

**UNIVERSITE DE NANTES**

---

**FACULTE DE MEDECINE**

---

**Année 2006**

**N°128**

**THESE**

pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

Par

**Julien Geay**

Né le 1<sup>er</sup> décembre 1977 à Nantes

Présentée et soutenue publiquement le 16 octobre 2006

---

**CARACTÉRISTIQUES FONCTIONNELLES ET MOLÉCULAIRES  
DE LA BARRIÈRE ÉPITHÉLIALE OESOPHAGIENNE DANS LE  
REFLUX. CORRÉLATIONS AVEC L'EXPOSITION ACIDE ET NON  
ACIDE DE L'OESOPHAGE**

---

Président : Monsieur le Professeur Jean-Paul Galmiche

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Stanislas Bruley des  
Varannes

# **TABLE DES MATIÈRES**

Liste des abreviations.....	3
revue generale .....	4
1 Introduction .....	4
2 Les mécanismes tissulaires de défense au cours du RGO .....	4
A La paroi oesophagienne .....	4
B Facteurs de défense pré-épithéliaux .....	6
C Facteurs de défense épithéliaux.....	8
D Facteurs de défense post-épithéliaux.....	10
3 Facteurs d'agression épithéliale .....	11
A Acide et pepsine .....	11
B Contenu duodéal .....	12
C Mécanismes d'action .....	15
4 Phénotype RGO et réponse immune et inflammatoire .....	15
FIGURES ET TABLEAU .....	20
REFERENCES .....	27
ETUDE PERSONNELLE.....	35
1 Introduction .....	36
2 Matériel et méthodes .....	37
A Population étudiée .....	37
B Explorations réalisées (figure 1) .....	38
C Analyse statistique.....	46
3 Résultats.....	47
A Population étudiée .....	47
B Résultats des explorations (tableau I) .....	47
C) C Résultats de la perméabilité et des analyses transcriptomiques .....	49
4 Discussion .....	51
FIGURES ET TABLEAU.....	55
REFERENCES .....	62

## LISTE DES ABREVIATIONS

RGO	Reflux Gastro-Oesophagien
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
RDG	Reflux Duodéno-Gastrique
RDGO	Reflux Duodéno-Gastro-Oesophagien
IPP	Inhibiteur de la Pompe à Protons
IL	Interleukine
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein type 1</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and presumably Secreted</i>
IFN $\gamma$	Interferon gamma
PAF	<i>Platelet-Activated Factor</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
BEO	Barrière Epithéliale Oesophagienne
ZO-1	Zonula Occludens type 1
FOGD	Fibroscopie Oeso-Gastro-Duodénale
SIO	Sphincter Inférieur de l'Oesophage
IS	Indice de Spécificité
SAP	<i>Symptom Association Probability</i>
IP	Indice de Probabilité
EAO	Exposition Acide Oesophagienne
EOB	Exposition Oesophagienne à la Bilirubine
EORI	Exposition Oesophagienne au Reflux d'Impédance

# REVUE GENERALE

## 1 INTRODUCTION

Le reflux du contenu gastrique dans l'œsophage à travers la jonction oeso-gastrique, jusque dans la lumière oesophagienne, est un phénomène physiologique. La physiopathologie du reflux gastro-oesophagien (RGO) est multifactorielle et résulte d'un déséquilibre entre des mécanismes protecteurs et des facteurs d'agression de la muqueuse oesophagienne. Dans le RGO, les principaux mécanismes de prévention et de protection reposent sur a) la barrière mécanique oeso-gastrique naturelle formée par le sphincter inférieur de l'œsophage et la pince diaphragmatique, b) la motricité gastro-intestinale (vidange gastrique, péristaltisme oesophagien primaire et secondaire) [1], c) la paroi oesophagienne (le mucus, l'épithélium et ses jonctions intercellulaires, la lamina propria et ses vaisseaux sanguins, la sous muqueuse et ses glandes), et d) la sécrétion salivaire riche en bicarbonates tamponnant les ions acides.

L'objectif de cette revue est de préciser les mécanismes tissulaires de défense et de la réponse inflammatoire au cours du RGO.

## 2 LES MÉCANISMES TISSULAIRES DE DÉFENSE AU COURS DU RGO

### *A La paroi oesophagienne*

La paroi oesophagienne est constituée de 5 couches : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et l'adventice (figure 1). Cette organisation est retrouvée tout au long du tube digestif.

La muqueuse comprend l'épithélium, constitué de plusieurs couches de cellules épithéliales malpighiennes non kératinisantes (20 à 30 couches cellulaires) recouvrant le chorion, associées à quelques cellules spécialisées telles des mélanocytes, des cellules endocrines ou des cellules de Langerhans situés dans la couche profonde de l'épithélium.

L'épithélium oesophagien est constitué d'une couche basale (*stratum germinativum*), site de la prolifération épithéliale, avec des cellules à haut rapport nucléo-cytoplasmique, avec un cytoplasme basophile et un noyau rond et sombre. La couche basale mesure habituellement moins de 10 à 15 % de la hauteur totale de l'épithélium. En réponse à un stimulus agressif, cette couche basale est capable d'augmenter sa prolifération cellulaire. Différentes couches successives surmontent cette basale avec des cellules de plus en plus différenciées, qui s'aplatissent, avec un noyau plus petit et allongé et un cytoplasme rempli d'inclusions de phospholipides et de glycogène. Ces couches peuvent être séparées en 2 zones, principalement le *stratum spinosum* constituant la zone médiane de l'épithélium avec des cellules métaboliquement actives et le *stratum corneum* constitué de 5 à 10 couches de cellules en voie d'apoptose (figure 2).

Le chorion ou *lamina propria*, situé entre l'épithélium et la *muscularis mucosae*, est un tissu conjonctif contenant des vaisseaux et quelques lymphocytes épars. Il s'insinue par endroit dans l'épithélium, réalisant des papilles conjonctives, dont la hauteur ne doit normalement pas excéder les deux-tiers de l'épaisseur de l'épithélium. La sous-muqueuse est le tissu conjonctif et vasculaire de la paroi oesophagienne, contenant par ailleurs un riche réseau lymphatique, quelques cellules inflammatoires polymorphes, quelques follicules lymphoïdes, des fibres nerveuses (complexe de Meissner compris) et des glandes sous muqueuses responsables de la sécrétion du mucus. La musculature est faite de 2 couches, une couche longitudinale externe et une couche circulaire interne, encadrant le plexus myentérique. Cette couche musculaire propre est intimement liée à la musculature cricopharyngienne pour le segment proximal, et à la musculature gastrique pour le segment distal. Contrairement aux autres segments du tube digestif, l'œsophage est dépourvu de séreuse, ce qui explique la rapidité et l'importance de la dissémination des infections et des tumeurs.

Les modifications macroscopiques de la muqueuse oesophagienne en cas de RGO sont celles retrouvées en endoscopie (oesophagite, endobrachyoesophagite et leurs complications).

Les lésions histologiques du RGO ont été décrites il y a une vingtaine d'années [2]. On peut observer des défauts de l'épithélium correspondant aux érosions endoscopiques, une hypertrophie de la basale dépassant les 20 % de la hauteur de l'épithélium, une hypertrophie des papilles mesurant plus des deux-tiers de l'épithélium, un infiltrat muqueux inflammatoire polymorphe à prédominance de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. D'autres critères ont été décrits par certains auteurs comme la dilatation des vaisseaux papillaires, la présence de cellules ballonnées, l'acanthose (épithélium mesurant plus de 0,4 mm de hauteur), la présence intraépithéliale de cellules de Langerhans ou dendritiques (plus de 2 par champ), l'hyperexpression de la protéine p53 (positive dans plus de 5 % de l'épithélium en immunohistochimie), et la dilatation des espaces intercellulaires (tableau I) [3].

### *B Facteurs de défense pré-épithéliaux*

#### 1) La couche de mucus

Le mucus est présent à la surface de toutes les muqueuses. Son rôle est essentiel dans la protection de l'épithélium vis-à-vis des infections, des substrats ingérés, des molécules sécrétées (enzymes protéolytiques, ion hydrogène...). L'épaisseur de la couche protectrice au niveau oesophagien est bien inférieure à celle de l'estomac ou du duodénum : elle mesure  $95 \pm 12 \mu\text{m}$  d'épaisseur. C'est le premier moyen de défense opposé au reflux. Son rôle est limité, comme en atteste son pouvoir tampon vis-à-vis des ions  $\text{H}^+$  avec gradient de pH de 2 à 7 au niveau gastrique, et de 2 à 3 au niveau oesophagien (figure 3) [4].

Le pouvoir protecteur du mucus est lié à sa composition. Celle-ci est incomplètement connue. Son principal composant est la mucine, molécule glycoprotéique, associée à d'autres constituants protéiques et polypeptidiques, et en particulier le facteur de croissance épidermique oesophagien (EGF) [5,6]. Les études animales ont montré que les cellules épithéliales in vivo ou ex vivo soumises à l'acide en présence d'EGF, étaient moins lésées, proliféraient plus et surexprimaient les récepteurs à l'EGF et les canaux échangeurs d'ions  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  type 1. La supplémentation orale en cas d'EGF déficitaire (exérèse des glandes

salivaires chez l'animal), rétablissait la protection de l'épithélium et empêchait la constitution des lésions muqueuses ; cette dernière constatation n' étant pas extrapolable à l'homme du fait d'une sécrétion d'EGF possible directement au niveau de la basale de l'épithélium et des capillaires intra-papillaires d'un œsophage normal, en plus de la sécrétion par les glandes sous-muqueuses et salivaires[7]. La part polypeptidique de la mucine constitue environ 30% de la molécule, avec un contenu important en thréonine, sérine et proline, et plus faible en tyrosine. Les hydrates de carbone constituent 70% de la molécule avec une prédominance de galactose (33,2%), associé à de la N-acétylglucosamine (25,9%), du fucose (24,5%) et de l'acide N-acétylneuraminique (4,1%). Cette composition est originale car très différente de la salive ou de la mucine du surfactant gastrique. La variabilité de ce mucus en période d'agression par l'acide a été étudié chez l'animal et chez l'homme. Il a été ainsi montré qu'il existait une sécrétion active et permanente des glandes sous muqueuses oesophagiennes, modulée selon la composition du liquide agressant la muqueuse (sérum physiologique, acide ou acide et pepsine associés). En effet, le pH acide diminuait la sécrétion de mucine par les glandes sous muqueuses et/ou diminuait le renouvellement de la mucine au sein de la couche de mucus, le tout en maintenant voire augmentant sa viscosité. La viscosité n'était donc pas liée uniquement au contenu en mucine, et d'autres molécules y contribuaient. Si celles-ci étaient connues au niveau du mucus gastrique : immunoglobulines A, prostaglandines, lipides et en particulier phospholipides, aucune étude n'avait été réalisée au niveau oesophagien. La pepsine quant à elle, agissait par l'intermédiaire de son action protéolytique avec comme résultante la libération des différents composants du mucus et la diminution de sa viscosité[8]. Ce surfactant muqueux a donc une utilité limitée mais réelle dans la protection de l'épithélium. Il participe au renforcement des défenses de l'œsophage, et en cas de défaillance qualitative et/ou quantitative du mucus, les risques d'oesophagite sont plus importants (figure 4) [9].

