières décennies, et une perte d'homéostasie s'en suivrait, provoquant une rapide montée de divers problèmes de santé comme les MII<sup>45, 46</sup>. La «théorie de l'hygiène» est une des principales théories qui supporte les changements du mode de vie et leur impact sur l'augmentation des cas de diverses allergies et maladies autoimmunes<sup>47, 48</sup>.

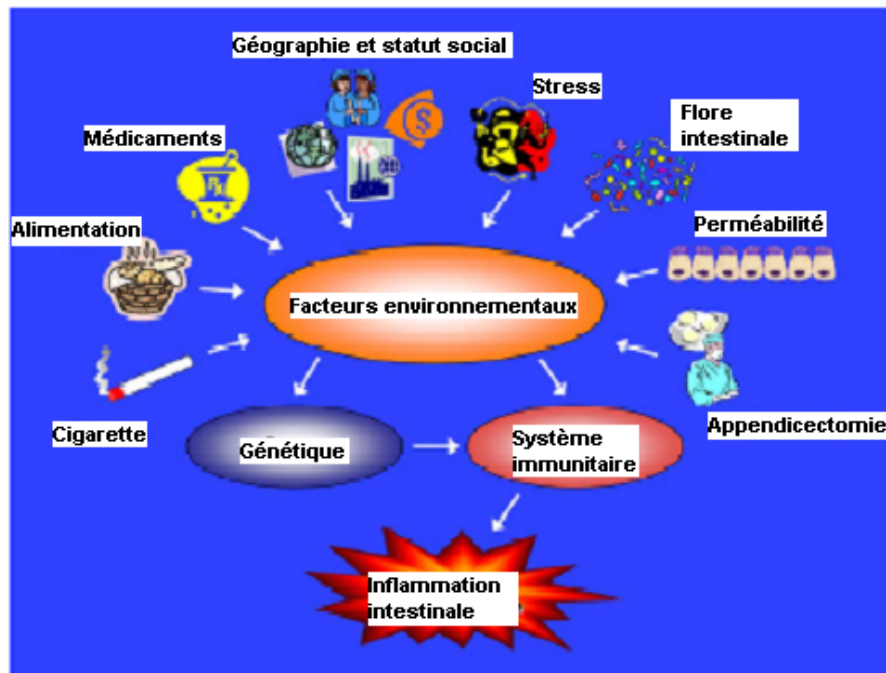
La théorie de l'hygiène affirme qu'une exposition réduite aux bactéries et à divers agents infectieux<sup>49, 50</sup>, une diminution de la taille des familles et donc des contacts entre frères et sœurs de même que des conditions d'hygiène très poussées du mode de vie à l'occidental ont mené à une augmentation de la prévalence des allergies et des maladies autoimmunes et atopiques<sup>47, 48</sup>. Cette diminution de contacts avec différents microorganismes semble reliée à un mauvais développement du système immunitaire ayant des répercussions systémiques sur le statut immunitaire de l'individu<sup>51</sup>. Les campagnes de vaccination, l'usage des antibiotiques, l'allaitement et la vie en milieu urbain sont tous des éléments considérés par la théorie de l'hygiène comme ayant un impact sur le développement de l'immunité<sup>52</sup>.

Supportant aussi les arguments en faveur de la théorie de l'hygiène et du mode de vie est l'observation du gradient nord-sud dans l'incidence et la prévalence des MII<sup>40</sup>. En effet, il a été observé, en Amérique du Nord et en Europe, que les cas de MII sont plus nombreux au nord<sup>40</sup>. Les cas sont aussi plus nombreux dans les pays nordiques que dans les pays chauds<sup>53</sup>. De plus, si une personne se déplace d'une zone non à risque et s'installe de manière permanente dans une zone à risque, elle augmente ses chances de développer une MII<sup>19</sup>, possiblement en raison d'un nouveau mode de vie et de divers facteurs retrouvés dans son nouvel environnement. La déficience en vitamine D fréquente dans les pays nordiques a cependant aussi été récemment incriminée comme un facteur pouvant contribuer au déclenchement des MII et expliquer partiellement le gradient nord-sud observé<sup>53</sup>.

L'environnement, le mode de vie, la nutrition et le système immunitaire de l'hôte sont des facteurs qui affectent grandement la composition de la flore intestinale<sup>54, 55</sup>. La présence de certaines bactéries dans la flore intestinale semble augmenter les risques de développer une MII, comme certaines souches d'*Escherichia coli* ou de *Bacteroides vulgatus*, alors que les lactobacilles et les bifidobactéries seraient plutôt bénéfiques et sont largement utilisées comme probiotiques<sup>54, 55</sup>.

D'autres facteurs environnementaux sont largement reconnus comme ayant un impact sur l'évolution des MII. Par exemple, il a été démontré que fumer la cigarette est protecteur

dans la colite ulcéreuse, mais délétère dans la maladie de Crohn<sup>45</sup>. L'appendicectomie est aussi reconnue comme étant protectrice dans la colite ulcéreuse<sup>43</sup>.



**Figure 1.** Facteurs environnementaux pouvant altérer le bon fonctionnement du tube digestif et le maintien de l'homéostasie intestinale. L'action combinée de ces différents facteurs environnementaux chez des individus génétiquement susceptibles peut provoquer une inflammation chronique et non contrôlée menant aux maladies inflammatoires de l'intestin (Adaptée de<sup>40</sup>, Danese, S., *et al.*, 2004).

### 3.2. Principaux gènes de susceptibilité

La génétique joue un rôle crucial dans le développement d'une MII. L'étude des jumeaux monozygotiques le prouve bien, car lorsqu'un jumeau développe la maladie de Crohn, il y a

50% de chance que le second jumeau la contracte à son tour<sup>56</sup>. Le taux de concordance est de près de 20% pour la colite ulcéreuse<sup>56</sup>. Ces statistiques démontrent clairement la prépondérance de la susceptibilité génétique, mais aussi l'implication des facteurs environnementaux pour l'induction des MII. Les gènes impliqués dans le développement d'une MII sont difficiles à identifier car ce sont des maladies complexes en lien étroit avec l'environnement<sup>57</sup>.

De nombreuses études associatives ont permis d'identifier des polymorphismes et des mutations génétiques pouvant augmenter le risque de développer les MII. Par exemple, des polymorphismes des gènes codant pour les récepteurs Toll-like (TLR) et la protéine NOD2, responsables de la surveillance des bactéries dans l'intestin, sont présents chez une plus grande proportion de patients comparativement aux contrôles<sup>58, 59</sup>. Les polymorphismes du gène du récepteur de la cytokine interleukine (IL)-23 ont aussi été récemment liés au développement des MII<sup>60</sup>. L'axe IL-23/Th17 s'inscrit également dans le maintien de l'équilibre entre la tolérance et le déclenchement d'une réaction immunitaire<sup>61</sup>. En fin de compte, les quelques gènes de susceptibilité présentés sont responsables de la surveillance de la microflore intestinale et des antigènes d'origine alimentaire pour favoriser l'homéostasie intestinale. Un dysfonctionnement de tels gènes peut entraîner une réponse inflammatoire inappropriée. L'implication de la composante génétique dans l'étiologie des MII est indéniable et de nouveaux gènes potentiellement en lien avec les MII sont de plus en plus identifiés.



### **3.3. La nutrition comme facteur de risque des MII**

Le rôle premier du tube digestif est d'abord de digérer et d'absorber les nutriments, pour ensuite évacuer les déchets. Il est donc tout à fait naturel que différents aliments aient été incriminés comme facteur de risque des MII. Cependant, il est difficile de démontrer clairement le rôle que peut jouer un nutriment en particulier et les données sur l'implication des aliments dans les MII sont peu convaincantes<sup>40</sup>. La consommation élevée de sucre raffiné semble liée au développement de la maladie de Crohn<sup>62</sup> alors que la consommation de gras semble liée à la colite ulcéreuse<sup>63</sup>. Dans une cohorte japonaise, une plus grande consommation d'acides gras polyinsaturés n-6 semblait liée à la maladie de Crohn<sup>64</sup>. La consommation de fruits et de légumes, de même qu'une plus grande ingestion de fibres, semblait quant à elles réduire le risque de développer une MII<sup>63</sup>. Il est par contre difficile d'évaluer avec précision l'alimentation des participants aux différentes études et le nombre d'individus sondés est souvent faible<sup>65</sup>. En raison de ces limites, il est difficile d'incriminer hors de tout doute certains aliments dans le développement des MII, même si certaines associations ont été démontrées<sup>66</sup>.

### **3.4. La nutrition comme traitement des MII**

Même si à l'heure actuelle, il est difficile de démontrer clairement l'implication d'un aliment particulier comme facteur de risque des MII, certaines interventions nutritionnelles se sont avérées très bénéfiques.

Par exemple, les acides gras polyinsaturés n-3 et n-6 sont réduits chez les patients atteints de maladie de Crohn<sup>67</sup>. Une plus forte consommation d'acides gras polyinsaturés n-6 chez les japonais, augmentant ainsi le ratio n-6/n-3 et favorisant la voie pro-inflammatoire des prostaglandines, semble liée à la maladie de Crohn<sup>64</sup>. Pour ces raisons, un supplément d'huile de poisson ou d'acides gras polyinsaturés n-3 peut s'avérer bénéfique dans les MII, puisqu'il facilite la production de prostaglandines et de leucotriènes anti-inflammatoires<sup>68</sup>,  
<sup>69</sup>.

Les patients atteints de MII souffrent aussi de malabsorption intestinale, ce qui peut entraîner des déficiences en plusieurs éléments importants. C'est souvent le cas pour les vitamines antioxydantes liposolubles A et E<sup>70</sup>, de même que pour la vitamine C<sup>71, 72</sup>. Les patients souffrant de MII peuvent donc voir leur apport en antioxydants exogènes réduit, ce qui affaiblit la défense antioxydante et facilite l'occurrence d'un stress oxydant et d'inflammation au niveau intestinal. D'ailleurs, des patients de Crohn supplémentés avec de la vitamine C et E connaissent une réduction du stress oxydant alors que le niveau de l'activité de la maladie demeure stable<sup>73</sup>.

L'anémie est une conséquence sérieuse et fréquente des MII, en raisons d'importantes pertes sanguines<sup>74</sup>. Il faut cependant faire attention aux suppléments de fer pour compenser les pertes. En effet, le fer peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène, selon la réaction de Fenton, et former ainsi le radical hydroxyle, qui est très dommageable. Il a d'ailleurs été

démontré que les suppléments de fer pris oralement pouvaient aggraver une MII. La voie parentérale pour l'apport du sucrose de fer serait plutôt à privilégier<sup>74</sup>.

La nutrition peut cependant apporter plus de bénéfices que la simple correction des carences. En effet, plusieurs nutriments ont des effets antioxydants puissants ou peuvent affecter l'expression génique de diverses protéines impliquées dans l'inflammation ou la défense antioxydante, ce qui pourrait s'avérer une alternative de choix pour améliorer le sort des patients pédiatriques souffrant de MII. Des éléments nutritionnels sont essentiels au bon fonctionnement de la défense antioxydante, comme le sélénium qui fait partie du site actif de l'enzyme glutathion peroxydase<sup>75</sup>. La consommation de certains polyphénols<sup>76, 77</sup> ou phytoestrogènes<sup>78</sup> pourrait même augmenter les défenses antioxydantes endogènes de l'organisme. Récemment, des essais fructueux ont été obtenus par la supplémentation en phytoestrogènes<sup>79, 80</sup> ou en polyphénols<sup>81-84</sup> dans des modèles animaux d'inflammation intestinale, mais ces résultats tardent à être vérifiés chez l'humain.

La fermentation des fibres ingérées au niveau du côlon produit du butyrate, un nutriment essentiel pour les colonocytes. Le métabolisme du butyrate pourrait être altéré dans les MII<sup>85, 86</sup> et des études ont été entreprises afin de vérifier si une supplémentation en butyrate pouvait faciliter la guérison. Il semblerait en effet que l'ajout de butyrate de sodium à un traitement à la mesalazine (5-ASA) favorise la guérison chez des patients atteints de colite ulcéreuse<sup>87</sup>.

Dans les MII, la flore intestinale est un des facteurs de risque clés. Il est possible de moduler cette flore par l'ingestion de bactéries probiotiques, des micro-organismes vivants et inoffensifs pouvant avoir des effets bénéfiques pour l'hôte<sup>88</sup>. La prise de probiotiques pourrait faciliter le soulagement des symptômes et le maintien de la rémission, particulièrement pour la pouchite<sup>89, 90</sup> et la colite ulcéreuse<sup>91, 92</sup>. Cependant, les études sont encore trop peu nombreuses pour en recommander l'utilisation à grande échelle<sup>93</sup>.

## **4. Le stress oxydant**

Le stress oxydant est un débalancement entre la génération de radicaux libres et la capacité du corps à détoxifier ces espèces réactives. La perte d'homéostasie dans la défense antioxydante peut entraîner de nombreux dommages, les radicaux libres pouvant réagir sur les lipides, les protéines et l'ADN. Par contre, le corps humain est doté d'une panoplie d'enzymes antioxydantes capables de contrôler les espèces réactives et prévenir les dommages.

### **4.1. La défense antioxydante endogène**

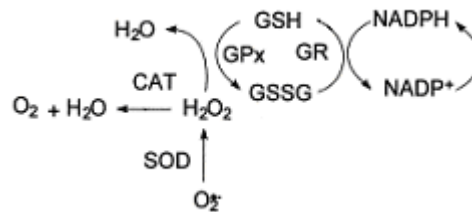
La première ligne de défense est représentée par les enzymes superoxydes dismutases (SOD), découvertes en 1969<sup>94</sup>. Elles sont responsables de la détoxification de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) en le convertissant en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et sont indispensables pour le maintien de la vie des organismes aérobies<sup>95</sup>. Il y a trois types de SOD : la Cu/Zn-SOD (SOD-1), localisée principalement dans le cytoplasme<sup>96</sup> et

responsable de près de 70% de l'activité SOD<sup>97</sup>; la Mn-SOD (SOD-2) est située exclusivement dans la mitochondrie et responsable d'environ 15% de l'activité SOD<sup>97</sup>; la Cu/Zn-SOD extracellulaire (SOD-3) est une forme sécrétée responsable de jusqu'à 15% de l'activité SOD<sup>97</sup>.

Les différentes SOD sont d'une importance capitale, mais produisent le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, une substance potentiellement nocive. Elles doivent donc fonctionner de concert avec une 2<sup>e</sup> ligne de défense représentée par les enzymes catalase (CAT) et glutathion peroxydase (G-Px). Elles sont toutes deux capables de convertir le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O. La CAT se retrouve principalement dans les peroxysomes<sup>98</sup> alors que la G-Px est principalement présente dans le cytoplasme<sup>98</sup>. Il existe de nombreux types d'enzymes G-Px, la forme prédominante dans les cellules épithéliales intestinales est la G-Px2<sup>99</sup>, et la plupart sont dépendantes du sélénium<sup>100</sup>. Les G-Px sont aussi les principales enzymes pouvant réagir avec les lipides peroxydés<sup>101</sup>.

Le glutathion (GSH), un tri-peptide, est une molécule très présente dans tous les types cellulaires et il est très impliqué dans la défense antioxydante endogène. Il est principalement reconnu pour son action dans le maintien de l'équilibre redox de la cellule en raison du groupement thiol (-SH) de la cystéine qui le compose, mais ses fonctions sont multiples<sup>102</sup>. Parmi les fonctions les plus importantes du GSH, il sert de cofacteur à la G-Px, pour la détoxification du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de certains lipides peroxydés<sup>103</sup>, ce qui génère par contre le glutathion disulfide ou oxydé (GSSG). Afin de maintenir des concentrations de

GSH adéquates, le GSSG est reconverti en GSH sous l'action de l'enzyme glutathion réductase (G-Réd), ce qui nécessite le NADPH comme cofacteur<sup>104</sup> (voir Figure 2, page 22). Le GSH peut aussi agir directement en tant que piègeur de radicaux libres, en inactivant entre autres le peroxydrite, le radical peroxy et le radical hydroxyl<sup>105, 106</sup>.



**Figure 2.** Cycle du GSH. Le GSH sert de cofacteur à la G-Px pour détoxifier le  $H_2O_2$ , ce qui forme du GSSG. Ce dernier est ensuite retransformé en GSH sous l'action de la G-Réd en présence de NADPH.

Signification des abréviations : CAT :catalase; GPx : glutathion peroxydase; GR : glutathion réductase; GSH : glutathion réduit; GSSG : glutathion disulfide; SOD : superoxyde dismutase. Figure adaptée de Schafer et Buettner, 2001<sup>107</sup>.

L'environnement redox d'une cellule affecte de nombreux processus biologiques, comme le repliement, la conformation et la dégradation des protéines<sup>108</sup>, la signalisation<sup>102</sup>, la prolifération/différenciation cellulaire<sup>109</sup> et l'apoptose<sup>110</sup>. L'environnement redox peut être considéré comme la capacité réductrice totale des différents couples redox à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule, et dans les différents compartiments cellulaires<sup>107</sup>. Le principal

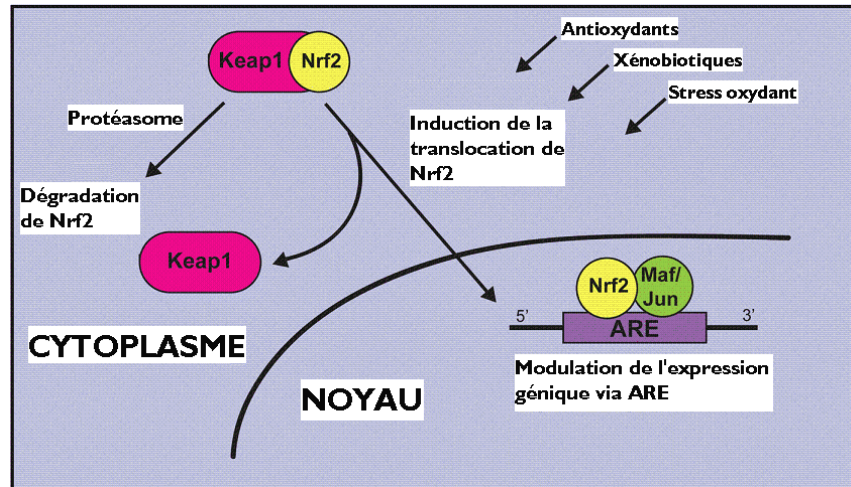
couple thiol/disulfide est celui du glutathion réduit/glutathion disulfide (GSH/GSSG)<sup>111</sup>, et il est souvent utilisé comme biomarqueur<sup>107</sup>.

Les SOD prennent en charge les anions superoxydes, mais produisent du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui doit à son tour être pris en charge par la CAT ou la G-Px. La disponibilité du GSH est cependant importante pour l'activité de la G-Px et le maintien de la cellule dans un état rédox approprié, qui repose à son tour sur l'activité de différentes enzymes, dont la G-Réd. Le système de défense antioxydante endogène doit donc répondre aux attaques radicalaires de manière coordonnée, de façon à maintenir l'équilibre oxydatif. En effet, chaque membre de la défense antioxydante a un rôle précis à jouer. La perte ou la surexpression d'un joueur et une perte de coordination dans la réponse peuvent avoir des conséquences pathologiques. Par exemple, la surexpression de la Cu/Zn-SOD intracellulaire, dont le gène est situé sur le 21<sup>e</sup> chromosome, semble associée au syndrome de Down<sup>112</sup>. La Mn-SOD, même si son activité ne représente qu'environ 15% de l'activité SOD totale<sup>97</sup>, est très importante en raison de sa localisation dans un site important de production d'O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, la mitochondrie. En effet, les souris invalidées pour la SOD-2 meurent moins de 10 jours après leur naissance en raison de complications multiples<sup>113</sup>. Les débalancements au niveau de la 2<sup>e</sup> ligne de défense peuvent être tout aussi dommageables, l'inactivation de la CAT augmentant les lésions au rein après induction de stress oxydant<sup>114</sup>, et l'inactivation de la G-Px4 provoquant l'infertilité chez la souris<sup>115</sup>.

## 4.2. Régulation de la défense antioxydante

L'expression des différents acteurs impliqués dans la défense antioxydante est un phénomène étroitement régulé. Des facteurs de transcription agissent comme gardiens du stress oxydant et contribuent à maintenir l'équilibre et à prévenir les dommages. Le facteur de transcription Nrf2 est un acteur majeur dans la régulation de la défense antioxydante de l'organisme, en grande partie via le contrôle des niveaux de GSH et du potentiel redox<sup>116-118</sup>. Il intervient dans la coordination de la réponse antioxydante, via sa liaison à des sites ARE (« antioxidant response element ») sur le promoteur des gènes cibles pour activer leur transcription<sup>116</sup>. À l'état basal, le Nrf2 est séquestré dans le cytosol par la protéine Keap-1. La translocation de Nrf2 vers le noyau, où il peut moduler la transcription génique, est induite classiquement en situation de stress oxydant, Nrf2 étant ainsi libéré de son inhibiteur Keap-1<sup>119, 120</sup> (voir Figure 3, page 25).





**Figure 3.** Activation de Nrf2. L'induction de la translocation de Nrf2 vers le noyau peut être induite par un stress oxydant. Nrf2 est alors libéré de son inhibiteur Keap1 et peut se lier dans le noyau aux séquences ARE des gènes cibles et induire leur transcription. Figure adaptée de Aleksunes et al., 2007<sup>116</sup>.

Parmi les cibles de Nrf2, plusieurs sont impliquées dans le métabolisme et l'homéostasie du GSH. La synthèse du GSH dépend des niveaux de cystéine disponibles ainsi que de l'activité des enzymes responsables de sa synthèse, la glutamate-cystéine ligase et la glutathion synthétase. Un échangeur assure l'entrée de cystéine dans la cellule, en faisant sortir un glutamate. Il s'agit du système x(-)(c), dont l'expression génique est régulée par l'activation de Nrf2<sup>121</sup>. De plus, l'expression génique des deux sous-unités de l'enzyme glutamate-cystéine ligase est modulée par Nrf2<sup>122</sup>. L'enzyme glutathion synthétase contient aussi des sites ARE dans son promoteur et son expression pourrait être modulée par Nrf2<sup>116</sup>.

L'enzyme G-Réd est modulée par Nrf2. En effet, les cellules pulmonaires des souris Nrf2<sup>-/-</sup> ont une expression réduite de la G-Réd suite à une exposition à la fumée de cigarette<sup>117</sup>. L'enzyme G-Px est aussi une cible de Nrf2. Dans les cellules Caco-2, l'expression génique de la G-Px est induite par la surexpression de Nrf2 et renversée par la surexpression de son inhibiteur Keap-1<sup>99</sup>. Des effets similaires ont été observés dans les cellules épithéliales pulmonaires, où l'inactivation de Keap-1 augmente l'expression génique de la G-Px, alors qu'elle est diminuée par l'inactivation du Nrf2<sup>123</sup>. Le Nrf2 pourrait aussi être impliqué dans la régulation de l'expression des SOD et de la CAT<sup>77</sup>.

Les facteurs de transcription « PPAR $\gamma$  coactivator 1  $\alpha$  et  $\beta$  » (PGC1 $\alpha$  et PGC1 $\beta$ ) sont aussi fortement surexprimés suite à un stress oxydant<sup>124</sup>. D'ailleurs, il a été démontré que les souris dont le gène codant pour PGC1 $\alpha$  avait été invalidé étaient beaucoup plus sensibles au stress oxydant<sup>124</sup>. De plus, l'expression de plusieurs enzymes antioxydantes endogènes, comme les SOD, la CAT et la G-Px, augmente parallèlement à l'expression des PGC1<sup>124-127</sup>.

Les différentes connaissances sur les facteurs de transcription Nrf2 et PGC1 démontrent leur importance pour ajuster la réponse antioxydante aux niveaux de stress oxydant en augmentant l'expression des enzymes antioxydantes endogènes. Ces facteurs de transcription ont un impact majeur sur le maintien de l'homéostasie de l'environnement redox de la cellule et la prévention des dommages.

Plusieurs substances d'origine nutritionnelle connues pour avoir des effets bénéfiques sur la santé, notamment au niveau du stress oxydant, semblent en mesure d'activer Nrf2<sup>128</sup>. L'épigallocatechine gallate, le principal polyphénol que l'on retrouve dans le thé vert, est un activateur puissant de Nrf2<sup>76, 77</sup>. La consommation de curcuma augmente l'accumulation de Nrf2 dans le noyau<sup>129</sup>, et le resvératrol, un polyphénol retrouvé dans les raisins et le vin, active aussi Nrf2<sup>130</sup>. Les phytoestrogènes comme la génistéine ou la dadzéine pourraient aussi activer Nrf2 et la défense antioxydante<sup>131-133</sup>, mais les données sont contradictoires<sup>134</sup>. L'exercice physique induit un stress oxydant léger, qui pourrait être responsable de l'activation des PGC1 et de la défense antioxydante<sup>126</sup>. Le resvératrol semble aussi pouvoir agir sur la défense antioxydante en augmentant l'activité de PGC1 $\alpha$ <sup>135</sup>. L'activation possible de Nrf2 ou des PGC1 par des molécules obtenues par l'alimentation ou par l'exercice physique semble avoir un impact important sur la régulation de la défense antioxydante et pourrait s'avérer bénéfique pour les patients atteints de MII.

### **4.3. Implication du stress oxydant dans les MII**

Le contrôle du stress oxydant est un facteur de risque important des MII. Le corps humain est doté d'une panoplie d'enzymes antioxydantes indispensables au bon fonctionnement de l'intestin et leur dysfonctionnement peut entraîner un déséquilibre de la balance oxydante/antioxydante. Cette perte d'équilibre pourrait être responsable au niveau intestinal de la mise en place d'une réaction inflammatoire incontrôlée. Le stress oxydant doit donc

être considéré comme un joueur clé de la pathogenèse des MII et possiblement de leur étiologie.

Les premiers indices solides suggérant que les agents pro-oxydants pouvaient provoquer une réaction inflammatoire au niveau intestinal ont été obtenus dans les années 1960. En effet, au 20<sup>e</sup> siècle, des lavements au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> étaient prescrits par les médecins pour faciliter l'évacuation des amas de matières fécales dures<sup>42</sup>. Cependant, ces lavements ont provoqué, chez certains patients prédisposés, des saignements intestinaux et même des colites<sup>136-138</sup>. Des concentrations élevées de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau intestinal, un agent pro-oxydant, semblent donc suffisantes pour causer des dommages et provoquer une réaction inflammatoire puissante similaire à celle retrouvée dans les MII.

Une démonstration élégante de l'importance du stress oxydant comme facteur étiologique dans les MII a été faite à l'aide de souris dont les gènes codant pour les G-Px1 et 2 avaient été invalidés. En effet, l'absence de ces deux formes de G-Px provoque au niveau intestinal des symptômes similaires à ceux observés dans les MII. Ces souris souffraient d'ulcérations péri-anales, de retard de croissance, d'inflammation de la muqueuse au niveau de l'iléum et du côlon, et la peroxydation lipidique était augmentée dans le côlon<sup>139</sup>.

Comme il a été mentionné précédemment, il est important que la réponse antioxydante soit coordonnée. Certaines observations suggèrent qu'un déséquilibre de la réponse antioxydante est présent chez les individus atteints de MII. En effet, la Mn-SOD semble

particulièrement induite dans les cellules épithéliales intestinales de patients atteints de maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse<sup>140</sup>. La surexpression des SOD n'est pas nécessairement bénéfique, même si les données sont contradictoires<sup>141</sup>, puisqu'elles génèrent par leur activité du peroxyde d'hydrogène qui peut induire des dommages ou la production d'autres espèces radicalaires s'il n'est pas pris en charge par la deuxième ligne de défense antioxydante<sup>142</sup>. C'est précisément la situation de déséquilibre qui a été observée chez les patients atteints de MII. Dans les cellules épithéliales intestinales prélevées chez des individus atteints de MII, l'augmentation des SOD ne semble pas jumelée avec l'augmentation de la CAT et de la G-Px, qui demeurent inchangées, créant ainsi cette perte d'équilibre de la réponse antioxydante, potentiellement impliquée dans la mise en place des dommages<sup>143</sup>. Cette perte d'équilibre pourrait donc possiblement être impliquée dans l'initiation et la perpétuation de la réaction inflammatoire incontrôlée retrouvée lors des périodes de rechute dans les MII<sup>140</sup>. Ceci est particulièrement vrai en présence d'un excès de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui n'est pas pris en charge par la deuxième ligne de défense, puisqu'il peut rapidement réagir pour former le très puissant et très dommageable radical hydroxyl<sup>144</sup>.

Différents acteurs de la défense antioxydante ont été évalués chez les patients atteints de MII. En tant que marqueur global du niveau de défense antioxydante de l'individu, des tests de capacité antioxydante totale (TAC) évaluant l'activité réductrice d'un fluide corporel ont été utilisés. Ces tests sont controversés et non-spécifiques, mais peuvent tout de même donner un aperçu de l'état de la défense antioxydante de patients atteints de MII en

comparaison à des contrôles sains. Dans la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, la TAC a été mesurée dans la salive et le sérum, et des diminutions significatives ont été observées, même chez des patients avec une maladie inactive<sup>145-147</sup>. Ces diminutions peuvent s'expliquer par la réduction de plusieurs antioxydants différents, qui a été observée dans les MII. En effet, la vitamine A<sup>148</sup>, la vitamine C<sup>72, 148, 149</sup>, la vitamine E<sup>149-151</sup> et la  $\beta$ -carotène<sup>148, 151, 152</sup> sont diminuées dans le sang des patients souffrant d'une MII. De plus, le sélénium, une composante essentielle au bon fonctionnement de la G-Px, est lui aussi diminué dans le sang chez les cas de maladie de Crohn<sup>72, 149, 153</sup>. Toutes ces données suggèrent donc une capacité antioxydante réduite chez les gens atteints d'une MII, non seulement en tant que conséquence de la réaction inflammatoire, mais aussi comme cause puisque la défense est souvent abaissée même chez les patients en rémission.

Plusieurs articles ont aussi étudié de nombreux marqueurs de stress oxydant chez les patients atteints de MII. Les marqueurs ont souvent été dosés indirectement, soit dans le sang (plasma ou sérum), dans la salive ou l'air expiré, mais aussi directement dans les tissus intestinaux. Les niveaux de peroxydation lipidique dans la salive de personnes atteintes de maladie de Crohn sont plus élevés que chez les contrôles<sup>147</sup>. Des marqueurs de peroxydation lipidique sont aussi plus élevés dans le sang chez les gens atteints de maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse<sup>67, 150, 154</sup>, de même que dans le tissu intestinal<sup>155, 156</sup>. Le pentane et l'éthane expirés, des marqueurs non-invasifs de peroxydation lipidique, sont plus élevés chez les patients atteints d'une MII<sup>148, 157</sup>. Un marqueur très fiable de modification à l'ADN en raison d'un stress oxydant important, le 8-hydroxydéoxyguanosine (8-OHdG)<sup>158</sup>,

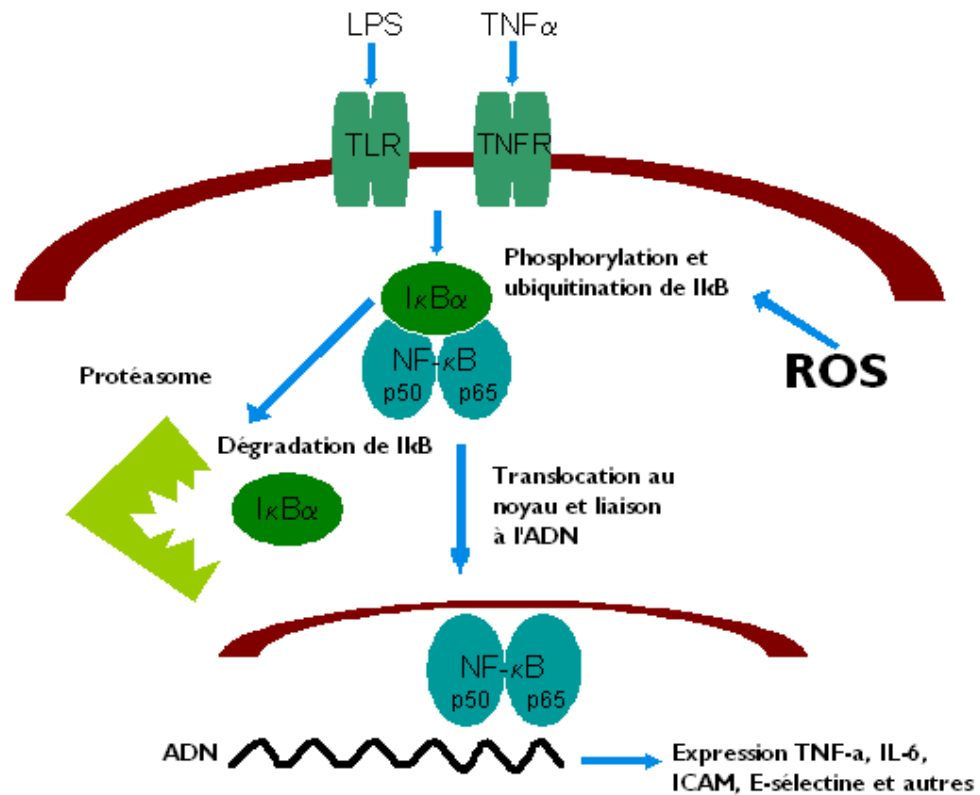
est lui aussi augmenté dans les MII, au niveau du plasma<sup>151</sup> et du côlon<sup>159</sup>. La plupart de ces études ont comparé des individus sains à des patients ayant une MII active. L'augmentation observée pour les différents marqueurs de peroxydation n'est donc pas surprenante; même si elle ne fournit pas d'évidence que le stress oxydant est un facteur étiologique des MII, elle confirme bel et bien son implication et ses répercussions possibles sur le corps entier. En support du rôle étiologique du stress oxydant, certaines études rapportent l'élévation de marqueurs d'oxydation chez les patients même dans les tissus non-inflammés<sup>160</sup>.

Le stress oxydant peut affecter l'intestin de différentes manières. Une de ses conséquences majeure pour le déclenchement et la perpétuation des MII est sans contredit son impact sur la perméabilité intestinale, par l'altération de la barrière épithéliale et de la fluidité membranaire. En effet, le contrôle de la perméabilité intestinale et de l'intégrité de la barrière épithéliale est crucial. Une déficience peut entraîner la pénétration de bactéries de la flore intestinale ou d'antigènes d'origine alimentaire dans la paroi intestinale et provoquer ainsi une réaction immunitaire, un fort recrutement de cellules immunitaires et le déclenchement d'une réaction inflammatoire puissante pouvant générer des dommages encore plus drastiques au tube digestif<sup>42</sup>. L'intégrité de la barrière intestinale repose en grande partie sur l'établissement de jonctions serrées entre les cellules. Plusieurs des protéines qui composent ces jonctions sont altérées dans des conditions pro-inflammatoires<sup>161-164</sup> et pro-oxydantes<sup>163</sup>.

#### 4.4. Stress oxydant et inflammation

Le stress oxydant et l'inflammation sont des phénomènes intimement liés. S'il est vrai que l'inflammation entraîne forcément un stress oxydant, il est aussi vrai qu'un stress oxydant peut induire la réaction inflammatoire. En effet les radicaux libres peuvent agir sur la signalisation cellulaire et déclencher une réaction inflammatoire. Il a été démontré que les radicaux libres peuvent induire la production de facteurs chimiotactiques comme MIP-1 $\alpha$  et l'IL-8 dans les macrophages et les cellules épithéliales<sup>165, 166</sup>. Cette augmentation de l'expression de facteurs chimiotactiques pourrait vraisemblablement passer par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, puisqu'il est lui aussi activé par les espèces radicalaires<sup>167-169</sup>. L'activation de NF- $\kappa$ B (voir Figure 4, page 33) induit l'augmentation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire comme l'IL-6, le TNF- $\alpha$ , le COX-2 et plusieurs autres facteurs<sup>170-172</sup>. De plus, les espèces radicalaires peuvent augmenter l'expression de molécules d'adhésion comme la E-sélectine, ICAM et VCAM-1, aussi via l'activation du NF- $\kappa$ B, et faciliter l'adhérence des cellules phagocytaires<sup>167, 173-176</sup>. Un excès du stress oxydant peut donc induire une réaction inflammatoire et recruter des cellules immunitaires qui généreront encore plus de stress oxydant. Ce dernier, produit durant la réaction inflammatoire par les cellules immunitaires, est d'une grande utilité pour détruire les agents infectieux<sup>177, 178</sup>, mais il peut favoriser l'apparition d'une inflammation persistante et incontrôlée, potentiellement responsable de pathologies sérieuses, comme les MII<sup>179, 180</sup>.





**Figure 4.** Activation de NF-κB. Le facteur de transcription pro-inflammatoire NF-κB est classiquement activé par la liaison de facteurs comme les lipopolysaccharides (LPS) ou le TNF-α suite à la liaison à leurs récepteurs, ce qui déclenche une cascade de signalisation menant à la dégradation de IκB, la protéine inhibitrice du NF-κB. Les radicaux libres (ROS) peuvent eux aussi mener à la dégradation de IκB et entraîner l'activation du NF-κB. Une fois libéré de IκB, le NF-κB est transloqué au noyau où il se lie à l'ADN pour induire l'expression de différents gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Il est à noter qu'une boucle de régulation positive peut s'installer puisque certains gènes induits par le NF-κB augmentent à leur tour son activation.

Les données présentées précédemment suggèrent que les patients atteints d'une MII ont une défense antioxydante dysfonctionnelle, ce qui pourrait expliquer en partie l'apparition des symptômes lors des périodes de rechute. En effet, le stress oxydant semble présent avant le déclenchement de la réponse inflammatoire, et les radicaux libres pourraient même être responsables de l'induction de l'inflammation. Les stress oxydant doit donc être considéré comme un facteur étiologique des MII, et non seulement comme une conséquence de l'inflammation<sup>181</sup>. L'implication de plusieurs composantes antioxydantes dans les maladies inflammatoires de l'intestin a été largement étudiée. Cependant, le niveau de connaissances sur les rôles des paraoxonases (PON) dans l'intestin, des enzymes au fort potentiel antioxydant, demeure très faible.

## **5. Les paraoxonases**

La famille des enzymes dites paraoxonases (PON) contient trois membres différents, PON1, PON2 et PON3, qui partagent des caractéristiques structurales similaires et qui ont plus de 60% d'homologie au niveau de leur séquence d'acides aminés<sup>182</sup>. Chacune des PON a démontré un fort potentiel en tant qu'enzyme antioxydante, principalement au niveau de la circulation sanguine<sup>183</sup>. La présence des trois formes de PON a été récemment identifiée tout au long du tube digestif<sup>184</sup>, mais leurs fonctions y demeurent inconnues.

PON1 est de loin la plus étudiée des trois en raison de son implication démontrée dans la prévention de l'athérosclérose, alors que la littérature est beaucoup moins abondante en ce qui a trait à PON2 et PON3. Dans les sections subséquentes, les principales connaissances quant aux rôles des différentes PON seront détaillées. Les facteurs modulant leur expression et pouvant avoir un impact sur leur activité seront aussi définis, et les connaissances sur les PON et l'intestin seront exposées.

## 5.1. PON1

PON1 est connue depuis 1953<sup>185, 186</sup>, mais ses fonctions d'enzyme antioxydante ont été découvertes seulement à la fin des années 1980<sup>187</sup>. Dans les années 1950, PON1 était catégorisée comme une A-estérase, et le nom paraoxonase provenait de sa capacité à hydrolyser un métabolite toxique, le paraoxon<sup>185, 186</sup>. PON1 a donc des fonctions importantes liées à la détoxification de différents pesticides ou autres composés organophosphorés<sup>188, 189</sup>, mais la description de PON1 retrouvée dans les sections suivantes se concentrera principalement sur ses effets antioxydants et anti-inflammatoires.

Les travaux de recherche sur les effets antioxydants et anti-inflammatoires de PON1 ont réellement débutés lorsqu'un lien a été établi avec les lipoprotéines de haute densité (HDL). Les niveaux de HDL sont intimement reliés au risque cardiovasculaire, en raison de leur capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol des cellules en périphérie et son retour vers le foie pour son excrétion ou conversion biliaire, un phénomène nommé transport inverse du

cholestérol. Cependant, les particules de HDL ont aussi un important potentiel antioxydant, ce qui peut avoir un impact majeur dans la prévention de maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose. En effet, vers la fin des années 1980, il était connu que les HDL pouvaient prévenir l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL)<sup>190</sup>, ce qui a pour effet de prévenir la formation de cellules spumeuses et de plaques athérosclérotiques, mais les protéines responsables de ces effets n'étaient pas clairement identifiées. En 1991, l'effet préventif des HDL sur l'oxydation des LDL était démontré, car l'oxydation des LDL induite par le cuivre était diminuée en présence de HDL<sup>191</sup>. Dans la même étude, des effets antioxydants similaires ont été observés alors qu'une seule protéine isolée des HDL était co-incubée avec le cuivre et les LDL<sup>191</sup>. Il s'agissait alors de la première démonstration concrète du potentiel antioxydant et anti-inflammatoire de PON1, par la prévention de l'oxydation des LDL et de la formation de cellules spumeuses. Cette fonction très importante pour la prévention des maladies cardiovasculaires attribuée à PON1 a généré beaucoup d'intérêt envers cette «nouvelle» protéine antioxydante et mené à une grande quantité de travaux de recherche sur PON1 dans les années 1990 et 2000. Quelques groupes de recherche ont travaillé à la purification de PON1 et de nombreuses études se sont penchées sur les mécanismes d'action de l'enzyme. À la fin des années 1990, des modèles de souris dont le gène de PON1 avait été invalidé ont été générés<sup>192</sup>, ce qui a permis de confirmer l'implication de PON1 dans l'athérosclérose et de mieux comprendre ses autres fonctions.

PON1 est fortement exprimée dans le foie, mais son expression génique a aussi pu être identifiée dans d'autres tissus comme le rein, le poumon et l'intestin<sup>182, 184</sup>. Le foie est probablement le plus important producteur de PON1, puisqu'elle se retrouve dans la circulation sanguine associée avec les particules de HDL, qui sont principalement sécrétées par le foie<sup>193, 194</sup>. À ce jour, PON1 est principalement reconnu comme une enzyme antioxydante liée au HDL, capable de prévenir l'oxydation du LDL. Comme il a été démontré que PON1 était présente dans d'autres tissus, il est possible qu'elle exerce ses fonctions antioxydantes ailleurs que dans la circulation sanguine<sup>195</sup>.

Afin de mieux comprendre les différentes fonctions potentielles de PON1, des études ont été entreprises pour identifier ses substrats physiologiques. De nombreux substrats ont été étudiés et c'est sans surprise qu'une activité organophosphatase a pu être identifiée<sup>196</sup>, expliquant ainsi sa capacité à hydrolyser des composés organophosphorés. Le phényl acétate a aussi été identifié comme un des meilleurs substrats de PON1, conférant une activité arylestérase à l'enzyme. Cependant, sur le plan physiologique, PON1 a démontré la capacité d'hydrolyser différentes lactones et il semblerait que son activité lactonase soit son activité principale<sup>196, 197</sup>. C'est la fonction lactonase de PON1 qui pourrait être responsable de ses effets antioxydants et anti-inflammatoires. En effet, les produits d'oxydation de plusieurs acides gras polyinsaturés seraient structurellement similaires à des lactones et pourraient être détoxifiés par l'action de PON1<sup>196-198</sup>. L'activité lactonase est probablement l'activité naturelle des PON puisque cette activité était la seule présente chez les trois différentes PON<sup>196</sup>.

L'activité lactonase de PON1 pourrait aussi avoir un effet anti-infectieux. En effet, PON1 pourrait être impliqué dans l'inactivation de molécules de signalisation produite par certaines bactéries, un procédé nommé «quorum-sensing». Le terme quorum-sensing réfère aux signaux produits par les bactéries qui leur permettent de coordonner l'expression de certains gènes et de surveiller la densité de leur population pour faciliter la colonisation de l'hôte<sup>199</sup>. Les N-acyl homosérine lactones et les butyrolactones sont des signaux connus de quorum sensing<sup>200, 201</sup> et donc potentiellement des cibles des PON. PON1 a démontré la capacité d'hydrolyser le N-(3-oxododécanoyl)-L-homosérine lactone, une molécule importante de quorum sensing de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, qui peut réaliser des infections opportunistes notamment au niveau du poumon<sup>202</sup>.

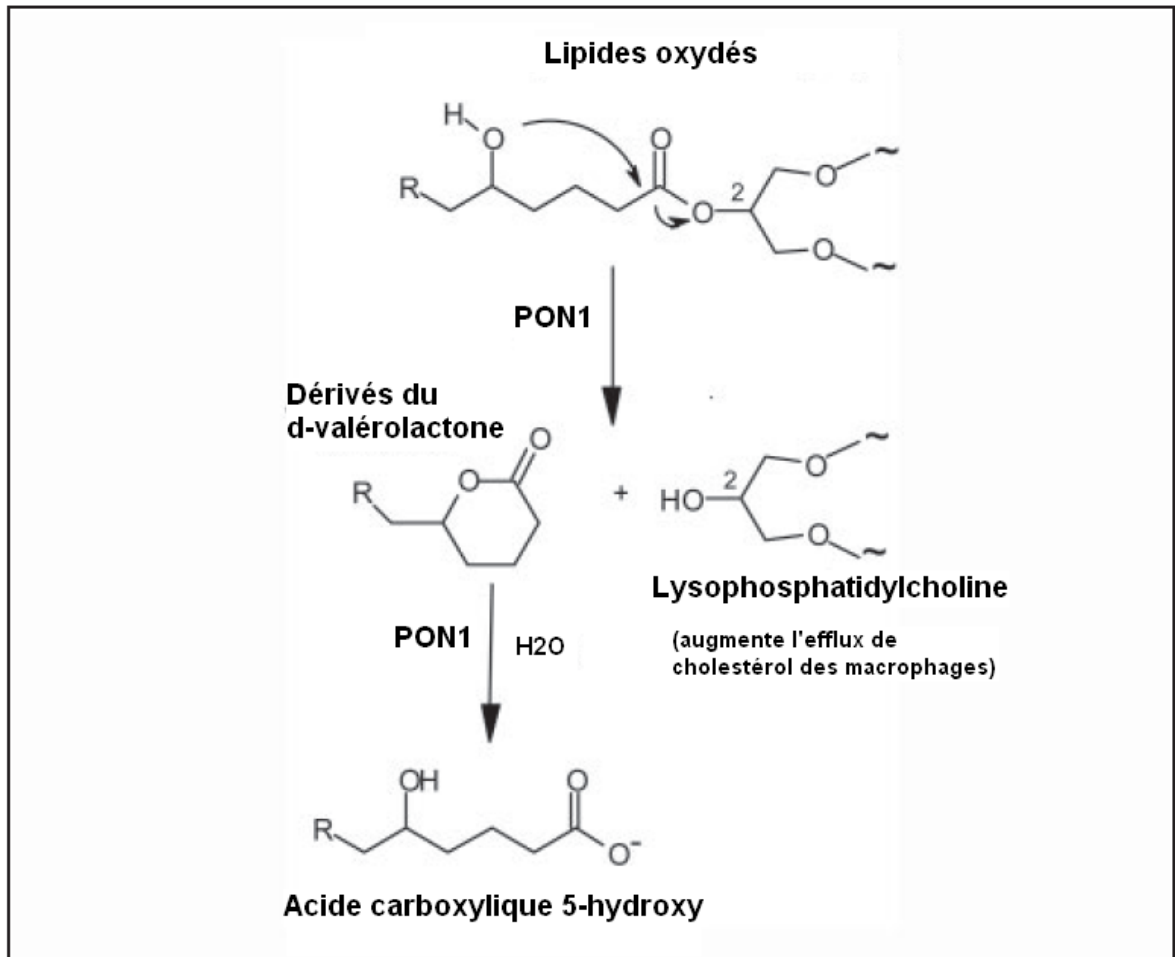
Un autre substrat de PON1 ayant une importance au niveau pathophysiologique pourrait être l'homocystéine thiolactone, qui est un sous-produit des réactions de charge de certaines synthétases de l'ARN de transfert. L'homocystéinylation des protéines peut mener à leur inactivation et à des dommages au niveau cellulaire et est considérée comme un facteur de risque de maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose<sup>203</sup>. PON1 semble avoir une activité hydrolase envers l'homocystéine thiolactone, une activité qualifiée thiolactonase<sup>204</sup>. En fait, cette activité thiolactonase de PON1 se corrèle négativement avec la N-homocystéinylation des protéines, ce qui suggère un autre effet bénéfique pour PON1 dans la prévention de l'athérosclérose<sup>205</sup>.

PON1 pourrait aussi avoir des activités peroxydase et estérase, qui contribueraient aux effets antioxydants et anti-inflammatoires de l'enzyme. Ces activités ont été identifiées alors que les mécanismes d'action de PON1 étaient à l'étude. Les effets bénéfiques attribués à PON1 pourraient être associés à sa capacité de prendre en charge les phospholipides oxydés. L'ajout de PON1 purifiée ou de HDL à des LDL soumis à l'oxydation dans un système de co-culture réduisait les facteurs chémotactiques et les interactions entre les monocytes et les cellules endothéliales<sup>206</sup>. En présence de PON1, le LDL oxydé et le 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-phosphatidylcholine oxydé (Ox-PAPC) ne semblaient plus pouvoir attirer les monocytes. Notons toutefois que les activités de PON1 peuvent être inhibées par l'EDTA, puisqu'elles sont dépendantes du calcium<sup>207</sup>. Cette inhibition de PON1 par l'EDTA réduisait la capacité du HDL à protéger le LDL de l'oxydation et à prévenir la migration des monocytes. Le mécanisme d'action associé à ces effets bénéfiques de PON1 semble donc être la destruction des phospholipides oxydés<sup>206</sup>. Le mécanisme d'action a été mieux défini dans une autre étude. Lorsque des HDL oxydés étaient incubés en présence de PON1 purifiée, le contenu en lipides peroxydés était réduit de 19% et celui d'hydroperoxydes de cholestéryl linoléate (CL-OOH) était diminué de 90%<sup>208</sup>. Les analyses de HPLC ont démontré que l'action de PON1 semblait dédiée principalement à la réduction du contenu en CL-OOH, ce qui dénote une activité peroxydase pour PON1<sup>208</sup>. De plus, PON1 a aussi exhibé la capacité d'hydrolyser directement le peroxyde d'hydrogène, un intermédiaire majeur et dommageable des réactions de stress oxydant, ce qui met en évidence, encore une fois, l'activité peroxydase de PON1<sup>208</sup>. PON1 semble donc pouvoir non seulement prévenir l'oxydation du HDL et du

LDL, mais semble aussi en mesure de prendre en charge le peroxyde d'hydrogène en plus des lipides peroxydés dans les lipoprotéines oxydées, pour ainsi réduire la réaction inflammatoire et la migration des monocytes<sup>206, 208</sup>.

Les mécanismes d'action de PON1 ont été caractérisés plus en profondeur dans des études subséquentes. L'activité peroxydase a pu être confirmée, car lorsque des homogénats de lésions coronariennes étaient incubés en présence de PON1 purifiée, le contenu en CL-OOH et en hydroperoxyde d'acide linoléique (L-OOH) était diminué<sup>209</sup>. De manière intéressante, la diminution en CL-OOH et en L-OOH était jumelée à une augmentation en hydroxyde de cholestéryl linoléate (CL-OH) et en hydroxyde d'acide linoléique (L-OH). Le CL-OOH et le CL-OH pouvait aussi être hydrolysé par la PON1 purifiée, ce qui entraînait ensuite l'augmentation des acides gras libres L-OOH et L-OH<sup>209</sup>. Cette observation suggère que PON1 a la capacité de cliver le lien ester entre la molécule de cholestérol et l'hydroperoxyde ou l'hydroxyde d'acide linoléique, et confirme son activité estérase<sup>209</sup>. Ces résultats démontrent encore le potentiel antioxydant et anti-inflammatoire de PON1, par l'hydrolyse des lipides peroxydés dans les plaques athéromateuses.





**Figure 5.** Mécanisme d'action potentiel de PON1 pour l'hydrolyse de lipides oxydés. Les lipides oxydés contenant un groupement hydroxyle en position 5' pourraient être lactonisés par PON1, ce qui générerait des dérivés du d-valérolactone et de la lysophosphatidylcholine. La production de lysophosphatidylcholine pourrait contribuer aux effets bénéfiques de PON1 dans l'athérosclérose, puisque celle-ci augmente l'efflux de cholestérol des macrophages. Les lipides peroxydés seraient donc dégradés par l'activité lactonase de PON1. Figure adaptée de Rosenblat et al., 2006<sup>210</sup>.

Certains résultats contradictoires sont cependant présents dans la littérature en ce qui a trait aux effets bénéfiques de PON1. Par exemple, une activité phospholipase A2 avait été attribuée à PON1<sup>211, 212</sup>, mais il semblerait que de mauvaises purifications de PON1 soient responsables de cet effet en raison de contaminations<sup>213-215</sup>. L'activité phospholipase A2 avait été identifiée comme un effet athéroprotecteur et anti-inflammatoire de PON1, mais elle a depuis été discréditée. En effet, lorsque PON1 était purifiée à l'aide d'une méthode plus spécifique, elle perdait son activité phospholipase qui semblait plutôt due à la présence de la «platelet-activating factor acetylhydrolase» dans la préparation initiale<sup>213, 216</sup>. De plus, dans certains groupes de recherche, la forme purifiée de PON1 n'a pas démontré d'effets antioxydants et anti-inflammatoires. Il a donc été conclu que les méthodes de purification devaient être améliorées et que les essais devaient être réalisés en autant que possible dans l'environnement naturel de l'enzyme<sup>217</sup>. Les essais *in vitro* ne peuvent pas répondre à toutes les questions et des problèmes de purification peuvent avoir donné à PON1 une activité antioxydante. Heureusement, le modèle de souris comportant l'inactivation du gène codant pour PON1 a été généré à la fin des années 1990<sup>192</sup> et le modèle de souris transgénique surexprimant PON1 a suivi peu de temps après<sup>218, 219</sup>. Ces modèles ont permis de résoudre les controverses entourant les fonctions de PON1 et de démontrer hors de tout doute ses effets antioxydants et anti-inflammatoires, principalement au niveau de la circulation sanguine.

Depuis la découverte des effets préventifs de PON1 sur l'oxydation du LDL<sup>191</sup>, la recherche sur cette nouvelle enzyme antioxydante et anti-athérosclérotique a été foisonnante. Pour

confirmer le grand potentiel de PON1 au niveau de la prévention des maladies cardiovasculaires, le modèle de souris invalidées pour PON1 (PON1<sup>-/-</sup>) a été généré. Dans la première étude utilisant le modèle de souris PON1<sup>-/-</sup>, le HDL a été isolé et il ne pouvait pas prévenir l'oxydation du LDL ou la migration des monocytes comme le HDL des souris normales pouvaient le faire dans un modèle de co-culture<sup>192</sup>. Ce résultat confirmait l'implication de PON1 dans la fonction antioxydante et anti-inflammatoire du HDL. De plus, le rôle de PON1 dans la pathophysiologie de l'athérosclérose a aussi été confirmé. En effet, les souris PON1<sup>-/-</sup> soumises à une diète riche en gras et en cholestérol ont montré un développement plus imposant de lésions athéromateuses que les souris normales<sup>192</sup>.

Le modèle de souris dont le gène de PON1 avait été invalidé a été combiné avec un modèle de souris dont le gène de l'apolipoprotéine E (apo E<sup>-/-</sup>) était invalidé. Les souris apo E<sup>-/-</sup> sont plus susceptibles de développer l'athérosclérose en raison de niveaux plasmatiques de LDL élevés et d'une peroxydation lipidique augmentée<sup>220</sup>. Les souris combinant l'invalidation de PON1 et de l'apo E, soumises à des diètes normales ou riches en gras, ont montré plus de signes d'athérosclérose que les souris apo E<sup>-/-</sup> et leur LDL était plus susceptible à l'oxydation<sup>221</sup>. Ces résultats démontraient encore une fois les effets antioxydants de PON1 et son importance pour la prévention de l'athérosclérose.

Le rôle de PON1 pour la prévention de l'athérosclérose a été étudié plus en profondeur à l'aide du modèle de souris PON1<sup>-/-</sup>. Cependant, les souris n'étaient pas soumises à une diète athérogène, ce qui permettait de déterminer l'implication de PON1 dans la mise en place

des plaques athéromateuses et sur les signes avant coureurs du développement de l'athérosclérose en fonction de l'âge. Les souris PON1<sup>-/-</sup> âgées de 6 à 9 mois ont commencé à montrer des signes d'athérosclérose. Par exemple, l'expression génique de différentes molécules d'adhésion importantes à la migration des leucocytes comme la P-sélectine et ICAM1 était augmentée. De plus, la production d'anions superoxydes était augmentée au niveau de l'aorte en comparaison aux souris normales<sup>222</sup>. Ces résultats suggéraient donc que l'absence de PON1, même sous une diète normale, peut entraîner une augmentation du stress oxydant et de l'expression des molécules d'adhésion, confirmant le rôle prépondérant de PON1 dans la protection de la fonction endothéliale et la prévention de l'athérosclérose. En absence de PON1, la fonction antioxydante des HDL semble clairement diminuée, mais le transport inverse du cholestérol pourrait être lui aussi affecté. En effet, les macrophages péritonéaux isolés des souris PON1<sup>-/-</sup> montrent une diminution de l'expression de SR-BI, important dans le transport inverse du cholestérol<sup>223</sup>, et une diminution de la liaison du HDL aux macrophages<sup>224</sup>.

Afin de confirmer les fonctions attribuées à PON1 et de mieux comprendre les mécanismes d'action, des souris transgéniques surexprimant PON1 ont été générées. Dans un des modèles, une expression de PON1 de 5 fois supérieure à celle des contrôles et spécifique au foie a pu être obtenue. La forme de PON1 surexprimée était ensuite retrouvée dans la circulation liée au HDL. L'augmentation de PON1 sur le HDL n'a pas semblé modifier sa composition ou ses propriétés, mise à part une fonction antioxydante améliorée et une protection accrue face à la peroxydation lipidique. De plus, la lécithine cholestérol

acyltransférase (LCAT), une enzyme clé modulant le transport inverse du cholestérol, normalement inactivée par le stress oxydant, se trouvait mieux protégée lorsque le HDL provenant d'animaux surexprimant PON1 était soumis à l'oxydation induite par le cuivre<sup>218</sup>.

Dans un autre modèle, PON1 humaine a été surexprimée dans le foie de souris, puis retrouvée dans la circulation liée au HDL. L'activité arylestérase était augmentée de 2 à 4 fois dans le sérum des souris surexprimant PON1. Lorsqu'elles ont été soumises à une diète riche en gras, les souris surexprimant PON1 ont développé des lésions athérosclérotiques de taille réduite en comparaison aux souris normales<sup>219</sup>. Lorsque PON1 a été surexprimée chez des souris apo E<sup>-/-</sup>, la chimiotaxie était réduite, mise en évidence par la diminution de l'expression de la «monocyte chemotactic protein-1» (MCP-1). De plus, le HDL isolé de souris surexprimant PON1 prévenait l'oxydation des LDL plus efficacement en comparaison aux contrôles<sup>219</sup>.

Il est aussi possible de surexprimer une protéine de façon transitoire en utilisant les adénovirus comme vecteurs. La surexpression de PON1 à l'aide des adénovirus dans les souris apo E<sup>-/-</sup> a permis de diminuer la taille des lésions athérosclérotiques. De plus, la peroxydation lipidique était abaissée dans le sérum, démontré par les niveaux de malondialdéhyde (MDA) réduits, et la réaction inflammatoire était aussi diminuée selon les valeurs plus basses de TNF- $\alpha$ <sup>225</sup>. De manière intéressante, il semblerait que PON1 puisse exercer ses effets antioxydants et anti-inflammatoires ailleurs que dans la circulation

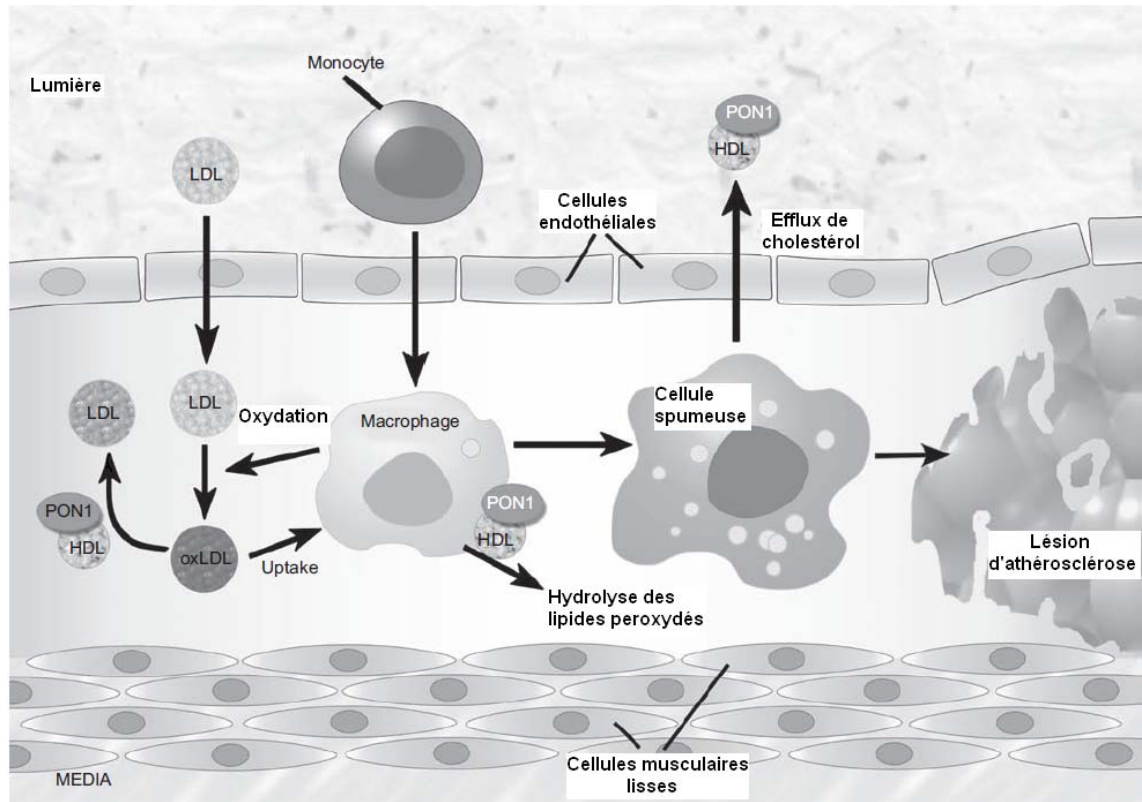
sanguine. En effet, des souris surexprimant PON1 à l'aide d'adénovirus semblaient mieux protégées contre des dommages au foie induits par le CCl<sub>4</sub>, comme en témoignait les différents marqueurs de stress oxydant et d'inflammation<sup>226</sup>. PON1 exhibe donc des effets antioxydants et anti-inflammatoires au niveau du foie<sup>226, 227</sup>.

Un modèle animal présentant des caractéristiques similaires au syndrome métabolique humain, soit des souris déficientes en leptine et en récepteurs LDL, a ensuite été utilisé. Ce modèle animal présente de la dyslipidémie et de l'obésité, conduisant éventuellement au développement d'athérosclérose. PON1 a été surexprimée dans ce modèle animal, ce qui a mené à la réduction de l'oxydation du LDL, du volume des plaques athéromateuses et de la quantité de macrophages présents dans les plaques<sup>228</sup>.

Les macrophages sont des acteurs importants dans l'établissement des lésions athérosclérotiques, mais PON1 n'y est normalement pas exprimée. Cependant, PON1 est retrouvée dans les macrophages des souris transgéniques qui la surexpriment. La présence de PON1 dans les macrophages réduit la quantité totale de peroxydes et la relâche d'anions superoxydes tout en augmentant les niveaux de glutathion réduit<sup>229</sup>. Les macrophages isolés de souris PON1<sup>-/-</sup>, et transfectés afin d'y surexprimer PON1, illustrent des effets similaires, confirmant ainsi le fort potentiel antioxydant de PON1<sup>229</sup>.

L'étude des modèles animaux de même que des modèles cellulaires de co-culture suggère que PON1 influence la liaison entre les macrophages et le HDL. Pour confirmer ces effets

attribués à PON1, le HDL a été isolé chez des souris normales, des souris transgéniques surexprimant PON1 et des souris PON1<sup>-/-</sup>, et la fonction des HDL a ensuite été étudiée en scrutant leur liaison aux macrophages et à leur capacité d'efflux de cholestérol. Le HDL isolé des souris surexprimant PON1 avait un efflux de cholestérol augmenté à partir des macrophages péritonéaux ou de la souche J774 A.1<sup>230</sup>. Cette action pourrait être médié par le transporteur ABCA1 car la liaison des macrophages aux HDL était aussi plus marquée. De plus, la présence de grandes concentrations de PON1 dans le HDL induisait la formation lysophosphatidylcholine dans les macrophages, ce qui pourrait aussi contribuer aux effets observés<sup>230</sup>. Ces résultats confirment l'importance de PON1 dans le transport inverse du cholestérol, ce qui peut expliquer réciproquement l'impact de l'absence de PON1 sur la survenue des lésions athéromateuses.



**Figure 6.** Actions multiples de PON1 pour la prévention de l'athérosclérose. L'athérosclérose est causée par une surcharge de stress oxydant et d'inflammation, ce qui mène à l'oxydation du LDL. Le LDL oxydé (oxLDL) est ensuite capté par les macrophages, ce qui entraîne la formation de cellules spumeuses et éventuellement le développement de lésions d'athérosclérose. Par ses effets antioxydants, PON1 peut hydrolyser les lipides oxydés dans le LDL et régénérer du LDL normal. PON1 peut aussi hydrolyser les lipides oxydés qui avaient été captés par le macrophage pour ainsi diminuer la formation de cellules spumeuses. Enfin, la présence de PON1 sur le HDL favorise l'efflux de cholestérol et le transport inverse au foie, prévenant ainsi la formation de cellules spumeuses et de lésions d'athérosclérose. Figure adaptée de Camps *et al.*, 2009<sup>194</sup>.



Dans la circulation, le HDL protège le LDL de l'oxydation et PON1 pourrait être en partie responsable de cet effet<sup>191, 231</sup>. La supplémentation de HDL en PON1 purifiée peut aussi les protéger de l'oxydation<sup>208</sup>. De plus, la présence de PON1 influence l'efflux de cholestérol des macrophages vers le HDL<sup>208, 224</sup>, ce qui affecte donc grandement le transport inverse vers le foie. PON1 peut donc prévenir l'oxydation des lipoprotéines, faciliter le transport inverse du cholestérol et diminuer la formation des cellules spumeuses et la réaction inflammatoire. PON1 a un rôle majeur à jouer dans la prévention des lésions athérosclérotiques. Cependant, la découverte d'effets antioxydants et anti-inflammatoires dans des sites autres que la circulation<sup>226, 227</sup> suggère que les bienfaits de PON1 pourraient être présents dans certains tissus périphériques et, possiblement, au niveau intestinal.

## **5.2. PON2**

L'identification de PON2 est beaucoup plus récente que celle de PON1<sup>182</sup>. La littérature traitant des fonctions de PON2 est aussi très limitée en comparaison à celle s'attardant aux différents rôles de PON1. Pourtant, PON2, une lactonase de 40 kDa, est probablement ubiquitaire puisqu'elle a été retrouvée dans tous les tissus sondés, dont les poumons, le foie, le cœur et l'intestin<sup>232</sup>. Il est donc probable qu'elle ait un impact important dans plusieurs organes. La similitude est grande entre PON1 et PON2 au niveau du gène, et cette dernière a aussi été impliquée dans la défense antioxydante, la réaction inflammatoire et la dégradation des signaux de quorum sensing<sup>233</sup>, qui coordonnent normalement l'infection<sup>234</sup>,

de par son activité lactonase. Néanmoins, contrairement à PON1, elle n'a pas d'activité paraoxonase, arbore très peu d'activité estérase<sup>196</sup> et ne se retrouve pas dans les lipoprotéines. Elle demeurerait majoritairement localisée dans la membrane plasmique des cellules, ce qui suggère un impact différent de PON1 au niveau de la défense antioxydante<sup>232</sup>. Étant exprimée dans les macrophages<sup>235-237</sup> et les cellules endothéliales<sup>238</sup>, PON2 pourrait tout de même remplir une fonction antioxydante dans la circulation et préventive quant aux événements athérosclérotiques.

Au début des années 2000, la première démonstration du potentiel antioxydant de PON2 a été réalisée dans les cellules HeLa. PON2 a été surexprimée dans ces cellules et a diminué l'impact de stress oxydant induit par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De plus, dans un système de co-culture, du LDL incubé avec des cellules HeLa surexprimant PON2 était moins oxydé et la chimiotaxie des monocytes était aussi réduite<sup>232</sup>.

Par la suite, le potentiel antioxydant de PON2 a été confirmé dans les cellules vasculaires. Le stress oxydant induit avec le 2,3-diméthoxy-1,4-haptoquinone a généré des niveaux de radicaux libres nettement réduits dans des cellules surexprimant PON2. Par contre, en invalidant PON2 dans ces mêmes cellules exposées au même type de stress oxydant, des niveaux plus élevés de radicaux libres ont été générés<sup>238</sup>. L'impact du stress du réticulum endoplasmique (RE) a aussi été évalué dans les cellules vasculaires. Le stress du RE est un phénomène caractérisé par une augmentation des radicaux libres, accompagnée de "unfolded protein response". Une augmentation de l'expression protéique de PON2 a alors

été constatée et une séquence de réponse au stress du RE a été identifiée sur son promoteur. Dans les cellules vasculaires, PON2 pourrait donc jouer un rôle d'antioxydant impliqué particulièrement dans la protection des fonctions du RE<sup>238</sup>.

Comme PON1 avait montré un énorme potentiel pour la prévention de l'athérosclérose, des modèles animaux invalidés ou surexprimant PON2 ont été générés et le potentiel antiathérogénique de PON2 a été étudié<sup>239, 240</sup>. La surexpression de PON2 dans les souris déficientes pour l'apo E, prédisposées au développement de l'athérosclérose, a réduit les niveaux de lipides peroxydés. Les LDL isolés de ces souris étaient aussi moins susceptibles au stress oxydant, la capacité antioxydante de leur HDL était augmentée et l'efflux de cholestérol des macrophages était amélioré<sup>240</sup>. Un modèle de souris déficientes en PON2 a aussi été généré et leur susceptibilité à développer des lésions athérosclérotiques a été vérifiée<sup>239</sup>. Les souris PON2<sup>-/-</sup> ont été soumises à une diète riche en gras durant 15 mois, et ont développé des plaques athéromateuses de taille plus importante en comparaison aux souris contrôles. De plus, le LDL isolé de ces souris était plus susceptible à l'oxydation et induisait plus de chimiotaxie. Pour démontrer le potentiel anti-inflammatoire de PON2, des macrophages ont été isolés des souris PON2<sup>-/-</sup> et traités avec des LPS pour induire une réaction inflammatoire. Dans les macrophages dépourvus de PON2, la réponse inflammatoire était plus importante, tel que démontré par une augmentation de l'expression génique du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$ . Ils étaient aussi plus sensibles face à l'induction d'un stress oxydant<sup>239</sup>.

Des macrophages péritonéaux de souris PON2<sup>-/-</sup> ont aussi été isolés afin de vérifier l'impact de l'absence de PON2 sur le métabolisme des triglycérides et le stress oxydant. En absence de PON2, le niveau de stress oxydant présent dans les macrophages était élevé, induisant une plus grande oxydation des LDL. De plus, lorsque les macrophages isolés de souris PON2<sup>-/-</sup> étaient soumis à des concentrations de glucose élevées, ils synthétisaient et accumulaient plus de triglycérides, ce qui était probablement dû à l'activité augmentée de la diacylglycérol acyltransférase 1 (DGAT1), une enzyme essentielle à la synthèse de triglycérides<sup>241</sup>. Inversement, lorsque PON2 était surexprimée, l'activité de la DGAT1 et l'accumulation des triglycérides étaient réduites dans les macrophages<sup>242</sup>. Il semble donc que PON2 puisse être protectrice face au développement de l'athérosclérose en réduisant la formation de cellules spumeuses et en réduisant la synthèse et l'accumulation de triglycérides au niveau des macrophages<sup>241, 242</sup>.

L'impact direct de PON2 sur les macrophages a été évalué à l'aide de la protéine purifiée. L'addition de PON2 purifiée aux macrophages isolés de souris apo E<sup>-/-</sup>, qui contiennent normalement des niveaux de peroxydes élevés, a pu réduire la présence de stress oxydant<sup>236</sup>. Apparemment, PON2 peut même diminuer le stress oxydant via la réduction de l'activité de la NADPH oxydase<sup>241</sup>.

En raison de sa capacité à hydrolyser des molécules de signalisation bactérienne, comme les acyl-homosérines lactones (AHL), impliquées dans le phénomène de quorum sensing<sup>234</sup>, PON2 pourrait avoir des effets anti-infectieux. En fait, les AHL sont relativement

spécifiques pour PON2 puisque l'activité de PON1 et PON3 envers ces substrats est beaucoup plus faible<sup>196, 202</sup>. D'ailleurs, les phénomènes de quorum sensing sont facilités dans les souris PON2<sup>-/-233</sup>. PON2 pourrait donc contribuer à réduire le phénomène de quorum sensing utilisé par des bactéries opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa*, qui peuvent causer des infections pulmonaires chez les patients atteints de fibrose kystique<sup>243</sup>. PON2 est non seulement la plus puissante des PON pour décomposer les AHL<sup>196</sup>, mais elle peut aussi hydrolyser d'autres molécules de quorum sensing comme le 3-oxo-C12-homosérine lactone (3-OC12-HSL)<sup>202</sup>. De plus, lorsque PON2 a été invalidée dans des cellules alvéolaires humaines, les cellules devenaient plus sensibles aux molécules produites par les bactéries *Pseudomonas aeruginosa*, comme le 3-OC12-HSL et la pyocyanine<sup>244</sup>. Il a aussi été démontré qu'un polymorphisme de PON2, caractérisé par la substitution d'un résidu cystéine par un résidu sérine en position 311, pouvait altérer la glycosylation de la protéine et diminuer son activité lactonase, ce qui pourrait s'avérer d'une grande importance pour l'immunité et la défense anti-bactérienne au niveau du poumon<sup>245</sup>.

Comparativement à PON1, la littérature est malheureusement très peu abondante sur les fonctions de PON2. Cependant, les résultats présentés précédemment démontrent le grand potentiel de PON2 en tant qu'enzyme antioxydante, anti-inflammatoire et anti-infectieuse. En fait, PON2 exerce un effet antioxydant et anti-inflammatoire aux niveaux des cellules endothéliales et des macrophages, et un effet anti-infectieux dans les cellules alvéolaires. Parmi les caractéristiques importantes de PON2 la distinguant de PON1, son caractère

ubiquitaire, en plus de sa capacité d'action directement au niveau cellulaire sont les plus importantes. Des bénéfices de PON2 ont été identifiés au niveau de la circulation sanguine et du poumon principalement, mais les travaux futurs permettront possiblement d'identifier des bienfaits pour différents organes dans lesquels le stress oxydant et l'inflammation sont impliqués, comme les maladies neuro-dégénératives ou les MII.

### 5.3. PON3

L'identification de PON3 a été faite en même temps que celle de PON2, soit au milieu des années 1990<sup>182</sup>. Tout comme pour PON2, cette découverte est relativement récente et la littérature traitant de PON3 est peu abondante. Au niveau de la séquence génétique, une similitude importante existe entre les différentes PON, et bien que PON2 ait des fonctions distinctes de PON1, PON3 est celle qui se rapproche le plus de la plus étudiée des trois enzymes. En effet, PON3 est semblable à PON1, car elle est principalement exprimée au foie et se retrouve aussi associée aux particules de HDL dans la circulation<sup>246</sup>. Par contre, elle n'a qu'une très faible activité paraoxonase et se distingue de PON1 par sa capacité à hydrolyser certaines molécules pharmacologiques comme les statines et le spironolactone<sup>196, 247</sup>. Elle contribuerait aussi à la protection du LDL face à l'oxydation, mais moins efficacement que PON1<sup>248</sup> en plus d'être moins abondante dans le HDL<sup>247</sup>. C'est probablement ce qui explique la plus faible attention portée à PON3 en comparaison à PON1. Par contre, l'intérêt pour PON3 pourrait changer car elle a récemment été impliquée dans la prévention de l'obésité<sup>249</sup>.

Les premières caractéristiques de PON3, une protéine de 39 kDa, ont été définies au début des années 2000<sup>247</sup>, par le groupe de recherche du Dr. Draganov. PON3 a été purifiée à partir du sang de lapin, et des contaminations de PON1 et d'apo A-I étaient présentes dans l'échantillon. PON1 et l'apo A-I étant des composantes connues du HDL, ceci suggérait la localisation de PON3 au niveau du HDL, tout comme PON1<sup>247</sup>. Cependant, l'activité de PON3 envers différents substrats la distingue de PON1. Elle a en effet une très faible activité arylestérase et pratiquement aucune activité paraoxonase. Tout comme PON1 et PON2, elle peut hydrolyser différents lactones et plusieurs acides gras polyinsaturés oxydés<sup>196</sup>. Elle est par contre la seule à pouvoir hydrolyser de volumineuses molécules pharmacologiques comme la lovastatine, le spironolactone et la canrénone<sup>196</sup>. PON3 pourrait donc jouer un rôle dans le métabolisme de certaines molécules pharmacologiques. PON3 pourrait aussi hydrolyser des esters d'estrogène<sup>250</sup>, ce qui pourrait avoir des effets antioxydants<sup>78</sup>.

PON3 a par la suite été mieux caractérisée et ses fonctions ont été mieux définies. Comme pour PON1, PON3 semble exprimée principalement au niveau du foie, et plus faiblement dans le rein<sup>246</sup>, ce qui est logique puisque PON3 se retrouve elle aussi associée aux particules de HDL dans la circulation sanguine. PON3 semble avoir des effets antioxydants similaires à PON1, puisque l'ajout de milieu de culture provenant de cellules HeLa qui surexprimaient PON3 à des cellules endothéliales pouvait prévenir l'oxydation des LDL et hydrolysait les lipides oxydés déjà présents. De plus, dans ce système de co-culture, la

chimiotaxie des monocytes était réduite<sup>246</sup>. PON3 a aussi été clonée et produite dans la bactérie *Escherichia coli*, puis la protéine correctement repliée a été purifiée et a démontré la capacité de prévenir l'oxydation du LDL induite par le cuivre et la formation de diènes conjugués, une étape initiale de la peroxydation lipidique<sup>251</sup>.