## 2) La salive

La couche protectrice muqueuse oesophagienne n'est pas seulement le fait de la sécrétion des glandes sous muqueuses. En effet, les glandes salivaires sécrètent une salive riche en bicarbonates, utiles pour le tamponnement du milieu vis-à-vis des ions  $H^+$  présents dans le liquide de reflux. Embryologiquement, le lien est fort entre les glandes sous muqueuses et les glandes salivaires, notamment les glandes accessoires de l'oropharynx, puisque les glandes sous muqueuses en proviennent. L'implication de la salive dans la défense contre les phénomènes de RGO a été démontrée par plusieurs études qui ont déterminé la réponse sécrétoire au niveau oesophagien et salivaire, à l'aide de cathéters aspiratifs, suite à un stimulus mécanique (ballon gonflé dans l'œsophage) et chimique (instillation d'acide et de pepsine). La réponse sécrétoire salivaire était intense, couplée à une sécrétion épithéliale des glandes sous muqueuses, quelle que soit la nature du stimulus. La réponse salivaire était médiée par un réflexe oeso-salivaire, via le système sympathique et parasympathique [10-13].

A cet effet chimique tampon, se surajoute un effet de clairance volumique, avec efflux de salive vers l'estomac, médié par le péristaltisme oesophagien [14-16].

### *C Facteurs de défense épithéliaux.*

La fonction de barrière épithéliale nécessite une structure complexe associant des cellules épithéliales avec principalement une bi-couche lipidique hydrophobe constituant la membrane cellulaire, directement au contact avec les substances contenues dans le reflux. Ces cellules sont assemblées entre elles par des complexes jonctionnels. Ces complexes sont composés par des jonctions intercellulaires (desmosomes, jonctions serrées ou zonula occludens, molécules d'adhésions) et d'une substance intercellulaire *mucine-like*. Associés à ces mécanismes structurels de défense, des mécanismes luttent contre l'acidification intracellulaire, par l'intermédiaire de l'effet tampon des ions  $HCO_3^-$  et grâce à la capacité des cellules à expulser les ions  $H^+$  dans le secteur interstitiel paracellulaire où ils sont tamponnés par les ions  $HCO_3^-$  présents, et absorbés par le flux sanguin local des vaisseaux de la *lamina propria*. Agnone et al ont montré l'existence de transporteurs  $Na^+/H^+$  au niveau de la face

basale des cellules épithéliales oesophagiennes, permettant l'expulsion d'ions  $H^+$  en échange d'ions sodium  $Na^+$ . L'énergie nécessaire au fonctionnement de ces transporteurs est fournie par le gradient transmembranaire en sodium (riche en extracellulaire et pauvre en intra cellulaire), lui-même créé par l'activité des pompes membranaires  $Na^+/K^+$  ATPase. Ce mécanisme protecteur permet de lutter contre l'acidose intracellulaire, facteur majeur de nécrose épithéliale [17,18]. Ces transporteurs  $Na^+/H^+$  jouent un rôle privilégié dans la protection de l'épithélium par l'intermédiaire de l'EGF, capable de les activer *via* la phosphorylation du domaine cytoplasmique ou par interaction avec le domaine régulateur de ce transporteur [6,19,20].

L'effet tampon lié aux ions  $HCO_3^-$  est directement dépendant de l'apport de ces ions au niveau épithélial. Cependant, l'épithélium oesophagien est pas capable d'en synthétiser[21], et donc seule une diffusion paracellulaire est possible, via les vaisseaux sanguins de la *lamina propria*. Les ions  $HCO_3^-$  ont 4 niveaux d'action possibles. Le premier permet de les apporter au niveau des glandes sous muqueuses, puis de les relarguer dans un deuxième temps au niveau du mucus pré-épithélial. Le deuxième mode d'action est celui de la diffusion paracellulaire vers le mucus. En troisième lieu, les ions  $HCO_3^-$  peuvent rester au niveau paracellulaire, mécanisme particulièrement important car le passage et l'extrusion cellulaire d'ions  $H^+$  se fait préférentiellement au niveau paracellulaire. Enfin, le quatrième niveau d'action est intracellulaire, où les ions  $HCO_3^-$  exercent leur effet tampon après pénétration dans la cellule grâce aux échangeurs ioniques  $Cl^-/HCO_3^-$ , dépendants du gradient transmembranaire en  $Na^+$  (figure 5) [22].

A côté des mécanismes de protection chimique de l'épithélium oesophagien, il existe un mécanisme cellulaire de défense face aux variations d'osmolarité, notamment lors des épisodes de RGO. Cet effet protecteur paraît lié à une diminution du volume cellulaire en réponse à l'hypo-osmolarité environnante, habituellement responsable d'une lyse cellulaire. Ce moyen de défense a été étudié *in vitro*, par Orlando et al, en mesurant la taille des cellules constituant l'épithélium. Cet effet régulateur a été ensuite analysé en présence d'inhibiteurs spécifiques de pompes responsables des flux ioniques transmembranaires. Il a

été observé que ce facteur protecteur de l'épithélium était sous-tendu par la perte cytosolique d'ions chlore et potassium via 2 mécanismes différents : une chute rapide de la concentration en chlore et potassium par l'intermédiaire de pompes spécifiques les rejetant en extra cellulaire (maintien de l'équilibre électrochimique) et une action plus lente aboutissant au même résultat grâce à un cotransporteur de chlorure de potassium [23].

#### *D Facteurs de défense post-épithéliaux*

##### 1) *La lamina propria*

Située entre l'épithélium et la *muscularis mucosae*, la *lamina propria* constitue le tissu conjonctif et vasculaire sous-épithélial. Les vaisseaux sanguins sont essentiels dans la défense face aux agressions du liquide refluant, puisqu'ils sont responsables de l'apport exclusif d'ions  $\text{HCO}_3^-$  au sein de l'épithélium oesophagien, incapable d'en réaliser la synthèse [21]. Ces ions bicarbonates sont extrêmement importants grâce à leur effet tampon pour limiter l'effet délétère de l'acide sur la muqueuse oesophagienne, et ceci par les différents mécanismes exposés plus haut. L'apport d'ions  $\text{HCO}_3^-$  semble uniquement dépendant du système vasculaire sous-épithélial qui permet en outre l'apport d'agents protecteurs tels l' $\text{O}_2$ , des substrats nécessaires au métabolisme cellulaire, des ions bicarbonates  $\text{HCO}_3^-$ . Il détoxifie aussi l'épithélium en réabsorbant du  $\text{CO}_2$ , des ions  $\text{H}^+$ . Toutes ces fonctions participent à l'équilibre acide-base des tissus et à la diminution ou à l'absence de survenue des lésions épithéliales (figure 6).

De plus, il existe un mécanisme adaptatif de ce système vasculaire avec augmentation du flux sanguin en cas d'exposition acide oesophagienne chez l'animal et augmentation couplée de la capacité d'apport en ions  $\text{HCO}_3^-$ , permettant de répondre à une demande temporaire plus importante au moment des épisodes de RGO [24,25].

##### 2) *La sous-muqueuse*

La participation de la sous-muqueuse dans la défense de l'intégrité épithéliale se résume à ses glandes sécrétants le mucus. Ces glandes forment des rangées longitudinales

sur toute la hauteur de l'œsophage, avec une prédominance au niveau des 2 extrémités de l'œsophage ; elles sont en continuité avec les glandes salivaires accessoires de l'oropharynx. Leur canal excréteur est oblique vers la lumière du bas œsophage. Les cellules glandulaires contiennent des mucines neutres, sialylées et sulfatés, alors que l'épithélium du canal excréteur est plutôt riche en cytokératines [26]. La sécrétion des glandes sous-muqueuses est continue, mais elle peut varier en fonction de différents stimuli mécaniques ou chimiques, à l'instar des glandes salivaires vues précédemment [10-13].

### 3 FACTEURS D'AGRESSION ÉPITHÉLIALE

L'acidité gastrique a été le premier facteur mis en cause dans les lésions dues au RGO, et notamment l'hypersécrétion acide, avec comme corollaire la baisse du pH intragastrique et l'augmentation du volume gastrique. Le rôle de l'hypersécrétion acide gastrique dans le RGO reste discuté. Zentlin et al n'avaient pas trouvé de corrélation entre la fréquence du reflux et le pH intragastrique [27]. De plus, Hirschowitz et al avaient montré, dans une étude randomisée et contrôlée, que la quantité d'acide ou de pepsine sécrétés dans l'estomac n'était pas corrélée au grade de l'oesophagite, et qu'elle était identique quelles que soient les lésions [28]. Seule la sécrétion acide post-prandiale semblait être augmentée chez les sujets ayant un RGO, avec une corrélation à l'exposition acide oesophagienne [29,30]. Globalement, il ne semble donc pas que la sécrétion acide gastrique ait un rôle majeur dans le RGO. En revanche, la nature des agents refluant paraît importante. En effet, leurs toxicités sont diverses et variables en fonction de leurs associations. L'acide et la pepsine sont les plus connus, mais les sécrétions duodénales ont été plus étudiées ces dernières années et semblent impliquées dans d'autres situations physiopathologiques.

#### *A Acide et pepsine*

L'importance de l'acide et de la pepsine dans la survenue des lésions de la muqueuse oesophagienne est bien connue chez l'animal. Dès 1959, Redo et al ont publié

une étude montrant l'induction d'une oesophagite chez le chien en cas d'instillation associée de pepsine et d'acide, alors que la muqueuse résistait macroscopiquement à l'acide seul [31]. Ces données ont été confirmées par la suite, et associées à une altération de la perméabilité de la muqueuse [32].

Le rôle majeur de la pepsine dans la destruction cellulaire épithéliale a été largement conforté par la suite. Tobey et al ont montré la différence de destruction tissulaire que pouvait induire la pepsine sur l'épithélium oesophagien, par l'intermédiaire de l'étude de la résistance trans-épithéliale et de la perméabilité en chambre de Ussing. La pepsine induisait des lésions épithéliales plus rapides et irréversibles par rapport à l'acide seul, caractérisées par une diminution de la résistance et une augmentation de la perméabilité. De plus cette action était pH dépendant, puisqu'une différence n'apparaissait que lorsque le pH était inférieur à 3 [33]. Ces données *in vitro* étaient concordantes avec celles observées *in vivo* chez l'animal [34,35]. L'atteinte de la perméabilité était aussi observée en l'absence de lésions épithéliales au microscope, suggérant une action plutôt paracellulaire de la pepsine, et vraisemblablement au niveau des complexes jonctionnels intercellulaires (enzyme protéolytique), du fait d'une action lytique sur l'épithélium entier et non sur des cellules en suspension dépourvues de jonctions intercellulaires.

Chez l'homme, le rôle de l'acide et de la pepsine dans la pathogénie des symptômes et des lésions, a pu être étudié grâce aux innovations technologiques (test de Bernstein, pH-impédancemétrie, cathéters aspiratifs). La concentration en acide et en pepsine au niveau de l'œsophage, l'importance du degré d'acidité (pH<4) et le temps passé à pH<4 ont été corrélés à l'importance des symptômes et des lésions d'oesophagite, ainsi qu'aux autres complications du RGO [36-38].

### *B Contenu duodéal*

Le contenu duodéal peut se trouver associé au liquide gastrique, par l'intermédiaire du reflux trans-pylorique. Le liquide duodéal comprend la bile et les sécrétions pancréatiques. Le reflux duodéno-gastrique (RDG) ou duodéno-gastro-oesophagien (RDGO)

est un processus physiologique observé chez le volontaire sain en période post-prandiale et nocturne [39]. Plusieurs études avec des méthodologies souvent imparfaites, ont établi un rôle du RDG dans la survenue de gastrites, d'ulcères gastriques, d'une dyspepsie et de lésions d'oesophagite [36,40-43]. Les éléments potentiellement impliqués dans cette toxicité muqueuse étaient les acides biliaires, la trypsine et la lysolécitine [44-46].

Le rôle toxique des sécrétions duodénales a été largement étudié sur des modèles animaux. Dans ces modèles, les acides biliaires entraînaient une oesophagite de sévérité variable. Cette toxicité était directement liée à leur caractère conjugué et au pH du milieu associé. C'est ce qu'avait montré Harmon et al avec l'instillation de sels biliaires conjugués ou non conjugués, au niveau d'un œsophage animal, en variant l'acidité du milieu, et en étudiant l'intensité de la destruction muqueuse par sa perméabilité ; les acides biliaires conjugués étaient alors plus délétères à pH acide <2, alors que les non conjugués l'étaient à pH 5-8 [47]. Kivilaakso et al, toujours par des instillations oesophagiennes, ont confirmé ces données et ont de plus montré l'effet toxique de la trypsine à pH 7, toxicité aggravée par la présence concomitante d'acides biliaires non conjugués [48,49].

Chez l'homme, le caractère agressif du contenu duodéal sur la muqueuse oesophagienne a d'abord été suspecté chez les patients gastrectomisés [50]. Le rôle du RDG dans la constitution de lésions de la muqueuse oesophagienne est difficile à établir. Le caractère imparfait ou inadapté des méthodes de mesure utilisées initialement (scintigraphie, pHmétrie), rend peu fiables les résultats de ces études. Actuellement, l'analyse de la présence de bilirubine (un des principaux constituants de la bile) par méthode spectrophotométrique, permet de détecter de façon plus fiable le RDGO (données spectrophotométriques proportionnelles à la concentration en bilirubine, elle-même corrélée à la concentration des différents composants du liquide duodéal) [51,52].

Le RDGO peut être observé chez le sujet sain et chez les patients ayant un RGO. Cependant, il semble exister une augmentation croissante de la fréquence des reflux de bilirubine et de reflux acide avec la gravité du RGO en termes de complications morphologiques endoscopiques (endoscopie normale, oesophagite, endobrachyoesophage

non compliqué ou compliqué). De plus les deux types de reflux acide et bilieux étaient associés dans 76 % des épisodes de reflux, quelle que soit la gravité endoscopique du RGO [53]. Ces données orientent vers un rôle aggravant du RDGO, en association à un reflux acide.

Vaezi et al, ainsi que d'autres auteurs, ont par la suite confirmé et enrichi ces données avec la survenue d'oesophagite uniquement en cas de reflux mixte (acide et bilieux) pathologique, et non pas en cas de reflux bilieux isolé. Ainsi, le contenu duodénal ne semble agressif qu'en milieu acide [54-57,61]. En revanche, le reflux bilieux isolé peut engendrer des symptômes de nature différente (type dyspepsie : pesanteur post-prandiale, nausées, vomissements), de ceux développés en cas de reflux mixte (type RGO : pyrosis, régurgitations, brûlure épigastrique) [57]. De plus, la fréquence et le délai d'apparition de ces symptômes semblent varier en fonction du type d'acide biliaire instillé [58]. D'autres études ont confirmé cette plus grande fréquence des lésions du bas œsophage en cas de reflux acide et de RDGO associés, intensité du reflux corrélée avec la gravité des lésions oesophagiennes [59,60].

L'autre rôle suspecté du RDGO sur la muqueuse oesophagienne concernait son impact sur la survenue d'une métaplasie épithéliale, d'un endobrachyoesophage, ainsi qu'un rôle possible mais non démontré dans la carcinogénèse.

L'impact du RDGO isolé sur la muqueuse oesophagienne semble donc faible. Cependant, il peut être augmenté en cas de traitement par inhibiteur de la pompe à protons (IPP) avec des épisodes de reflux plus prolongés [62].

Toutes ces études ont permis de mieux comprendre certaines interactions entre les composants du liquide refluant. L'organigramme suivant résume ces interactions avec la mise en évidence d'effets synergiques entre : a) la pepsine et des acides biliaires conjugués ou la lysolécithine avec l'acide à pH 2-4 et entre les acides biliaires non conjugués et la trypsine ; b) d'une inhibition de la toxicité des acides biliaires non conjugués et de la trypsine à pH acide (figure 7).

### C Mécanismes d'action

Pour la trypsine et la pepsine, l'effet protéolytique constitue le mécanisme principal de destruction directe de l'épithélium par lyse de la substance intercellulaire et des protéines de surface cellulaires qui permettent la cohésion de cet épithélium pluristratifié [63,64].

L'acide joue un rôle toxique direct, et un rôle potentialisateur sur les enzymes protéolytiques actives à pH 2-3 pour la pepsine et 5-8 pour la trypsine. La toxicité directe, s'exerce par le biais des pompes ioniques responsables de l'homéostasie transmembranaire avec une inactivation des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase des faces basocellulaires du *stratum spinosum* et une activation des pompes amiloride-  $\text{Na}^+$ . Ces modifications du flux transmembranaire entraînent une accumulation d'ions  $\text{Na}^+$  dans la cellule, responsable d'une augmentation du volume cellulaire, puis de la mort cellulaire [65,66]. En outre, le pH acide permet d'inhiber la régulation du volume cellulaire, mécanisme protecteur physiologique du stress hypo-osmolaire au niveau de l'épithélium oesophagien [23,67].

Les mécanismes d'action de la bile ont été moins étudiés. Deux mécanismes ont été décrits, l'un par l'intermédiaire de l'action détergente directe par solubilisation des lipides membranaires des cellules épithéliales, hypothèse suspectée du fait de la restitution de phospholipides et de cholestérol au niveau de la lumière oesophagienne [68,69], l'autre faisant intervenir les propriétés lipophiles naturelles des acides biliaires, permettant leur entrée au sein de la muqueuse, puis leur toxicité par désorganisation de la structure membranaire ou par interférence avec les fonctions cellulaires. Cette solubilisation des lipides membranaires et du mucus favorise de surcroît la pénétration et l'action des autres composants du liquide refluant (acide et pepsine notamment), entraînant une toxicité plus importante et plus profonde.

## 4 PHÉNOTYPE RGO ET RÉPONSE IMMUNE ET INFLAMMATOIRE

Les 3 degrés lésionnels endoscopiques observés au cours du reflux, œsophage normal, œsophagite et endobrachyoesophage ont souvent été considérés comme un

*continuum* ; l'endobrachyoesophage et sa complication principale l'adénocarcinome correspondant alors à l'événement terminal de l'aggravation des lésions de RGO. Un modèle conceptuel plus récent considère un aspect non évolutif entre ces trois formes, les 3 sous-groupes constituant des entités distinctes (reflux non érosif, oesophagite et endobrachyoesophage) [70]. Ces formes différentes seraient médiées par une réponse immunitaire et inflammatoire différente, à l'instar des maladies inflammatoires digestives et des réactions immunes TH1 ou TH2.

Plusieurs médiateurs de l'inflammation ont été étudiés au cours du RGO et en particulier des chémokines (Interleukine (IL) 1 $\beta$ , 4, 6, 8, 10, MCP-1 ou Monocyte Chemoattractant Protein type 1 ; RANTES ou Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and presumably Secreted, IFN  $\gamma$  ou Interferon gamma, Prostaglandines type E2, PAF ou Platelet-Activating Factor), mais aussi des récepteurs comme ceux de l'IL-8 type CXCR 1 et 2, et des régulateurs de l'expression de certains gènes comme NF- $\kappa$ B. Quelques études ont validé leurs prédominances en fonction de la présence ou non d'un RGO et de son phénotype.