Le potentiel antioxydant de PON3 est très grand, comme pour PON1 et PON2. La génération d'un modèle de souris transgéniques surexprimant PON3 a permis de mieux définir ce potentiel et de vérifier son implication dans différentes pathologies comme l'athérosclérose et l'obésité. Les souris transgéniques générées exprimaient de 4 à 7 fois plus de PON3 au niveau du foie que les souris normales. Lorsqu'elles ont été soumises à une diète athérogène riche en gras, elles ont développé des plaques athéromateuses de taille réduite en comparaison aux contrôles<sup>249</sup>. Cependant, dans ce modèle animal, PON3 ne se retrouvait pas liée au HDL mais semblait plutôt demeurer au niveau de la cellule hépatique, et ses effets antioxydants aidant à contrôler le développement de l'athérosclérose pourraient y prendre place<sup>249</sup>. PON3 a aussi été surexprimée chez des souris déficientes en récepteurs du LDL et des effets similaires ont pu être observés, soit la réduction des lésions athérosclérotiques, en plus de l'abaissement des concentrations du facteur chimiotactique MCP-1<sup>249</sup>.

Un effet de PON3 très intéressant et inattendu est ressorti des expériences faites sur les animaux déficients en récepteurs du LDL et surexprimant PON3. En effet, les investigateurs ont noté une réduction de l'adiposité chez les animaux qui surexprimaient



PON3<sup>249</sup>. De manière intéressante, un autre groupe de recherche a établi un lien entre PON3 et l'obésité, alors que l'expression génique de PON3 a été trouvée plus élevée dans les tissus adipeux de porcs obèses en comparaison à des porcs plus maigres<sup>252</sup>. PON3 pourrait être impliquée dans le contrôle des niveaux des lipides plasmatiques, puisque des souris déficientes en PON3, lorsque soumises à une diète riche en gras, ont montré des niveaux de cholestérol total et de cholestérol LDL augmentés, en plus de niveaux de cholestérol HDL réduits. La taille des lésions athérosclérotiques était aussi augmentée chez ces animaux<sup>253</sup>.

Pour étudier l'implication de PON3 dans la prévention de l'athérosclérose, un modèle de souris déficientes en apo E et surexprimant PON3 a été généré. Dans ce modèle, la formation d'hydroperoxydes lipidiques était diminuée dans le sérum des animaux surexprimant PON3, avec des LDL moins susceptibles à l'oxydation, des HDL plus efficaces pour extraire le cholestérol à partir des macrophages et des lésions athérosclérotiques de taille réduite<sup>254</sup>. De plus, dans ce modèle, PON3 ne résidait pas dans le HDL, donc l'effet antioxydant devait se produire au niveau cellulaire<sup>254</sup>. Pour confirmer, les résultats précédents, les souris déficientes en apo E ont reçu une injection d'adénovirus afin de provoquer une surexpression transitoire de PON3. Dans ce modèle, les plaques athéromateuses étaient encore de taille réduite<sup>225</sup>. De plus, le potentiel anti-inflammatoire de PON3 a été démontré à l'aide d'un modèle d'induction au CCl<sub>4</sub> de lésions au foie. Dans ce modèle, la surexpression de PON3 a réduit la peroxydation lipidique, augmenté les concentrations de GSH et diminué les niveaux de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$ <sup>226, 255</sup>.

L'expression génique et protéique de PON3 a été détectée dans les macrophages murins et elle semble y être active puisque son activité statinase spécifique y a été détectée<sup>236</sup>. Des macrophages de souris apo E<sup>-/-</sup>, qui contiennent de grandes quantités de lipides peroxydés, ont été incubés avec de la PON3 purifiée et du LDL. La présence de PON3 a pu réduire le contenu en lipides peroxydés des macrophages et l'oxydation du LDL<sup>236</sup>. PON3 pourrait donc jouer un rôle antioxydant au niveau des macrophages en plus du HDL.

Même si les études définissant les fonctions de PON3 sont peu nombreuses, les modèles cellulaires et les animaux transgéniques fournissent des évidences convaincantes sur son potentiel antioxydant et anti-inflammatoire. PON3 semble pouvoir réduire l'oxydation du LDL et les phénomènes chémotactiques, il serait donc impliqué dans la prévention de l'athérosclérose, comme PON1 et PON2. PON3 semble cependant différent de PON1 et PON2 par la nature des substrats qu'il peut hydrolyser. Il a aussi des fonctions différentes, comme son implication dans l'obésité et le contrôle des niveaux des lipides plasmatiques. De plus, même si l'expression de PON3 est prépondérante au foie, elle a aussi été identifiée dans de nombreux tissus comme le rein, le poumon, le pancréas et l'intestin<sup>195, 256</sup>. Les effets bénéfiques de PON3 doivent donc être présents dans ces différents tissus et PON3 est donc probablement impliquée ailleurs que dans la prévention de l'athérosclérose. PON3 a d'ailleurs démontré un potentiel anti-inflammatoire au niveau du foie<sup>217, 247</sup>. L'expression de PON3 serait aussi augmentée à la fin de la période de gestation chez le rat, le mouton et l'humain et il a été suggéré qu'elle joue un rôle antioxydant chez les nouveau-nés et les

bébés prématurés<sup>257</sup>. Ses effets anti-inflammatoires et antioxydants dans des sites autres que la circulation sanguine sont aussi très attrayants, mais beaucoup de travail reste à faire afin d'élucider et de comprendre la totalité des fonctions de cette enzyme.

#### **5.4. Polymorphismes des paraoxonases**

Les polymorphismes retrouvés dans les gènes des différentes PON ont été associés à de nombreuses pathologies. Comme c'est le cas dans l'ensemble de la littérature sur les PON, les informations sont beaucoup plus abondantes sur PON1 que sur les deux autres. Même si les études associatives ne fournissent que rarement des mécanismes concrets par rapport à l'implication d'une protéine dans une pathologie, elles ont le mérite d'établir des liens qui peuvent ensuite stimuler la recherche fondamentale et la diriger vers des avenues inattendues.

##### **5.4.1. Polymorphismes de PON1**

Les principaux polymorphismes du gène de PON1 ont été bien caractérisés. La fréquence de certains polymorphismes de PON1 a été associée à différentes pathologies, comme les maladies coronariennes<sup>258</sup>, la maladie de Parkinson<sup>259</sup>, le diabète de type 2<sup>260</sup> et même les maladies inflammatoires de l'intestin<sup>261</sup>.

Dans la section codante du gène de PON1, il y a deux polymorphismes principaux. Le premier est situé en position 55, où il y a substitution d'un acide aminé leucine par une

méthionine (L55M); et le deuxième en position 192, où il y a substitution d'un acide aminé glutamine par une arginine. (Q192R)<sup>262, 263</sup>. Le polymorphisme Q192R ne semble pas affecter la masse protéique de PON1<sup>264</sup>, mais les différentes activités de PON1 sont grandement influencées par ce polymorphisme. En effet, l'activité paraoxonase semble plus élevée chez les porteurs d'une arginine (R) en position 192<sup>263-266</sup>. Par contre, l'activité arylestérase serait plus élevée chez les individus porteurs du génotype QQ en position 192<sup>267</sup>. Le polymorphisme L55M ne semble quant à lui pas affecter directement l'activité de PON1, mais plutôt son expression génique. En effet, les porteurs de l'allèle L avaient un niveau d'ARN messager (ARNm) plus élevé pour PON1<sup>268</sup>, ce qui entraînerait vraisemblablement une augmentation de la concentration en PON1 dans le sang<sup>269</sup>. Il serait cependant possible que ces observations pour le polymorphisme L55M soient simplement dues au fait que cette variante génétique est en déséquilibre de liaison avec un important polymorphisme de la région promotrice de PON1 en position -108<sup>267</sup>.

Il y a cinq polymorphismes principaux qui ont été identifiés dans ce qui est considéré comme la région promotrice de PON1, soit les 1000 bases précédant la section codante. Parmi les polymorphismes de la séquence du promoteur de PON1, plusieurs semblent impliqués dans les variations des niveaux de PON1 au niveau sanguin via la modulation de l'expression génique<sup>264</sup>. Ce serait les 200 bases qui précèdent la section codante qui auraient la plus grande importance sur la régulation de l'expression de PON1<sup>270</sup>. Le polymorphisme du promoteur de PON1 qui a la plus grande influence sur son expression est d'ailleurs situé en position -108<sup>267</sup>, position à laquelle une base cytosine ou thymine

peut être présente (le polymorphisme est donc noté T(-108)C). La variation de l'expression entraînée par ce polymorphisme pourrait s'expliquer par la présence en cette position d'un site de liaison potentiel du facteur de transcription Sp-1<sup>270, 271</sup>. Le génotype CC en position -108 augmente la concentration et l'activité de PON1 dans le sérum<sup>271</sup> et les expériences faites à l'aide de constructions permettant de mesurer l'activité du promoteur via l'activité luciférase ont aussi suggéré une augmentation de l'expression de PON1 avec le génotype CC<sup>264, 270, 272</sup>. D'autres polymorphismes de la région promotrice de PON1 ont aussi été identifiés, comme ceux en position -909<sup>264, 267, 270, 271</sup>, -824<sup>264, 270, 271</sup> et -162<sup>267, 270</sup>, mais ils ont un impact beaucoup moins important sur l'expression et l'activité de l'enzyme.

Les polymorphismes de PON1 peuvent affecter l'enzyme en modifiant son niveau d'expression génique et protéique, ou en changeant son affinité pour certains substrats ainsi que son niveau d'activité. Pour PON1, il est intéressant de noter que les fréquences alléliques varient grandement entre les différents groupes ethniques<sup>267, 273</sup>. Par exemple, la présence de l'allèle R192 est plus fréquente dans la population hispanique en comparaison à la population du nord de l'Europe<sup>269</sup>. Ceci peut avoir un grand impact sur le niveau d'activité de l'enzyme et le risque de développer différentes maladies, particulièrement l'athérosclérose. En effet, les facteurs génétiques, qui comprennent bien sûr les polymorphismes, seraient responsables à eux seuls d'environ 60% de la variation interindividuelle de l'activité de PON1, alors que les facteurs environnementaux, démographiques, métaboliques et le sexe n'expliqueraient qu'environ 30% des différences<sup>266</sup>. La connaissance des différents polymorphismes chez un individu ne peut

tout de même pas à elle seule permettre de prédire le niveau d'activité de PON1<sup>274</sup>, car la part des autres facteurs peut avoir un impact non-négligeable<sup>267</sup>, ce qui sera détaillé en profondeur dans une section subséquente. Il est aussi très important de noter que le substrat utilisé lors de l'essai enzymatique pour déterminer l'activité de PON1 doit être pris en considération lors de l'interprétation des résultats. Certains polymorphismes peuvent en effet augmenter l'activité de PON1 envers un substrat, alors que l'activité enzymatique peut être diminuée envers un autre substrat<sup>265, 266</sup>.

Dans une étude récente, l'impact des polymorphismes sur l'activité de PON1 variait en fonction des substrats utilisés. Les polymorphismes Q192R et L55M modulaient de manière significative les activités de PON1 envers les substrats : paraoxon pour la paraoxonase, phénylacetate pour l'arylestérase et dihydrocoumarin pour la lactonase. Cependant, les activités paraoxonase et arylestérase les plus élevées étaient retrouvées dans les individus 192RR/55LL, alors que l'activité lactonase la plus élevée était retrouvée chez les individus 192QQ<sup>266</sup>. Ces différences sont notoires puisque l'activité paraoxonase est principalement importante pour la détoxification de composés organophosphorés, alors que l'activité lactonase serait surtout responsable des effets antioxydants de PON1.

PON1 se retrouve associée aux particules de HDL dans la circulation et ses polymorphismes pourraient affecter cette liaison ainsi que la fonctionnalité du HDL. Le HDL provenant d'individus homozygotes 192QQ et 55LL semble être le plus efficace pour

prévenir l'oxydation des LDL<sup>275</sup>. Cependant, PON1 semble avoir une affinité plus faible pour le HDL chez les individus 192QQ<sup>276</sup>.

Les polymorphismes présents sur la séquence promotrice de PON1 peuvent aussi avoir des impacts physiopathologiques. Par exemple, une association a été démontrée entre les génotypes -108TT (expression de PON1 la plus faible) et des concentrations de glucose élevées, chez des patients souffrant d'anomalies dans le contrôle des niveaux de glucose<sup>277</sup>. Contrairement, les individus ayant le génotype -108CC (expression de PON1 la plus élevée) ont un risque réduit de maladie coronarienne<sup>278</sup>. L'impact du polymorphisme C(-909)G est moindre sur l'expression de PON1, mais le génotype -909GG (expression de PON1 plus élevée) diminue le risque d'infarctus du myocarde, particulièrement chez les hommes de moins de 60 ans<sup>279</sup>.

#### **5.4.2. Polymorphismes de PON2 et PON3**

Les polymorphismes de PON2 et PON3 ont été peu étudiés et la littérature traitant de leurs impacts sur l'activité des enzymes ou de leurs associations avec diverses maladies est très rare.

Pour PON2, un polymorphisme semble avoir un certain impact sur l'activité de l'enzyme. Il s'agit de la substitution d'une cystéine pour une sérine en position 311 (C311S). Ce polymorphisme de la séquence codante de PON2 affecte la glycosylation de l'enzyme et diminue son activité lactonase<sup>245</sup>. Cette forme polymorphique de PON2 pourrait donc

générer une enzyme avec une activité antioxydante moins élevée ayant un impact sur certaines pathologies. D'ailleurs, ce polymorphisme de PON2 semble associé au risque de souffrir de différents problèmes cardiovasculaires<sup>280, 281</sup>, de complications diabétiques<sup>282, 283</sup> et de progression vers la maladie d'Alzheimer<sup>284, 285</sup>.

Quelques études seulement ont été entreprises pour déterminer les variations génétiques de PON3. Des polymorphismes ont été identifiés en position 311 et 324, ce qui entraînait un changement d'acide aminé (S311T et G324D), mais la fréquence de ces polymorphismes était très faible et leurs impacts inconnus<sup>286</sup>. D'autres polymorphismes ont été identifiés en positions 10340 (A10340C) et 2115 (A2115T), et ils étaient associés à une activité PON1 réduite<sup>287</sup>. Beaucoup de travail reste à faire pour identifier les polymorphismes ayant un impact substantiel sur l'activité de PON3 et le risque de développer divers problèmes de santé.

## **6. Régulation de l'expression des paraoxonases**

Pour bien comprendre les fonctions des différentes PON, il est important d'analyser la régulation de leur expression génique et protéique. Ceci peut fournir des informations précieuses quant aux processus physiopathologiques dans lesquels elles sont impliquées et sur leurs fonctions potentielles dans différents organes. De plus, l'étude de la régulation des PON pourrait permettre d'identifier des avenues nutritionnelles ou pharmacologiques pour



moduler leur expression et ainsi d'avoir un impact positif sur la défense antioxydante de l'individu.

## **6.1. Régulation de PON1**

### **6.1.1. Habitudes de vie et alimentation**

De nombreuses études ont été entreprises afin d'identifier des nutriments pouvant moduler l'expression et l'activité de PON1. De même, plusieurs études se sont penchées sur les habitudes de vie favorisant un statut de PON1 élevé, ainsi que sur celles qui affectent négativement son activité.

L'impact des habitudes alimentaires, de même que du style de vie (tabac, exercice physique) sur PON1 a été évalué. La cigarette est connue pour augmenter le stress oxydant en plus de réduire les défenses antioxydantes et sa consommation est corrélée avec une diminution de l'activité de PON1<sup>288-290</sup>. De manière surprenante, une étude a identifié une corrélation négative entre la consommation de légumes, de  $\beta$ -carotène et de fibres solubles et l'activité de PON1<sup>291</sup>. De telles habitudes alimentaires sont pourtant reconnues comme favorisant le maintien d'une bonne santé<sup>292</sup>. Ces résultats pourraient probablement s'expliquer par les génotypes des individus qui peuvent venir biaiser l'interprétation des données, car les polymorphismes comptent pour plus de 50% de la variation dans l'activité de PON1<sup>266</sup>. Il a de plus été démontré que les variations génétiques dans la séquence de PON1 peuvent influencer la réponse à une diète riche en légumes<sup>291</sup>. Par ailleurs, la

quercétine, un flavonoïde de type flavonol retrouvé fréquemment dans les fruits et les légumes, a démontré la capacité d'augmenter l'expression génique et protéique chez les souris, mais l'activité de PON1 demeurait inchangée chez les humains<sup>293</sup>.

La consommation d'alcool est aussi un facteur connu pour influencer les niveaux de HDL et de LDL et la balance oxydative. Ses effets sur PON1 ont été évalués dans différentes études. Des rats ont été soumis à une faible ou à une forte consommation d'alcool durant une période de 8 semaines. La consommation élevée d'alcool réduisait l'activité de PON1 dans le sérum de 20%, mais la faible consommation l'augmentait de 20%. Ces résultats pourraient s'expliquer par un effet sur l'expression de PON1 au foie car la consommation élevée d'alcool réduisait son expression de 51%, alors qu'une faible consommation l'augmentait de 59%<sup>294</sup>. Ces résultats ont été confirmés chez l'humain; les gens consommant de l'alcool avec modération avaient une activité de PON1 fortement augmentée, alors que ceux consommant de grandes quantités d'alcool voyaient l'activité de PON1 chuter<sup>294</sup>. De plus, il a été démontré que les gens consommant de fortes quantités d'alcool ont des niveaux élevés de peroxydation lipidique au foie en parallèle avec l'élévation des différentes enzymes hépatiques comme l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase et la gamma glutamyl transférase, indiquant des perturbations au foie. Cette étude confirmait la diminution de l'activité de PON1 chez les gros buveurs d'alcool et il était suggéré que les dommages au foie réduisaient sa capacité à produire l'enzyme PON1<sup>295</sup>.

PON1 semble inactivée par un trop grand stress oxydant et l'efficacité de différentes molécules antioxydantes à prévenir cette perte d'activité a été évaluée. Le vin rouge contient beaucoup de composés phénoliques aux capacités antioxydantes importantes qui pourraient avoir un impact sur PON1 et expliquer en partie les effets bénéfiques associés à une consommation modérée d'alcool. D'ailleurs, la consommation de vin rouge et de ses antioxydants est associée à une augmentation des niveaux de cholestérol HDL et à l'inhibition de l'oxydation des LDL<sup>296</sup>. Les souris apo E<sup>-/-</sup>, plus susceptibles à développer de l'athérosclérose, ont été traitées avec du vin rouge et certains de ses antioxydants isolés, comme la quercétine et la catéchine. Ces traitements ont grandement augmenté l'activité de PON1 et réduit le développement de lésions athérosclérotiques<sup>297</sup>.

L'impact d'autres polyphénols sur l'expression génique et l'activité de PON1 a aussi été évalué. Plusieurs polyphénols d'origine alimentaire ont été testés, comme la naringinine, la flavone et la quercétine, et ils pouvaient non seulement prévenir la perte d'activité de PON1 en raison de leurs effets antioxydants, mais ils agissaient aussi en augmentant l'expression génique de PON1. Les polyphénols étudiés pouvaient augmenter l'activité du promoteur de PON1 via un élément de réponse « aryl hydrocarbon receptor » (AhR)<sup>298</sup>. La cascade de signalisation intracellulaire PPAR $\gamma$ -PKA-cAMP pourrait aussi être impliquée dans l'augmentation de l'expression de PON1 par les polyphénols retrouvés dans le jus de pomme-grenade<sup>299</sup>. Les polyphénols retrouvés dans le jus de pomme-grenade auraient aussi d'autres effets intéressants sur PON1. En plus d'augmenter son expression et son activité, ils pourraient augmenter la capacité de liaison de PON1 au HDL pour ainsi maximiser le

pouvoir antioxydant de ce dernier<sup>300</sup>. Les effets antioxydants des polyphénols sont reconnus, mais leur impact sur PON1 suggère des mécanismes d'action en relation avec les bienfaits observés suite à la consommation modérée de vin rouge et de boissons de jus de pomme-grenade et autres polyphénols sur le maintien d'une bonne santé cardiovasculaire.

Le resvératrol, un autre polyphénol retrouvé dans le vin rouge, a été étudié séparément puisque que son action pourrait être différente des autres polyphénols. Il pourrait en effet antagoniser l'activité des AhR<sup>301</sup>. Malgré tout, il a été démontré que le resvératrol pouvait lui aussi augmenter l'expression génique de PON1 de même que son activité, dans un modèle de cellules hépatiques Hu-H7. Il semblerait que l'élément de réponse AhR sur le promoteur de PON1 soit inhabituel et qu'il réponde positivement au resvératrol<sup>302</sup>.

Les effets sur l'expression et l'activité de PON1 de nombreux autres antioxydants ont aussi été évalués. Les vitamines antioxydantes C et E ont toutes les deux été associées à une activité de PON1 augmentée. Par exemple, l'induction d'hypothyroïdisme chez les rats augmentait le niveau de stress oxydant et réduisait l'activité de PON1. Par contre, lorsque les animaux étaient supplémentés avec de la vitamine E, le niveau d'activité de PON1 était de retour à la normale<sup>303</sup>. Des lapins qui étaient soumis à une diète riche en cholestérol ont aussi vu l'activité de PON1 augmenter après une supplémentation de vitamine E, possiblement en raison d'une élévation des niveaux de HDL<sup>304</sup>. Chez l'humain, des apports plus élevés en vitamines C et E sont aussi associés à une augmentation de l'activité de PON1<sup>305</sup>. D'autres études ont été entreprises afin de mieux caractériser l'impact de la

vitamine C sur PON1. Des particules de HDL isolées de sujets sains ont été soumises à un stress oxydant induit par le 2,2'-Azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride- et le 2,2'-azobis (2,4-diméthyl -4-méthoxy valéronitrile). La peroxydation lipidique ainsi générée entraînait la réduction de l'activité de PON1, mais l'ajout de vitamine C réduisait l'intensité du stress oxydant et prévenait la perte de l'activité de PON1<sup>306</sup>. Malheureusement, aucune de ces études n'a évalué l'impact des vitamines antioxydantes C et E sur l'expression génique de PON1 ou sur l'activité de son promoteur. Les bienfaits observés pourraient s'expliquer simplement par la protection de l'activité de PON1 par les effets antioxydants des vitamines. Il serait donc très important d'évaluer l'impact de ces vitamines sur l'expression de PON1 pour mieux évaluer les bénéfices potentiels.

La vitamine A a aussi un grand potentiel antioxydant<sup>307</sup> et pourrait donc avoir un impact positif sur PON1. D'ailleurs, lorsque des rats ont été soumis à une diète déficiente en vitamine A, un stress oxydant survenait et le niveau de cholestérol HDL diminuait, tout comme l'activité de PON1. La supplémentation en vitamine A chez ces animaux suffisait à normaliser les niveaux de HDL et l'activité de PON1<sup>308</sup>. La vitamine A pourrait donc avoir de l'importance pour la régulation de PON1, mais encore une fois les mécanismes ne sont pas définis.

La capacité à moduler l'expression ou l'activité de PON1 par plusieurs aliments a aussi été testée individuellement. Différentes sortes de noix sont reconnues comme ayant des effets bénéfiques sur le profil lipidique en plus d'effets antioxydants. L'effet des pistaches sur la

peroxydation lipidique, les lipoprotéines et PON1 a été évalué chez le rat. Des rats ont consommé des pistaches en proportion de 20% du total de leur diète durant 10 semaines. Ceci a généré une augmentation des niveaux de HDL et de l'activité de PON1<sup>309</sup>. Dans une autre étude, des rats ont consommé de l'avocat en proportion de plus de 20% de leur diète durant 5 semaines, ce qui a réduit les niveaux de triglycérides sanguins, augmenté le cholestérol HDL et l'activité de PON1<sup>310</sup>. L'acaï, un fruit reconnu pour ses grandes propriétés antioxydantes, a aussi pu augmenter l'activité de PON1 chez les rats<sup>311</sup>. Les dates de type Hallawi contiennent de grandes quantités de polyphénols et leur consommation élevait l'activité de PON1 chez des sujets sains<sup>312</sup>. Le Du-zhong, un extrait d'écorce d'*Eucommia ulmoides*, est utilisé en médecine traditionnelle chinoise. Ses effets sur PON1 ont été évalués chez des souris atteintes de diabète de type 2. Le Du-zhong avait des propriétés antioxydantes intéressantes, la peroxydation lipidique était réduite chez les souris, un phénomène possiblement expliqué par l'augmentation de l'activité de PON1, la SOD, la CAT et la G-Px<sup>313</sup>. La berbérine, un alcaloïde extrait des plantes utilisé en médecine traditionnelle, pourrait avoir des effets cardio-protecteurs en diminuant le niveau de cholestérol sanguin. Elle a été utilisée pour traiter des cellules hépatiques HepG2 et Hu-H7, ce qui a augmenté l'expression génique et protéique de PON1<sup>314</sup>.

Finalement, la consommation de différents produits généralement considérés comme étant bénéfiques pour la santé est associée à une meilleure activité de PON1. Ceci semble logique en vue de l'amélioration du profil lipidique et de l'augmentation des HDL, en plus de l'activité plus élevée de PON1 : tous des effets protecteurs face au développement des

maladies cardiovasculaires. Cependant, la plupart des études citées n'approfondissent pas la question des mécanismes d'action, n'analysent pas les effets sur l'expression génique et protéique de PON1 et n'étudient pas les facteurs de transcription potentiellement impliqués. Les effets sont possiblement encore seulement dus aux propriétés antioxydantes des aliments évalués.

Le statut du HDL est très important pour l'activité de PON1, puisqu'il est son transporteur dans la circulation. Des habitudes de vie ayant des effets néfastes sur les HDL, comme des habitudes alimentaires athérogènes ou le fait de fumer la cigarette<sup>315</sup> sont généralement reliées à une réduction de l'activité de PON1<sup>288, 290, 316</sup>. Au contraire, des conditions favorisant des niveaux élevés de HDL, comme par exemple le traitement avec certains fibrates, tendent à augmenter l'activité de PON1<sup>317, 318</sup>. De plus, chez les sujets sains et même chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires, un lien clair a été établi entre les niveaux de HDL, d'apolipoprotéine A-I (apo A-I), l'apolipoprotéine la plus abondante dans le HDL, et la masse protéique et l'activité de PON1<sup>319</sup>. Cette relation a été bien démontrée dans les modèles animaux. La surexpression de l'apo A-I chez les souris C57BL/6 induisait une forte augmentation des niveaux de cholestérol HDL et de l'activité de PON1<sup>320</sup>. La réciproque a aussi été démontrée : l'inactivation de l'apo A-I dans les souris C57BL/6 réduisait l'activité de PON1 de 75% et sa masse protéique de près de 40%<sup>321</sup>. Ces études suggèrent que la régulation du statut de PON1 est intimement liée à celles du HDL et de l'apo A-I. Les différents nutriments étudiés peuvent donc avoir des effets bénéfiques sur PON1 via leur pouvoir antioxydant et via l'augmentation des niveaux

de cholestérol HDL ou de l'apo A-I. Des nutriments peuvent donc s'avérer bénéfiques pour PON1 dans la circulation sanguine sans même affecter son expression génique ou protéique. Il serait cependant intéressant d'établir le répertoire des molécules agissant sur l'expression de PON1 et d'élucider les mécanismes d'action impliqués.

La qualité et la quantité des lipides ingérés affecte fortement la concentration des différentes lipoprotéines dans le sang, et devrait donc avoir un impact sur PON1. Des souris déficientes en récepteurs du LDL soumises à une diète athérogène subissent une diminution des niveaux de cholestérol HDL et de l'apo A-I. De plus, la peroxydation lipidique est augmentée dans le plasma. Quant à PON1, même si aucun changement n'était observé au niveau de son expression génique dans le foie, son activité et sa masse protéique étaient réduites dans le plasma<sup>316</sup>. Cette diminution causée par la diète athérogène peut s'expliquer par la diminution du HDL, le transporteur de PON1, mais aussi par la présence d'un stress oxydant augmenté. Ces résultats ont été confirmés dans une autre étude, alors qu'une diète enrichie en cholestérol donnée à des souris déficientes en récepteurs du LDL générait une diminution de l'activité de PON1<sup>322</sup>. Des résultats similaires ont été obtenus chez le rat, alors qu'une diète riche en gras affectait l'activité de PON1 chez les mâles et les femelles, via la diminution de son expression génique ou la diminution du HDL, respectivement<sup>323</sup>. L'expression génique de PON1 au foie pourrait donc être affectée par la diète riche en gras et la peroxydation lipidique créée par cette diète, et il a été démontré que les niveaux d'ARNm de PON1 étaient diminués dans les cellules hépatiques humaines traitées avec du LDL oxydé<sup>322</sup>.



D'autres types de lipides peuvent avoir des effets bénéfiques ou néfastes sur la santé. L'huile de poisson, riche en acides gras polyinsaturés oméga-3, a des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes<sup>324-326</sup> qui pourraient favoriser l'activité de PON1. Cependant, la supplémentation de la diète en huile de poisson chez les rats a diminué l'activité de PON1<sup>327</sup>. Ces résultats sont surprenants, mais les auteurs ont suggéré que le fait que les acides gras polyinsaturés soient très susceptibles à la peroxydation puisse être responsable de la diminution de PON1<sup>327</sup>. D'ailleurs, des repas riches en gras de cuisson, comme ceux utilisés pour la friture dans la restauration rapide, contenant de grandes quantités d'hydroperoxydes, induisent une diminution rapide de l'activité de PON1 dès la 4<sup>e</sup> heure suivant le repas, et cet effet dure jusqu'à 8 heures après le repas<sup>328</sup>. La présence de gras trans dans la diète d'individus sains peut aussi réduire les niveaux de HDL et l'activité de PON1<sup>329</sup>.

D'autres huiles sont plutôt reconnues pour leurs effets bénéfiques sur la santé, comme l'huile d'olive et l'huile d'argan. L'huile d'argan est une huile traditionnelle du Maroc qui a des teneurs élevées en antioxydants comme la vitamine E et en acides gras mono- et polyinsaturés. Elle peut réduire le stress oxydant et moduler positivement les lipides sanguins<sup>330</sup>. L'huile d'olive et l'huile d'argan, données indépendamment à des hommes en santé durant 3 semaines ont chacune augmenté l'activité de PON1 et le LDL isolé était moins susceptible à l'oxydation<sup>331</sup>. La qualité des gras consommés a donc un impact sur les lipides sanguins, mais affecte tout aussi bien l'activité de PON1.

Les résultats des nombreuses études sur l'impact de la nutrition et des habitudes de vie sur PON1 suggèrent à peu près tous la même chose. Des habitudes de vie saines, à savoir la diminution du tabagisme, une alimentation reconnue pour ses bienfaits sur le profil lipidique ou riche en antioxydants et la consommation de bons gras favorisent une activité élevée de PON1 dans le sang et donc le maintien d'une bonne santé cardiovasculaire. De plus, l'activité physique peut elle aussi augmenter l'activité de PON1<sup>332, 333</sup>, alors qu'elle est plutôt diminuée chez les enfants et les adultes souffrant d'obésité<sup>334, 335</sup>, ce qui renforce les arguments selon lesquels un mode de vie sain favorise PON1. Cependant, le grand problème de toutes ces études est que, pour la plupart, elles n'ont pas étudié l'impact des nutriments sur l'expression génique et protéique de PON1 ni les mécanismes et facteurs de transcription impliqués. De plus, PON1 pourrait jouer des rôles antioxydants ailleurs que dans la circulation sanguine et il est donc important de s'intéresser à sa régulation dans les autres organes où elle est exprimée et de mieux définir les mécanismes d'action.

### **6.1.2. Inflammation**

L'inflammation et le stress oxydant sont deux phénomènes intimement liés et sont tous deux très impliqués dans le développement de l'athérosclérose. Les modèles animaux de souris invalidées pour PON1 ont montré l'implication de cette dernière sur les risques cardiovasculaires, tout en documentant son grand potentiel anti-inflammatoire. Des études ont donc été entreprises afin d'étudier l'impact de l'inflammation sur PON1.

La phase aiguë de réponse durant la réaction inflammatoire peut affecter les particules de HDL<sup>336</sup>. Elle est caractérisée par une augmentation rapide de différentes molécules pro-inflammatoires, comme la protéine C-réactive (CRP), la sérum amyloïde A (SAA) et la molécule chimotactique MCP-1. La phase aiguë de réponse de la réaction inflammatoire a été induite chez le lapin par une injection d'huile de croton, et a aussi été étudiée sur des lipoprotéines isolées de patients avant et après une chirurgie cardiaque, ce qui cause de l'inflammation et du stress oxydant, pour son effet sur PON1. Dans les deux cas, l'activité de PON1 était diminuée dans le HDL, et l'augmentation du contenu en SAA dans le HDL corrélait avec la perte d'activité de PON1<sup>336</sup>. La phase aiguë de réponse de la réaction inflammatoire a aussi été induite chez la souris par une injection du virus influenza, ce qui a augmenté les niveaux d'IL-6 et de SAA en moins de 2 jours, et qui corrélait avec une diminution de l'activité de PON1 et de son expression protéique<sup>337</sup>.

L'impact de différentes cytokines pro-inflammatoires sur l'expression et l'activité de PON1 a aussi été étudié. Dans la lignée cellulaire hépatique murine Hepa 1-6, un traitement avec plusieurs cytokines inflammatoires, soit l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , a simultanément augmenté l'expression génique et protéique de la SAA et réduit l'expression génique de PON1. De manière intéressante, l'inhibition du facteur de transcription NF- $\kappa$ B ou la surexpression transitoire de son inhibiteur naturel le I $\kappa$ B parvenait à normaliser le niveau d'expression de PON1<sup>338</sup>. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans les souris C57BL/6, qui ont reçu une injection intra-péritonéale de lipopolysaccharides (LPS), ce qui induit une réaction inflammatoire. L'injection de LPS entraînait une forte diminution de l'expression

de PON1 et une augmentation de l'expression de la SAA 24 heures plus tard. Ces régulations semblaient encore dues au facteur de transcription NF- $\kappa$ B, puisque sa neutralisation normalisait les niveaux d'expression de PON1<sup>338</sup>. Des cellules hépatiques humaines HepG2 le traitement avec l'IL-1 $\beta$  ou le TNF- $\alpha$  produisait une diminution de l'expression génique de PON1<sup>339</sup>. De même, des hamsters ayant reçu une injection intrapéritonéale de LPS, de TNF- $\alpha$  ou d'IL-1 $\beta$  ont montré une réduction de l'expression génique et de l'activité de PON1 au foie<sup>340</sup>.

Le rôle de l'IL-6, une cytokine importante de la phase aigüe de réponse de la réaction inflammatoire, a été évalué pour son impact sur l'expression de PON1 dans les cellules HepG2. Une expression abaissée de PON1 a été observée lorsque les cellules étaient traitées avec des phospholipides oxydés, mais cet effet était aboli quand les cellules recevaient en plus un anticorps neutralisant l'IL-6. De plus, le traitement des cellules HepG2 avec de l'IL-6 uniquement a aussi conduit à une diminution de l'expression génique de PON1, équivalente à celle observée suite à l'administration de phospholipides oxydés. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* alors que des souris IL-6<sup>-/-</sup> ont reçu une injection intraveineuse de phospholipides oxydés sans qu'aucune diminution de l'activité de PON1 ne se produise, montrant l'importance de l'IL-6 dans la régulation de l'activité de PON1 par les phospholipides oxydés<sup>341</sup>. Cependant, des résultats contradictoires par rapport aux effets de l'IL-6 sur PON1 ont aussi été obtenus dans les cellules HepG2, car l'IL-6 induisait l'expression génique de PON1<sup>342</sup>. Dans l'ensemble, la plupart des études suggère que des

conditions pro-inflammatoires diminuent l'activité de PON1 de même que son expression génique, et que cette régulation pourrait passer par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B.

### **6.1.3. Stress oxydant**

Comme mentionné auparavant, PON1 est une importante composante de la défense antioxydante. Cependant, de nombreux groupes de recherche ont démontré qu'elle est inactivée par le stress oxydant possiblement après avoir joué son rôle d'antioxydant. L'ajout de PON1 à du LDL peut diminuer l'oxydation induite par le cuivre, mais l'activité de PON1 est aussitôt réduite<sup>343</sup>. De plus, l'unique présence des composantes du LDL oxydé, comme le cholestéryl arachidonate oxydé ou l'ox-PAPC, peut grandement diminuer l'activité de PON1<sup>343</sup>. Comme il a été suggéré dans les sections précédentes, la présence d'antioxydants, comme la quercétine et la glabridine, durant l'oxydation du LDL a permis de réduire la perte d'activité de PON1<sup>343</sup>.

Les propriétés antioxydantes de PON1 ont été étudiées à l'aide de différents systèmes d'induction d'oxydation du HDL. Le pouvoir antioxydant de PON1 a été démontré, mais son activité diminuait rapidement, au fur et à mesure que la présence d'hydroperoxydes lipidiques augmentait<sup>209, 344</sup>. Le système menant le plus efficacement à l'inactivation de PON1 était l'induction de l'oxydation du HDL par le cuivre. L'inactivation de PON1 était accompagnée par une capacité réduite du HDL à prévenir l'oxydation du LDL<sup>344</sup>. L'inactivation de PON1 peut se produire très rapidement, puisque sous sa forme libre ou

liée au HDL, une courte période de 10 minutes en présence de stress oxydant était suffisante pour l'inactiver complètement<sup>345</sup>. L'ajout de catalase pouvait cependant protéger PON1 de l'inactivation, suggérant que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut être un médiateur du stress oxydant impliqué dans l'inactivation de PON1<sup>345</sup>. L'activité de PON1 était aussi rapidement réduite par un autre acteur important du stress oxydant, le peroxy-nitrite<sup>211</sup>. L'activité de PON1 est le plus souvent évaluée avec le paraoxon (activité paraoxonase) ou le phénylacétate (activité arylestérase) comme substrat. Cependant, il est possible que son activité antioxydante soit dépendante d'un site actif distinct et qu'elle soit régulée différemment, car son activité peroxydase (p-nitrophényl 13-hydroperoxylinoléate utilisé comme substrat) n'était pas altérée par le stress oxydant<sup>346</sup>.

Le stress oxydant peut aussi affecter la masse protéique de PON1. À titre d'exemple, la peroxydation lipidique induite par un mélange de fer et d'ascorbate (Fe/Asc) a diminué l'activité de PON1 dans des HDL<sub>3</sub> d'humains ou de rats et dans les microsomes isolés du foie, en plus de réduire la masse protéique de PON1<sup>347</sup>.

#### **6.1.4. Stress oxydant et inflammation dans diverses pathologies**

Il a été démontré que l'activité ou l'expression de PON1 peuvent être grandement affectées par le stress oxydant et l'inflammation présents dans des conditions pathologiques. Dans les cancers gastro-œsophagiens, l'activité de PON1 est réduite et la diminution semblait corrélée avec des niveaux élevés de différents marqueurs inflammatoires dans le sang, comme la CRP et l'IL-6<sup>348</sup>. Dans un modèle animal d'infection intestinale au nématode

*Nippostrongylus brasiliensis*, l'activité de PON1 était aussi réduite dans le sérum, et cette observation corrélait avec des niveaux élevés de différentes cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ <sup>349</sup>. Dans un modèle de pancréatite induite par le taurocholate, la concentration et l'activité de PON1 étaient réduites dans le sérum<sup>350</sup>. Dans la maladie de Behçet, aussi caractérisée par de l'inflammation et du stress oxydant, les patients ont une activité de PON1 abaissée dans le sérum, des observations jumelées aux niveaux élevés d'hydroperoxydes lipidiques<sup>351</sup>. Des résultats similaires ont été obtenus chez des patients souffrant de choc septique ou d'hépatite virale aigüe<sup>352</sup>. PON1 est donc clairement affectée par des conditions d'inflammation et de stress oxydant, tant au niveau de son expression génique et protéique que de son activité enzymatique. Cependant, il est difficile de savoir si une diminution de l'activité de PON1 peut contribuer au déclenchement de certaines des maladies présentées, ou si sa diminution est simplement une conséquence de l'état pathologique. Il serait par contre intéressant de pouvoir élucider cet aspect, ce qui permettrait de mieux intervenir pour prévenir des complications.

#### **6.1.5. Régulation pharmacologique**

La régulation de PON1 par diverses molécules pharmacologiques n'a pas été grandement étudiée. Les médicaments qui ont été évalués le plus souvent pour leurs effets potentiels sur l'expression et l'activité de PON1 sont les statines et les agonistes des PPAR. Les statines sont des inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase, et sont largement utilisées pour leur capacité à réduire les niveaux de cholestérol sanguin et pour la

prévention des maladies cardiovasculaires. En plus de partager avec PON1 des bénéfices au niveau de la santé cardiovasculaire, les statines ont aussi démontré des effets antioxydants<sup>353</sup>, et c'est probablement ces bénéfices similaires à ceux de PON1 qui ont mené différents investigateurs à évaluer l'impact des statines sur PON1.

Les diètes riches en cholestérol ont un effet nocif sur PON1, réduisant son activité et augmentant aussi différents marqueurs de stress oxydant. Ceci a été confirmé chez des lapins recevant une diète riche en cholestérol durant 8 semaines<sup>354</sup>. Cependant, lorsque ces lapins recevaient de l'atorvastatine, les marqueurs de stress oxydant étaient diminués et l'activité de PON1 était normalisée<sup>354</sup>. Des effets bénéfiques des statines sur PON1 ont aussi été démontrés chez l'homme. En effet, des patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale recevant une dose quotidienne de simvastatine durant 4 mois ont vu le niveau de peroxydation lipidique diminuer dans le sérum et celui de l'activité de PON1 augmenter<sup>355</sup>. Des effets similaires ont été observés chez des patients hyperlipidémiques : le traitement à l'atorvastatine durant 6 mois entraînait une diminution de l'oxydation du LDL et une hausse de l'activité de PON1<sup>356, 357</sup>. Ces études soulignent que les statines peuvent avoir un impact bénéfique sur PON1, en plus de réduire le stress oxydant et de ses effets bien connus sur la réduction du cholestérol. Comme c'était le cas avec les nutriments antioxydants, il est possible que les effets bénéfiques des statines sur PON1 soient une conséquence de leur potentiel antioxydant. Cependant, les statines pourraient aussi avoir un impact sur l'activité du promoteur de PON1 et sur son expression génique et cet aspect a été évalué.



Pour examiner l'effet des statines sur le promoteur de PON1, des cellules HepG2 ont été transfectées avec la séquence promotrice de PON1 jumelée au gène de la luciférase, ce qui permet de déterminer le niveau d'activité du promoteur. Lorsque les cellules étaient traitées avec de la simvastatine, l'activité du promoteur de PON1 était augmentée de 250%. L'augmentation de l'activité du promoteur de PON1 semblait expliquée en partie par le facteur de transcription SREBP-2, puisqu'il était augmenté par le traitement avec la statine, et qu'il pouvait à lui seul augmenter l'activité du promoteur<sup>358</sup>. L'importance du facteur de transcription SREBP-2 dans l'augmentation de l'activité du promoteur de PON1 a été confirmée dans une autre étude où l'ajout de SREBP-2 purifié aux cellules HepG2 a augmenté l'activité du promoteur de PON1<sup>359</sup>. Cet effet pouvait par contre être renversé par l'inhibition du facteur de transcription Sp-1<sup>360</sup>. Les facteurs de transcription SREBP-2 et Sp-1 semblent donc agir conjointement pour moduler l'expression de PON1<sup>359</sup>. La pitivastatine pouvait elle aussi activer le promoteur de PON1 via l'activation de la PKC et l'augmentation de la liaison du facteur de transcription Sp-1 dans les cellules HuH7. L'expression protéique était aussi augmentée par la pitivastatine<sup>361</sup>. Des données contradictoires ont cependant été obtenues dans les cellules Hu-H7 : le traitement avec différentes statines diminuait l'expression génique et l'activité de PON1, ainsi que l'activité de son promoteur<sup>362</sup>. Une étude récente affirme par contre elle aussi que les statines peuvent avoir des effets bénéfiques sur PON1. La lovastatine donnée à des patients diabétiques durant 90 jours a augmenté l'activité de PON1 et leur LDL était moins susceptible à l'oxydation<sup>363</sup>. La présence de polymorphismes dans la séquence promotrice

de PON1 pourrait par contre influencer la modulation exercée par les statines. Le polymorphisme T(-108)C modifie la séquence de liaison du facteur de transcription Sp-1 et donc possiblement la régulation de l'activité du promoteur et de l'expression génique de PON1 par les statines<sup>360, 364</sup>, mais les études sont parfois contradictoires<sup>365</sup>. En général, les statines semblent avoir un impact bénéfique sur PON1, possiblement via l'augmentation de sa transcription et leurs effets antioxydants pouvant prévenir son inactivation.

Les PPAR (pour « Peroxisome proliferator-activated receptors ») agissent principalement au niveau du stockage des lipides et de l'oxydation des acides gras. Leurs agonistes pharmacologiques sont considérés comme cardioprotecteurs, les agonistes PPAR $\alpha$ , les fibrates, sont utilisés comme des agents hypolipémifiants, et les agonistes PPAR $\gamma$ , les thiazolidinédiones, régulent le métabolisme du glucose et sont utilisés dans le diabète de type 2.

Les données sur les effets des agonistes PPAR sur PON1 sont parfois contradictoires. Des effets négatifs sur l'activité de PON1 ont été observés chez des rats traités avec différentes doses de fénofibrate, et ce même si certains marqueurs de stress oxydant étaient abaissés<sup>366</sup>. Dans une autre étude, des rats soumis à une diète riche en fructose, ce qui augmentait la peroxydation lipidique et réduisait l'activité de PON1, ont reçu du bezafibrate, ce qui normalisait les niveaux d'activité de PON1<sup>367</sup>. Dans le modèle cellulaire des Hu-H7, un traitement à l'acide fénofibrique, la forme active du fénofibrate, augmentait l'activité de PON1 et son expression génique<sup>362</sup>. En comparaison à d'autres fibrates, l'acide

fénofibrique était d'ailleurs le plus efficace pour augmenter l'activité du promoteur de PON1<sup>362</sup>. Les résultats parfois contradictoires obtenus dans les modèles cellulaires et dans les modèles animaux peuvent s'expliquer par la durée des traitements, la dose, le type de fibrate utilisé et le modèle étudié.

Dans les études humaines aussi, les résultats sont parfois contradictoires. Des patients hyperlipoprotéïnémiques recevant du bézafibrate ou du gemfibrozil durant 8 semaines n'ont pas vu l'activité de PON1 être modulée, et ce même si les niveaux de HDL et d'apo A-I étaient augmentés<sup>368</sup>. De la même façon, d'autres patients hyperlipoprotéïnémiques traités avec du ciprofibrate ont obtenu une augmentation du niveau d'apo A-I dans le sérum, mais en combinaison avec une légère baisse non-significative de l'activité de PON1<sup>369</sup>. Plusieurs études ont cependant noté un impact positif des fibrates sur PON1 chez l'homme. Du gemfibrozil, administré à des patients atteints de diabète de type 2 durant 3 mois, a causé la réduction des niveaux de triglycérides sanguins et l'augmentation des concentrations de HDL, d'apo A-I et de l'activité de PON1<sup>317</sup>. Le traitement de patients hyperlipidémiques avec du fénofibrate a généré des effets similaires<sup>318</sup>. De plus, des patients hyperlipidémiques souffrant en plus de problèmes cardiaques traités avec du fénofibrate ont vu leurs niveaux de CRP plasmatique et de fibrinogène réduits, et l'activité de PON1 était augmentée<sup>370</sup>. Le traitement de patients atteints du syndrome métabolique avec du ciprofibrate a produit une diminution des triglycérides sanguins et du LDL oxydé, en plus de rehausser l'apo A-I, les HDL et l'activité de PON1<sup>371</sup>. En général, l'impact des fibrates, des agonistes PPAR $\alpha$ , sur PON1 semble plutôt bénéfique et pourrait s'expliquer par des

effets antioxydants et anti-inflammatoires, de même que par une régulation positive de l'expression génique de PON1 et du profil lipidique.

Les données sont moins abondantes quant aux effets des agonistes PPAR $\gamma$  sur PON1. L'impact de la rosiglitazone sur PON1 a été évalué chez des patients atteints du SIDA en plus de lipodystrophie et de résistance à l'insuline. La rosiglitazone n'avait aucun effet sur les niveaux de cholestérol HDL ou sur les différents marqueurs pro-inflammatoires testés, mais a significativement augmenté l'activité de PON1<sup>372</sup>. La rosiglitazone est couramment utilisée dans le traitement du diabète de type 2 et il a été démontré que l'activité de PON1 était augmentée par ce traitement. L'augmentation de l'activité de PON1 corrélait inversement avec les niveaux de peroxydes dans le plasma<sup>373</sup>.

De nombreuses autres molécules pharmacologiques ont été évaluées pour leurs effets potentiels sur PON1. Il s'agit en général de molécules utilisées dans la prévention des maladies cardiovasculaires ou dans le contrôle du profil lipidique. L'aspirine est largement utilisée pour la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires et démontre aussi un potentiel antioxydant et anti-inflammatoire. Une partie de ses effets bénéfiques au niveau de la circulation sanguine pourrait s'expliquer par une modulation de PON1. Effectivement, la consommation d'aspirine chez des patients souffrant de problèmes cardiaques a significativement augmenté l'activité et la concentration de PON1 dans le sang<sup>374</sup>. Ces propriétés de l'aspirine ont été confirmées dans les cellules HepG2, dans des

hépatocytes de rat et chez la souris. Dans tous ces modèles, l'aspirine augmentait l'expression génique et l'activité de PON1<sup>375</sup>.

Les effets du valsartan, un bloqueur du récepteur d'angiotensine II utilisé pour abaisser la pression sanguine, sur PON1 ont été déterminés chez des sujets diabétiques de type 2. Le valsartan semblait baisser le stress oxydant, comme le témoignait le marqueur 8-isoprostane dans l'urine, mais aucun effet n'a été noté sur l'activité de PON1<sup>376</sup>. La barnidipine, un bloqueur de canaux calciques, aussi utilisée pour les problèmes d'hypertension, a elle aussi réduit les niveaux d'isoprostane dans les urines de patients hypertendus, mais sans aucune influence sur l'activité de PON1<sup>377</sup>.

Le probucol a la capacité de réduire les niveaux de cholestérol sanguin et a aussi des propriétés antioxydantes. Il a démontré la capacité d'augmenter l'activité et la concentration de PON1 chez l'homme<sup>378</sup>, de même que chez des lapins soumis à une diète riche en cholestérol, en plus d'augmenter son expression au foie<sup>379</sup>.

L'orlistat est un médicament utilisé pour réduire l'obésité et améliorer le profil lipidique. Les patients recevant de l'orlistat ont vu leur activité de PON1 être augmentée<sup>380</sup>, ce qui constitue donc un bénéfice supplémentaire de ce médicament pour la santé cardiovasculaire.

L'ézétimibe est une molécule utilisée pour améliorer le profil lipidique par la réduction de l'absorption intestinale de cholestérol. Chez des patients hyperlipidémiques, l'ézétimibe a pu augmenter l'activité de PON1, ce qui lui confère aussi un effet bénéfique supplémentaire pour la prévention de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires<sup>381</sup>.

Quelques études ont donc été faites pour évaluer le potentiel de diverses molécules pharmacologiques sur PON1. En général, les molécules ayant des propriétés antioxydantes semblent augmenter l'activité de PON1. Il en va de même pour les molécules qui améliorent le profil lipidique. Des conclusions similaires à celles tirées quant à l'effet des habitudes de vie et de la nutrition peuvent donc être suggérées. Cependant, plusieurs études ont évalué plus en profondeur l'effet des composés pharmacologiques sur PON1. Certaines molécules ont démontré la capacité d'augmenter l'activité du promoteur de PON1 et son expression génique. De plus, des facteurs de transcription impliqués ont pu être identifiés. La compréhension de la régulation de PON1 et des mécanismes d'action est très importante pour agir et prévenir les maladies cardiovasculaires et possiblement d'autres maladies dans lesquelles le stress oxydant et l'inflammation sont impliquées. Malheureusement, il n'y a pour l'instant aucune molécule pharmacologique ayant été conçue spécifiquement pour moduler PON1.

## 6.2. Régulation de PON2

Une grande quantité de travail a été accomplie pour approfondir et comprendre la régulation de PON1 en raison de ses fonctions antioxydantes et anti-inflammatoires bien définies au niveau de la circulation sanguine. En fait, améliorer son statut pourrait s'avérer capital pour une bonne santé cardiovasculaire. La régulation de PON2 a été beaucoup moins étudiée. PON2 est différente de PON1 car il s'agit d'une protéine ubiquitaire qui exercerait ses effets antioxydants directement au niveau cellulaire. Une meilleure compréhension de sa régulation pourrait fournir des indices importants quant aux processus cellulaires dans lesquelles elle est impliquée, et dans quels organes spécifiques. Les impacts d'un meilleur statut de PON2 pourraient être encore plus importants que pour PON1, puisqu'elle agirait possiblement sur le corps entier. Certaines études suggèrent que PON1 pourrait être synthétisée dans plusieurs tissus différents<sup>195</sup>, mais en faible quantité puisque son expression est prédominante au foie<sup>182</sup>. De plus, une fois en circulation, elle ne serait pas captée par les tissus périphériques puisqu'elle ne colocalise pas avec l'apo A-I à l'extérieur de la circulation sanguine<sup>195</sup>. Le caractère ubiquitaire de PON2 lui confère donc l'avantage d'être synthétisée localement et d'exercer ses effets antioxydants au niveau cellulaire dans l'ensemble du corps.

Il est cependant plus difficile de travailler à l'étude de la régulation de PON2. En effet, contrairement à PON1, aucun substrat spécifique à PON2 n'a pu être identifié à ce jour. Il est donc extrêmement difficile d'évaluer avec justesse le niveau d'activité de PON2. Certains essais ont été mis au point, comme la mesure de l'activité lactonase envers le

dihydrocoumarin (DHC)<sup>236</sup> ou le thiobutyl butyrolactone (TBBL)<sup>382</sup>. Néanmoins, il faut préciser que le DHC ne se trouve pas être un substrat spécifique à PON2, puisque PON1 et PON3 ont chacun une activité plus élevée à son endroit en comparaison à PON2<sup>196</sup>. Quant au TBBL, il n'est pas non plus spécifique à PON2 et peut très bien être utilisé pour mesurer l'activité lactonase de PON1. Le TBBL est en fait un lactone synthétique chromogène qui ressemble aux lactones lipidiques hydrolysés par les PON<sup>194</sup>.

### **6.2.1. Inflammation et stress oxydant**

L'expression et l'activité de PON2 sont modulées dans de nombreuses situations pathophysiologiques dans lesquelles un stress oxydant ou de l'inflammation sont impliqués. Plusieurs modèles différents ont été utilisés pour déterminer l'impact de l'inflammation et du stress oxydant sur PON2. La modulation de PON2 a été évaluée dans des macrophages péritonéaux isolés de souris apo E<sup>-/-</sup>. Lorsque ces macrophages ont été soumis à un plus grand niveau de stress oxydant en comparaison aux souris normales, l'expression génique de PON2 était augmentée, de même que son activité lactonase envers le DHC<sup>236</sup>. De plus, des macrophages péritonéaux isolés de souris normales ont été soumis à un stress oxydant induit par le buthionine sulfomixine, un inhibiteur de la synthèse du glutathion, par l'angiotensin II, par des phospholipides oxydés ou par le 7-kétocholestérol, et toutes ces conditions menaient à une augmentation de l'expression génique de PON2 et de son activité lactonase envers le DHC<sup>236</sup>.



La régulation de PON2 dans les macrophages a aussi été caractérisée à l'aide d'un modèle de monocytes humains, les cellules THP-1. Durant les processus de différenciation de ces monocytes en macrophages, une augmentation graduelle de la production d'anions superoxydes est observée, en raison d'une activité accrue de la NADPH-oxydase. Cette augmentation de stress oxydant était corrélée à une augmentation de l'expression génique et protéique de PON2 et de son activité lactonase envers le dihydrocoumarin<sup>235</sup>. Cependant, lorsque de la vitamine E était ajoutée lors de la période de différenciation, les niveaux d'anions superoxydes étaient réduits, tout comme les niveaux d'activité et d'expression génique de PON2. Le rôle de la NADPH-oxydase dans la régulation de PON2 a été déterminé à l'aide des souris p47<sup>phox-/-</sup>, chez qui cette enzyme est déficiente, et dans lesquelles l'augmentation de PON2 était abolie. Différents inducteurs et inhibiteurs de la NADPH-oxydase ont aussi respectivement augmenté ou annulé l'augmentation de l'expression génique de PON2. Cette régulation de l'expression génique pourrait impliquer AP-1, un facteur de transcription sensible au stress oxydant<sup>235</sup>. Pour élucider le rôle de PON2 dans les macrophages, d'autres études sont cependant nécessaires, puisque qu'il a été démontré que son expression génique et protéique est diminuée dans les lésions athéromateuses<sup>383</sup>.

Les effets du stress oxydant sur PON2 ont été caractérisés dans d'autres conditions. L'activateur de plasminogène urokinase (uPA) contribue à générer un stress oxydant. Dans des cellules THP-1 traitées avec l'uPA, une augmentation de l'expression de PON2 a été observée parallèlement à une augmentation des niveaux de stress oxydant. De plus, les

macrophages isolés de souris PON2<sup>-/-</sup> étaient moins bien protégés d'un stress oxydant induit par l'uPA<sup>384</sup>, ce qui suggère que PON2 a un rôle antioxydant à jouer au niveau des macrophages. L'augmentation de l'expression de PON2 pourrait aussi être partiellement expliquée par l'activation du facteur de transcription SREBP-2, puisque son inhibition abolissait l'augmentation de PON2 par l'uPA<sup>385</sup>.

La régulation de PON2 dans les macrophages a été étudiée à l'aide de d'autres méthodes d'induction de stress oxydant et d'autres antioxydants. Le stress oxydant a été induit par l'AAPH, le cuivre ou le Fe/Asc dans les macrophages J774 A.1. Comme dans les études citées précédemment, l'induction de stress oxydant par ces différents facteurs a augmenté l'expression génique et protéique de PON2, de même que son activité envers le TBBL<sup>382</sup>. Cependant, le traitement de ces cellules avec divers antioxydants, comme le « butylated hydroxytoluène » (BHT), la vitamine E ou le punicalagine, un antioxydant présent dans le jus de pomme-grenade, ont tous conduit à une hausse de l'activité de PON2, sans produire d'impact sur l'expression protéique. Pour la régulation par le stress oxydant et les antioxydants, les facteurs de transcription PPAR $\gamma$  et AP-1 pourraient être partiellement responsables, puisque l'incubation des macrophages avec des inhibiteurs spécifiques à ces facteurs de transcription abolissait les effets sur l'expression de PON2<sup>237</sup>. Tous ces résultats montrent que l'expression de PON2 est étroitement régulée par les niveaux de stress oxydant présents dans le macrophage. L'augmentation de l'expression et de l'activité de PON2 pourraient constituer des mécanismes pour compenser le stress oxydant présent dans le macrophage lors de son activation.

### 6.2.2. Nutrition et pharmacologie

PON2 pourrait avoir un impact sur de nombreuses maladies en raison de son caractère ubiquitaire. Quelques études commencent donc à s'intéresser à sa régulation par diverses molécules pharmacologiques et nutritionnelles.

Les macrophages J774A.1 recevant de la rosiglitazone, un agoniste PPAR $\gamma$ , voient une augmentation de l'expression génique de PON2<sup>237</sup>. De plus, des polyphénols isolés du jus de pomme-grenade pouvaient aussi induire l'expression génique de PON2, probablement via PPAR $\gamma$ , puisque cet effet était atténué en présence d'un inhibiteur de PPAR $\gamma$ <sup>237</sup>. Le traitement de macrophages RAW264.7 avec de la quercétine a aussi augmenté l'expression génique et protéique de PON2. Cependant, la quercétine n'a eu aucun effet sur PON2 chez des hommes en santé, possiblement parce qu'elle est rapidement métabolisée chez l'humain<sup>386</sup>.

Dans les macrophages, l'inflammation et le stress oxydant induits par une exposition à de hauts niveaux de glucose mènent à la diminution de l'expression génique et de l'activité de PON2. Cependant, un traitement à la glabridine, un phytoestrogène extrait de la racine de réglisse, pouvait augmenter l'expression génique et l'activité de PON2 dans de telles conditions<sup>387</sup>.

L'acide arachidonique, un acide gras polyinsaturé considéré généralement comme ayant des effets pro-inflammatoires, a augmenté l'expression génique et l'activité de PON2 dans les macrophages, possiblement via les facteurs de transcription AP-1 et PPAR $\gamma$ <sup>388</sup>. De manière intéressante, l'expression génique et l'activité de PON2 étaient diminuées dans les macrophages péritonéaux isolés de souris déficientes en  $\Delta 6$ -désaturase, qui ne peuvent pas convertir l'acide linoléique en acide arachidonique<sup>388</sup>.

Les glucocorticoïdes pourraient aussi réguler l'expression génique de PON2. Le traitement de fibroblastes NIH3T3 avec de la dexaméthasone a augmenté l'expression génique de PON2 via le récepteur des glucocorticoïdes et un élément de réponse aux glucocorticoïdes retrouvé sur le promoteur de PON2<sup>389</sup>.

La littérature est encore peu abondante sur les facteurs régulant PON2. Il semble cependant que des conditions pro-oxydantes et pro-inflammatoires altèrent son expression et son activité. La modulation de PON2 en réponse à ces stimuli pourrait donc agir comme phénomène compensatoire pour faciliter le retour à l'équilibre de la balance pro-/antioxydante. Cependant, énormément de travail reste à accomplir pour bien comprendre la régulation de PON2 et pour pouvoir délibérément agir sur son expression et avoir un impact bénéfique sur le maintien de la santé.

### 6.3. Régulation de PON3

Parmi les trois PON, c'est définitivement sur PON3 que la littérature est la moins abondante. Pourtant, PON3 pourrait avoir un impact important sur l'athérosclérose car elle est elle aussi liée au HDL et y exerce des effets antioxydants. En plus, elle a récemment été liée à l'obésité et au contrôle des niveaux de lipides sanguins. Les travaux futurs sur les PON devraient se pencher de plus en plus sur la régulation de PON3 afin de pouvoir identifier les différents processus physiologiques dans lesquelles elle est impliquée et de pouvoir agir sur son expression par les voies pharmacologique et nutritionnelle.

Contrairement à PON2, une méthode spécifique a été mise au point pour mesurer l'activité de PON3. PON3 est en effet la seule PON à pouvoir hydrolyser des substrats de taille importante, comme les statines ou le spironolactone<sup>390</sup>. L'activité qualifiée de « statinase » de PON3 peut être mesurée par HPLC<sup>391</sup>. L'utilisation de cette méthode est cependant jugée difficile et est peu répandue pour l'instant<sup>194</sup>.

#### 6.3.1. Inflammation et stress oxydant

La modulation de PON3 a été évaluée dans des macrophages péritonéaux isolés de souris apo E<sup>-/-</sup>, qui sont soumis à un grand niveau de stress oxydant. L'expression génique de PON3 demeurait inchangée, mais son activité statinase était réduite. Le traitement des souris apo E<sup>-/-</sup> avec du jus de pomme-grenade ou de la vitamine E augmentait l'activité statinase, ce qui montre que PON3 est sensible au niveau de stress oxydant. Cependant, lorsque les macrophages J774 A.1 ont été traités avec du jus de pomme-grenade ou de la

vitamine E, une diminution de l'activité statinase de PON3 a été notée<sup>237</sup>. Dans une autre étude, l'incubation de macrophages péritonéaux isolés de souris normales avec différents systèmes pro-oxydants a aussi réduit l'activité de PON3 sans avoir d'impact sur son expression génique<sup>236</sup>. PON3 semble donc définitivement régulée par le stress oxydant, mais les effets sont parfois contradictoires, ce qui nécessite des travaux additionnels. De plus, aucune étude ne s'est attardée à la régulation pharmacologique et nutritionnelle de PON3.

## **7. Connaissances sur les paraoxonases et l'intestin**

Les agents potentiellement pathogènes ou nocifs sont très abondants dans l'intestin et de nombreux mécanismes de défense doivent être mis en place pour surveiller, tolérer ou agir envers les bactéries résidentes et inoffensives, les bactéries pathogènes, les antigènes alimentaires, les molécules pro-oxydantes provenant de la diète et les cellules épithéliales desquamées, ainsi que de nombreux métabolites générés par la flore intestinale<sup>392</sup>. Une multitude de molécules pro-oxydantes peut provenir de la diète, comme le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les lipides peroxydés, les sulphites et plusieurs autres composés<sup>158</sup>, ce qui peut augmenter la charge de stress oxydant à laquelle les défenses intestinales doivent faire face. Une perte d'équilibre entre l'intensité du stress oxydant et la capacité des défenses antioxydantes, ou une perte de coordination dans la réponse antioxydante pourrait être responsable du déclenchement des maladies inflammatoires de l'intestin<sup>144</sup>.

La présence de PON1, PON2 et PON3 a été détectée dans plusieurs segments du tube digestif humain, dont le duodénum et le côlon<sup>184</sup>. Leur présence a aussi été détectée dans l'intestin des souris C57BL/6 et les cellules intestinales humaines Caco-2<sup>184</sup>. De part leurs fonctions antioxydantes et anti-inflammatoires, démontrées principalement au niveau de la circulation sanguine et du macrophage, elles pourraient s'avérer des protéines importantes pour le maintien de l'homéostasie intestinale. Les PON pourraient potentiellement aider à maintenir la fonction et l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, contrôler la balance pro-/antioxydante et ainsi aider à prévenir le développement des maladies inflammatoires de l'intestin ou faciliter la guérison et prolonger les périodes de rémission.

Des polymorphismes de PON1 et PON2 ont d'ailleurs été identifiés comme facteurs de risque potentiels des MII. Chez les juifs Ashkénazes porteurs de l'allèle 192RR de PON1, une protection face au développement d'une MII est constatée<sup>261</sup>. Pour PON2, les homozygotes 148GG et 311CC étaient moins fréquents chez les enfants atteints de MII que chez les contrôles<sup>393</sup>. Ces résultats suggèrent donc que le statut des PON peut avoir un impact au niveau intestinal et être associé au développement d'une MII.

Chez les patients atteints de colite ulcéreuse, dans laquelle l'inflammation et le stress oxydant sont omniprésents, l'activité de PON1 est réduite dans le sérum<sup>394</sup>. Ces observations ont été confirmées à l'aide d'échantillons sanguins provenant de patients atteints de maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse, dans lesquels une diminution de l'activité de PON1 a aussi été notée<sup>395</sup>. De plus, des biopsies intestinales prélevées chez des

patients souffrant de maladie de Crohn ou de maladie cœliaque ont montré une réduction de l'expression génique de PON1 au niveau intestinal<sup>396</sup>.

Les fonctions de PON2 ont aussi été sommairement étudiées dans le tube digestif. Les conditions inflammatoires et pro-oxydantes retrouvées dans la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse ou la maladie cœliaque n'ont pas affecté l'expression génique de PON2, mesurée dans des biopsies intestinales. Pour vérifier l'exactitude de ces résultats, des cellules Caco-2 ont été traitées avec les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  et IL-1 $\beta$  et aucun effet n'a été obtenu sur l'expression génique de PON2<sup>396</sup>.

L'expression génique de PON3 a aussi été étudiée dans des biopsies intestinales provenant de patients atteints de la maladie de Crohn, de la colite ulcéreuse ou de la maladie cœliaque. L'ARNm de PON3 a été détecté chez un patient sur 14 atteints de colite ulcéreuse, et chez 3 patients sur 17 atteints de maladie de Crohn, en comparaison à 10 sujets sains sur 25<sup>396</sup>. L'inflammation et le stress oxydant retrouvés dans ces maladies semblent donc affecter l'expression de PON3. Par contre, il est très surprenant que l'expression de PON3 ait été détectée chez moins de la moitié des sujets sains; des problèmes méthodologiques pourraient être responsables de tels résultats. Dans le modèle cellulaire des Caco-2, un stress oxydant induit à l'aide de Fe/Asc n'a pas altéré l'expression génique de PON3, mais l'activité statinase était diminuée<sup>184</sup>.



Les connaissances sur les PON et l'intestin ne sont pas très abondantes. Malgré tout, la présence des PON au niveau intestinal, leur modulation en situation de stress oxydant et d'inflammation et l'association de certains de leurs polymorphismes avec le risque de développer une MII suggèrent fortement qu'elles ont des rôles importants à jouer dans l'intestin. De plus, l'implication importante du stress oxydant dans les MII et le fort potentiel antioxydant et anti-inflammatoire des PON justifie l'étude de la régulation et des fonctions des PON au niveau intestinal, et de leur implication potentielle dans les MII.

## **II-Projet de recherche**

Les maladies inflammatoires de l'intestin, soit la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, sont deux désordres intestinaux complexes et aux facteurs de risque multiples. Dans les deux cas, une inflammation incontrôlée et aux causes imprécises se développe au niveau intestinal, et entraîne des conséquences sérieuses pour les individus atteints.

Malgré plusieurs dizaines d'années de recherches intensives à travers le monde, les causes précises des MII demeurent inconnues. Malheureusement, la maladie de Crohn ne peut jamais être totalement guérie et les médicaments ne servent qu'à contrôler et alléger les symptômes et à tenter de prévenir les rechutes. La colite ulcéreuse peut par contre être guérie, mais au prix d'une chirurgie lors de laquelle le côlon doit être retiré<sup>31</sup>.

La chirurgie n'est pas toujours une approche intéressante pour le patient, particulièrement en pédiatrie, puisqu'elle peut grandement affecter sa qualité de vie. Pourtant, environ 70 à 80 % des patients atteints de maladie de Crohn et 40 % des gens atteints de colite ulcéreuse devront avoir recours à la chirurgie<sup>31</sup>. Les médicaments ont eux aussi de nombreux effets secondaires<sup>26</sup>. Ces maladies sont de plus en plus présentes en pédiatrie, une population jeune dans laquelle les effets secondaires indésirables dus aux médicaments sont encore plus présents et où la chirurgie ne devrait se pratiquer qu'en dernier recours<sup>38</sup>.

Il faut donc redoubler d'effort au niveau de la recherche fondamentale afin de mieux comprendre les causes et les facteurs de risque de ces maladies et trouver des approches alternatives et plus spécifiques afin de maintenir les périodes de rémission et prévenir les rechutes. En comprenant mieux les causes de même que les facteurs déclenchant les

périodes de rechute, il serait aussi possible d'empêcher ces maladies de refaire surface et l'impact sur la qualité de vie des patients serait énorme.

Dans cette optique, le stress oxydant est aujourd'hui reconnu comme un acteur important non seulement de la pathogenèse des MII, mais certains auteurs avancent même qu'une défense antioxydante déficiente pourrait être responsable du déclenchement de ces maladies<sup>42, 144</sup>. Le projet de recherche présenté dans cette thèse de doctorat a donc tenté d'analyser le lien entre inflammation et stress oxydant au niveau intestinal, en se concentrant sur la régulation et le rôle des enzymes antioxydantes paraoxonases dans les cellules épithéliales intestinales.

## **1. Hypothèse**

En raison de leur puissante capacité antioxydante, principalement démontrée dans la circulation sanguine, et de leur présence tout au long du tube digestif, il est possible que les enzymes paraoxonases soient impliquées dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Les paraoxonases pourraient jouer des rôles majeurs au niveau intestinal comme le maintien de la balance pro- et antioxydante, le contrôle du niveau d'inflammation et la protection de la barrière épithéliale intestinale. Au niveau intestinal, la démonstration de telles fonctions pour les paraoxonases pourrait mettre en évidence le rôle protecteur de ces enzymes dans la pathogenèse et potentiellement l'étiologie des maladies inflammatoires de l'intestin.

## 2. Objectifs principaux

La présence des différentes PON dans les cellules intestinales sera vérifiée, de même que la localisation de PON2 à l'intérieur de la cellule et au niveau du tube digestif humain sera aussi assurée.

La modulation de l'expression génique et protéique des PON dans des contextes de stress oxydant et d'inflammation au niveau intestinal sera évaluée, afin de déterminer si ces enzymes sont régulées dans de telles conditions physiopathologiques, ce qui pourrait suggérer une implication dans ces processus.

Certaines composantes nutritionnelles et pharmacologiques pouvant affecter l'expression génique et protéique des PON au niveau intestinal seront testées. Identifier des agents modulateurs des PON permettrait d'agir de façon simple pour augmenter la défense antioxydante de l'intestin et ainsi avoir un impact potentiel chez les patients atteints de MII.

Dans le but de définir les rôles et les propriétés physiologiques de PON2 dans l'intestin, un modèle cellulaire d'inactivation sera mis sur pied. Les conséquences de la forte diminution de PON2 dans la cellule intestinale seront analysées, particulièrement en ce qui a trait aux réponses antioxydante et inflammatoire.

## **3. Méthodologie**

### **3.1. Culture cellulaire**

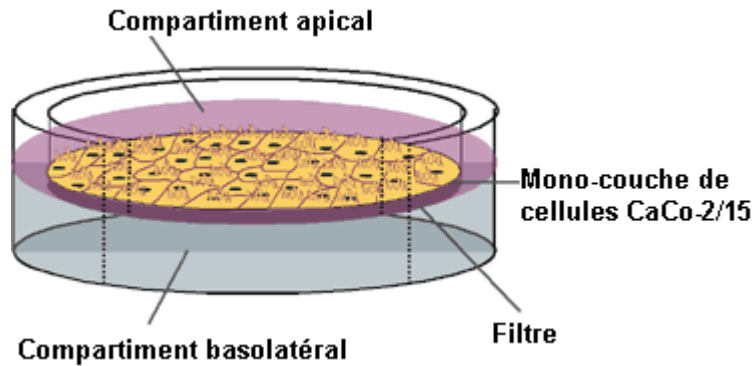
Les cellules intestinales Caco-2/15 ont été le principal modèle cellulaire utilisé pour le présent programme scientifique. Ces cellules épithéliales humaines sont dérivées d'un adénocarcinome colorectal et ont la capacité de se différencier et d'acquérir les caractéristiques physiologiques de l'intestin grêle<sup>397</sup>. Les cellules clonales Caco-2/15 ont été isolées par nos collaborateurs Dr. Quaroni et Beaulieu, et il s'agit de cellules sélectionnées à partir de la lignée cellulaire Caco-2 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) en fonction du niveau d'expression de la sucrase-isomaltase<sup>398</sup>. Ce modèle cellulaire intestinal est largement utilisé, particulièrement pour l'étude de l'absorption et du transport intestinal des graisses et de plusieurs nutriments, de l'assemblage et de la sécrétion des lipoprotéines<sup>399, 400</sup>, de la balance pro-et anti-oxydante et de l'inflammation<sup>401</sup> et des processus de différenciation cellulaire<sup>398, 402-404</sup>. Phénotypiquement, ces cellules forment des microvillosités, des dômes et des jonctions serrées<sup>403</sup>, ce qui peut être démontré par des techniques de microscopie électronique, d'immunocytochimie et de mesure de la résistance électrique trans-épithéliale<sup>405</sup>.

Les cellules Caco-2/15 ont été cultivées à 37°C, sous 5% de CO<sub>2</sub>, dans du milieu «minimal essential medium» (MEM) (Wisent, St-Bruno, Québec), supplémenté de 1% de pénicilline-streptomycine, 1% d'acides aminés non-essentiels pour MEM (Invitrogen, Carlsbad, Californie) et de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Wisent). Les cellules Caco-2/15 ont été maintenues en culture dans des flacons de 75-cm<sup>2</sup> (Corning Glass Works,

Corning, NY) et utilisées entre les passages 20 et 25. Les cellules étaient trypsinisées (0.05% trypsin-0.5 mM EDTA, Invitrogen) lorsqu'elles atteignaient environ 70 à 90% de confluence et fractionnées (1:5).

Pour les expériences sur la régulation des PON (voir Article 1, page 122),  $1 \times 10^6$  cellules / puits ont été déposées sur des plaques de 6 puits contenant des insertions de filtres de polyester poreux (pores de 0.4- $\mu\text{m}$ ) (Corning Glass Works, Corning, NY). La culture des cellules Caco-2/15 sur ces filtres permet la différenciation cellulaire et la polarisation apicale et basolatérale (voir Figure 7, page 104). Les cellules étaient cultivées sur filtre durant 21 jours, afin d'assurer une pleine différenciation<sup>5, 402, 406</sup>. Le milieu de culture était changé à tous les 2 ou 3 jours.

Pour les expériences sur les impacts de l'inactivation de PON2 (voir Article 3, page 198),  $1 \times 10^6$  cellules / puits ont été déposées sur des plaques de 6 puits sans filtre et infectées immédiatement avec des lentivirus, alors qu'elles n'avaient pas encore adhérentes à la plaque. Les expériences étaient réalisées 10 à 12 jours après l'atteinte de la confluence, un moment où les cellules expriment de nombreux marqueurs de différenciation<sup>404</sup>, car plus la période de différenciation était longue, moins importante était l'inactivation de PON2 observée. Le milieu de culture était changé à tous les 2 ou 3 jours.



**Figure 7.** Représentation d'un puits contenant un filtre poreux sur lequel les cellules Caco-2/15 sont déposées. Cette façon de cultiver les cellules Caco-2/15 permet la différenciation et la polarisation de ces cellules intestinales; le pôle apical représente la lumière intestinale et le côté basolatéral correspond à la circulation sanguine.

### 3.2. Vérification de l'intégrité cellulaire

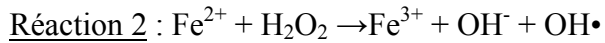
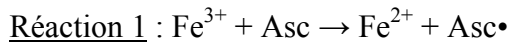
Afin de valider l'intégrité cellulaire des Caco-2/15 et de vérifier l'état de différenciation des cellules, différents marqueurs ont été utilisés. L'expression protéique de la villine<sup>407</sup> et l'expression génique de la sucrase-isomaltase<sup>408</sup> ont été utilisées en tant que marqueurs de différenciation. La villine est une protéine importante pour la formation de la bordure en brosse des cellules épithéliales intestinales<sup>409</sup> alors que la sucrase-isomaltase catalyse l'hydrolyse du sucrose<sup>398</sup>. Leur expression caractérise la différenciation des cellules Caco-2, la villine étant exprimée dès le 3<sup>e</sup> jour suivant l'atteinte de la confluence et la sucrase-isomaltase dès le 6<sup>e</sup><sup>404</sup>.



Pour vérifier l'établissement de jonctions serrées entre les cellules, différentes méthodes peuvent être utilisées. Lorsque les cellules sont cultivées sur filtre, il est possible de vérifier l'établissement des jonctions serrées par la mesure de la résistance électrique trans-épithéliale en plaçant une électrode dans le milieu apical, et une dans le milieu basolatéral<sup>405</sup>. Cette technique ne peut pas être réalisée si les cellules sont cultivées sur des plaques régulières. Il est cependant possible de mesurer l'expression génique de la E-cadhérine<sup>410</sup> comme marqueur de jonctions serrées et de perméabilité cellulaire, puisqu'il s'agit d'une protéine transmembranaire importante pour l'adhésion inter-cellulaire dans la couche des cellules épithéliales<sup>411</sup>. La E-cadhérine est exprimée dès le 3<sup>e</sup> jour suivant l'atteinte de la confluence cellulaire<sup>404</sup>.