L'Interleukine 8 est la chémokine la plus étudiée. Sa présence au sein de la muqueuse oesophagienne est significativement augmentée en cas de RGO avec ou sans oesophagite par rapport à des volontaires sains et aux patients ayant un endobrachyoesophage. Ainsi, sa concentration, mesurée par RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction), était 3 à 10 fois plus importante en cas d'oesophagite érosive qu'en cas de RGO non érosif ou d'endobrachyoesophage. De plus, la concentration épithéliale en IL-8 semble proportionnelle aux lésions endoscopiques d'oesophagite ; également les taux les plus élevés d'IL-8 ont été trouvés associés à certaines anomalies histologiques comme l'hyperplasie de la basale, l'élongation des papilles et l'infiltrat à polynucléaires neutrophiles [70-73]. Ces associations suggèrent un rôle chémoattractant de l'IL-8 sur les polynucléaires neutrophiles (déjà décrit in vitro [74,75], eux-mêmes responsables de la production de radicaux libres de l'oxygène et de monoxyde d'azote. Ces substances peuvent induire des lésions de l'épithélium, comme cela a été observé dans un

modèle d'œsophagite chez le lapin [76,77]. De plus L'IL-8 stimule la prolifération épithéliale. Cette réaction pourrait avoir un effet protecteur vis à vis du reflux, mais elle pourrait aussi jouer un rôle dans les phénomènes de carcinogenèse liés à l'hyperprolifération cellulaire. Tant ces modifications histologiques IL-8 dépendantes que les concentrations muqueuses d'IL-8 sont résolutive après un traitement IPP de 8 semaines [72,73].

Les récepteurs à l'IL-8, les CXCR-1 et CXCR-2, sont exprimés au sein de la muqueuse de l'épithélium oesophagien, qu'il y ait ou non un RGO, et ce quelle que soit la sévérité des lésions d'œsophagite. Ces récepteurs ne sont pas spécifiques, mais leur affinité pour l'IL-8 est 2 à 5 fois plus élevée que pour d'autres ligands (Growth Related Oncogene  $\alpha$  par exemple). Le rôle exact de ces récepteurs dans le RGO est mal connu, mais ils facilitent probablement la pénétration des cellules inflammatoires au sein de l'épithélium. Dans ces études, leurs présences n'étaient cependant pas associées à la survenue d'une œsophagite [71,73,78].

Le rôle de NF- $\kappa$ B dans la régulation de l'IL-8 et notamment de ses gènes semble important. Chez l'animal et chez l'homme en situation d'exposition acide oesophagienne pathologique, NF- $\kappa$ B amplifie l'expression du gène de l'IL-8 suite à un stimulus par des cytokines inflammatoires type IL-1 ou par des radicaux libres de l'oxygène [73,79]. Ces études montrent une surexpression des protéines NF- $\kappa$ B localisées préférentiellement au niveau du noyau des cellules épithéliales, alors que leur expression est habituellement cytoplasmique, suggérant une interaction de ces protéines dans la régulation de l'expression de l'IL-8.

Toutes ces données permettent de déduire une des cascades de réactions impliquant l'IL-8 et conduisant à l'atteinte de l'épithélium (figure 8).

Les niveaux des cytokines MCP-1 et de RANTES dans la muqueuse oesophagienne sont significativement plus élevés chez les malades ayant une œsophagite que chez les sujets sains. Les taux de MCP-1 et RANTES sont corrélés à ceux de l'IL-8 ; cependant, à la différence de l'IL-8, leurs concentrations ne semblent pas corrélées à la sévérité des lésions endoscopiques. La concentration de MCP-1 est aussi plus élevée en cas d'anomalie

histologique à type d'hyperplasie de la basale et d'élongation des papilles (suggérant une action stimulante sur la prolifération cellulaire à l'instar de l'IL-8) ; la concentration de RANTES semble plus élevée en cas d'infiltrat à polynucléaires éosinophiles, peut-être en raison de son rôle chémoattractant vis-à-vis des éosinophiles.

Bien que le stimulus responsable de l'augmentation de synthèse de ces chémokines, reste inconnu, ces résultats expliquent en partie la présence d'éosinophiles au sein de la muqueuse oesophagienne et précisent les différents types de cytokines responsables de la modification et de l'altération de l'épithélium en cas de RGO.

Plusieurs études animales ont cherché à préciser l'action d'autres molécules ou mécanismes impliqués dans le RGO. Cheng et al ont étudié le type de cytokines libérées par la muqueuse, ainsi que leurs interactions et effets sur les contractions du muscle oesophagien. Un modèle animal de « sac muqueux » a permis de recueillir et d'analyser le surfactant contenant les différentes cytokines sécrétées en présence ou non d'acide. Dans un deuxième temps, le tissu musculaire oesophagien était incubé dans ce surfactant, et ses contractions en réponse à un stimulus étaient enregistrées. L'exposition acide entraînait la production d'IL-1 $\beta$  et de PAF. Le PAF était lui responsable de la sécrétion d'IL-6 en intra-muqueux, le tout étant relargué dans la lumière oesophagienne et diffusant vers la couche musculaire circulaire, où ils entraînaient la formation de radicaux libres de l'oxygène par interaction avec la NADPH oxydase. Tous ces médiateurs inflammatoires intra-musculaires empêchaient la contraction musculaire en inhibant la libération d'acétylcholine par les neurones cholinergiques oesophagiens (figure 9) [80,81].

Les récentes données de réponse immunitaire et inflammatoire renforcent le concept nosologique actuel de sous-groupes distincts de RGO sans *continuum*, concept initialement suspecté devant l'absence de lien statistique entre ces différents stades (par exemple, l'oesophagite n'apparaissait pas comme étant un facteur de risque indépendant de la survenue d'un endobrachyoesophage [82]. Les raisons de ces réponses diverses au RGO restent mal comprises, excepté l'importance de l'exposition acide impliquée dans la gravité des lésions endoscopiques [53], avec cependant des fréquentes discordances entre les

résultats d'exposition acide, non acide, bilieuse et le degré d'atteinte de la muqueuse oesophagienne [84]. L'étude de Fitzgerald et al a permis d'apporter un début de réponse physiopathologique à ce nouveau modèle conceptuel. L'étude de la réponse immunitaire était réalisée par immuno-histochimie et par la quantification de l'ARN des différentes cytokines par RT-PCR, sur des biopsies oesophagiennes de patients reflueurs. Le profil inflammatoire en cas d'oesophagite était constitué d'IL-8, d'IL-1 $\beta$  et d'INF- $\gamma$  (réponse immunologique type TH-1) et plus modérément d'IL-10, alors qu'en cas d'oesophage de Barrett, le profil de cytokines était plutôt de type TH-2 avec une prépondérance d'IL-4 et d'IL-10. Au total, il a été démontré pour la première fois que l'environnement immunitaire est différent en cas d'oesophagite et d'endobrachyoesophage, et qu'il pourrait être responsable des variations de phénotype en cas de RGO et parallèlement du risque de carcinogénèse [70].

## FIGURES ET TABLEAU

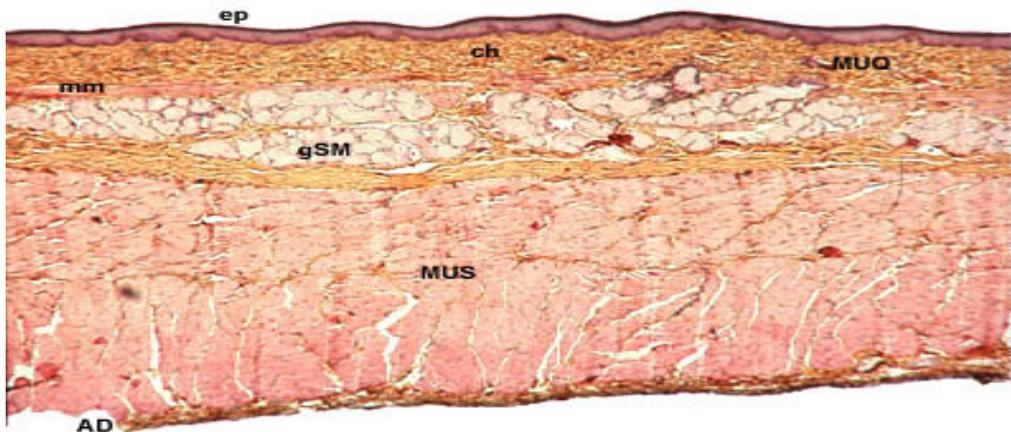


Figure 1 : Schéma général de la paroi du tube digestif et coupe histologique de la paroi oesophagienne. On distingue les 5 couches communes à tout le tube digestif : la muqueuse, la *muscularis mucosae*, la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse.

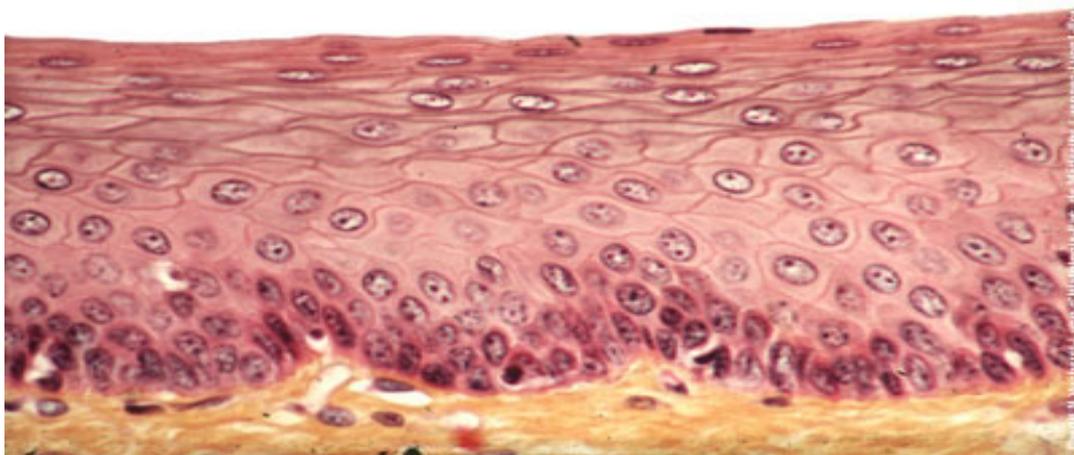


Figure 2 : coupe histologique de l'épithélium oesophagien. On distingue les différentes couches cellulaires avec différenciation progressive conduisant à l'apoptose, du *stratum germinativum* au *stratum cornéum*.