### 3.3. Traitements cellulaires

Afin d'induire un stress oxydant, les cellules Caco-2/15 ont été incubées avec une combinaison de Fer/ascorbate (Fe/Asc, 200  $\mu$ M/2 mM, Sigma) durant 4 à 6 heures. L'acide ascorbique est généralement considéré comme un antioxydant. Cependant, lorsqu'il est mis en présence de fer, des dommages peroxydatifs sont induits à l'endroit de l'ADN, des lipides et des protéines<sup>412</sup>. Ces dommages seraient induits en partie par la formation du radical ascorbyl (Asc•, réaction 1), mais principalement via la réaction de Fenton. En effet, lorsque de l'acide ascorbique est ajouté à du milieu de culture, il y a génération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui pourra à son tour réagir avec le fer via la réaction de Fenton et générer le très dommageable radical hydroxyle (OH•, Réaction 2)<sup>158</sup>.



Les antioxydants BHT (0.5 mM, Sigma) et Trolox (0,5 mM, Sigma), un dérivé soluble de la vitamine E, ont aussi été ajoutés aux cellules Caco-2/15 1 heure avant l'incubation et lors du traitement avec le Fe/Asc<sup>413, 414</sup>. Leur rôle servait à mettre en évidence la contribution du stress oxydant induit par le Fe/Asc.

Afin de déclencher une réaction inflammatoire, différents agents pro-inflammatoires ont été utilisés. Les cellules Caco-2/15 ont été traitées avec des LPS (Sigma) durant 1 à 24 heures, à des concentrations variant entre 50 et 200 µg/ml. Les cytokines pro-inflammatoires TNF-α (250 ng/ml, Medicorp, Montréal) et interféron-γ (IFN-γ, 20 U/ml, Roche Diagnostics) ont aussi été ajoutées aux cellules Caco-2/15 durant 20 heures<sup>400, 401, 415</sup>. De plus, le «cafféic acid phenethyl ester» (CAPE, 10 µM, Sigma) a été utilisé pour inhiber la translocation du facteur de transcription pro-inflammatoire NF-κB vers le noyau<sup>416, 417</sup>.

Des agonistes des PPAR ont aussi utilisés afin d'étudier leur effet sur la régulation de l'expression des PON. Les cellules Caco-2/15 ont été traitées durant 20 heures avec de la rosiglitazone (50 µM, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan), un agoniste PPARγ, et avec le WY-14643 (250 µM, Sigma), un agoniste PPARα<sup>415</sup>.

Une pré-incubation de 18 à 20 heures lors de laquelle les cellules étaient placées dans du milieu MEM non-supplémenté de SVF précédait systématiquement les traitements cellulaires.

### **3.4. Extraction d'ARN et analyse de l'expression protéique par RT-PCR**

Pour analyser l'expression génique de différents gènes, l'ARN total était d'abord extrait des cellules Caco-2/15 à l'aide du réactif TRIzol (Invitrogen), et la quantité d'ARN extrait était déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre. Pour obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc), l'enzyme «MMLV-reverse transcriptase» (Invitrogen) a été utilisée. La transcription inverse de 3µg d'ARN en ADNc durait 50 minutes à 37°C.

Par la suite, l'ADNc obtenu était amplifié par PCR à l'aide d'une enzyme *Taq* polymérase (Feldan Bio, Québec). En général, entre 20 et 40 cycles d'amplification étaient utilisés, selon les conditions suivantes : dénaturation à 95°C durant 30 sec, température d'hybridation spécifique à chaque paire d'amorces durant 30 sec et élongation à 72°C durant 30 sec. Les différentes paires d'amorces utilisées, de même que les conditions précises pour chacune d'elles sont détaillées dans le Tableau III, page 109. Pour chaque paire d'amorces, le nombre de cycles optimal avait été déterminé au préalable afin de s'assurer d'être dans la phase exponentielle de l'amplification et d'éviter la saturation du signal obtenu. De plus, les résultats obtenus étaient corrigés selon l'amplification du gène glyceraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase (GAPDH). Les réactions de PCR ont été réalisées dans le thermocycleur UNO II de Biometra et les bandes obtenues ont été

visualisées sous UV sur des gels d'agarose de 1% contenant du bromure d'éthidium. La quantification des bandes obtenues était réalisée à l'aide du programme UN-SCAN-IT gel 6.1.

Gène	Amorces	Amplicon	Température d'hybridation	Nombre de cycles
GAPDH	F- AGAAGGCTGGGGCTCATT R- GGGCCATCCACAGTCTTCT	256 bp	58°C	21
PON1	F- GCCTAATGGACTGGCTTTCA R- ACTTGGCATCTGGATGGTTC	242 bp	58°C	38
PON2	F- TGATTCAGCAAATGGGATCA R- GCTTCTGGCCATTAGGATGA	212 bp	58°C	25
PON3	F- TCTTGGATCTTCGCTGGACT R- CCACTAAGGTGCCCAACTGT	216 bp	58°C	30
SOD-1	F- AGGGCATCATCAATTTTCGAG R- ACATTGCCCAAGTCTCCAAC	217 bp	58°C	23
SOD-2	F- CGACCTGCCCTACGACTACG R- TGACCACCACCATTGAACTT	198 bp	58°C	22
SOD-3	F- GGTGCAGCTCTCTTTTCAGG R- ACATGTCTCGGATCCACTCC	181 bp	58°C	30
GSH-Reductase	F- CAGTGGGACTCACGGAAGAT R- AAACCCTGCAGCATTTCATC	205 bp	58°C	27
GSH-Peroxidase	F- TTCGCTCTGAGGCACAACC R- ACAGGGCTCCAAATGATGAG	151 bp	58°C	28
Catalase	F- GCCTGGGACCCAATTATCTT R- GAATCTCCGCACTTCTCCAG	203 bp	58°C	23
IL-6	F- GAGGCACTGGCAGAAAACAA R- TGGCATTGTGGTTGGGTCA	274 bp	60°C	38
IL-8	F- CTGCGCCAACACAGAAATTA R- ATTGCATCTGGCAACCCTAC	238 bp	58°C	37
TNF- $\alpha$	F- TGCTTGTTTCTCAGCCTCTT R- ATCCCAAAGTAGACCTGCC	602 bp	58°C	38
MCP-1	F- CCCAGTCACCTGCTGTTAT R- GAGTTTGGGTTTGCTTGTC	201 bp	58°C	35
HNF4 $\alpha$	F- CAGATGATCGAGCAGATCCA R- CGTTGGTTCCCATATGTTCC	157 bp	58°C	28
PGC1 $\alpha$ <sup>418</sup>	F- TCAGTCCTCACTGGTGGACA R- TGCTTCGTCTGTCAAAAACAG	351 bp	58°C	32
PGC1 $\beta$	F- TGTTTCAGACAGAACGCCAAG R- ACACCGGTAGGTGATGAAGC	213 bp	58°C	30
Sucrase-isomaltase <sup>408</sup>	F-AGGGATTGTAATTTCTCGTTCCC R-GGGGTAACCATAAATGCTGG	481 bp	58°C	29
E-cadherin <sup>410</sup>	F- CCTTCCTCCCAATACATCTCCC R- TCTCCGCTCCTTCTTCATC	432 bp	58°C	26
Occludin	F- GAAGCCAAACCTCTGTGAGC R- GAAGACATCGTCTGGGGTGT	229 bp	58°C	30
Villin	F- CAAGACAGGCTCACTACCA R- TGTCATAGGACAGGCTGCTG	203 bp	58°C	27

**Tableau III.** Amorces et conditions d'utilisation pour les réactions de PCR.

### **3.5. Immunobuvardage de type Western**

L'expression protéique était déterminée par immunobuvardage de type Western. Les cellules Caco-2/15 étaient récoltées dans le réactif d'extraction de protéines de mammifère (M-PER, Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL) dans lequel une mixture d'anti-protéases (Roche Diagnostics, Laval, Québec) avait été ajoutée. Les lysats cellulaires récoltés étaient ensuite sonifiés afin d'assurer une homogénéisation efficace et la concentration en protéines de chacun des échantillons était déterminée par la méthode de Bradford (Bio-Rad, Mississauga, Ontario).

Pour les immunobuvardages de type Western, les échantillons de protéines étaient dénaturés dans un tampon contenant du SDS et du  $\beta$ -mercaptoéthanol et chauffés 10 min à 100°C. Ils migraient ensuite sur un gel SDS-PAGE de 7,5 % pour séparer les différentes protéines selon leur poids moléculaire, puis étaient transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes étaient d'abord incubées 1 heure à température ambiante avec du lait écrémé afin de bloquer les sites de liaison non-spécifiques, puis un anticorps primaire dirigé vers une protéine d'intérêt était incubé sous agitation avec la membrane durant une nuit à 4°C. Les membranes étaient ensuite rincées et incubées 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à l'enzyme «horseradish peroxidase», dirigé contre l'animal hôte dans lequel l'anticorps primaire avait été produit. Les différents anticorps utilisés, de même que les conditions précises pour chacun d'eux sont détaillées dans le Tableau IV, page 111. L'expression protéique de la  $\beta$ -actine était toujours utilisée pour confirmer qu'une quantité équivalente de protéine avait été chargée

sur les gels. Les signaux obtenus après le développement des films étaient quantifiés à l'aide du programme UN-SCAN-IT gel 6.1.

	<b>Provenance</b>	<b>Animal hôte</b>	<b>Dilution</b>
<b>1<sup>er</sup> anticorps utilisés</b>			
$\beta$ -actine	Sigma	Souris	1/250 000
PON1	Invitrogen	Lapin	1/1 000
PON2	Invitrogen	Lapin	1/2 000
PON3	Hyperomics Pharma	Poulet	1/4 000
NF- $\kappa$ B p65	Santa Cruz Biotechnology	Chèvre	1/10 000
I $\kappa$ B $\alpha$	Cell Signaling	Lapin	1/5 000
Villine	BD Biosciences	Souris	1/2 000
Keap-1	Abcam	Lapin	1/1 000
Nrf2	Abcam	Lapin	1/5 000
<b>2<sup>e</sup> anticorps utilisés</b>			
Anti-Souris	Jackson ImmunoResearch	Chèvre	1/10 000
Anti-Lapin	Jackson ImmunoResearch	Souris	1/10 000
Anti-Chèvre	Jackson ImmunoResearch	Lapin	1/10 000
Anti-Poulet	Jackson ImmunoResearch	Âne	1/10 000

**Tableau IV.** Anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type Western.

### 3.6. Marqueurs de stress oxydant

Pour estimer la peroxydation lipidique, la quantité de MDA dans les lysats cellulaires et dans le milieu de culture était mesurée par HPLC. Les profils obtenus pour le MDA sont similaires dans les deux cas, mais le niveau est 5 à 10 fois plus élevé dans le milieu de culture, ce qui rend la détection plus facile<sup>401, 413, 414</sup>. Pour mesurer le MDA, les échantillons provenant de milieu de culture ou de lysats cellulaires doivent d'abord être traités avec une solution de sodium tungstate à 10 % ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ , Sigma) de façon à précipiter les protéines. À la suite de cette réaction, les surnageants sont prélevés et réagissent pendant 1 heure à 95°C avec un volume équivalent d'une solution d'acide thiobarbiturique à 0.5% (TBA; Sigma). À la suite de cette réaction, la solution devient rosée s'il y a présence de MDA dans l'échantillon [(TBA) 2-MDA], et à la suite d'une extraction au 1-butanol, la solution est séchée et précipitée sous azote à 37°C. L'extrait séché ainsi recueilli est resuspendu dans la phase mobile composée de phosphate de potassium déhydrogénique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )/méthanol (70:30, pH 7.0) et cette solution est injectée dans un HPLC pour la détection et quantification du MDA réalisée à l'aide d'une courbe standard.

Le ratio du glutathion réduit sur le glutathion oxydé (GSH/GSSG) est un bon indicateur du niveau de stress oxydant auquel est soumise la cellule. Il a été déterminé suite à l'exposition des cellules au Fe/Asc à l'aide du kit Bioxytech GSH/GSSG-412 (OxisResearch, Portland, OR). Les cellules Caco-2/15 étaient d'abord lavées deux fois au PBS et récoltées dans l'acide métaphosphorique 5%. Elles étaient ensuite centrifugées à 1000 x g à 4°C durant 10 min. Les surnageants étaient divisés en deux aliquots, le premier destiné à la détermination



de la concentration de glutathion total, et le second, dans lequel du 1-méthyl-2-vinyl-pyridium trifluorométhane sulfonate était ajouté afin de se lier au GSH, servant ainsi à la mesure du GSSG. Les échantillons étaient conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse. Pour déterminer les concentrations de GSH total et de GSSG, le chromogène DTNB, l'enzyme G-Réd et le NADPH étaient ajoutés à l'échantillon et l'absorbance était mesurée à 412 nm à toutes les 30 sec durant 3 min. Les concentrations de GSH total et de GSSG pouvaient alors être calculées à l'aide d'une courbe standard.

Le  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en tant que produit important des réactions de stress oxydant, a aussi été mesuré dans le milieu de culture. 100 uL de milieu de culture des cellules Caco-2/15 étaient recueillis et ajoutés à 900 uL de réactif FOX (pour 100 ml: 270 uL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré, Xylénol orange 5 mM,  $\text{FeCl}_2$  12,5 mM, BHT 40 mM, dans le méthanol à 80%) et incubés à température ambiante durant 30 min. L'absorbance était alors déterminée à 560 nm et les concentrations de  $\text{H}_2\text{O}_2$  étaient calculées à l'aide d'une courbe standard.

### **3.7. Production et titrage des lentivirus**

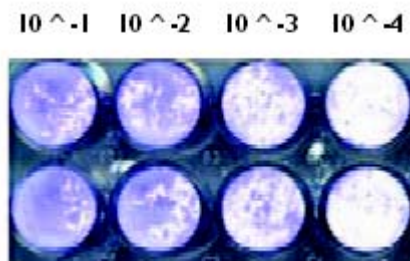
Pour la production de lentivirus, les cellules HEK293 FT (Invitrogen) ont été utilisées. Elles ont été cultivées à  $37^{\circ}\text{C}$  sous 5% de  $\text{CO}_2$  dans le «Dulbecco's modified eagle medium» (DMEM) (Wisent) supplémenté de 1% de pénicilline-streptomycine (Invitrogen), 1% d'acides aminés non-essentiels (Invitrogen), 1% de Glutamax (Invitrogen), 1% de solution de sodium pyruvate (Invitrogen) et 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of généticine, en plus de 10% de

SVF (Wisent). Les cellules HEK293 FT ont été cultivées dans des pétris de 10 cm<sup>2</sup>. Pour la production de lentivirus, 5 x 10<sup>6</sup> cellules/pétri étaientensemencées suite à une trypsinisation et elles étaient immédiatement transfectées.

Les ARN d'interférence (ARNi) ciblant l'ARNm de la paraoxonase 2 humaine et clonés dans le vecteur pLKO.1-puromycine ont été achetés chez Open Biosystems (Huntsville, Alabama). Immédiatement après l'ensemencement des cellules HEK293 FT (5 x 10<sup>6</sup> cellules/pétri), elles ont été transfectées par la méthode standard au calcium/phosphate avec 5 µg d'ADN des plasmides suivants: pLP1, pLP2, pLP/VSVG (Invitrogen), en combinaison avec le vecteur pLKO.1 vide (utilisé comme Mock) ou avec le vecteur contenant les ARNi anti-PON2 sur support pLKO.1. Ces différents plasmides permettent l'assemblage par les cellules HEK293 FT de lentivirus contenant le vecteur pLKO.1 vide ou les ARNi anti-PON2. 18 heures après la transfection, 10 mM de sodium butyrate (Sigma) ont été ajoutés afin d'augmenter l'efficacité de la transfection, puis le milieu a été changé 24 heures après la transfection. 72 heures après la transfection, les lentivirus se retrouvent dans le milieu de culture des cellules HEK293 FT. Le milieu était donc récolté et filtré sur une membrane 0.45 µm pour éliminer les débris cellulaires, aliquoté et conservé à -80°C<sup>407, 419</sup>.

Les cellules HeLa ont été utilisées pour le titrage des lentivirus. Elles ont été cultivées à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans le MEM supplémenté de 1% de pénicilline-streptomycine et 1% acides aminés non-essentiels, en plus de 10% de SVF. Pour le titrage, 1 x 10<sup>5</sup>

cellules/puits sur une plaque de 12 puits étaientensemencées et immédiatement infectées avec des dilutions sériées des solutions de lentivirus, en présence de 4 µg/mL de polybrène (Sigma), pour faciliter l'infection. 72 heures après l'infection, 2 µg/mL de puromycine (Sigma) étaient ajoutés afin de sélectionner les cellules infectées, et ce, durant 10 jours. Le milieu de culture était changé à tous les 2 ou 3 jours. Suite à la période de sélection, les colonies cellulaires résistantes à la puromycine ont été colorées à l'aide d'une solution de 1% de cristal violet dans l'éthanol à 10% (voir Figure 8, page 115). Le décompte des colonies résistantes permet de déterminer approximativement le nombre de lentivirus dans les différentes préparations et ainsi, il est possible d'infecter les cellules avec un nombre équivalent de lentivirus dans les différents groupes.



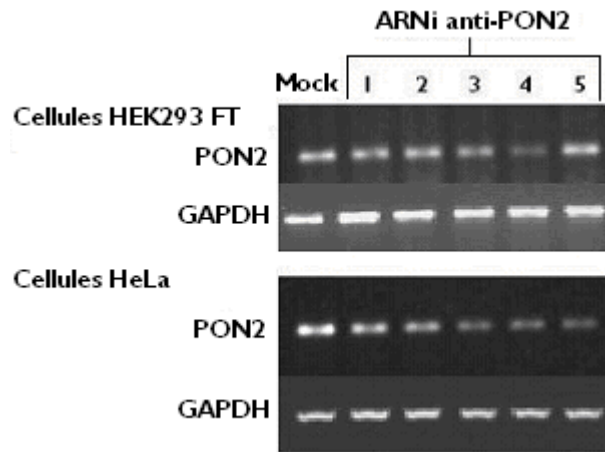
**Figure 8.** Représentation d'un titrage de lentivirus à l'aide de dilutions sériées. Les colonies de cellules HeLa résistantes à la puromycine, après une période de sélection de 10 jours, sont colorées au cristal violet. Les dilutions les plus faibles ne permettent pas de dénombrer les colonies, mais il est possible de le faire pour les dilutions plus importantes et ainsi obtenir une approximation du nombre de lentivirus dans les différentes solutions.

### **3.8. Invalidation de PON2 dans les cellules Caco-2/15**

Différentes constructions d'ARNi ciblant l'ARNm de PON2 humain ont été testées afin d'identifier celle réduisant le plus son expression. Des cellules HEK293 FT et HeLa ont été utilisées pour cette vérification puisqu'il s'agit de cellules faciles à transfecter, ce qui permet de faire un choix rapidement en ce qui a trait à la construction à utiliser. Les cellules ont été transfectées selon la méthode du calcium/phosphate avec les 5 constructions d'ARNi anti-PON2 obtenues de la compagnie Open Biosystems et l'expression génique de PON2 a été déterminée par RT-PCR et comparée à celle du vecteur vide PLKO.1 (Mock). La construction numéro 4 a donné l'invalidation la plus importante (voir Figure 9, page 117) dans les deux types cellulaires testés et c'est donc celle qui a été choisie pour la totalité de l'étude.

Pour l'invalidation de PON2 dans les cellules Caco-2/15, des lentivirus contenant la construction numéro 4 anti-PON2 ont été générés dans les cellules HEK293 FT (voir section précédente).  $1 \times 10^6$  cellules Caco-2/15 ont étéensemencées dans chaque puits de plaques de 6 puits avec 2 mL de milieu MEM + 1% de pénicilline-streptomycine, 1 % d'acides aminés non-essentiels, 10% de SVF et 4  $\mu\text{g/mL}$  de polybrène pour faciliter l'infection<sup>58</sup>. Les cellules étaient alors immédiatement infectées avec 3 mL de solution lentivirale durant 3 jours. Les cellules étaient ensuite trypsinisées et divisées 1:3 dans des plaques de 6 puits et une période de sélection débutait par l'addition de 2  $\mu\text{g/mL}$  de puromycine afin d'obtenir l'invalidation la plus prononcée possible. Après avoir atteint la confluence, les cellules étaient conservées en culture durant 10 à 12 jours, une période à

laquelle elles sont pleinement différenciées, et différents traitements cellulaires étaient appliqués. Pour chaque expérience, le niveau d'invalidation de PON2 était déterminé par RT-PCR et immunobuvardage de type Western. Pour les contrôles, des cellules infectées par des lentivirus contenant le vecteur pLKO.1 vide ont été utilisées (appelées Mock tout au cours de l'étude). L'expression de PON2 avait été comparée au préalable entre des groupes de cellules non-infectées et les groupes de cellules Mock et invalidées pour PON2.



**Figure 9.** Détermination de l'efficacité des constructions d'ARNi pour invalider l'expression de PON2. Des cellules HEK293 FT et HeLa ont été transfectées selon la méthode du calcium/phosphate avec 5 constructions d'ARNi anti-PON2 (Open Biosystems) et l'expression génique de PON2 a été déterminée par RT-PCR et comparée à celle du Mock. La construction numéro 4 a donné une invalidation importante dans les deux types cellulaires testés et c'est celle qui a été sélectionnée pour la totalité de l'étude.

### 3.9. Activité des enzymes antioxydantes endogènes

Pour mesurer l'activité des enzymes antioxydantes endogènes, les cellules Caco-2/15 étaient récoltées dans un tampon de lyse hypotonique (10 mM HEPES, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF).

L'activité SOD a été déterminée selon la méthode de McCord *et al.*<sup>94</sup>. Brièvement, l'anion superoxyde est généré par l'addition de xanthine et de xanthine oxydase à la réaction et l'oxydation du tampon de réaction est monitorée en spectrophotométrie à 550 nm durant 5 min, sans ajouter d'échantillon. Il s'agit alors d'une valeur de référence. Le même mélange réactionnel est ensuite reproduit, mais en ajoutant de l'échantillon, le tampon de réaction se trouve alors moins oxydé en raison de la présence des SOD dans l'échantillon. L'activité SOD totale de l'échantillon peut ainsi être calculée.

L'activité de la CAT a été déterminée à l'aide d'un protocole adapté de Jiang *et al.*<sup>420</sup>. Brièvement, l'oxydation du xylénol orange est suivie par spectrophotométrie à 560 nm en présence d'ions ferreux. Pour obtenir une valeur de référence, 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont ajoutés au réactif FOX (décrit précédemment). L'échantillon est ensuite ajouté à la même concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la réaction se fait sur glace durant 5 min précisément. La réaction est arrêtée lorsque 100 uL sont prélevés et ajoutés à 900 uL de réactif FOX. En raison de la présence de la CAT dans l'échantillon, le xylénol orange est moins oxydé par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la différence avec la valeur de référence permet de calculer l'activité de la CAT.

Pour l'activité de la G-Px, les homogénats cellulaires étaient ajoutés à un tampon phosphate contenant 10 mM de GSH, 0.1 U de l'enzyme glutathion réductase et 2 mM de NADPH, puis l'addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.5%) initiait la réaction. L'absorbance était ensuite mesurée à toutes les 30 sec à 340 nm durant 5 min.

Pour l'activité de la G-Réd, les homogénats cellulaires étaient ajoutés à un tampon phosphate contenant 2 mM de NADPH, puis l'addition de 10 mM de GSSG initiait la réaction. L'absorbance était ensuite mesurée tous les 30 sec à 340 nm durant 5 min.

### **3.10. Analyses statistiques**

Les valeurs présentées sont la moyenne  $\pm$  l'erreur standard. Les statistiques ont été analysées à l'aide de tests de t bilatéraux de Student lorsque seulement les valeurs de 2 groupes étaient comparées. Lorsque plus de 2 groupes étaient comparés, le test de l'ANOVA était priorisé, suivi d'un post-test de Tukey afin de comparer les différents groupes entre eux. Une différence statistique était considérée comme significative lorsque la probabilité «p» était inférieure à 5%, ou 0,05.

## **4. Articles scientifiques**



## **4.1. Article 1**

**Précourt L.P.**, Seidman E, Delvin E, Amre D, Deslandres C, Dominguez M, Sinnett D, Levy E. Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Juillet 2009, 41(7):1628-37.

### **4.1.1. Apport original et contribution des co-auteurs**

Cet article confirme la présence des PON dans l'intestin, en plus d'analyser leur régulation principalement en situation de stress oxydant et d'inflammation. Il établit aussi le lien potentiel entre les PON et les MII. En tant que premier auteur, ma contribution a été majeure puisque j'ai participé à la planification du travail, au choix et à la réalisation des expériences présentées dans le manuscrit. J'ai aussi participé à l'élaboration, la rédaction et à la révision de l'article, sous la supervision du Dr Levy. Les autres co-auteurs (Dr Seidman, Dr Delvin, Dr Amre, Dr Deslandres et Dr Sinnett) ont contribué par leurs suggestions et commentaires, et participé à la révision du manuscrit. Le Dr Michel Dominguez a fourni une aide scientifique et technique dans la réalisation des expériences.

## **Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members**

**Louis-Philippe Precourt<sup>a</sup>, Ernest Seidman<sup>b</sup>, Edgard Delvin<sup>c</sup>, Devendra Amre<sup>d</sup>, Colette Deslandres<sup>d</sup>, Michel Dominguez<sup>a</sup>, Daniel Sinnott<sup>d</sup> and Emile Levy<sup>a\*</sup>**

From the Departments of <sup>a</sup>Nutrition, <sup>c</sup>Biochemistry and <sup>d</sup>Pediatrics, Université de Montréal, Research Centre, CHU Sainte Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

<sup>b</sup>Research Institute, McGill University, Campus MGH, C10.148.6, Montréal (Québec), Canada

**Running Head:** A Comparison of PON Expression in Caco-2/15 cells

**Address for correspondence:**

\*Dr. Emile Levy  
GI-Nutrition Unit  
CHU Sainte-Justine  
3175 Côte Ste-Catherine  
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5  
Tel.: [REDACTED]  
Fax: [REDACTED]  
E-mail: [REDACTED]

**ABSTRACT**

The paraoxonase (PON) gene cluster contains three members (PON1, PON2, and PON3), located on chromosome 7q21.3-22.1. Until now there has been little insight into their regulation in human intestine. This study was designed to determine the regulation of PONs by oxidative stress and inflammatory factors. Differentiated Caco-2/15 cells, cultured on polycarbonate Transwell filter inserts, exhibited transcripts of the 3 PONs whereas Western blot revealed the protein expression of PON2 and PON3 only. Iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation, lipopolysaccharides (LPS), tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  induced differential effects on the gene expression and protein mass of PONs. In particular, LPS down-regulated PON2 protein expression, which was accompanied with decreased levels of I $\kappa$ B $\alpha$ , the inhibitor of the proinflammatory transcription factor Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B). Selective inactivation of NF- $\kappa$ B by the action of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) partially attenuated but did not abolish LPS-triggered decline of PON2. However, the combination of CAPE and antioxidants completely abrogated the negative impact of LPS on PON2. Therefore, our data indicate that oxidative stress and proinflammatory agents selectively affect the expression of PONs. Our findings also suggest that both NF- $\kappa$ B pathway and lipid peroxidation are implicated in LPS-dependent diminution of PON2.

**Keywords:**

PON, peroxidation, regulation, inflammation, Caco-2 cells

**ABBREVIATIONS**

BHT;	Butylated hydroxytoluene
CAPE;	Caffeic acid phenethyl ester
FBS;	Fetal bovine serum
HDL;	High-density lipoprotein
IFN- $\gamma$ ;	Interferon- $\gamma$
LDL;	Low-density lipoprotein
LPS;	Lipopolysaccharides
MDA;	Malondialdehyde
MEM;	Minimal essential medium
NF- $\kappa$ B;	Nuclear factor-kappa B
PON;	Paraoxonase
PPAR;	Peroxisome proliferator-activated receptor
ROS;	Reactive oxygen species
TNF- $\alpha$ ;	Tumor necrosis factor alpha

## **INTRODUCTION**

High reactive oxygen species (ROS) concentrations can overwhelm cellular defenses and lead to cellular damage, such as DNA strand breakage, derangement of membrane ion transport systems, enzymes and other proteins and abundant lipid peroxidation. Very often the disturbance in the pro-oxidant/antioxidant balance is implicated in various pathologies, including hypertension, atherosclerosis, diabetes, and chronic kidney disease (Ross, 1999). Therefore, adequate levels of antioxidant defenses are necessary to avoid harmful effects of an excessive ROS production. Although paraoxonase (PON) was initially identified as an enzyme capable of hydrolyzing organophosphate compounds, there is now a growing body of evidence that it plays an antioxidant and anti-inflammatory role (Aviram and Rosenblat, 2005). In fact, the PON family is composed of three members (PON1, PON2, PON3) and the genes coding for these enzymes are all located next to each other on the long arm of chromosome 7 (7q21.3-q22.1) (Primo-Parmo et al., 1996). PONs are enzymes originally described based on their ability to hydrolyse organophosphates. However, their enzymatic characterization revealed that they evolved as lactonases. For example, PON1 hydrolyzes a broad range of substrates and has been traditionally described as paraoxonase/arylesterase. However, it recently became evident that PON1 is in fact a lactonase with lipophilic lactones constituting its primary substrates (Draganov et al., 2005; Khersonsky and Tawfik, 2005). PON2 is able to hydrolyse and inactivate N-acyl-homoserine lactones whereas PON3 can hydrolyze bulky drug substrates, such as lovastatin and spironolactone (Draganov et al., 2005). PON1 and PON3 are expressed in the liver and excreted in the blood where they are associated with the high-density lipoprotein (HDL) particle (Reddy et al., 2001; Mackness et al., 1985). PON2 is not present in blood, but is expressed widely in a number of tissues, including the liver, lungs, brain and heart (Mochizuki et al., 1998). Of

the PON family, PON1 is the most investigated and best understood member. Not only does PON1 prevent low-density lipoprotein (LDL) oxidation, but it is also capable of increasing HDL-mediated cholesterol efflux from macrophages, which may explain its anti-atherogenic properties. Similar to PON1, PON2 and PON3 inhibit LDL lipid peroxidation and inhibit the ability of this pro-atherogenic lipoprotein to induce monocyte chemotaxis (Aviram and Rosenblat, 2004).

Only a few articles reported the presence of PON components in the small intestine (Levy et al., 2007; Shamir et al., 2005). Moreover, their regulation has not been thoroughly examined in the gut. Therefore, the aim of the present study was to document the expression and the modulation of PONs in intestinal Caco-2/15 cells.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture**

Caco-2/15 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in minimal essential medium (MEM) (GIBCO-BRL, Grand Island, NY) containing 1% penicillin-streptomycin and 1% MEM nonessential amino acids (GIBCO-BRL) and supplemented with 10% decompeted fetal bovine serum (FBS) (Flow, McLean, VA). Caco-2/15 cells (passages 20–30) were maintained in T-75-cm<sup>2</sup> flasks (Corning Glass Works, Corning, NY). Cultures were split (1:6) when they reached 70–90% confluence, by use of 0.05% trypsin-0.5 mM EDTA (GIBCO-BRL). For individual experiments, cells were plated at a density of 1 x 10<sup>6</sup> cells/well on 24.5-mm polyester Transwell filter inserts with 0.4-µm pores (Costar, Cambridge, MA), in MEM (as described above) supplemented with 5% FBS. The inserts were placed into six-well culture plates, permitting separate access to the upper and lower compartments of the monolayers. Cells were cultured for 21 days postconfluence, at which the Caco-2/15 cells are highly differentiated and appropriate for lipid synthesis (Grenier et al., 2007; Sane et al., 2006; Marcil et al., 2002; Levy et al., 2001). The medium was refreshed every second day.

### **Antibodies against PONs**

The PON1 and PON2 polyclonal antibodies (Abs) were prepared by Invitrogen (Carlsbad, California) and PON3 was prepared by HyperOmics Farma Inc. (Montreal, Quebec, Canada). The specificity of the Abs was evaluated by various methods, which recognized the specific PONs among various proteins, Western blotting following the incubation of the Abs in the presence or absence of specific antigens, the omission of the primary PONs Ab in Western blot and the identification of the PONs sequences following immunoprecipitation and SDS-PAGE. It is also important to note that pilot studies were

initiated to demonstrate (i) the specificity of the PONs polyclonal Ab in humans; and (ii) the equivalent response to PONs Abs from human tissues, which were simultaneously tested by PAGE and Western blot.

### **Western Blots**

To assess the presence of PON1, PON2 and PON3 and evaluate their mass, Caco-2/15 cells were homogenized and adequately prepared for Western blotting as described previously (Levy et al., 2004). The Bradford assay (BioRad), was used to estimate protein concentration. Proteins were denatured in sample buffer containing SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol, separated on a 10% SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Non specific binding sites of the membranes were blocked using defatted milk proteins followed by the addition of primary antibodies directed against PON1, PON2 and PON3. The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Even if identical protein amounts of tissue homogenates were applied, the  $\beta$ -actin, as a reference protein, was used to confirm equal loading on SDS-PAGE. Molecular size markers were simultaneously loaded on gels (data not shown on the figures). Blots were developed and the mass of PON1, PON2 and PON3 was quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and the UN-SCAN-IT gel 6.1 software. Importantly, the utilization of differential loading and quantification suggested a dynamic range of densitometric measurements.

### **RT-PCR**

Experiments for mRNA quantification as well as for GAPDH (as a reference or a house-keeping gene) were performed using the UNO II thermocycler (Biometra) as reported previously (Montoudis et al., 2008; Sane et al., 2006). Approximately 30–40 cycles of



amplification were used at 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 30 s. For PON1, conventional RT-PCR did not reveal the presence of its transcript in Caco-2/15 cells, and OneStep RT-PCR (Qiagen) had to be performed. Amplicons were visualized on standard ethidium bromide-stained agarose gels. Under these experimental conditions relative to RT-PCR, specifically, the cycles for PON1, PON2, PON3 and GAPDH were 31, 31, 35 and 30, respectively corresponding to the linear portion of the exponential phase. Fold induction was calculated using GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) as the reference gene and quantification was determined with the software UN-SCAN-IT gel 6.1.

Primers	used:	GAPDH	(F-AGAAGGCTGGGGCTCATT/R- GGGCCATCCACAGTCTTCT);
		PON1	(F-GCCTAATGGACTGGCTTTCA/R- ACTTGGCATCTGGATGGTTC);
		PON2	(F-TGATTCAGCAAATGGGATCA/R- GCTTCTGGCCATTAGGATGA);
		PON3	(F-TCTTGGATCTTCGCTGGACT/R- CCACTAAGGTGCCCAACTGT);
		TNF- $\alpha$	(F-TGCTTGTTCCCTCAGCCTCTT/R- ATCCCAAAGTAGACCTGCCC)

### **Effect of oxidative stress and antioxidants**

To determine whether lipid peroxidation was responsible for alterations in PONs protein expression, Caco-2/15 cells were incubated with iron/ascorbate (200  $\mu$ M/2 mM) for 6 hours. The antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) (0.5 mM) and Trolox (0,5 mM) were added to the apical compartment of Caco-2/15 cells for 1 h before incubation with iron/ascorbate (200  $\mu$ M/2 mM).

### **Effect of proinflammatory agents**

Various proinflammatory agents were tested including LPS (50 and 200  $\mu$ g/ml), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ , 250 ng/ml) and Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ , 20 U/ml). Caco-2/15 cells were incubated with those pro-inflammatory agents added to the apical compartment

for 24 h with LPS and 20 h with TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . A time-profile experiment was also performed in order to analyze the impact of LPS on gene and protein expression after 1 h, 4 h and 24 h. Additionally, caffeoyl phenethyl ether (CAPE, 10  $\mu$ M) was employed to inhibit the translocation of the transcription factor NF- $\kappa$ B to the nucleus.

### **Estimation of lipid peroxidation**

The amount of free malondialdehyde (MDA) formed during the reaction was determined by HPLC, as we previously described (Bernotti et al., 2003). Proteins were first precipitated with a 10% sodium tungstate ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ) solution (Aldrich, Milwaukee, WI). The protein-free supernatants were then reacted with an equivalent volume of 0.5% (wt/vol) thiobarbituric acid solution (TBA; Sigma, St. Louis, MO) at 90°C for 60 min. After cooling to room temperature, the pink chromogen [(TBA) 2-MDA] was extracted with 1-butanol and dried over a stream of nitrogen at 37°C. The dry extract was then resuspended in a potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )/methanol mobile phase (70:30, pH 7.0) before MDA determination by HPLC with fluorescence detection.

### **Statistical Analysis**

All values were expressed as the mean  $\pm$  SEM. The data were evaluated by ANOVA, where appropriate, and the differences between the means were assessed using the Tukey's post test.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Before focusing on the regulation of the different PONs, we first examined their gene expression and protein mass in Caco-2/15 cells. PCR analyses revealed the presence of PON1, PON2 and PON3 in Caco-2/15 cells (Figure 1), but OneStep RT-PCR had to be used to detect PON1. On the other hand, Western blot was able to detect only PON2 and PON3 proteins. Since the absence of PON1 was intriguing, we loaded SDS-PAGE gels with higher concentrations of homogenate proteins after immunoprecipitation and could not detect any PON1 signal (data not shown). On the other hand, our previous studies illustrated the presence of PON1 within HDL employing our antibodies (Trudel et al., 2005). We have also investigated human and rat intestine without more success (Trudel et al., 2005), whereas rat liver tissue disclosed a clear PON1 protein signal (Figure 1), indicating that the quality of the antibodies or technical procedures are not related to the lack of ability to detect PON1 protein in the intestine. These findings are at variance with the observations reported by Shamir et al. (Shamir et al., 2005) who documented the presence of all PON proteins in Caco-2 cells and gastrointestinal biopsies from humans. At present, we have no valid explanations for the discrepancy concerning PON1 except the differences in experimental procedures.

Given the potential functions of PONs in the intestine as detoxifiers, antioxidants and quorum-quenching mediators (Shamir et al., 2005), we evaluated in a second step the effect of oxidative stress on the expression of PONs. As expected, incubation of Caco-2/15 cells with iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation induced a marked increase in MDA levels (Figure 2) and a significant decrease in the gene expression of all the PON family members (Figure 3). Additionally, iron-ascorbate reduced the protein mass of PON2 without affecting that of PON3 (Figure 3). Importantly, the pre-incubation of Caco-2/15 cells with

strong antioxidants, such as BHT and Trolox, markedly attenuated the decline in the expression of PONs (Figure 3). The current observations suggest that PONs may have important antioxidant capacity that could prevent impairment of breakdown of membrane integrity, ensuring the maintenance of cellular homeostasis and functions.

Gram-negative bacterial species constitute the main source of endotoxin in the gut microflora (Ulevitch and Tobias, 1999). Lipopolysaccharides (LPS) are a potent stimulus of the host's immune response via its capacity to come into contact with intestinal gall and to induce the proinflammatory cytokine cascade. LPS characteristically activates neutrophils, monocytes, and macrophages via its CD14 membrane receptor (Ulevitch and Tobias, 1999). An increasing body of evidence points to the direct effect of LPS on intestinal epithelial cells via toll-like receptors (Cario et al., 2000). LPS can induce cell proliferation (Chakravorty and Kumar, 1999), modulate energy metabolism (Fukushima et al., 1999), and augment the production of inflammatory cytokines by enterocytes (Ogle et al., 1997). The high numbers of *E. coli* in the inflamed intestine point towards an important role of bacterial lipoproteins or LPS in the exacerbation of intestinal immunopathology. We then tested the modulation of PONs by LPS. As illustrated in Figure 4, the effects of LPS were concentration-dependent. A concentration of 200 µg/ml lowered PON1 and PON3 mRNA and was ineffective towards PON2 compared with control cells. Conversely, a concentration of 50 µg/ml upregulated PON2 mRNA without any impact on PON1 and PON3 (Figure 4). Regarding the protein mass, LPS at both concentrations lessened that of PON2 and only a trend of decrease was noted for PON3. A time-profile experiment with LPS was carried out to analyze the regulation of PONs, and possibly better correlate gene and protein modulation (Figure 5). PON1 gene expression was significantly down-regulated after 4 h and 24 h of incubation with LPS. Similarly, there was a reduction in the

PON3 transcript, which was noted only after 24 h, and no modulation was observed for its protein mass. As to PON2 gene expression, it was not modulated by 200 µg/mL LPS, but its protein mass was significantly decreased after 24 h only.

In order to elucidate the mechanisms behind the changes elicited by LPS on the expression of PONs, we turned to the nuclear factor kappa B (NF-κB), which represents a robust transcription factor that initiates a cascade of inflammatory events as soon as the inhibitory IκB protein is degraded allowing the translocation of NF-κB from the cytosol to the nucleus (Siebenlist et al., 1994). Following the addition of LPS, Caco-2/15 cell homogenates were analyzed by Western blot, and the expression of the 37-kDa protein IκBα, and the p65 subunit of the NF-κB protein were evaluated. As illustrated in Figure 6, cells treated with LPS exhibited decreased quantities of IκBα (Figure 6A) and elicited a higher ratio of NF-κB/ IκBα (Figure 6B), which indicates IκBα degradation in the cytosol as well as the release of NF-κB that can then be translocated to the nucleus with the ability to induce or repress gene transcription. To unravel the role of NF-κB in regulating LPS-mediated PONs expression, we proceeded to the selective inhibition of NF-κB by the action of CAPE, a potent and specific inhibitor (Meriin et al., 1998). There was a slight up-regulation of PON1 gene expression by CAPE, which might be related to an inhibition of basal NF-κB activation in control conditions. Interestingly, the activation of NF-κB was confirmed given the induction of the expression of NF-κB target gene TNF-α (Figure 6C). Indeed, inflammation induced with 200 µg/mL of LPS for 24 h increased TNF-α expression by almost 7-fold, and this increase was reduced (~ 50%) after CAPE supplementation (Figure 6C). Pre-treatment with CAPE prior to challenge with LPS also abolished LPS-dependent decreases in PON1 and PON3 gene expression (Figure 7). Moreover, at the protein level, beneficial effects were positively noted on PON2 protein mass (Figure 7). Finally, the

exposure of Caco-2/15 cells to the combination of antioxidants and CAPE inhibitor significantly suppressed the negative effects of LPS exerted on PON2 protein mass (Figure 7). In keeping with this, our findings indicate that antioxidants and NF- $\kappa$ B inhibitors may help preserve PON2 expression and overcome oxidative stress and inflammation induced by LPS, thus preventing gut injury.

The gut is an important source of cytokines with local and systemic effects (Stadnyk, 2002). For instance, during Crohn's disease, intestinal production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  is markedly increased (Fiocchi, 1998). Also, during systemic inflammatory response, production of pro-inflammatory cytokines is observed as interleukin-6 is secreted in response to sepsis and endotoxemia (Fiocchi, 1998). Therefore, given the potency of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in inducing inflammatory and physiological responses in intestinal epithelial cells, we investigated their effects on the expression of PONs. Caco-2/15 cells cultured with TNF- $\alpha$  exhibited a reduction in PON1 and PON3 mRNA (Figure 8). However a significant increase was noted in PON2 mRNA (Figure 8). Additionally, a marked decrease in PON2 cell protein content was noted with the administration of TNF- $\alpha$  (Figure 8). A similar PON1 and PON3 gene expression profile was recorded with IFN- $\gamma$  (Figure 9). The incongruity between the gene and protein expression of PON2 in inflammatory conditions may be explained by ubiquitin–proteasome system triggered by cytokines (Leblond et al., 2006; Yin et al., 2001). In this system, proteins are poly-ubiquitinated and then processed by the constitutive 20S proteasome, a large ATP-dependent multicatalytic complex. In addition to the immunoproteasome, mRNA stability may affect the expression of proteins. The inconsistency between the gene and protein expression could also be explained by a compensatory mechanism of PON2 mRNA in inflammation, as it has already been

proposed for other proteins (Lehmann et al., 2008). More studies are needed to highlight the mechanisms involved. Finally, potential posttranscriptional/posttranslational events may be behind these non-related findings.

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) is a nuclear hormone receptor, controlling the expression of numerous genes among others that are involved in inflammation (Delerive et al., 2001). PPAR $\gamma$  activation dampens the inflammatory response by decreasing NF- $\kappa$ B activation. PPAR $\gamma$  is highly expressed in the intestine, suggesting an important role in the regulation of the intestinal inflammatory response (Wang et al., 2005; Auboeuf et al., 1997). Additionally, PON1 mRNA has been shown to be upregulated by activation of PPAR $\alpha$  in human hepatoma cell line HuH7 (Gouedard et al., 2003) and PON2 mRNA was increased in J774A.1 macrophages after incubation with PPAR $\gamma$  specific ligand (Shiner et al., 2007). We have, therefore, examined the effects agonists, rosiglitazone and WY-14643, two powerful agonists for PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$ , respectively. Rosiglitazone-treated Caco-2/15 cells showed a rise in the gene expression of PON1 and PON3, whereas PON2 remained insensitive (Figure 10). However, the protein mass of PON2 and PON3 was not altered by the presence of the two agonists (Figure 10). Although the findings relative to PON1 and PON3 mRNA with the PPAR $\gamma$  agonist are in line with various studies showing that PPAR $\gamma$  ligands inhibited the epithelial inflammatory response (Su et al., 1999), delayed the onset of inflammatory bowel disease (Lytle et al., 2005) and suppressed experimentally induced colitis (Shah et al., 2007), the limited responses in our studies do not suggest an important regulatory role for PPAR $\gamma$ .

In conclusion, differential regulation of PONs was highlighted by the present experiments. In particular, oxidative stress and proinflammatory agents were able to alter the expression

of PONs in intestinal cells, which may suggest their active role during pathophysiological conditions.



**ACKNOWLEDGEMENTS**

The current work was supported by research grant from the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (CCFC). The authors thank Schohraya Spahis, François Leblond, Geneviève Lalonde and Sanchez Garcia, Maria del Rocio for their expert technical assistance.

**REFERENCES**

- Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 1997;46:1319-27.
- Aviram M and Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1304-16.
- Aviram M and Rosenblat M. Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Curr Opin Lipidol* 2005;16:393-9.
- Bernotti S, Seidman E, Sinnott D, Brunet S, Dionne S, Delvin E, Levy E. Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G898-G906.
- Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 2000;164:966-72.
- Chakravorty D and Kumar KS. Modulation of barrier function of small intestinal epithelial cells by lamina propria fibroblasts in response to lipopolysaccharide: possible role in TNFalpha in inducing barrier dysfunction. *Microbiol Immunol* 1999;43:527-33.
- Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* 2001;169:453-9.

- Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res* 2005;46:1239-47.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205.
- Fukushima K, Sasaki I, Takahashi K, Naito H, Matsuno S. Lipopolysaccharide- and proinflammatory cytokine-induced energy production in intestinal and colonic epithelial cell lines. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:291-6.
- Gouedard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y. Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 2003;63:945-56.
- Grenier E, Maupas FS, Beaulieu JF, Seidman E, Delvin E, Sane A, Tremblay E, Garofalo C, Levy E. Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion, and apolipoprotein biogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G1178-G1189.
- Khersonsky O and Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry* 2005;44:6371-82.
- Leblond J, Hubert-Buron A, Bole-Feysot C, Ducrotte P, Dechelotte P, Coeffier M. Regulation of proteolysis by cytokines in the human intestinal epithelial cell line HCT-8: role of IFN $\gamma$ . *Biochimie* 2006;88:759-65.
- Lehmann GL, Carreras FI, Soria LR, Gradilone SA, Marinelli RA. LPS induces the TNF- $\alpha$ -mediated downregulation of rat liver aquaporin-8: role in sepsis-associated cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G567-G575.

- Levy E, Menard D, Delvin E, Stan S, Mitchell G, Lambert M, Ziv E, Feoli-Fonseca JC, Seidman E. The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene increases fat absorption in human intestinal explants. *J Biol Chem* 2001;276:39679-84.
- Levy E, Menard D, Suc I, Delvin E, Marcil V, Brissette L, Thibault L, Bendayan M. Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *J Cell Sci* 2004;117:327-37.
- Levy E, Trudel K, Bendayan M, Seidman E, Delvin E, Elchebly M, Lavoie JC, Precourt LP, Amre D, Sinnett D. Biological role, protein expression, subcellular localization, and oxidative stress response of paraoxonase 2 in the intestine of humans and rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G1252-G1261.
- Lytle C, Tod TJ, Vo KT, Lee JW, Atkinson RD, Straus DS. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand rosiglitazone delays the onset of inflammatory bowel disease in mice with interleukin 10 deficiency. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:231-43.
- Mackness MI, Hallam SD, Peard T, Warner S, Walker CH. The separation of sheep and human serum "A"-esterase activity into the lipoprotein fraction by ultracentrifugation. *Comp Biochem Physiol B* 1985;82:675-7.
- Marcil V, Delvin E, Seidman E, Poitras L, Zoltowska M, Garofalo C, Levy E. Modulation of lipid synthesis, apolipoprotein biogenesis, and lipoprotein assembly by butyrate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G340-G346.
- Meriin AB, Gabai VL, Yaglom J, Shifrin VI, Sherman MY. Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:6373-9.

- Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ, Tsui LC, Prochazka M. Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene* 1998;213:149-57.
- Montoudis A, Seidman E, Boudreau F, Beaulieu JF, Menard D, Elchebly M, Mailhot G, Sane AT, Lambert M, Delvin E, Levy E. Intestinal fatty acid binding protein regulates mitochondrion beta-oxidation and cholesterol uptake. *J Lipid Res* 2008;49:961-72.
- Ogle CK, Guo X, Hasselgren PO, Ogle JD, Alexander JW. The gut as a source of inflammatory cytokines after stimulation with endotoxin. *Eur J Surg* 1997;163:45-51.
- Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996;33:498-507.
- Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:542-7.
- Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
- Sane AT, Sinnott D, Delvin E, Bendayan M, Marcil V, Menard D, Beaulieu JF, Levy E. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res* 2006;47:2112-20.
- Shah YM, Morimura K, Gonzalez FJ. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in macrophage suppresses experimentally induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G657-G666.
- Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, Suissa A, Aviram M. Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal

- tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radic Biol Med* 2005;39:336-44.
- Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is upregulated by unesterified cholesterol through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway. *Biol Chem* 2007;388:1353-8.
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:405-55.
- Stadnyk AW. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can J Gastroenterol* 2002;16:241-6.
- Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD. A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 1999;104:383-9.
- Trudel K, Sinnott D, James RW, Delvin E, Amre D, Seidman E, Levy E. Iron-ascorbic acid-induced oxidant stress and its quenching by paraoxonase 1 in HDL and the liver: comparison between humans and rats. *J Cell Biochem* 2005;96:404-11.
- Ulevitch RJ and Tobias PS. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 1999;11:19-22.
- Wang Q, Herrera-Ruiz D, Mathis AS, Cook TJ, Bhardwaj RK, Knipp GT. Expression of PPAR, RXR isoforms and fatty acid transporting proteins in the rat and human gastrointestinal tracts. *J Pharm Sci* 2005;94:363-72.
- Yin L, Laevsky G, Giardina C. Butyrate suppression of colonocyte NF-kappa B activation and cellular proteasome activity. *J Biol Chem* 2001;276:44641-6.

**FIGURES LEGENDS**

**Figure 1** Gene and protein expressions of PONs in Caco-2/15 cells. Caco-2/15 cells were incubated with fresh medium, allowed to grow and differentiate for 21 days, and tested for transcript levels and protein mass of PON1, PON2 and PON3 by RT-PCR and Western blotting, respectively. The protein expression of PON1, PON2 and PON3 in rat liver has been included as a positive control. Data originated from three separate experiments.

**Figure 2** Lipid peroxidation in Caco-2/15 cells challenged with iron-ascorbate. Caco-2/15 cells were incubated with iron-ascorbate (Fe/Asc) (200  $\mu$ M/2 mM) for 6 h at 37°C. Oxidative stress was assessed by measuring malondialdehyde (MDA) as an index of lipid peroxidation.

Values are means  $\pm$  SEM for 4 different experiments.

\* $p < 0,05$

**Figure 3** Effect of iron-ascorbate-induced lipid peroxidation on gene and protein expressions of PONs in Caco-2/15 cells. The latter were incubated for 6 h in the presence or absence of iron-ascorbate (Fe/Asc), BHT (0.5mM) and Trolox (0.5mM). Then PONs mass was quantitated by SDS-PAGE and Western blotting, whereas cell transcripts were evaluated by RT-PCR. Values are expressed as means  $\pm$  SEM for  $n = 4$  for each experimental group.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0,01$

**Figure 4** Effect of LPS on the gene expression and protein mass of PONs in Caco-2/15 cells. LPS (50 or 200  $\mu\text{g/ml}$ ) was added to the apical compartment for 24 h. Cells were harvested and PONs mass was then quantitated by SDS-PAGE and Western blotting, whereas cell transcripts were evaluated by RT-PCR as described in MATERIALS AND METHODS. Values are means  $\pm$  SEM for 4 different experiments.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

**Figure 5** Effect of LPS on the gene expression and protein mass of PONs in Caco-2/15 cells as a function of time incubation. LPS (200  $\mu\text{g/ml}$ ) was added to the apical compartment for 1 h, 4 h and 24 h. Cells were harvested and PONs mass was then quantitated by SDS-PAGE and Western blotting, whereas cell transcripts were evaluated by RT-PCR as described in MATERIALS AND METHODS. Values are means  $\pm$  SEM for 4 different experiments.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

**Figure 6** Effect of LPS on the protein mass of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$  as well as on NF- $\kappa$ B target gene TNF- $\alpha$  in Caco-2/15 cells. LPS (200  $\mu\text{g/ml}$ ) was added to the apical compartment for 24 h. Cells were harvested and I $\kappa$ B $\alpha$  (A) and NF- $\kappa$ B (B) mass was then quantitated by SDS-PAGE and Western blotting as described in MATERIALS AND METHODS. Furthermore, TNF- $\alpha$  gene expression (C) was assessed in the presence or absence of caffeic acid phenethyl ester (CAPE, 10  $\mu\text{M}$ ). Values are means  $\pm$  SEM for 4 different experiments.



\*p<0,05; \*\*p<0,01

**Figure 7**

Role of NF- $\kappa$ B in LPS-induced changes in the gene and protein expressions of PONs. Caco-2/15 cells were incubated for 24 h with LPS (200  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of caffeic acid phenethyl ester (CAPE, 10  $\mu$ M), BHT (0.5mM) and Trolox (0,5 mM), all administered to the apical compartment. Cells were harvested and PONs mass was then quantitated by SDS-PAGE and Western blotting, whereas cell transcripts were evaluated by RT-PCR as described in MATERIALS AND METHODS. Values are means  $\pm$  SEM for 4 different experiments.

\*p<0.05; \*\*p<0.01.

**Figure 8**

Modulation of the gene and protein expressions of PONs by TNF- $\alpha$ . Differentiated Caco-2/15 cells were incubated for 20 h with TNF- $\alpha$  (250 ng/ml). Cells were harvested and PONs mass was then quantitated by SDS-PAGE and Western blotting, whereas cell transcripts were evaluated by RT-PCR as described in MATERIALS AND METHODS. Values are means  $\pm$  SEM for 3 different experiments.

\*p<0.05 vs. controls; \*\*p<0.01 vs. controls.

**Figure 9**

Modulation of the gene and protein expressions of PONs by IFN- $\gamma$ . Differentiated Caco-2/15 cells were incubated for 20 h with IFN- $\gamma$  (20 U/ml). Cells were harvested and PONs mass was then quantitated by SDS-PAGE and Western blotting, whereas cell transcripts were evaluated by RT-PCR as described in MATERIALS

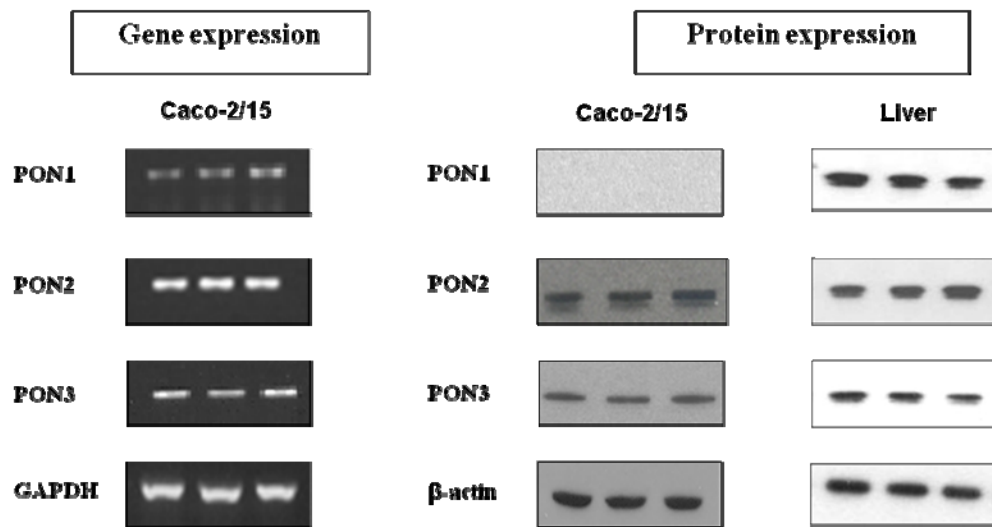
AND METHODS. Values are means  $\pm$  SEM for 3 different experiments.

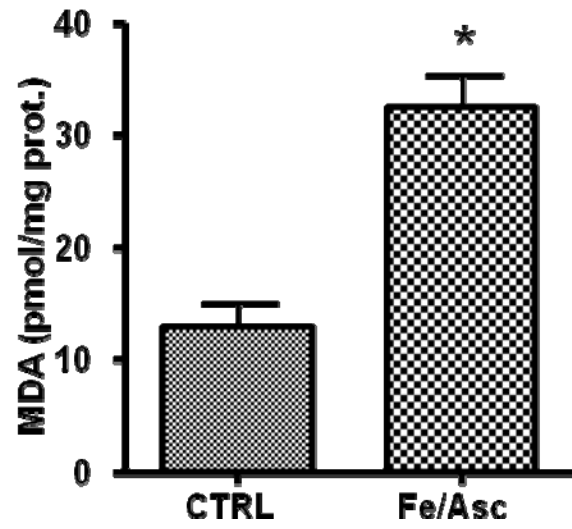
\* $p < 0.01$  vs. controls.

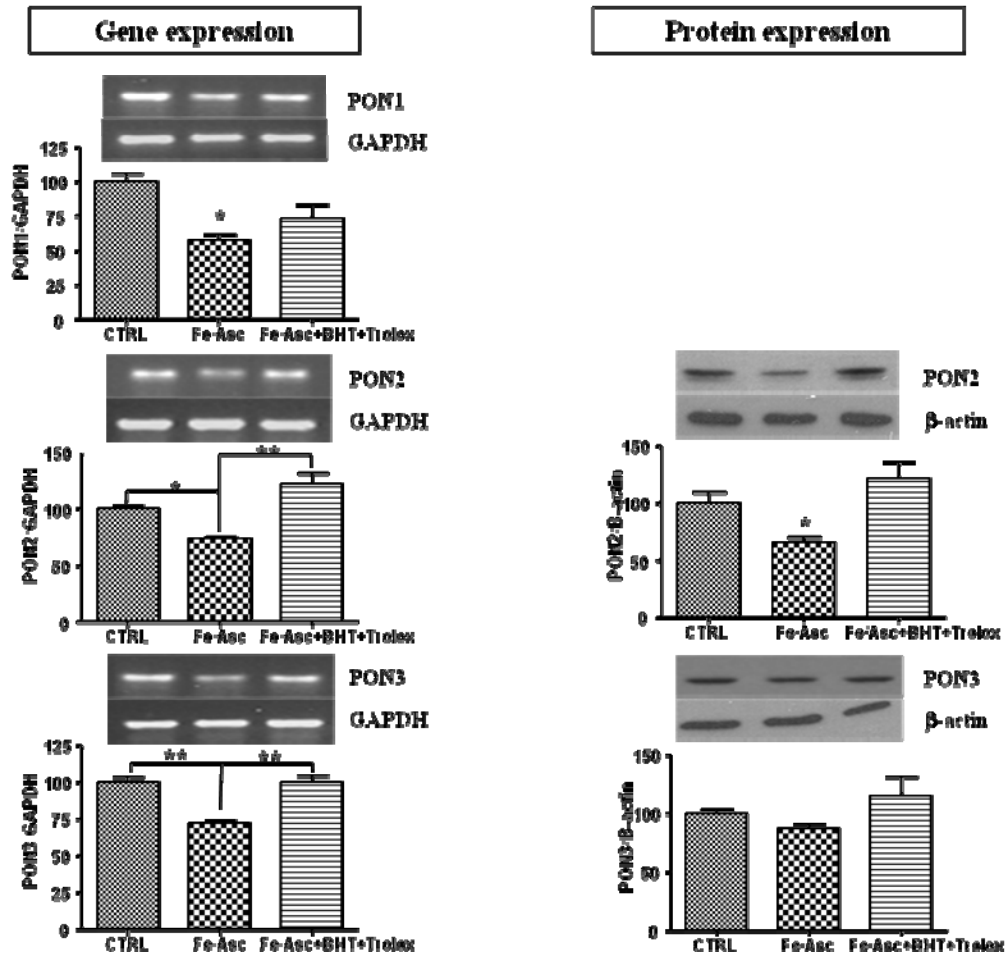
**Figure 10**

Modulation of the gene and protein expressions of PONs by PPAR agonists. Differentiated Caco-2/15 cells were incubated for 20 h with rosiglitazone (50  $\mu$ M) and WY-14643 (250  $\mu$ M). Cells were harvested and PONs mass was then quantitated by SDS-PAGE and Western blotting, whereas cell transcripts were evaluated by RT-PCR as described in MATERIALS AND METHODS. Values are means  $\pm$  SEM for 3 different experiments. \* $p < 0,05$ .

Figure 1



**Figure 2**



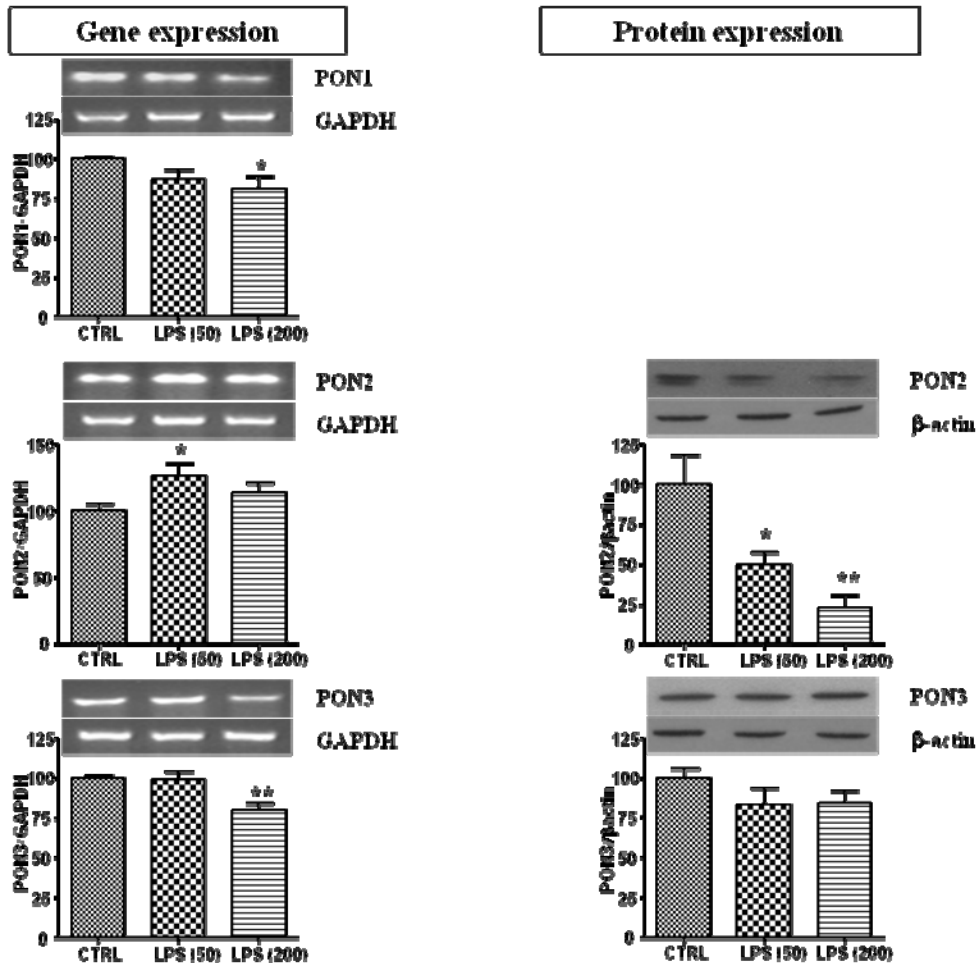


Figure 4

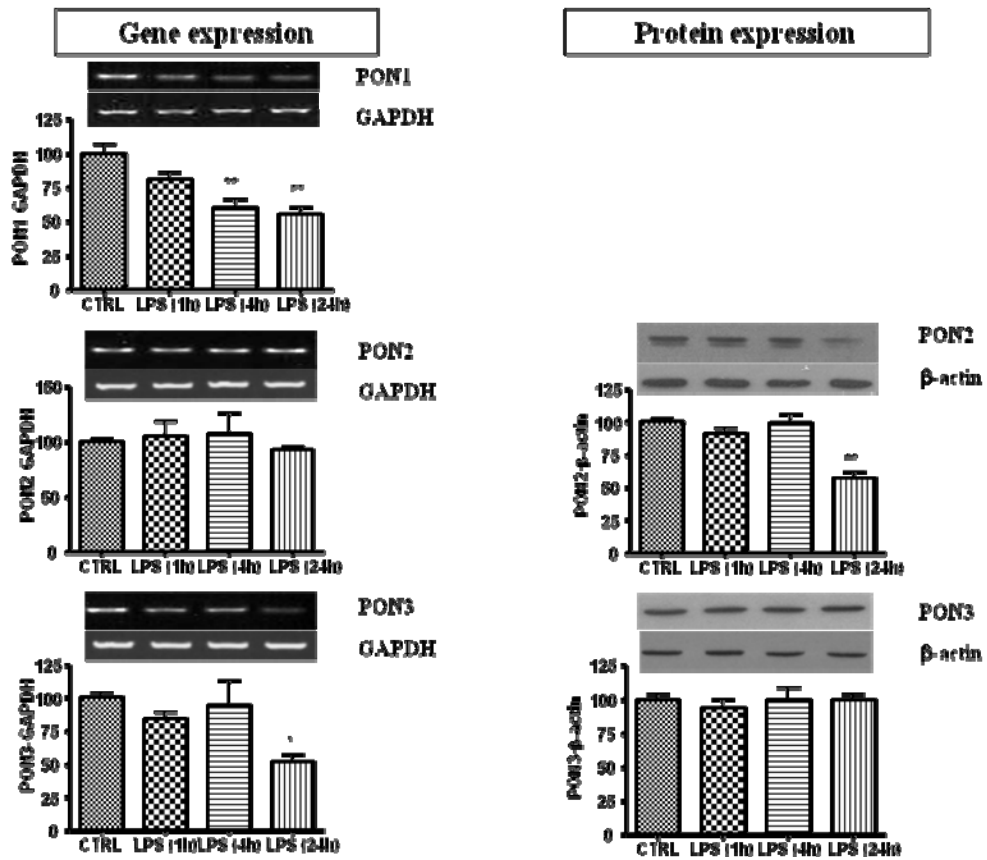
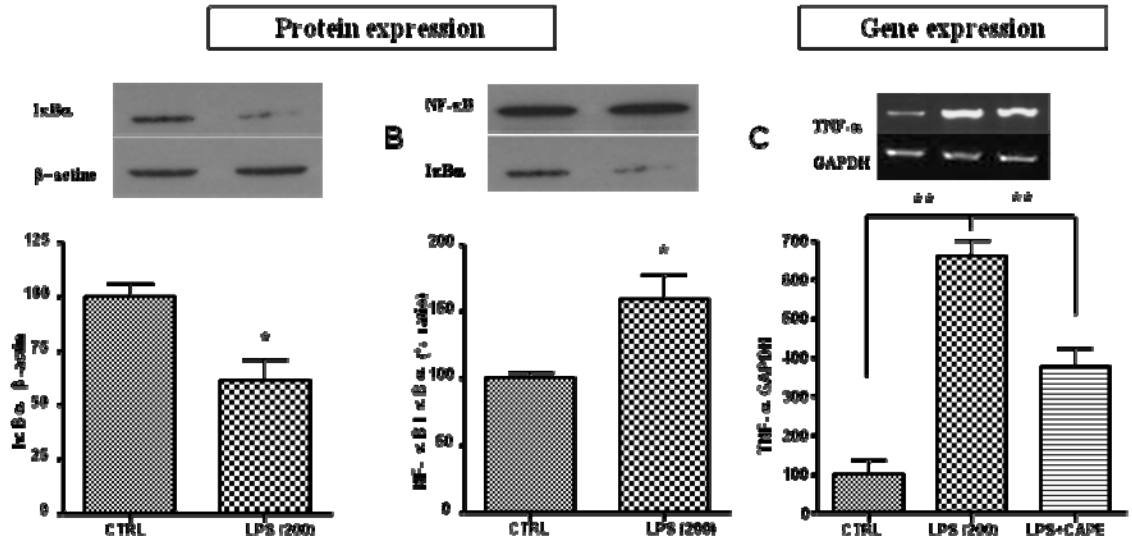


Figure 5

Figure 6





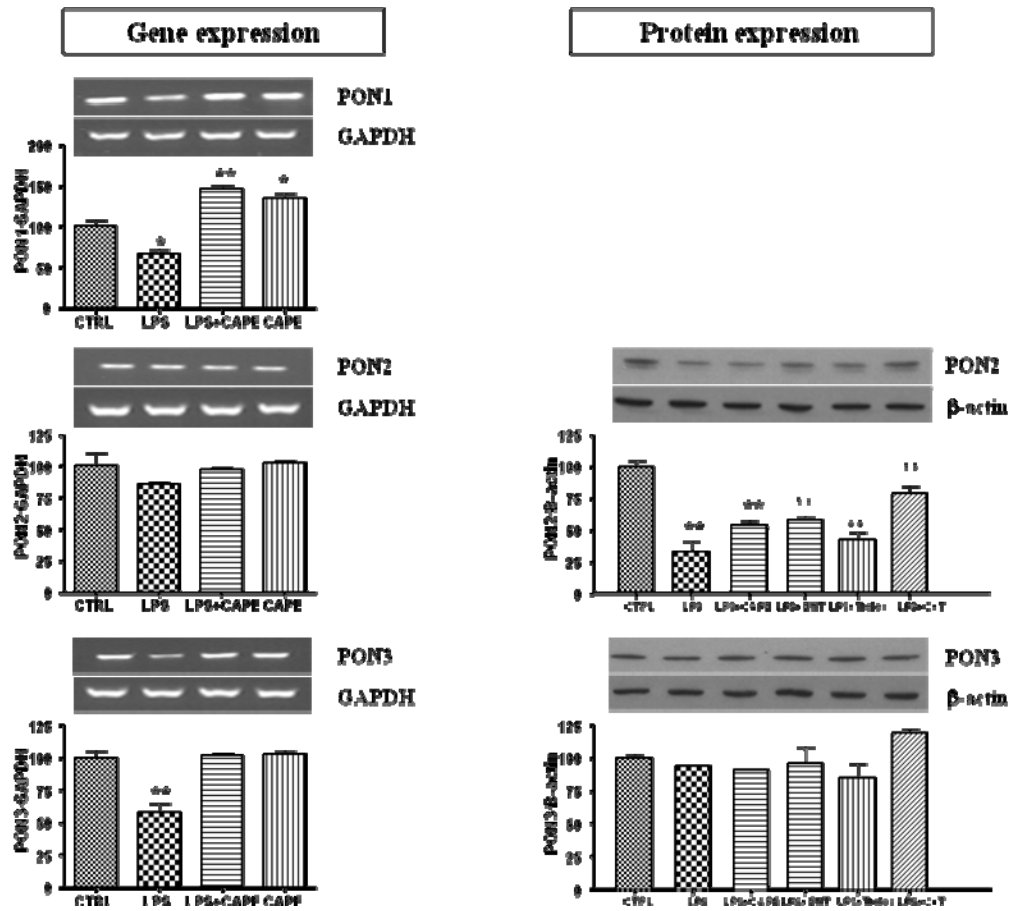


Figure 7

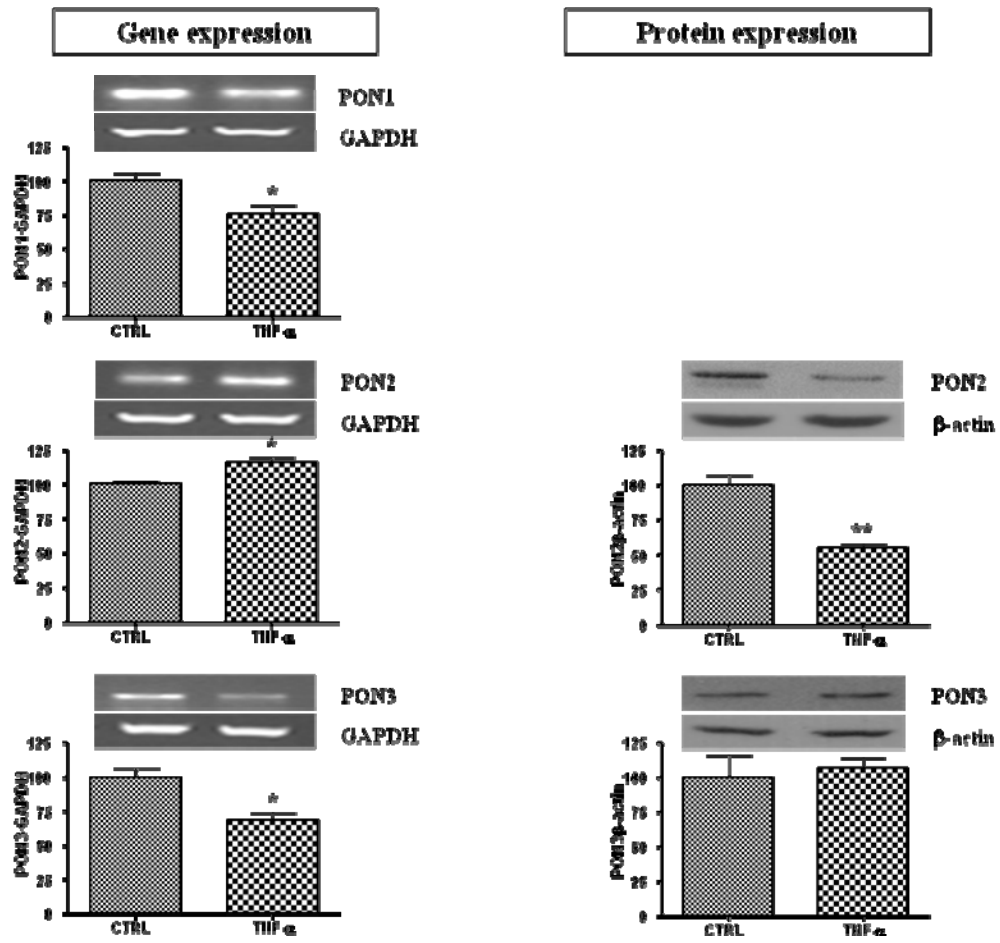
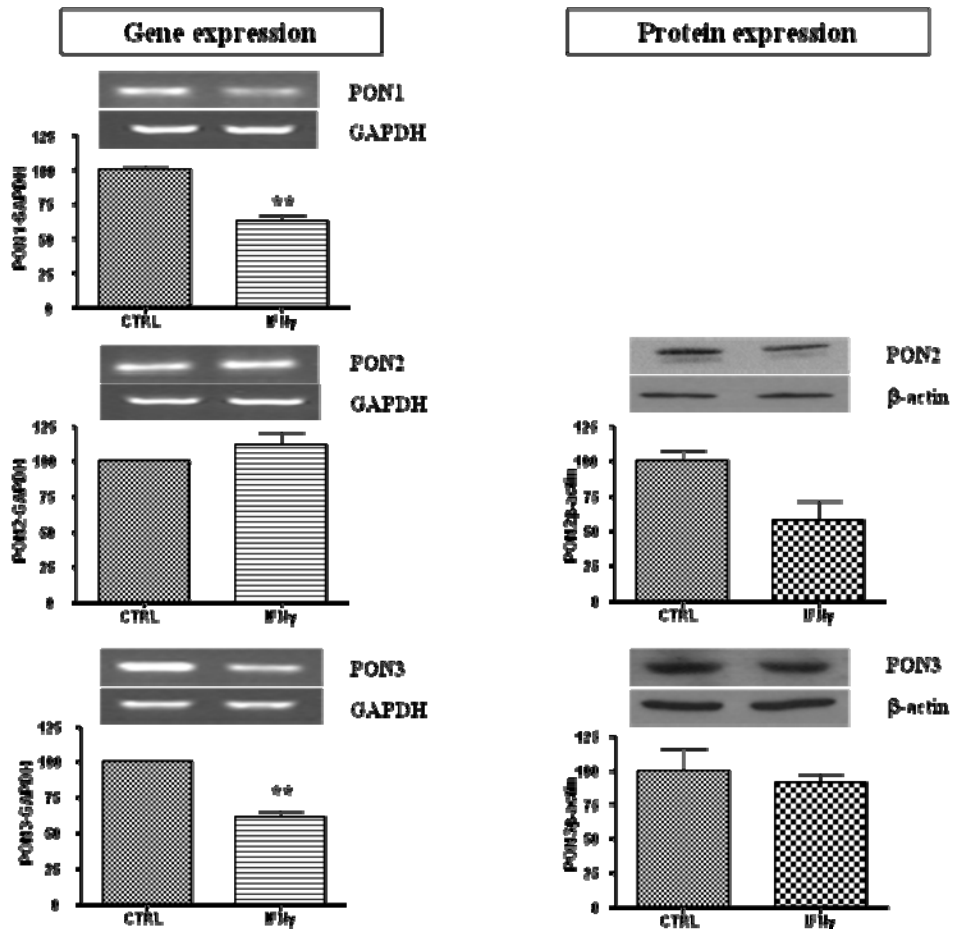


Figure 8



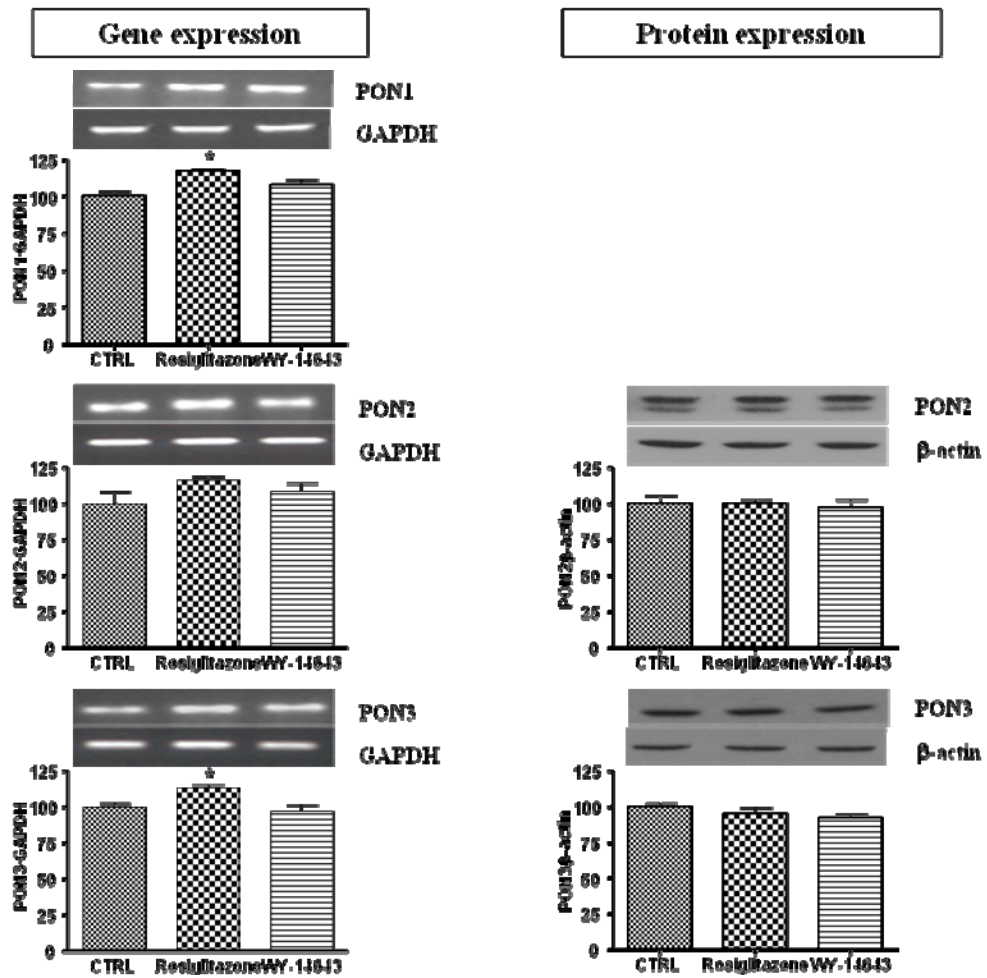


Figure 10

## **4.2. Article 2**

Levy, E., K. Trudel, M. Bendayan, E. Seidman, E. Delvin, M. Elchebly, J.C. Lavoie, **L.P. Précourt**, D. Amre, D. Sinnett. Biological role, protein expression, subcellular localization and oxidative stress response of paraoxonase 2 in the intestine of humans and rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, Décembre 2007, 293(6):G1252-61.

### **4.2.1. Apport original et contribution des co-auteurs**

Dans cet article, la présence et la localisation de PON2 au niveau intestinal est évaluée, en plus de sa régulation en situation de stress oxydant. Le potentiel antioxydant de PON2 dans les cellules intestinales est aussi démontré. Une grande partie de ce travail a été assurée par Karine Trudel. J'ai participé aux expériences sur la régulation de PON2, de même qu'à la planification de la démonstration du rôle antioxydant de PON2, à l'aide de la protéine purifiée, et à la révision du manuscrit. Le Dr Bendayan a réalisé les expériences de microscopie électronique. Le Dr Levy a participé à l'élaboration et la supervision du projet, en plus d'assurer la rédaction du manuscrit. Dr Seidman, Dr. Delvin, Dr Elchebly, Dr Lavoie, Dr Amre et Dr Sinnett ont contribué par leurs critiques et participé à la révision du manuscrit.

**Biological role, Protein Expression, Subcellular Localization and  
Oxidative Stress Response of Paraoxonase2 in the Intestine of Humans  
and Rats.**

**Emile Levy<sup>1\*</sup>, Karine Trudel<sup>1</sup>, Moise Bendayan<sup>2</sup>, Ernest Seidman<sup>3</sup>, Edgard Delvin<sup>4</sup>,  
Jean-Claude Lavoie<sup>5</sup>, Louis-Philippe Precourt<sup>1</sup>, Devendra Amre<sup>5</sup> and Daniel Sinnett<sup>5</sup>**

From the Departments of <sup>1</sup>Nutrition, <sup>2</sup>Pathology and Cellular Biology, <sup>4</sup>Biochemistry and  
<sup>5</sup>Pediatrics, *Université de Montréal*, Research Centre, *CHU Sainte Justine*, 3175 Côte Ste-  
Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

<sup>3</sup>Research Institute, McGill University, Campus MGH, C10.148.6, Montréal (Québec),  
Canada

**Running Head:** A Comparison of PON2 Expression in Humans and Rats

**Address for correspondence:**

\* Dr. Emile Levy  
GI-Nutrition Unit  
CHU Sainte-Justine  
3175 Côte Ste-Catherine  
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5  
Tel.: [REDACTED]  
E-mail: [REDACTED]

**ABSTRACT**

Oxidative stress is a cardinal manifestation of various intestinal disorders. However, very little knowledge is available on the intestine's inherent defense mechanisms against free radicals. This study was designed to determine the protein expression, subcellular localization and oxidative stress response of paraoxonase2 (PON2), a member of a powerful antioxidant family in human and rat intestine. Biochemical and ultrastructural experiments all showed a substantial expression of PON2 in human and rat intestine. Western blot analysis disclosed higher levels of PON2 in the jejunum than in the duodenum, ileum and colon. Cell fractionation revealed a predominant PON2 association with microsomes and lysosomes in the human jejunum, which differed from that in rats. PON2 was detected in the intestine as early as week 15 of gestation and was significantly increased by week 20. Iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation induced a marked decrease in PON2 expression in intestinal specimens coincidental to an abundant rise in malondialdehyde (MDA). On the other hand, pre-incubation with potent antioxidants, such as butylated hydroxytoluene, trolox and N-acetylcysteine, prevented iron/ascorbate-generating PON2 reduction in parallel with MDA suppression. Finally, the pre-incubation of permeabilized Caco-2 cells with purified PON2 led to a protection against iron/ascorbate-induced lipid peroxidation. These observations demonstrate that the human intestine is preferentially endowed with a marked PON2 expression compared with the rat intestine and this expression shows a developmental and intracellular pattern of distribution. Furthermore, our observations suggest PON2 protective effects against pro-oxidant stimuli in the small intestine.

**Keywords:** PON2, intestine, oxidative stress, subcellular organelles

## **INTRODUCTION**

Redox balance, usually observed in healthy subjects, is maintained by an equilibrium between prooxidants and antioxidants (21, 38). A decrease in antioxidant protection, an excess of reactive oxygen species (ROS), as well as a failure to repair oxidative damage leads to redox imbalance (21). The resulting accumulation of free radicals can have deleterious effects by reacting and oxidizing key organic substrates, such as polyunsaturated fatty acids, proteins and DNA (6, 12, 50). This process, called oxidative stress, disturbs normal functioning and is involved in a wide spectrum of pathologies: cancer, atherosclerosis, cystic fibrosis, Alzheimer and Parkinson's (11, 26, 30, 39, 53, 55). Importantly, a variety of gastrointestinal diseases are also associated with ROS and oxidative stress (19, 41, 42). In fact, the gastrointestinal mucosa is repetitively exposed to luminal oxidants from ingested foods (13, 20, 41) and, despite the antioxidant properties of its mucus lining, there is a continuous generation of oxidative stress (20). Clearly, the ingestion and/or occurrence of peroxides may have implications for human health, particularly in the long term.

Antioxidants play a crucial role in preventing damage induced by oxidative stress through the neutralization of free radicals. Alimentary non-enzymatic oxidants, such as  $\alpha$ -tocopherol, vitamin C and retinoids, possess a chemical structure that allows the quenching of singlet oxygen and peroxides (25). In addition, humans are endowed with endogenous enzymatic antioxidants that include superoxide dismutase, which catalyzes the conversion of superoxides into oxygen and hydrogen peroxide and is less reactive towards organic molecules (36); catalase, a heme-containing enzyme, which allows the dismutation of hydrogen peroxide into water and oxygen (37); and glutathione peroxidase, which detoxifies activated oxygen through the catalysis of hydrogen peroxide reduction (1, 37).



Recently, numerous investigators have focused on the paraoxonase (PON) protein family (2). Its distinct members (PON1, PON2, and PON3) are believed to be powerful attenuators of oxidative damage and highly atheroprotective (17, 32, 40). PON1 and PON3 circulate attached to high-density lipoprotein particles (15). They inhibit atherogenesis by hydrolyzing lipid hydroperoxides and by preventing low-density lipoprotein (LDL) oxidative modification (15). The distribution of PON2 in many tissues suggests the possibility of its playing an antioxidant role (15). PON2 is increased in cells harvested from 4-month-old apolipoprotein (apo) E(-/-) animals exhibiting signs of oxidative stress (46). Additionally, the administration of PON2 to macrophages from apo E(-/-) mice reduced lipid peroxide content (46). Similarly, overexpression of PON2 in Hela cells prevents the formation of oxidized LDL (40, 45). Overall, these observations are indicative of the antioxidant properties of PON2.

The number of studies suggesting the protective properties of PON2 is, however, limited and there has been little insight into its role in animal and human physiology. In particular, only limited data are available on the intestine, even though this organ is exposed on a daily basis to high levels of oxidative stress and requires strong antioxidants, which may preserve important endocrine, metabolic, immunologic and absorptive functions. The major aims of the present investigation were to examine the protein expression, subcellular localization, ontogeny, role and response to oxidative stress of PON2 in the human and rat intestine. Experiments were also carried out to explore whether powerful antioxidants may prevent the manifestation of oxidative stress and the depletion of PON2 following the exposure of microsomal fractions to iron/ascorbate.

## **MATERIALS AND METHODS**

Small intestine and large bowel tissues were obtained from fetuses ranging from 15 to 20 weeks following legal or therapeutic abortion with informed patient consent. No tissues were collected from cases associated with known fetal abnormalities or fetal death. Intestinal samples were also obtained from patients (50-60 years of age) who had undergone surgical resection of different areas of the digestive tract. Normal tissue found adjacent to the resected pathological tissues was used in all cases, as ascertained by routine hematoxylin/eosin staining. The human study protocol was approved by the Ethics committee of Sainte-Justine Hospital and the Institutional Review Committee for the use of human material from the “Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke/Faculté de Médecine”. All experimental animal procedures were authorized by the Institutional Animal Care Committee.

### **Preparation and Specificity of PON2 Antibody**

The PON2 polyclonal antibody (Ab) was prepared by Invitrogen (Carlsbad, California). It was generated against the PON2 region spanning amino acids 94-112. The specificity of the antibody was evaluated by various methods, including ELISA that recognized only PON2 among various proteins, Western blotting following the incubation of the Ab in the presence or absence of the 19-amino acid antigen, the omission of the primary PON2 Ab in Western blot and the identification of the PON2 sequences following immunoprecipitation and SDS-PAGE. Noteworthy is the KEEKPRARELRISRGFDL epitope that allows cross-reaction between humans and rats. It is also important to note that pilot studies were initiated to demonstrate (i) the specificity of the PON2 polyclonal Ab in humans and rats; and (ii) the equivalent response to PON2 Ab from human and rat tissues, which were simultaneously tested by PAGE and Western blot.

### **Immunocytochemical labelling**

Rat and human intestinal tissues were sampled and fixed by immersion in 0.1 mM phosphate buffered 1% glutaraldehyde for 2 h. Tissues were then processed for embedding in Lowicryl at -30 °C (4, 31). Tissue thin sections were cut, mounted on Parlodion-carbon coated grids and processed for the protein A-gold immunolabelling according to previously described methods (4, 31). The anti-PON2 antibody was used at 1/10 dilution in combination with the 10 nm protein A-gold complex. Control of specificity was carried out by omitting the primary antibody step or by replacing the PON2 antibody with albumin.

### **Preparation of microsomes and subcellular fractions**

Intestinal specimens were rinsed, homogenized and centrifuged for 15 min at  $12,000 \times g$  at 4°C in order to prepare microsome fractions, a technique described earlier (8, 9). The supernatant fraction was then centrifuged for 60 min at  $100,000 \times g$ . The pellet was centrifuged for 60 min at 4°C. The washed microsomal pellets were quick frozen and stored at -80°C for later use. To isolate subcellular fractions, tissue homogenate was subjected to differential and discontinuous sucrose density gradient centrifugation.

### **Western Blots**

To assess the presence of PON2 and evaluate its mass, intestinal tissues were homogenized and adequately prepared for Western blotting as described previously (29). The Bradford assay (BioRad), was used to estimate protein concentration. Proteins were denatured in sample buffer containing SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol, separated on a 4-20% gradient SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Nonspecific binding sites of the membranes were blocked using defatted milk proteins followed by the addition of primary antibodies directed against PON2. The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Even if

identical protein amounts of tissue homogenates were applied, the  $\beta$ -actin protein was used to confirm equal loading on SDS-PAGE (results not shown). Blots were developed and the mass of PON2 was quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and software.

### **Effect of antioxidants**

To determine whether lipid peroxidation was responsible for alterations in PON2 protein expression, the antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) (0.5 mM), N-acetylcysteine (NAC) (5 mM) and Trolox (0.5 mM) were added to microsomes or to the apical compartment of Caco-2 cells for 1 h before incubation with iron/ascorbate.

### **Estimation of lipid peroxidation**

The amount of free malondialdehyde (MDA) formed during the reaction was determined by HPLC, as we previously described (6). Proteins were first precipitated with a 10% sodium tungstate ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ) solution (Aldrich, Milwaukee, WI). The protein-free supernatants were then reacted with an equivalent volume of 0.5% (wt/vol) thiobarbituric acid solution (TBA; Sigma, St. Louis, MO) at 90°C for 60 min. After cooling to room temperature, the pink chromogene [(TBA) 2-MDA] was extracted with 1-butanol and dried over a stream of nitrogen at 37°C. The dry extract was then resuspended in a potassium dehydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )/methanol mobile phase (70:30, pH 7.0) before MDA determination by HPLC with fluorescence detection.

### **Permeabilization of Caco-2 cells by Digitonin**

Caco-2 cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). They were grown in minimum essential medium (MEM; GIBCOBRL, Grand Island, NY) and supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin (100 units/ml), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and l-glutamine (4 mM). Medium was changed every 2–3 days. Cells

( $4.5 \times 10^5$  cells) were used after 15 days of confluence and permeabilized in Krebs-Ringer bicarbonate solution containing 10 mM magnesium dichloride ( $\text{MgCl}_2$ ), 0.1 potassium chloride (KCl), 1 mM Na-free ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA), 1 mM adenosine triphosphate (ATP), 50 pg/ml digitonin and a mixture of antiproteases (25  $\mu\text{g/ml}$  phenylmethanesulphonyl fluoride, 1  $\mu\text{g/ml}$  pepstatin, 10  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin, 10  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin S) for 15 min. Then, Caco-2 digitonised cells were extensively washed and pre-incubated for 30 min with 10  $\mu\text{g}$  PON2 (purified from plasma by chromatography on DEAE-sepharose CL-6B) before they were cultured in MEM in the presence or absence of iron/ascorbate (100  $\mu\text{M}$ /200  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. Cells and media were collected and MDA was determined as described above.

### **Statistical Analysis**

All values were expressed as the mean  $\pm$  SEM. The data were evaluated by ANOVA, where appropriate, and the differences between the means were assessed using the Student's two-tailed *t*-test.

## **RESULTS**

First we evaluated PON2 protein mass in intestinal homogenates. As illustrated by the profiles reported in Figure 1, PON2 protein mass was higher in humans than in rats for the same quantities of homogenate proteins loaded on SDS-PAGE. Additionally, its expression was revealed at varying degrees in the different regions of the small intestine. PON2 levels in the gastrointestinal tract predominated in the jejunum. In fact, the protein expression of PON2 in the the different human regions of the intestine (duodenum, jejunum, ileum) was found to be 2.7-, 3.1- and 2.7-fold greater than corresponding rat tissue (Fig. 1A). We have also assessed PON2 gene expression in human tissues in order to determine whether it parallels PON2 protein distribution. PCR evaluation showed that the profile of PON2 mRNA transcripts corroborated the pattern of the PON2 protein expression in the intestinal regions (Fig. 1B).

Subsequently, immunolabelling for PON2 was carried out on human intestine tissue using specific anti-PON2 antibody in combination with the protein A-gold complex. Labelling by gold particles was obtained over cellular membranes as well as intracellular compartments. In human intestinal tissues (Fig. 2), the labelling was associated with microvilli as well as along the basolateral membrane (blm). Apical membrane-derived endosomal vesicles (end) also displayed gold particles. Additionally, the RER-Golgi (G) complex secretory pathway as well as lysosomes (Lys) and mitochondria (M). nuclei (N) displayed some labelling, whereas lipid droplets (L) were devoid of gold particles. Under the control condition in which the primary antibody was omitted, the labelling was totally abolished (results not shown). Overall, these observations provided support for the presence of PON2 protein in the intestine. Moreover, the high resolution immunogold approach disclosed the intracellular distribution of PON2 in the enterocyte.

We then examined the cellular localization of PON2 in the adult jejunum by conventional fractionation. As shown in Figure 3, the pattern of PON2 distribution was different in rats and humans. In rats, PON2 was mostly associated with nuclei, mitochondria, lysosomes and microsomes, whereas its expression in humans was predominant in lysosomes and microsomes. The question arose as to whether microsomal PON2 expression pattern paralleled the homogenate profile displayed in Figure 1. Western blotting of microsomes exhibited similar PON2 observations (Fig. 4), and PON2 was also preeminent in the jejunum in comparison to the duodenum and ileum.

We also explored the ontogeny of PON2 in the human small and large intestine using equal protein amounts of tissue homogenates. An increase in PON2 was noted only in the proximal regions of the small intestine and colonic tissue as a function of foetal age (Fig. 5). The proximal small intestine and colon exhibited a significant progressive rise in PON2 protein content: 145% and 123%, respectively, at the end of week 20 compared with the value (100%) noted at the end of week 15. No marked ontogenic differences in PON2 protein expression were recorded in the other intestinal segments.

We next performed cell fractionation in order to examine the subcellular localization of PON2 in human foetal jejunum. This experimental approach revealed a PON2 distribution similar to that in rats with evidently less enrichment in lysosomes (Fig. 6).

Given the growing importance of PON as a cardiovascular disease risk factor and its potential involvement in protection against free radicals, we expected the status of PON2 to be significantly decreased under oxidative stress. In order to test this hypothesis, we exposed rat jejunum microsomes to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. Incubation with iron/ascorbate at the concentration of (100  $\mu$ M/200  $\mu$ M) resulted in a significant increase in MDA levels in rat (Fig. 7A). Pre-incubation with strong antioxidants, such as

BHT, NAC and trolox, markedly suppressed the production of MDA, providing direct evidence for the ability of the iron/ascorbate system to provoke profound lipid peroxidation (Fig. 7B). Similar findings were noted in human jejunum microsomes (Fig. 8). It is important to note that the addition of iron/ascorbate to microsomes never decreased the protein expression of protein disulfide isomerase (results not shown), a microsomal marker, which suggests a selective response of PON2 to oxidative stress.

Similar studies were repeated with fetal proximal intestinal microsomes (Fig. 9) and integral Caco-2 cells (Fig. 10), and corroborated the capability of iron/ascorbate to reduce PON2 protein expression. Pre-incubation with BHT at a concentration of 0.5 mM prevented the PON2 protein decline observed with iron/ascorbate, which suggests the direct involvement of oxidative stress.

Finally, studies were undertaken to assess the direct role of PON2 in oxidative stress. To this end, plasma membranes of Caco-2 cells were permeabilized with digitonin to introduce purified PON2 before the addition of iron/ascorbate. As illustrated in Figure 11, permeabilized Caco-2 cells had more PON2 protein content in comparison with normal cells not exposed to digitonin. Furthermore, Table 1 indicates that MDA production was markedly diminished in permeabilized cells and their media in the presence of iron/ascorbate. On the other hand, MDA levels were raised in permeabilized Caco-2 cells incubated with PON2 antibody (Results not shown). Taken together, these findings reasonably suggest the protective action of PON2 against iron/ascorbate-induced lipid peroxidation.



## **DICUSSION**

The PON family consists of the three PON1, PON2 and PON3 members that share structural properties. Most of the information available on the PON family function derives from studies of PON1. We therefore initiated a comparative investigation of rats and humans with special respect to subcellular localization and ontogeny as well as the status of PON2 in response to oxidative stress. Our data clearly established that PON2 is: 1) localized in different regions of the intestine, including the duodenum, jejunum, ileum, proximal colon and distal colon; 2) present at higher concentrations in the human intestine than rat counterparts; 3) distributed in various cellular organelles, such as nuclei, mitochondria, lysosomes and microsomes; 4) more associated with mitochondria and lysosomes in rat jejunum, and with lysosomes and microsomes in human jejunum; and 5) decreased in the presence of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation and is restored with antioxidants. In addition, our findings emphasize the protective antioxidant role of PON2 in permeabilized Caco-2 cells.

ROS are abundantly released by activated neutrophils that infiltrate the intestinal wall during the cascade of immunological events that produce intestinal inflammation. Moreover, their luminal concentrations can dramatically increase due to environmental factors, such as dietary oxidant ingestion, intraluminal catalase-negative bacteria and desquamated cell oxidases. Therefore, important cellular detoxification systems may adequately control the amplified generation of ROS, terminate radical injury and repair damaged cellular elements. As documented in the present study, PON2 is abundantly expressed along the intestine. We speculate that PON2 may be a potentially important antioxidant that could prevent impairment or breakdown of membrane integrity, ensuring the maintenance of cellular homeostasis and functions. In line with this assumption, several

workers have suggested that PON2 may possess a biochemical function similar to that of PON1 and PON3, given its genetic association with pathophysiological conditions, including variations in plasma lipoproteins (7, 22), glucose levels in fasting type 2 diabetics (35), neonatal birth weight (10), the risk of coronary heart disease (47) and decreased oxidative state in human endothelial cells (40).

To delineate the role of PON2, we decided to introduce purified PON2 protein in permeabilized Caco-2 epithelial cell monolayers to assess its protective action against iron/ascorbate-induced lipid peroxidation. Cell permeabilization has been extensively used to allow access of extracellular reagents to intracellular targets (18, 23, 33). Digitonin opens pores in the membrane that allow the diffusion of large molecules, such as antibodies or enzymes, into the cytoplasm (14, 27, 48, 51). The results shown in the present investigation reveal the potential of PON2 in reducing the production of MDA in digitonin-permeabilized cells, indicating its antioxidant role. Confirmation was obtained with PON2 antibodies that favoured the induction of lipid peroxidation. These permeabilization experiments constitute a direct evidence for the antioxidant function of PON2 since most of the accessible studies have only been suggestive in comparison with the substantial information available on PON1. In agreement with our observations, a quite new article (published during the preparation of the present manuscript) has reported that PON2 represents an endogenous defense mechanism in vascular cells (24). In this work, overexpression of PON2 markedly reduced oxidative stress, whereas its knockdown increased ROS in human umbilical vein endothelial cell-derived EA.hy 926 cells.

Of considerable interest is the detection of PON2 in a number of intracellular compartments. Subcellular fractionation analyses revealed the distribution of PON2 in

nuclei, mitochondria, lysosomes and microsomes. If the role of PON2 truly lies in counteracting oxidative stress, its subcellular localization may suggest its active participation in the protection of organelle integrity and function during lipid peroxidation. This work provides evidence that PON2 expression is higher in the jejunum than in the duodenum and ileum in adult humans and rats. Previous studies emphasized that the jejunum is the preferential site of fatty acid uptake, lipid resynthesis and chylomicron assembly (28). Since the jejunal wall is continuously exposed to pro-oxidants present in the diet (13, 20, 41), PON2 likely plays a significant role in neutralizing the effects of pro-oxidant excess that trigger dramatic changes in intestinal epithelial cells, including the collapse of the cytoskeleton, disruption of tight junctions and loss of mucosal barrier integrity (3, 34, 44). Very little information is available concerning the antioxidant status of the enterocyte following peroxidative attack directed toward the brush-border membrane. Using iron/ascorbate oxygen radical-generating system, we showed that oxidative stress did not induce changes in the Caco-2 cells antioxidant enzyme activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione transferase (6). In the present investigation, iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation induced a diminished level of PON2 protein expression, pointing out the direct implication of this protein in diminishing lipid peroxidation. Other proteins may counteract oxidative stress capable of provoking the loss of enterocyte function. Tso's team has provided evidence of the powerful antioxidant capacity of apo A-IV, a protein produced by the small intestine (43, 52). Shamir et al (49) have shown that the gut could be the site of synthesis of PON family members. Collectively, all these antioxidant proteins may protect against oxidative stress that arises from dietary oxidized lipids, circulatory oxidized lipoproteins, luminal flora or inflammatory bowel diseases, such as Crohn's disease and ulcerative colitis.

Crohn's disease and ulcerative colitis are two severe disorders characterized by chronic intestinal inflammation with increased risks of developing colorectal carcinoma (16). Intestinal damage in inflammatory bowel diseases has been related to increased free radical production resulting from impaired antioxidant defense, respiratory burst of infiltrating phagocytic cells and pathogenic flora (19, 30, 54). Thus, scavenging ROS is considered to be critical for regulating intestinal inflammation. Additional work is needed to highlight the status and elucidate the role of PON2 in these chronic inflammatory diseases.

Rats have largely been used to exploit their physiological uniqueness in addressing biomedical and nutritional research issues. Very often, findings in lipid metabolism and lipid peroxidation in rats are inadequately extrapolated to humans. Since many aspects relative to these fields in rats are not identical to humans (5), we have addressed the pattern of distribution in the intestine, the intracellular localization and the response to oxidative stress of PON2 in rats and humans. Our findings could document various quantitative and qualitative changes in the two species, thus, the rat may not represent an appropriate model for the prediction of PON2 localization and anti-oxidative effects in humans.

In conclusion, our data demonstrated the presence of PON2 in all the regions of the intestine and in different subcellular compartments. Microsomal PON2 protein expression was reduced by iron/ascorbate-induced lipid peroxidation whereas pre-treatment with powerful antioxidants abolished PON2 decline. According to our experimental data, the cell-associated PON2 probably acts to decrease ROS that could otherwise cause deleterious effects on various intracellular organelles.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (CCFC). The authors are grateful to Mrs Schohraya Spahis for her excellent technical assistance.

**Table 1: Lipid peroxidation in Caco-2 cells challenged with purified PON2**

<b>Caco-2 specimen</b>	<b>No addition</b>	<b>+ iron/ascorbate</b>	<b>+ iron/ascorbate and PON2</b> (pmol/mg cellular protein)
Homogenate	78 ± 5	296 ± 12 <sup>a</sup>	105 ± 14 <sup>a,b</sup>
Medium	6 ± 1	47 ± 4 <sup>a</sup>	15 ± 1 <sup>b</sup>

Caco-2 cells were pre-incubated for 30 min with 10 µg PON2 purified from plasma by chromatography on DEAE-sepharose CL-6B. Thereafter, iron/ascorbate (100 µM/200 µM) was added for 24 h. The cells and media were collected and MDA was determined as described in the Methods section.

<sup>a</sup>p < 0,05 vs controls (No addition); <sup>b</sup>p < 0,05 vs iron/ascorbate

## **REFERENCES**

- Arthur JR.** The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 57: 1825-1835, 2000.
- Aviram M and Rosenblat M.** Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Curr Opin Lipidol* 16: 393-399, 2005.
- Banan A, Fields JZ, Zhang Y and Keshavarzian A.** iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G1234-G1246, 2001.
- Bendayan M.** Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 29: 1-159, 1995.
- Bergen WG and Mersmann HJ.** Comparative aspects of lipid metabolism: impact on contemporary research and use of animal models. *J Nutr* 135: 2499-2502, 2005.
- Bernotti S, Seidman E, Sinnett D, Brunet S, Dionne S, Delvin E and Levy E.** Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G898-G906, 2003.
- Boright AP, Connelly PW, Brunt JH, Scherer SW, Tsui LC and Hegele RA.** Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. *Atherosclerosis* 139: 131-136, 1998.
- Brunet S, Thibault L, Delvin E, Yotov W, Bendayan M and Levy E.** Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* 29: 1809-1817, 1999.
- Brunet S, Thibault L, Lepage G, Seidman EG, Dube N and Levy E.** Modulation of endoplasmic reticulum-bound cholesterol regulatory enzymes by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 28: 46-54, 2000.

- Busch CP, Ramdath DD, Ramsewak S and Hegele RA.** Association of PON2 variation with birth weight in Trinidadian neonates of South Asian ancestry. *Pharmacogenetics* 9: 351-356, 1999.
- Choi J, Rees HD, Weintraub ST, Levey AI, Chin LS and Li L.** Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *J Biol Chem* 280: 11648-11655, 2005.
- Cochrane CG.** Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 91: 23S-30S, 1991.
- Cross CE, Halliwell B and Allen A.** Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *Lancet* 1: 1328-1330, 1984.
- Csala M, Banhegyi G, Braun L, Szirmai R, Burchell A, Burchell B, Benedetti A and Mandl J.** Beta-glucuronidase latency in isolated murine hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 59: 801-805, 2000.
- Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS and La Du BN.** Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 275: 33435-33442, 2000.
- Eaden J.** Review article: colorectal carcinoma and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 20 Suppl 4: 24-30, 2004.
- Getz GS and Reardon CA.** Paraonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr Opin Lipidol* 15: 261-267, 2004.
- Goncalves CA, Gottfried C and Dunkley PR.** The use of permeabilized cells to assay protein phosphorylation and catecholamine release. *Neurochem Res* 25: 885-894, 2000.
- Grisham MB.** Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 344: 859-861, 1994.



- Grisham MB, Von Ritter C, Smith BF, Lamont JT and Granger DN.** Interaction between oxygen radicals and gastric mucin. *Am J Physiol* 253: G93-G96, 1987.
- Halliwell B.** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 52: 253-265, 1994.
- Hegele RA, Harris SB, Connelly PW, Hanley AJ, Tsui LC, Zinman B and Scherer SW.** Genetic variation in paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Canadian Oji-Cree. *Clin Genet* 54: 394-399, 1998.
- Hersey SJ and Perez A.** Permeable cell models in stimulus-secretion coupling. *Annu Rev Physiol* 52: 345-361, 1990.
- Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Kruger M, Strand D and Forstermann U.** Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation* 115: 2055-2064, 2007.
- Hosaka S, Obuki M, Nakajima J and Suzuki M.** Comparative study of antioxidants as quenchers or scavengers of reactive oxygen species based on quenching of MCLA-dependent chemiluminescence. *Luminescence* 2005.
- Kehrer JP.** Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23: 21-48, 1993.
- Lepers A, Cacan R and Verbert A.** Permeabilized cells as a way of gaining access to intracellular organelles: an approach to glycosylation reactions. *Biochimie* 72: 1-5, 1990.
- Levy E.** The 1991 Borden Award Lecture. Selected aspects of intraluminal and intracellular phases of intestinal fat absorption. *Can J Physiol Pharmacol* 70: 413-419, 1992.
- Levy E, Menard D, Suc I, Delvin E, Marcil V, Brissette L, Thibault L and Bendayan M.** Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *J Cell Sci* 117: 327-337, 2004.

- Levy E, Rizwan Y, Thibault L, Lepage G, Brunet S, Bouthillier L and Seidman E.** Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 71: 807-815, 2000.
- Levy E, Stan S, Delvin E, Menard D, Shoulders C, Garofalo C, Slight I, Seidman E, Mayer G and Bendayan M.** Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem* 277: 16470-16477, 2002.
- Li HL, Liu DP and Liang CC.** Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med* 81: 766-779, 2003.
- Liu J, Xiao N and DeFranco DB.** Use of digitonin-permeabilized cells in studies of steroid receptor subnuclear trafficking. *Methods* 19: 403-409, 1999.
- Lum H and Roebuck KA.** Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C719-C741, 2001.
- Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJ and Mackness MI.** Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci (Lond)* 98: 355-363, 2000.
- Maier CM and Chan PH.** Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 8: 323-334, 2002.
- Mates JM, Perez-Gomez C and Nunez dC, I.** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32: 595-603, 1999.
- McCall MR and Frei B.** Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med* 26: 1034-1053, 1999.

**Moreira PI, Smith MA, Zhu X, Honda K, Lee HG, Aliev G and Perry G.** Oxidative damage and Alzheimer's disease: are antioxidant therapies useful?. *Drug News Perspect* 18: 13-19, 2005.

**Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM and Reddy ST.** Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 276: 44444-44449, 2001.

**Parks DA.** Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut* 30: 293-298, 1989.

**Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J and Grisham MB.** Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 33: 311-322, 2002.

**Qin X, Swertfeger DK, Zheng S, Hui DY and Tso P.** Apolipoprotein AIV: a potent endogenous inhibitor of lipid oxidation. *Am J Physiol* 274: H1836-H1840, 1998.

**Rao RK, Baker RD, Baker SS, Gupta A and Holycross M.** Oxidant-induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol* 273: G812-G823, 1997.

**Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M and Fogelman AM.** Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 542-547, 2001.

**Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN and Aviram M.** Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3

activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 468-474, 2003.

**Sanghera DK, Aston CE, Saha N and Kamboh MI.** DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 62: 36-44, 1998.

**Schulz I.** Permeabilizing cells: some methods and applications for the study of intracellular processes. *Methods Enzymol* 192: 280-300, 1990.

**Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, Suissa A and Aviram M.** Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radic Biol Med* 39: 336-344, 2005.

**Stadtman ER.** Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 928: 22-38, 2001.

**Tang BL, Tan AE, Lim LK, Lee SS, Low DY and Hong W.** Syntaxin 12, a member of the syntaxin family localized to the endosome. *J Biol Chem* 273: 6944-6950, 1998.

**Tso P and Liu M.** Apolipoprotein A-IV, food intake, and obesity. *Physiol Behav* 83: 631-643, 2004.

**Valko M, Morris H and Cronin MT.** Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12: 1161-1208, 2005.

**Wendland BE, Aghdassi E, Tam C, Carrrier J, Steinhart AH, Wolman SL, Baron D and Allard JP.** Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 74: 259-264, 2001.

**Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Collins CE and Garg ML.**

Oxidative stress in cystic fibrosis: dietary and metabolic factors. *J Am Coll Nutr* 20: 157-165, 2001.

## **FIGURE LEGENDS**

**Figure 1** Pattern of PON2 distribution in different regions of human and rat intestine. The proteins of tissue homogenates (A) were fractionated by SDS-PAGE and electrotransferred onto nitro-cellulose membranes. The blots were then incubated with the polyclonal antibody overnight at 4 °C. Immunocomplexes were revealed by means horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin and an enhanced chemiluminescence's kit. PON2 mass was quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and software. The mRNA levels of human tissues (B) were also assessed to corroborate the PON2 protein mass findings. Representative PCR and Western blot illustrate the PON2 tissue distribution.

Values are expressed as means  $\pm$  SE for n=4 in each group of experiments.

\*p < 0.02 vs humans; \*\*p < 0.05 vs duodenum and ileum.

**Figure 2** Immunogold labelling of PON2 on human intestinal tissue. The labelling by gold particles is present over the microvilli (mv) and is particularly associated with their limiting membrane and the endosomal vesicles (end) (Panel A). Intracellularly, the labelling is present over the rough endoplasmic reticulum (RER), the Golgi apparatus (G) and the lysosomes (Lys), as well as in mitochondria (M) and nuclei (N) (Panels B, C and D). Lipid droplets (L) however, are devoid of any labelling (Panel D). Protein A-golds are also noted on the basolateral membrane (blm) (Panel D).

**Figure 3** Subcellular localization of PON2 in jejunum from humans and rats. Subcellular fractions were prepared from homogenates using sucrose density

gradient centrifugation. Samples of each fraction were subjected to SDS-PAGE and Western blotting.

Values represent the mean  $\pm$  SE for 4 separate experiments.

\* $p < 0.005$  vs homogenates.

**Figure 4** Protein expression of PON2 in intestinal microsomes. Microsomes were obtained by subcellular fractionation and PON2 profile was examined by SDS-PAGE and Western blotting.

Values represent the mean  $\pm$  SE for  $n=4$  in each group of experiments.

\* $p < 0.05$  vs humans; \*\* $p < 0.05$  vs duodenum and ileum.

**Figure 5** Developmental pattern of PON2 expression in the human intestine. Proximal and distal small intestine (A) and colon (B) were analyzed with similar protein amounts at the various periods of gestation. PON2 profile was examined by SDS-PAGE and Western blotting.

Values represent the mean  $\pm$  SE for  $n=4$  in each group of experiments.

\* $p < 0.05$  vs proximal segment; \*\* $p < 0.005$  vs proximal region; \*\*\* $p < 0.01$  vs 20 weeks of gestation.

**Figure 6** Analyses of PON2 content in subcellular fractions. PON2 expression in cellular fractions obtained from foetal small intestine. The organelles were isolated from the proximal intestine (17 weeks of gestation) using sucrose density gradient centrifugation. They were resolved by SDS-PAGE, electroblotted onto nitrocellulose membranes and incubated with primary and secondary antibodies.

Values represent the mean  $\pm$  SE for  $n=4$  in each experimental group.

\* $p < 0.05$  vs homogenates; \*\* $p < 0.005$  vs homogenates.

**Figure 7** Effect of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation on PON2 protein expression in rat jejunum microsomes. Microsomal fractions were incubated in the presence or absence of  $\text{Fe}^{2+}$ -ascorbate. Oxidative stress was assessed by measuring MDA as an index of lipid peroxidation. In order to determine whether lipid peroxidation was largely responsible for PON2 changes, various antioxidants (BHT, NAC and Trolox) were added separately to the reaction mixture before incubation with  $\text{Fe}^{2+}$ -ascorbate. Then PON2 mass was quantitated by SDS-PAGE and Western blotting.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=4 for each experimental group.

\*p < 0.05 vs control; \*\*p < 0.005 vs control.

**Figure 8** Effect of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation on PON2 expression in human jejunum microsomes. Microsomal fractions were incubated in the presence or absence of  $\text{Fe}^{2+}$ -ascorbate. Oxidative stress was assessed by measuring MDA as an index of lipid peroxidation. In order to determine whether lipid peroxidation was largely responsible for PON2 changes, various antioxidants (BHT, NAC and Trolox) were added separately to the reaction mixture before incubation with  $\text{Fe}^{2+}$ -ascorbate. Then PON2 mass was quantitated by SDS-PAGE and Western blotting.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=4 for each experimental group.

\*p < 0.05 vs control; \*\*p < 0.005 vs control.

**Figure 9** Effect of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation on PON2 status in fetal proximal intestinal microsomes. Microsomal fractions were incubated in the presence or absence of  $\text{Fe}^{2+}$ -ascorbate. Oxidative stress was assessed by measuring MDA as an index of lipid peroxidation. In order to determine



whether lipid peroxidation was largely responsible for PON2 changes, various antioxidants (BHT, NAC and Trolox) were added separately to the reaction mixture before incubation with  $\text{Fe}^{2+}$ -ascorbate. Then PON2 mass was quantitated by SDS-PAGE and Western blotting.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=4 for each experimental group.

\*p < 0.05 vs control; \*\*p < 0.005 vs control.

**Figure 10** Effect of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation on PON2 status in microsomes and Caco-2 cells. Iron/ascorbate (100  $\mu\text{M}$ /200  $\mu\text{M}$ ) was administered to Caco-2 cell microsomes (A) as well as to differentiated Caco-2 cells (B) for 30 min at 37°C. BHT was added in some experiments at the concentration of 0.5 mM to neutralize the oxidative stress. Cells were then harvested, washed, homogenized and tested for PON2 mass by SDS-PAGE and Western blotting.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=4 for each experimental group.

\*p < 0.05 vs control

**Figure 11** Effect of digitonin on PON2 uptake in Caco-2 cells. Digitonin (50 pg/ml) was added to Caco-2 cells as described in Materials and Methods. Following the incubation period, cells were washed, cultured in medium containing purified PON2 protein, homogenized and tested for PON2 mass by SDS-PAGE and Western blotting. Control cells were cultured in the same conditions, but without the addition of PON2.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=3 for each group.

\*p < 0.01 vs control

Figure 1

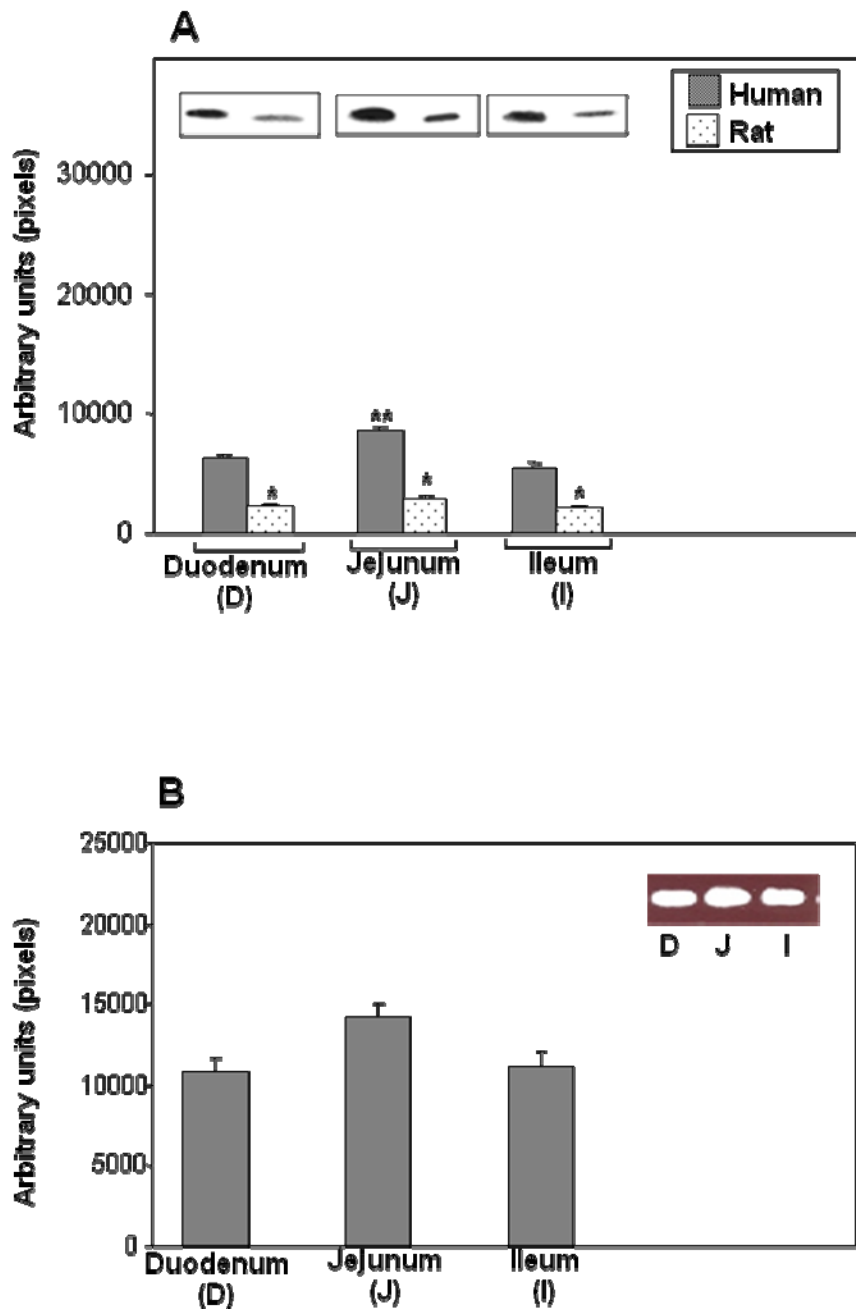


Figure 2

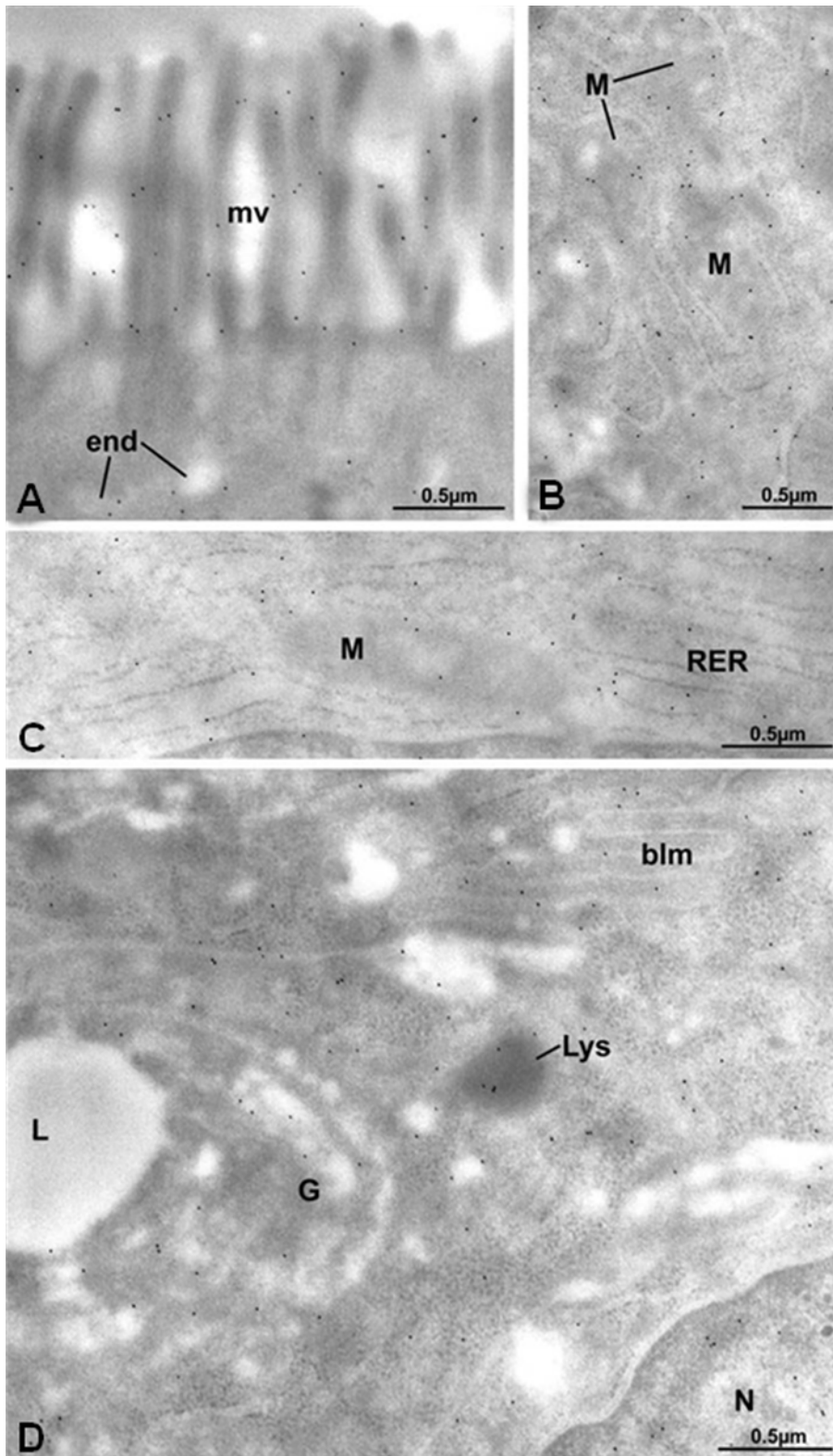


Figure 3

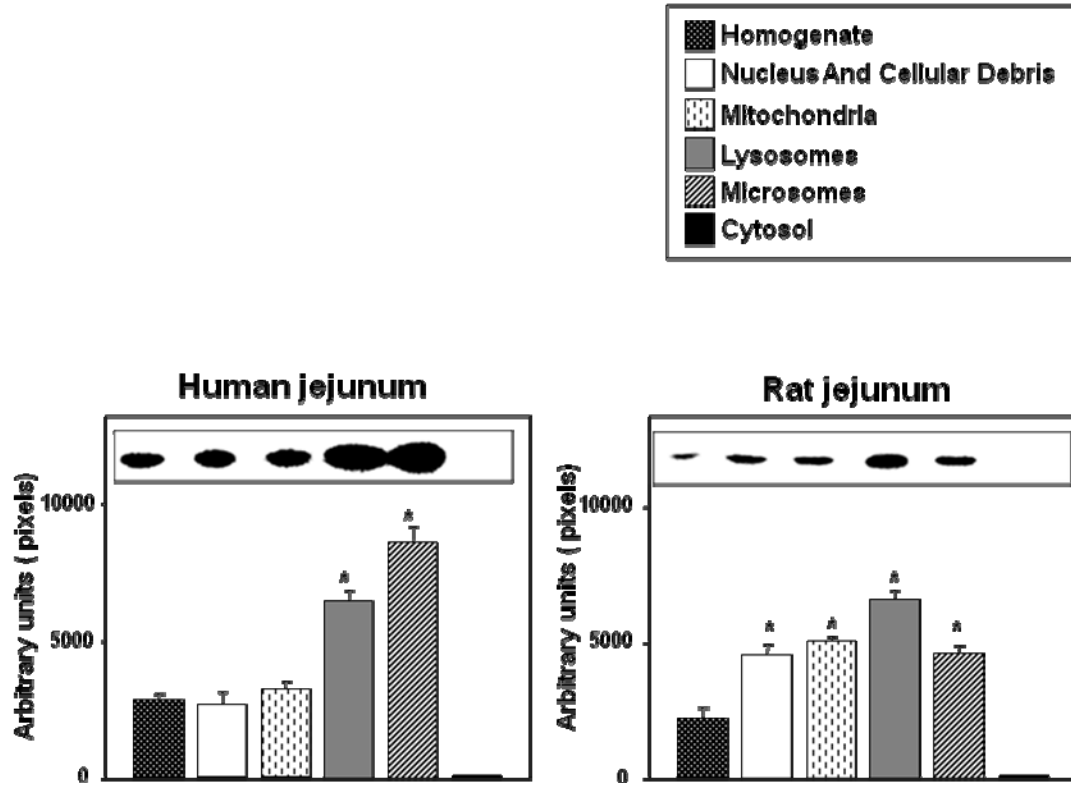


Figure 4

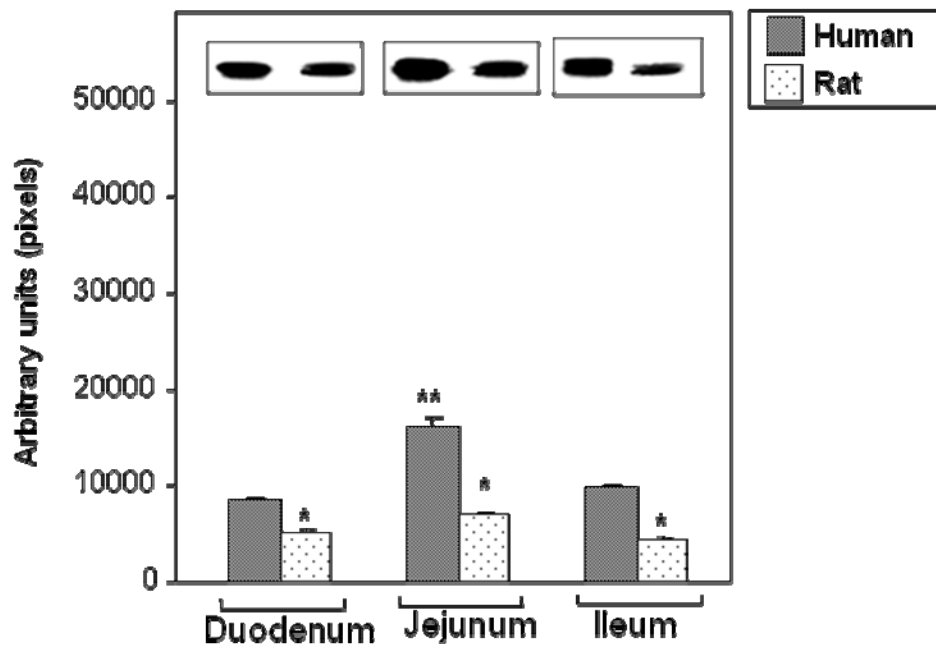


Figure 5

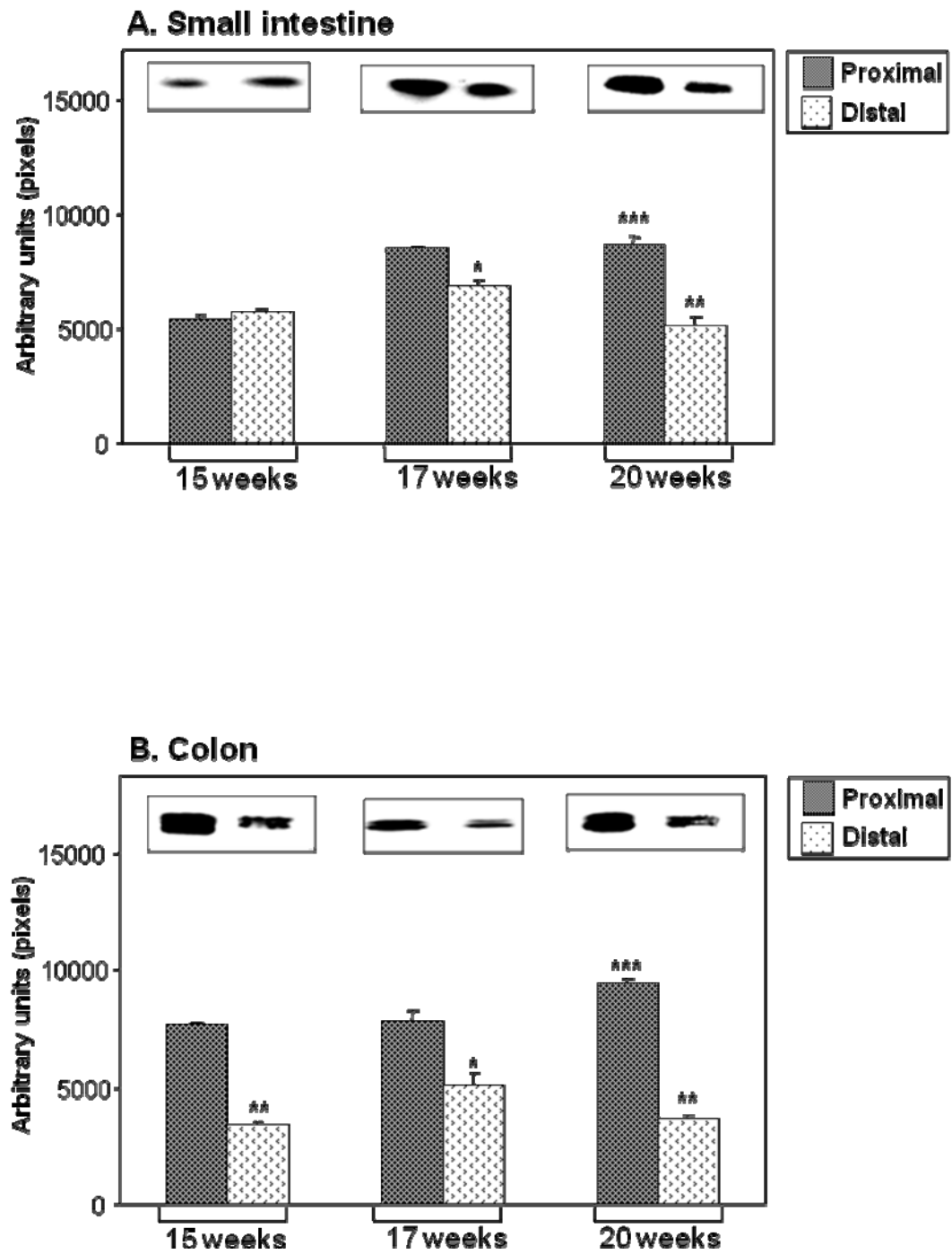


Figure 6

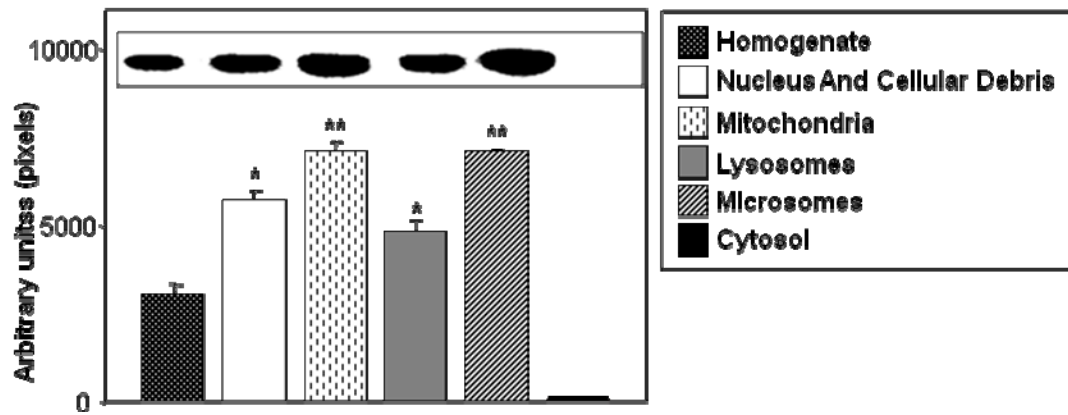


Figure 7

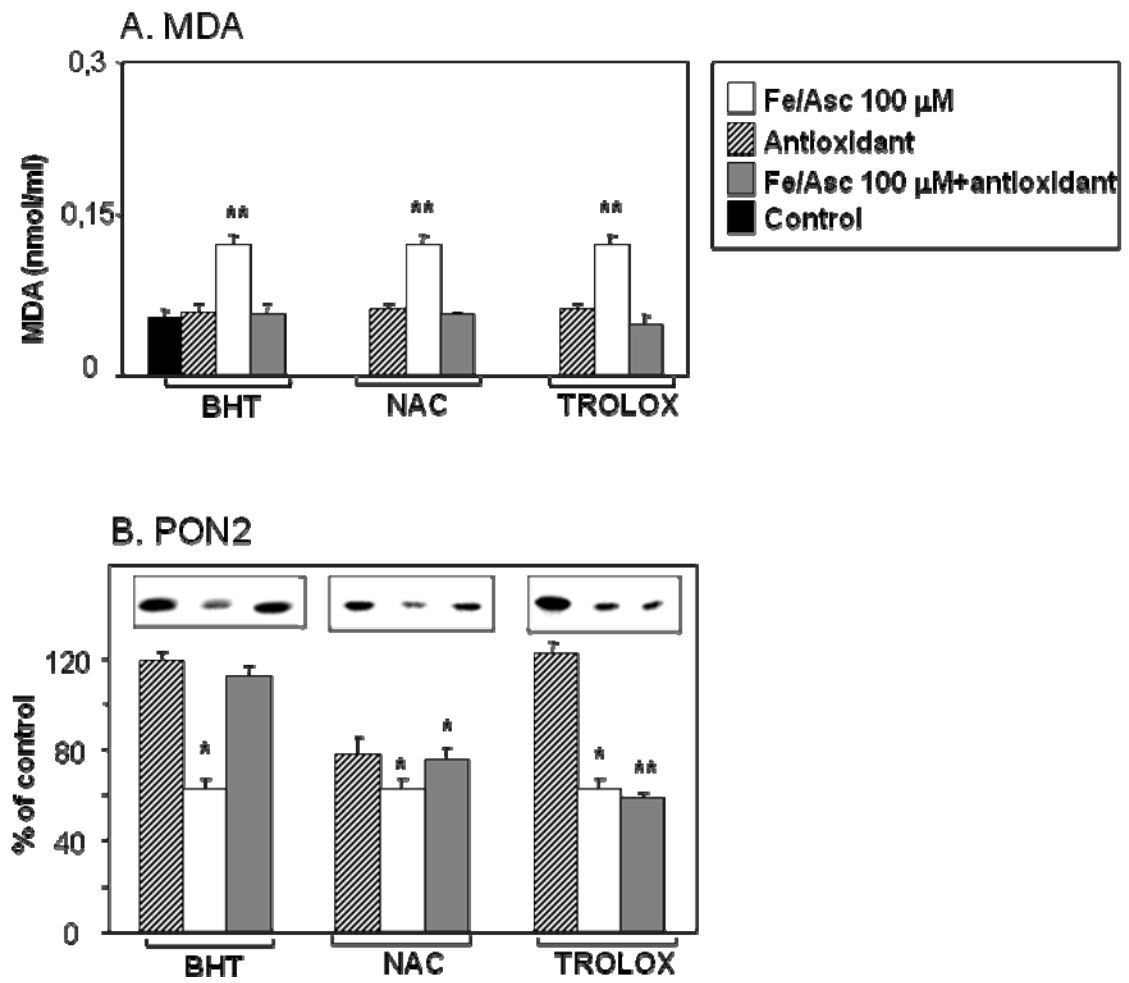




Figure 8

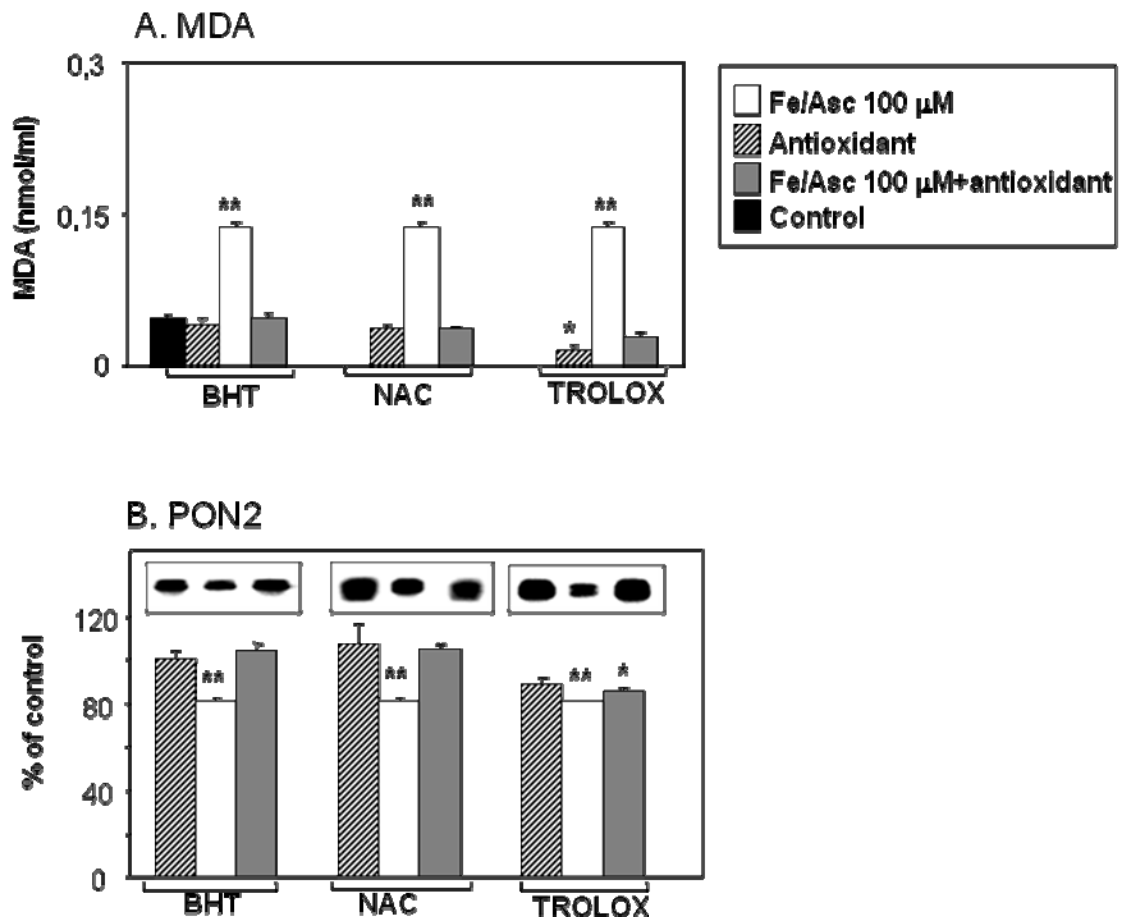


Figure 9

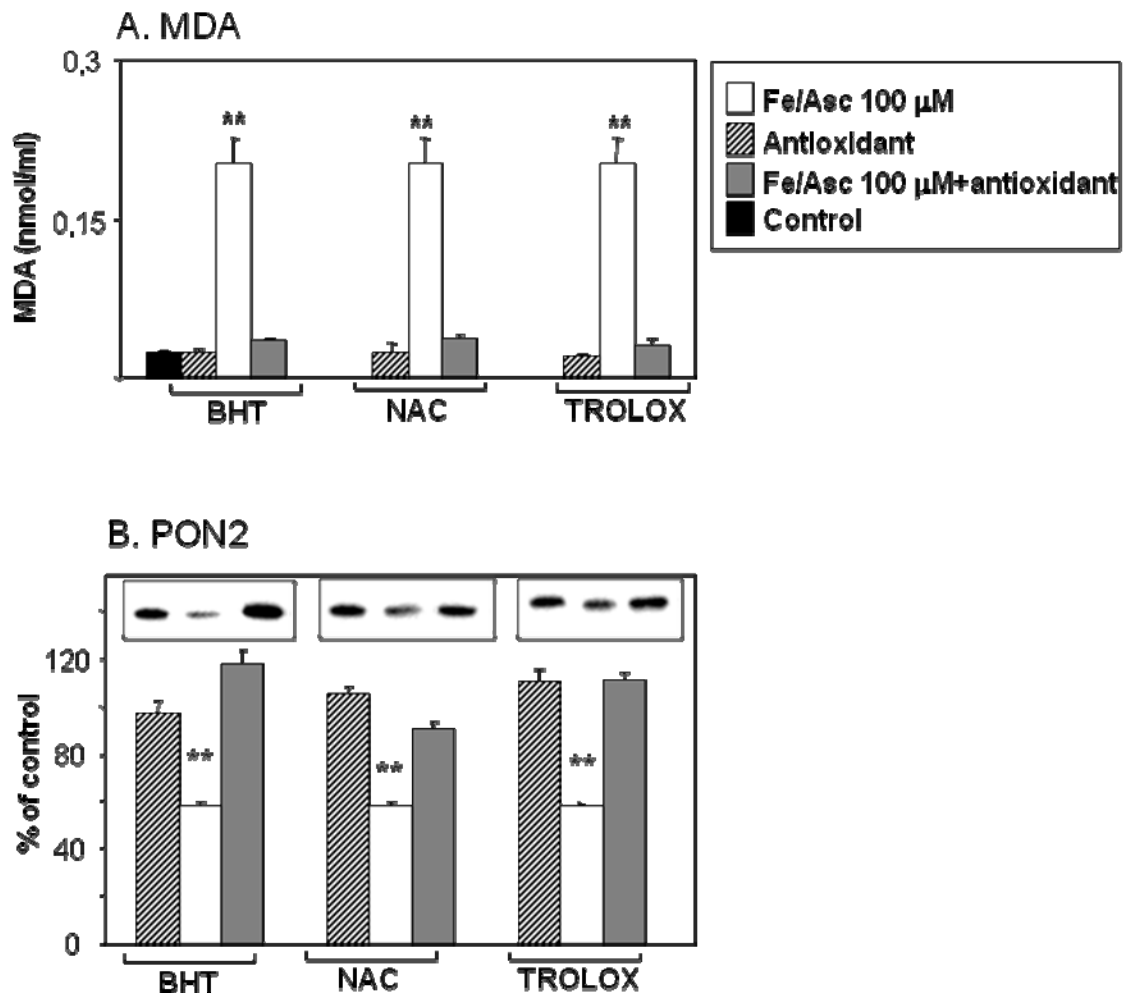


Figure 10

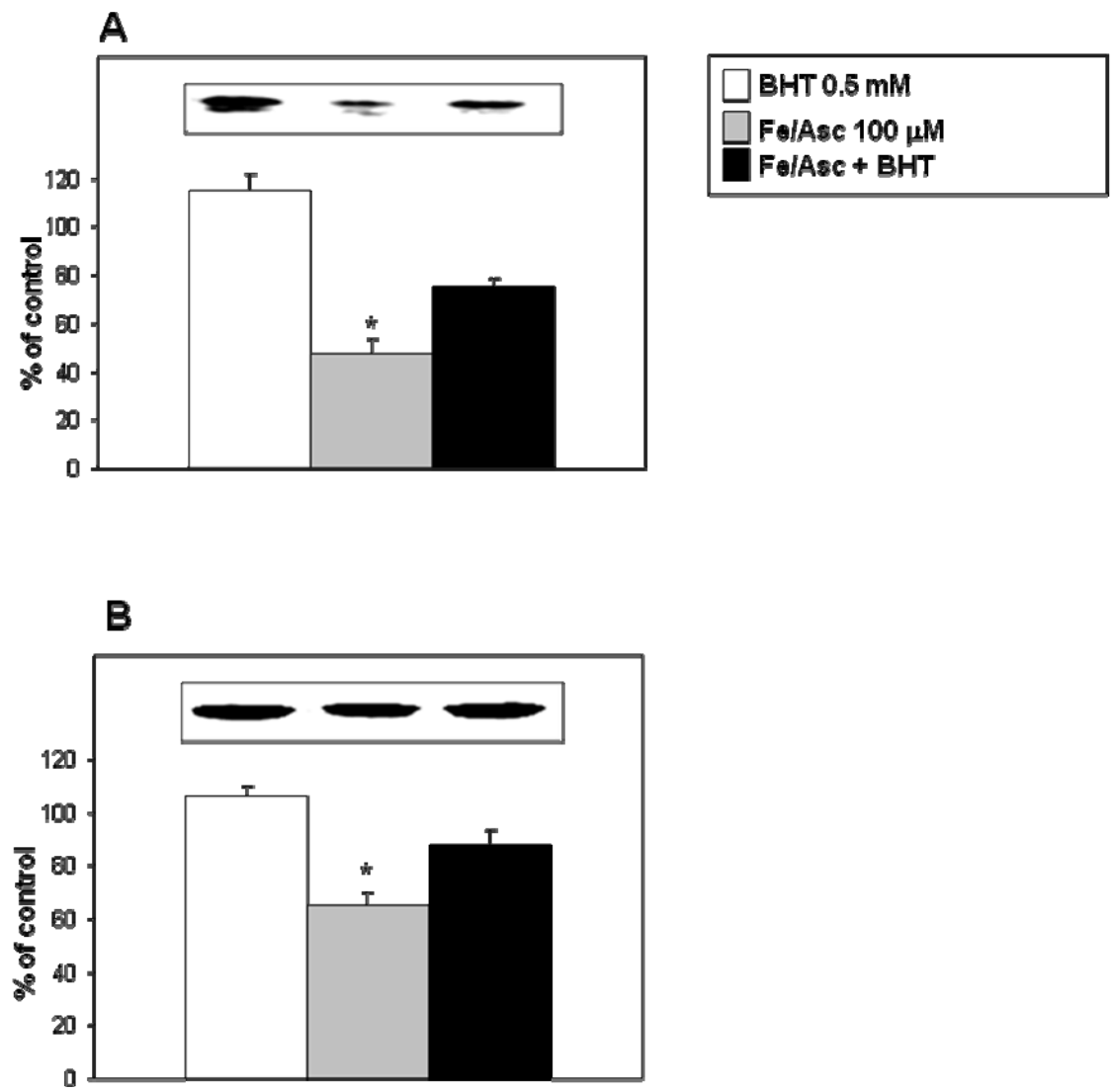
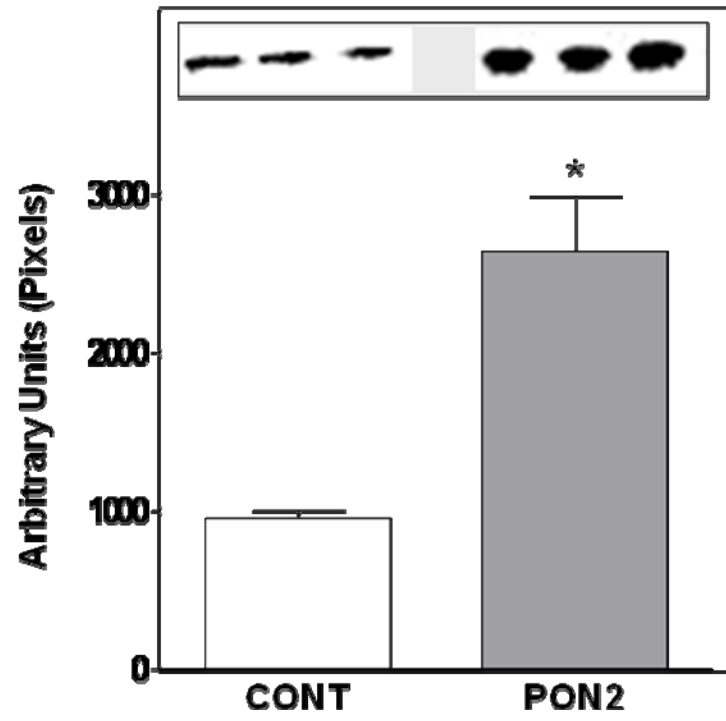


Figure 11



### **4.3. Article 3**

**Précourt, L.P.**, NTimbane, T., Taha, R., Lavoie, J.C., Delvin, E. et Levy, E. Antioxidative properties of paraoxonase 2 in intestinal epithelial cells. Article en préparation.

#### **4.3.1. Apport original et contribution des co-auteurs**

Dans cet article, le modèle de cellules Caco-2/15 invalidées pour PON2 est présenté. Ce modèle a permis de mettre en lumière que la réponse antioxydante est débalancée et que la réaction inflammatoire est exacerbée suite à la forte réduction de PON2. Il établit de manière plus précise le lien entre PON2, l'inflammation et le stress oxydant. En tant que premier auteur, ma contribution a été majeure puisque j'ai participé à la planification du travail, de même qu'au choix et à la réalisation des expériences présentées dans le manuscrit. J'ai aussi assuré la rédaction de l'article. Dr Delvin et Dr Lavoie ont participé à la supervision du projet et à la révision du manuscrit. Dr Ntimbane et Dr Taha ont fourni une aide scientifique pour la mise au point de différentes techniques. Finalement, le Dr Levy était responsable de la supervision de l'étude et de la révision du manuscrit.

## **Antioxidative properties of paraoxonase 2 in intestinal epithelial cells**

**Louis-Philippe Précourt<sup>a</sup>, Thierry Ntimbane<sup>a</sup>, Rame Taha<sup>a</sup>, Jean-Claude Lavoie<sup>b</sup>,  
Edgard Delvin<sup>c</sup> and Emile Levy<sup>a,\*</sup>**

Research Centre, CHU-Sainte-Justine, Departments of <sup>a</sup>Nutrition, <sup>b</sup>Pediatrics and  
<sup>c</sup>Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5.

**Running Title:** Roles of PON2 in the gut

**Address for correspondence:**

\*Dr. Emile Levy  
GI-Nutrition Unit  
CHU Sainte-Justine  
3175 Côte Ste-Catherine  
Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5  
Tel.: [REDACTED]  
Fax: [REDACTED]  
E-mail: [REDACTED]

**ABSTRACT**

Oxidative stress is a major component of inflammatory bowel disease. Paraoxonases (PONs) are antioxidant enzymes that are found throughout the digestive tract, but their roles remain unclear in the intestine. The main objectives of the current study were to generate a reliable model invalidating PON2 expression in intestinal Caco-2/15 cells and to evaluate the antioxidative and inflammatory responses. PON2 expression was knocked-down using lentivirus containing anti-PON2 shRNA and oxidative stress was induced using Iron/Ascorbate. Gene expression and activity of endogenous antioxidant enzymes were determined, as well as various inflammation and oxidative stress markers. Caco-2/15 cells invalidated for PON2 have shown imbalanced primary and secondary antioxidative response, while superoxide dismutases were mostly increased and catalase decreased. This imbalance led to increased hydrogen peroxide concentrations. Moreover, malondyaldehyde levels were elevated and the GSH/GSSG ratio was decreased, suggesting the presence of more oxidative stress in PON2 knockdown cells. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , Interleukin-6 and monocyte chemotactic protein-1 gene expression were also up-regulated in PON2 knockdown Caco-2/15 cells after induction of oxidative stress and transcription factor NF- $\kappa$ B was possibly implicated in that exacerbation of the inflammatory response. These results suggest that PON2 is implicated in the antioxidative and anti-inflammatory response in intestinal epithelial cells and makes it a potentially important player for the etiology and pathogenesis of inflammatory bowel disease.

**Keywords**

paraoxonase, lentiviral knockdown, intestine, oxidative stress, inflammation, peroxidation.

**ABBREVIATIONS**

CAT	Catalase
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
FBS;	Fetal bovine serum
Fe/Asc	Iron/Ascorbate
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
G-Px	Glutathione peroxidase
G-Red	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulfide
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide
HDL	High-density lipoprotein
IBD	Inflammatory bowel disease
IκB	Inhibitor of kappa B
LDL	Low-density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharides
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MDA	Malondialdehyde
MEM	Minimal essential medium
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
PON	Paraoxonase
PON2 KD	Paraoxonase 2 knockdown
ROS	Reactive oxygen species
shRNA	short hairpin RNA
SOD	Superoxide dismutase
TBA	Thiobarbituric acid
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha



## **INTRODUCTION**

In normal physiological conditions, reactive oxygen species (ROS) are taken in charge by the numerous antioxidants found in the body, namely endogenous antioxidants or nutritional antioxidant molecules. Antioxidants are vital for maintaining an equilibrium between pro- and antioxidants<sup>1,2</sup>. A decrease in antioxidant defences or an excess in ROS can lead to major damage to lipids, DNA, proteins and enzymes. Oxidative stress is thus recognized as an important contributing factor for many diseases such as cancer, atherosclerosis, cystic fibrosis, Alzheimer and Parkinson<sup>3-6</sup>.

In the gastrointestinal tract, oxidative stress and inflammation are processes highly implicated in many intestinal disorders<sup>7</sup>. The gastrointestinal mucosa is continuously exposed to oxidants from ingested food and the metabolically very active intestinal flora<sup>8-10</sup>. Inflammatory bowel diseases (IBD), including Crohn's disease and ulcerative colitis, are generally thought to be multifactorial, as genetic predisposition is involved, as well as immune system dysregulation, oxidative stress and various environmental factors<sup>11</sup>. Nutritional antioxidants and endogenous antioxidant enzymes can contribute to the prevention of loss of intestinal homeostasis by controlling ROS levels. Oxidative stress is even thought to be directly involved in the etiology of IBD<sup>12-14</sup>.

Paraoxonases (PONs) are relatively newly identified antioxidant enzymes that consist of three members (PON1, PON2 and PON3), located near to each other on the long arm of chromosome 7 (7q21.3-q22.1)<sup>15</sup>. All members are believed to be powerful antioxidants and research has particularly focused on their atheroprotective potential<sup>16-21</sup>. PON1, mainly synthesized by the liver, is by far the most studied member of the three-gene family because of its association with high-density lipoprotein (HDL) particles in the

blood circulation and its protective effects against low-density lipoprotein (LDL) oxidation and atherosclerosis development<sup>16, 17</sup>. PON3 is similar to PON1 in terms of function and location, as they are both associated to HDL and show the capacity to delay LDL-oxidation *in vitro*<sup>20, 22, 23</sup>. PON2 is expressed in all human tissues and is not associated with HDL in the blood circulation, but would rather be cell-based, which makes it a good candidate for preventing oxidative stress locally within cells<sup>24, 25</sup>. Despite increasing interest in PON2, there is still little information about its functions and characteristics in the digestive tract.