Tableau I : modifications histologiques retrouvées dans le reflux gastro-oesophagien

Modifications classiques	Autres modifications décrites
Erosions	Cellules ballonnées
Hypertrophie basale > 20% épithélium	Acanthose
Hypertrophie papilles > 2/3 épithélium	Cellules de Langerhans ou dendritiques intraépithéliales
Infiltrat inflammatoire épithélial polymorphe (neutrophiles, éosinophiles, rares lymphocytes)	Dilatation des vaisseaux papillaires Hyperexpression p53 Dilatation des espaces intercellulaires

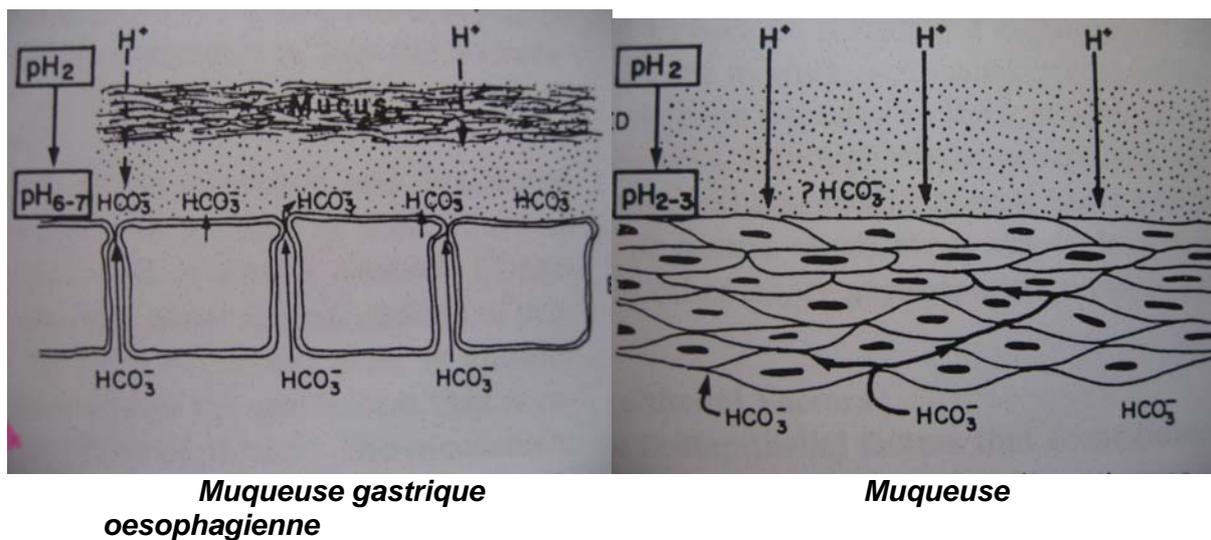


Figure 3 : efficacité tampon de la couche protectrice sus-épithéliale gastrique et oesophagienne. Dans l'estomac, la couche protectrice sus-épithéliale permet une réduction de l'acidité au niveau de l'épithélium en augmentant le pH de 2 à 6 voire 7. Par contre, au niveau oesophagien, la couche protectrice sus-épithéliale est beaucoup moins efficace sur la réduction de l'acidité avec un pH sensiblement identique voire un peu moins acide au environ de 3, ceci expliquant l'importance des facteurs de protection épithéliaux.

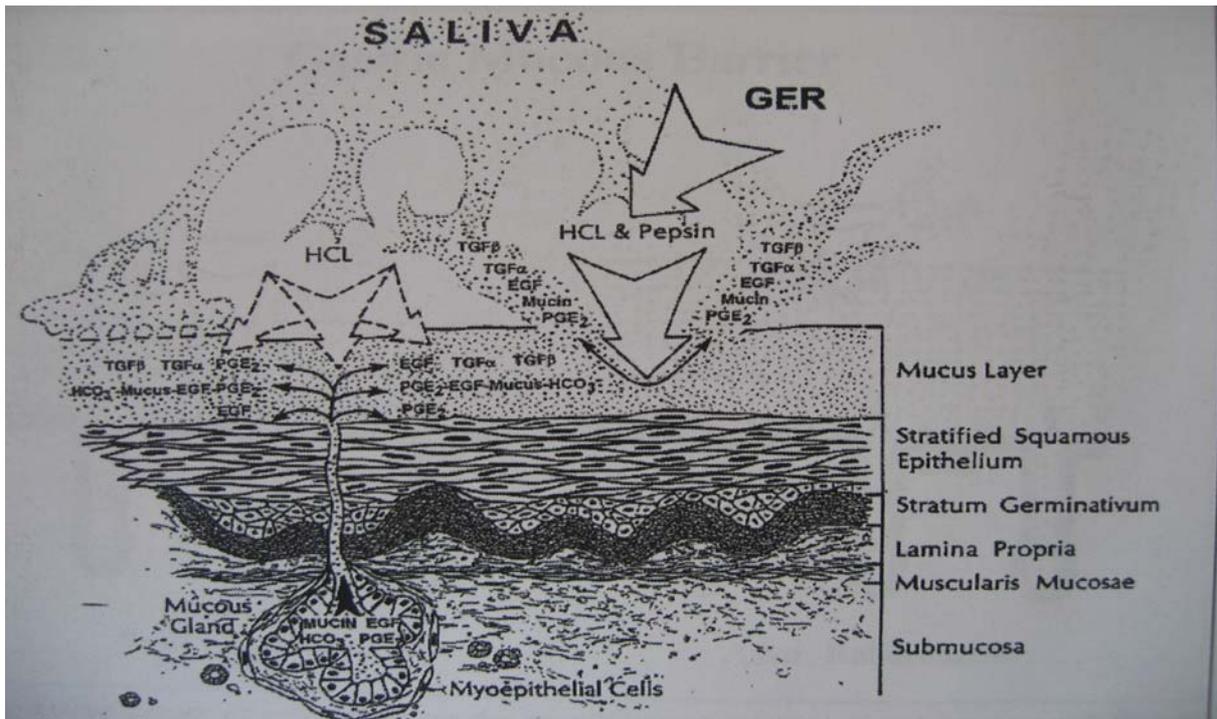


Figure 4 : schématisation des défenses pré-épithéliales de l'épithélium oesophagien. Ces défenses comprennent des composants salivaires et oesophagiens (glandes sous-muqueuses). Les sécrétions tapissent l'épithélium et forment une couche tampon à sa surface qui retarde la diffusion des ions  $H^+$  et empêche le passage de molécules organiques comme la pepsine activée.

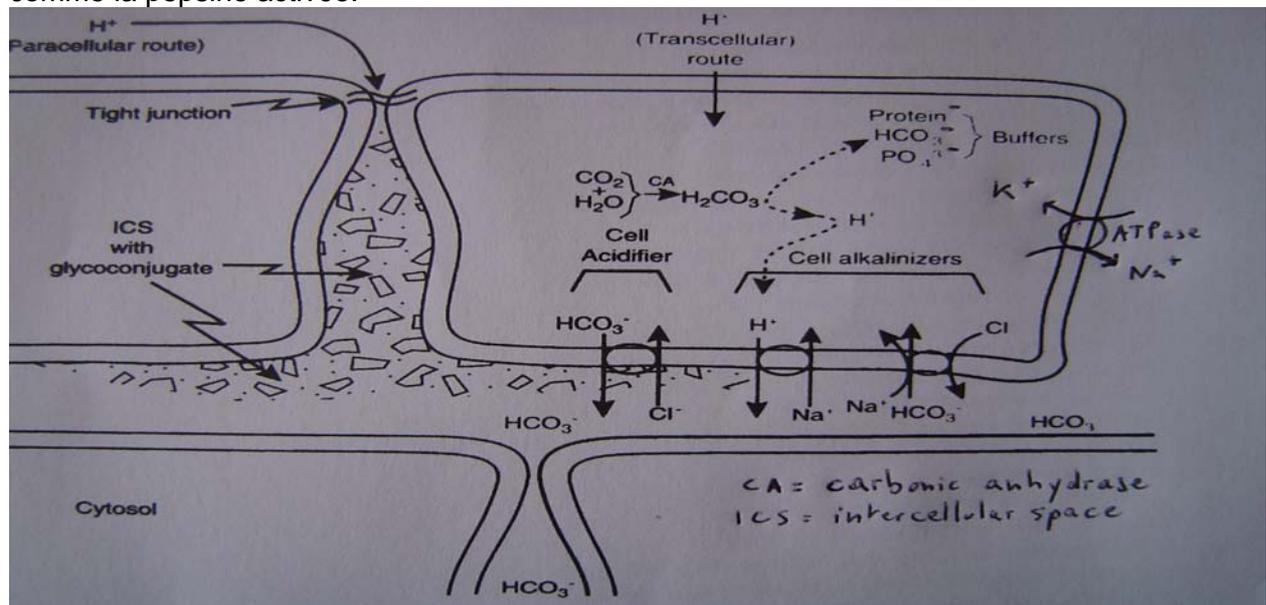


Figure 5 : schématisation de l'épithélium malpighien oesophagien et de ses moyens de défense face aux ions acides. L'acidification de l'épithélium oesophagien se fait principalement par voie paracellulaire et accessoirement par voie transcellulaire. Les ions  $HCO_3^-$ , mécanisme principal de protection cellulaire par effet tampon, sont présents dans l'espace intercellulaire via le flux sanguin et sont internalisés grâce aux pompes  $Cl^-/HCO_3^-$ , dépendantes du gradient transmembranaire en sodium. Une fabrication endogène est possible par l'intermédiaire de l'anhydrase carbonique couplant l'eau  $H_2O$  et le dioxyde de carbone  $CO_2$ . D'autres pompes membranaires permettent l'homéostasie du gradient transmembranaire du sodium et l'externalisation d'ions  $H^+$  et  $HCO_3^-$ .

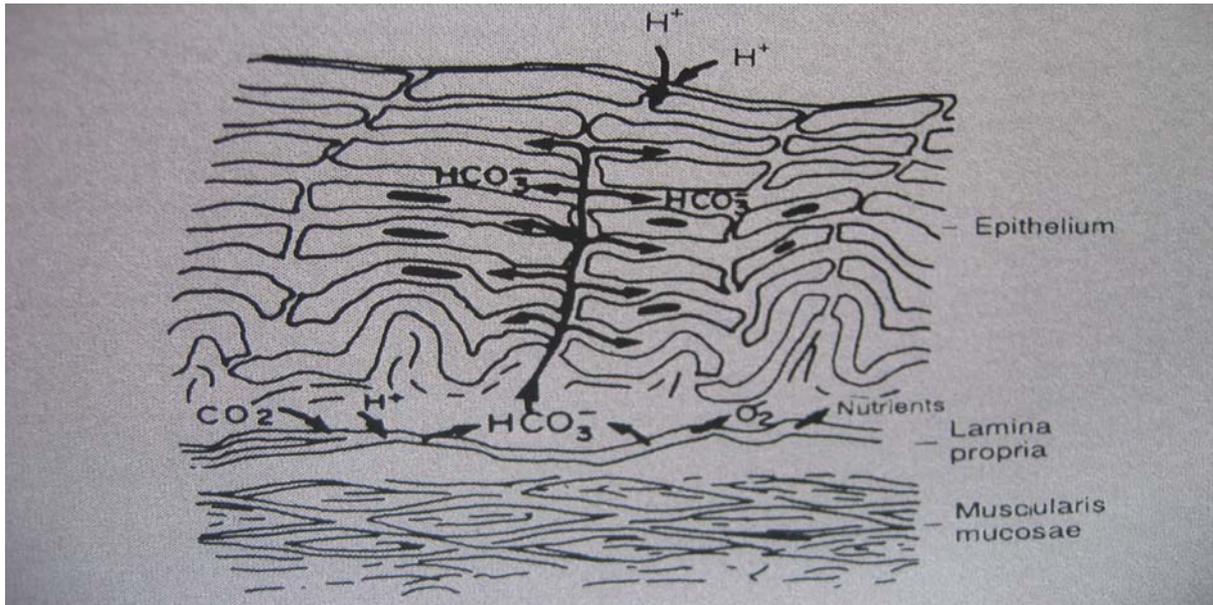
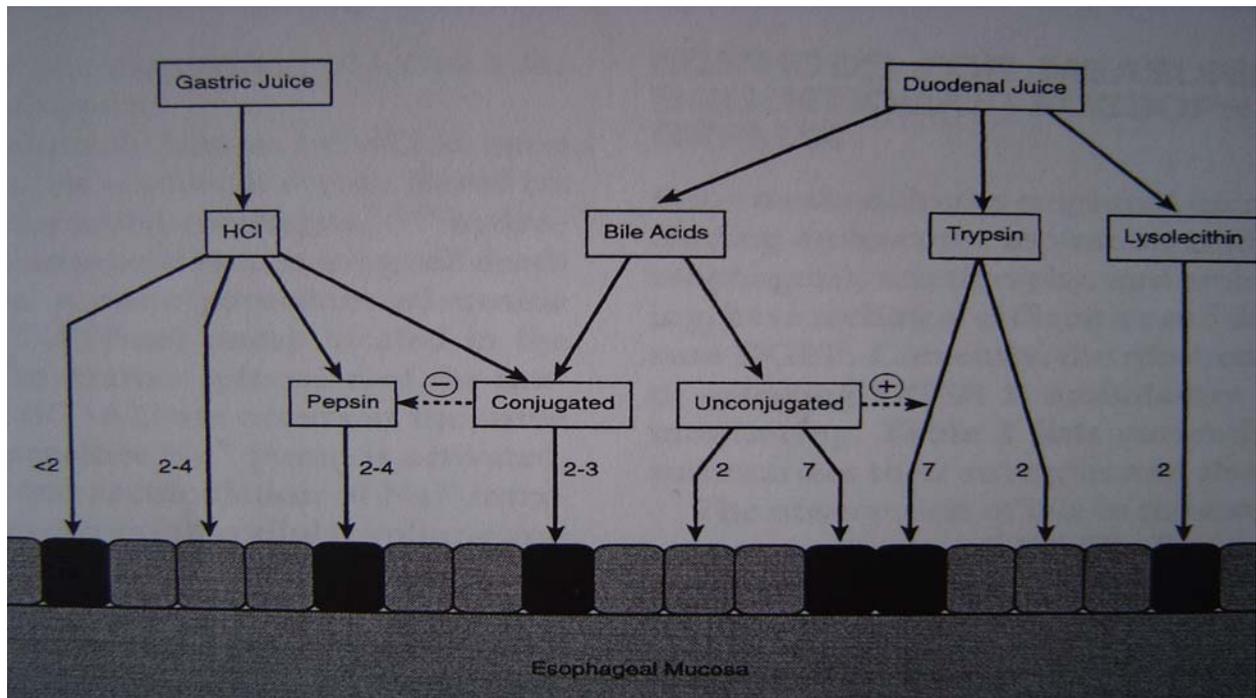


Figure 6 : rôle de la *lamina propria* dans la protection de l'épithélium oesophagien. La *lamina propria* intervient dans la défense épithéliale par l'intermédiaire de son réseau vasculaire. Il permet l'apport d'ions bicarbonates, de nutriments, d'oxygène et l'absorption des substances toxiques pour l'épithélium ( $\text{CO}_2$ , ions acides).



→ Les cases noircies correspondent aux cellules épithéliales lésées

Figure 7 : schématisation des interactions entre les différents composants du reflux et de leurs actions sur les cellules épithéliales oesophagiennes. L'acide seul est délétère à  $\text{pH} < 2$ , à  $\text{pH} 2-3$  en association aux acides biliaires conjugués, et à  $\text{pH} 2-4$  en association avec la pepsine. Les acides biliaires non conjugués et la trypsine ont un effet toxique synergique à  $\text{pH}$  neutre. La lysolécithine seule est toxique à  $\text{pH}$  acide.

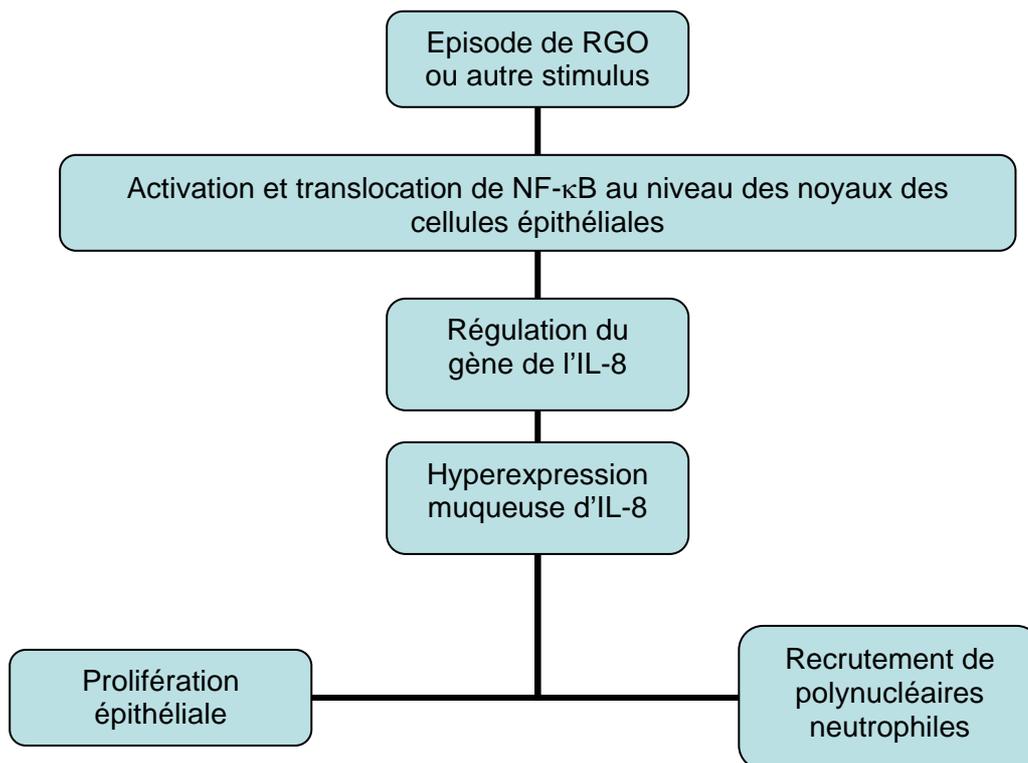
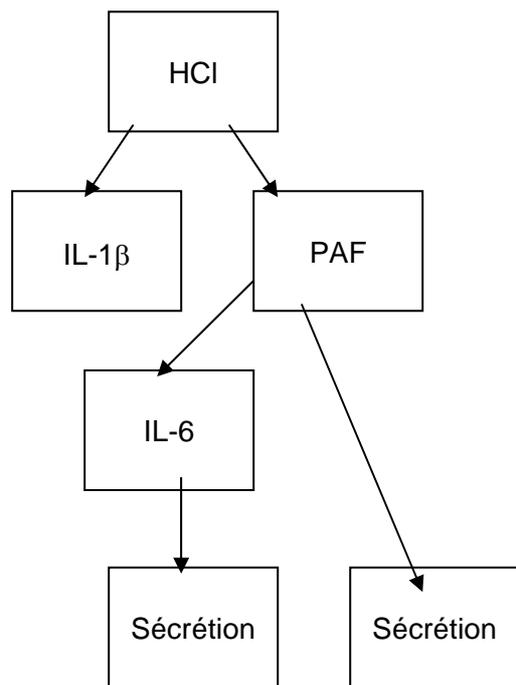
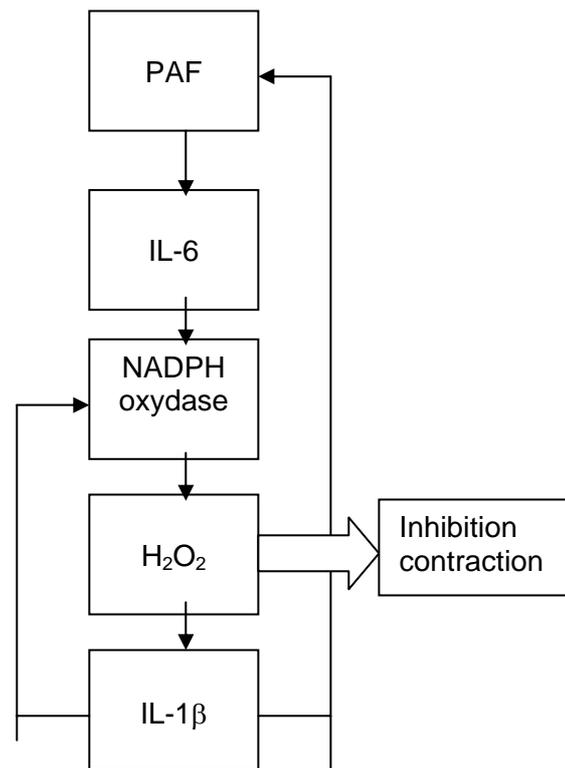


Figure 8 : du stimulus aux lésions histologiques, impact de la réaction immune et inflammatoire. Cet organigramme représente le rôle de l'IL-8 et de ses co-facteurs dans la survenue des anomalies histologiques du RGO.