PONs have been identified throughout the digestive tract in humans<sup>26</sup>. Moreover, oxidative stress and inflammation selectively affect the expression of PONs, which suggests their potential implication in IBD<sup>27</sup>. PON1 activities have been found to be reduced in the serum of patients with active Crohn's disease<sup>28</sup> and ulcerative colitis<sup>29</sup>. PON1 and PON3 gene expression were also found to be reduced in colonic samples obtained from Crohn's disease and ulcerative colitis patients<sup>30</sup> and PON1 and PON2 polymorphisms have been shown to be a protective factor to the development of IBD<sup>31, 32</sup>. PON2 may be particularly instrumental in fighting the potentially pro-inflammatory flora and pro-oxidant diet that challenges the intestinal epithelium since the addition of purified PON2 to permeabilized intestinal Caco-2/15 cells protected against Fe/Asc-induced oxidative stress<sup>33</sup>. However, the knowledge about implications of PON2 as an antioxidant or anti-inflammatory player in the digestive tract is still unclear. To demonstrate the physiological and biological functions of PON2 in the intestine, molecular strategies were applied to knockdown PON2 expression in the human intestinal Caco-2/15 cell line.

The aims of the present work were to define the potential implications of PON2 as a novel antioxidative and anti-inflammatory agent in the intestine by generating a reliable intestinal model of PON2 knockdown. We thus evaluated how the inactivation of PON2 influences intestinal cell integrity by assessing differentiation and tight junctions' markers, expression and activity of the classical endogenous antioxidant enzymes, extent of oxidative stress and inflammatory response. The implication of PON2 in the antioxidative defence and anti-inflammatory response in the intestinal cell would suggest a potential role for PON2 in pathophysiological conditions such as IBD.

## **METHODS**

### **Cell culture.**

Caco-2/15 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in minimal essential medium (MEM) (Wisent, St-Bruno, Québec) containing 1% penicillin-streptomycin and 1% MEM non-essential amino acids (Invitrogen, Carlsbad, California) and supplemented with 10% decompemented fetal bovine serum (FBS) (Wisent). Caco-2/15 cells (passages 20–25) were maintained in T-75-cm<sup>2</sup> flasks (Corning Glass Works, Corning, NY). Cultures were split (1:6) when they reached 70–90% confluence, by use of 0.05% trypsin-0.5 mM EDTA (Invitrogen). When cells reached 70-90% confluence again, they were plated at a density of 1 x 10<sup>6</sup> cells/well on 6-well plates (Corning Glass Works), in MEM (as described above) supplemented with 10% FBS. The cells were infected with lentivirus the same day they were plated. The medium was refreshed every 2-3 days.

HEK293 FT packaging cells (Invitrogen) were grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Wisent) containing 1% penicillin-streptomycin, 1% MEM non-essential amino acids, 1% Glutamax, 1% sodium pyruvate solution (Invitrogen) and 500 µg/mL of geneticin, and supplemented with 10% decompemented fetal bovine serum (FBS) (Wisent). HEK293 FT packaging cells were maintained in 10 cm<sup>2</sup> petri dishes. Cells were trypsinized and plated at a density of 5 x 10<sup>6</sup> cells/petri dish. Cells were immediately transfected for lentivirus production.

HeLa cells (ATCC), a gift from Dr Daniel Sinnett, were grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in minimal essential medium (MEM) (Wisent) containing 1% penicillin-streptomycin and 1% MEM non-essential amino acids (Invitrogen) and supplemented with 10%

decomplemented fetal bovine serum (FBS) (Wisent). HeLa cells were used for titrating the lentiviral stock.

### **Lentivirus production.**

Short hairpin RNAs (shRNAs) targeting human paraoxonase 2 mRNA and individually cloned into pLKO.1-puromycin vector were purchased from Open Biosystems (Huntsville, Alabama). HEK293 FT cells were plated at a density of  $5 \times 10^6$  cells/petri dish and immediately transfected by the standard calcium phosphate method for lentivirus production with 5  $\mu\text{g}$  of each of the following DNA plasmids : pLP1, pLP2, pLP/VSVG (Invitrogen) and either pLKO.1 empty vector (used as Mock throughout the study) or pLKO.1-containing shRNA targeting PON2. 18 hours after transfection, 10 mM sodium butyrate (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) was added and medium was replaced 24 hours after transfection. The culture media containing viral supernatants was collected 72 hours after transfection, 0.45  $\mu\text{m}$ -filtered, aliquoted and stored at  $-80^\circ\text{C}$ <sup>34, 35</sup>.

### **Lentivirus titration**

HeLa cells were plated at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well in 12-well plates and immediately infected with 10-fold serial dilutions of lentiviral stock in the presence of 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of polybrene (Sigma). 72 hours after infection, selection started by addition of 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of puromycin (Sigma) and lasted 10 days. Media was replaced every 2-3 days. Cells were then stained using 1% crystal violet in 10% ethanol and the number of puromycin-resistant colonies in each dilution were counted. This procedure allowed

determination of the number of transducing units in each lentiviral stock and ensured equal loading of lentiviruses for infection experiments.

### **Paraoxonase 2 knockdown and cell integrity**

Caco-2/15 cells were plated at a density of  $1 \times 10^6$  cells/well in a 6-well plate containing 2 mL of MEM + 1% penicillin-streptomycin, 1% MEM non-essential amino acids, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of polybrene and supplemented with 10% decompemented FBS. Cells were immediately infected with 3 mL of lentiviral stock solution. After 3 days of incubation with the lentiviral stock solution, cells were trypsinized 1:3 in 6-well plates and selection started with the addition of 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of puromycin to establish a stable PON2 KD. When cells reached confluency, they were allowed to differentiate for a period of 10-12 days before various treatments were applied. The degree of PON2 KD was monitored by RT-PCR and western blot before each experiment. Cells infected with pLKO.1 empty vector (Mock) served as controls throughout the experiments since comparable PON2 gene and protein expression have been shown in comparison to non-infected cells.

Cell integrity was monitored by determination of villin gene and protein expression<sup>34</sup> as a marker of cell differentiation, and occludin gene and protein expression<sup>36</sup> was used to evaluate cell permeability and tight junctions.

### **Induction of oxidative stress and inflammation**

In order to induce oxidative stress, Caco-2/15 cells were incubated with a mixture of iron (Sigma, 200  $\mu\text{M}$ ) and ascorbate (Sigma, 2 mM) (Fe/Asc) for 4 hours. Cells were

previously starved for 18-20 hours with MEM + 1% penicillin-streptomycin, 1% MEM non-essential amino acids, but not supplemented with FBS<sup>27, 37</sup>.

Inflammation was induced by addition of lipopolysaccharides (LPS) (Sigma), 100 µg/ml for 24 hours. Cells were also previously starved for 18-20 hours with MEM + 1% penicillin-streptomycin, 1% MEM non-essential amino acids, but not supplemented with FBS<sup>27, 38</sup>.

### **RNA isolation and RT-PCR**

Total RNA was extracted from differentiated Caco-2/15 cells using TRIzol reagent (Invitrogen), quantities were determined spectrophotometrically. The MMLV-reverse transcriptase (Invitrogen) was used to obtain complementary DNA according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription lasted 50 minutes at 37°C and 3 µg of total RNA were added in each reaction.

Complementary DNA was amplified by PCR using a Taq polymerase (Feldan Bio, Québec) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 20–40 cycles of amplification were used at 95°C for 30 sec, annealing temperature for 30 sec, and 72°C for 30 sec. A detailed list of primers used and specific conditions for each set can be found in Table 1. PCR reactions were performed using the UNO II thermocycler (Biometra). Amplicons were visualized on standard ethidium bromide-stained agarose gels. The number of amplification cycles used corresponds to the linear portion of the exponential phase, as determined in preliminary experiments. Fold induction was calculated using GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) as a reference or

a house-keeping gene, and quantification was determined with the software UN-SCAN-IT gel 6.1<sup>27</sup>.

### **Western blot analysis**

Caco-2/15 cells were collected in mammalian protein extraction reagent (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL) containing antiproteases mixture (Roche Diagnostics, Laval, Québec). Cells were sonificated to ensure proper homogenization and the Bradford assay (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) was used to determine the protein concentration of each sample. Proteins were denatured in sample buffer containing SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol, separated on a 7.5 % SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Non specific binding sites of the membranes were blocked using defatted milk proteins followed by the addition of one of the following primary antibodies: 1:2000 rabbit polyclonal anti-PON2 antibody (prepared by Invitrogen), 1:4000 chicken polyclonal anti-PON3 antibody (HyperOmics Farma Inc., Montreal, Québec, Canada) 1:2000 mouse monoclonal anti-villin antibody (BD Biosciences, Mississauga, Ontario), 1:5000 rabbit polyclonal anti-occludin antibody (Abcam, Campbridge, MA), 1:10,000 goat polyclonal anti-NF- $\kappa$ B p65 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 1:5000 rabbit polyclonal anti-I $\kappa$ B $\alpha$  antibody (Cell signaling, Beverly MA), 1:2000 rabbit anti-Nrf2 polyclonal antibody (Abcam, Campbridge, MA), 1:5000 rabbit anti-PGC1 $\alpha$  polyclonal antibody (Abcam, Campbridge, MA), 1:250,000 mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin antibody (Sigma). The relative amount of primary antibody was detected with specie-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine). The  $\beta$ -actin protein expression was determined to



confirm equal loading. Molecular size markers (Fermentas, Glen Burie, Maryland) were simultaneously loaded on gels. Blots were developed and the protein mass was quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and the UN-SCAN-IT gel 6.1 software.

### **Oxidative stress markers**

Estimation of lipid peroxidation was done measuring the amount of free malondialdehyde (MDA) by HPLC in the culture media. MDA measurements done in the culture media or in the cell lysats give similar information, except that levels are generally higher and more easily quantified in the media<sup>37-39</sup>. Proteins were first precipitated with a 10% sodium tungstate ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ) solution (Sigma). The protein-free supernatants then reacted with an equivalent volume of 0.5% (wt/vol) thiobarbituric acid solution (TBA; Sigma) at 95°C for 60 min. After cooling to room temperature, the pink chromogene [(TBA) 2-MDA] was extracted with 1-butanol and dried over a stream of nitrogen at 37°C. The dry extract was then resuspended in a potassium dehydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )/methanol mobile phase (70:30, pH 7.0) before MDA determination by HPLC with fluorescence detection as previously described<sup>27</sup>.

The ratio of reduced glutathione to glutathione disulfide (GSH/GSSG) was determined after exposure to iron/ascorbate using the Bioxytech GSH/GSSG-412 kit (OxisResearch, Portland, OR). Caco-2/15 cells were washed twice with ice-cold PBS and harvested in 5% meta-phosphoric acid (wt/vol) followed by a centrifugation at 1000 x g at 4°C for 10 min. The supernatants were divided into two aliquots, one for the measurement of total glutathione, and the other for GSSG, which was mixed with thiol scavenging 1-methyl-2-

vinyl-pyridium trifluoromethane sulfonate. Samples were immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For sample analysis, chromogen DTNB, enzyme glutathione-reductase (G-Red) and NADPH were added and absorbance was recorded every 30 seconds for 3 min at 412 nm. Total GSH and GSSG concentrations were calculated using a calibration curve.

### **Measurement of $\text{H}_2\text{O}_2$**

After Caco-2/15 cells were exposed to iron/ascorbate, 100  $\mu\text{L}$  of culture media was collected and added to 900  $\mu\text{L}$  of FOX reagent (for 100 ml: 270  $\mu\text{L}$  concentrated  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Xylenol orange 5 mM,  $\text{FeCl}_2$  12,5 mM, BHT 40 mM, in 80% methanol) and incubated at room temperature for 30 min. Absorbance was recorded at 560 nm and  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations were determined using a calibration curve.

### **Endogenous antioxidant enzyme activities**

Caco-2/15 cells were harvested in hypotonic lysis buffer (10 mM HEPES, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF). Total SOD activity was determined as described by McCord *et al.*<sup>40</sup>. Briefly,  $\text{O}_2^-$  was generated by the addition of xanthine and xanthine oxidase and the oxidation of the SOD assay cocktail is followed spectrophotometrically at 550 nm for 5 min, without adding a sample (blank). The same reaction is then repeated with the addition of the sample and the SOD assay cocktail is less oxidized because of the SOD activity in the sample and total SOD activity can be calculated.

The assay for the catalase (CAT) activity was adapted from the protocol reported by Jiang *et al.*<sup>41</sup> with measurement of xylenol orange oxidation at 560 nm in the presence of

ferrous ions. Briefly, 100  $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  were added and the absorbance was monitored at 560 nm, which gave a reference value. Sample were then incubated on ice with the same  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations and allowed to react for 5 min. Because of the CAT activity found in the sample, xylenol orange is less oxidized because  $\text{H}_2\text{O}_2$  has been hydrolyzed. CAT activity can then be calculated using a standard curve.

For glutathione peroxidase (G-Px) activity, cell homogenates were added to a PBS buffer containing 10 mM GSH, 0.1 U of glutathione reductase and 2 mM NADPH with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1.5%) to initiate the reaction. Absorbance was monitored every 30 sec at 340 nm for 5 min.

For glutathione reductase (G-Red) activity, cell homogenates were added to a PBS buffer containing 2 mM NADPH and 10 mM of GSSG to initiate the reaction. Absorbance was monitored every 30 sec at 340 nm for 5 min.

### **Statistical analysis.**

All values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. The data were evaluated by ANOVA and the differences between the means were assessed using the Tukey's post test.

## **RESULTS**

### **Validation of PON2 knockdown in Caco-2/15 cells**

To define the roles of PON2 in the oxidative stress and inflammatory response at the intestinal level, Caco-2/15 cells were infected with lentiviruses containing anti-PON2 shRNA to generate a model of intestinal cells in which PON2 expression is largely reduced. They were allowed to differentiate for 10-12 days and PON2 expression was compared to that of cells that were not infected with lentiviruses (CTRL) and pLKO.1 empty vector (Mock) infected cells. Gene expression analyzed by RT-PCR revealed a marked reduction in PON2 transcript (~75%) in anti-PON2 shRNA-transfected cells compared to mock and CTRL cells (Fig. 1A). Western blot experiments confirmed the major PON2 knockdown (KD) at the protein level, as a reduction of more than 80% was noted in anti-PON2 shRNA-transfected cells compared to mock and CTRL cells (Fig. 1B). Since no differences were noted between CTRL and Mock cells, the latter were employed as controls for the subsequent experiments.

### **Paraoxonase 2 knockdown and cell integrity.**

The effects of PON2 KD on cell integrity were examined. Villin<sup>34</sup> gene and protein expression were analyzed as markers of cell differentiation and occludin gene and protein expression were used as a marker of tight junctions and mucosal barrier function<sup>36</sup>. In normal control conditions, no differences were observed between Mock and PON2 KD groups for villin and occludin expression (Fig. 2). However, occludin expression was of particular interest after iron/ascorbate (Fe/Asc)-induced oxidative stress since tight junctions have shown to be affected in such conditions<sup>42-45</sup>. In our experiments, occludin

expression was significantly reduced in PON2 KD cells submitted to Fe/Asc treatment, compared to Mock cells (Fig. 2C-D).

#### **Paraoxonases 1 and 3 gene expression in paraoxonase 2 knockdown Caco-2/15 cells.**

PON1 and PON3 expression was analyzed in anti-PON2 shRNA-transfected cells to verify if the other members of the PON family could compensate for the major PON2 reduction. No marked differences were observed in PON1 and PON3 gene expression, as well as in PON3 protein expression between PON2 KD and Mock groups, as Fe/Asc-induced oxidative stress remained without a significant impact (Fig. 3). Noteworthy, PON1 protein expression was not determined since it was not detectable in Caco-2/15 cells as reported in our previous investigation<sup>27</sup>.

#### **PON2 knockdown and antioxidative response.**

The antioxidative response of endogenous antioxidant enzymes was analyzed to see if it was modified after PON2 KD in Caco-2/15 cells and to determine whether the oxidative balance was deranged.

When the primary antioxidative response of SOD enzymes was assessed, SOD-2 gene expression remained unchanged (Fig. 4B), but SOD-1 (Fig. 4A) and SOD-3 (Fig. 4C) gene expression were upregulated in PON2 KD cells following the induction of oxidative stress with Fe/Asc. Total SOD activity was also strongly induced in pro-oxidative conditions, but with similar patterns in Mock and PON2 KD groups (Fig. 4D).

The secondary antioxidative response in PON2 KD Caco-2/15 cells was also determined. G-Px2 gene expression was slightly and equally increased in Mock and PON2 KD groups

after Fe/Asc treatment (Fig. 5A). G-Px activity was however strongly upregulated in both groups upon induction of oxidative stress (Fig. 5B). Interestingly, CAT gene expression was strongly reduced in PON2 KD cells, independently of oxidative stress induction (Fig. 5C). CAT activity was also decreased in PON2 KD group in normal conditions, but similarly reduced upon induction of oxidative stress in both groups (Fig. 5D).

The G-Red enzyme is an important part of the antioxidative response for the maintenance of an oxidative balance. G-Red gene expression was upregulated in PON2 KD group after Fe/Asc induced oxidative stress (Fig. 6A), but activity was not altered (Fig. 6B).

### **Oxidative stress markers in paraoxonase 2 knockdown Caco-2/15 cells**

The extent of lipid peroxidation in PON2 KD cells was assessed by determining levels of MDA in the culture media. MDA levels were significantly increased in Mock and PON2 KD groups after exposure to Fe/Asc compared to non-exposed Mock cells. However, the rise in MDA levels was significantly more important in PON2 KD cells (Fig. 7A).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels were also measured in the culture media to verify if the oxidative balance was maintained in PON2 KD cells given that primary and secondary antioxidative responses were altered in our study. In fact, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels were found to be elevated in the PON2 KD group even without Fe/Asc treatment (Fig. 7B).

We finally turned to the redox potential, reduced glutathione/glutathione disulfide (GSH/GSSG), that is considered as a powerful cellular sensor of oxidative stress. Following Fe/Asc-induced oxidative stress, PON2 KD cells displayed a lower GSH/GSSG ratio than Mock cells (Fig. 7C).

### **Inflammatory response in paraoxonase 2 knockdown Caco-2/15 cells**

Since inflammation and oxidative stress are two phenomenon closely linked, we analyzed the modulation of gene expression of various pro-inflammatory components, as a possible consequence of PON2 silencing. In a first step, we could observe that TNF- $\alpha$  gene expression was significantly higher in PON2 KD cells compared to Mock cells without any treatment (Fig. 8A). Induction of oxidative stress by Fe/Asc strongly stimulated TNF- $\alpha$  gene expression in PON2 KD and Mock cells, but the impact was more pronounced in PON2 KD (Fig. 8A). Gene expression of IL-6 and MCP-1 was augmented after induction of oxidative stress only in the PON2 KD group (Fig. 8B and C), whereas IL-8 gene expression was increased similarly in both experimental groups (Fig. 8D).

### **NF- $\kappa$ B activation in lipopolysaccharides-challenged paraoxonase 2 knockdown Caco-2/15 cells**

Since the expression of various inflammatory genes was induced in PON2 KD cells, it was relevant to evaluate the status of NF- $\kappa$ B, a critical transcription factor that mediates inflammatory pathways. Its activation was determined after a challenge with LPS. We examined the protein expression of NF- $\kappa$ B and of its inhibitory molecule I $\kappa$ B, that prevents the translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus to activate the transcription of pro-inflammatory target genes<sup>27</sup>. A marked decreased level of I $\kappa$ B characterized PON2 KD and Mock cells following LPS treatment (Fig. 9B), but there was no significant statistical differences between the two groups. However, calculation of NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B ratio indicated an enhanced activation NF- $\kappa$ B in PON2 KD cells (Fig. 9A).

**Transcription factors involved in the regulation of antioxidative and inflammatory response in paraoxonase 2 knockdown Caco-2/15 cells**

We evaluated the protein expression of the transcription factors PGC1 $\alpha$  and Nrf2 that are involved in the regulation of antioxidant status in cells. Little change was observed in Nrf2 in response to Fe/Asc treatment (Fig. 10A), whereas a significant decrease was noted in PGC1 $\alpha$  (Fig. 10B).



## **DISCUSSION**

PON2 has shown to be widely expressed throughout the digestive tract and oxidative stress and inflammation affect its expression<sup>26, 27</sup>. Moreover, addition of purified PON2 to permeabilized intestinal Caco-2/15 cells decreased lipid peroxidation after induction of oxidative stress<sup>33</sup> and PON2 polymorphisms have been shown to be a protective factor to the development of IBD<sup>32</sup>, but the antioxidant and anti-inflammatory functions of PON2 in the intestine are not well defined. In this investigation, we achieved a reliable model of PON2 invalidation in the human intestinal Caco-2/15 cell line, reducing PON2 gene and protein expression by more than 80%. PON2 KD did not affect cell integrity or tight junctions in normal conditions, as expression of villin and occludin were not affected. However, oxidative balance seemed to be lost in PON2 KD cells, as SOD activity was increased, but coupled with a decrease in CAT activity. As a result, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels were found to be increased in the culture media of PON2 KD cells. Cells invalidated for PON2 were also more susceptible to oxidative stress injury, as demonstrated by higher MDA levels and a reduced GSH/GSSG ratio. The inflammatory response was exacerbated in PON2 KD cells since TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1 expression were increased after Fe/Asc-induced oxidative stress compared to Mock cells. The pro-inflammatory transcription factor NF- $\kappa$ B was also over-activated after LPS challenge.

After generation of the PON2 KD model in intestinal Caco-2/15 cells, experiments were undertaken in order to make sure that the cellular integrity was not altered by the lentiviral infection or the invalidation of PON2. Villin gene and protein expression<sup>34</sup> was used as marker of cell differentiation and revealed no difference between control cells

(not infected), Mock and PON2 KD cells. Upon differentiation, Caco-2/15 cells form tight junctions, which are major components of the epithelial barrier and implicated in the control of intestinal permeability<sup>45, 46</sup>. Occludin gene and protein expression was used as a marker of tight junctions<sup>36</sup> and no difference was seen in normal conditions between control cells (not infected), Mock and PON2 KD cells. These results show that the differentiation process and integrity of Caco-2/15 cells is not affected by either infection or PON2 invalidation and that the model is reliable. Tight junctions components are known to be altered by pro-inflammatory conditions<sup>42-45</sup>, which can exacerbate the inflammatory reaction. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can also have deleterious effects on tight junctions<sup>44</sup>. Accordingly, occludin expression was significantly reduced in PON2 KD cells submitted to Fe/Asc treatment, suggesting that epithelial barrier integrity is at risk in the absence of PON2.

PON2 is a member of the paraoxonase multi-gene family, also composed of PON1 and PON3<sup>15</sup>. Although PONs have different substrate specificity<sup>47-49</sup>, they all share antioxidant function, principally demonstrated in the blood circulation for the prevention of atherosclerosis<sup>16, 19, 50</sup>. PON1 and PON3 expression have been found in intestinal tissue in human and mice<sup>26, 51</sup>, but conflicting data has emerged<sup>27</sup>. However, PON1 and PON3 expression were analyzed in PON2 KD cells and they were not found to be regulated, so they do not seem to compensate for the major PON2 reduction.

The expression of other endogenous antioxidant enzymes could be adjusted in order to compensate PON2 relative absence. For maintenance of intestinal homeostasis, the

oxidative balance has to be preserved. This means that the various endogenous antioxidant enzymes have to be regulated in a coordinated manner. Superoxide dismutase enzymes are responsible for the primary antioxidative response. Superoxide anions are constantly produced in the mitochondria as a result of normal energy metabolism. The main function of SODs is to catalyze the conversion of these superoxide anions into oxygen and the less reactive  $H_2O_2$ <sup>52</sup>.  $H_2O_2$  has to be taken in charge by the secondary antioxidant response, composed mainly of GSH-Px and CAT, which catalyze the dismutation of  $H_2O_2$  to oxygen and water<sup>53, 54</sup>. In PON2 KD cells, SOD-1 and SOD-3 gene expression was found to be up-regulated after induction of oxidative stress, compared to mock cells. However, a similar increase in total SOD activity was found in both groups. Secondary antioxidant G-Px gene expression and activity were up-regulated similarly in both groups when cells were submitted to oxidative stress; however CAT expression and activity were strongly down-regulated in PON2 KD cells, even in normal conditions. These results suggest that PON2 KD cells have an imbalanced secondary antioxidant response, which could lead to  $H_2O_2$  accumulation and loss of homeostasis. Consequently,  $H_2O_2$  concentration was measured in the culture media and revealed a significant rise for PON2 KD cells, in comparison to mock cells, in normal conditions. Moreover, estimation of lipid peroxidation was done measuring MDA levels in the culture media, since levels in cell lysates gave similar information<sup>37-39</sup>. MDA levels were strongly increased in Mock and PON2 KD groups after Fe/Asc-induced oxidative stress, and significantly higher in PON2 KD cells. These results suggest that an imbalanced antioxidative response occurs in PON2 KD cells, leading to  $H_2O_2$  accumulation and making the cells more at risk towards oxidative stress.

The GSH/GSSG ratio is an indicator of the oxidative state of the cells<sup>55</sup>. Under pro-oxidative conditions, GSSG is increased and the GSH/GSSG ratio is decreased as a consequence. In PON2 KD cells, the GSH/GSSG ratio was found to be decreased after induction of oxidative stress, which confirms that the cells are more fragile towards oxidative stress. The G-Red enzyme is an important part of the antioxidative response and a factor in the GSH/GSSG ratio, since it is responsible for regeneration of GSH from GSSG<sup>56</sup>. Under oxidative stress and in absence of PON2, G-Red gene expression is up-regulated, possibly as a compensatory mechanism to regulate the GSH/GSSG ratio. However, the ratio is still decreased with various oxidative stress markers increased in PON2 KD cells.

Modifications in the GSH/GSSG ratio can up-regulate the inflammatory response. When GSH is depleted, the expression of many pro-inflammatory cytokines is increased and NF- $\kappa$ B is activated<sup>57-60</sup>. Oxidized lipids can also induce pro-inflammatory genes like TNF- $\alpha$  and MCP-1 via NF- $\kappa$ B activation<sup>61</sup>. In our model, major changes have been observed in the antioxidative response so the inflammatory response was analyzed. Moreover, PON2 has already been shown to possess anti-inflammatory potential, as macrophages isolated from PON2-deficient mice treated with LPS had increased TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  gene expression<sup>19</sup>. In PON2 KD or Mock cells, induction of oxidative stress by Fe/Asc significantly increased TNF- $\alpha$  gene expression, but the rise was significantly higher in PON2 KD cells. Gene expressions of IL-6 and MCP-1 were also increased in PON2 KD cells. TNF- $\alpha$  gene expression was also significantly higher in PON2 KD cells

in normal basal conditions, suggesting that PON2 KD makes intestinal epithelial cells more inflammation prone. These results demonstrate that invalidation of PON2 facilitates the development of an exacerbated inflammatory response.

PON2 KD cells were challenged with LPS in order to verify if the up-regulation of various pro-inflammatory genes was due to NF- $\kappa$ B activation. The NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B ratio was elevated in both groups after LPS challenge, but was significantly higher in PON2 KD cells. This result confirms that the inflammatory response is exacerbated in PON2 KD cells and that NF- $\kappa$ B could be implicated in the up-regulation of TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1 expression.

In PON2 KD cells, gene expression of various endogenous antioxidant enzymes have been found to be increased, such as G-Px2 and G-Red, which are known target genes of Nrf2<sup>62-64</sup>. However, no significant change was seen in Nrf2 protein expression. PGC1 $\alpha$  has also been shown to be a ROS sensor and has been linked with the up-regulation G-Px, SODs and to a lesser extent CAT gene expression<sup>65, 66</sup>. PGC1 $\alpha$  gene expression has already been shown to be induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and exercise-induced oxidative stress<sup>65, 67</sup>, and is increased in PON2 KD cells after Fe/Asc treatment (data not shown). However, PGC1 $\alpha$  protein expression is strongly reduced by Fe/Asc treatment<sup>68</sup>. Nrf2 and PGC1 $\alpha$  could be implicated in the regulation of antioxidant enzymes expression in PON2 KD cells.

Oxidative stress and inflammation are closely linked and both processes are of major importance in IBD. In intestinal Caco-2/15 cells, many consequences of the invalidation of PON2 suggest a possible implication of the enzyme in IBD. The imbalance between the primary and secondary antioxidants in PON2 KD cells has already been observed in intestinal epithelial cells of Crohn's disease patients<sup>69</sup>. Overexpression of SODs are not necessarily beneficial and can cause lipid peroxidation as a result of peroxides generated due to such an imbalanced response<sup>70</sup>, although conflicting results have emerged<sup>71</sup>. This loss of oxidative balance may contribute to the initiation and perpetuation of the inflammatory response in IBD<sup>72</sup> and in our model to an accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is not very reactive by itself, but can react with iron to form the highly damaging hydroxyl radical<sup>73</sup>. High H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations in the intestine can have major deleterious effects. For a long period of time during the 20<sup>th</sup> century, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enemas were recommended by physicians to help evacuating fecal impactions<sup>14</sup>. However, these H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enemas were found to induce rectal bleeding and colitis in certain predisposed patients<sup>74-76</sup>. Moreover, lipid peroxidation can be accelerated as a consequence of an imbalanced antioxidant defence and when a precursor of the hydroxyl radical such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is not removed<sup>13</sup>.

Oxidative stress and lipid peroxidation can also have major deleterious effects on membrane fluidity and epithelial barrier function, as demonstrated by a reduced occludin expression in PON2 KD cells. A loss of homeostasis in membrane permeability can have important repercussions in IBD, since alterations of the epithelial barrier allow bacteria from the luminal flora and food antigens to enter the colonic wall and induce an inflammatory response<sup>14</sup>.

Increased expression of pro-inflammatory genes such as TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1 has been observed in our model. TNF- $\alpha$  and IL-6 are cytokines involved in the acute-phase response and can stimulate the inflammatory reaction in IBD<sup>77, 78</sup>. TNF- $\alpha$  is of particular relevance for IBD, since anti-TNF therapy induces mucosal healing and can lead to remission in Crohn's disease<sup>77</sup>. MCP-1 is responsible for the recruitment of monocytes to the inflammatory site and has shown to be elevated in IBD<sup>79, 80</sup>, which are characterized by the accumulation of granulocytes and monocytes/macrophages<sup>81</sup>. The reduction of PON2 expression thus seems to have major consequences on intestinal cells and could be relevant for IBD.

## **Conclusion**

PON2 is thought to be an antioxidant enzyme, but only a few reports have demonstrated this potential function for PON2. PON2 has been overexpressed in HeLa cells where it has shown the capacity to reduce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced intracellular oxidative stress, and when incubated with LDL, monocyte chemotaxis was reduced<sup>25</sup>. In vascular cells, a marked reduction in ROS levels was observed in PON2-overexpressing cells after induction of oxidative stress, while an increase in ROS levels was seen in cells invalidated for PON2<sup>24</sup>. PON2-overexpressing or knockout mice have shown respectively an improved or altered antioxidative defence, and the prevention or worsening of atherosclerosis<sup>19, 82-84</sup>. PON2 has also recently been shown to play important roles within the mitochondria, preventing superoxide formation and apoptosis and maintaining ATP production<sup>85, 86</sup>, and alteration of mitochondrial functions may be implicated in IBD<sup>87</sup>. Our results suggest that a reduced PON2 activity would possibly mean an accumulation of oxidized lipids and

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which could exacerbate the inflammatory response in intestinal epithelial cells. The invalidation of PON2 in intestinal Caco-2/15 cells had a major impact on antioxidative defence and anti-inflammatory response, which suggests a potential role for PON2 in IBD, for the maintenance of intestinal homeostasis and mucosal barrier integrity.



**ACKNOWLEDGEMENTS**

The current work was supported by a research grant from the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (EL), J.A. de Sève Research Chair in Nutrition (EL) and FRSQ Scholarship Award (LPP). The authors thank Schohraya Spahis, Dr Alain T. Sané and Dre Geneviève Mailhot for their expert technical assistance.

**REFERENCES**

1. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994;52:253-65.
2. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med* 1999;26:1034-53.
3. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2010;38:96-109.
4. Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Collins CE, Garg ML. Oxidative stress in cystic fibrosis: dietary and metabolic factors. *J Am Coll Nutr* 2001;20:157-65.
5. Choi J, Rees HD, Weintraub ST, Levey AI, Chin LS, Li L. Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *J Biol Chem* 2005;280:11648-55.
6. Victor VM, Rocha M, Sola E, Banuls C, Garcia-Malpartida K, Hernandez-Mijares A. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 2009;15:2988-3002.
7. Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1994;344:859-61.
8. Kumar A, Wu H, Collier-Hyams LS, Hansen JM, Li T, Yamoah K, Pan ZQ, Jones DP, Neish AS. Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *Embo J* 2007;26:4457-66.
9. Parks DA. Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut* 1989;30:293-8.
10. Cross CE, Halliwell B, Allen A. Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *Lancet* 1984;1:1328-30.
11. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 2004;3:394-400.
12. Levy E, Rizwan Y, Thibault L, Lepage G, Brunet S, Bouthillier L, Seidman E. Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71:807-15.
13. Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1997-2015.
14. Pravda J. Radical induction theory of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2005;11:2371-84.
15. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996;33:498-507.
16. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998;394:284-7.
17. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Berliner JA, Witztum JL, Lusis AJ. Combined serum

- paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2000;275:17527-35.
18. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1304-16.
  19. Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V, Hama S, Shih DM, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ, Young S, Reddy ST. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol Chem* 2006;281:29491-500 Epub 2006 Aug 4.
  20. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:542-7.
  21. Zhang C, Peng W, Wang M, Zhu J, Zang Y, Shi W, Zhang J, Qin J. Studies on protective effects of human paraoxonases 1 and 3 on atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Gene Ther* 2010;17:626-33.
  22. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000;275:33435-42.
  23. Liu Y, Mackness B, Mackness M. Comparison of the ability of paraoxonases 1 and 3 to attenuate the in vitro oxidation of low-density lipoprotein and reduce macrophage oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2008;45:743-8.
  24. Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Kruger M, Strand D, Forstermann U. Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation* 2007;115:2055-64 Epub 2007 Apr 2.
  25. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001;276:44444-9 Epub 2001 Sep 28.
  26. Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, Suissa A, Aviram M. Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radic Biol Med* 2005;39:336-44 Epub 2005 Apr 6.
  27. Precourt LP, Seidman E, Delvin E, Amre D, Deslandres C, Dominguez M, Sinnott D, Levy E. Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1628-37.
  28. Boehm D, Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Matusiewicz M, Berdowska I, Zielinski B, Paradowski L, Gamian A. Paraoxonase-1 status in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:93-9.

29. Baskol G, Baskol M, Yurci A, Ozbakir O, Yucesoy M. Serum paraoxonase 1 activity and malondialdehyde levels in patients with ulcerative colitis. *Cell Biochem Funct* 2006;24:283-6.
30. Rothem L, Hartman C, Dahan A, Lachter J, Eliakim R, Shamir R. Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellularly localized to the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med* 2007;43:730-739 Epub 2007 May 10.
31. Karban A, Hartman C, Eliakim R, Waterman M, Neshier S, Barnett-Griness O, Shamir R. Paraoxonase (PON)1 192R allele carriage is associated with reduced risk of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2007;52:2707-15.
32. Sanchez R, Levy E, Seidman E, Amre D, Costea F, Sinnott D. Paraoxonase 1, 2 and 3 DNA variants and susceptibility to childhood inflammatory bowel disease. *Gut* 2006;55:1820-1.
33. Levy E, Trudel K, Bendayan M, Seidman E, Delvin E, Elchebly M, Lavoie JC, Precourt LP, Amre D, Sinnott D. Biological role, protein expression, subcellular localization, and oxidative stress response of paraoxonase 2 in the intestine of humans and rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G1252-61.
34. Mailhot G, Rabasa-Lhoret R, Moreau A, Berthiaume Y, Levy E. CFTR depletion results in changes in fatty acid composition and promotes lipogenesis in intestinal Caco 2/15 cells. *PLoS One* 2010;5:e10446.
35. Mailhot G, Ravid Z, Barchi S, Moreau A, Rabasa-Lhoret R, Levy E. CFTR knockdown stimulates lipid synthesis and transport in intestinal Caco-2/15 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;297:G1239-49.
36. Cui W, Li LX, Sun CM, Wen Y, Zhou Y, Dong YL, Liu P. Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. *Braz J Med Biol Res* 2010;43:330-7.
37. Courtois F, Suc I, Garofalo C, Ledoux M, Seidman E, Levy E. Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G12-9.
38. Courtois F, Seidman EG, Delvin E, Asselin C, Bernotti S, Ledoux M, Levy E. Membrane peroxidation by lipopolysaccharide and iron-ascorbate adversely affects Caco-2 cell function: beneficial role of butyric acid. *Am J Clin Nutr* 2003;77:744-50.
39. Courtois F, Delvin E, Ledoux M, Seidman E, Lavoie JC, Levy E. The antioxidant BHT normalizes some oxidative effects of iron + ascorbate on lipid metabolism in Caco-2 cells. *J Nutr* 2002;132:1289-92.
40. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.
41. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 1991;26:853-6.
42. Ciccocioppo R, Finamore A, Ara C, Di Sabatino A, Mengheri E, Corazza GR. Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease. *Am J Clin Pathol* 2006;125:502-11.

43. Perry I, Tselepis C, Hoyland J, Iqbal TH, Scott D, Sanders SA, Cooper BT, Jankowski JA. Reduced cadherin/catenin complex expression in celiac disease can be reproduced in vitro by cytokine stimulation. *Lab Invest* 1999;79:1489-99.
44. Katsube T, Tsuji H, Onoda M. Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in monolayers of intestinal epithelial cell. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:794-803.
45. Rao RK, Basuroy S, Rao VU, Karnaky Jr KJ, Gupta A. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem J* 2002;368:471-81.
46. Levy E, Mehran M, Seidman E. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *Faseb J* 1995;9:626-35.
47. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res* 2005;46:1239-47 Epub 2005 Mar 16.
48. Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry* 2005;44:6371-82.
49. Teiber JF, Billecke SS, La Du BN, Draganov DI. Estrogen esters as substrates for human paraoxonases. *Arch Biochem Biophys* 2007;461:24-9 Epub 2007 Mar 8.
50. Ng CJ, Bourquard N, Hama SY, Shih D, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Adenovirus-mediated expression of human paraoxonase 3 protects against the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1368-74 Epub 2007 Apr 19.
51. Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Beltran R, Joven J, Camps J. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 2008;45:146-57.
52. Maier CM, Chan PH. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 2002;8:323-34.
53. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1825-35.
54. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32:595-603.
55. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1191-212.
56. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985;113:484-90.
57. Armstrong JS, Steinauer KK, Hornung B, Irish JM, Lecane P, Birrell GW, Peehl DM, Knox SJ. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ* 2002;9:252-63.
58. Haddad JJ. Glutathione depletion is associated with augmenting a proinflammatory signal: evidence for an antioxidant/pro-oxidant mechanism regulating cytokines in the alveolar epithelium. *Cytokines Cell Mol Ther* 2000;6:177-87.
59. Haddad JJ, Saade NE, Safieh-Garabedian B. Redox regulation of TNF-alpha biosynthesis: augmentation by irreversible inhibition of gamma-glutamylcysteine

- synthetase and the involvement of an IkappaB-alpha/NF-kappaB-independent pathway in alveolar epithelial cells. *Cell Signal* 2002;14:211-8.
60. Haddad JJ. L-Buthionine-(S,R)-sulfoximine, an irreversible inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase, augments LPS-mediated pro-inflammatory cytokine biosynthesis: evidence for the implication of an IkappaB-alpha/NF-kappaB insensitive pathway. *Eur Cytokine Netw* 2001;12:614-24.
  61. Dwarakanath RS, Sahar S, Reddy MA, Castanotto D, Rossi JJ, Natarajan R. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by the oxidized lipid, 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid, in vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappa B (NF-kappa B). *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:585-95.
  62. Banning A, Deubel S, Kluth D, Zhou Z, Brigelius-Flohe R. The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol Cell Biol* 2005;25:4914-23.
  63. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009;46:443-53.
  64. Singh A, Rangasamy T, Thimmulappa RK, Lee H, Osburn WO, Brigelius-Flohe R, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:639-50.
  65. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Kloting N, Birringer M, Kiehnopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Bluher M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:8665-70.
  66. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 2006;127:397-408.
  67. Spiegelman BM. Transcriptional control of energy homeostasis through the PGC1 coactivators. *Novartis Found Symp* 2007;286:3-6; discussion 6-12, 162-3, 196-203.
  68. Zhu L, Liu Z, Feng Z, Hao J, Shen W, Li X, Sun L, Sharman E, Wang Y, Wertz K, Weber P, Shi X, Liu J. Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *J Nutr Biochem* 2010;21:1089-98.
  69. Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003;201:17-27.
  70. Ceballos-Picot I. [Transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase: a model for the study of radical mechanisms and aging]. *C R Seances Soc Biol Fil* 1993;187:308-23.
  71. Kruidenier L, van Meeteren ME, Kuiper I, Jaarsma D, Lamers CB, Zijlstra FJ, Verspaget HW. Attenuated mild colonic inflammation and improved survival from severe DSS-colitis of transgenic Cu/Zn-SOD mice. *Free Radic Biol Med* 2003;34:753-65.

72. Kruidenier L, Kuiper I, van Duijn W, Marklund SL, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003;201:7-16.
73. Halliwell B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathol Biol (Paris)* 1996;44:6-13.
74. Sheehan JF, Brynjolfsson G. Ulcerative colitis following hydrogen peroxide enema: case report and experimental production with transient emphysema of colonic wall and gas embolism. *Lab Invest* 1960;9:150-68.
75. Meyer CT, Brand M, DeLuca VA, Spiro HM. Hydrogen peroxide colitis: a report of three patients. *J Clin Gastroenterol* 1981;3:31-5.
76. Brynjolfsson G. Colonic injury from hydrogen peroxide. *N Engl J Med* 1967;277:662.
77. Peyrin-Biroulet L. Anti-TNF therapy in inflammatory bowel diseases: a huge review. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2010;56:233-43.
78. Atreya R, Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005;28:187-96.
79. Motomura Y, Khan WI, El-Sharkawy RT, Verma-Gandhu M, Verdu EF, Gauldie J, Collins SM. Induction of a fibrogenic response in mouse colon by overexpression of monocyte chemoattractant protein 1. *Gut* 2006;55:662-70.
80. Banks C, Bateman A, Payne R, Johnson P, Sheron N. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pathol* 2003;199:28-35.
81. Gross V, Arndt H, Andus T, Palitzsch KD, Scholmerich J. Free radicals in inflammatory bowel diseases pathophysiology and therapeutic implications. *Hepatogastroenterology* 1994;41:320-7.
82. Ng CJ, Hama SY, Bourquard N, Navab M, Reddy ST. Adenovirus mediated expression of human paraoxonase 2 protects against the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Mol Genet Metab* 2006;89:368-73 Epub 2006 Aug 28.
83. Meilin E, Aviram M, Hayek T. Paraoxonase 2 (PON2) decreases high glucose-induced macrophage triglycerides (TG) accumulation, via inhibition of NADPH-oxidase and DGAT1 activity: Studies in PON2-deficient mice. *Atherosclerosis* 2009.
84. Rosenblat M, Coleman R, Reddy ST, Aviram M. Paraoxonase 2 attenuates macrophage triglyceride accumulation via inhibition of diacylglycerol acyltransferase 1. *J Lipid Res* 2009;50:870-9.
85. Altenhofer S, Witte I, Teiber JF, Wilgenbus P, Pautz A, Li H, Daiber A, Witan H, Clement AM, Forstermann U, Horke S. One enzyme, two functions: PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity. *J Biol Chem* 2010;285:24398-403.
86. Devarajan A, Bourquard N, Hama S, Navab M, Grijalva V, Morvardi S, Clarke C, Vergnes L, Reue K, Teiber JF, Reddy ST. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2010.

87. Taha R, Seidman E, Mailhot G, Boudreau F, Gendron FP, Beaulieu JF, Menard D, Delvin E, Amre D, Levy E. Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 cell line. *PLoS One* 2010;5:e11817.
88. Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, Meier CA, Bell DR, Kralli A, Giacobino JP, Deriaz O. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes* 2003;52:2874-81.



**Table 1. Primers used for RT-PCR reactions**

Gene	Primers	Amplicon	Annealing temperature	Number of cycles
GAPDH	F- AGAAGGCTGGGGCTCATT R- GGGCCATCCACAGTCTTCT	256 bp	58°C	21
PON1	F- GCCTAATGGACTGGCTTTCA R- ACTTGGCATCTGGATGGTTC	242 bp	58°C	38
PON2	F- TGATTCAAGCAAATGGGATCA R- GCTTCTGGCCATTAGGATGA	212 bp	58°C	25
PON3	F- TCTTGGATCTTCGCTGGACT R- CCACTAAGGTGCCCAACTGT	216 bp	58°C	30
SOD-1	F- AGGGCATCATCAATTTTCGAG R- ACATTGCCCAAGTCTCCAAC	217 bp	58°C	23
SOD-2	F- CGACCTGCCCTACGACTACG R- TGACCACCACCATTGAACTT	198 bp	58°C	22
SOD-3	F- GGTGCAGCTCTCTTTTCAGG R- ACATGTCTCGGATCCACTCC	181 bp	58°C	30
GSH-Reductase	F- CAGTGGACTCACGGAAGAT R- AAACCCTGCAGCATTTCATC	205 bp	58°C	27
GSH-Peroxidase	F- TTCGCTCTGAGGCACAACC R- ACAGGGCTCCAATGATGAG	151 bp	58°C	28
Catalase	F- GCCTGGGACCCAATTATCTT R- GAATCTCCGCACTTCTCCAG	203 bp	58°C	23
IL-6	F- GAGGCACTGGCAGAAAACAA R- TGGCATTTGTGGTTGGGTCA	274 bp	60°C	38
IL-8	F- CTGCGCCAACACAGAAATTA R- ATTGCATCTGGCAACCCTAC	238 bp	58°C	37
TNF- $\alpha$	F- TGCTTGTTCTCAGCCTCTT R- ATCCCAAAGTAGACCTGCCC	602 bp	58°C	38
MCP-1	F- CCCAGTCACCTGCTGTTAT R- GAGTTTGGGTTTGCTTGTC	201 bp	58°C	35
Occludin	F- GAAGCCAAACCTCTGTGAGC R- GAAGACATCGTCTGGGGTGT	229 bp	58°C	30
PGC1 $\alpha$ <sup>88</sup>	F- TCAGTCCTCACTGGTGGACA R- TGCTTCGTCGTCAAAAACAG	351 bp	58°C	32
Villin	F- CAAGACAGGCTCACTACCA R- TGTCATAGGACAGGCTGCTG	203 bp	58°C	27

## **FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.** **Validation of Paraoxonase 2 knockdown in Caco-2/15 cells.** Cells were infected with lentiviruses containing anti-PON2 shRNA for 3 days. They were then trypsinized and allowed to proliferate until confluence and to differentiate for 10-12 days. Cells were harvested and gene expression was analyzed by (A) RT-PCR and protein expression was determined by (B) Western blot. Cells that were not infected with lentiviruses served as controls (CTRL), in comparison to pLKO.1 empty vector (Mock) and pLKO.1-puromycin containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD) infected cells. Results represent the means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, each done in triplicate (n=9). \*\* $p < 0.01$  vs. CTRL.

**Figure 2.** **Paraoxonase 2 knockdown and cell integrity.** Cells were infected with lentiviruses containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD) or pLKO.1 empty vector (Mock) for 3 days. They were then trypsinized and allowed to proliferate until confluence and to differentiate for 10-12 days. Cells were harvested and (A) villin and (C) occludin gene expression were analyzed by RT-PCR as differentiation and tight junctions makers respectively. (B) Villin and (D) occludin protein expression were also determined by Western blot. pLKO.1 empty vector (Mock+F/A) and pLKO.1-puromycin containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD+F/A) infected cells were also treated with iron/ascorbate (F/A, 200  $\mu$ M/2 mM) for 4h. Expressions of these markers in the Mock and PON2 KD groups were compared to a control group (CTRL) in which cells were not infected. Results represent

the means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, each done in triplicate (n=9). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. CTRL

**Figure 3. Paraoxonases 1 and 3 expression in paraoxonase 2 knockdown Caco-2/15 cells.** Cells were infected with lentiviruses containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD) or pLKO.1 empty vector (Mock) for 3 days. They were then trypsinized and allowed to proliferate until confluence and to differentiate for 10-12 days. pLKO.1 empty vector (Mock+F/A) and pLKO.1-puromycin containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD+F/A) infected cells were also treated with iron/ascorbate (F/A, 200  $\mu$ M/2 mM) for 4h. Cells were then harvested and (A) PON1 gene and PON3 (B) gene and (C) protein expression were assessed by RT-PCR and Western blots respectively. Results represent the means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, each done in triplicate (n=9).

**Figure 4. Primary antioxidative response in paraoxonase 2 knockdown Caco-2/15 cells.** Cells were infected with lentiviruses containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD) or pLKO.1 empty vector (Mock) for 3 days. They were then trypsinized and allowed to proliferate until confluence and to differentiate for 10-12 days. pLKO.1 empty vector (Mock+F/A) and pLKO.1-puromycin containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD+F/A) infected cells were also treated with iron/ascorbate (F/A, 200  $\mu$ M/2 mM) for 4h. Cells were then harvested and (A) SOD-1, (B) SOD-2 and (C) SOD-3 gene expression were assessed by RT-PCR. (D) Total SOD activity was also determined as described in Methods. Results represent the means

± SEM of 3 independent experiments, each done in triplicate (n=9). \*\* $p < 0.01$  vs. Mock.

**Figure 5. Secondary antioxidative response in paraoxonase 2 knockdown Caco-2/15 cells.** Cells were infected with lentiviruses containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD) or pLKO.1 empty vector (Mock) for 3 days. They were then trypsinized and allowed to proliferate until confluence and to differentiate for 10-12 days. pLKO.1 empty vector (Mock+F/A) and pLKO.1-puromycin containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD+F/A) infected cells were also treated with iron/ascorbate (F/A, 200  $\mu$ M/2 mM) for 4h. Cells were then harvested and (A) G-Px-2 and (C) CAT gene expression were assessed by RT-PCR. (B) G-Px and (D) CAT activity were also determined as described in Methods. Results represent the means ± SEM of 3 independent experiments, each done in triplicate (n=9). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. Mock.

**Figure 6. Glutathione-reductase expression and activity in paraoxonase 2 knockdown Caco-2/15 cells.** Cells were infected with lentiviruses containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD) or pLKO.1 empty vector (Mock) for 3 days. They were then trypsinized and allowed to proliferate until confluence and to differentiate for 10-12 days. pLKO.1 empty vector (Mock+F/A) and pLKO.1-puromycin containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD+F/A) infected cells were also treated with iron/ascorbate (F/A, 200  $\mu$ M/2 mM) for 4h. Cells were then harvested and (A) G-Red gene expression was assessed by RT-PCR. (B) G-Red activity was also

determined as described in Methods. Results represent the means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, each done in triplicate (n=9). \*\* $p < 0.01$  vs. Mock.

**Figure 7. Measurement of oxidative stress markers in paraoxonase 2 knockdown Caco-2/15 cells.** Cells were infected with lentiviruses containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD) or pLKO.1 empty vector (Mock) for 3 days. They were then trypsinized and allowed to proliferate until confluence and to differentiate for 10-12 days. pLKO.1 empty vector (Mock+F/A) and pLKO.1-puromycin containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD+F/A) infected cells were also treated with iron/ascorbate (F/A, 200  $\mu$ M/2 mM) for 4h. Cells and culture media were then collected and various oxidative stress markers were measured. (A) Malondialdehyde (MDA), a marker of lipid peroxidation, (B) hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) concentration and (C) redox state of glutathione (GSH/GSSG) were determined as described in Methods. Results represent the means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, each done in triplicate (n=9). \* $p < 0.05$

**Figure 8. Inflammatory response in paraoxonase 2 knockdown Caco-2/15 cells.** Cells were infected with lentivirus containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD) or pLKO.1 empty vector (Mock) for 3 days. They were then trypsinized and allowed to proliferate until confluence and to differentiate for 10-12 days. pLKO.1 empty vector (Mock+F/A) and pLKO.1-puromycin containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD+F/A) infected cells were also treated with iron/ascorbate (F/A, 200  $\mu$ M/2 mM) for 4h. Cells

were then harvested and (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-6, (C) IL-8 and (D) MCP-1 gene expression were assessed by RT-PCR. Results represent the means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, each done in triplicate (n=9). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01.

**Figure 9.** **NF- $\kappa$ B activation in lipopolysaccharides-challenged paraoxonase 2 knockdown Caco-2/15 cells.** Cells were infected with lentivirus containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD) or pLKO.1 empty vector (Mock) for 3 days. They were then trypsinized and allowed to proliferate until confluence and to differentiate for 10-12 days. pLKO.1 empty vector (Mock+LPS) and pLKO.1-puromycin containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD+LPS) infected cells were also treated with lipopolysaccharides (100  $\mu$ g/mL) for 24h. Cells were then harvested and the (A) NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  ratio was determined as an indicator of NF- $\kappa$ B activation. (B) I $\kappa$ B $\alpha$ / $\beta$ -actin ratio is also shown. Results represent the means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, each done in triplicate (n=9). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01

**Figure 10.** **Transcription factors involved in the regulation of antioxidative and inflammatory response in paraoxonase 2 knockdown Caco-2/15 cells.** Cells were infected with lentivirus containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD) or pLKO.1 empty vector (Mock) for 3 days. They were then trypsinized and allowed to proliferate until confluence and to differentiate for 10-12 days. pLKO.1 empty vector (Mock+F/A) and pLKO.1-puromycin containing anti-PON2 shRNA (PON2 KD+F/A) infected cells

were also treated with iron/ascorbate (F/A, 200  $\mu$ M/2 mM) for 4h. Cells were then harvested and protein expression of (A) Nrf2 and (B) PGC1 $\alpha$  were determined by western blots. Results represent the means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments in triplicate (n=9). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01.

**Figure 11.** **Potential implications for paraoxonase 2 in pathophysiological conditions in the intestine, such as inflammatory bowel disease.** The results of the current study suggest an implication for PON2 in the antioxidative and inflammatory response in intestinal epithelial cells. The reduction of PON2 in intestinal epithelial cells could lead to an increase in lipid peroxidation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, as an imbalance has been observed in the primary and secondary antioxidative response. As a consequence, the inflammatory reaction could be exacerbated, as shown by increased TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1 expression, and drive even more immune cells like macrophages and neutrophils to the intestine. Cell permeability and tight junctions could be affected, as suggested by the reduced E-cadherin expression, which would lead to even more inflammation as bacteria from the intestinal flora could enter the intestinal wall. The consequences of PON2 invalidation on the antioxidative defence and anti-inflammatory response in intestinal cells suggest a potential role for PON2 in pathophysiological conditions such as IBD.

Figure 1

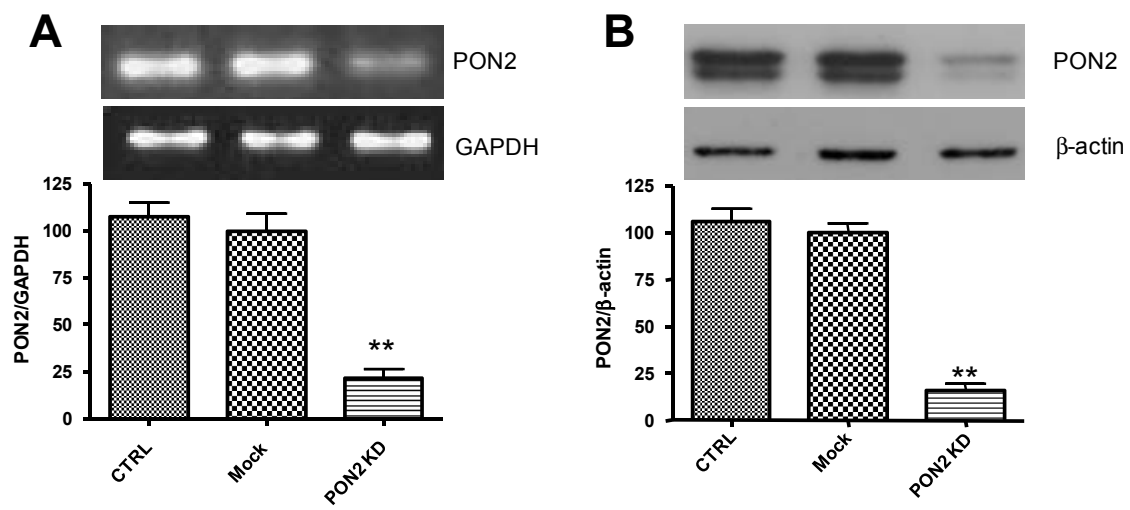




Figure 2

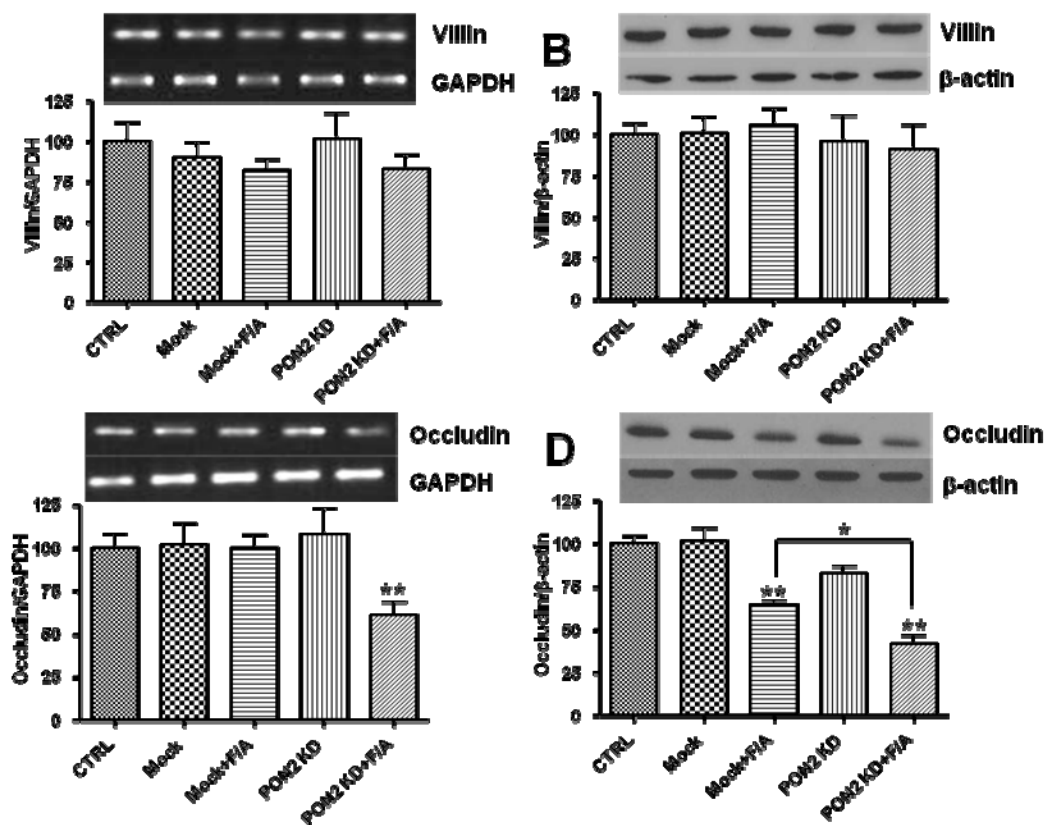


Figure 3

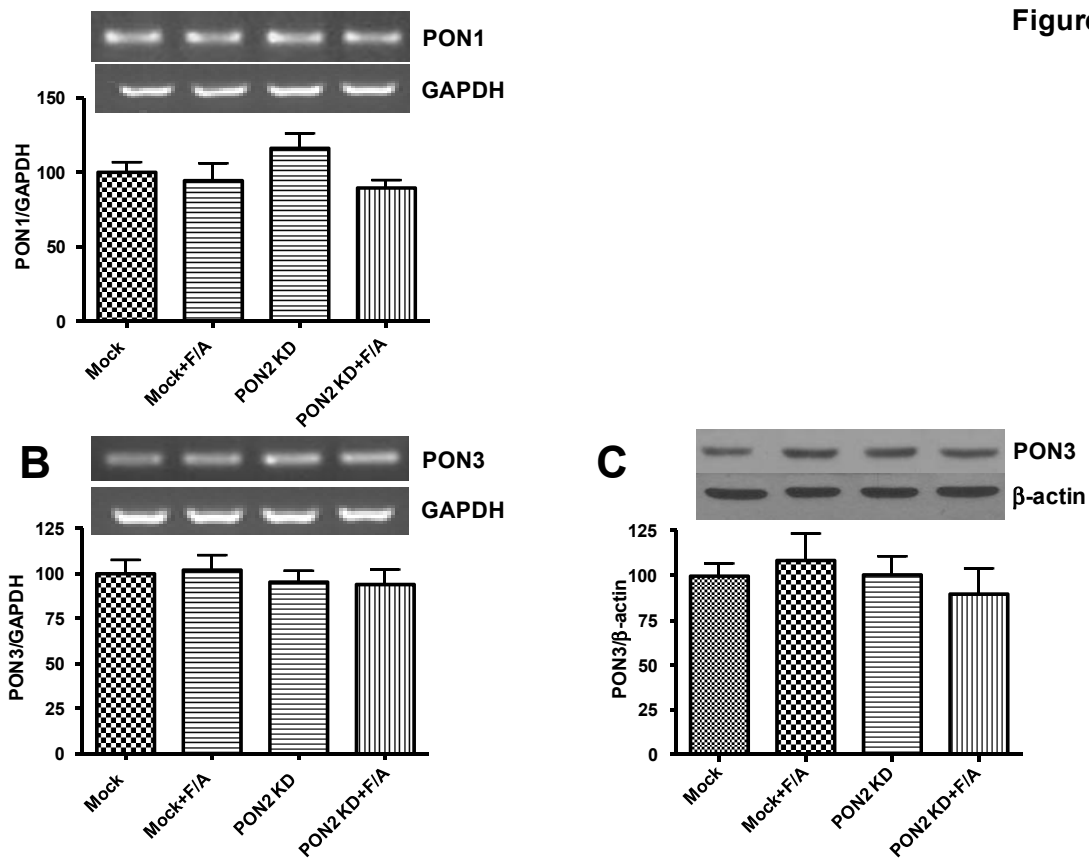


Figure 4

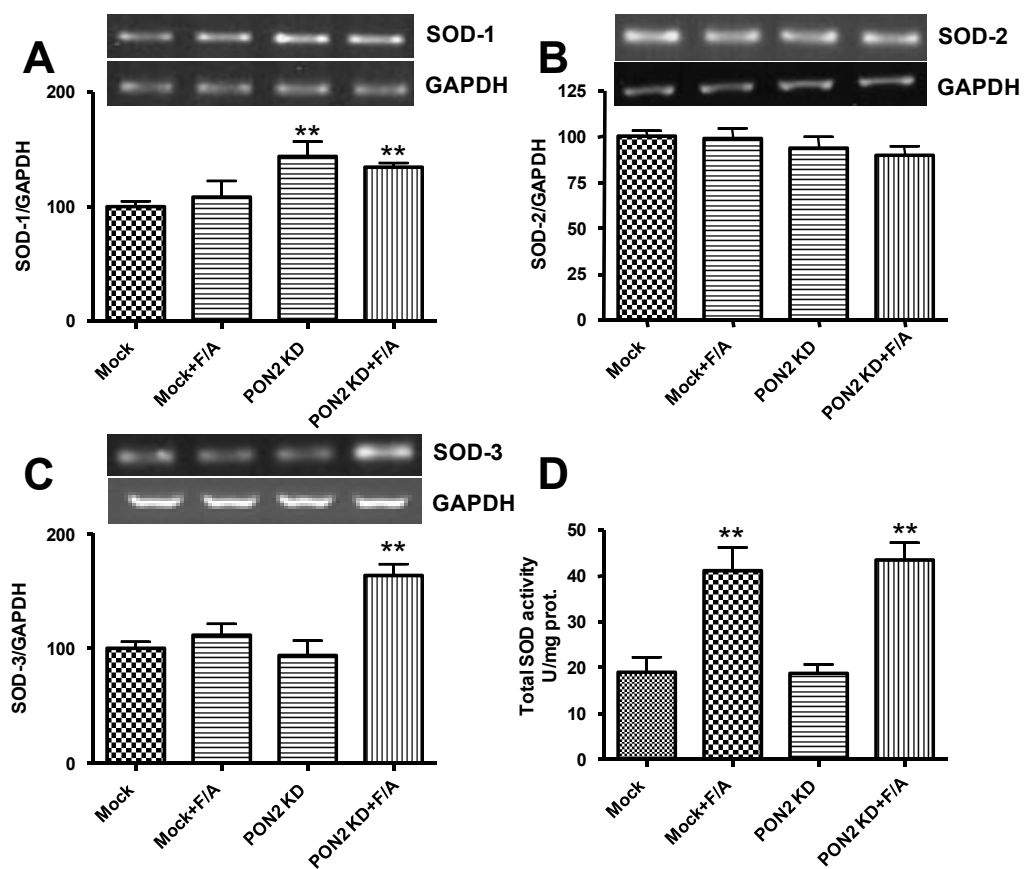
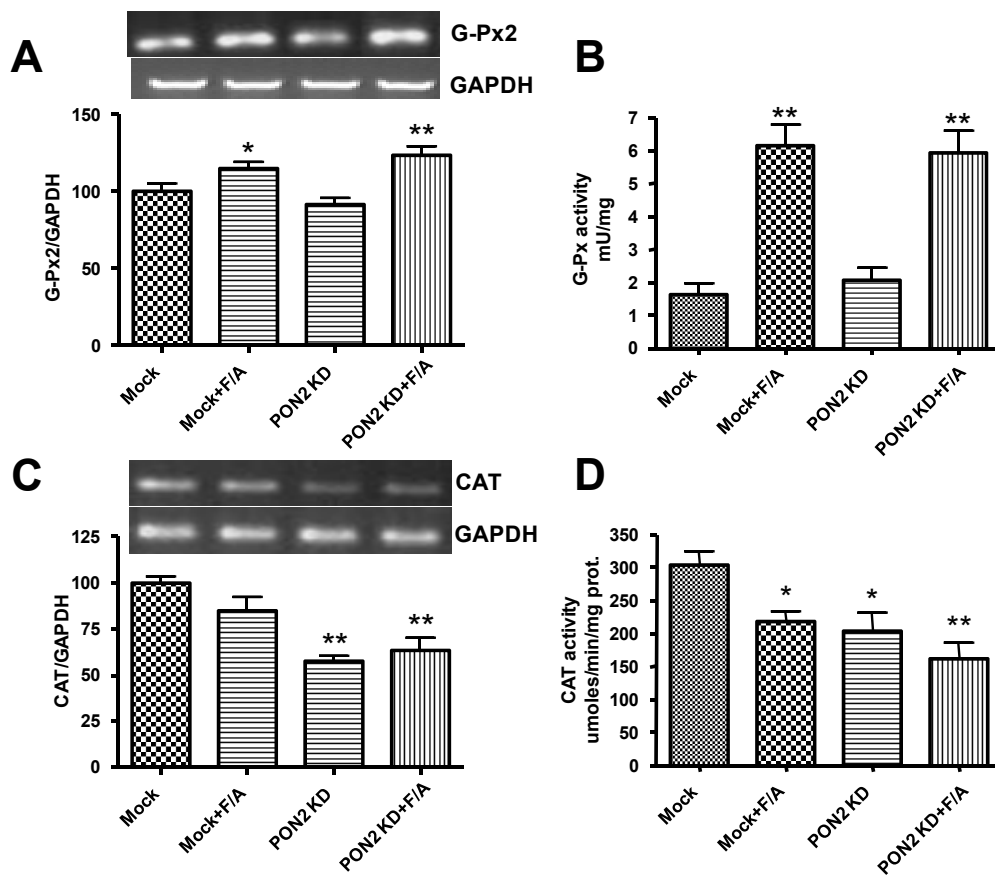


Figure 5



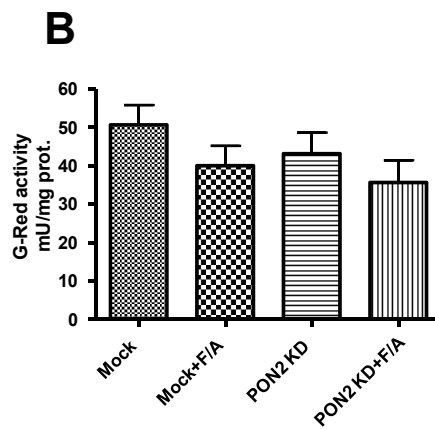
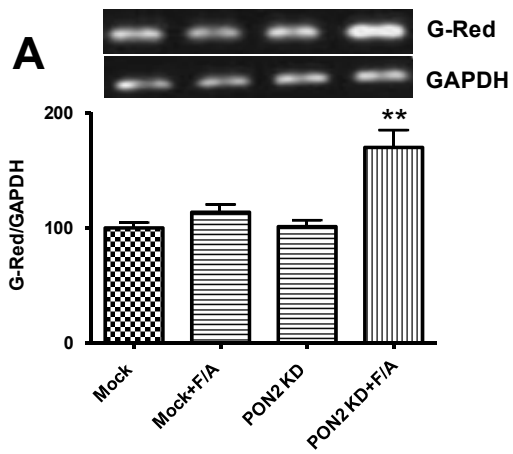


Figure 6

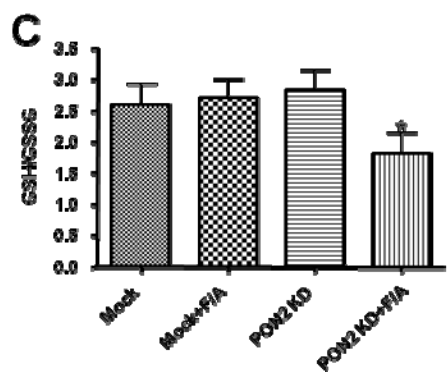
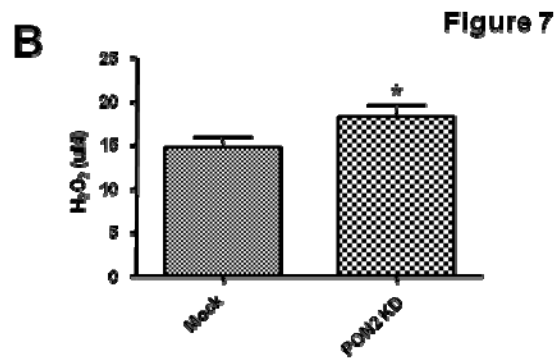
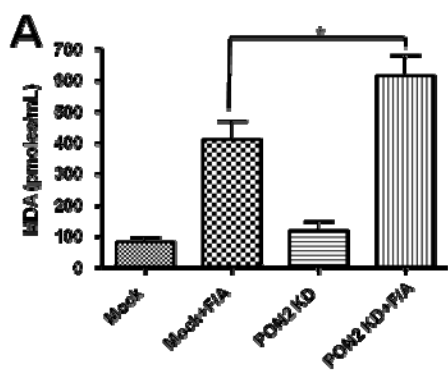


Figure 8

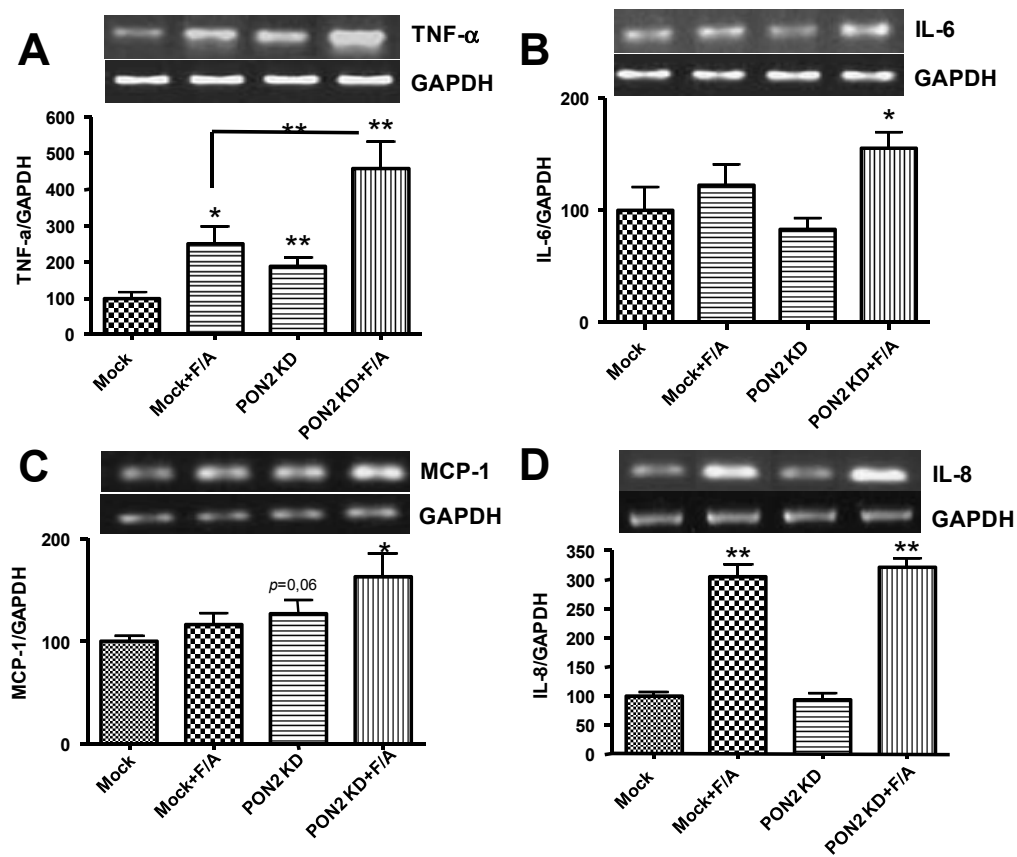


Figure 9

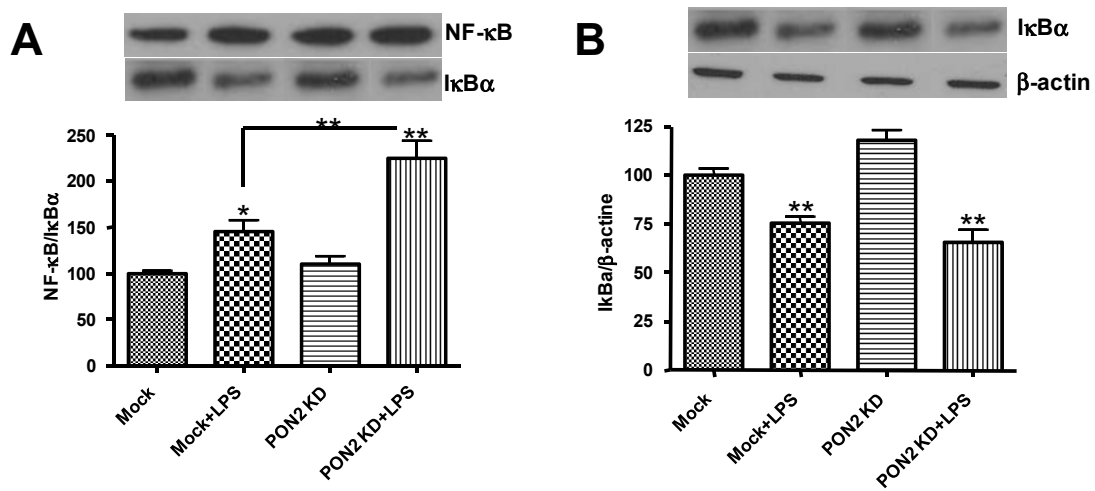




Figure 10

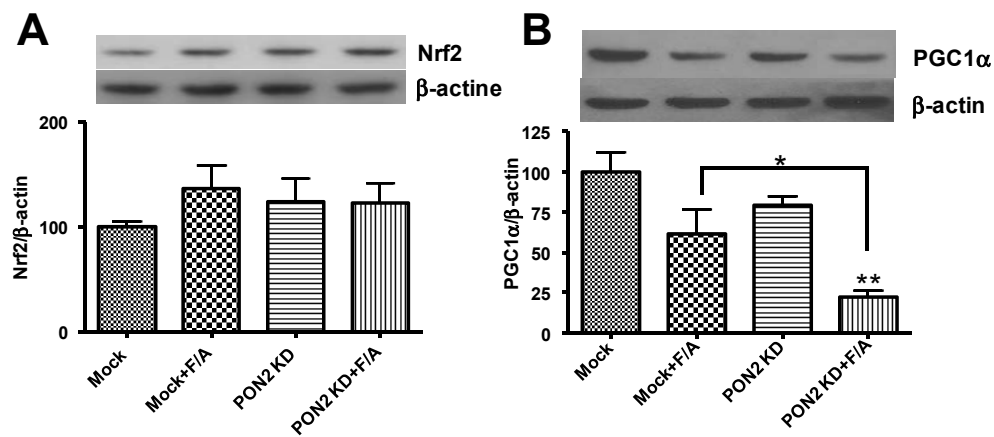
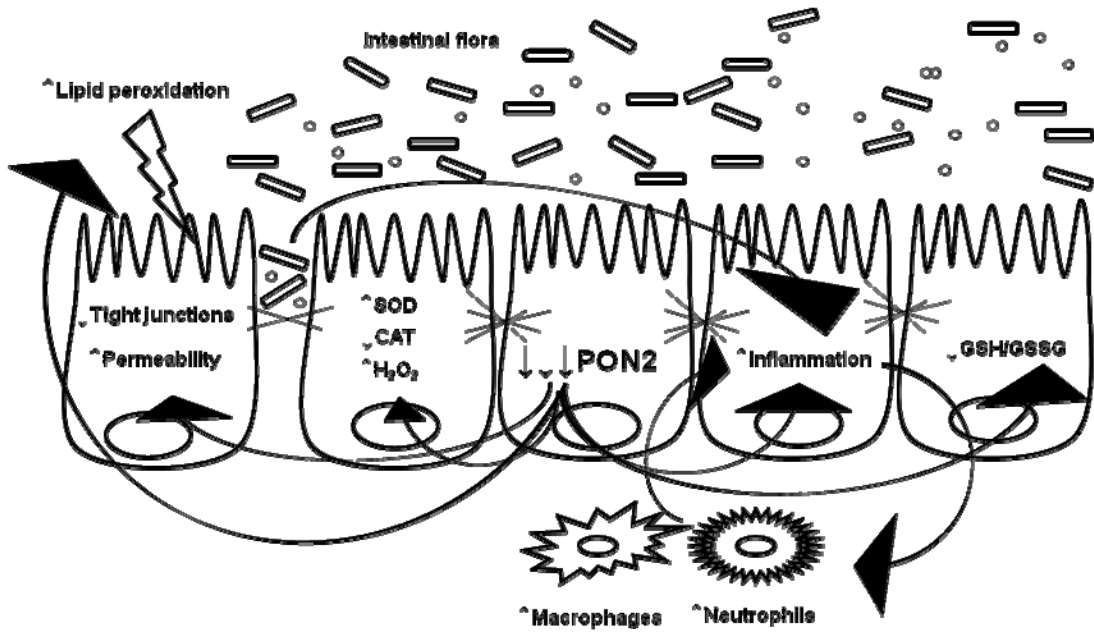


Figure 11



#### **4.4. Article 4**

**Précourt, L.P.,** Amre, D., Denis, M.C., Lavoie, J.C., Delvin, E., Seidman, E. et Levy, E.  
The three-gene paraoxonase family: Physiologic roles, actions and regulation.  
*Atherosclerosis*, Janvier 2011, 214(1):20-36.