**Muqueuse oesophagienne**



**Muscle circulaire oesophagien**

Figure 9 : cascades d'interactions entre les différentes cytokines au niveau de la muqueuse et du muscle circulaire oesophagiens. IL-1β=interleukine 1β ; PAF=*Platelet Activated Factor* ; IL-6=interleukine 6

REFERENCES

1. Anggiansah A, Taylor G, Bright N, Wang J, Owen WA, Rokkas T et al. Primary peristaltic is the major acid clearance mechanism in reflux patients. *Gut* 1994;35:1536-42
2. Ismail-Beigi F, Horton PF, Pope CE 2<sup>nd</sup>. Histological consequences of gastroesophageal reflux in man. *Gastroenterology* 1970;58:163-74
3. De Hertogh G, Ectors N, VAN Eyken P, Geboes K. Review article:the nature of esophageal injury in gastro-esophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24(suppl.2):17-26
4. Orlando RC. Esophageal epithelial defense against acid injury. *J Clin Gastroenterol* 1991;13(suppl 2):S1-5
5. Sarosiek J, Hetzel DP, Yu Z, Piascik R, Li L, Rourk RM et al. Evidence on secretion of epidermal growth factor by the esophageal mucosa in humans. *Am J Gastroenterol* 1993;88:1081-7
6. Fujiwara Y, Higuchi K, Takashima T, Hamaguchi M, Hayakawa T, Tominaga K et al. Roles of epidermal growth factor and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1 in esophageal epithelial defense against acid-induced injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G665-73
7. Jankowski J, McMenemin R, Yu C, Hopwood D, Wormsley KD. Proliferating cell nuclear antigen in esophageal diseases;correlation with transforming growth factor alpha expression. *Gut* 1992;33:587-91
8. Namiot Z, Sarosiek J, Rourk RM, Hetzel DP, McCallum RW. Human esophageal secretion:mucosal response to luminal acid et pepsine. *Gastroenterology* 1994;106:973-81
9. Namiot Z, Sarosiek J, Marcinkiewicz M, Edmunds MC, McCallum RW. Declined human esophageal mucine secretion in patients with severe reflux esophagitis. *Dig Dis Sci* 1994;39:2523-9
10. Namiot Z, Rourk RM, Piascik R, Hetzel DP, Sarosiek J, McCallum RW. Interrelationship between esophageal challenge with mechanical and chemical stimuli and salivary protective mechanisms. *Am J Gastroenterol* 1994;89:581-7
11. Sarosiek J, Rourk RM, Piascik R, Namiot Z, Hetzel DP, McCallum RW. The effect of esophageal mechanical and chemical stimuli on salivary mucin secretion in healthy individuals. *Am J Med Sci* 1994;308:23-31
12. Sarosiek J, Scheurich CJ, Marcinkiewicz M, McCallum RW. Enhancement of salivary esophagoprotection:rational for a physiological approach to gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 1996;110:675-81
13. Marcinkiewicz M, Han K, Zbroch T, Poplawski C, Gramley W, Goldin G et al. The potential role of the esophageal pre-epithelial barrier components in the maintenance of integrity of the esophageal

mucosa in patients with endoscopically negative gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1652-60

14. Orr WC, Robinson MG, Johnson LF. Acid clearance during sleep in the pathogenesis of reflux esophagitis. *Dig Dis Sci* 1981;26:423-7

15. Kahrilas PJ, Gupta RR. The effect of cigarette smoking on salivation and esophageal acid clearance. *J Lab Clin Med* 1989;114:431-8

16. Korsten MA, Rosman AS, Fishbein S, Shlein RD, Goldberg HE, Biener AE. Chronic xerostomia increases esophageal acid exposure and is associated with esophageal injury. *Am J Med* 1991;90:701-6

17. Orlando RC. Mechanisms of reflux-induced epithelial injuries in the esophagus. *Am J Med* 2000;108(suppl 4A):104S-8

18. Tobey NA. Systemic factors in esophageal mucosal protection. *Digestion* 1995;56(suppl 1):38-44

19. Sardet C, Counillon L, Franchi A, Pouyssegur J. Growth factors induce phosphorylation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, glycoprotein of 110 kD. *Science* 1990;247:723-6

20. Wakabayashi S, Bertrand B, Shigekawa M, Fafournoux P, Pouyssegur J. Growth factor activation and "H(+)-sensing" of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 (NHE 1). Evidence for an additional mechanism not requiring direct phosphorylation. *J Biol Chem* 1994;269:5583-8

21. Hamilton BH, Orlando RC. In vivo alkaline secretion by mammalian esophagus. *Gastroenterology* 1989;97:640-8

22. Tobey NA, Reddy SP, Khalbuss WE, Silvers SM, Cragoe EJ Jr, Orlando RC. Na<sup>+</sup>(+)-dependent and -independent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchangers in cultured rabbit esophageal epithelial cells. *Gastroenterology* 1993;104:185-95

23. Orlando GS, Tobey NA, Wang P, Abdulnour-Nakhoul S, Orlando RC. Regulatory volume decrease in human esophageal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G932-7

24. Bass BL, Schweitzer EJ, Harmon JW, Kraimer J. H<sup>+</sup> back diffusion interferes with intrinsic reactive regulation of esophageal mucosal blood flow. *Surgery* 1984;96:404-13

25. Hollwarth ME, Smith M, Kvietys PR, Granger DN. Esophageal blood flow in the cat. Normal distribution and effects of acid perfusion. *Gastroenterology* 1986;90:622-7

26. Hopwood D, Coghill G, Sanders DS. Human esophageal submucosal glands. Their detection mucin, enzyme and secretory protein content. *Histochemistry* 1986;86:107-12

27. Zentlin P, Dulbecco P, Bilardi C, Gambaro C, Iiritano E, Biagini R et al. Circadian pattern of intragastric acidity in patients with non-erosive reflux disease (NERD). *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:353-9
28. Hirschowitz BI. A critical analysis, with appropriate controls, of gastric acid and pepsin secretion in clinical esophagitis. *Gastroenterology* 1991;101:1149-58
29. Cadiot G, Bruhat A, Rigaud D, Coste T, Vuagnat A, Benyedder Y et al. Multivariate analysis of pathophysiological factors in reflux esophagitis. *Gut* 1997;40:167-174
30. Gardner JD, Sloan S, Miner PB, Robinson M. Meal-stimulated gastric acid secretion and integrated gastric acidity in gastro-esophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:945-953
31. Redo SF, Barnes WA, De La Sierra AO. Perfusion of the canine esophagus with secretions of the upper gastro-intestinal tract. *Ann Surg* 1959;149:556-64
32. Lillmoe KD, Johnson LF, Harmon JW. Role of the components of the gastroduodenal contents in experimental acid esophagitis. *Surgery* 1982;92:276-84
33. Tobey NA, Hosseini SS, Caymaz-Bor C, Wyatt HR, Orlando GS, Orlando RC. The role of pepsin in acid injury to esophageal epithelium. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3062-70.
34. Pursnani KG, Mohiuddin MA, Geisinger KR, Weinbaum G, Katzka DA. Experimental study of acid burden and acute esophagitis. *Br J Surg* 1998;85:677-80
35. Zaninotto G, Di Mario F, Costantini M, Baffa R, Germana B, Dal Santo PL et al. *Br J Surg* 1992;79:161-4
36. Gotley DC, Morgan AP, Ball D, Owen RW, Cooper MJ. Composition of gastro-esophageal refluxate. *Gut* 1991;32:1093-9
37. Bremner RM, Crookes PF, DeMeester TR, Peters JH, Stein HJ. Concentration of refluxed acid and esophageal mucosal injury. *Am J Surg* 1992;164:522-6
38. Stein HJ, Hoeft S, DeMeester TR. Functional foregut abnormalities in Barrett's esophagus. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:107-11
39. Mearin F, Azpiroz F, Malagelada JR, Zinsmeister AR. Antroduodenal resistance to flow in the control of duodenogastric bile reflux during fasting. *Gastroenterology* 1987;93:1026-33
40. Hopewood D, Bateson MC, Milne G, Bouchier IA. Effects of bile acids and hydrogen ion on the fine structure of esophageal epithelium. *Gut* 1981;22:306-11
41. Hubens A, Van de Kelft E, Roland J. The influence of cholecystectomy on the duodenogastric reflux of bile. *Hepatogastroenterology* 1989;36:384-6