##### **4.4.1. Apport original et contribution des co-auteurs**

Cet article de revue a permis de ratisser l'ensemble de la littérature touchant aux fonctions et à la régulation des PON. Le lecteur peut facilement comprendre l'importance des PON et la façon dont elles sont régulées. Ma contribution pour cet article consiste d'abord en l'organisation et la planification du travail, puis en la rédaction du manuscrit, sous la supervision principale du Dr Levy. Les autres co-auteurs, soient Dr Amre, Marie-Claude Denis, Dr Lavoie, Dr Delvin et Dr Seidman ont surtout apporté leurs commentaires et corrections.

## The three-gene paraoxonase family: Physiologic roles, actions and regulation

Louis-Philippe Précourt<sup>a</sup>, Devendra Amre<sup>b</sup>, Marie-Claude Denis<sup>a</sup>, Jean-Claude Lavoie<sup>b</sup>, Edgard Delvin<sup>c</sup>, Ernest Seidman<sup>§</sup>, Emile Levy<sup>a,\*</sup>

Research Centre, CHU-Sainte-Justine, Departments of <sup>a</sup>Nutrition, <sup>b</sup>Pediatrics and <sup>c</sup>Biochemistry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5.  
<sup>§</sup>Research Institute, McGill University, Campus MGH, C10.148.6, Montreal, Quebec, Canada

**Running Title:** PONs: Functions and Modulation

**Address for correspondence:**

\*Dr. Emile Levy  
GI-Nutrition Unit  
CHU Sainte-Justine  
3175 Côte Ste-Catherine  
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5  
Tel.: [REDACTED]  
Fax: [REDACTED]  
E-mail: [REDACTED]

**ABSTRACT**

The paraoxonase (PON) gene family is composed of three members (PON1, PON2, PON3) that share considerable structural homology and are located adjacently on chromosome 7 in humans. By far the most-studied member is PON1, a high-density lipoprotein-associated esterase/lactonase, also endowed with the capacity to hydrolyse organophosphates, but all the three proteins prevent oxidative stress and fight inflammation. They therefore seem central to a wide variety of human illnesses, including atherosclerosis, diabetes mellitus, mental disorders and inflammatory bowel diseases. The major goal of this review is to highlight the regulation of each of the paraoxonase components by diverse nutritional molecules and pharmacological agents as well as a number of pathophysiological events, such as oxidative stress and inflammation. Considerable and detailed cell-based studies and animal model experiments have been provided to allow a thorough scrutiny of PON modulation, which will increase our understanding and ability to target these genes in order to efficiently increase their transcriptional activity and decrease the risks of developing different disorders.

**Keywords**

PON, oxidative stress, regulation, inflammation, atherosclerosis, lipid hydroperoxides, HDL, LDL

## INTRODUCTION

The paraoxonase (*PON*) gene family contains three different members (PON1, PON2 and PON3), and exhibits antioxidative properties principally in the blood circulation. Recent interests have been directed towards a better comprehension of the functions of PON2 and PON3, but PON1 remains by far the most studied of the three enzymes.

PON1 is a calcium-dependent esterase that was first described for its capacity to hydrolyze organophosphates and pesticides, including paraoxon, which inspired the name of the three enzymes. PON1 is a 43-45 kDa glycoprotein, expressed in a variety of tissues [1], but it is mainly synthesized by the liver and circulates within high-density lipoprotein (HDL) particles [2]. It has been the focus of more intense research activities, because of its evident capacity to protect low-density lipoproteins (LDL) against oxidative stress, reduce macrophage foam cell formation and prevent atherosclerosis development [3]. *PON1* gene polymorphisms have been associated with various human diseases, including coronary heart disease [4], Parkinson's disease [5], type 2 diabetes [6] and inflammatory bowel disease [7].

Despite increasing interest in PON2, there is still little information about its functions and characteristics. Although this member of the PON family does not associate with HDL particles in the circulation, it has also been involved in the reduction of oxidative stress and protection against atherosclerosis [8]. PON2 is expressed in nearly all human tissues, including the lungs, liver, heart and intestine [9]. In vascular cells, PON2 was found to be a cell-based enzyme and appeared in two glycosylated isoforms of approximately 40-43 kDa [10]. *PON2* gene polymorphisms have been implicated in a variety of human disorders, such as cardiovascular diseases [11, 12], type 2 diabetes [13, 14] and inflammatory bowel disease [15].

PON3, the third member of the multigene family, is similar to PON1 in terms of expression, function and location. Both recombinant human PON1 and PON3 show the capacity to delay LDL-oxidation *in vitro*, with PON1 being more effective than PON3 in this respect [16]. Few data are available for the moment on *PON3* polymorphisms and the effects of these variants on human diseases are still unknown [17].

All three PONs seem to be important players in the maintenance of a low oxidative state in the blood circulation and, therefore, the prevention of atherosclerosis. Associations of their polymorphisms with various human diseases show a potential implication of these enzymes in other organs. Of note, PON1 gene polymorphisms have been shown to account for more than 60% of the interindividual variation in enzyme concentration and activity but the three PONs have shown to be modulated by various nutritional and pharmacological molecules and some pathophysiological events such as inflammation and oxidative stress. The purpose of this review is to summarize and update of the major functions attributed to PONs, as well as the nutritional, physiological and pharmacological influences of PON expression and activity in relation to disease. Identifying lifestyle modifications that favor PON expression and activity could have a major impact on atherosclerosis and many other oxidative stress-related diseases. In addition, the discovery of pharmacological products that modulate PONs could be of major clinical importance.

## **POTENTIAL FUNCTIONS AND REGULATION OF PARAOXONASE ENZYMES**

### **PHYSIOLOGICAL ROLES OF PON1**

PON1 was first studied for its capacity to detoxify organophosphate compounds [18], but the current paper will focus primarily on its antioxidative and anti-inflammatory properties as well as on the potential pathophysiological implications of its modulation.

HDLs are the most powerful independent negative predictors of cardiovascular events. The protective effects of HDLs have first been attributed to their capacity to promote cellular cholesterol efflux from peripheral cells and deliver it to the liver for excretion, a process known as reverse cholesterol transport. Thereafter, HDLs have considerably attracted particular attention because of their antioxidative potential. Indeed, HDL particles prevent LDL oxidation and are beneficial in atherosclerosis. In copper-induced LDL oxidation, HDL has the ability to reduce lipoperoxide formation. Interestingly, similar antioxidant effects have been demonstrated for PON1 (given its capacity to hydrolyze lipid peroxides and therefore prevent foam cell formation [19]). This major PON1 function prompted intensive research activities linking PON1, atherosclerosis and oxidative stress. Since then, numerous studies have been undertaken to purify the enzyme, define its functions and delineate its mechanisms of action. Furthermore, the use of genetically modified animals for PON1 has succeeded in broadening our knowledge of major PON1 functions. The enzyme has been closely linked to the control of oxidative stress and inflammation, mainly at the circulation level, where its association with HDL particles has been related to the prevention of atherosclerosis [20].

More work on the physiological substrate of PON1 was needed in order to precisely define the functions of the enzyme. Numerous possible substrates for PON1 had been studied. PON1 was found to have organophosphatase activity, which explains its ability to hydrolyze organophosphorous insecticides. PON1 also had arylesterase activity, phenyl acetate being one of its best substrates. Furthermore, PON1 showed good lactonase activity, hydrolyzing a wide range of lactones. Based on the substrate specificity found in various experiments, it was proposed that PON1 could primarily be a lactonase enzyme and specifically play a role in anti-inflammatory and antioxidative response, since there were



many oxidized metabolites of polyunsaturated fatty acids that are structurally similar to lactones [21]. Other research groups have also suggested that the native activity of PON1 is the production of lactonase and that it could be physiologically relevant for oxidized fatty acid products. The lactonase activity of PON1 is characterized as being very robust and is a common denominator for all three PONs [22].

Another important substrate for PON1 may be homocysteine thiolactone, formed by the editing reaction of certain aminoacyl-tRNA synthetases. Homocysteinylation of proteins can lead to protein inactivation and cell damage. Homocysteine thiolactone hydrolase activity was found on a protein associated with HDL and later identified as PON1 [23]. The PON1 thiolactonase activity is negatively correlated with N-homocysteinylation of proteins, suggesting another beneficial action of PON1 in the prevention of atherosclerosis [24].

PON1 could also be implicated in the inactivation of quorum-sensing signaling molecules. Purified PON1 showed the capacity to hydrolyze N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3OC12-HSL), an important quorum-sensing component of *Pseudomonas aeruginosa* [25].

PON1 peroxidase and esterase activity seem to be of major importance in detoxifying oxidative stress mediators and lactonase activity could hydrolyze various molecules. These activities, therefore, possibly explain the antioxidant and anti-inflammatory potential of the enzyme.

Various mechanisms of action were proposed for the beneficial effects of PON1 on oxidative stress and for the prevention of atherosclerosis. An effect of PON1 against oxidized lipoproteins was demonstrated. Inhibition of PON1 by EDTA reduced the capacity of HDL to protect LDL from oxidation and to prevent monocyte transmigration. In

addition, purified PON1 decreased the ability of mildly oxidized LDL and oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-phosphatidylcholine (Ox-PAPC) to induce monocyte chemotaxis. The mechanism of action for the protective effects of PON1 seems to be associated with the destruction of oxidized phospholipids [26]. Incubation of oxidized HDL with purified PON1 reduced lipoprotein peroxides by 19% and cholesteryl linoleate hydroperoxides (CL-OOH) by 90%. HPLC analysis showed that the action of PON1 was primarily directed toward reducing CL-OOH content, thus suggesting a peroxidase-like activity for PON1. PON1 was also shown to be able to hydrolyze hydrogen peroxide, a potentially important oxidative stress mediator in atherosclerosis [27].

The mechanism of action of human PON1 was further characterized. Peroxidase-like activity was confirmed, shown by the reduction of CL-OOH and linoleic acid hydroperoxide (L-OOH) content after incubation with purified PON1 and an increase in CL-OH and linoleic acid hydroxide (L-OH). The CL-OOH and CL-OH could also be hydrolyzed by purified PON1, associated with an increase in the corresponding free fatty acids L-OOH and L-OH. PON1 is, therefore, thought to be able to cleave the ester bond between the cholesterol and the linoleic acid hydroperoxide or hydroxide, representing the esterase activity of PON1. PON1 could possibly have the ability to remove active lipids from atherosclerotic lesions [28].

Unfortunately, interesting effects attributed to PON1, such as a phospholipase A2-like activity [29, 30], may be the result of contaminating enzymes [31-33]. When PON1 was purified using a modified and more specific method, it showed no phospholipase activity towards peroxyxynitrate [34]. Other experiments also showed that purified PON1 failed to protect LDL from oxidation. Along with the best purification methods available,

appropriate assays in the natural environment of the enzyme must be used to determine the physiological functions of PON1, namely as an antioxidant [35].

Minor contaminations often seem to be a part of purified PON1. These contaminations have led to false identifications of the physiological functions of PON1. Purification of PON1 must be optimized in order to better understand the biological pathways in which PON1 is implicated [34, 35]. Fortunately, studies with PON1 knockout (KO) and PON1-Tg mice, along with overexpression and knockdown *in vitro* have demonstrated beyond doubt the beneficial roles of PON1 as an important antioxidant.

Growing interest in the potentially major functions of PON1 led to the genetic engineering of PON1 KO. In the first study using PON1<sup>-/-</sup> mice, isolated HDL could not prevent LDL oxidation and monocyte chemotaxis, whereas HDL from wild-type mice blocked lipid hydroperoxide formation in LDL and reduced monocyte chemotaxis in a co-culture model. Accordingly, PON1<sup>-/-</sup> animals submitted to a high-fat, high-cholesterol diet exhibited increased susceptibility to the development of large atherosclerotic lesions. This elegant study clearly established the antioxidative and anti-inflammatory potential of PON1 *in vivo* and also showed its potential role in the prevention of atherosclerosis [36]. Combined PON1 KO/apolipoprotein E (apo E) KO mice were generated and fed either regular chow or a high-fat diet. Mice with combined PON1/apo E KO exhibited more atherosclerosis than apo E KO mice and their LDL were more susceptible to oxidation [37]. Again, these results showed the importance of PON1 in the prevention of atherosclerosis in mice from another genetic background.

Recently, the role of PON1 in preventing atherosclerosis was further studied in PON1 KO mice, but the animals were not submitted to an atherogenic diet. This made it possible to evaluate the influence of PON1 on the early steps of atherosclerosis. PON1 KO animals

aged between 6 and 9 months showed a significant increase in leukocyte adhesion and aortic adhesion molecules P-selectin and ICAM1 mRNA. Aortic superoxide production was also significantly higher in PON1 KO animals compared with WT controls. These results demonstrated that the absence of PON1 leads to an increase in oxidative stress and endothelial adhesion molecules, thereby emphasizing the major functions of PON1 in protecting the circulatory system and, in particular, preventing the onset of atherosclerosis [20]. More recently, it has been reported that, mouse peritoneal macrophages isolated from PON1 KO animals exhibit a reduced SR-BI expression and decreased cellular HDL binding, which emphasizes the protective role of PON1 against atherosclerosis [38].

Various research groups have studied the effects of overexpressing PON1 in mice. A mouse model showing a 5-fold increase in PON1 expression specifically in the liver was generated. PON1 was then found to be redistributed to HDL vehicles in the circulation. Increased PON1 content in HDL did not alter HDL composition or properties, except that they were more protected from lipid peroxidation. Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT), an important HDL-associated enzyme modulating reverse cholesterol transport, which is normally altered by oxidative stress, was protected by PON1 overexpression when HDL was submitted to copper ion oxidation [39].

In another model, human PON1 was expressed in mice primarily in the liver and then found in the plasma associated with HDL. Arylesterase activity was up 2- to 4-fold in PON1 Tg mice. On a high-fat diet, PON1 Tg mice exhibited decreased atherosclerotic lesion size. PON1 Tg/apo E mice also showed an important reduction in monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) expression, thus displaying reduced monocyte chemotaxis. Moreover, HDL isolated from PON1 Tg mice, from either a B6 or apo E KO background, significantly prevented LDL oxidation compared with controls [40]. Additional experimental approaches

have shed light on the potential functions of PON1. The injection of mice on an Apo E<sup>-/-</sup> background with adenovirus for expression of human PON1 resulted in reduced arterial lesion size likely via antioxidative and anti-inflammatory effects given the decrease in malondialdehyde (MDA) and TNF- $\alpha$  levels [41]. These effects have been confirmed in models of CCl(4)-induced liver injury [42] and adenovirus mediated hPON1 gene delivery [43].

Human PON1 overexpressing mice were also generated with combined leptin and LDL receptor deficiency, which is a model of metabolic syndrome. This mouse model is characterized by serious health problems that eventually lead to atherosclerosis, such as obesity and dyslipidemia. PON1 overexpression in mice with this particular genetic background led to a reduction in oxidized LDL, plaque volume and macrophages in the plaques [44].

Macrophages are major players of the atherosclerotic process, but do not normally express PON1. Macrophages from PON1<sup>-/-</sup> mice were isolated and transfected with human PON1, which caused a reduction in peroxide levels and superanion release, along with an increase in the reduced form of glutathione. Interestingly, PON1 was also found in the macrophages of PON1 Tg mice and the same observations were made [45].

PON1 functions in relation to macrophages were studied further. HDL was isolated from wild-type C57BL/6 mice, human PON1 Tg and PON1 KO mice. The effects of the HDL from these various sources on macrophage binding and cholesterol efflux were analyzed. HDL from PON1 Tg increased cholesterol efflux from J774 A.1 and MPM, via the ABCA1 transporter and their binding ability to the same macrophage cell types was also increased. Furthermore, the presence of high PON1 levels in HDL induced the formation of lysophosphatidylcholine in the macrophages, which is thought to increase HDL binding to

macrophages and thus contribute to a more important cholesterol efflux [46]. These results suggest that PON1 status on HDL particles will influence binding to macrophages and cholesterol efflux, further demonstrating PON1's beneficial effects in the early stages of atherosclerosis.

### **Modulation of PON1 status by genetic polymorphisms**

Allele frequencies for PON1 differ greatly among ethnic groups [47, 48]. For example, there is an increased frequency for the R192 allele in the Hispanic population compared to the frequency in people of Northern European origin [49]. Polymorphisms can influence enzyme concentration by affecting gene and protein expression as well as its specific activity. Genetic factors, including polymorphisms, were found to explain more than 60% of phenotypic variance in PON1 activity, while demographic environmental factors such as age and sex accounted for only 1-6% of changes and metabolic covariates for 4-19% [50]. Intriguingly, the general impact of diet on PON enzymes was not thoroughly evaluated, which represents a major issue of the present review that insists on the regulatory role of nutrition.

Examining only PON1 polymorphisms is, however, not necessarily representative of PON1 activity levels [51] because environmental factors also modulate PON1 status [47]. Importantly, when analysing PON1 activity, it is mandatory to consider the type of substrate used in the biochemical reaction since the same polymorphisms can generate opposite effects on PON1 activity depending on the substrate such as paraoxonase, sarin and dihydrocoumarin [50, 52].

There are two major and common polymorphisms found in the PON1 coding region, leading to a glutamine→arginine substitution at position 192 (Q192R) and to a leucine→methionine substitution at position 55 (L55M) [53, 54]. The Q192R

polymorphism does not affect PON1 protein concentrations [55]. However, PON1 activities are greatly influenced by this polymorphism. The original study reported highest PON activity with an arginine (R) at position 192 [54], which has been confirmed by others [50, 52]. However, in other reports, the highest arylesterase activity was found in individuals with the QQ genotype [47].

For the L55M PON1 polymorphism, L allele carriers were found to have higher mRNA levels [56]. Accordingly, L allele carriers have significantly higher enzyme concentrations [49]. However, the modulated PON1 status related to the L55M polymorphism seems largely due to linkage disequilibrium with the C(-108)T promoter polymorphism [47].

In a recent study, analysis of the activity of PON1 revealed varying results depending on the different substrates used. Polymorphisms Q192R and L55M had significant effects on PON1 paraoxonase, arylesterase (phenylacetate) and lactonase (dihydrocoumarin) activity. The highest PON and arylesterase activity was found in RR and LL individuals, but highest lactonase activity was detected in QQ individuals [50].

PON1 is carried by HDL particles in the blood circulation and its polymorphisms seem to have an impact on their association, as well as on HDL antioxidative functions. HDL from QQ(192) and LL(55) homozygote individuals appears as the most efficient for protecting LDL from oxidation [57]. However, having a Q at position 192 can reduce the affinity of PON1 towards HDL [58].

Five polymorphisms (Table 1) have been reported in the PON1 promoter region, located within the first 1000 bases upstream of the coding region. Apparently, the 200 bases upstream of the coding sequence are of major importance for PON1 expression [59]. Some polymorphisms, present in the PON1 promoter, are implicated in the variations of serum PON levels and can strongly influence gene expression [55].

The most dominant polymorphism found in PON1 promoter region is the T(-108)C, and, at this position, there is a potential binding site for the transcription factor Sp1 found [59, 60]. The CC genotype increases serum PON1 concentration and activity [60] and experiments using reporter gene constructs show a higher luciferase activity, which suggests an upregulation of PON1 gene expression in relation with the CC genotype [55, 59, 61]. Other promoter polymorphisms may impact on PON1 status at positions -909 [47, 55, 59, 60], -824 [55, 59, 60] and -162 [47, 59] where lies a potential NF-I transcription factor binding site [59].

PON1 promoter polymorphisms can have an impact on health and disease. For example, the low-expressor genotype of the PON1 promoter, the most important being the C(-108)T polymorphism, is associated with higher glucose concentrations in patients with abnormal glucose levels [62], whereas high expressor (CC genotype) is associated with a decreased risk of coronary artery disease [63]. As to the C(-909)G promoter polymorphism, the high expressor (GG genotype) results in a decreased odds ratio of myocardial infarction, particularly under 60 years of age [64].

Table 1 summarizes the most important polymorphisms that have been found in the *PON1* promoter and coding sequences. Noteworthy, nomenclature differences are thought to be due to little variations in the sequences analysed by various research groups [47].

### **Life-style habits and nutritional regulation of PON1**

Many studies have been carried out in order to identify nutritional and life-style habits as modulators of the enzyme. Factors known to be protective against atherosclerosis, as well as deleterious factors, have been evaluated for their effects on PON1.

The impact of daily dietary intake and life-style habits, including physical exercise and smoking, on PON1 activity was studied. Smoking, which generally enhances oxidative



stress at the expense of antioxidative defenses, was significantly correlated with lower PON1 activity [65-67]. Interestingly, the risk of myocardial infarction is increased in smokers that are carriers of the PON1 192QQ genotype [68]. Unexpectedly, PON1 activity was negatively correlated with the consumption of vegetables [69], water-soluble fibers and  $\beta$ -carotene, whereas these nutritional habits are well recognized for their health-promoting effects [70]. Genetic variance of PON1 seems to have an impact on the response to a high vegetable diet, as the reduction in PON1 activity was more important in women carrying the 192R and 55L genotype [69]. However, quercetin, a flavonol frequently found in fruits and vegetables, could increase PON1 gene and protein expression in mice liver, but no effect was found on PON1 activity in humans [71].

Alcohol consumption can influence HDL and LDL cholesterol levels as well as oxidative stress balance, and its effects on PON1 were assessed. Rats were submitted to either light or heavy alcohol drinking for 8 weeks. Heavy alcohol drinking was found to reduce serum PON1 activity by 20%, whereas light drinking increased it by 20%. Interestingly, PON1 liver mRNA expression was upregulated by 59% with light drinking, but downregulated 51% with heavy drinking [72]. In men, light drinkers had a PON1 activity 395% higher than controls, but it was decreased by 45% in heavy drinkers [72]. In another study, alcohol abusers displayed elevated levels of lipid hydroperoxides and of various liver enzymes such as alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and gamma glutamyl transferase, indicating liver damage. Concomitantly, serum PON1 activity was markedly decreased in alcohol abusers, maybe in part due to a reduced capacity of hepatocytes to produce PON1 [73].

Antioxidant molecules have also been evaluated for their ability to prevent the loss of PON1 activity under high oxidative stress. Consumption of red wine contains antioxidant

phenolic compounds and has been associated with increased plasma levels of HDL and inhibition of LDL oxidation [74]. Atherosclerosis-prone apo E<sup>-/-</sup> mice were treated with red wine and its antioxidant flavonoids catechin and quercetin and it resulted in a marked increase in PON1 activity and reduced atherosclerotic lesions [75]. Similarly, the impact of polyphenols has also been tested on PON1 activity and gene expression. Among the dietary polyphenols tested, naringenin, flavone and quercetin not only protected against the loss of PON1 activity, because of their antioxidative properties, but were also able to increase PON1 gene expression. Further investigation showed that polyphenols increased PON1 gene promoter activity in an aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent manner [76]. The intracellular signaling pathway PPAR $\gamma$ -PKA-cAMP has also been implicated in the upregulation of PON1 by pomegranate juice polyphenols [77]. Moreover, pomegranate juice polyphenols have shown the capacity to increase the binding of PON1 to HDL, an effect that goes beyond the antioxidant potential of pomegranate juice [78]. Therefore, in addition to the antioxidative properties of polyphenols, these results provide a molecular mechanism for the beneficial effects of moderate red wine and pomegranate juice consumption on atherosclerosis.

The effects of wine antioxidant resveratrol were analyzed, since its action may differ from that of other polyphenols, because it was reported to antagonize the activity of AhR [79]. Surprisingly, resveratrol also enhanced PON1 gene expression and activity in human hepatoma cell line H7. An unusual AhR responsive element in the PON1 promoter could potentially be responsible for the modulation observed [80].

PON1 has shown to be inactivated by oxidative stress and many antioxidative nutrients have been studied for their effects on PON1 status. Antioxidant vitamins C and E have both been demonstrated to be associated with increased PON1 activity. For example, induction

of hypothyroidism in rats resulted in increased oxidative stress and reduced PON1 activity. However, vitamin E supplementation completely re-established the level of PON1 activity [81]. Similarly, rabbits fed a high cholesterol diet and supplemented with vitamin E displayed plasma and liver elevation of PON1 activity, likely a result of HDL augmentation conferred by vitamin E [82]. In a human study, increased intakes of vitamins C and E were associated with increased PON1 activity [83]. These observations could be explained by a better antioxidative defense, resulting in the protection of PON1.

In order to evaluate the modulation of PON1 by vitamin C, HDL particles were isolated from healthy volunteers and submitted to 2,2'-Azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride- and 2,2'-azobis (2,4-dimethyl -4-methoxy valeronitrile)-induced oxidative stress. While lipid oxidation resulted in PON1 reduction, vitamin C was capable of normalizing oxidative stress and PON1 activity [84]. These kinds of in vitro experiments show that antioxidative molecules can prevent the loss of PON1 activity, but do not allow the evaluation of the effects of vitamin C on PON1 expression. PON1 protein and gene expression would need to be evaluated in order to better identify the impact of vitamins C and E on PON1.

Vitamin A also has antioxidant potential [85] and could, therefore, have a beneficial impact on PON1 status. When rats were submitted to a prooxidative vitamin A-deficient diet, a reduction in HDL-cholesterol and PON1 activity was monitored. Supplementation of vitamin A restored HDL-cholesterol and PON1 activity back to normal values [86].

Various nutrients have also been individually evaluated for their capacity to positively modulate PON1 activity and prevent atherosclerosis. Since nuts are recognized for their beneficial impact on lipid profile and oxidation, the effects of pistachio intake on lipoproteins and lipid oxidation were evaluated in rats. Rats consuming pistachio nuts as

20% of their daily caloric intake for 10 weeks showed an increase in HDL levels and PON1 activities, which may improve antioxidative defense [87]. In another study, the supplementation of rats with avocado (5 g for 17.5 g of regular chow diet) for 5 weeks lowered plasma triglycerides and raised HDL-cholesterol and PON1 activity [88]. Acai, fruits known for their high antioxidant content, have also raised PON1 activity in rats [89]. Similarly, consumption by healthy subjects of Hallawi date containing high levels of phenolics compounds increased PON1 activity [90].

*Eucommia ulmoides* oliver leaf extract (Du-zhong) effects on PON1 were evaluated in type 2 diabetic mice. Du-zhong exhibited antioxidative properties, as lipid peroxides were reduced in the animals, the activities of PON1, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase were increased in the erythrocyte and catalase activity was also augmented in the liver and kidneys [91].

The relationship between PON1 and HDL was intensively explored. Conditions such as proatherogenic diets and cigarette smoking, which can be deleterious to HDL levels [92], generally tend to reduce PON1 activity [65, 67, 93]. In contrast, conditions that favor high HDL levels, such as treatments with certain types of fibrates, generally tend to increase PON1 activity [94, 95]. Both healthy controls and coronary artery disease patients have been characterized by positive associations between HDL and apo A-I levels, on the one hand, and PON1 activity and protein mass, on the other hand [96]. This relationship was also demonstrated in animal models. Overexpression of apo A-I in C57BL/6 mice induced a major increase in HDL levels and PON1 activity [97]. Conversely, when apo A-I was knocked out in C57BL/6 mice, PON1 activity decreased by 75% and PON1 protein mass was reduced by 39%, compared with control mice [98]. These studies suggest that PON1 regulation is definitely and logically linked to the modulation of HDL and apo A-I.

The lipidic composition of the diet greatly modulates lipoprotein constituents and should reasonably influence PON1 status. In fact, when LDL receptor KO mice were submitted to short-term feeding with an atherogenic diet, no changes were observed in PON1 gene expression in the liver, but PON1 protein mass and activity were reduced. Concomitantly, a decline was noted in HDL and apo A-I, whereas plasma lipid hydroperoxides were significantly augmented [93]. While the atherogenic diet itself might not affect PON1 directly, it may do so indirectly through oxidative stress, which lowers PON1 carriers.

Normal mice and LDL receptor KO mice received an atherogenic diet, which resulted in a significant loss of gene expression and PON1 activity [99]. Moreover, rats were submitted to a high-fat diet that negatively affected PON1 activity in males (via a decline in PON1 mRNA) and females (via HDL lowering) [100].

The effects of various dietary fats on PON1 status have been evaluated in rats. Interestingly, triolein supplementation showed an important increase in serum PON1 activity; whereas fish oil reduced it and tripalmitin remained without effect [101]. The results with fish oil are quite surprising, since it contains  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids largely beneficial for human health in view of their anti-inflammatory and antioxidant properties. However, they are highly susceptible to peroxidation, which may negatively influence PON1 [101]. Accordingly, meals rich in used cooking fat (containing hydroperoxides), often employed for deep-frying in fast food restaurants, induced a decrease in PON1 activity in men as soon as four hours postprandially and the effect lasted up to 8 hours after the meal was taken [102]. Replacing saturated fat with trans fat in the diet of healthy men and women resulted in decreased serum HDL-cholesterol and PON1 activity [103]. These results suggest that the quality of fats consumed modulate PON1

activity and gene expression and can be either deleterious or beneficial for cardiovascular health.

Virgin argan oil has high mono- and polyunsaturated fatty acid content and is known for slowing down oxidative stress and modulating lipoprotein metabolism [104]. When virgin argan oil and extra virgin olive oil were administered to healthy men for 3 weeks, PON1 activities (PON and arylesterase) increased in both groups compared with baseline and LDL was less susceptible to lipid peroxidation [105].

Taken together, the results indicate the role of various nutrients in the regulation of PON1 expression and/or activity, possibly explained by a better defense against oxidative stress. Moreover, lifestyle habits generally recognized as health-promoting, such as being a non-smoker and eating a low-fat diet with antioxidative molecules seem to be beneficial for PON1 status. In line with this reasoning, physical activity seems to increase PON1 activity [106, 107], which is decreased in obese children and adults [108, 109]. But PON1 polymorphisms could impact on the response to exercise, since an increase in PON1 activity was found in 192QQ subjects, and a decrease in R carriers [110]. It is, however, important to note that many studies did not assess the direct effects of the various nutrients or lifestyle habits on PON1 gene and protein expression. Additionally, little attention has been devoted to the mechanisms of action, including the transcription factors involved in PON1 lifestyle and nutritional modulation.

### **Regulation of PON1 by inflammation**

Studies using PON1 KO and Tg mice as well as various biological systems have been able to reveal a number of major functions in the prevention of atherosclerosis, protection against oxidative stress and a potential capacity to control inflammation. Various research groups have demonstrated that inflammation modulates PON1 (Table 2).

The antioxidative capacity of HDL particles was evaluated during the acute phase response (APR) [111], which is characterized by increased levels of various pro-inflammatory markers, including C-reactive protein (CRP), serum amyloid A (SAA) protein and MCP-1. When APR was studied in rabbits, induced by croton oil injection, or in lipoproteins isolated from patients before and after cardiac surgery, which causes a major stress response, PON1 activity in plasma HDL was significantly affected and the increase in SAA content in the HDL correlated with a major loss of PON1 activity [111]. Similarly, mice inoculated with the influenza virus showed an increase in APR markers IL-6 and SAA within 2 days, which correlated with decreased PON1 protein expression and activity [112]. The influence of various pro-inflammatory cytokines was also significant. A mixture of IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  concomitantly increased SAA mRNA and protein and reduced PON1 mRNA in murine hepatoma cell line Hepa 1-6. Interestingly, an inhibitor of NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus or the transient overexpression of I $\kappa$ B partially restored PON1 mRNA levels. The results were confirmed in vivo in C57BL/6 mice injected intraperitoneally with lipopolysaccharides (LPS), a pro-inflammatory mediator. Northern blot analysis showed an important drop in hepatic PON1 mRNA 24 hours after LPS injection and a rise in SAA. Mechanistically, PON1 down-regulation was due to transcription factor NF- $\kappa$ B, since neutralizing the latter restored PON1 mRNA expression levels [113]. In other reports, human hepatocellular liver carcinoma (HepG2) cells treated with IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  both exhibited decreased PON1 mRNA [114] and Syrian hamsters injected intraperitoneally with LPS, TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$  displayed lowered liver PON1 gene expression and activity [115].

The role of IL-6, an important cytokine of APR, was further characterized for its impact on PON1 expression using HepG2 cells. Low PON1 gene expression was observed in the

presence of oxidized phospholipids, an effect that was abolished when the cells were treated with IL-6 antibody. Treatment of HepG2 cells with IL-6 alone showed a decrease in PON1 mRNA equivalent to the one noted with oxidized phospholipids. These results were confirmed in vivo as IL-6<sup>-/-</sup> mice injected intravenously with oxidized phospholipids did not show a decrease in PON1 activity in the plasma [116]. The implications of other cytokines should be investigated, including TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , since they were competent in modulating PON1 expression [114, 115]. This issue is particularly important in view of contradictory results surrounding the impact of IL-6 on PON1 gene expression reported in HepG2 cells [117]. However, many reports have demonstrated that pro-inflammatory mediators decrease PON1 activity and gene expression, possibly through an NF- $\kappa$ B-dependent mechanism.

#### **Regulation of PON1 by oxidative stress**

Human serum PON1 has shown to be an important antioxidant enzyme, having the capacity to prevent LDL and HDL oxidation. Various research groups have demonstrated that PON1 is modulated and inactivated by oxidative stress following its buffer action (Table 2). The addition of purified PON1 to LDL reduced the magnitude of its oxidation with copper ions or AAPH at the expense of PON1 arylesterase activity [118]. It was found that components of ox-LDL (e.g., oxidized-cholesteryl arachidonate and ox-PAPC) displayed the potency to strongly inactivate PON1 activity [118]. On the other hand, the presence of antioxidants, such as flavonoids quercetin and glabridin during LDL oxidation, attenuated the loss of PON1 arylesterase activity [118].

In the various systems tested for the oxidation of HDL particles, PON1 paraoxonase activity rapidly decreased, as lipid hydroperoxides increased [28, 119]. The highest level of peroxidation and loss of PON1 activity was obtained with copper-induced HDL oxidation.



The reduction of PON1 activity correlated well with the reduced ability of HDL to prevent LDL oxidation [119]. In fact, a complete inhibition of PON1 activity was noted within 10 minutes either in its isolated or HDL-associated forms and among various antioxidants, catalase showed the best protection [120]. PON1 arylesterase activity also declined rapidly in HDL following treatment with 3-Morpholinopyridone (SIN-1), which generates peroxynitrite [29]. Interestingly, PON1 arylesterase activity was altered by oxidation, but PON peroxidase activity remained unaffected. Therefore, PON1 susceptibility to oxidation may be specific to each enzyme activity [121].

Various oxidative stress mediators reduced PON1 activity, but also directly affected the protein mass. For example, Fe/Asc-induced lipid peroxidation not only decreased PON1 arylesterase activity and PON activity in human and rat HDL<sub>3</sub> and liver microsomes, but it also reduced PON1 protein mass [122].

### **Impact of inflammatory and oxidative stress-related diseases on PON1**

Most of the aforementioned studies clearly documented the association among PON1, inflammation and oxidative stress, which can occur during the development of atherosclerosis. However, PON1 can be affected by other inflammatory disorders. In ulcerative colitis patients, characterized by inflammation and oxidative stress, serum PON1 activity was found to be decreased [123]. Confirmation was obtained in a second study, in which serum PON1 activity was found reduced in active ulcerative colitis and Crohn's disease [124]. Furthermore, intestinal biopsies from Crohn's and celiac disease exhibited a reduced level in PON1 mRNA expression [125]. In gastroesophageal cancers, a drop was detectable in PON1 paraoxonase and arylesterase activities, and the decrease correlated well with the extent of circulating inflammatory markers, including CRP and IL-6 [126]. Even in an animal model of intestinal nematode *Nippostrongylus brasiliensis* infection, a

decrease was monitored in serum PON1 paraoxonase and arylesterase activity, which again correlated with pro-inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  [127]. Taurocholate-induced experimental acute pancreatitis also resulted in decreased serum PON1 activity and concentration [128]. In Behçet's disease, also characterized by inflammation and oxidative stress, patients showed low levels of serum PON1 activity along with high levels of total peroxides and lipid hydroperoxides [129]. Similar results were obtained in patients with acute viral hepatitis or sepsis, as PON1 activity was also decreased [130]. Whether the down-regulation of PON1 is a cause of disease or a consequence due to inflammation and oxidative stress still needs to be determined.

### **Pharmacological regulation of PON1**

Little is known about the pharmacological regulation of human paraoxonases. So far, statins and PPAR agonists are the most widely studied pharmacological molecules for their effects on PON1. No specific molecule targeting PON1 has yet been developed.

Statins are 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, which are widely used to reduce serum cholesterol levels and prevent cardiovascular events. Statins have exhibited an antioxidant potential [131], which prompted studies on PON1 status.

Rabbits fed a high-cholesterol diet for 8 weeks showed a marked reduction in PON1 activity along with an increase in various oxidative stress markers [132]. Treatment of these rabbits with atorvastatin decreased oxidative stress and increased PON1 activity [132]. The effects of statins on PON1 status have also been studied in men. Daily simvastatin treatments of patients with familial hypercholesterolemia for 4 months resulted in lower serum lipid peroxides and higher PON1 activity [133]. Similarly, hyperlipidemic patients treated with atorvastatin for 6 months displayed a similar effect on PON1 [134], while reducing oxidized LDL [135]. Overall, these studies show that various statins can have

beneficial effects not only through their action on cholesterol reduction, but also via lowering oxidative stress and increasing PON1 activity. It is possible that PON1 activity might be increased by statins as a consequence of oxidative stress limitation. Other mechanisms may include the direct effects of statins on PON1 promoter activity and gene expression. To this end, HepG2 cells were transiently transfected with DNA fragments containing the PON1 promoter, whose activity was evaluated with a luciferase reporter assay, in the presence or absence of simvastatin. This drug upregulated PON1 promoter activity by up to 250%, thereby explaining the increase in PON1 activity following statin treatment. The increase in PON1 promoter activity was at least partially explained by the raised levels of the transcription factor SREBP-2, which could directly upregulate PON1 promoter activity [136]. The importance of transcription factor SREBP-2 in upregulating PON1 promoter activity was confirmed, since treatment of HepG2 cells with purified SREBP-2 enhanced PON1 promoter activity [137], which was reversed by inhibition of the Sp1 transcription factor [138]. Pitivastatin also activated the PON1 promoter, increased PON1 protein levels in HuH7 cells through induction of protein kinase C and raised binding intensity of Sp1 on PON1 promoter [139]. Of note were the contradictory data obtained in human hepatoma HuH7 cells in which treatment with different types of statins decreased PON1 arylesterase activity, mRNA levels and promoter activity [140]. Polymorphisms could also have an impact on the effects of statins on PON1, since the increase in PON1 activity might be influenced by the T(-108)C polymorphism [141] although another report states the lack of influence [142]. Statins seem to be generally beneficial for PON1 status, favoring its expression and also possibly preventing its inactivation with their antioxidative properties.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) act principally on lipid storage and fatty acid oxidation and their agonists are considered important cardioprotective drugs. For example, fibrates are employed as antiatherosclerotic and hypolipidemic agents, while thiazolidinediones are mostly used in type 2 diabetes, since they can regulate glucose metabolism.

Negative effects on PON1 activity were seen with fenofibrate in rats receiving 3 different doses for 7 days despite a drop in various oxidative stress markers [143]. In another study, the treatment of rats on a fructose-enriched diet, which increased MDA levels and reduced PON1 activity, supplemented with bezafibrate stimulated PON1 [144]. Exposure of HuH7 cells to fenofibric acid, the pharmacologically active form of fenofibrate, upregulated PON1 activity and mRNA levels [140]. Compared with bezafibrate, clofibric acid and gemfibrozil, fenofibric acid was most effective in increasing PON1 promoter activity [140]. While contradictory results have been recorded regarding the impact of fibrates on PON1 in cells and laboratory animals, the differences can be explained by the dosage, length of treatment, type of fibrate studied and model used.

Deviant data have also emerged from human studies. Indeed, patients with hyperlipoproteinemia who received bezafibrate or gemfibrozil for 8 weeks, did not show a modulation in PON1 activity even when HDL-cholesterol and apo A-I were increased [145]. In a similar fashion, patients with familial combined hyperlipoproteinemia treated with ciprofibrate exhibited increased serum apo A-I concomitant with a non-significant drop in PON1 [146]. On the other hand, positive results were obtained with gemfibrozil administered to type 2 diabetic patients for 3 months, as triglycerides were decreased, while HDL-cholesterol, apo A-I and serum PON1 activity were increased [94]. Fenofibrate treatment in patients with hyperlipidemia also resulted in similar effects [95]. In addition,

patients with combined hyperlipidemia and coronary artery disease, treated with fenofibrate, lowered their plasma CRP and fibrinogen and increased their PON1 activity [147]. Finally, the treatment of patients with metabolic syndrome with ciprofibrate resulted in a decrease in triglycerides and oxLDL, along with an increase in apo A-I, HDL and PON1 activity [148].

Overall, various PPAR $\alpha$  agonists seem beneficial for PON1 status by direct regulation [140] or via indirect effects on HDL and apo A-I, as well as inflammatory and oxidative stress prevention.

Few data are available for the impact of PPAR $\gamma$  agonists on PON1 status. The impact of rosiglitazone on PON1 was evaluated in HIV patients with lipodystrophy and insulin resistance. Rosiglitazone had no effect on HDL-cholesterol or the inflammatory markers tested, but it significantly increased PON1 activity [149]. The treatment of type 2 diabetic patients with rosiglitazone resulted in increased fasting PON1 activity and a post-prandial fall in PON1 activity was also attenuated. These observations correlated with reduced plasma peroxides, thereby highlighting the protective role of PON1 [150].

Aspirin is widely used in the prevention and treatment of vascular diseases. It is also known for its anti-inflammatory and antioxidant effects. The hypothesis that aspirin may have beneficial effects on serum PON1 concentration and activity was tested. Aspirin use significantly increased PON1 concentration and activity in patients with coronary artery disease [151]. The effects of aspirin on PON1 were further characterized in HepG2 cells, rat primary hepatocytes and mice and led to an increase in PON1 activity and gene expression [152].

Other drugs with beneficial effects on cardiovascular health were investigated for their action on PON1. The effects of valsartan, an angiotensin II receptor blocker used for

lowering blood pressure, were studied in type 2 diabetic subjects. Valsartan lowered urine 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, but had no effect on PON1 activity [153]. Barnidipine, a calcium channel blocker, used as an anti-hypertensive drug, reduced isoprostane levels in hypertensive patients without changing PON1 status [154].

Probucol is a cholesterol-lowering drug that has antioxidative properties. It has been shown to increase PON1 activity in men [155] and serum PON1 levels, measured by ELISA, as well as in rabbits fed a high-cholesterol diet, concomitant with a rise in gene expression in the liver [156].

Orlistat is a drug used to reduce obesity and ameliorate the lipid profile. Patients receiving orlistat exhibited high serum PON1 activity [157], which represents a supplementary beneficial effect of orlistat.

Ezetimibe is used as an anti-hyperlipidemic drug that acts through inhibition of intestinal cholesterol absorption. In hyperlipidemic patients, ezetimibe therapy increased PON1 activity, which could further help prevent atherosclerosis [158].

Overall, drugs that have antioxidative properties seem to be beneficial to PON1 status. Some of the pharmacological molecules increased PON1 gene expression and activity in the liver, while others produced an amelioration in oxidative status and lipid profile, including HDL and apo A-I levels, possibly leading to better protection against atherosclerosis.

## **PHYSIOLOGICAL ROLES OF PON2**

Less information is available regarding the specific functions and regulation of PON2. However, like PON1, it has been implicated in oxidative stress, inflammation and quorum-sensing regulation. Its antioxidative properties may be related to atherosclerosis prevention, although PON2 protein is not detectable in HDL particles. However, PON2 is expressed in

nearly all human tissues with a primary localization in the plasma membrane, which suggests functions that are distinct from those reported for PON1 and PON3 [9].

The first reported demonstration of the antioxidative potential of PON2 was obtained in HeLa cells where PON2 overexpression was shown to lower H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced intracellular oxidative stress. Accordingly, LDL incubated with PON2-overexpressing HeLa cells was found to be less oxidized and its action on monocyte chemotaxis was reduced [9].

An evaluation of the ROS-reducing properties of PON2 was carried out using genetically modified vascular cells. The induction of oxidative stress with 2,3-dimethoxy-1,4-haptoquinone in cells overexpressing PON2 resulted in a marked reduction in ROS levels. Conversely, the administration of the same prooxidant to cells invalidated for PON2 raised ROS levels [10]. Interestingly, the impact of endoplasmic reticulum (ER) stress on PON2 was investigated in vascular cells [10]. While ER stress caused an increase in ROS and induced the “unfolded protein response,” it upregulated PON2 protein expression. Since an ER stress element-like sequence was found to be present in the promoter region of PON2, the authors concluded that PON2 probably plays an important role in controlling oxidative stress in vascular cells, particularly in the ER [10].

Antiatherogenic properties of PON2 have also been assessed in genetically modified mice [159, 160]. PON2 overexpression in apo E deficient mice, which exhibit more susceptibility to the development of atherosclerotic lesions, showed an increased antioxidant capacity, demonstrated by reduced levels of lipid hydroperoxides. LDL from these mice was less susceptible to oxidative modifications and HDL was endowed with an elevated antioxidant capacity and displayed enhanced abilities to efflux cholesterol from macrophages [161]. Additional evidence for the important protective role of PON2 against oxidative stress and atherosclerosis development was gained using a PON2-deficient mouse

model [159]. When submitted to a high-fat diet for 15 months, PON2-deficient animals developed significantly larger atherosclerotic lesions compared with controls. Moreover, LDL isolated from these animals was more susceptible to oxidation and induced more monocyte chemotaxis. When macrophages were isolated from PON2-deficient mice, they had not only a greater susceptibility to oxidative stress, but they also responded with an increase in TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  gene expression after LPS-induced inflammation [159].

Furthermore, PON2 may exert a significant protection against macrophage triglyceride accumulation, macrophage TG biosynthesis, microsomal diacylglycerol acyltransferase 1 activity and macrophage oxidative stress, under high glucose concentrations. The investigators of this study suggest that the PON2 protective effect may contribute to the decrement in macrophage atherogenicity and foam cell formation, attenuating the development of vascular complications in diabetes mellitus [162, 163].

The direct impact of PON2 on macrophages was investigated with purified PON2 protein. Its addition to macrophages isolated from apo E<sup>-/-</sup> mice and containing high peroxide concentration revealed less prooxidant stress [8].

PON2 was also studied in the gastrointestinal tract, since oxidative stress and inflammation are processes that are highly implicated in many intestinal disorders. The hypothesis is that PON2 may be instrumental in fighting the potentially pro-inflammatory flora and prooxidant diet that challenges the intestinal epithelium. PON2 gene and protein expression has been detected in various parts of the human gastrointestinal tract [164] and the addition of purified PON2 to permeabilized intestinal Caco-2 cells protects against Fe/Asc-induced oxidative stress [165]. Thus, PON2 may help maintain intestinal homeostasis by neutralizing prooxidants and pro-inflammatory agents, thereby favoring solid protection for mucosal barrier integrity.



In line with this reasoning, a noteworthy feature of PON2 is its high ability to degrade various harmful factors, including acylhomoserine lactones, that allow bacteria to communicate and coordinate their infection, a process known as quorum sensing [166], which is enhanced in PON2 KO mice [167]. If PON2 is capable of lessening the quorum sensing produced by bacteria like *Pseudomonas aeruginosa*, which causes infections in cystic fibrosis [168], it may prove to represent an interesting pharmaceutical target for the prevention of pulmonary infections. In fact, PON2 exhibited the highest activity of the three PONs against acylhomoserine lactones [21] and towards 3-OC12-HSL [25] and its knockdown in human alveolar and endothelial cells rendered them more sensitive to 3-OC12-HSL and pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* [169]. A polymorphism found in PON2 coding sequence, with a substitution of a cysteine for a serine at position 311, alters glycosylation of the enzyme and decreases its lactonase activity, which could be of major importance for innate immunity in the lungs [170].

Altogether, these findings clearly demonstrate the important protective roles played by PON2 against inflammation and oxidative stress. It is possible that PON2 fulfills these crucial functions in various organs, whereas HDL-associated PON1 and PON3 are mostly effective in the blood circulation. Furthermore, the property of PON2 to hydrolyze several bacterial products highlights its potential anti-infective defense mechanisms.

### **Regulation of PON2 by inflammation and oxidative stress**

PON2 has proven to be largely modulated in pathophysiological situations related to oxidative stress and inflammation (Table 3). Various models have been used to better understand PON2 regulation.

The modulation of PON2 was assessed in peritoneal macrophages (MPM) isolated from apo E<sup>-/-</sup> mice. PON2 mRNA was found to be upregulated compared with macrophages

from control mice [8], and lactonase activity towards dihydrocoumarin (DHC) was enhanced. However, DHC is not a specific substrate of PON2. PON1 and PON3 both exhibit higher activity towards DHC than does PON2 [21]. Moreover, the transcripts of PON2 and lactonase activity towards DHC were consistently increased following the induction of oxidative stress with the use of buthionine sulfomixine, an inhibitor of glutathione synthesis, angiotensin II, Ox-PAPC or 7-ketocholesterol [8].

The expression of PON2 in macrophages was further characterized in human acute monocytic leukemia THP-1 cells. During the differentiation of these cells into macrophages, there was a gradual increase in the production of superoxide anion (dependent on reduced-NADPH-oxidase), concomitant with an increase in PON2 gene and protein expression and lactonase activity towards DHC [171]. When differentiated in the presence of antioxidant vitamin E, the superoxide anion production was reduced along with PON2 gene expression and lactonase activity. The importance of NADPH-oxidase in the upregulation of PON2 was obtained by using p47<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> mice that lack this enzyme. Inducers and inhibitors of NADPH oxidase activity also respectively stimulated and abolished the increase in PON2 mRNA. The authors suggested that this effect was due in part to the redox sensitive transcription factor AP-1 [171]. Additional studies are needed to highlight the status of PON2, not only in macrophages, but also in atherosclerosis, since preliminary data have shown that PON2 gene and protein expression were decreased in plaques [172].

Further characterization of the effect of oxidative stress on PON2 regulation was carried out. Urokinase plasminogen activator (uPA) contributes to oxidative stress. THP-1 macrophages were treated with uPA, which enhanced PON2 expression in parallel with oxidative stress burst. Moreover, macrophages isolated from PON2<sup>-/-</sup> mice were less

protected from uPA-induced oxidative stress [173], suggesting once again an important antioxidative role for PON2 in macrophages. The upregulation of PON2 by uPA seems to depend on SREBP-2 in the presence of platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  [174].

Elaboration on the regulation of PON2 was extended with the use of various pro-oxidative systems and antioxidants. Oxidative stress elicited with AAPH, copper sulfate and iron/ascorbate in J774 A.1 macrophages raised PON2 protein mass and activity towards thiobutyl butyrolactone [175]. Interestingly, treatment of these cells with antioxidants, namely butylated hydroxytoluene, vitamin E and punicalagin (a major antioxidant ingredient in pomegranate juice), also raised PON2 activity, but without any effect on protein levels. Transcription factors PPAR $\gamma$  and AP-1 seemed to be in part responsible for these modifications, since the incubation of macrophages with AP-1 or PPAR $\gamma$  inhibitors prevented the effect on PON2 [176]. These results showed that PON2 is highly regulated by the oxidative state in macrophages, which may constitute a compensatory mechanism to help control ROS at the cellular level.

As mentioned previously, harmful agents are abundant in the intestine and numerous mechanisms are exerted to protect the body from potentially pathogenic bacteria, dietary oxidant ingestion and intestinal flora [165]. In particular, an imbalance between pro- and antioxidants and inappropriate inflammatory response is implicated in the etiopathology of inflammatory bowel disease. The presence of PON1, 2 and 3 was detected in human gastrointestinal specimens, as well as in the intestine of C57BL/6 mice [164]. PON enzymatic activities, gene and protein expression in human intestinal Caco-2 cells were also reported [164]. The effect of Fe/Asc-induced oxidative stress was evaluated on PON2 content in human and rat jejunum microsomes, as well as in differentiated CaCo-2 cells [165]. In all these systems, PON2 protein mass was found to be decreased by oxidative

stress, and preincubation with antioxidants butylated hydroxytoluene, N-acetylcysteine and Trolox prevented this decrease, suggesting a direct effect of oxidative stress on PON2 [165]. Although inflammatory conditions such as Crohn's disease, ulcerative colitis and celiac disease demonstrated no substantial impact on the intestinal gene expression of PON2 and pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) failed to influence PON2 gene expression [125], additional studies demonstrated major changes in PON2 following Caco-2 treatment with pro-inflammatory molecules [177].

Atherosclerosis is also an inflammatory and oxidative stress-related disease in which PON2 status has been evaluated. In atherosclerotic plaques and in plaque-adjacent tissue, PON2 gene and protein expression were decreased [172].

### **Pharmacological and nutritional regulation of PON2**

At present, PON2 can be considered as a major antioxidative enzyme in atherosclerosis as well as in many other oxidative stress-related diseases given its ubiquitous character. More and more studies related to the nutritional modulation of PON2 are published, but limited information is available about PON2 pharmacological regulation.

Treatment with rosiglitazone, a PPAR $\gamma$  agonist, increased PON2 mRNA expression in J774A.1 macrophage cells [176]. Pomegranate juice polyphenols were also able to induce PON2 gene expression and lactonase activity, which was attenuated by addition of GW9662, a PPAR $\gamma$  inhibitor [176]. Moreover, the addition of quercetin to RAW264.7 macrophages also upregulated PON2 gene and protein expression, but the same findings could not be observed in human volunteers, possibly because quercetin is highly metabolized [178].

Interestingly, arachidonic acid, generally considered as a pro-inflammatory fatty acid, increases PON2 mRNA and activity in macrophages and decreases cholesterol biosynthesis

rate via the transcription factors AP-1 and PPAR $\gamma$  [179]. Conversely, PON2 mRNA expression and activity are decreased in macrophages from  $\Delta 6$ -desaturase knockout mice, which cannot convert the precursor linoleic acid to arachidonic acid [179].

Glucocorticoids could also prove to be important players for the modulation of PON2 gene expression. Treatment of NIH3T3 cells with dexamethasone increased PON2 mRNA via the glucocorticoid receptor and the glucocorticoid response element found on the PON2 promoter [180]. However, much work is required to identify the nutritional and pharmacological stimuli capable of influencing PON2.

### **PHYSIOLOGICAL ROLES OF PON3**

The biological functions of PON3 were clarified with the pioneer work of Draganov et al. in 2000 [181]. Characterization of rabbit PON3 was carried out following its purification and it interestingly co-purified with PON1 and apo A-I, both known components of HDL, indicating the location of PON3 within HDL particles. Substrate specificity was found to be quite different, as PON3 had no paraoxonase activity and very limited arylesterase activity, but was endowed with a much greater lactonase activity than PON1. PON3 was able to delay LDL copper-induced oxidation 100 times more effectively than PON1, although the latter was about 200 times more abundant than PON3 in rabbit HDL [181].

Human PON3 was further characterized and its functions better defined. PON3 mRNA expression was found primarily in the liver and kidneys. Like rabbits, human PON3 circulates bound to HDL particles. Moreover, HeLa cells with PON3 overexpression prevented the formation of mildly oxidized LDL, inactivated preformed mildly oxidized LDL, exhibited low levels of lipid hydroperoxides and showed reduced monocyte chemotaxis [182]. When human PON3 was cloned and expressed in *Escherichia coli*, the

refolded human PON3 was able to reduce conjugated diene formation and to partially prevent CuSO<sub>4</sub>-induced LDL oxidation in vitro [183].

More recently, the development of human PON3 transgenic mice allowed a better comprehension of the functions of PON3 and confirmed its properties in protecting against atherosclerosis. Transgenic mice expressing 4 to 7 times more PON3 in their liver and fed an atherogenic diet displayed significantly smaller atherosclerotic lesions compared with control mice [184]. Interestingly, human PON3 was not found to be associated with HDL in the circulation and its antioxidative properties were thought to reside at the cellular level, namely in hepatocytes. Human PON3 was also expressed in LDL receptor KO mice and it resulted in decreased atherosclerotic lesions and a reduction in monocyte chemotaxis factor MCP-1 [184]. Of note was the reduction of adiposity in normal and LDL receptor KO mice expressing human PON3, suggesting a role for this enzyme in the control of obesity [184]. PON3 mRNA levels were also found to be higher in perirenal and subcutaneous fat tissues of obese compared to leaner pigs [185].

Another genetically modified animal model was produced to study the impact of PON3 levels in vivo. Using human PON3-expressing mice, on an apo E KO background, it was possible to observe reduced lipid hydroperoxides in the serum and smaller atherosclerotic lesion areas, while LDL was less susceptible to oxidation and HDL was more protective against LDL oxidation and had an enhanced capacity to efflux cholesterol from macrophages [160]. This report also confirmed that human PON3 in mice did not reside in HDL particles [160]. Confirmation of the data was obtained in mice on an apo E<sup>-/-</sup> background. when they were administered adenovirus to express human PON3, one could note reduced arterial lesion size without anti-inflammatory or antioxidative effects [41]. However, the anti-inflammatory potential of PON3 was shown in a mouse model of

CCl(4)-induced liver injury, as overexpression of PON3 led to reduced MDA levels, increased glutathione content and decreased TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  [43, 186].

PON3 gene and protein expression have been detected in various types of murine macrophages that showed specific esterase activity [8]. Macrophages from apo E<sup>-/-</sup>, which contain lipid peroxides, were incubated in the presence of purified PON3 and with LDL, and as a result, macrophage lipid peroxide content was reduced, as was LDL oxidation [8].

Overall, these studies tend to show an important protective role for PON3 against atherosclerosis, particularly in terms of its antioxidative effects. However, the specific natural substrates of PON3 have not been well characterized. Unlike PON1, PON3 has very limited paraoxonase activity and shows no organophosphatase activity towards chlorpyrifos oxon and diazoxon. PON3 displayed some arylesterase activity and the capacity to hydrolyze various lactones, which can explain its beneficial effects on oxidative stress and against lipids peroxides. The beneficial effects of PON3 probably go beyond the blood circulation, since PON3 appears a wide range of tissues, including the lung, liver, pancreas and intestine [1, 187]. Moreover, PON3 has recently been shown to be up-regulated in late gestation in rat, sheep and human and could even play an antioxidative role in premature or newborn babies [188]. However, its lactonase activity towards drug substrates such as lovastatin, spironolactone and canrenone distinguishes PON3 from PON1 and PON2 [21]. The distinct abilities of PON3 may be physiologically important, although they are not yet well understood.

### **Regulation of PON3 by inflammation and oxidative stress**

Few studies have focused on PON3 regulation (Table 4). MPM isolated from apo E<sup>-/-</sup> mice, and exposed to oxidative stress did not reveal any changes in PON3 mRNA levels, even if esterase activity was diminished. Supplementation of apo E<sup>-/-</sup> mice with antioxidant

pomegranate juice or vitamin E increased statinase activity, indicating that PON3 is regulated by oxidative stress. However, murine macrophages-like cells J774 A.1 were treated with antioxidant pomegranate juice and a reduction in PON3 statinase activity was observed in comparison with control cells [176]. Moreover, incubation of MPM isolated from C57BL/6 mice with various pro-oxidative systems led to reduced PON3 activity without having any impact on gene expression [8]. PON3 seems to be affected by oxidative stress, but more studies are needed to clarify its regulation, since conflicting results have been obtained.

PON3 mRNA expression was studied in colonic samples obtained from healthy individuals and Crohn's disease and ulcerative colitis patients. PON3 mRNA was detected in 1/14 patients with active ulcerative colitis and in 3/17 Crohn's disease patients, compared to 10/25 in healthy controls [125]. It is, therefore, possible that inflammation and oxidative stress in inflammatory bowel disease patients may downregulate PON3 expression in the intestine, even if the low expression level of PON3 in controls is surprising. Nevertheless, it is important to mention that Caco-2 cells that were submitted to Fe/Asc-induced oxidative stress had unchanged PON3 gene and protein expression, though statinase activity was reduced [164]. In addition to the poor understanding of PON3 regulation, more work is necessary to better define its physiological functions and understand its importance as an antioxidant in the circulation and in various organs.

## **CONCLUSIONS**

PONs (1, 2 and 3) are still relatively newly identified antioxidant enzymes and much more work needs to be done in order to fully elucidate their physiological functions as well as understand their modulation and their implications for human health. PON1, 2 and 3 can all prevent atherosclerosis and control oxidative stress in the blood circulation. Oxidised lipids



have shown to be potential substrates for PONs, which could explain their beneficial implication in oxidative stress and inflammation. Hydrolysis of bacterial signaling molecules also suggests anti-infective functions for PONs. However, oxidative stress and inflammatory conditions generally seem to be deleterious for PON1 and nutritional antioxidants may prevent the loss of its activity.

Manipulating PONs expression and activity by nutritional or pharmacological means could thus have an implication in oxidative stress and inflammation-related diseases (Figure 1). PON1 generally seems upregulated by a healthy life-style, including consumption of antioxidants, eating "good" fats or exercising. Drugs such as statins and PPAR activators could also increase PON1 expression and activity. The manipulation of PON2 and PON3 has been less studied. PON2 could be up-regulated by nutritional polyphenols and PPAR activators and PON3 could also be up-regulated by antioxidants. More research should be performed in order to develop specific pharmacological agents targeting PONs.

Unfortunately, the modulation of PON1 is often assessed only by the determination of PON and arylesterase activity under various experimental conditions, while gene and protein regulation is not evaluated. In addition, future studies will have to increasingly focus on PON2 and PON3. Both these enzymes have shown significant antioxidative potential and they may have the capacity to help prevent atherosclerosis and other cardiovascular diseases. PON2 is expressed in nearly all human tissues, and thus may be implicated in many other diseases, as suggested by the relation between disease and its polymorphisms. Simple, valuable and specific enzymatic reactions are also necessary to evaluate PON2 and PON3 activity [189]. Moreover, a recent report on PON localization suggests that PON1 and PON3 are present at the cellular level in a variety of tissues, where they could locally confer protection from oxidative damage [1]. Thus, research must now evaluate PON

functions throughout the body and stop focusing on blood circulation. A deeper understanding of PON functions and modulators would pave the way for clinical and nutritional interventions in order to boost antioxidative defense through PON activities, while helping to prevent atherosclerosis and other oxidative stress-related diseases.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by the Crohn's and Colitis Foundation of Canada, the JA deSève Research Chair in Nutrition (EL) and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (LPP).

The authors thank Mrs Schohraya Spahis for her technical assistance.

**Table 1. Major PON1 polymorphisms accounting for the modulation of enzyme activity as well as gene and protein expression**

<b>Position</b>	<b>Amino acids or nucleotides involved</b>	<b>Effects on Expression</b>	<b>Effects on activity</b>	<b>References</b>
55	Leucine(L)→methionine(M)	LL : highest expression	LL : highest paraoxonase, arylesterase and lactonase activity	[47, 50, 56]
192	Glutamine(Q)→arginine(R)		With phenylacetate, QQ highest activity	[47]
192	Glutamine(Q)→arginine(R)		RR : highest paraoxonase and arylesterase activity QQ : highest lactonase and sarinase activity	[50, 52, 54]
-108 or -107	C or T	-108C promoter 2 times higher activity	With phenylacetate, CC highest serum concentration and activity	[47, 55, 59, 61]
-126		no differences		[59]
-162	A or G		With phenylacetate, AA highest activity	[47, 59]
-824 or -832	A or G	-824A promoter 1.7 times higher activity or no difference	With phenylacetate : AA highest activity	[55, 59, 60]
-907 or -909	C or G	No difference	With phenylacetate : GG highest activity	[47, 55, 59, 60]

**Table 2: Regulation of PON1 gene, protein expression and activity**

Model	Mediator	Gene Expression	Protein Expression	Activity	Mechanism	References
<b><i>Inflammatory modulators</i></b>						
Human and rabbit HDL	Acute phase response mediators	n/d	n/d	↓	n/d	[111]
Syrian hamsters	Lipopolysaccharides; TNF- $\alpha$ ; IL-1	↓ (liver)	n/d	↓ (serum)	n/d	[115]
Human liver HepG2 cells	TNF- $\alpha$ ; IL-1	↓	n/d	n/d	n/d	[115]
C57BL/6J mice	Acute influenza infection; IL-6	n/d	n/d	↓	n/d	[112]
Human liver HepG2 cells	Oxidized phospholipids; IL-6	↓	n/d	n/d	n/d	[116]
	LPS	n/d	n/d	↓	n/d	
Human liver HepG2 cells	TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$	↓	n/d	n/d	n/d	[114]
Human liver HepG2 cells	TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$	↓	n/d	n/d	n/d	[117]
	IL-6	↑	n/d	n/d	n/d	
Murine hepatoma Hepa 1-6 cells and murine AML12, NMH hepatocyte cells; C57BL/6 mice	Cytokine mixture (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and IL-6); LPS	↓	n/d	n/d	NF- $\kappa$ B transactivation and PPAR $\alpha$ inhibition	[113]
Human intestinal Caco-2 cells	TNF- $\alpha$ ; IFN $\gamma$ ; IL-1 $\beta$	=	n/d	n/d	n/d	[125]
Biopsies: Duodenum of celiac patients; Terminal ileum of Crohn's patients; Colon of ulcerative colitis patients	n/a	↓	n/d	n/d	n/d	[125]
<b><i>Oxidative stress</i></b>						
Purified PON1	Oxidized LDL	n/d	n/d	↓	n/d	[118]
HDL	3-Morpholinopyridone (SIN-1)	n/d	n/d	↓	n/d	[29]
HDL	Cupric sulfate; $\gamma$ -irradiations	n/d	n/d	↓	n/d	[119]
Purified PON1; HDL	Copper/Ascorbate	n/d	n/d	↓	n/d	[120]
Human intestinal Caco-2 cells	Iron/Ascorbate	=	=	↑	n/d	[164]
Human and rat livers	Iron/Ascorbate	n/d	↓	↓	n/d	[122]
HDL	Copper	n/d	n/d	↓	n/d	[121]

n/d: no data

**Table 3: Regulation of PON2 gene, protein expression and activity**

Model	Mediator	Gene Expression	Protein Expression	Activity	Mechanism	References
<b><i>Inflammatory modulators</i></b>						
Human intestinal Caco-2 cells	TNF- $\alpha$ ; IFN $\gamma$ ; IL-1 $\beta$	=	n/d	n/d	n/d	[125]
Biopsies: Duodenum of celiac patients; Terminal ileum of Crohn's patients; Colon of ulcerative colitis patients	n/d	=	n/d	n/d	n/d	[125]
<b><i>Oxidative stress</i></b>						
Mouse peritoneal macrophages	Apo E <sup>-/-</sup> mice (high oxidative stress)	↑	n/d	↑ lactonase activity (DHC)	n/d	[8]
J774 A.1 macrophages	BSO; Ang II; 7-KETO; Ox-PAPC	↑	n/d	↑ lactonase activity (DHC)	n/d	[8]
Human myeloid leukemia cell line THP-1, differentiated into macrophages with vitamin D	Superoxide anion	↑	↑	↑ lactonase activity (DHC)	Activation of NADPH-oxidase by transcription factor AP-1	[171]
Human intestinal Caco-2 cells	Iron/Ascorbate (Fe/Asc)	=	=	↑ lactonase activity	n/d	[164]
J774 A.1 macrophages	Prooxidants : AAPH; Fe/Asc Copper sulfate	n/d	↑	↑ lactonase activity (TBBL)	n/d	[175]
J774 A.1 macrophages	Antioxidants: BHT; Vitamin E Punicalagin	n/d	=	↑ lactonase activity (TBBL)	n/d	[8]
J774 A.1 macrophages	Pomegranate juice	↑	↑	↑ lactonase activity (DHC)	PPAR $\gamma$ and AP-1 activation	[176]

Human and rat intestinal specimens; Human intestinal Caco-2 cells	Fe/Asc	↓	↓	n/d	n/d	[165]
THP-1 macrophages	Urokinase plasminogen activator	↑	n/d	n/d	n/d	[173]
Human atherosclerotic plaques	n/d	↓	↓	n/d	n/d	[172]

---

n/d: no data

**Table 4: Regulation of PON3 gene, protein expression and activity**

Model	Mediator	Gene Expression	Protein Expression	Activity	Mechanism	References
<b><i>Inflammatory modulators</i></b>						
Human intestinal Caco-2 cells	TNF- $\alpha$ ; IFN $\gamma$ ; IL-1 $\beta$	=	n/d	n/d	n/d	[125]
Biopsies: Duodenum of celiac patients; Terminal ileum of Crohn's patients; Colon of ulcerative colitis patients	n/a	↓	n/d	n/d	n/d	[125]
<b><i>Oxidative stress</i></b>						
Mouse peritoneal macrophages	Apo E <sup>-/-</sup> mice (high oxidative stress)	=	n/d	↓statinase activity	n/d	[8]
J774 A.1 macrophages	BSO; Ang II; 7-KETO; Ox-PAPC	=	n/d	↓statinase activity	n/d	[8]
Human intestinal Caco-2 cells	Iron/Ascorbate	=	=	↓	n/d	[164]
J774 A.1 macrophages	Pomegranate juice	n/d	n/d	↓	n/d	[176]

n/d: no data



**REFERENCES**

- 1 Marsillach J, Mackness B, Mackness M et al. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 2008;45:146-157.
- 2 La Du BN. Structural and functional diversity of paraoxonases. *Nat Med* 1996;2:1186-1187.
- 3 Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1304-1316.
- 4 Ito T, Yasue H, Yoshimura M et al. Paraoxonase gene Gln192Arg (Q192R) polymorphism is associated with coronary artery spasm. *Hum Genet* 2002;110:89-94.
- 5 Zintzaras E, Hadjigeorgiou GM. Association of paraoxonase 1 gene polymorphisms with risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2004;49:474-481.
- 6 Hofer SE, Bennetts B, Chan AK et al. Association between PON 1 polymorphisms, PON activity and diabetes complications. *J Diabetes Complications* 2006;20:322-328.
- 7 Karban A, Hartman C, Eliakim R et al. Paraoxonase (PON)1 192R allele carriage is associated with reduced risk of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2007;52:2707-2715.
- 8 Rosenblat M, Draganov D, Watson CE et al. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:468-474.

- 9 Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A et al. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001;276:44444-44449.
- 10 Horke S, Witte I, Wilgenbus P et al. Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation* 2007;115:2055-2064.
- 11 Leus FR, Zwart M, Kastelein JJ et al. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis* 2001;154:641-649.
- 12 Pan JP, Lai ST, Chiang SC et al. The risk of coronary artery disease in population of Taiwan is associated with Cys-Ser 311 polymorphism of human paraoxonase (PON)-2 gene. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 2002;65:415-421.
- 13 Mackness B, McElduff P, Mackness MI. The paraoxonase-2-310 polymorphism is associated with the presence of microvascular complications in diabetes mellitus. *J Intern Med* 2005;258:363-368.
- 14 Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW et al. Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3373-3377.
- 15 Sanchez R, Levy E, Seidman E et al. Paraoxonase 1, 2 and 3 DNA variants and susceptibility to childhood inflammatory bowel disease. *Gut* 2006;55:1820-1821.

- 16 Liu Y, Mackness B, Mackness M. Comparison of the ability of paraoxonases 1 and 3 to attenuate the in vitro oxidation of low-density lipoprotein and reduce macrophage oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2008;45:743-748.
- 17 Campo S, Sardo AM, Campo GM et al. Identification of paraoxonase 3 gene (PON3) missense mutations in a population of southern Italy. *Mutat Res* 2004;546:75-80.
- 18 Costa LG, Richter RJ, Li WF et al. Paraoxonase (PON 1) as a biomarker of susceptibility for organophosphate toxicity. *Biomarkers* 2003;8:1-12.
- 19 Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991;286:152-154.
- 20 Ng DS, Chu T, Esposito B et al. Paraoxonase-1 deficiency in mice predisposes to vascular inflammation, oxidative stress, and thrombogenicity in the absence of hyperlipidemia. *Cardiovasc Pathol* 2008;17:226-232.
- 21 Draganov DI, Teiber JF, Speelman A et al. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res* 2005;46:1239-1247.
- 22 Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry* 2005;44:6371-6382.
- 23 Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 2000;275:3957-3962.
- 24 Perla-Kajan J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylation in humans. *FASEB J* 2010;24:931-936.

- 25 Teiber JF, Horke S, Haines DC et al. Dominant role of paraoxonases in inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun* 2008;76:2512-2519.
- 26 Watson AD, Berliner JA, Hama SY et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;96:2882-2891.
- 27 Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL et al. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998;101:1581-1590.
- 28 Aviram M, Hardak E, Vaya J et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 2000;101:2510-2517.
- 29 Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF et al. Apolipoprotein A-I promotes the formation of phosphatidylcholine core aldehydes that are hydrolyzed by paraoxonase (PON-1) during high density lipoprotein oxidation with a peroxynitrite donor. *J Biol Chem* 2001;276:24473-24481.
- 30 Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF et al. Multiple substrates for paraoxonase-1 during oxidation of phosphatidylcholine by peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:391-396.
- 31 Kriska T, Marathe GK, Schmidt JC et al. Phospholipase action of platelet-activating factor acetylhydrolase, but not paraoxonase-1, on long fatty acyl chain phospholipid hydroperoxides. *J Biol Chem* 2007;282:100-108.

- 32 Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 2003;278:3937-3947.
- 33 Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN et al. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 2001;354:1-7.
- 34 Connelly PW, Draganov D, Maguire GF. Paraoxonase-1 does not reduce or modify oxidation of phospholipids by peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 2005;38:164-174.
- 35 Teiber JF, Draganov DI, La Du BN. Purified human serum PON1 does not protect LDL against oxidation in the in vitro assays initiated with copper or AAPH. *J Lipid Res* 2004;45:2260-2268.
- 36 Shih DM, Gu L, Xia YR et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998;394:284-287.
- 37 Shih DM, Xia YR, Wang XP et al. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2000;275:17527-17535.
- 38 Fuhrman B, Gantman A, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) deficiency in mice is associated with reduced expression of macrophage SR-BI and consequently the loss of HDL cytoprotection against apoptosis. *Atherosclerosis* 2010.
- 39 Oda MN, Bielicki JK, Ho TT et al. Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:921-927.
- 40 Tward A, Xia YR, Wang XP et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 2002;106:484-490.

- 41 Zhang C, Peng W, Wang M et al. Studies on protective effects of human paraoxonases 1 and 3 on atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Gene Ther* 2010;17:626-633.
- 42 Marsillach J, Camps J, Ferre N et al. Paraoxonase-1 is related to inflammation, fibrosis and PPAR delta in experimental liver disease. *BMC Gastroenterol* 2009;9:3.
- 43 Peng W, Zhang C, Lv H et al. Comparative evaluation of the protective potentials of human paraoxonase 1 and 3 against CCl4-induced liver injury. *Toxicol Lett* 2010;193:159-166.
- 44 Mackness B, Quarck R, Verreth W et al. Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1545-1550.
- 45 Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice. *Atherosclerosis* 2005;181:9-18.
- 46 Rosenblat M, Vaya J, Shih D et al. Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 2005;179:69-77.
- 47 Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB et al. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet* 2001;68:1428-1436.

- 48 Ginsberg G, Neafsey P, Hattis D et al. Genetic polymorphism in paraoxonase 1 (PON1): Population distribution of PON1 activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009;12:473-507.
- 49 Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983;35:1126-1138.
- 50 Rainwater DL, Rutherford S, Dyer TD et al. Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. *Heredity* 2009;102:147-154.
- 51 Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. *Circ Cardiovasc Genet* 2008;1:147-152.
- 52 Davies HG, Richter RJ, Keifer M et al. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 1996;14:334-336.
- 53 Adkins S, Gan KN, Mody M et al. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993;52:598-608.
- 54 Humbert R, Adler DA, Distechi CM et al. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993;3:73-76.
- 55 Leviev I, James RW. Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:516-521.
- 56 Leviev I, Negro F, James RW. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations

- of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2935-2939.
- 57 Mackness B, Mackness MI, Arrol S et al. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett* 1998;423:57-60.
- 58 Gaidukov L, Rosenblat M, Aviram M et al. The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux. *J Lipid Res* 2006;47:2492-2502.
- 59 Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB et al. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics* 2001;11:77-84.
- 60 Deakin S, Leviev I, Brulhart-Meynet MC et al. Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position - 107, implicating the Sp1 transcription factor. *Biochem J* 2003;372:643-649.
- 61 Suehiro T, Nakamura T, Inoue M et al. A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis* 2000;150:295-298.
- 62 Leviev I, Kalix B, Brulhart Meynet MC et al. The paraoxonase PON1 promoter polymorphism C(-107)T is associated with increased serum glucose concentrations in non-diabetic patients. *Diabetologia* 2001;44:1177-1183.
- 63 Leviev I, Righetti A, James RW. Paraoxonase promoter polymorphism T(-107)C and relative paraoxonase deficiency as determinants of risk of coronary artery disease. *J Mol Med* 2001;79:457-463.



- 64 Leviev I, Poirier O, Nicaud V et al. High expressor paraoxonase PON1 gene promoter polymorphisms are associated with reduced risk of vascular disease in younger coronary patients. *Atherosclerosis* 2002;161:463-467.
- 65 Isik B, Ceylan A, Isik R. Oxidative stress in smokers and non-smokers. *Inhal Toxicol* 2007;19:767-769.
- 66 Mouhamed DH, Ezzaher A, Araoud M et al. [Paraoxonase 1 (PON1) activity and lipid parameters in Tunisian smokers]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2010;68:143-147.
- 67 Solak ZA, Kabaroglu C, Cok G et al. Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people. *Clin Exp Med* 2005;5:99-105.
- 68 Senti M, Aubo C, Tomas M. Differential effects of smoking on myocardial infarction risk according to the Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase gene. *Metabolism* 2000;49:557-559.
- 69 Rantala M, Silaste ML, Tuominen A et al. Dietary modifications and gene polymorphisms alter serum paraoxonase activity in healthy women. *J Nutr* 2002;132:3012-3017.
- 70 Kleemola P, Freese R, Jauhiainen M et al. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis* 2002;160:425-432.
- 71 Boesch-Saadatmandi C, Egert S, Schrader C et al. Effect of quercetin on paraoxonase 1 activity--studies in cultured cells, mice and humans. *J Physiol Pharmacol* 2010;61:99-105.

- 72 Rao MN, Marmillot P, Gong M et al. Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. *Metabolism* 2003;52:1287-1294.
- 73 Prakash M, Shetty JK, Tripathy S et al. Serum paraoxonase in alcohol abusers associated with alcoholic liver disease. *Clin Chim Acta* 2007;378:232-234.
- 74 Belleville J. The French paradox: possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases. *Nutrition* 2002;18:173-177.
- 75 Fuhrman B, Aviram M. Preservation of paraoxonase activity by wine flavonoids: possible role in protection of LDL from lipid peroxidation. *Ann N Y Acad Sci* 2002;957:321-324.
- 76 Gouedard C, Barouki R, Morel Y. Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 2004;24:5209-5222.
- 77 Khateeb J, Gantman A, Kreitenberg AJ et al. Paraoxonase 1 (PON1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: a role for PPAR-gamma pathway. *Atherosclerosis* 2010;208:119-125.
- 78 Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein: studies in vitro and in diabetic patients. *Nutrition* 2010;26:359-366.
- 79 Casper RF, Quesne M, Rogers IM et al. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol Pharmacol* 1999;56:784-790.

- 80 Gouedard C, Barouki R, Morel Y. Induction of the paraoxonase-1 gene expression by resveratrol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2378-2383.
- 81 Sarandol E, Tas S, Dirican M et al. Oxidative stress and serum paraoxonase activity in experimental hypothyroidism: effect of vitamin E supplementation. *Cell Biochem Funct* 2005;23:1-8.
- 82 Jeon SM, Park YB, Kwon OS et al. Vitamin E supplementation alters HDL-cholesterol concentration and paraoxonase activity in rabbits fed high-cholesterol diet: comparison with probucol. *J Biochem Mol Toxicol* 2005;19:336-346.
- 83 Jarvik GP, Tsai NT, McKinstry LA et al. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1329-1333.
- 84 Calla MS, Lynch SM. Vitamin C preserves the cardio-protective paraoxonase activity of high-density lipoprotein during oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* 2006;452:129-137.
- 85 Ahlemeyer B, Bauerbach E, Plath M et al. Retinoic acid reduces apoptosis and oxidative stress by preservation of SOD protein level. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1067-1077.
- 86 Gatica LV, Vega VA, Zirulnik F et al. Alterations in the lipid metabolism of rat aorta: effects of vitamin a deficiency. *J Vasc Res* 2006;43:602-610.
- 87 Aksoy N, Aksoy M, Bagci C et al. Pistachio intake increases high density lipoprotein levels and inhibits low-density lipoprotein oxidation in rats. *Tohoku J Exp Med* 2007;212:43-48.

- 88 Perez MO, Garcia HL. [High-density lipoproteins (HDL) size and composition are modified in the rat by a diet supplemented with "Hass" avocado (*Persea americana* Miller)]. *Arch Cardiol Mex* 2007;77:17-24.
- 89 Sun X, Seeberger J, Alberico T et al. Acai palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. *Exp Gerontol* 2010;45:243-251.
- 90 Rock W, Rosenblat M, Borochoy-Neori H et al. Effects of date ( *Phoenix dactylifera* L., Medjool or Hallawi Variety) consumption by healthy subjects on serum glucose and lipid levels and on serum oxidative status: a pilot study. *J Agric Food Chem* 2009;57:8010-8017.
- 91 Park SA, Choi MS, Jung UJ et al. *Eucommia ulmoides* Oliver leaf extract increases endogenous antioxidant activity in type 2 diabetic mice. *J Med Food* 2006;9:474-479.
- 92 Mikhailidis DP, Papadakis JA, Ganotakis ES. Smoking, diabetes and hyperlipidaemia. *J R Soc Health* 1998;118:91-93.
- 93 Hedrick CC, Hassan K, Hough GP et al. Short-term feeding of atherogenic diet to mice results in reduction of HDL and paraoxonase that may be mediated by an immune mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1946-1952.
- 94 Balogh Z, Seres I, Harangi M et al. Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates?. *Diabetes Metab* 2001;27:604-610.
- 95 Paragh G, Seres I, Harangi M et al. The effect of micronised fenofibrate on paraoxonase activity in patients with coronary heart disease. *Diabetes Metab* 2003;29:613-618.

- 96 Blatter Garin MC, Moren X, James RW. Paraonase-1 and serum concentrations of HDL-cholesterol and apoA-I. *J Lipid Res* 2006;47:515-520.
- 97 De GB, Stengel D, Landeloos M et al. Effect of overexpression of human apo A-I in C57BL/6 and C57BL/6 apo E-deficient mice on 2 lipoprotein-associated enzymes, platelet-activating factor acetylhydrolase and paraonase. Comparison of adenovirus-mediated human apo A-I gene transfer and human apo A-I transgenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E68-E75.
- 98 Moore RE, Navab M, Millar JS et al. Increased atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein A-I attributable to both impaired reverse cholesterol transport and increased inflammation. *Circ Res* 2005;97:763-771.
- 99 Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ et al. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraonase ratio. *J Clin Invest* 1997;99:2005-2019.
- 100 Thomas-Moya E, Gianotti M, Proenza AM et al. Paraonase 1 response to a high-fat diet: gender differences in the factors involved. *Mol Med* 2007;13:203-209.
- 101 Kudchodkar BJ, Lacko AG, Dory L et al. Dietary fat modulates serum paraonase 1 activity in rats. *J Nutr* 2000;130:2427-2433.
- 102 Sutherland WH, Walker RJ, de Jong SA et al. Reduced postprandial serum paraonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1340-1347.
- 103 de Roos NM, Schouten EG, Scheek LM et al. Replacement of dietary saturated fat with trans fat reduces serum paraonase activity in healthy men and women. *Metabolism* 2002;51:1534-1537.

- 104 Drissi A, Girona J, Cherki M et al. Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). *Clin Nutr* 2004;23:1159-1166.
- 105 Cherki M, Derouiche A, Drissi A et al. Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: Intervention study in healthy men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15:352-360.
- 106 Cakmak A, Zeyrek D, Atas A et al. Paraoxonase activity in athletic adolescents. *Pediatr Exerc Sci* 2010;22:93-104.
- 107 Hamurcu Z, Saritas N, Baskol G et al. Effect of wrestling exercise on oxidative DNA damage, nitric oxide level and paraoxonase activity in adolescent boys. *Pediatr Exerc Sci* 2010;22:60-68.
- 108 Koncsos P, Seres I, Harangi M et al. Human paraoxonase-1 activity in childhood obesity and its relation to leptin and adiponectin levels. *Pediatr Res* 2010;67:309-313.
- 109 Seres I, Bajnok L, Harangi M et al. Alteration of PON1 Activity in Adult and Childhood Obesity and Its Relation to Adipokine Levels. *Adv Exp Med Biol* 2010;660:129-142.
- 110 Tomas M, Elosua R, Senti M et al. Paraoxonase1-192 polymorphism modulates the effects of regular and acute exercise on paraoxonase1 activity. *J Lipid Res* 2002;43:713-720.
- 111 Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC et al. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995;96:2758-2767.

- 112 Van Lenten BJ, Wagner AC, Nayak DP et al. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza a infection. *Circulation* 2001;103:2283-2288.
- 113 Han CY, Chiba T, Campbell JS et al. Reciprocal and coordinate regulation of serum amyloid A versus apolipoprotein A-I and paraoxonase-1 by inflammation in murine hepatocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1806-1813.
- 114 Kumon Y, Nakauchi Y, Suehiro T et al. Proinflammatory cytokines but not acute phase serum amyloid A or C-reactive protein, downregulate paraoxonase 1 (PON1) expression by HepG2 cells. *Amyloid* 2002;9:160-164.
- 115 Feingold KR, Memon RA, Moser AH et al. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 1998;139:307-315.
- 116 Van Lenten BJ, Wagner AC, Navab M et al. Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. *J Biol Chem* 2001;276:1923-1929.
- 117 Kumon Y, Suehiro T, Ikeda Y et al. Human paraoxonase-1 gene expression by HepG2 cells is downregulated by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but is upregulated by interleukin-6. *Life Sci* 2003;73:2807-2815.
- 118 Aviram M, Rosenblat M, Billecke S et al. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999;26:892-904.

- 119 Jaouad L, Milochevitch C, Khalil A. PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. *Free Radic Res* 2003;37:77-83.
- 120 Nguyen SD, Sok DE. Oxidative inactivation of paraoxonase1, an antioxidant protein and its effect on antioxidant action. *Free Radic Res* 2003;37:1319-1330.
- 121 Karabina SA, Lehner AN, Frank E et al. Oxidative inactivation of paraoxonase--implications in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2005;1725:213-221.
- 122 Trudel K, Sinnett D, James RW et al. Iron-ascorbic acid-induced oxidant stress and its quenching by paraoxonase 1 in HDL and the liver: comparison between humans and rats. *J Cell Biochem* 2005;96:404-411.
- 123 Baskol G, Baskol M, Yurci A et al. Serum paraoxonase 1 activity and malondialdehyde levels in patients with ulcerative colitis. *Cell Biochem Funct* 2006;24:283-286.
- 124 Boehm D, Krzystek-Korpacka M, Neubauer K et al. Paraoxonase-1 status in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:93-99.
- 125 Rothem L, Hartman C, Dahan A et al. Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellularly localized to the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med* 2007;43:730-739.
- 126 Krzystek-Korpacka M, Boehm D, Matusiewicz M et al. Paraoxonase 1 (PON1) status in gastroesophageal malignancies and associated paraneoplastic syndromes - connection with inflammation. *Clin Biochem* 2008;41:804-811.



- 127 Farid AS, Nakahara K, Murakami N et al. Decreased serum paraoxonase-1 activity during intestinal nematode (*Nippostrongylus brasiliensis*) infection in rats. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78:770-776.
- 128 Franco-Pons N, Marsillach J, Joven J et al. Serum paraoxonase undergoes inhibition and proteolysis during experimental acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2008;12:891-899.
- 129 Isik A, Koca SS, Ustundag B et al. Decreased total antioxidant response and increased oxidative stress in Behcet's disease. *Tohoku J Exp Med* 2007;212:133-141.
- 130 Kedage V, Muttigi MS, Shetty MS et al. Serum paraoxonase 1 activity status in patients with liver disorders. *Saudi J Gastroenterol* 2010;16:79-83.
- 131 Kowalski J, Pawlicki L, Grycewicz J et al. Plasma antioxidative activity during atorvastatin and fluvastatin therapy used in coronary heart disease primary prevention. *Fundam Clin Pharmacol* 2004;18:93-96.
- 132 Bolayirli IM, Aslan M, Balci H et al. Effects of atorvastatin therapy on hypercholesterolemic rabbits with respect to oxidative stress, nitric oxide pathway and homocysteine. *Life Sci* 2007;81:121-127.
- 133 Tomas M, Senti M, Garcia-Faria F et al. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patient. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2113-2119.
- 134 Harangi M, Seres I, Varga Z et al. Atorvastatin effect on high-density lipoprotein-associated paraoxonase activity and oxidative DNA damage. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;60:685-691.

- 135 Kassai A, Illyes L, Mirdamadi HZ et al. The effect of atorvastatin therapy on lecithin:cholesterol acyltransferase, cholesteryl ester transfer protein and the antioxidant paraoxonase. *Clin Biochem* 2007;40:1-5.
- 136 Deakin S, Leviev I, Guernier S et al. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2083-2089.
- 137 Deakin S, Guernier S, James RW. Pharmacogenetic interaction between paraoxonase-1 gene promoter polymorphism C-107T and statin. *Pharmacogenet Genomics* 2007;17:451-457.
- 138 Ota K, Suehiro T, Arai K et al. Effect of pitavastatin on transactivation of human serum paraoxonase 1 gene. *Metabolism* 2005;54:142-150.
- 139 Arai K, Suehiro T, Ikeda Y et al. Role of protein kinase C in pitavastatin-induced human paraoxonase I expression in Huh7 cells. *Metabolism* 2010.
- 140 Gouedard C, Koum-Besson N, Barouki R et al. Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 2003;63:945-956.
- 141 Nagila A, Permpongpaiboon T, Tantrarongroj S et al. Effect of atorvastatin on paraoxonase1 (PON1) and oxidative status. *Pharmacol Rep* 2009;61:892-898.
- 142 Sardo MA, Campo S, Bonaiuto M et al. Antioxidant effect of atorvastatin is independent of PON1 gene T(-107)C, Q192R and L55M polymorphisms in hypercholesterolaemic patients. *Curr Med Res Opin* 2005;21:777-784.
- 143 Beltowski J, Wojcicka G, Mydlarczyk M et al. The effect of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPARalpha) agonist, fenofibrate, on lipid

- peroxidation, total antioxidant capacity, and plasma paraoxonase 1 (PON 1) activity. *J Physiol Pharmacol* 2002;53:463-475.
- 144 Ackerman Z, Oron-Herman M, Rosenthal T et al. Effects of amlodipine, captopril, and bezafibrate on oxidative milieu in rats with fatty liver. *Dig Dis Sci* 2008;53:777-784.
- 145 Durrington PN, Mackness MI, Bhatnagar D et al. Effects of two different fibric acid derivatives on lipoproteins, cholesteryl ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis* 1998;138:217-225.
- 146 Turay J, Grniakova V, Valka J. Changes in paraoxonase and apolipoprotein A-I, B, C-III and E in subjects with combined familiar hyperlipoproteinemia treated with ciprofibrate. *Drugs Exp Clin Res* 2000;26:83-88.
- 147 Yesilbursa D, Serdar A, Saltan Y et al. The effect of fenofibrate on serum paraoxonase activity and inflammatory markers in patients with combined hyperlipidemia. *Kardiol Pol* 2005;62:526-530.
- 148 Paragh G, Seres I, Harangi M et al. Ciprofibrate increases paraoxonase activity in patients with metabolic syndrome. *Br J Clin Pharmacol* 2006;61:694-701.
- 149 Coll B, van Wijk JP, Parra S et al. Effects of rosiglitazone and metformin on postprandial paraoxonase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human immunodeficiency virus-infected patients with lipodystrophy. *Eur J Pharmacol* 2006;544:104-110.

- 150 van WJ, Coll B, Cabezas MC et al. Rosiglitazone modulates fasting and postprandial paraoxonase 1 activity in type 2 diabetic patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:1134-1137.
- 151 Blatter-Garin MC, Kalix B, De PS et al. Aspirin use is associated with higher serum concentrations of the anti-oxidant enzyme, paraoxonase-1. *Diabetologia* 2003;46:593-594.
- 152 Jaichander P, Selvarajan K, Garelnabi M et al. Induction of paraoxonase 1 and apolipoprotein A-I gene expression by aspirin. *J Lipid Res* 2008;49:2142-2148.
- 153 Saisho Y, Komiya N, Hirose H. Effect of valsartan, an angiotensin II receptor blocker, on markers of oxidation and glycation in Japanese type 2 diabetic subjects: blood pressure-independent effect of valsartan. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;74:201-203.
- 154 Spirou A, Rizos E, Liberopoulos EN et al. Effect of barnidipine on blood pressure and serum metabolic parameters in patients with essential hypertension: a pilot study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2006;11:256-261.
- 155 Noto H, Kawamura M, Hashimoto Y et al. Modulation of HDL metabolism by probucol in complete cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Atherosclerosis* 2003;171:131-136.
- 156 Hong SC, Zhao SP, Wu ZH. Probuco1 up-regulates paraoxonase 1 expression in hepatocytes of hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47:77-81.
- 157 Audikovszky M, Pados G, Seres I et al. [Changes in lipid profile and paraoxonase activity in obese patients as a result of orlistat treatment]. *Orv Hetil* 2001;142:2779-2783.

- 158 Turfaner N, Uzun H, Balci H et al. Ezetimibe therapy and its influence on oxidative stress and fibrinolytic activity. *South Med J* 2010;103:428-433.
- 159 Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V et al. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol Chem* 2006;281:29491-29500.
- 160 Ng CJ, Bourquard N, Hama SY et al. Adenovirus-mediated expression of human paraoxonase 3 protects against the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1368-1374.
- 161 Ng CJ, Hama SY, Bourquard N et al. Adenovirus mediated expression of human paraoxonase 2 protects against the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Mol Genet Metab* 2006;89:368-373.
- 162 Meilin E, Aviram M, Hayek T. Paraoxonase 2 (PON2) decreases high glucose-induced macrophage triglycerides (TG) accumulation, via inhibition of NADPH-oxidase and DGAT1 activity: studies in PON2-deficient mice. *Atherosclerosis* 2010;208:390-395.
- 163 Rosenblat M, Coleman R, Reddy ST et al. Paraoxonase 2 attenuates macrophage triglyceride accumulation via inhibition of diacylglycerol acyltransferase 1. *J Lipid Res* 2009;50:870-879.
- 164 Shamir R, Hartman C, Karry R et al. Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radic Biol Med* 2005;39:336-344.
- 165 Levy E, Trudel K, Bendayan M et al. Biological role, protein expression, subcellular localization, and oxidative stress response of paraoxonase 2 in the

- intestine of humans and rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G1252-G1261.
- 166 Juhas M, Eberl L, Tummler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* 2005;7:459-471.
- 167 Stoltz DA, Ozer EA, Ng CJ et al. Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L852-L860.
- 168 Willcox MD, Zhu H, Conibear TC et al. Role of quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* in microbial keratitis and cystic fibrosis. *Microbiology* 2008;154:2184-2194.
- 169 Horke S, Witte I, Altenhofer S et al. Paraoxonase 2 is down-regulated by the *Pseudomonas aeruginosa* quorumsensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone and attenuates oxidative stress induced by pyocyanin. *Biochem J* 2010;426:73-83.
- 170 Stoltz DA, Ozer EA, Recker TJ et al. A common mutation in paraoxonase-2 results in impaired lactonase activity. *J Biol Chem* 2009;284:35564-35571.
- 171 Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Paraoxonase 2 (PON2) expression is upregulated via a reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH)-oxidase-dependent mechanism during monocytes differentiation into macrophages. *Free Radic Biol Med* 2004;37:2052-2063.
- 172 Fortunato G, Di Taranto MD, Bracale UM et al. Decreased paraoxonase-2 expression in human carotids during the progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:594-600.

- 173 Fuhrman B, Khateeb J, Shiner M et al. Urokinase plasminogen activator upregulates paraoxonase 2 expression in macrophages via an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1361-1367.
- 174 Fuhrman B, Gantman A, Khateeb J et al. Urokinase activates macrophage PON2 gene transcription via the PI3K/ROS/MEK/SREBP-2 signalling cascade mediated by the PDGFR-beta. *Cardiovasc Res* 2009;84:145-154.
- 175 Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. A biphasic U-shape effect of cellular oxidative stress on the macrophage anti-oxidant paraoxonase 2 (PON2) enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349:1094-1099.
- 176 Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is up-regulated by pomegranate juice phenolic anti-oxidants via PPAR gamma and AP-1 pathway activation. *Atherosclerosis* 2007;195:313-321.
- 177 Precourt LP, Seidman E, Delvin E et al. Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1628-1637.
- 178 Boesch-Saadatmandi C, Pospissil RT, Graeser AC et al. Effect of Quercetin on Paraoxonase 2 Levels in RAW264.7 Macrophages and in Human Monocytes--Role of Quercetin Metabolism. *Int J Mol Sci* 2009;10:4168-4177.
- 179 Rosenblat M, Volkova N, Roqueta-Rivera M et al. Increased macrophage cholesterol biosynthesis and decreased cellular paraoxonase 2 (PON2) expression in Delta6-desaturase knockout (6-DS KO) mice: Beneficial effects of arachidonic acid. *Atherosclerosis* 2009.

- 180 Lim JA, Kim SH. Transcriptional activation of an anti-oxidant mouse Pon2 gene by dexamethasone. *BMB Rep* 2009;42:421-426.
- 181 Draganov DI, Stetson PL, Watson CE et al. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000;275:33435-33442.
- 182 Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:542-547.
- 183 Lu H, Zhu J, Zang Y et al. Cloning, purification, and refolding of human paraoxonase-3 expressed in *Escherichia coli* and its characterization. *Protein Expr Purif* 2006;46:92-99.
- 184 Shih DM, Xia YR, Wang XP et al. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ Res* 2007;100:1200-1207.
- 185 Labrecque B, Beaudry D, Mayhue M et al. Molecular characterization and expression analysis of the porcine paraoxonase 3 (PON3) gene. *Gene* 2009;443:110-120.
- 186 Peng W, Jiang X, Haiqin L et al. Protective effects of transgene expressed human PON3 against CCl4-induced subacute liver injury in mice. *Biomed Pharmacother* 2009;63:592-598.
- 187 Shih DM, Xia YR, Yu JM et al. Temporal and Tissue-Specific Patterns of Pon3 Expression in Mouse: In situ Hybridization Analysis. *Adv Exp Med Biol* 2010;660:73-87.



- 188 Belteki G, Kempster SL, Forhead AJ et al. Paraoxonase-3, a Putative Circulating Antioxidant, Is Systemically Up-Regulated in Late Gestation in the Fetal Rat, Sheep, and Human. *J Clin Endocrinol Metab* 2010.
- 189 Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009;46:83-106.

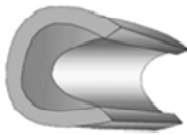
**FIGURE LEGEND****Main functions of human paraoxonases enzymes**

PON1 and PON3 are expressed in a variety of tissues, but are mainly produced by the liver. They are both associated to HDL particles in the blood circulation, where they prevent HDL and LDL oxidation and prevent atherosclerosis. All PONs could have antioxidative and anti-inflammatory functions in various tissues such as liver, intestine, lungs, as well as macrophages and endothelial cells.



### Brain

Link between PON1 polymorphisms and Parkinson's disease



### Blood circulation

- PON1 & PON3 : Transported by HDL in the circulation and prevent LDL and HDL oxidation
- In endothelial cells PON2 functions as an antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic agent.
- In macrophages, PON2 & PON3 demonstrate anti-oxidative and anti-inflammatory effects, as well as promote cholesterol efflux.



### Lungs

Expression of PON1, PON2 & PON3 important for the control of bacterial quorum sensing



### Adipose tissue

Presence of PON3 that regulates adiposity



### Liver

- Synthesis of PON1, PON2 & PON3 that enhance the liver capacity for the anti-oxidative and anti-inflammatory defense
- Detoxification of organophosphate compounds by PON1



### Intestine

Expression of PON1, PON2 & PON3 that display antioxidative and anti-inflammatory effects

### **III-Discussion**

L'intestin est un organe extrêmement complexe aux fonctions multiples. Il doit non seulement veiller à la digestion et l'absorption des nutriments, au transit, à l'entreposage et à l'expulsion des matières fécales, mais il doit également assurer un rôle de surveillance majeur sur toutes les molécules alimentaires et bactérienne. Une dérégulation des ces divers processus qui ont lieu au niveau intestinal peut avoir des conséquences sérieuses pour le corps entier. Par exemple, une "surabsorption" de lipides alimentaires peut entraîner des problèmes cardiovasculaires, ou une réponse immunitaire inappropriée peut générer un état d'inflammation incontrôlée. L'intestin doit donc conserver un état d'homéostasie et maintenir l'équilibre en développant une tolérance envers toutes les molécules potentiellement pathogènes qui y transitent.

La perte d'homéostasie peut entraîner des lésions dans la paroi intestinale et altérer la perméabilité. Une augmentation de la perméabilité et la présence de lésions dans la barrière épithéliale intestinale peuvent faire en sorte que des bactéries ou des antigènes alimentaires se retrouvent dans des endroits inappropriés et déclenchent une réaction inflammatoire intense. Une surcharge de stress oxydant peut être à l'origine de la perte d'homéostasie intestinale et induire la formation de lésions et l'augmentation de la perméabilité, des caractéristiques impliquées dans le déclenchement des MII<sup>42, 138</sup>. Les molécules pro-oxydantes sont nombreuses dans l'intestin. En plus de l'inévitable charge oxydante provenant de la mitochondrie et de la phosphorylation oxydative, de nombreuses molécules pro-oxydantes peuvent provenir de la diète<sup>158</sup>, des cellules immunitaires<sup>177</sup> ou être générées

par la flore intestinale<sup>392</sup>. Il est donc essentiel que l'intestin puisse se défendre adéquatement face à ce stress oxydant et les molécules antioxydantes provenant de la diète ainsi que de nombreuses enzymes antioxydantes endogènes doivent se charger de faire ce travail.

Parmi les différentes enzymes antioxydantes présentes dans l'intestin, les paraoxonases (PON) 1, 2 et 3 pourraient jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Elles ont un fort potentiel antioxydant démontré principalement dans la circulation sanguine et leur présence a été détectée en 2005 dans plusieurs segments du tube digestif humain<sup>184</sup>. Cependant, les connaissances sur les PON et l'intestin ne sont pas très abondantes, même si certains de leurs polymorphismes ont été identifiés comme facteurs de risque potentiels des MII<sup>261, 393</sup>. De plus, l'activité de PON1 semble être abaissée dans le sang chez les patients atteints de colite ulcéreuse<sup>394</sup> ou de maladie de Crohn<sup>395</sup>. Finalement, quelques données indiquent que l'expression génique de PON1 et PON3 serait diminuée dans des biopsies intestinales de patients atteints de MII<sup>396</sup>.

Dans ce projet de recherche, l'hypothèse que chacune des PON puisse être modulée par le stress oxydatif et des conditions pro-inflammatoires a été émise. Les fonctions et la régulation des PON au niveau intestinal ont donc été évaluées. Les PON pourraient être impliquées dans le maintien de la défense antioxydante et d'un niveau d'inflammation contrôlé, ce qui assurerait la protection de la barrière épithéliale intestinale. Comme ces composantes sont majeures dans la pathogenèse et l'étiologie des maladies inflammatoires

de l'intestin, les PON pourraient s'avérer être des enzymes antioxydantes de grande envergure pour le maintien de l'homéostasie intestinale et la prévention du développement des MII.

La revue de littérature réalisée durant le projet de doctorat a permis d'analyser critiqueusement et en profondeur les différentes fonctions attribuées aux PON et les conditions physiologiques de même que les molécules pharmacologiques et nutritionnelles contrôlant leur expression. Ceci était absolument nécessaire afin de bien cibler les molécules pouvant avoir un impact régulateur sur l'expression des PON dans les cellules intestinales Caco-2/15.

La revue de littérature a permis de mettre en lumière la disproportion très importante favorisant la régulation de PON1 par le grand nombre de publications répertoriées. Même pour PON1, l'information n'est cependant pas complète puisque seule l'activité a été fréquemment utilisée pour évaluer l'effet d'un aliment, d'un processus physiologique ou d'une molécule pharmacologique sur le statut de PON1. Par contre, plusieurs études ont généré des plasmides contenant la séquence promotrice de PON1 jumelée au gène de la luciférase<sup>358, 359, 360</sup>. Ceci est fort intéressant puisqu'une telle construction permet d'évaluer l'impact d'un effecteur sur l'activité du promoteur de PON1 et donc son expression génique.

La littérature traitant de PON2 et de PON3 est par contre peu abondante, tant au niveau de leurs fonctions potentielles que dans leur régulation. Pourtant, ces enzymes ont un potentiel antioxydant tout aussi intéressant que celui de PON1, et PON2 pourrait être impliquée dans davantage de processus physiologiques ou pathologiques en raison de son caractère ubiquitaire<sup>232</sup>. De plus, la régulation des trois PON est rarement évaluée conjointement. La plupart du temps, chaque PON est étudiée séparément et ce malgré le fait qu'elles partagent plus de 60% d'homologie au niveau de leur séquence codante<sup>182</sup> en plus d'avoir la capacité d'hydrolyser plusieurs des mêmes substrats<sup>196, 202</sup>. Leur régulation pourrait se produire de façon similaire ou la modulation d'une PON pourrait possiblement influencer l'expression des deux autres. Dans le présent projet de doctorat, la régulation des trois PON a été évaluée conjointement et lorsque l'expression de PON2 a été invalidée dans les cellules Caco-2/15, l'expression de PON1 et PON3 a été analysée afin de vérifier si un phénomène compensatoire était mis en place par la cellule, les autres PON pouvant potentiellement compenser la perte de PON2.

Au niveau de la régulation des PON, les points principaux à retenir de la revue de littérature sont nombreux. L'étude de la régulation de PON1 est importante puisque celle-ci a des effets préventifs démontrés face au développement de l'athérosclérose et un grand potentiel comme enzyme antioxydante. Cependant, les polymorphismes de PON1 seraient responsables de près de 60% de la variation interindividuelle dans l'activité de PON1<sup>266</sup>. Ceci suggère pratiquement que l'activité de PON1 ne peut être modulée et qu'elle est pré-déterminée chez chaque individu en fonction de son génotype. Pourtant, l'ensemble de la

revue de littérature sur la régulation de PON1 démontre clairement qu'adopter de saines habitudes de vie favorise une activité de PON1 élevée. Par exemple, la consommation d'aliments contenant de grandes quantités de molécules antioxydantes, comme le vin rouge<sup>297</sup> ou le jus de pomme-grenade<sup>299</sup>, semble augmenter l'activité de PON1. De plus, les individus actifs physiquement ont une activité de PON1 plus élevée<sup>332, 333</sup>, alors qu'elle est diminuée chez les gens obèses<sup>334, 335</sup>. Il est donc clair que PON1 est une enzyme modulable par les facteurs environnementaux qui pourraient se combiner à la génétique pour déterminer son niveau d'activité.

Les effets bénéfiques des nutriments antioxydants sur PON1 pourraient s'expliquer par une protection conférée à l'enzyme. En effet, il a été démontré que PON1 est inactivée par le stress oxydant. Elle pourrait donc agir comme enzyme antioxydante en se sacrifiant pour exercer ses effets<sup>343</sup>. Il est possible que PON2 et PON3 agissent de la même façon, mais aucune étude n'a détaillé de manière aussi précise le mode d'action de ces deux enzymes. De plus, il a été démontré que de nombreuses conditions pathologiques impliquant une réaction inflammatoire ou un stress oxydant affectent les PON<sup>348-351</sup>. Le fait que PON1 soit régulée en présence de stress oxydant et d'inflammation dans différents systèmes suggère par contre qu'elle est impliquée dans ces processus très importants dans le déclenchement des MII, ce qui justifie l'étude de la régulation de PON1 dans la cellule intestinale.

Le statut de PON1 semble aussi lié étroitement à la qualité du profil lipidique des individus. Il est donc logique que la qualité de l'alimentation, et particulièrement des lipides



consommés, affecte le statut de PON1. Les niveaux d'activité et de la masse protéique de PON1 sont d'ailleurs corrélés avec les niveaux de HDL et d'apo A-I<sup>320, 321</sup>. Les acides gras polyinsaturés oméga-3, qui ont démontré des effets anti-inflammatoires, pourraient s'avérer bénéfiques pour les patients souffrant d'une MII<sup>421</sup>. Les effets des acides gras polyinsaturés linoléique, linoléique, éicosapentaénoïque et docosahexaénoïque ont donc été administrés individuellement aux cellules Caco-2/15 afin d'évaluer leur impact sur l'expression des PON. Malheureusement, aucun de ces acides gras polyinsaturés n'a démontré le potentiel de réguler de manière intéressante PON1, PON2 ou PON3 (résultats non-présentés).

La pharmacologie peut aussi s'avérer un moyen intéressant de réguler l'expression et l'activité des PON. Le sujet a été le plus largement exploré pour PON1, alors que les statines<sup>354-357</sup> et les agonistes de PPAR<sup>362, 367, 372, 373</sup> ont démontré dans la plupart des cas la capacité d'augmenter l'expression et l'activité de PON1. Le sujet a été peu étudié pour PON2, mais les agonistes PPAR $\gamma$  ont aussi augmenté son expression génique<sup>237</sup>. L'impact de molécules pharmacologiques sur PON3 n'a cependant pas été évalué. Les statines ont des effets bénéfiques pour la santé cardiovasculaire par la réduction du cholestérol sanguin, mais leur importance au niveau intestinal est peu connue<sup>422</sup>. Par contre, les PPAR pourraient être impliqués dans les MII. En effet, la surexpression ou l'activation de PPAR $\gamma$ <sup>423-425</sup> ou PPAR $\alpha$ <sup>426</sup> ont démontré des effets protecteurs dans les modèles animaux de colite inflammatoire. L'impact d'agonistes PPAR $\alpha$  et  $\gamma$  sur l'expression des trois PON a donc été déterminé dans la cellule intestinale.

La littérature est malheureusement beaucoup moins abondante en général sur PON2 et PON3 en comparaison à PON1. Plusieurs des traitements sélectionnés pour évaluer la régulation des trois PON dans la cellule intestinale sont basés sur les connaissances sur PON1. La grande majorité des études portant sur la régulation de PON2 ont été faites dans les macrophages. Ces études ont tout de même permis de montrer qu'elle est régulée par le stress oxydant et l'inflammation<sup>235, 236, 382</sup>. Certains articles montrent même une augmentation de son expression dans ces conditions<sup>235, 236, 382</sup>, ce qui suggère que PON2 pourrait faciliter le retour à l'équilibre de la balance pro-/antioxydante, ce qui serait d'une importance capitale au niveau intestinal. Comme PON1, PON3 semble aussi réduite par le stress oxydant, mais les études sont très peu nombreuses<sup>236, 237</sup>. Malgré tout, il serait crucial de l'investiguer au niveau intestinal.

Très peu de mécanismes d'action ont été élucidés pour expliquer la régulation des PON. L'implication du facteur de transcription NF- $\kappa$ B a été démontrée dans la diminution de l'expression de PON1<sup>338</sup>. L'activation des facteurs de transcription PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  semble affecter de façon positive l'expression de PON1 et PON2<sup>237, 354-357, 362, 367, 372, 373</sup>. Le facteur de transcription AP-1, sensible au niveau de stress oxydant, serait lui aussi impliqué dans la régulation de l'expression de PON2<sup>235</sup>. Les phénomènes importants agissant sur l'activité ou l'expression des PON semblent donc être représentés par l'inflammation et le stress oxydant, faisant promouvoir l'activation des facteurs de transcription tels que les PPAR qui pourraient produire des effets bénéfiques. Pour étudier la régulation des PON au

niveau de la cellule intestinale, ce sont donc les facteurs qui ont été priorisés, car ils ont en plus une certaine implication dans les MII.

La régulation des PON a donc été largement analysée, mais la très grande majorité des études porte sur PON1. De plus, très peu d'entre elles ont considéré l'intestin comme un organe dans lequel les PON pourraient être étroitement régulées ou avoir des effets bénéfiques. En fait, le groupe de recherche des Dr Aviram et Shamir a été le premier et seul à fournir des informations pertinentes quant aux PON dans l'intestin<sup>184</sup> et lors de MII<sup>396</sup>. Lors de la mise en place du projet de doctorat au sein de l'équipe du Dr Levy, la régulation des PON au niveau de l'intestin avait été très peu évaluée et leurs rôles y étaient tout à fait inconnus.

Avant de débiter l'étude, il fallait confirmer la présence des PON dans les cellules intestinales Caco-2/15, qui allaient être utilisées tout au long du projet. Les réactions de PCR ont révélé la présence de l'ARNm de PON1, PON2 and PON3 dans les cellules Caco-2/15. Cependant, les réactions de PCR conventionnelles ne pouvaient pas détecter la présence de PON1 et des réactions de « OneStep RT-PCR » (transcription inverse et PCR faites en même temps, avec des amorces spécifiques à PON1) ont dû être utilisées afin de détecter l'expression génique de PON1. Ceci suggère que PON1 est exprimée dans ces cellules intestinales, mais en très faible quantité. Ceci est confirmé par le fait que seules les expressions protéiques de PON2 et PON3 ont pu être détectées dans les lysats cellulaires de Caco-2/15. Afin de s'assurer de l'absence de PON1 dans les cellules Caco-2/15, de grandes

quantités d'homogénats cellulaires ont été immunoprécipités avec l'anticorps anti-PON1, mais la présence de PON1 n'a pas pu être détectée par immunobuvardage. La validité de l'anticorps utilisé pour détecter la présence de PON1 a pourtant été démontrée dans des échantillons de foie de rats, le foie étant le principal organe exprimant PON1, et dans lesquels une détection nette de PON1 a pu être obtenue. De plus, des études antérieures du groupe de recherche du Dr Levy ont pu détecter la présence de PON1 dans les particules de HDL à l'aide de ce même anticorps<sup>347</sup>. En fin de compte, des échantillons d'intestins humains et de rats analysés n'avaient pas davantage révélé la présence de la protéine de PON1<sup>347</sup>. Ces résultats sont donc contraires aux données de Shamir et ses collaborateurs, les premiers à identifier la présence des PON dans l'intestin<sup>184</sup>. Des différences dans les procédures expérimentales pourraient expliquer ces résultats contradictoires.

Le stress oxydant est omniprésent au niveau intestinal et il a été démontré que les PON pouvaient être régulées par le stress oxydant dans différents tissus. De plus, il a été suggéré que les PON puissent agir au niveau intestinal en tant qu'enzymes antioxydantes ou anti-infectieuses via leur capacité à hydrolyser des molécules de quorum sensing<sup>184</sup>. Les effets du stress oxydant sur l'expression des PON dans la cellule intestinale ont donc été évalués. Tel qu'attendu, l'incubation de cellules Caco-2/15 avec le Fe/Asc a fortement augmenté les niveaux de MDA, démontrant l'induction de la peroxydation lipidique. Le stress oxydant induit par le Fe/Asc a aussi réduit l'expression génique des trois PON de même que la masse protéique de PON2. L'expression protéique de PON3 n'a pas été affectée. Lorsque les cellules étaient traitées avec des antioxydants puissants comme le BHT ou le Trolox en

même temps qu'avec le Fe/Asc, la diminution de l'expression génique des PON et de l'expression protéique était moindre, démontrant que le stress oxydant était bel et bien responsable des modulations observées. Ces observations suggèrent que les PON pourraient avoir des rôles antioxydants à jouer au niveau intestinal. PON2 semble particulièrement importante puisqu'elle est régulée au niveau génique et protéique. PON1 et PON3 sont régulées seulement au niveau génique et la protéine de PON1 n'a pas pu être détectée. Malgré tout, les PON pourraient aider à maintenir l'homéostasie intestinale et l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale.

Les bactéries Gram-négatives constituent la principale source d'endotoxines dans la flore intestinale<sup>427</sup>. Les LPS composent ces endotoxines et sont de puissants stimulants de la réponse inflammatoire. En effet, s'ils viennent en contact avec la paroi intestinale, ils sont reconnus par leurs récepteurs membranaires, le CD14 et le TLR4, et induisent la production de cytokines pro-inflammatoires via l'activation du facteur de transcription NF-κB et attirent quantité de neutrophiles, monocytes et macrophages au site inflammatoire<sup>427, 428</sup>. Les LPS sont des régulateurs très puissants, qui en plus d'augmenter la production de cytokines pro-inflammatoires dans les entérocytes<sup>429</sup>, peuvent aussi induire la prolifération cellulaire<sup>430</sup> et moduler le métabolisme énergétique<sup>431</sup>. Dans les MII, il a été observé que des quantités plus importantes de bactéries de l'espèce *Escherichia coli*, des bactéries Gram-négatives qui produisent des LPS, étaient présentes au niveau de la flore intestinale en comparaison à des individus sains<sup>432</sup>. Ceci suggère que les LPS pourraient jouer un rôle dans le déclenchement et la perpétuation de la réaction immunitaire dans l'intestin. De plus,

plusieurs études ont démontré que l'expression des PON pouvait être altérée en situation inflammatoire<sup>338-340, 387</sup>. Donc, l'expression génique et protéique des PON a été analysée suite au traitement des cellules Caco-2/15 par les LPS. Les effets des LPS sur l'expression des PON dépendaient de la concentration utilisée. En effet, une concentration de 200 µg/ml, supra-physiologique, diminuait l'expression génique de PON1 et PON3, mais n'avait aucun effet sur PON2. Cependant, une concentration physiologique de 50 µg/ml augmentait l'expression génique de PON2 et avait des effets plus modestes sur la diminution de PON1 et PON3. Par contre, en ce qui a trait à l'expression protéique de PON2, chacune des concentrations de LPS utilisées l'a fortement diminuée. Quant à l'expression protéique de PON3, elle n'était pas modulée significativement. Afin d'analyser la corrélation dans l'expression génique et protéique des PON, les cellules Caco-2/15 ont été traitées aux LPS durant des temps courts, soit 1h et 4h. L'expression génique de PON1 était diminuée significativement après 4h de traitement, alors que l'expression de PON3 n'était pas modulée à ces différents temps. Quant à PON2, son expression génique n'est pas affectée par un traitement à une concentration de 200 µg/mL de LPS, et sa masse protéique semble diminuer après 24h seulement.

Pour comprendre les mécanismes et les facteurs de transcription impliqués dans la régulation intestinale des PON par les LPS, des expériences ont été entreprises pour caractériser l'expression de cytokines inflammatoires et l'activation du NF-κB. L'activation du facteur de transcription NF-κB initie une cascade d'événements pro-inflammatoires. Elle se produit lorsque son inhibiteur naturel IκB est dégradé par le protéasome, ce qui

permet à NF- $\kappa$ B d'être transloqué vers le noyau et d'y moduler l'expression de ses gènes cibles<sup>433</sup>. À la suite d'un traitement aux LPS dans les cellules Caco-2/15, l'expression protéique d' I $\kappa$ B $\alpha$  et de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B ont été analysées. Les LPS activent le NF- $\kappa$ B et déclenchent une réaction pro-inflammatoire, tel que démontré par la réduction de l'expression protéique d' I $\kappa$ B $\alpha$  et l'augmentation du ratio NF- $\kappa$ B/ I $\kappa$ B $\alpha$ . La dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  suggère que le NF- $\kappa$ B est relâché et peut pénétrer le noyau pour y induire ou réprimer l'expression de gènes cibles. Ceci a été confirmé par l'analyse de l'expression génique du TNF- $\alpha$ , une cible classique de NF- $\kappa$ B, qui était fortement augmentée par le LPS.

Afin de vérifier si le NF- $\kappa$ B était impliqué dans la régulation intestinale des PON par les LPS, un inhibiteur spécifique a été utilisé, le CAPE<sup>416, 417</sup>. L'efficacité du CAPE pour inhiber le NF- $\kappa$ B a été démontrée par la réduction de l'expression du TNF- $\alpha$  de près de 50% suite à un traitement aux LPS. En ce qui a trait à la régulation des PON, l'ajout de CAPE lors du traitement des cellules Caco-2/15 aux LPS a complètement aboli la réduction de l'expression génique de PON1 et PON3. De plus, l'expression protéique de PON2 était partiellement rétablie lors de l'ajout de CAPE. Cependant, lorsqu'une combinaison de CAPE et de l'antioxydant Trolox était ajoutée au traitement aux LPS, le niveau d'expression protéique de PON2 se rapprochait encore plus de la normale. Ces résultats suggèrent que le NF- $\kappa$ B prend part à la régulation de l'expression des PON en situation inflammatoire. De plus, l'inhibition de NF- $\kappa$ B et les antioxydants semblent aider à

maintenir le niveau d'expression des PON en situation inflammatoire induite par les LPS au niveau intestinal, et pourrait s'avérer bénéfique pour la prévention des dommages intestinaux.

L'intestin est une source importante de cytokines qui peuvent avoir des effets locaux ou systémiques<sup>434</sup>. Dans la maladie de Crohn, la production intestinale de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  est décuplée<sup>435</sup>. Les effets des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ , qui induisent une réaction pro-inflammatoire dans les cellules épithéliales intestinales, sur l'expression des PON ont été évalués. Comme pour l'inflammation induite par les LPS, les cellules Caco-2/15 traitées avec du TNF- $\alpha$  ont montré une réduction de l'ARNm de PON1 et PON3. Quant à PON2, une augmentation significative de son expression génique a été observée pour les doses de TNF- $\alpha$  utilisées, tout comme lors de l'utilisation d'une concentration physiologique de LPS. L'expression génique de PON2 ne corrélait pas avec son expression protéique, puisque la masse protéique était encore une fois réduite suivant le traitement au TNF- $\alpha$ . Des résultats similaires ont été obtenus avec l'IFN- $\gamma$ .

Le fait que PON3 semble régulée strictement au niveau génique en situation de stress oxydant ou d'inflammation et qu'aucun changement significatif ne soit observé au niveau protéique suggère que PON3 n'est pas une enzyme très importante dans ces processus au niveau intestinal. Le manque de corrélation entre l'expression génique et protéique de PON2 en situation inflammatoire au niveau intestinal pourrait s'expliquer par la mise en



place d'un mécanisme compensatoire, l'expression génique étant possiblement augmentée pour contrer l'inflammation et combler la perte de la masse protéique, ce qui a déjà été suggéré pour d'autres protéines<sup>436</sup>. Cependant, il est possible que PON2 agisse en tant qu'enzyme antioxydante et anti-inflammatoire au niveau intestinal, mais qu'elle soit sacrifiée en réalisant ses actions, comme il a été proposé pour PON1<sup>344, 345</sup>. Ceci pourrait aussi expliquer que l'ARNm de PON2 soit augmenté alors que la masse protéique diminue. Finalement, il est possible que des modifications post-transcriptionnelles ou post-translationnelles soient responsables de ces observations. Des études supplémentaires seront nécessaires pour clarifier le mécanisme d'action de PON2 et expliquer l'incongruité entre les niveaux d'ARNm et de protéine en situation inflammatoire dans les cellules intestinales.

Les PPAR sont des récepteurs nucléaires qui contrôlent l'expression de nombreux gènes dont certains sont impliqués dans la réaction inflammatoire<sup>437</sup>. Les PPAR peuvent en effet diminuer l'activation de NF- $\kappa$ B. Le PPAR $\gamma$  est fortement exprimé dans l'intestin et pourrait donc y tenir un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire<sup>438, 439</sup>. De plus, l'activation de PPAR $\alpha$  et  $\gamma$  a montré dans différents modèles la capacité d'augmenter l'expression génique de PON1 et PON2<sup>237, 362, 440</sup>. Les effets de la rosiglitazone, un agoniste PPAR $\gamma$ , et du WY-14643, un agoniste PPAR $\alpha$ , sur l'expression des PON ont été évalués. L'expression génique de PON1 et PON3 a été augmentée significativement mais faiblement par la rosiglitazone, mais aucun effet n'a été observé sur PON2. L'agoniste PPAR $\alpha$  n'a quant à lui eu aucun effet sur l'expression génique des PON. De plus, la masse

protéique de PON2 et PON3 demeurait inchangée suite au traitement avec la rosiglitazone ou avec le WY-14643. Il est connu que les agonistes PPAR $\gamma$  peuvent inhiber la réponse épithéliale inflammatoire<sup>441</sup>, aider à prévenir l'apparition des symptômes dans les MII<sup>442</sup> et améliorer les conséquences de l'induction expérimentale de colite inflammatoire dans les modèles animaux<sup>425</sup>. Cependant, la réponse limitée des PON aux agonistes PPAR suggère que les bienfaits dus à l'activation des PPAR ne semblent pas liés à l'augmentation de l'expression des PON.

L'étude de la régulation des PON dans les cellules Caco-2/15 a permis de mettre en lumière une modulation différentielle de chacune des PON. Au niveau génique, l'expression de PON2 était augmentée par l'inflammation, alors qu'elle était diminuée pour PON1 et PON3. De plus, seules PON1 et PON3 étaient régulées par l'activation du PPAR $\gamma$ . Ceci suggère que chacune des PON pourrait avoir des fonctions distinctes au niveau intestinal. De plus, seule PON2 était régulée au niveau de sa masse protéique et le manque de corrélation entre son expression génique et protéique peut suggérer un phénomène compensatoire pour lutter contre l'inflammation et tenter de rétablir l'homéostasie. Le fait que les PON soient régulées en conditions inflammatoires ou de stress oxydant suggère que celles-ci pourraient être impliquées dans ces processus au niveau intestinal. Elles pourraient donc être importantes pour la protection de la muqueuse intestinale et prévenir le déclenchement d'une MII ou prévenir les périodes de rechute.

Parmi les trois PON, PON2 semble définitivement la plus intéressante et celle avec le plus de potentiel au niveau intestinal. La présence de la forme protéique de PON1 n'a pu être identifiée dans les cellules Caco-2/15 et PON3 est régulée seulement au niveau génique. Quant à elle, PON2 est régulée au niveau génique et protéique par le stress oxydant et l'inflammation dans les cellules Caco-2/15. De plus, son expression protéique ne corrèle pas avec son expression génique suite à l'induction d'inflammation. Ces résultats suggèrent un rôle anti-inflammatoire et antioxydant potentiel pour PON2. Les fonctions de PON2 au niveau intestinal ont donc été caractérisées plus en profondeur.

Des tissus intestinaux humains ont été prélevés de fœtus suite à un avortement et d'humains âgés entre 50 et 60 ans lors de procédures chirurgicales au niveau intestinal. La présence de PON2 dans différents fragments intestinaux de même que dans diverses fractions cellulaires a ainsi pu être caractérisée. Des échantillons intestinaux provenant de rats ont aussi été utilisés. Peu importe la provenance des tissus étudiés, la forme protéique de PON2 a été détectée tout au long de l'intestin, soit dans le duodénum, le jéjunum, l'iléon, le côlon proximal et le côlon distal. La distribution de PON2 était presque équivalente dans tous ces segments, mais elle était légèrement prédominante au niveau du jéjunum. De même, sa présence a été localisée par microscopie électronique dans divers compartiments cellulaires, comme le réticulum endoplasmique, la mitochondrie, le noyau, et sa présence a aussi été identifiée dans les microvillosités et la membrane basolatérale. Des fractions cellulaires ont aussi été préparées à partir d'échantillons intestinaux, et la présence de PON2 dans les divers compartiments cellulaires nommés ci-dessus a été confirmée, avec une

prédominance dans les microsomes. Des microsomes de jéjunum de rats, d'humains et d'intestins proximaux fœtaux ont été isolés et soumis à un stress oxydant induit par le Fe/Asc. Dans tous les cas, le stress oxydant a significativement réduit la masse protéique de PON2 et les niveaux étaient rétablis suite à l'ajout d'antioxydants comme le BHT, le Trolox ou le N-acétylcystéine. Des résultats similaires ont été obtenus à l'aide des cellules Caco-2/15. En plus de localiser PON2 dans différents organelles, ces résultats confirment donc la présence de PON2 dans l'intestin et sa régulation en situation de stress oxydant.

Afin de mieux caractériser le potentiel antioxydant de PON2 dans la cellule intestinale, la protéine de PON2 purifiée a été ajoutée dans des cellules Caco-2/15 perméabilisées à la digitonine. De cette manière, la masse protéique de PON2 était près de trois fois supérieure à celle retrouvée dans les cellules contrôles. Lorsque ces cellules ont été soumises à un stress oxydant induit par le Fe/Asc, elles semblaient partiellement protégées puisque les niveaux de peroxydation lipidique, déterminés par la mesure du MDA, étaient abaissés. Ceci démontre que PON2 peut agir en tant qu'antioxydant dans la cellule épithéliale intestinale et aider à prévenir les dommages.

Une caractérisation plus en profondeur des fonctions antioxydantes et anti-inflammatoires de PON2 dans la cellule intestinale a ensuite été entreprise. Pour ce faire, l'inactivation de l'expression de PON2 a été réalisée dans les cellules Caco-2/15 à l'aide de lentivirus contenant des ARNi anti-PON2. Les cellules sont infectées par ces lentivirus et les ARNi qu'ils contiennent mènent à la dégradation de l'ARNm de PON2. De cette façon,

l'expression génique et protéique de PON2 était réduite de plus de 80% dans les cellules Caco-2/15. L'utilisation de ce modèle a permis de déterminer l'impact de l'absence de PON2 sur l'intégrité cellulaire, la différenciation et l'établissement des jonctions serrées, sur la réponse antioxydante endogène, sur la susceptibilité de la cellule face à un stress oxydant et sur l'intensité de la réponse inflammatoire. Les phénomènes étudiés sont tous en lien avec le développement et la pathogenèse des MII et permettront d'analyser l'impact potentiel de PON2 dans ces maladies et pour le maintien de l'homéostasie intestinale.

PON2 est considérée comme une enzyme antioxydante, mais très peu d'évidences existent pour le démontrer. PON2 a été surexprimée dans les cellules HeLa et a démontré la capacité de réduire le stress oxydant induit par le  $H_2O_2$ <sup>232</sup>. Dans des cellules vasculaires soumises à un stress oxydant, une forte réduction des niveaux de radicaux libres a été observée lorsque PON2 était surexprimée. Quant à elle, l'invalidation de PON2 dans ces mêmes conditions augmentait les niveaux de radicaux libres<sup>238</sup>. De plus, les modèles animaux de souris surexprimant ou déficientes en PON2 ont montré respectivement une défense antioxydante améliorée ou affaiblie, ce qui a été étudié au niveau de l'athérosclérose<sup>239-242</sup>. Le potentiel antioxydant de PON2 a donc été peu étudié et se concentre principalement sur la santé cardiovasculaire et la prévention de l'athérosclérose.

Cependant, PON2 est une protéine ubiquitaire et pourrait avoir des rôles à jouer dans plusieurs organes et a notamment été identifiée tout au long du tube digestif<sup>184</sup>. Les travaux présentés précédemment ont aussi montré qu'elle était régulée en conditions inflammatoires

ou oxydantes dans les cellules intestinales Caco-2/15 et l'addition de PON2 purifiée à ces mêmes cellules semblait les protéger face à l'induction d'un stress oxydant. PON2 pourrait donc avoir d'importantes fonctions antioxydantes et anti-inflammatoires dans l'intestin. Pour ces raisons, l'expression de PON2 a été invalidée de plus de 80% dans les cellules Caco-2/15 afin d'éclaircir ses fonctions. Après avoir généré ce modèle de façon répétée, il fallait vérifier l'intégrité des cellules Caco-2/15 dont le gène de PON2 avait été invalidé et comparer à celles de cellules non-infectées et infectées avec un vecteur vide (Mock). La forte réduction de l'expression de PON2 n'a pas semblé affecter l'intégrité cellulaire, puisque l'expression de la villine<sup>407</sup> et de la sucrase-isomaltase<sup>408</sup>, des marqueurs de différenciation, et de la E-cadhérine<sup>410</sup>, un marqueur de jonctions serrées n'était pas modulée. Ceci démontre aussi que l'infection en elle-même ne semble pas affecter le processus de différenciation cellulaire et la mise en place des jonctions serrées, ce qui valide l'utilisation du modèle.

PON2 fait partie de la famille des PON, qui est aussi composée de PON1 et PON3<sup>182</sup>. Les PON ont plusieurs substrats communs<sup>196, 197, 250</sup> et ont toutes un grand potentiel antioxydant<sup>192, 239, 254</sup>. Suite à la forte réduction de PON2 obtenue, l'expression de PON1 et PON3 a été analysée car elles pourraient être modulées pour compenser la perte de PON2. Cependant, l'expression génique de PON1 et PON3 est demeurée inchangée dans les cellules dont l'ARNm de PON2 avait été invalidé.

L'expression des autres enzymes antioxydantes endogènes pourrait elle aussi être augmentée afin de compenser pour la perte de PON2. L'équilibre doit être maintenu dans la balance antioxydante et les différentes enzymes doivent agir de manière coordonnée. Dans les cellules invalidées pour PON2, l'expression génique de SOD-1 et SOD-3 était augmentée suite à un stress oxydant induit par le Fe/Asc. Cependant, l'activité SOD totale était augmentée de manière équivalente dans les groupes des cellules invalidées pour PON2 et Mock. La G-Px, joueur important de la deuxième ligne de défense antioxydante, était aussi augmentée dans les deux groupes, au niveau de l'expression génique et de l'activité à la suite de l'induction d'un stress oxydant. Par contre, l'expression et l'activité de la CAT étaient fortement diminuées dans le groupe des cellules invalidées pour PON2, même dans les conditions basales sans stress oxydant, générant ainsi un déséquilibre dans la défense antioxydante. Dans les cellules épithéliales intestinales prélevées chez des patients atteints de la maladie de Crohn, un débalancement similaire a déjà été observé<sup>143</sup>. De plus, la surexpression des SOD, si elle n'est pas jumelée à un ajustement de la deuxième ligne de défense, peut être dommageable en raison d'une accumulation de peroxydes<sup>142</sup>, ce qui peut contribuer au développement des MII<sup>140</sup>.

Le débalancement observé dans la deuxième ligne de défense antioxydante dans les cellules invalidées pour PON2 pourrait générer une augmentation des concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ce prooxydant a donc été mesuré dans le milieu de culture de ces cellules en conditions basales, ce qui a révélé une augmentation significative en comparaison des cellules Mock. Dans l'intestin, des concentrations élevées de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peuvent entraîner des dommages

importants. En effet, des lavements au  $H_2O_2$  étaient utilisés autrefois pour déloger les fécalomes<sup>42</sup>, mais ceci a entraîné des saignements et des symptômes similaires au MII chez certains individus prédisposés<sup>136-138</sup>. Le  $H_2O_2$  peut aussi réagir avec le fer via la réaction de Fenton et générer le très dommageable radical hydroxyle<sup>443</sup>.

En présence de concentrations élevées de  $H_2O_2$  qui n'est pas pris en charge et hydrolysé, la peroxydation lipidique peut être plus importante<sup>144</sup>. L'estimation de la peroxydation lipidique a été obtenue par la mesure des niveaux de MDA dans le milieu de culture. Les niveaux de MDA mesurés dans les lysats cellulaires ou le milieu de culture donnent généralement une information équivalente<sup>401, 413, 414</sup>, mais ils sont plus élevés dans le milieu de culture, ce qui facilite la détection et augmente la précision et la spécificité de l'analyse. L'induction de stress oxydant par le Fe/Asc a fortement augmenté les niveaux de MDA dans les cellules invalidées pour PON2 et les Mock, mais il était significativement plus élevé dans les cellules déficientes en PON2. Ces résultats suggèrent que l'absence de PON2 crée un déséquilibre dans la réponse antioxydante et mène à des dommages cellulaires plus importants dans la cellule intestinale.

La mesure du ratio GSH/GSSG est utilisée comme un indicateur fiable de l'état oxydatif de la cellule<sup>107</sup>. Dans des conditions pro-oxydantes, la concentration du GSSG est augmentée et le ratio GSH/GSSG se trouve ainsi abaissé. Dans les cellules déficientes en PON2, le ratio GSH/GSSG se trouvait abaissé suite à l'induction d'un stress oxydant, en comparaison aux cellules Mock. Ceci suggère que les cellules sont fragilisées face à un stress oxydant



en absence de PON2. L'enzyme G-Réd est importante pour le maintien du ratio GSH/GSSG, puisqu'elle est responsable de régénérer le GSH à partir du GSSG<sup>104</sup>. D'ailleurs, dans les cellules invalidées pour PON2, l'expression génique de la G-Réd était augmentée par le stress oxydant, possiblement pour tenter de compenser la réduction du ratio GSH/GSSG.

Le stress oxydant et la peroxydation lipidique peuvent affecter sérieusement la fluidité membranaire et compromettre la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale. Ceci peut avoir de graves répercussions dans le déclenchement des MII, puisque les bactéries présentes dans la flore intestinale ou les antigènes alimentaires peuvent alors pénétrer dans la paroi intestinale et déclencher une réaction inflammatoire incontrôlée<sup>42</sup>. Les jonctions serrées sont des composantes essentielles de la barrière épithéliale intestinale et sont affectées par des conditions pro-inflammatoires<sup>161-164</sup>. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut lui aussi avoir des effets délétères sur les jonctions serrées<sup>163</sup>. Dans les cellules Caco-2/15 invalidées pour PON2 traitées au Fe/Asc, l'expression génique de la E-cadhérine était réduite en comparaison aux cellules Mock. Ceci suggère que la perméabilité intestinale est altérée en absence de PON2, ce qui pourrait faciliter le déclenchement d'une réaction inflammatoire.

Le stress oxydant et l'inflammation sont deux phénomènes étroitement liés et ont chacun une importance capitale dans les MII. Des changements importants dans la réponse antioxydante ont été observés dans les cellules déficientes en PON2, la réponse inflammatoire a donc été analysée. Un certain potentiel antioxydant a déjà été démontré

pour PON2. Lorsque des macrophages isolés de souris déficientes en PON2 étaient traités avec des LPS, l'expression génique du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  était plus élevée que celle de macrophages prélevés chez des souris contrôles<sup>239</sup>. Dans les cellules Caco-2/15 invalidées pour PON2, l'expression génique du TNF- $\alpha$  était significativement plus élevée que chez les cellules Mock en conditions basales. De plus, lors de l'induction de stress oxydant avec le Fe/Asc, l'expression génique du TNF- $\alpha$  a augmenté dans les deux groupes, mais était significativement plus élevée dans les cellules déficientes en PON2. L'expression génique de l'IL-6 et de MCP-1 était aussi plus élevée dans les cellules invalidées pour PON2 suite à l'induction d'un stress oxydant. Ces résultats démontrent que même en conditions basales, l'absence de PON2 peut rendre les cellules intestinales plus vulnérables à l'inflammation. De plus, lors de l'induction d'un stress oxydant, la réponse inflammatoire qui s'en suit est exacerbée. PON2 pourrait donc avoir une fonction anti-inflammatoire au niveau intestinal.

Le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 sont des cytokines qui peuvent contribuer au déclenchement de la réaction inflammatoire dans les MII<sup>27, 444</sup>. Le TNF- $\alpha$  semble particulièrement important dans les MII, puisque les agents anti-TNF peuvent induire la guérison de la muqueuse et mener à la rémission dans la maladie de Crohn<sup>27</sup>. Le MCP-1 est quant à lui responsable du recrutement des monocytes au site inflammatoire et il est connu que son expression est plus élevée dans les MII<sup>445, 446</sup>. Les MII sont d'ailleurs caractérisées par une accumulation de granulocytes et de monocytes/macrophages dans la paroi intestinale<sup>447</sup>. L'élévation de l'expression de ces gènes dans les cellules Caco-2/15 déficientes en PON2 suggère donc

que PON2 pourrait être impliqué dans le processus inflammatoire au niveau intestinal et dans les MII. Les modifications du ratio GSH/GSSG pourraient partiellement expliquer l'élévation de l'intensité de la réponse inflammatoire. Lorsque les concentrations de GSH sont amoindries, l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires est augmentée et le NF- $\kappa$ B est activé<sup>172, 448-450</sup>. L'accumulation de lipides oxydés peut aussi induire l'expression de gènes pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et le MCP-1 via l'activation de NF- $\kappa$ B<sup>451</sup>

Afin de vérifier l'implication du NF- $\kappa$ B dans l'augmentation de l'expression génique de gènes pro-inflammatoires, les cellules Caco-2/15 déficientes en PON2 ont été traitées avec des LPS. Les expressions protéiques de NF- $\kappa$ B et d'I $\kappa$ B ont été déterminées et le ratio NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B a été analysé. Le ratio NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B était augmenté dans les cellules contrôles suite à l'ajout de LPS, mais l'augmentation était significativement plus élevée dans les cellules invalidées pour PON2. Ces résultats confirment que la réponse inflammatoire est exacerbée dans les cellules déficientes en PON2 et suggèrent qu'une suractivation du NF- $\kappa$ B est en partie responsable de l'augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires.

Du côté de la réponse antioxydante, le Nrf2 est un acteur très important car il participe à l'activation de la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la défense antioxydante<sup>116</sup>. En conditions basales, le Nrf2 est associé avec son inhibiteur naturel, Keap-1, dans le cytosol où il est rapidement dégradé. Lorsqu'un stimulant comme par exemple un stress oxydant est présent, le Nrf2 et Keap-1 se dissocient et le Nrf2 peut alors pénétrer dans le

noyau et se lier aux séquences ARE des promoteurs des gènes cibles<sup>119, 120</sup>. Dans les cellules déficientes en PON2, l'expression génique de nombreuses enzymes antioxydantes était affectée, soit la SOD-1, la SOD-3, la G-Px2 et la G-Réd, et certaines de ces enzymes sont des cibles connues de Nrf2<sup>99, 117, 123</sup>. L'expression génique de Nrf2 était aussi augmentée dans les cellules Caco-2/15 invalidées pour PON2, ce qui pourrait suggérer que Nrf2 est régulée pour tenter de rétablir la coordination dans la défense antioxydante et pour protéger les cellules face à un stress oxydant. Cependant, l'expression protéique de Nrf2 était inchangée.

Les coactivateurs transcriptionnels PGC1 ( $\alpha$  et  $\beta$ ) sont aussi responsables de la surveillance des niveaux de stress oxydant et ont été liés à la régulation de la G-Px, des SOD et possiblement aussi de la CAT<sup>124, 126</sup>. Il a été démontré que l'expression génique de PGC1 $\alpha$  et  $\beta$  était induite par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et un stress oxydant généré par l'exercice physique<sup>125, 126</sup>. Dans les cellules Caco-2/15 invalidées pour PON2, seulement l'expression génique de PGC1 $\alpha$  était augmentée suite au traitement avec le Fe/Asc. Cette augmentation de PGC1 $\alpha$  pourrait donc aussi être partiellement responsable de la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la défense antioxydante pour tenter de combler la forte réduction de PON2.

La forte réduction de l'expression de PON2 dans les cellules Caco-2/15 a généré de nombreux changements dans la défense antioxydante et la réponse inflammatoire. La défense antioxydante doit réagir de manière coordonnée afin de contrôler le stress oxydant. Un débalancement entre la première et la deuxième ligne de défense peut s'avérer

dommageable<sup>112, 114</sup>. Un tel déséquilibre semble être généré par la réduction de PON2 puisque l'activité SOD était augmentée alors que celle de la CAT diminuait. En conséquence, les niveaux de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mesurés dans le milieu de culture étaient augmentés. Suite à l'induction d'un stress oxydant, les cellules dans lesquelles PON2 avait été invalidée semblaient aussi fragilisées, puisque les niveaux de MDA, un marqueur de la peroxydation lipidique, étaient augmentés, et que le ratio GSH/GSSG était diminué. La réponse inflammatoire était aussi exacerbée dans les cellules invalidées pour PON2, démontré par l'augmentation de l'expression génique du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6 et de MCP-1 suite à l'ajout de Fe/Asc pour induire un stress oxydant, en comparaison aux cellules Mock. Suite à un traitement pro-inflammatoire aux LPS, l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B était aussi plus importante. Tous ces résultats démontrent le fort potentiel antioxydant et anti-inflammatoire de PON2 au niveau intestinal et son implication possible dans le maintien de l'homéostasie intestinale et la prévention des MII.

Il a été proposé que les substrats naturels des PON puissent être certains produits d'oxydation d'acides gras polyinsaturés. Une fonction antioxydante de PON2 pourrait être de les métaboliser et ainsi affecter la réponse inflammatoire<sup>196</sup>. Il a aussi été proposé que les PON puissent agir en tant qu'immunomodulateurs et détoxifiants dans l'intestin<sup>396</sup>. L'activité lactonase de PON2, qui serait responsable de sa fonction antioxydante, peut être altérée par un polymorphisme commun<sup>245</sup>, et la variation génétique de la séquence de PON2 a été liée aux MII<sup>393</sup>. L'intégrité du statut de PON2 pourrait donc être importante pour le maintien de l'homéostasie intestinale. De plus, il a récemment été démontré que

PON2 pourrait jouer un rôle antioxydant dans la mitochondrie, prévenant la formation d'anions superoxydes et l'apoptose, et aidant à maintenir les niveaux de production d'ATP<sup>452, 453</sup>. Une fonction mitochondriale saine est une composante majeure de la santé intestinale et ses altérations pourraient être impliquées dans le développement des MII<sup>454</sup>. Le maintien de l'activité de PON2 pourrait donc protéger du stress oxydant, de l'inflammation et maintenir l'efficacité de la fonction mitochondriale. À l'inverse, une activité de PON2 faible pourrait signifier une accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de lipides peroxydés, ce qui entraînerait l'exacerbation de la réponse inflammatoire dans les cellules épithéliales intestinales. Ceci suggère que PON2 est impliquée dans le maintien de l'équilibre inflammatoire et l'intégrité de la barrière épithéliale au niveau intestinal, des composantes très importantes pour la prévention des MII.

## CONCLUSION

Les connaissances sur les PON et l'intestin étaient très limitées au début de ce projet de recherche. Pourtant, les PON sont des enzymes au fort potentiel antioxydant et une bonne défense antioxydante est essentielle au maintien de l'homéostasie intestinale. Les dérèglements de la balance pro-/antioxydante peuvent conduire à des lésions ou à un mauvais fonctionnement de la barrière épithéliale intestinale et entraîner des pathologies sérieuses comme les MII. Il devenait donc très intéressant d'étudier la présence, la régulation et les rôles des PON dans la cellule intestinale, car leur fort potentiel antioxydant pourrait en faire des joueurs clés pour le maintien de l'homéostasie intestinale et la prévention des MII.

Le projet de recherche a permis de démontrer la présence de PON2 et PON3 dans la cellule intestinale humaine Caco-2/15, et de PON1 à un niveau moins important. L'étude de leur régulation a permis de démontrer que leur expression est régulée en situation de stress oxydant et d'inflammation, notamment par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, ce qui suggère une certaine implication dans ces processus au niveau intestinal. L'activation des PPAR semble impliquée dans l'augmentation de l'expression des PON dans la cellule intestinale, mais les impacts biologiques de la faible, mais significative, élévation notée sont probablement négligeables. Malheureusement, aucun puissant modulateur d'origine nutritionnelle n'a pu être identifié. La nutrition aurait été le moyen le plus facile d'augmenter l'expression des PON pour possiblement aider les patients atteints de MII.

PON2 semblait être la PON la plus prometteuse quant à ses fonctions antioxydantes et anti-inflammatoires au niveau intestinal. En effet, l'ajout de PON2 purifiée aux cellules Caco-2/15 soumises à un stress oxydant pouvait réduire la peroxydation lipidique. De plus, sa présence tout au long de l'intestin et sa régulation tant au niveau génique que protéique en situation de stress oxydant et d'inflammation suggérait un rôle dans ces processus. Un modèle de cellules Caco-2/15 déficientes en PON2 a donc été généré et a permis de mieux caractériser l'implication de PON2 dans la défense antioxydante et la réponse inflammatoire. Suite à une forte réduction de PON2, un déséquilibre se produit dans la défense antioxydante, menant à l'accumulation de  $H_2O_2$ , et la réponse inflammatoire est exacerbée. Ces résultats démontrent les impacts antioxydants et anti-inflammatoires de PON2 dans la cellule intestinale et suggèrent qu'elle pourrait être impliquée dans l'étiologie et la pathogenèse des MII.

Beaucoup de travail reste à accomplir pour mieux caractériser la régulation et les fonctions des PON au niveau intestinal et leur implication dans les MII. Des banques de tissus intestinaux provenant de patients atteints de maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse sont présentement en train de se former. Ceci pourra permettre d'étudier l'expression génique et protéique des PON dans l'intestin d'individus souffrant d'une MII. Des échantillons sanguins devraient aussi être amassés afin d'étudier l'activité de PON1 dans le plasma et ainsi de bien caractériser le statut des PON dans les MII. L'obtention de ces données permettrait de confirmer cliniquement les résultats obtenus dans les modèles cellulaires. De plus, des modèles animaux de souris déficientes ou surexprimant les PON ont été générés



dans différents endroits du monde et des démarches ont été entreprises afin de les obtenir. Ceci pourrait permettre de suivre le développement et la gravité des symptômes de colites inflammatoires induite chimiquement, par exemple avec des animaux déficients en PON2 en comparaison à des animaux contrôles. Une telle expérience serait une démonstration élégante de l'implication des PON dans la défense intestinale et les MII.

Le projet de recherche portant sur la régulation et les rôles des PON au niveau intestinal aura tout de même permis d'établir le lien avec l'inflammation, le stress oxydant et les MII. Il a pavé la voie à de nombreux autres projets de recherche, qui pourront éventuellement mener à une meilleure prise en charge des patients et au soulagement durable de leurs symptômes.

#### IV-Bibliographie

1. Marcil V, Peretti N, Delvin E, Levy E. [Digestive and absorptive processes of lipids]. *Gastroenterol Clin Biol* 2004;28:1257-66.
2. Hill MJ. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev* 1997;6 Suppl 1:S43-5.
3. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:235-43.
4. Levy E, Spahis S, Sinnett D, Peretti N, Maupas-Schwalm F, Delvin E, Lambert M, Lavoie MA. Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipidol* 2007;18:310-8.
5. Sane AT, Sinnett D, Delvin E, Bendayan M, Marcil V, Menard D, Beaulieu JF, Levy E. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res* 2006;47:2112-20.
6. Davis HR, Jr., Basso F, Hoos LM, Tetzloff G, Lally SM, Altmann SW. Cholesterol homeostasis by the intestine: lessons from Niemann-Pick C1 Like 1 [NPC1L1]. *Atheroscler Suppl* 2008;9:77-81.
7. Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, Rudling M, Myrdal U, Annesi G, Naik S, Meadows N, Quattrone A, Islam SA, Naoumova RP, Angelin B, Infante R, Levy E, Roy CC, Freemont PS, Scott J, Shoulders CC. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet* 2003;34:29-31.
8. Hooper AJ, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Monogenic hypocholesterolaemic lipid disorders and apolipoprotein B metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005;42:515-45.
9. Peretti N, Roy CC, Sassolas A, Deslandres C, Drouin E, Rasquin A, Seidman E, Brochu P, Vohl MC, Labarge S, Bouvier R, Samson-Bouma ME, Charcosset M, Lachaux A, Levy E. Chylomicron retention disease: a long term study of two cohorts. *Mol Genet Metab* 2009;97:136-42.
10. Levy E, Lalonde G, Delvin E, Elchebly M, Precourt LP, Seidah NG, Spahis S, Rabasa-Lhoret R, Ziv E. Intestinal and hepatic cholesterol carriers in diabetic *Psammomys obesus*. *Endocrinology* 2010;151:958-70.
11. Ravid Z, Bendayan M, Delvin E, Sane AT, Elchebly M, Lafond J, Lambert M, Mailhot G, Levy E. Modulation of intestinal cholesterol absorption by high glucose levels: impact on cholesterol transporters, regulatory enzymes, and transcription factors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G873-85.
12. Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Hudcovic T, Tuckova L, Cukrowska B, Lodinova-Zadnikova R, Kozakova H, Rossmann P, Bartova J, Sokol D, Funda DP, Borovska D, Rehakova Z, Sinkora J, Hofman J, Drastich P, Kokesova A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* 2004;93:97-108.
13. Shi HN, Walker A. Bacterial colonization and the development of intestinal defences. *Can J Gastroenterol* 2004;18:493-500.
14. Walker WA. Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30 Suppl 2:S2-7.

15. Dagi N, Poyrazoglu OK, Dagi AF, Sahbaz F, Karaca I, Kobat MA, Bahcecioglu IH. Is inflammatory bowel disease a risk factor for early atherosclerosis? *Angiology* 2010;61:198-204.
16. Pedersen N, Duricova D, Elkjaer M, Gamborg M, Munkholm P, Jess T. Risk of extra-intestinal cancer in inflammatory bowel disease: meta-analysis of population-based cohort studies. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1480-7.
17. FCMII. Toute la vérité sur les maladies inflammatoires de l'intestin. Fondation canadienne des maladies inflammatoires de l'intestin 2008.
18. CCFA. Introduction to Crohn's disease. Crohn's and colitis foundation of America 2005.
19. Williams CN. Does the incidence of IBD increase when persons move from a low- to a high-risk area? *Inflamm Bowel Dis* 2008;14 Suppl 2:S41-2.
20. Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW, MacKenzie A, Koehoorn M, Jackson M, Fedorak R, Israel D, Blanchard JF. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1559-68.
21. CCFC. The Burden of Inflammatory Bowel Disease (IBD) in Canada. Crohn's and Colitis Foundation of Canada 2008.
22. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-7.
23. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504-17.
24. Loftus CG, Loftus EV, Jr., Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ, 3rd, Sandborn WJ. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:254-61.
25. Geary RB, Richardson A, Frampton CM, Collett JA, Burt MJ, Chapman BA, Barclay ML. High incidence of Crohn's disease in Canterbury, New Zealand: results of an epidemiologic study. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:936-43.
26. FCMII. La médication et les maladies inflammatoires de l'intestin. Fondation canadienne des maladies inflammatoires de l'intestin 2010.
27. Peyrin-Biroulet L. Anti-TNF therapy in inflammatory bowel diseases: a huge review. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2010;56:233-43.
28. Sarzi-Puttini P, Ardizzone S, Manzionna G, Atzeni F, Colombo E, Antivalle M, Carrabba M, Bianchi-Porro G. Infliximab-induced lupus in Crohn's disease: a case report. *Dig Liver Dis* 2003;35:814-7.
29. Mangge H, Gindl S, Kenzian H, Schauenstein K. Atopic dermatitis as a side effect of anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *J Rheumatol* 2003;30:2506-7.
30. Esser AC, Abril A, Fayne S, Doyle JA. Acute development of multiple keratoacanthomas and squamous cell carcinomas after treatment with infliximab. *J Am Acad Dermatol* 2004;50:S75-7.

31. FCMII. Chirurgie et maladies inflammatoires de l'intestin. Fondation canadienne des maladies inflammatoires de l'intestin 2010.
32. De Boer M, Grootenhuis M, Derkx B, Last B. Health-related quality of life and psychosocial functioning of adolescents with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:400-6.
33. Loonen HJ, Grootenhuis MA, Last BF, Koopman HM, Derkx HH. Quality of life in paediatric inflammatory bowel disease measured by a generic and a disease-specific questionnaire. *Acta Paediatr* 2002;91:348-54.
34. Kirschner BS. Ulcerative colitis and Crohn's disease in children. Diagnosis and management. *Gastroenterol Clin North Am* 1995;24:99-117.
35. Markowitz J, Grancher K, Rosa J, Aiges H, Daum F. Growth failure in pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;16:373-80.
36. Rufo PA, Bousvaros A. Current therapy of inflammatory bowel disease in children. *Paediatr Drugs* 2006;8:279-302.
37. Telander RL. Surgical management of Crohn's disease in children. *Curr Opin Pediatr* 1995;7:328-34.
38. Cuffari C. Inflammatory bowel disease in children: a pediatrician's perspective. *Minerva Pediatr* 2006;58:139-57.
39. Mallon DP, Suskind DL. Nutrition in pediatric inflammatory bowel disease. *Nutr Clin Pract* 2010;25:335-9.
40. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 2004;3:394-400.
41. Stefanelli T, Malesci A, Repici A, Vetrano S, Danese S. New insights into inflammatory bowel disease pathophysiology: paving the way for novel therapeutic targets. *Curr Drug Targets* 2008;9:413-8.
42. Pravda J. Radical induction theory of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2005;11:2371-84.
43. Jantchou P, Monnet E, Carbonnel F. [Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis (excluding tobacco and appendicectomy)]. *Gastroenterol Clin Biol* 2006;30:859-67.
44. de Silva HJ, de Silva NR, de Silva AP, Jewell DP. Emergence of inflammatory bowel disease 'beyond the West': do prosperity and improved hygiene have a role? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102:857-60.
45. Lakatos PL. Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: have we made progress? *Dig Dis* 2009;27:215-25.
46. Straub RH, Besedovsky HO. Integrated evolutionary, immunological, and neuroendocrine framework for the pathogenesis of chronic disabling inflammatory diseases. *Faseb J* 2003;17:2176-83.
47. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 1989;299:1259-60.
48. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 2000;55 Suppl 1:S2-10.
49. Hansen R, Thomson JM, El-Omar EM, Hold GL. The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2010;45:266-76.

50. Glasser AL, Darfeuille-Michaud A. Abnormalities in the handling of intracellular bacteria in Crohn's disease: a link between infectious etiology and host genetic susceptibility. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008;56:237-44.
51. Kalliomaki M, Isolauri E. Pandemic of atopic diseases--a lack of microbial exposure in early infancy? *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002;2:193-9.
52. Koloski NA, Bret L, Radford-Smith G. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. *World J Gastroenterol* 2008;14:165-73.
53. Peyrin-Biroulet L, Oussalah A, Bigard MA. Crohn's disease: the hot hypothesis. *Med Hypotheses* 2009;73:94-6.
54. Desreumaux P, Colombel JF. [Intestinal flora and Crohn's disease]. *Ann Pharm Fr* 2003;61:276-81.
55. Baker PI, Love DR, Ferguson LR. Role of gut microbiota in Crohn's disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;3:535-46.
56. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Järnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 2003;124:1767-73.
57. Cooney R, Jewell D. The genetic basis of inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2009;27:428-42.
58. Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 2005;174:4453-60.
59. Philpott DJ, Viala J. Towards an understanding of the role of NOD2/CARD15 in the pathogenesis of Crohn's disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:555-68.
60. Weersma RK, Zhernakova A, Nolte IM, Lefebvre C, Rioux JD, Mulder F, van Dullemen HM, Kleibeuker JH, Wijmenga C, Dijkstra G. ATG16L1 and IL23R are associated with inflammatory bowel diseases but not with celiac disease in the Netherlands. *Am J Gastroenterol* 2008;103:621-7.
61. Shen W, Durum SK. Synergy of IL-23 and Th17 cytokines: new light on inflammatory bowel disease. *Neurochem Res* 2010;35:940-6.
62. Sonnenberg A. Geographic and temporal variations of sugar and margarine consumption in relation to Crohn's disease. *Digestion* 1988;41:161-71.
63. Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40:754-60.
64. Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda N. Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan. *Am J Clin Nutr* 1996;63:741-5.
65. Yamamoto T, Nakahigashi M, Saniabadi AR. Review article: diet and inflammatory bowel disease--epidemiology and treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30:99-112.
66. Ekblom A, Montgomery SM. Environmental risk factors (excluding tobacco and microorganisms): critical analysis of old and new hypotheses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:497-508.

67. Levy E, Rizwan Y, Thibault L, Lepage G, Brunet S, Bouthillier L, Seidman E. Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71:807-15.
68. De Ley M, de Vos R, Hommes DW, Stokkers P. Fish oil for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007:CD005986.
69. MacLean CH, Mojica WA, Newberry SJ, Pencharz J, Garland RH, Tu W, Hilton LG, Gralnek IM, Rhodes S, Khanna P, Morton SC. Systematic review of the effects of n-3 fatty acids in inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nutr* 2005;82:611-9.
70. Bousvaros A, Zurakowski D, Duggan C, Law T, Rifai N, Goldberg NE, Leichtner AM. Vitamins A and E serum levels in children and young adults with inflammatory bowel disease: effect of disease activity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;26:129-35.
71. Geerling BJ, Badart-Smook A, Stockbrugger RW, Brummer RJ. Comprehensive nutritional status in patients with long-standing Crohn disease currently in remission. *Am J Clin Nutr* 1998;67:919-26.
72. Geerling BJ, Badart-Smook A, van Deursen C, van Houwelingen AC, Russel MG, Stockbrugger RW, Brummer RJ. Nutritional supplementation with N-3 fatty acids and antioxidants in patients with Crohn's disease in remission: effects on antioxidant status and fatty acid profile. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:77-84.
73. Aghdassi E, Wendland BE, Steinhart AH, Wolman SL, Jeejeebhoy K, Allard JP. Antioxidant vitamin supplementation in Crohn's disease decreases oxidative stress. a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2003;98:348-53.
74. Kulnigg S, Gasche C. Systematic review: managing anaemia in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24:1507-23.
75. Seidman EG, Bernotti S, Levy E. Nutritional modulation of gut inflammation. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme* 2002;7:41-61; discussion 61-5.
76. Na HK, Surh YJ. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food Chem Toxicol* 2008;46:1271-8.
77. Sahin K, Orhan C, Tuzcu M, Ali S, Sahin N, Hayirli A. Epigallocatechin-3-gallate prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defense system via modulating hepatic nuclear transcription factors in heat-stressed quails. *Poult Sci* 2010;89:2251-8.
78. Abplanalp W, Ravi Subbiah MT. Uptake and protection against oxidative stress by estrogen esters in THP-1 human macrophage cell lines. *Gynecol Obstet Invest* 2001;51:81-4.
79. Morimoto M, Watanabe T, Yamori M, Takebe M, Wakatsuki Y. Isoflavones regulate innate immunity and inhibit experimental colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:1123-9.
80. Seibel J, Molzberger AF, Hertrampf T, Laudenbach-Leschowski U, Diel P. Oral treatment with genistein reduces the expression of molecular and biochemical markers of inflammation in a rat model of chronic TNBS-induced colitis. *Eur J Nutr* 2009;48:213-20.

81. Castagnini C, Luceri C, Toti S, Bigagli E, Caderni G, Femia AP, Giovannelli L, Lodovici M, Pitozzi V, Salvadori M, Messerini L, Martin R, Zoetendal EG, Gaj S, Eijssen L, Evelo CT, Renard CM, Baron A, Dolara P. Reduction of colonic inflammation in HLA-B27 transgenic rats by feeding Marie Menard apples, rich in polyphenols. *Br J Nutr* 2009;102:1620-8.
82. Lenoir L, Rossary A, Joubert-Zakeyh J, Vergnaud-Gauduchon J, Farges MC, Fraisse D, Texier O, Lamaison JL, Vasson MP, Felgines C. Lemon Verbena Infusion Consumption Attenuates Oxidative Stress in Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in the Rat. *Dig Dis Sci* 2011.
83. Mazzon E, Muia C, Paola RD, Genovese T, Menegazzi M, De Sarro A, Suzuki H, Cuzzocrea S. Green tea polyphenol extract attenuates colon injury induced by experimental colitis. *Free Radic Res* 2005;39:1017-25.
84. Skyberg JA, Robison A, Golden S, Rollins MF, Callis G, Huarte E, Kochetkova I, Jutila MA, Pascual DW. Apple polyphenols require T cells to ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis and dampen proinflammatory cytokine expression. *J Leukoc Biol* 2011.
85. Thibault R, Blachier F, Darcy-Vrillon B, de Coppet P, Bourreille A, Segain JP. Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a transport deficiency. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:684-95.
86. Ling SC, Griffiths AM. Nutrition in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3:339-44.
87. Vernia P, Monteleone G, Grandinetti G, Villotti G, Di Giulio E, Frieri G, Marcheggiano A, Pallone F, Caprilli R, Torsoli A. Combined oral sodium butyrate and mesalazine treatment compared to oral mesalazine alone in ulcerative colitis: randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Dig Dis Sci* 2000;45:976-81.
88. Tamboli CP, Caucheteux C, Cortot A, Colombel JF, Desreumaux P. Probiotics in inflammatory bowel disease: a critical review. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:805-20.
89. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000;119:305-9.
90. Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003;124:1202-9.
91. Cui HH, Chen CL, Wang JD, Yang YJ, Cun Y, Wu JB, Liu YH, Dan HL, Jian YT, Chen XQ. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2004;10:1521-5.
92. Hegazy SK, El-Bedewy MM. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2010;16:4145-51.

93. Hedin C, Whelan K, Lindsay JO. Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *Proc Nutr Soc* 2007;66:307-15.
94. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.
95. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995;64:97-112.
96. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10405-9.
97. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J* 1984;222:649-55.
98. Singh AK, Dhaunsi GS, Gupta MP, Orak JK, Asayama K, Singh I. Demonstration of glutathione peroxidase in rat liver peroxisomes and its intraorganellar distribution. *Arch Biochem Biophys* 1994;315:331-8.
99. Banning A, Deubel S, Kluth D, Zhou Z, Brigelius-Flohe R. The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol Cell Biol* 2005;25:4914-23.
100. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1825-35.
101. McCray PB, Gibson DD, Fong KL, Hornbrook KR. Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 1976;431:459-68.
102. Sen CK. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem Pharmacol* 1998;55:1747-58.
103. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004;134:489-92.
104. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985;113:484-90.
105. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996;16:33-50.
106. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002;18:872-9.
107. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1191-212.
108. Townsend DM. S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. *Mol Interv* 2007;7:313-24.
109. Nkabyo YS, Ziegler TR, Gu LH, Watson WH, Jones DP. Glutathione and thioredoxin redox during differentiation in human colon epithelial (Caco-2) cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G1352-9.
110. Nicole A, Santiard-Baron D, Ceballos-Picot I. Direct evidence for glutathione as mediator of apoptosis in neuronal cells. *Biomed Pharmacother* 1998;52:349-55.



111. Kemp M, Go YM, Jones DP. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med* 2008;44:921-37.
112. Kedziora J, Bartosz G. Down's syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 1988;4:317-30.
113. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995;11:376-81.
114. Kobayashi M, Sugiyama H, Wang DH, Toda N, Maeshima Y, Yamasaki Y, Masuoka N, Yamada M, Kira S, Makino H. Catalase deficiency renders remnant kidneys more susceptible to oxidant tissue injury and renal fibrosis in mice. *Kidney Int* 2005;68:1018-31.
115. Imai H, Hakkaku N, Iwamoto R, Suzuki J, Suzuki T, Tajima Y, Konishi K, Minami S, Ichinose S, Ishizaka K, Shioda S, Arata S, Nishimura M, Naito S, Nakagawa Y. Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice. *J Biol Chem* 2009;284:32522-32.
116. Aleksunes LM, Manautou JE. Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol Pathol* 2007;35:459-73.
117. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009;46:443-53.
118. Reddy NM, Kleiberger SR, Yamamoto M, Kensler TW, Scollick C, Biswal S, Reddy SP. Genetic dissection of the Nrf2-dependent redox signaling-regulated transcriptional programs of cell proliferation and cytoprotection. *Physiol Genomics* 2007;32:74-81.
119. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999;13:76-86.
120. Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1208-13.
121. Sasaki H, Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Sato K, Maehara K, Wang H, Tamba M, Itoh K, Yamamoto M, Bannai S. Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J Biol Chem* 2002;277:44765-71.
122. Chan JY, Kwong M. Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim Biophys Acta* 2000;1517:19-26.
123. Singh A, Rangasamy T, Thimmulappa RK, Lee H, Osburn WO, Brigelius-Flohe R, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Glutathione peroxidase 2, the major cigarette

- smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:639-50.
124. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 2006;127:397-408.
  125. Spiegelman BM. Transcriptional control of energy homeostasis through the PGC1 coactivators. *Novartis Found Symp* 2007;286:3-6; discussion 6-12, 162-3, 196-203.
  126. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Bluher M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:8665-70.
  127. Kukidome D, Nishikawa T, Sonoda K, Imoto K, Fujisawa K, Yano M, Motoshima H, Taguchi T, Matsumura T, Araki E. Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes* 2006;55:120-7.
  128. Surh YJ, Kundu JK, Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med* 2008;74:1526-39.
  129. Farombi EO, Shrotriya S, Na HK, Kim SH, Surh YJ. Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1. *Food Chem Toxicol* 2008;46:1279-87.
  130. Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang SR, Megson IL, Rahman I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L478-88.
  131. Kaspar JW, Jaiswal AK. Antioxidant-induced phosphorylation of tyrosine 486 leads to rapid nuclear export of Bach1 that allows Nrf2 to bind to the antioxidant response element and activate defensive gene expression. *J Biol Chem* 2010;285:153-62.
  132. Ma W, Yuan L, Yu H, Ding B, Xi Y, Feng J, Xiao R. Genistein as a neuroprotective antioxidant attenuates redox imbalance induced by beta-amyloid peptides 25-35 in PC12 cells. *Int J Dev Neurosci* 2010;28:289-95.
  133. Mann GE, Bonacasa B, Ishii T, Siow RC. Targeting the redox sensitive Nrf2-Keap1 defense pathway in cardiovascular disease: protection afforded by dietary isoflavones. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:139-45.
  134. Wiegand H, Wagner AE, Boesch-Saadatmandi C, Kruse HP, Kulling S, Rimbach G. Effect of dietary genistein on Phase II and antioxidant enzymes in rat liver. *Cancer Genomics Proteomics* 2009;6:85-92.
  135. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 2006;127:1109-22.

136. Sheehan JF, Brynjolfsson G. Ulcerative colitis following hydrogen peroxide enema: case report and experimental production with transient emphysema of colonic wall and gas embolism. *Lab Invest* 1960;9:150-68.
137. Meyer CT, Brand M, DeLuca VA, Spiro HM. Hydrogen peroxide colitis: a report of three patients. *J Clin Gastroenterol* 1981;3:31-5.
138. Brynjolfsson G. Colonic injury from hydrogen peroxide. *N Engl J Med* 1967;277:662.
139. Esworthy RS, Aranda R, Martin MG, Doroshov JH, Binder SW, Chu FF. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G848-55.
140. Kruidenier L, Kuiper I, van Duijn W, Marklund SL, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003;201:7-16.
141. Kruidenier L, van Meeteren ME, Kuiper I, Jaarsma D, Lamers CB, Zijlstra FJ, Verspaget HW. Attenuated mild colonic inflammation and improved survival from severe DSS-colitis of transgenic Cu/Zn-SOD mice. *Free Radic Biol Med* 2003;34:753-65.
142. Ceballos-Picot I. [Transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase: a model for the study of radical mechanisms and aging]. *C R Seances Soc Biol Fil* 1993;187:308-23.
143. Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003;201:17-27.
144. Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1997-2015.
145. Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulios PD, Karmiris K, Castanas E, Kouroumalis EA. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2004;49:1433-7.
146. Rezaie A, Ghorbani F, Eshghtork A, Zamani MJ, Dehghan G, Taghavi B, Nikfar S, Mohammadirad A, Daryani NE, Abdollahi M. Alterations in salivary antioxidants, nitric oxide, and transforming growth factor-beta 1 in relation to disease activity in Crohn's disease patients. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1091:110-22.
147. Jahanshahi G, Motavasel V, Rezaie A, Hashtroudi AA, Daryani NE, Abdollahi M. Alterations in antioxidant power and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in saliva of patients with inflammatory bowel diseases. *Dig Dis Sci* 2004;49:1752-7.
148. Wendland BE, Aghdassi E, Tam C, Carrrier J, Steinhart AH, Wolman SL, Baron D, Allard JP. Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 2001;74:259-64.
149. Geerling BJ, v Houwelingen AC, Badart-Smook A, Stockbrugger RW, Brummer RJ. The relation between antioxidant status and alterations in fatty acid profile in patients with Crohn disease and controls. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:1108-16.

150. Sampietro GM, Cristaldi M, Cervato G, Maconi G, Danelli P, Cervellione R, Rovati M, Bianchi Porro G, Cestaro B, Taschieri AM. Oxidative stress, vitamin A and vitamin E behaviour in patients submitted to conservative surgery for complicated Crohn's disease. *Dig Liver Dis* 2002;34:696-701.
151. D'Odorico A, Bortolan S, Cardin R, D'Inca R, Martines D, Ferronato A, Sturniolo GC. Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1289-94.
152. Erichsen K, Hausken T, Ulvik RJ, Svardal A, Berstad A, Berge RK. Ferrous fumarate deteriorated plasma antioxidant status in patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:543-8.
153. Reimund JM, Hirth C, Koehl C, Baumann R, Duclos B. Antioxidant and immune status in active Crohn's disease. A possible relationship. *Clin Nutr* 2000;19:43-8.
154. Forrest CM, Gould SR, Darlington LG, Stone TW. Levels of purine, kynurenine and lipid peroxidation products in patients with inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol* 2003;527:395-400.
155. Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol* 2003;201:28-36.
156. Chiarpotto E, Scavazza A, Leonarduzzi G, Camandola S, Biasi F, Teggia PM, Garavoglia M, Robecchi A, Roncari A, Poli G. Oxidative damage and transforming growth factor beta 1 expression in pretumoral and tumoral lesions of human intestine. *Free Radic Biol Med* 1997;22:889-94.
157. Pelli MA, Trovarelli G, Capodicasa E, De Medio GE, Bassotti G. Breath alkanes determination in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 1999;42:71-6.
158. Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* 2009;46:531-42.
159. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, Weissman GS, Katz S, Floyd RA, McKinley MJ, Fisher SE, Mullin GE. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996;41:2078-86.
160. Keshavarzian A, Banan A, Farhadi A, Komanduri S, Mutlu E, Zhang Y, Fields JZ. Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:720-8.
161. Ciccocioppo R, Finamore A, Ara C, Di Sabatino A, Mengheri E, Corazza GR. Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease. *Am J Clin Pathol* 2006;125:502-11.
162. Perry I, Tselepis C, Hoyland J, Iqbal TH, Scott D, Sanders SA, Cooper BT, Jankowski JA. Reduced cadherin/catenin complex expression in celiac disease can be reproduced in vitro by cytokine stimulation. *Lab Invest* 1999;79:1489-99.
163. Katsube T, Tsuji H, Onoda M. Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in monolayers of intestinal epithelial cell. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:794-803.

164. Rao RK, Basuroy S, Rao VU, Karnaky Jr KJ, Gupta A. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem J* 2002;368:471-81.
165. Steinhäuser ML, Kunkel SL, Hogaboam CM, Evanoff H, Strieter RM, Lukacs NW. Macrophage/fibroblast coculture induces macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  production mediated by intercellular adhesion molecule-1 and oxygen radicals. *J Leukoc Biol* 1998;64:636-41.
166. DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem* 1993;268:25568-76.
167. Roebuck KA. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB (Review). *Int J Mol Med* 1999;4:223-30.
168. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* 1992;17:221-37.
169. Li N, Karin M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *Faseb J* 1999;13:1137-43.
170. Zhang G, Ghosh S. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2000;6:453-7.
171. Schmid RM, Adler G. NF-kappaB/rel/IkappaB: implications in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* 2000;118:1208-28.
172. Haddad JJ, Saade NE, Safieh-Garabedian B. Redox regulation of TNF-alpha biosynthesis: augmentation by irreversible inhibition of gamma-glutamylcysteine synthetase and the involvement of an IkappaB-alpha/NF-kappaB-independent pathway in alveolar epithelial cells. *Cell Signal* 2002;14:211-8.
173. Ley K, Deem TL. Oxidative modification of leukocyte adhesion. *Immunity* 2005;22:5-7.
174. Wagener FA, Feldman E, de Witte T, Abraham NG. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;216:456-63.
175. Cominacini L, Fratta Pasini A, Garbin U, Campagnola M, Davoli A, Rigoni A, Zenti MG, Pastorino AM, Lo Cascio V. E-selectin plasma concentration is influenced by glycaemic control in NIDDM patients: possible role of oxidative stress. *Diabetologia* 1997;40:584-9.
176. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1993;92:1866-74.
177. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002;397:342-4.

178. Levy O. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *J Leukoc Biol* 2004;76:909-25.
179. Miles K, Clarke DJ, Lu W, Sibinska Z, Beaumont PE, Davidson DJ, Barr TA, Campopiano DJ, Gray M. Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of alpha-defensins. *J Immunol* 2009;183:2122-32.
180. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627-40.
181. Rezaie A, Parker RD, Abdollahi M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Dig Dis Sci* 2007;52:2015-21.
182. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996;33:498-507.
183. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1304-16.
184. Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, Suissa A, Aviram M. Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radic Biol Med* 2005;39:336-44 Epub 2005 Apr 6.
185. Aldridge WN. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J* 1953;53:110-7.
186. Aldridge WN. Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J* 1953;53:117-24.
187. Mackness MI, Walker CH. Multiple forms of sheep serum A-esterase activity associated with the high-density lipoprotein. *Biochem J* 1988;250:539-45.
188. Costa LG, Li WF, Richter RJ, Shih DM, Lusic A, Furlong CE. The role of paraoxonase (PON1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism. *Chem Biol Interact* 1999;119-120:429-38.
189. Costa LG, Cole TB, Furlong CE. Polymorphisms of paraoxonase (PON1) and their significance in clinical toxicology of organophosphates. *J Toxicol Clin Toxicol* 2003;41:37-45.
190. Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1990;1044:275-83.
191. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991;286:152-4.
192. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusic AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998;394:284-7.

193. La Du BN. Structural and functional diversity of paraoxonases. *Nat Med* 1996;2:1186-7.
194. Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009;46:83-106.
195. Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Beltran R, Joven J, Camps J. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 2008;45:146-57.
196. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res* 2005;46:1239-47 Epub 2005 Mar 16.
197. Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry* 2005;44:6371-82.
198. Connelly PW, Picardo CM, Potter PM, Teiber JF, Maguire GF, Ng DS. Mouse serum paraoxonase-1 lactonase activity is specific for medium chain length fatty acid lactones. *Biochim Biophys Acta* 2010.
199. Raina S, De Vizio D, Odell M, Clements M, Vanhulle S, Keshavarz T. Microbial quorum sensing: a tool or a target for antimicrobial therapy? *Biotechnol Appl Biochem* 2009;54:65-84.
200. Wang YJ, Huang JJ, Leadbetter JR. Acyl-HSL signal decay: intrinsic to bacterial cell-cell communications. *Adv Appl Microbiol* 2007;61:27-58.
201. Smith D, Wang JH, Swatton JE, Davenport P, Price B, Mikkelsen H, Stickland H, Nishikawa K, Gardiol N, Spring DR, Welch M. Variations on a theme: diverse N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing mechanisms in gram-negative bacteria. *Sci Prog* 2006;89:167-211.
202. Teiber JF, Horke S, Haines DC, Chowdhary PK, Xiao J, Kramer GL, Haley RW, Draganov DI. Dominant role of paraoxonases in inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun* 2008;76:2512-9.
203. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *J Physiol Pharmacol* 2008;59 Suppl 9:155-67.
204. Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 2000;275:3957-62.
205. Perla-Kajan J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylation in humans. *Faseb J* 2009.
206. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;96:2882-91.
207. Geldmacher-von Mallinckrodt M, Diepgen TL. The human serum paraoxonase—Polymorphism and specificity. *Toxicol Environ Chem* 1988;188:79-196.

208. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998;101:1581-90.
209. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 2000;101:2510-7.
210. Rosenblat M, Gaidukov L, Khersonsky O, Vaya J, Oren R, Tawfik DS, Aviram M. The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. *J Biol Chem* 2006;281:7657-65.
211. Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, Emili A, Draganov D, La Du BN, Kuksis A, Connelly PW. Apolipoprotein A-I promotes the formation of phosphatidylcholine core aldehydes that are hydrolyzed by paraoxonase (PON-1) during high density lipoprotein oxidation with a peroxynitrite donor. *J Biol Chem* 2001;276:24473-81 Epub 2001 Apr 24.
212. Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, Emili A, Draganov D, La Du BN, Kuksis A, Connelly PW. Multiple substrates for paraoxonase-1 during oxidation of phosphatidylcholine by peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:391-6.
213. Kriska T, Marathe GK, Schmidt JC, McIntyre TM, Girotti AW. Phospholipase action of platelet-activating factor acetylhydrolase, but not paraoxonase-1, on long fatty acyl chain phospholipid hydroperoxides. *J Biol Chem* 2007;282:100-8.
214. Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 2003;278:3937-47.
215. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 2001;354:1-7.
216. Connelly PW, Draganov D, Maguire GF. Paraoxonase-1 does not reduce or modify oxidation of phospholipids by peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 2005;38:164-74.
217. Teiber JF, Draganov DI, La Du BN. Purified human serum PON1 does not protect LDL against oxidation in the in vitro assays initiated with copper or AAPH. *J Lipid Res* 2004;45:2260-8.
218. Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:921-7.
219. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, Lusis AJ, Shih DM. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 2002;106:484-90.
220. Hayek T, Oiknine J, Brook JG, Aviram M. Increased plasma and lipoprotein lipid peroxidation in apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201:1567-74.



221. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Berliner JA, Witztum JL, Lusis AJ. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2000;275:17527-35.
222. Ng DS, Chu T, Esposito B, Hui P, Connelly PW, Gross PL. Paraoxonase-1 deficiency in mice predisposes to vascular inflammation, oxidative stress, and thrombogenicity in the absence of hyperlipidemia. *Cardiovasc Pathol* 2007.
223. Nieland TJ, Penman M, Dori L, Krieger M, Kirchhausen T. Discovery of chemical inhibitors of the selective transfer of lipids mediated by the HDL receptor SR-BI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15422-7.
224. Fuhrman B, Gantman A, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) deficiency in mice is associated with reduced expression of macrophage SR-BI and consequently the loss of HDL cytoprotection against apoptosis. *Atherosclerosis* 2010.
225. Zhang C, Peng W, Wang M, Zhu J, Zang Y, Shi W, Zhang J, Qin J. Studies on protective effects of human paraoxonases 1 and 3 on atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Gene Ther* 2010;17:626-33.
226. Peng W, Zhang C, Lv H, Zhu J, Zang Y, Pang X, Zhang J, Qin J. Comparative evaluation of the protective potentials of human paraoxonase 1 and 3 against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury. *Toxicol Lett* 2010;193:159-66.
227. Marsillach J, Camps J, Ferre N, Beltran R, Rull A, Mackness B, Mackness M, Joven J. Paraoxonase-1 is related to inflammation, fibrosis and PPAR delta in experimental liver disease. *BMC Gastroenterol* 2009;9:3.
228. Mackness B, Quarck R, Verreth W, Mackness M, Holvoet P. Human Paraoxonase-1 Overexpression Inhibits Atherosclerosis in a Mouse Model of Metabolic Syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006.
229. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice. *Atherosclerosis* 2005;181:9-18.
230. Rosenblat M, Vaya J, Shih D, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 2005;179:69-77 Epub 2004 Dec 29.
231. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 1993;104:129-35.
232. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001;276:44444-9 Epub 2001 Sep 28.
233. Stoltz DA, Ozer EA, Ng CJ, Yu JM, Reddy ST, Lusis AJ, Bourquard N, Parsek MR, Zabner J, Shih DM. Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L852-60 Epub 2006 Nov 22.

234. Juhas M, Eberl L, Tummeler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* 2005;7:459-71.
235. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Paraoxonase 2 (PON2) expression is upregulated via a reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH)-oxidase-dependent mechanism during monocytes differentiation into macrophages. *Free Radic Biol Med* 2004;37:2052-63.
236. Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:468-74 Epub 2003 Jan 30.
237. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is up-regulated by pomegranate juice phenolic anti-oxidants via PPAR gamma and AP-1 pathway activation. *Atherosclerosis* 2007;195:313-21 Epub 2007 Feb 12.
238. Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Kruger M, Strand D, Forstermann U. Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation* 2007;115:2055-64 Epub 2007 Apr 2.
239. Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V, Hama S, Shih DM, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ, Young S, Reddy ST. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol Chem* 2006;281:29491-500 Epub 2006 Aug 4.
240. Ng CJ, Hama SY, Bourquard N, Navab M, Reddy ST. Adenovirus mediated expression of human paraoxonase 2 protects against the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Mol Genet Metab* 2006;89:368-73 Epub 2006 Aug 28.
241. Meilin E, Aviram M, Hayek T. Paraoxonase 2 (PON2) decreases high glucose-induced macrophage triglycerides (TG) accumulation, via inhibition of NADPH-oxidase and DGAT1 activity: Studies in PON2-deficient mice. *Atherosclerosis* 2009.
242. Rosenblat M, Coleman R, Reddy ST, Aviram M. Paraoxonase 2 attenuates macrophage triglyceride accumulation via inhibition of diacylglycerol acyltransferase 1. *J Lipid Res* 2009;50:870-9.
243. Willcox MD, Zhu H, Conibear TC, Hume EB, Givskov M, Kjelleberg S, Rice SA. Role of quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* in microbial keratitis and cystic fibrosis. *Microbiology* 2008;154:2184-94.
244. Horke S, Witte I, Altenhofer S, Wilgenbus P, Goldeck M, Forstermann U, Xiao J, Kramer GL, Haines DC, Chowdhary PK, Haley RW, Teiber JF. Paraoxonase 2 is downregulated by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone and attenuates oxidative stress induced by pyocyanin. *Biochem J* 2009.
245. Stoltz DA, Ozer EA, Recker TJ, Estin M, Yang X, Shih DM, Lusis AJ, Zabner J. A common mutation in paraoxonase-2 results in impaired lactonase activity. *J Biol Chem* 2009;284:35564-71.

246. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:542-7.
247. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000;275:33435-42.
248. Liu Y, Mackness B, Mackness M. Comparison of the ability of paraoxonases 1 and 3 to attenuate the in vitro oxidation of low-density lipoprotein and reduce macrophage oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2008;45:743-8.
249. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Wang SS, Bourquard N, Fogelman AM, Lusis AJ, Reddy ST. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ Res* 2007;100:1200-7 Epub 2007 Mar 22.
250. Teiber JF, Billecke SS, La Du BN, Draganov DI. Estrogen esters as substrates for human paraoxonases. *Arch Biochem Biophys* 2007;461:24-9 Epub 2007 Mar 8.
251. Lu H, Zhu J, Zang Y, Ze Y, Qin J. Cloning, purification, and refolding of human paraoxonase-3 expressed in *Escherichia coli* and its characterization. *Protein Expr Purif* 2006;46:92-9.
252. Labrecque B, Beaudry D, Mayhue M, Halle C, Bordignon V, Murphy BD, Palin MF. Molecular characterization and expression analysis of the porcine paraoxonase 3 (PON3) gene. *Gene* 2009;443:110-20.
253. Shih DM, Yu JM, Xia YR, Shi YS, Wang XP, Castellani L, Zhang P, Port Z, Champion MD, Ford DA, Reue K, Lusis AJ, . Altered Lipid Metabolism and Increased Atherosclerosis in the Paraoxonase 3 Knockout Mice. American Heart Association 2010;San Francisco.
254. Ng CJ, Bourquard N, Hama SY, Shih D, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Adenovirus-mediated expression of human paraoxonase 3 protects against the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1368-74 Epub 2007 Apr 19.
255. Peng W, Jiang X, Haiqin L, Zhang C, Zhu J, Zhang J, Zang Y, Qin J. Protective effects of transgene expressed human PON3 against CCl4-induced subacute liver injury in mice. *Biomed Pharmacother* 2009;63:592-8.
256. Shih DM, Xia YR, Yu JM, Lusis AJ. Temporal and Tissue-Specific Patterns of Pon3 Expression in Mouse: In situ Hybridization Analysis. *Adv Exp Med Biol* 2010;660:73-87.
257. Belteki G, Kempster SL, Forhead AJ, Giussani DA, Fowden AL, Curley A, Charnock-Jones DS, Smith GC. Paraoxonase-3, a Putative Circulating Antioxidant, Is Systemically Up-Regulated in Late Gestation in the Fetal Rat, Sheep, and Human. *J Clin Endocrinol Metab* 2010.
258. Ito T, Yasue H, Yoshimura M, Nakamura S, Nakayama M, Shimasaki Y, Harada E, Mizuno Y, Kawano H, Ogawa H. Paraoxonase gene Gln192Arg (Q192R) polymorphism is associated with coronary artery spasm. *Hum Genet* 2002;110:89-94.

259. Zintzaras E, Hadjigeorgiou GM. Association of paraoxonase 1 gene polymorphisms with risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2004;49:474-81.
260. Hofer SE, Bennetts B, Chan AK, Holloway B, Karschimkus C, Jenkins AJ, Silink M, Donaghue KC. Association between PON 1 polymorphisms, PON activity and diabetes complications. *J Diabetes Complications* 2006;20:322-8.
261. Karban A, Hartman C, Eliakim R, Waterman M, Nesher S, Barnett-Griness O, Shamir R. Paraoxonase (PON)1 192R allele carriage is associated with reduced risk of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2007;52:2707-15.
262. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993;52:598-608.
263. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993;3:73-6.
264. Leviev I, James RW. Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:516-21.
265. Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 1996;14:334-6.
266. Rainwater DL, Rutherford S, Dyer TD, Rainwater ED, Cole SA, Vandenberg JL, Almasy L, Blangero J, Maccluer JW, Mahaney MC. Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. *Heredity* 2009;102:147-54.
267. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet* 2001;68:1428-36 Epub 2001 May 2.
268. Leviev I, Negro F, James RW. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2935-9.
269. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983;35:1126-38.
270. Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics* 2001;11:77-84.
271. Deakin S, Leviev I, Brulhart-Meynet MC, James RW. Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position -107, implicating the Sp1 transcription factor. *Biochem J* 2003;372:643-9.
272. Suehiro T, Nakamura T, Inoue M, Shiinoki T, Ikeda Y, Kumon Y, Shindo M, Tanaka H, Hashimoto K. A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis* 2000;150:295-8.

273. Ginsberg G, Neafsey P, Hattis D, Guyton KZ, Johns DO, Sonawane B. Genetic polymorphism in paraoxonase 1 (PON1): Population distribution of PON1 activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009;12:473-507.
274. Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. *Circ Cardiovasc Genet* 2008;1:147-52.
275. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett* 1998;423:57-60.
276. Gaidukov L, Rosenblat M, Aviram M, Tawfik DS. The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux. *J Lipid Res* 2006;47:2492-502.
277. Leviev I, Kalix B, Brulhart Meynet MC, James RW. The paraoxonase PON1 promoter polymorphism C(-107)T is associated with increased serum glucose concentrations in non-diabetic patients. *Diabetologia* 2001;44:1177-83.
278. Leviev I, Righetti A, James RW. Paraoxonase promoter polymorphism T(-107)C and relative paraoxonase deficiency as determinants of risk of coronary artery disease. *J Mol Med* 2001;79:457-63.
279. Leviev I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Kee F, Arveiler D, Morrisson C, Cambien F, James RW. High expressor paraoxonase PON1 gene promoter polymorphisms are associated with reduced risk of vascular disease in younger coronary patients. *Atherosclerosis* 2002;161:463-7.
280. Leus FR, Zwart M, Kastelein JJ, Voorbij HA. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis* 2001;154:641-9.
281. Pan JP, Lai ST, Chiang SC, Chou SC, Chiang AN. The risk of coronary artery disease in population of Taiwan is associated with Cys-Ser 311 polymorphism of human paraoxonase (PON)-2 gene. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 2002;65:415-21.
282. Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW, Hanley AJ, Harris SB, Tsui LC, Zinman B. Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3373-7.
283. Mackness B, McElduff P, Mackness MI. The paraoxonase-2-310 polymorphism is associated with the presence of microvascular complications in diabetes mellitus. *J Intern Med* 2005;258:363-8.
284. Shi J, Zhang S, Tang M, Liu X, Li T, Han H, Wang Y, Guo Y, Zhao J, Li H, Ma C. Possible association between Cys311Ser polymorphism of paraoxonase 2 gene and late-onset Alzheimer's disease in Chinese. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;120:201-4.
285. Janka Z, Juhasz A, Rimanoczy AA, Boda K, Marki-Zay J, Kalman J. Codon 311 (Cys --> Ser) polymorphism of paraoxonase-2 gene is associated with

- apolipoprotein E4 allele in both Alzheimer's and vascular dementias. *Mol Psychiatry* 2002;7:110-2.
286. Campo S, Sardo AM, Campo GM, Avenoso A, Castaldo M, D'Ascola A, Giunta E, Calatroni A, Saitta A. Identification of paraoxonase 3 gene (PON3) missense mutations in a population of southern Italy. *Mutat Res* 2004;546:75-80.
  287. Sanghera DK, Manzi S, Minster RL, Shaw P, Kao A, Bontempo F, Kamboh MI. Genetic variation in the paraoxonase-3 (PON3) gene is associated with serum PON1 activity. *Ann Hum Genet* 2008;72:72-81.
  288. Isik B, Ceylan A, Isik R. Oxidative stress in smokers and non-smokers. *Inhal Toxicol* 2007;19:767-9.
  289. Mouhamed DH, Ezzaher A, Araoud M, Neffati F, Douki W, Fadhel Najjar M. [Paraoxonase 1 (PON1) activity and lipid parameters in Tunisian smokers]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2010;68:143-7.
  290. Solak ZA, Kabaroglu C, Cok G, Parildar Z, Bayindir U, Ozmen D, Bayindir O. Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people. *Clin Exp Med* 2005;5:99-105.
  291. Rantala M, Silaste ML, Tuominen A, Kaikkonen J, Salonen JT, Alfthan G, Aro A, Kesaniemi YA. Dietary modifications and gene polymorphisms alter serum paraoxonase activity in healthy women. *J Nutr* 2002;132:3012-7.
  292. Kleemola P, Freese R, Jauhiainen M, Pahlman R, Alfthan G, Mutanen M. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis* 2002;160:425-32.
  293. Boesch-Saadatmandi C, Egert S, Schrader C, Coumol X, Barouki R, Muller MJ, Wolfram S, Rimbach G. Effect of quercetin on paraoxonase 1 activity--studies in cultured cells, mice and humans. *J Physiol Pharmacol* 2010;61:99-105.
  294. Rao MN, Marmillot P, Gong M, Palmer DA, Seeff LB, Strader DB, Lakshman MR. Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. *Metabolism* 2003;52:1287-94.
  295. Prakash M, Shetty JK, Tripathy S, Verma M, Vasudev S, Bhandary PV. Serum paraoxonase in alcohol abusers associated with alcoholic liver disease. *Clin Chim Acta* 2007;378:232-4.
  296. Belleville J. The French paradox: possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases. *Nutrition* 2002;18:173-7.
  297. Fuhrman B, Aviram M. Preservation of paraoxonase activity by wine flavonoids: possible role in protection of LDL from lipid peroxidation. *Ann N Y Acad Sci* 2002;957:321-4.
  298. Gouedard C, Barouki R, Morel Y. Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 2004;24:5209-22.
  299. Khateeb J, Gantman A, Kreitenberg AJ, Aviram M, Fuhrman B. Paraoxonase 1 (PON1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: A role for PPAR-gamma pathway. *Atherosclerosis* 2009.

300. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein: studies in vitro and in diabetic patients. *Nutrition* 2010;26:359-66.
301. Casper RF, Quesne M, Rogers IM, Shiota T, Jolivet A, Milgrom E, Savouret JF. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol Pharmacol* 1999;56:784-90.
302. Gouedard C, Barouki R, Morel Y. Induction of the paraoxonase-1 gene expression by resveratrol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2378-83 Epub 2004 Sep 30.
303. Sarandol E, Tas S, Dirican M, Serdar Z. Oxidative stress and serum paraoxonase activity in experimental hypothyroidism: effect of vitamin E supplementation. *Cell Biochem Funct* 2005;23:1-8.
304. Jeon SM, Park YB, Kwon OS, Huh TL, Lee WH, Do KM, Park T, Choi MS. Vitamin E supplementation alters HDL-cholesterol concentration and paraoxonase activity in rabbits fed high-cholesterol diet: comparison with probucol. *J Biochem Mol Toxicol* 2005;19:336-46.
305. Jarvik GP, Tsai NT, McKinstry LA, Wani R, Brophy VH, Richter RJ, Schellenberg GD, Heagerty PJ, Hatsukami TS, Furlong CE. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1329-33.
306. Calla MS, Lynch SM. Vitamin C preserves the cardio-protective paraoxonase activity of high-density lipoprotein during oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* 2006;452:129-37.
307. Ahlemeyer B, Bauerbach E, Plath M, Steuber M, Heers C, Tegtmeier F, Krieglstein J. Retinoic acid reduces apoptosis and oxidative stress by preservation of SOD protein level. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1067-77.
308. Gatica LV, Vega VA, Zirulnik F, Oliveros LB, Gimenez MS. Alterations in the lipid metabolism of rat aorta: effects of vitamin a deficiency. *J Vasc Res* 2006;43:602-10 Epub 2006 Oct 13.
309. Aksoy N, Aksoy M, Bagci C, Gergerlioglu HS, Celik H, Herken E, Yaman A, Tarakcioglu M, Soydinc S, Sari I, Davutoglu V. Pistachio intake increases high density lipoprotein levels and inhibits low-density lipoprotein oxidation in rats. *Tohoku J Exp Med* 2007;212:43-8.
310. Perez Mendez O, Garcia Hernandez L. [High-density lipoproteins (HDL) size and composition are modified in the rat by a diet supplemented with "Hass" avocado (*Persea americana* Miller)]. *Arch Cardiol Mex* 2007;77:17-24.
311. Sun X, Seeberger J, Alberico T, Wang C, Wheeler CT, Schauss AG, Zou S. Acai palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. *Exp Gerontol* 2010;45:243-51.
312. Rock W, Rosenblat M, Borochoy-Neori H, Volkova N, Judeinstein S, Elias M, Aviram M. Effects of date ( *Phoenix dactylifera* L., Medjool or Hallawi Variety) consumption by healthy subjects on serum glucose and lipid levels and on serum oxidative status: a pilot study. *J Agric Food Chem* 2009;57:8010-7.

313. Park SA, Choi MS, Jung UJ, Kim MJ, Kim DJ, Park HM, Park YB, Lee MK. *Eucommia ulmoides* Oliver leaf extract increases endogenous antioxidant activity in type 2 diabetic mice. *J Med Food* 2006;9:474-9.
314. Cheng CC, Hsueh CM, Liang KW, Ting CT, Wen CL, Hsu SL. Role of JNK and c-Jun signaling pathway in regulation of human serum paraoxonase-1 gene transcription by berberine in human HepG2 cells. *Eur J Pharmacol* 2010.
315. Mikhailidis DP, Papadakis JA, Ganotakis ES. Smoking, diabetes and hyperlipidaemia. *J R Soc Health* 1998;118:91-3.
316. Hedrick CC, Hassan K, Hough GP, Yoo JH, Simzar S, Quinto CR, Kim SM, Dooley A, Langi S, Hama SY, Navab M, Witztum JL, Fogelman AM. Short-term feeding of atherogenic diet to mice results in reduction of HDL and paraoxonase that may be mediated by an immune mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1946-52.
317. Balogh Z, Seres I, Harangi M, Kovacs P, Kakuk G, Paragh G. Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates? *Diabetes Metab* 2001;27:604-10.
318. Paragh G, Seres I, Harangi M, Balogh Z, Illyes L, Boda J, Szilvassy Z, Kovacs P. The effect of micronised fenofibrate on paraoxonase activity in patients with coronary heart disease. *Diabetes Metab* 2003;29:613-8.
319. Blatter Garin MC, Moren X, James RW. Paraoxonase-1 and serum concentrations of HDL-cholesterol and apoA-I. *J Lipid Res* 2006;47:515-20 Epub 2005 Dec 3.
320. De Geest B, Stengel D, Landeloos M, Lox M, Le Gat L, Collen D, Holvoet P, Ninio E. Effect of overexpression of human apo A-I in C57BL/6 and C57BL/6 apo E-deficient mice on 2 lipoprotein-associated enzymes, platelet-activating factor acetylhydrolase and paraoxonase. Comparison of adenovirus-mediated human apo A-I gene transfer and human apo A-I transgenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E68-75.
321. Moore RE, Navab M, Millar JS, Zimetti F, Hama S, Rothblat GH, Rader DJ. Increased atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein A-I attributable to both impaired reverse cholesterol transport and increased inflammation. *Circ Res* 2005;97:763-71.
322. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, Fonarow GC, Cardinez CJ, Castellani LW, Brennan ML, Lusis AJ, Fogelman AM, La Du BN. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest* 1997;99:2005-19.
323. Thomas-Moya E, Gianotti M, Proenza AM, Llado I. Paraoxonase 1 response to a high-fat diet: gender differences in the factors involved. *Mol Med* 2007;13:203-9.
324. Dhar P, Chattopadhyay K, Bhattacharyya D, Roychoudhury A, Biswas A, Ghosh S. Antioxidative effect of conjugated linolenic acid in diabetic and non-diabetic blood: an in vitro study. *J Oleo Sci* 2006;56:19-24.
325. Kim YJ, Chung HY. Antioxidative and anti-inflammatory actions of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in renal epithelial cells and macrophages. *J Med Food* 2007;10:225-31.



326. Grotto D, Vicentini J, Friedmann Angeli JP, Francisco Latorraca E, Pontes Monteiro PA, Mazzaron Barcelos GR, Somacal S, Emanuelli T, Barbosa F, Jr. Evaluation of protective effects of fish oil against oxidative damage in rats exposed to methylmercury. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010.
327. Kudchodkar BJ, Lacko AG, Dory L, Fungwe TV. Dietary fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. *J Nutr* 2000;130:2427-33.
328. Sutherland WH, Walker RJ, de Jong SA, van Rij AM, Phillips V, Walker HL. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1340-7.
329. de Roos NM, Schouten EG, Scheek LM, van Tol A, Katan MB. Replacement of dietary saturated fat with trans fat reduces serum paraoxonase activity in healthy men and women. *Metabolism* 2002;51:1534-7.
330. Drissi A, Girona J, Cherki M, Godas G, Derouiche A, El Messal M, Saile R, Kettani A, Sola R, Masana L, Adlouni A. Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). *Clin Nutr* 2004;23:1159-66.
331. Cherki M, Derouiche A, Drissi A, El Messal M, Bamou Y, Idrissi-Ouadghiri A, Khalil A, Adlouni A. Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: Intervention study in healthy men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15:352-60 Epub 2005 Jul 1.
332. Cakmak A, Zeyrek D, Atas A, Erel O. Paraoxonase activity in athletic adolescents. *Pediatr Exerc Sci* 2010;22:93-104.
333. Hamurcu Z, Saritas N, Baskol G, Akpınar N. Effect of wrestling exercise on oxidative DNA damage, nitric oxide level and paraoxonase activity in adolescent boys. *Pediatr Exerc Sci* 2010;22:60-8.
334. Koncsos P, Seres I, Harangi M, Illyes I, Jozsa L, Gonczi F, Bajnok L, Paragh G. Human paraoxonase-1 activity in childhood obesity and its relation to leptin and adiponectin levels. *Pediatr Res* 2010;67:309-13.
335. Seres I, Bajnok L, Harangi M, Sztanek F, Koncsos P, Paragh G. Alteration of PON1 Activity in Adult and Childhood Obesity and Its Relation to Adipokine Levels. *Adv Exp Med Biol* 2010;660:129-42.
336. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995;96:2758-67.
337. Van Lenten BJ, Wagner AC, Nayak DP, Hama S, Navab M, Fogelman AM. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza a infection. *Circulation* 2001;103:2283-8.
338. Han CY, Chiba T, Campbell JS, Fausto N, Chaisson M, Orasanu G, Plutzky J, Chait A. Reciprocal and coordinate regulation of serum amyloid A versus apolipoprotein A-I and paraoxonase-1 by inflammation in murine hepatocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1806-13 Epub 2006 May 18.

339. Kumon Y, Nakauchi Y, Suehiro T, Shiinoki T, Tanimoto N, Inoue M, Nakamura T, Hashimoto K, Sipe JD. Proinflammatory cytokines but not acute phase serum amyloid A or C-reactive protein, downregulate paraoxonase 1 (PON1) expression by HepG2 cells. *Amyloid* 2002;9:160-4.
340. Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Grunfeld C. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 1998;139:307-15.
341. Van Lenten BJ, Wagner AC, Navab M, Fogelman AM. Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. *J Biol Chem* 2001;276:1923-9 Epub 2000 Oct 16.
342. Kumon Y, Suehiro T, Ikeda Y, Hashimoto K. Human paraoxonase-1 gene expression by HepG2 cells is downregulated by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but is upregulated by interleukin-6. *Life Sci* 2003;73:2807-15.
343. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999;26:892-904.
344. Jaouad L, Milochevitch C, Khalil A. PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. *Free Radic Res* 2003;37:77-83.
345. Nguyen SD, Sok DE. Oxidative inactivation of paraoxonase1, an antioxidant protein and its effect on antioxidant action. *Free Radic Res* 2003;37:1319-30.
346. Karabina SA, Lehner AN, Frank E, Parthasarathy S, Santanam N. Oxidative inactivation of paraoxonase--implications in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2005;1725:213-21.
347. Trudel K, Sinnett D, James RW, Delvin E, Amre D, Seidman E, Levy E. Iron-ascorbic acid-induced oxidant stress and its quenching by paraoxonase 1 in HDL and the liver: comparison between humans and rats. *J Cell Biochem* 2005;96:404-11.
348. Krzystek-Korpacka M, Boehm D, Matusiewicz M, Diakowska D, Grabowski K, Gamian A. Paraoxonase 1 (PON1) status in gastroesophageal malignancies and associated paraneoplastic syndromes - Connection with inflammation. *Clin Biochem* 2008.
349. Farid AS, Nakahara K, Murakami N, Hayashi T, Horii Y. Decreased serum paraoxonase-1 activity during intestinal nematode (*Nippostrongylus brasiliensis*) infection in rats. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78:770-6.
350. Franco-Pons N, Marsillach J, Joven J, Camps J, Closa D. Serum paraoxonase undergoes inhibition and proteolysis during experimental acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2008;12:891-9.
351. Isik A, Koca SS, Ustundag B, Selek S. Decreased total antioxidant response and increased oxidative stress in Behcet's disease. *Tohoku J Exp Med* 2007;212:133-41.

352. Kedage V, Muttigi MS, Shetty MS, Suvarna R, Rao SS, Joshi C, Prakash M. Serum paraoxonase 1 activity status in patients with liver disorders. *Saudi J Gastroenterol* 2010;16:79-83.
353. Kowalski J, Pawlicki L, Grycewicz J, Blaszczyk J, Irzmanski R, Ceglinski T, Kowalczyk E. Plasma antioxidative activity during atorvastatin and fluvastatin therapy used in coronary heart disease primary prevention. *Fundam Clin Pharmacol* 2004;18:93-6.
354. Bolayirli IM, Aslan M, Balci H, Altug T, Hacibekiroglu M, Seven A. Effects of atorvastatin therapy on hypercholesterolemic rabbits with respect to oxidative stress, nitric oxide pathway and homocysteine. *Life Sci* 2007;81:121-7 Epub 2007 May 6.
355. Tomas M, Senti M, Garcia-Faria F, Vila J, Torrents A, Covas M, Marrugat J. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2113-9.
356. Harangi M, Seres I, Varga Z, Emri G, Szilvassy Z, Paragh G, Remenyik E. Atorvastatin effect on high-density lipoprotein-associated paraoxonase activity and oxidative DNA damage. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;60:685-91 Epub 2004 Oct 14.
357. Kassai A, Illyes L, Mirdamadi HZ, Seres I, Kalmar T, Audikovszky M, Paragh G. The effect of atorvastatin therapy on lecithin:cholesterol acyltransferase, cholesteryl ester transfer protein and the antioxidant paraoxonase. *Clin Biochem* 2007;40:1-5 Epub 2006 Jun 9.
358. Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2083-9 Epub 2003 Sep 18.
359. Deakin S, Guernier S, James RW. Pharmacogenetic interaction between paraoxonase-1 gene promoter polymorphism C-107T and statin. *Pharmacogenet Genomics* 2007;17:451-7.
360. Ota K, Suehiro T, Arii K, Ikeda Y, Kumon Y, Osaki F, Hashimoto K. Effect of pitavastatin on transactivation of human serum paraoxonase 1 gene. *Metabolism* 2005;54:142-50.
361. Arii K, Suehiro T, Ikeda Y, Kumon Y, Inoue M, Inada S, Takata H, Ishibashi A, Hashimoto K, Terada Y. Role of protein kinase C in pitavastatin-induced human paraoxonase I expression in Huh7 cells. *Metabolism* 2010.
362. Gouedard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y. Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 2003;63:945-56.
363. Nezami N, Ghorbanihaghjo A, Argani H, Safa J, Rashtchizadeh N, Vatankhah AM, Salari B, Hajhosseini B. Lovastatin enhances paraoxonase enzyme activity and quells low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in type 2 diabetic nephropathy. *Clin Biochem* 2010.
364. Nagila A, Permpongpaiboon T, Tantrarongroj S, Porapakkham P, Chinwattana K, Deakin S, Porntadavity S. Effect of atorvastatin on paraoxonase1 (PON1) and oxidative status. *Pharmacol Rep* 2009;61:892-8.

365. Sardo MA, Campo S, Bonaiuto M, Bonaiuto A, Saitta C, Trimarchi G, Castaldo M, Bitto A, Cinquegrani M, Saitta A. Antioxidant effect of atorvastatin is independent of PON1 gene T(-107)C, Q192R and L55M polymorphisms in hypercholesterolaemic patients. *Curr Med Res Opin* 2005;21:777-84.
366. Beltowski J, Wojcicka G, Mydlarczyk M, Jamroz A. The effect of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPARalpha) agonist, fenofibrate, on lipid peroxidation, total antioxidant capacity, and plasma paraoxonase 1 (PON 1) activity. *J Physiol Pharmacol* 2002;53:463-75.
367. Ackerman Z, Oron-Herman M, Rosenthal T, Pappo O, Link G, Sela BA, Grozovski M. Effects of amlodipine, captopril, and bezafibrate on oxidative milieu in rats with fatty liver. *Dig Dis Sci* 2008;53:777-84.
368. Durrington PN, Mackness MI, Bhatnagar D, Julier K, Prais H, Arrol S, Morgan J, Wood GN. Effects of two different fibric acid derivatives on lipoproteins, cholesteryl ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis* 1998;138:217-25.
369. Turay J, Grniakova V, Valka J. Changes in paraoxonase and apolipoprotein A-I, B, C-III and E in subjects with combined familiar hyperlipoproteinemia treated with ciprofibrate. *Drugs Exp Clin Res* 2000;26:83-8.
370. Yesilbursa D, Serdar A, Saltan Y, Serdar Z, Heper Y, Guclu S, Cordan J. The effect of fenofibrate on serum paraoxonase activity and inflammatory markers in patients with combined hyperlipidemia. *Kardiol Pol* 2005;62:526-30.
371. Paragh G, Seres I, Harangi M, Erdei A, Audikovszky M, Debreczeni L, Kovacsay A, Illyes L, Pados G. Ciprofibrate increases paraoxonase activity in patients with metabolic syndrome. *Br J Clin Pharmacol* 2006;61:694-701.
372. Coll B, van Wijk JP, Parra S, Castro Cabezas M, Hoepelman IM, Alonso-Villaverde C, de Koning EJ, Camps J, Ferre N, Rabelink TJ, Tous M, Joven J. Effects of rosiglitazone and metformin on postprandial paraoxonase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human immunodeficiency virus-infected patients with lipodystrophy. *Eur J Pharmacol* 2006;544:104-10.
373. van Wijk J, Coll B, Cabezas MC, Koning E, Camps J, Mackness B, Joven J. Rosiglitazone modulates fasting and post-prandial paraoxonase 1 activity in type 2 diabetic patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:1134-7.
374. Blatter-Garin MC, Kalix B, De Pree S, James RW. Aspirin use is associated with higher serum concentrations of the anti-oxidant enzyme, paraoxonase-1. *Diabetologia* 2003;46:593-4 Epub 2003 Mar 22.
375. Jaichander P, Selvarajan K, Garelnabi M, Parthasarathy S. Induction of paraoxonase 1 and apolipoprotein A1 gene expression by aspirin. *J Lipid Res* 2008.
376. Saisho Y, Komiya N, Hirose H. Effect of valsartan, an angiotensin II receptor blocker, on markers of oxidation and glycation in Japanese type 2 diabetic subjects: blood pressure-independent effect of valsartan. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;74:201-3 Epub 2006 Jun 5.

377. Spirou A, Rizos E, Liberopoulos EN, Kolaitis N, Achimastos A, Tselepis AD, Elisaf M. Effect of barnidipine on blood pressure and serum metabolic parameters in patients with essential hypertension: a pilot study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2006;11:256-61.
378. Noto H, Kawamura M, Hashimoto Y, Satoh H, Hara M, Iso-o N, Togo M, Kimura S, Tsukamoto K. Modulation of HDL metabolism by probucol in complete cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Atherosclerosis* 2003;171:131-6.
379. Hong SC, Zhao SP, Wu ZH. Probucool up-regulates paraoxonase 1 expression in hepatocytes of hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47:77-81.
380. Audikovszky M, Pados G, Seres I, Harangi M, Fulop P, Katona E, Winkler G, Paragh G. Changes in lipid profile and paraoxonase activity in obese patients as a result of orlistat treatment. *Orv Hetil* 2001;142:2779-83.
381. Turfaner N, Uzun H, Balci H, Ercan MA, Karter YH, Caner M, Sipahioglu F, Genc H. Ezetimibe therapy and its influence on oxidative stress and fibrinolytic activity. *South Med J* 2010;103:428-33.
382. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. A biphasic U-shape effect of cellular oxidative stress on the macrophage anti-oxidant paraoxonase 2 (PON2) enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349:1094-9.
383. Fortunato G, Di Taranto MD, Bracale UM, Del Guercio L, Carbone F, Mazzaccara C, Morgante A, D'Armiento FP, D'Armiento M, Porcellini M, Sacchetti L, Bracale G, Salvatore F. Decreased paraoxonase-2 expression in human carotids during the progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:594-600 Epub 2008 Feb 7.
384. Fuhrman B, Khateeb J, Shiner M, Nitzan O, Karry R, Volkova N, Aviram M. Urokinase plasminogen activator upregulates paraoxonase 2 expression in macrophages via an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1361-7.
385. Fuhrman B, Gantman A, Khateeb J, Volkova N, Horke S, Kiyani J, Dumler I, Aviram M. Urokinase activates macrophage PON2 gene transcription via the PI3K/ROS/MEK/SREBP-2 signalling cascade mediated by the PDGFR-beta. *Cardiovasc Res* 2009;84:145-54.
386. Boesch-Saadatmandi C, Pospissil RT, Graeser AC, Canali R, Boomgaarden I, Doering F, Wolfram S, Egert S, Mueller MJ, Rimbach G. Effect of Quercetin on Paraoxonase 2 Levels in RAW264.7 Macrophages and in Human Monocytes--Role of Quercetin Metabolism. *Int J Mol Sci* 2009;10:4168-77.
387. Yehuda I, Madar Z, Szuchman-Sapir A, Tamir S. Glabridin, a phytoestrogen from licorice root, up-regulates manganese superoxide dismutase, catalase and paraoxonase 2 under glucose stress. *Phytother Res* 2010.
388. Rosenblat M, Volkova N, Roqueta-Rivera M, Nakamura MT, Aviram M. Increased macrophage cholesterol biosynthesis and decreased cellular paraoxonase 2 (PON2) expression in Delta6-desaturase knockout (6-DS KO) mice: Beneficial effects of arachidonic acid. *Atherosclerosis* 2009.

389. Lim JA, Kim SH. Transcriptional activation of an anti-oxidant mouse Pon2 gene by dexamethasone. *BMB Rep* 2009;42:421-6.
390. Teiber JF, Draganov DI, La Du BN. Lactonase and lactonizing activities of human serum paraoxonase (PON1) and rabbit serum PON3. *Biochem Pharmacol* 2003;66:887-96.
391. Suchocka Z, Swatowska J, Pachecka J, Suchocki P. RP-HPLC determination of paraoxonase 3 activity in human blood serum. *J Pharm Biomed Anal* 2006;42:113-9.
392. Kelly D, Coutts AG. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *Proc Nutr Soc* 2000;59:177-85.
393. Sanchez R, Levy E, Seidman E, Amre D, Costea F, Sinnott D. Paraoxonase 1, 2 and 3 DNA variants and susceptibility to childhood inflammatory bowel disease. *Gut* 2006;55:1820-1.
394. Baskol G, Baskol M, Yurci A, Ozbakir O, Yucesoy M. Serum paraoxonase 1 activity and malondialdehyde levels in patients with ulcerative colitis. *Cell Biochem Funct* 2006;24:283-6.
395. Boehm D, Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Matusiewicz M, Berdowska I, Zielinski B, Paradowski L, Gamian A. Paraoxonase-1 status in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:93-9.
396. Rothem L, Hartman C, Dahan A, Lachter J, Eliakim R, Shamir R. Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellularly localized to the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med* 2007;43:730-739 Epub 2007 May 10.
397. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989;96:736-49.
398. Beaulieu JF, Quaroni A. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem J* 1991;280 ( Pt 3):599-608.
399. Mehran M, Levy E, Bendayan M, Seidman E. Lipid, apolipoprotein, and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997;33:118-28.
400. Mehran M, Seidman E, Marchand R, Gurbindo C, Levy E. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits lipid and lipoprotein transport by Caco-2 cells. *Am J Physiol* 1995;269:G953-60.
401. Courtois F, Seidman EG, Delvin E, Asselin C, Bernotti S, Ledoux M, Levy E. Membrane peroxidation by lipopolysaccharide and iron-ascorbate adversely affects Caco-2 cell function: beneficial role of butyric acid. *Am J Clin Nutr* 2003;77:744-50.
402. Grenier E, Maupas FS, Beaulieu JF, Seidman E, Delvin E, Sane A, Tremblay E, Garofalo C, Levy E. Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion, and apolipoprotein biogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G1178-89.
403. Gendron FP, Mongrain S, Laprise P, McMahon S, Dubois CM, Blais M, Asselin C, Rivard N. The CDX2 transcription factor regulates furin expression during

- intestinal epithelial cell differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G310-8.
404. Laprise P, Chailier P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ, Rivard N. Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 2002;277:8226-34.
405. Grasset E, Pinto M, Dussaulx E, Zweibaum A, Desjeux JF. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *Am J Physiol* 1984;247:C260-7.
406. Levy E, Stan S, Delvin E, Menard D, Shoulders C, Garofalo C, Slight I, Seidman E, Mayer G, Bendayan M. Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem* 2002;277:16470-7.
407. Mailhot G, Rabasa-Lhoret R, Moreau A, Berthiaume Y, Levy E. CFTR depletion results in changes in fatty acid composition and promotes lipogenesis in intestinal Caco 2/15 cells. *PLoS One* 2010;5:e10446.
408. Escaffit F, Pare F, Gauthier R, Rivard N, Boudreau F, Beaulieu JF. Cdx2 modulates proliferation in normal human intestinal epithelial crypt cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:66-72.
409. George SP, Wang Y, Mathew S, Srinivasan K, Khurana S. Dimerization and actin-bundling properties of villin and its role in the assembly of epithelial cell brush borders. *J Biol Chem* 2007;282:26528-41.
410. Benoit YD, Pare F, Francoeur C, Jean D, Tremblay E, Boudreau F, Escaffit F, Beaulieu JF. Cooperation between HNF-1alpha, Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;298:G504-17.
411. Schreider C, Peignon G, Thenet S, Chambaz J, Pincon-Raymond M. Integrin-mediated functional polarization of Caco-2 cells through E-cadherin-actin complexes. *J Cell Sci* 2002;115:543-52.
412. Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 1992;307:108-12.
413. Courtois F, Delvin E, Ledoux M, Seidman E, Lavoie JC, Levy E. The antioxidant BHT normalizes some oxidative effects of iron + ascorbate on lipid metabolism in Caco-2 cells. *J Nutr* 2002;132:1289-92.
414. Courtois F, Suc I, Garofalo C, Ledoux M, Seidman E, Levy E. Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G12-9.
415. Peretti N, Delvin E, Sinnott D, Marcil V, Garofalo C, Levy E. Asymmetrical regulation of scavenger receptor class B type I by apical and basolateral stimuli using Caco-2 cells. *J Cell Biochem* 2007;100:421-33.
416. Natarajan K, Singh S, Burke TR, Jr., Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9090-5.

417. Song JJ, Cho JG, Hwang SJ, Cho CG, Park SW, Chae SW. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on LPS-induced inflammation of human middle ear epithelial cells. *Acta Otolaryngol* 2008;128:1303-7.
418. Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, Meier CA, Bell DR, Kralli A, Giacobino JP, Deriaz O. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes* 2003;52:2874-81.
419. Mailhot G, Ravid Z, Barchi S, Moreau A, Rabasa-Lhoret R, Levy E. CFTR knockdown stimulates lipid synthesis and transport in intestinal Caco-2/15 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;297:G1239-49.
420. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 1991;26:853-6.
421. Bassaganya-Riera J, Hontecillas R. Dietary conjugated linoleic acid and n-3 polyunsaturated fatty acids in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13:569-73.
422. Lee JY, Kim JS, Kim JM, Kim N, Jung HC, Song IS. Simvastatin inhibits NF-kappaB signaling in intestinal epithelial cells and ameliorates acute murine colitis. *Int Immunopharmacol* 2007;7:241-8.
423. Adachi M, Kurotani R, Morimura K, Shah Y, Sanford M, Madison BB, Gumucio DL, Marin HE, Peters JM, Young HA, Gonzalez FJ. Peroxisome proliferator activated receptor gamma in colonic epithelial cells protects against experimental inflammatory bowel disease. *Gut* 2006;55:1104-13.
424. Sanchez-Hidalgo M, Martin AR, Villegas I, Alarcon De La Lastra C. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* 2005;69:1733-44.
425. Shah YM, Morimura K, Gonzalez FJ. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in macrophage suppresses experimentally induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G657-66.
426. Riccardi L, Mazzon E, Bruscoli S, Esposito E, Crisafulli C, Di Paola R, Caminiti R, Riccardi C, Cuzzocrea S. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha modulates the anti-inflammatory effect of glucocorticoids in a model of inflammatory bowel disease in mice. *Shock* 2009;31:308-16.
427. Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 1999;11:19-22.
428. Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 2000;164:966-72.
429. Ogle CK, Guo X, Hasselgren PO, Ogle JD, Alexander JW. The gut as a source of inflammatory cytokines after stimulation with endotoxin. *Eur J Surg* 1997;163:45-51.



430. Chakravorty D, Kumar KS. Modulation of barrier function of small intestinal epithelial cells by lamina propria fibroblasts in response to lipopolysaccharide: possible role in TNF $\alpha$  in inducing barrier dysfunction. *Microbiol Immunol* 1999;43:527-33.
431. Fukushima K, Sasaki I, Takahashi K, Naito H, Matsuno S. Lipopolysaccharide- and proinflammatory cytokine-induced energy production in intestinal and colonic epithelial cell lines. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:291-6.
432. Friswell M, Campbell B, Rhodes J. The role of bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gut Liver* 2010;4:295-306.
433. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:405-55.
434. Stadnyk AW. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can J Gastroenterol* 2002;16:241-6.
435. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205.
436. Lehmann GL, Carreras FI, Soria LR, Gradilone SA, Marinelli RA. LPS induces the TNF-alpha-mediated downregulation of rat liver aquaporin-8: role in sepsis-associated cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G567-75.
437. Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* 2001;169:453-9.
438. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 1997;46:1319-27.
439. Wang Q, Herrera-Ruiz D, Mathis AS, Cook TJ, Bhardwaj RK, Knipp GT. Expression of PPAR, RXR isoforms and fatty acid transporting proteins in the rat and human gastrointestinal tracts. *J Pharm Sci* 2005;94:363-72.
440. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is upregulated by unesterified cholesterol through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway. *Biol Chem* 2007;388:1353-8.
441. Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD. A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 1999;104:383-9.
442. Lytle C, Tod TJ, Vo KT, Lee JW, Atkinson RD, Straus DS. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand rosiglitazone delays the onset of inflammatory bowel disease in mice with interleukin 10 deficiency. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:231-43.
443. Halliwell B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathol Biol (Paris)* 1996;44:6-13.
444. Atreya R, Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005;28:187-96.

445. Motomura Y, Khan WI, El-Sharkawy RT, Verma-Gandhu M, Verdu EF, Gauldie J, Collins SM. Induction of a fibrogenic response in mouse colon by overexpression of monocyte chemoattractant protein 1. *Gut* 2006;55:662-70.
446. Banks C, Bateman A, Payne R, Johnson P, Sheron N. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pathol* 2003;199:28-35.
447. Gross V, Arndt H, Andus T, Palitzsch KD, Scholmerich J. Free radicals in inflammatory bowel diseases pathophysiology and therapeutic implications. *Hepatology* 1994;41:320-7.
448. Armstrong JS, Steinauer KK, Hornung B, Irish JM, Lecane P, Birrell GW, Peehl DM, Knox SJ. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ* 2002;9:252-63.
449. Haddad JJ. Glutathione depletion is associated with augmenting a proinflammatory signal: evidence for an antioxidant/pro-oxidant mechanism regulating cytokines in the alveolar epithelium. *Cytokines Cell Mol Ther* 2000;6:177-87.
450. Haddad JJ. L-Buthionine-(S,R)-sulfoximine, an irreversible inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase, augments LPS-mediated pro-inflammatory cytokine biosynthesis: evidence for the implication of an IkappaB-alpha/NF-kappaB insensitive pathway. *Eur Cytokine Netw* 2001;12:614-24.
451. Dwarakanath RS, Sahar S, Reddy MA, Castanotto D, Rossi JJ, Natarajan R. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by the oxidized lipid, 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid, in vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappa B (NF-kappa B). *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:585-95.
452. Altenhofer S, Witte I, Teiber JF, Wilgenbus P, Pautz A, Li H, Daiber A, Witan H, Clement AM, Forstermann U, Horke S. One enzyme, two functions: PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity. *J Biol Chem* 2010;285:24398-403.
453. Devarajan A, Bourquard N, Hama S, Navab M, Grijalva V, Morvardi S, Clarke C, Vergnes L, Reue K, Teiber JF, Reddy ST. Paraonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2010.
454. Taha R, Seidman E, Mailhot G, Boudreau F, Gendron FP, Beaulieu JF, Menard D, Delvin E, Amre D, Levy E. Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 cell line. *PLoS One* 2010;5:e11817.

## **Annexe I-Autres articles réalisés durant le doctorat**

1. Leblond F, Seidah N.G., **Précourt L.P.**, Delvin E, Dominguez M, Levy E. Regulation of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, Avril 2009, 296(4):G805-15.
2. Levy E, Lalonde G, Delvin E, Elchebly M, **Précourt L.P.**, Seidah N.G., Spahis S, Rabasa-Lhoret R, Ziv E. Intestinal and hepatic cholesterol carriers in diabetic Psammomys obesus. *Endocrinology*. Mars 2010, 151(3):958-70.
3. Marcil, V., Seidman, E., Sinnett, D., Boudreau, F., Gendron, F.P., Beaulieu, J.F., Ménard, D., **Précourt, L.P.**, Amre, D., Levy, E. Modification in oxidative stress, inflammation and lipoprotein assembly in response to hepatocyte nuclear factor 4 alpha knockdown in intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, Décembre 2010, 285(52):40448-60.

## Annexe II-Liste des présentations

1. Levy, E., **Précourt, L.P.**, Sanchez, R., Seidman, E., Amre, D., et D. Sinnett. 28 avril au 2 mai 2007. Paraoxonase 1, 2 and 3 DNA variants and susceptibility in inflammatory bowel disease. *Experimental Biology Annual Meeting* (FASEB), Washington D.C., États-Unis.
2. **Précourt, L.P.**, Delvin, E., Amre, D., Sinnett, D., Seidman, E. et E. Levy. 28 avril au 2 mai 2007. Intestinal paraoxonase regulation and its status in Crohn's disease. *Experimental Biology Annual Meeting* (FASEB), Washington D.C., États-Unis.
3. **Précourt, L.P.**, Delvin, E., Amre, D., Sinnett, D., Seidman, E. et E. Levy. 3 au 5 mai 2007. Régulation intestinale des paraoxonases et implication de leurs polymorphismes dans les maladies inflammatoires de l'intestin. *Société québécoise de lipidologie, nutrition et métabolisme*, Laval, Québec.
4. Lalonde, G., Delvin, E., Sané, A., Garofalo, C., **Précourt, L.P.**, Lambert, M. et E. Levy. 3 au 5 mai 2007. Transport du cholestérol au niveau hépatique et intestinal dans des conditions d'insulinorésistance et de diabète de type 2. *Société québécoise de lipidologie, nutrition et métabolisme*, Laval, Québec.
5. **Précourt, L.P.**, Delvin, E., Amre, D., Seidman, E., Sinnett, D. et E. Levy. 15-16 mai 2007. Régulation intestinale des paraoxonases : impact de l'inflammation et du stress oxydatif. *XXIIIe Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués du CHU-Ste-Justine*. Montréal, Québec.
6. Lalonde G, Delvin E, Sané A, Garofalo C, **Précourt L.P.**, Lambert M, Levy E. 15-16 mai 2007. Modulation de l'expression des transporteurs hépatiques et intestinaux du cholestérol chez le *Psammomys obesus*, un modèle animal du diabète de type 2. *XXIIIe Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués, CHU Ste-Justine*, Montréal, Québec.

7. Leblond F., Seidah N.G., **Précourt L.P.**, Sané A.T., Garofalo C., Delvin E. et E. Levy. 7-8 juin 2007. Le PCSK9 (proprotéine convertase subtilisin/kexin type 9), un nouveau joueur clé dans l'homéostasie intestinale du cholestérol ? *6e Symposium de physiopathologie du tube digestif*, Sherbrooke, Québec.

8. **Précourt L.P.**, Sanchez, R., Delvin E., Amre, D. Seidman, E., Sinnett, D. et E. Levy. 7-8 juin 2007. Impact de l'inflammation et du stress oxydant sur les paraoxonases au niveau intestinal et altération des HDL dans la maladie de Crohn. *6e Symposium de physiopathologie du tube digestif*, Sherbrooke, Québec.

9. Leblond F., Seidah N.G., **Précourt L.P.**, Sané A.T., Garofalo C., Delvin E. et E. Levy. 14-15 juin 2007. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) overexpression modulates key cholesterol players of the small intestine. *3rd International Symposium on Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*, Montréal, Québec.

10. **Précourt L.P.**, Sanchez, R., Delvin E., Amre, D. Seidman, E., Sinnett, D. et E. Levy. 14-15 juin 2007. Modulation of the three paraoxonase variants in the small intestine. *3rd International Symposium on Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*, Montréal, Québec.

11. Leblond F., **Précourt, L.P.**, Delvin E., Elchebly M., Seidah N.G., Ziv E. et E. Levy. 5 au 9 avril 2008. Role and regulation of the proprotein convertase subtilisin /kexin type 9 (PCSK9) in the small intestine. *Experimental Biology Annual Meeting (FASEB)*, San Diego, Californie, États-Unis.

12. **Précourt L.P.**, Delvin E., Amre, D., Sinnett, D., Seidman, E. et E. Levy. 5 au 9 avril 2008. Modulation of the human paraoxonase gene family members by various effectors in Caco-2 cells. *Experimental Biology Annual Meeting (FASEB)*, San Diego, Californie, États-Unis.

13. Leblond F., **Précourt, L.P.**, Sané, A.T., Seidah N.G., Delvin E. et E. Levy. 1 au 3 mai 2008. Régulation du PCSK9 par des effecteurs dans les cellules intestinales Caco-2/15. *9e congrès annuel de la Société Québécoise de Lipidologie, Nutrition et Métabolisme (SQLNM)*, Laval, Québec.

14. **Précourt, L.P.**, Bendayan, M., Delvin, E., Leblond, F., Seidman, E., Sinnett, D. et E. Levy. 1 au 3 mai 2008. Les paraoxonases 1, 2 et 3 sont modulées distinctement par le stress oxydant et l'inflammation. *9e congrès annuel de la Société Québécoise de Lipidologie, Nutrition et Métabolisme (SQLNM)*, Laval, Québec.

15. Cammisotto, P.G., Sané, A.T., Leblond F., Garofalo, C., Lalonde, G., **Précourt, L.P.**, Bendayan, M. et E. Levy. 1 au 3 mai 2008. Mécanisme de transport de la leptine au travers d'une monocouche de cellules intestinales humaines CaCo-2. *9e congrès annuel de la Société Québécoise de Lipidologie, Nutrition et Métabolisme (SQLNM)*, Laval, Québec.

16. **Précourt L.P.**, Delvin E, Amre D, Sinnett D et Levy E. Juin 2008. Modulation des paraoxonases 1, 2 et 3 par différents effecteurs dans les cellules Caco-2/15. *XXIIIe Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués, CHU Ste-Justine*, Montréal, Québec.

17. **Précourt L.P.**, Bendayan, M, Delvin E, Leblond, F Amre D, Seidman E, Sinnett D et Levy E. Juin 2008. Les paraoxonases dans l'intestin : implication dans le stress oxydant et l'inflammation. *7<sup>e</sup> Symposium de Physiopathologie du tube digestif "Compréhension des fonctions de l'épithélium digestif, une ouverture vers de nouvelles thérapies"*. Orford, Québec.

18. Leblond F, Perreault N, Delvin E, Camisotto P, **Précourt L.P.**, Sané, AT, Seidah NG, et Levy E. Juin 2008. PCSK9 comme nouveau joueur clé de l'homéostasie du cholestérol: Régulation dans le modèle intestinal Caco-2/15. *7<sup>e</sup> Symposium de Physiopathologie du tube*

*digestif ''Compréhension des fonctions de l'épithélium digestif, une ouverture vers de nouvelles thérapies''*. Orford, Québec.

19. Cammisotto PG, Sané AT, Leblond F, Garofalo C, Lalonde G, **Précourt L.P.**, Bendayan M et Levy E. Juin 2008. Transcytose de la leptine au moyen de son récepteur membranaire dans les cellules Caco-2. *7<sup>e</sup> Symposium de Physiopathologie du tube digestif ''Compréhension des fonctions de l'épithélium digestif, une ouverture vers de nouvelles thérapies''*. Orford, Québec.

20. Cammisotto PG, Bendayan M, Lalonde G, **Précourt L.P.**, Garofalo C, Levy E. 29 avril au 2 mai 2009. Contrôle de la synthèse des récepteurs de la leptine par les nutriments et les hormones dans les cellules caco-2. *10<sup>e</sup> réunion annuelle de la Société Québécoise de Lipidologie, Métabolisme et Nutrition*, Quebec.

21. **Précourt L.P.**, Ntimbane T, Taha R, Delvin E, Levy E. 29 avril au 2 mai 2010. Impact de l'inactivation de la paraoxonase 2 sur la réponse antioxydante de la cellule intestinale. *11<sup>e</sup> réunion annuelle de la Société Québécoise de Lipidologie, Métabolisme et Nutrition*, Québec.

22. Harmel E, Laville M, Garofalo C, Grenier E, Ben Djouddi Ouadda A, **Précourt L.P.**, Levy E. 29 avril au 2 mai 2010. Rôles et régulation de l'AMPK intestinale, une cible potentielle pour le traitement des dyslipidémies diabétiques. *11<sup>e</sup> réunion annuelle de la Société Québécoise de Lipidologie, Métabolisme et Nutrition*, Québec.

23. **Précourt L.P.**, Ntimbane T, Taha R, Delvin E, Levy E. 28 avril 2010. Anti-oxidative and anti-inflammatory properties of paraoxonases: Do these enzymes represent potential bioscavengers for IBD? *13th annual CARL GORESKY RESEARCH DAY*, Montréal, Québec.

24. **Précourt L.P.**, Ntimbane T, Rame T, Delvin E, Levy E. Mai 2010. Rôle antioxydant de la paraoxonase 2 dans la cellule intestinale. *XXVe Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués, CHU Ste-Justine, Montréal, Québec.*

25. Harmel E, Laville M, Garofalo C, Grenier E, Ben Djouddi Ouadda A, **Précourt L.P.**, Levy E. Mai 2010. Caractérisation de l'AMPK dans l'intestin: une cible potentielle pour le traitement des dyslipidémies diabétiques. *XXVe Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués, CHU Ste-Justine, Montréal, Québec.*



## **Annexe III-Liste des bourses obtenues**

2010	Bourse d'excellence de la Fondation des étoiles pour la recherche pédiatrique
2010	Bourse de présentation à un congrès, Département de Nutrition, Université de Montréal
2008	Bourse de la Faculté des Études Supérieures pour les étudiants au doctorat
2008	Bourse de présentation à un congrès, Département de Nutrition, Université de Montréal
2007	Bourse de formation de doctorat, FRSQ
2007	Bourse du Centre de recherche du CHU-Ste-Justine pour les étudiants au doctorat