42. Nano M, Palmas F, Giaccone M, Ricci E, Camandona M, Gardino L et al. Biliary reflux after cholecystectomy:a prospective study. *Hepatogastroenterology* 1990;37:233-4
43. Stoker DL, Williams JG. Alkaline reflux esophagitis. *Gut* 1991;32:1090-2
44. Lillemoe KD, Johnson LF, Harmon JW. Alkaline esophagitis :a comparison of the ability of components of gastroduodenal contents to injure the rabbit esophagus. *Gastroenterology* 1983;85:621-8
45. Salo J, Kivilaakso E. Role of luminal H<sup>+</sup> in the pathogenesis of experimental esophagitis. *Surgery* 1982;92:61-8
46. Harmon JW, Doong T, Gadacz TR. Bile acids are not equally damaging to the gastric mucosa. *Surgery* 1978;84:79-86
47. Harmon JW, Johnson LF, Maydonovitch CL. Effect of acid and bile salts on the rabbit esophageal mucosa. *Dig Dis Sci* 1981;26:65-72
48. Kivilaakso E, Fromm D, Silen W. Effect of bile salts and related compounds on isolated esophageal mucosa. *Surgery* 1980;87:280-5
49. Salo JA, Kivilaakso E. Contribution of trypsin and cholate to the pathogenesis of experimental alkaline reflux esophagitis. *Scand J Gastroenterol* 1984;19:875-81
50. Helsingen N Jr. Esophagitis following total gastrectomy:a follow-up study on 9 patients 5 years or more after operation. *Acta Chir Scand* 1960;118:190-201
51. Bechi P, Pucciani F, Baldini F, Cosi F, Falciai R, Mazzanti R et al. Long-term ambulatory enterogastric reflux monitoring. Validation of a new fiberoptic technique. *Dig Dis Sci* 1993;38:1297-306
52. Vaezi MF, Lacamera RG, Richter JE. Validation studies of Bilitec 2000:an ambulatory duodenogastric reflux monitoring system. *Am J Physiol* 1994;267:G1050-7
53. Vaezi MF, Richter JE. Role of acid and duodenogastroesophageal reflux in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 1996 ;111 :1192
54. Champion G, Richter JE, Vaezi MF, Singh S, Alexander R. Duodenogastroesophageal reflux:relationship top H and importance in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1994;107:747-54
55. Caldwell MT, Lawlor P, Byrne PJ, Walsh TN, Hennessy TP. Ambulatory esophageal bile reflux monitoring in Barrett's esophagus. *Br J Surg* 1995;82:657-60
56. Vaezi MF, Richter JE. Synergism of acid and duodenogastroesophageal reflux in complicated Barrett's esophagus. *Surgery* 1995;117:699-704
57. Vaezi MF, Richter JE. Contribution of acid and duodenogastro-esophageal mucosal injury and symptoms in partial gastrectomy. *Gut* 1997;41:297-302

58. Siddiqui A, Rodriguez-Stanley S, Zubaidi S, Miner PB Jr. Esophageal visceral sensitivity to bile salts in patients with functional heartburn and in healthy control subjects. *Dig Dis Sci* 2005;50:81-5
59. Stipa F, Stein HJ, Feussner H, Kraemer S, Siewert JR. Assessment of non-acid esophageal reflux: comparison between long-term reflux aspiration test and fiberoptic bilirubin monitoring. *Dis Esophagus* 1997;10:24-8
60. Marshall RE, Anggiansah A, Owen WA, Owen WJ. The relationship between acid and bile reflux and symptoms in gastro-esophageal reflux disease. *Gut* 1997;40:182-7
61. Vaezi MF, Richter JE. Duodeno-gastroesophageal reflux. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:719-29
62. Tack J, Koek G, Demedts I, Sifrim D, Janssens J. Gastroesophageal reflux disease poorly responsive to single-dose proton pump inhibitors in patients without Barrett's esophagus: acid reflux, bile reflux or both? *Am J Gastroenterol* 2004;99:981-8
63. Salo JA, Lehto VP, Kivilaakso E. Morphological alterations in experimental esophagitis. Light microscopic and scanning and transmission electron microscopic study. *Dig Dis Sci* 1983;28:440-8
64. Shimono M, Clementi F. Intercellular junctions of oral epithelium. II. Ultrastructural changes in rat buccal epithelium induced by trypsin digestion. *J Ultrastruct Res* 1977;59:101-12
65. Orlando RC, Bryson JC, Powell DW. Mechanisms of H<sup>+</sup> injury in rabbit esophageal epithelium. *Am J Physiol* 1984;9:G718-24
66. Orlando RC, Powell DW, Carney CN. Patophysiology of acute acid injury in rabbit esophageal epithelium. *J Clin Invest* 1981;68:286-93
67. Snow JC, Goldstein JL, Schmidt LN, Lisitza P, Layden TJ. Rabbit esophageal cells show regulatory volume decrease: ionic basis and effect of pH. *Gastroenterology* 1993;105:102-10
68. Duane WC, Wiegand DM. Mechanism by which bile salt disrupts the gastric mucosal barrier in the dog. *J Clin Invest* 1980;66:1044-9
69. Tanaka K, Fromm D. Effects of bile acid and salicylate on isolated surface and glandular cells of rabbit stomach. *Surgery* 1983;93:660-3
- ref continuum rgo
70. Fitzgerald RC, Onwuegbusi BA, Bajaj-Elliott M, Saeed IT, Burnham WR, Farthing MJ. Diversity in the esophageal phenotypic response to gastro-esophageal reflux: immunological determinants. *Gut* 2002;50:451-9

71. Kanazawa Y, Isomoto H, Wen CY, Wang AP, Saenko VA, Ohtsuru A et al. Impact of endoscopically minimal involvement on IL-8 mRNA expression in esophageal mucosa of patients with non-erosive reflux disease. *World J Gastroenterol* 2003;9:2801-4
72. Isomoto H, Wang A, Mizuta Y, Akazawa Y, Ohba K, Omagari K et al. Elevated levels of chemokines in esophageal mucosa of patients with reflux esophagitis. *Am J Gastroenterol* 2003;98:551-6
73. Isomoto H, Saenko VA, Kanazawa Y, Nishi Y, Ohtsuru A, Inoue K et al. Enhanced expression of interleukin-8 and activation of nuclear factor kappa-B in endoscopy-negative gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2004;99:589-97
74. Baggiolini M, Loetscher P, Moser B. Interleukine-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol* 1995;17:103-8
75. Mukaida N, Harada A, Matsushima K. Interleukine-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9:9-23
76. Naya MJ, Pereboom D, Ortego J, Alda JO, Lanas A. Superoxide anions produced by inflammatory cells play an important part in the pathogenesis of acid and pepsin induced esophagitis in rabbits. *Gut* 1997;40:175-81
77. Lanas A, Soteras F, Jimenez P, Fiteni I, Piazuelo E, Royo Y et al. Superoxide anions and nitric oxide in high-grade esophagitis induced by acid and pepsin in rabbits. *Dig Dis Sci* 2001;46:2733-43
78. Isomoto H, Kanazawa Y, Nishi Y, Wen CY, Inoue K, Kohno S. Expression of CXC receptor 1 and 2 in esophageal mucosa of patients with reflux esophagitis. *World J Gastroenterol* 2005;11:1793-7
79. Oh TY, Lee JS, Ahn BO, Cho H, Kim WB, Surh YJ et al. Oxidative stress is more important than acid in the pathogenesis of reflux esophagitis in rats. *Gut* 2001;49:364-71
80. Cheng L, Cao W, Fiocchi C, Behar J, Biancani P, Harnett KM. HCL-induced inflammatory mediators in cat esophageal mucosa and inflammatory mediators in esophageal circular muscle in an in vitro model of esophagitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1307-17
81. Cheng L, Cao W, Fiocchi C, Behar J, Biancani P, Harnett KM. Platelet-activating factor and prostaglandin E2 impair esophageal Ach release in experimental esophagitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G418-28
82. Lieberman DA, Oehlke M, Helfand M. Risk factors for Barrett's esophagus in community-based practice. GORGE consortium. Gastroenterology Outcomes Research Group in Endoscopy. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1293-7

84. Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Sontag SJ. Gastric surgery is not a risk for Barrett's esophagus or esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2001;121:1281-5

ETUDE PERSONNELLE

## 1 INTRODUCTION

Le reflux gastro-oesophagien (RGO) est une pathologie fréquente touchant 10 à 30% des adultes. La physiopathologie du RGO est multifactorielle et incomplètement comprise, même si l'acide joue un rôle essentiel dans le développement des symptômes et des complications [1,2]. A côté des facteurs moteurs [3,4], tant les caractéristiques de la muqueuse oesophagienne, comme éléments de défense, que celles des caractéristiques physico-chimiques du reflux, comme éléments d'agression interviennent dans la survenue des symptômes et dans l'apparition des lésions et des complications. Les rôles respectifs de ces caractéristiques (muqueuse et nature des reflux) restent difficiles à préciser. Si l'agression acido-peptique est bien étudiée, divers éléments restent mal connus et notamment a) le rôle d'autres facteurs que l'acide, b) les caractéristiques de la muqueuse elle-même placée dans cet environnement agressif.

Des enregistrements combinés du pH avec la scintigraphie oesophagienne ou la bilimétrie (Bilitec<sup>®</sup>) ont montré que des reflux acides pouvaient survenir séparément des reflux d'aliments neutres ou de bile ; ces données suggèrent que chez certains sujets, le mélange de ces composants dans l'estomac pourrait être incomplet, avec pour conséquence des compositions variables des matériels de reflux [5]. Ainsi les reflux gazeux, liquides ou mixtes non acides contenant des composants potentiellement agressifs, comme la pepsine ou les acides biliaires, pourraient jouer un rôle important dans le développement des symptômes et des lésions. En réalité, jusqu'à maintenant, le rôle précis des épisodes de reflux gazeux ou non acides dans la pathogénie du RGO reste pour l'instant inconnu, essentiellement en raison des difficultés de détection. Seule la mesure de l'impédance électrique endoluminale permet d'enregistrer les mouvements de liquides et/ou de gaz dans le tube digestif [6,7]. A l'aide de cette technique, il devient possible de détecter des reflux de gaz et de liquides, et de caractériser leur composition acide ou non acides en la couplant à la pHmétrie. Outre les facteurs d'agression, les caractéristiques de résistance de la muqueuse oesophagienne jouent un rôle important dans l'expression des différentes formes du RGO. La barrière épithéliale oesophagienne (BEO) est constituée des membranes apicales et des

complexes jonctionnels des cellules du *stratum corneum* [8]. La BEO prévient la pénétration du contenu luminal oesophagien dans la muqueuse. Cette fonction de barrière est réglée au niveau moléculaire par les protéines des jonctions serrées. Au niveau de la barrière épithéliale intestinale, certaines protéines des jonctions serrées, telles que Zonula occludens type 1 (ZO-1), l'occludine et les claudines semblent jouer un rôle clef [9,10]. Néanmoins, dans l'œsophage, l'expression de ces protéines ainsi que leurs altérations éventuelles au cours des pathologies du reflux restent largement inconnues. Des études animales ont montré que l'exposition de la muqueuse oesophagienne à l'acide augmentait la perméabilité paracellulaire de la BEO [11-12], et induisait une dilatation des espaces intercellulaires de l'épithélium, réversible sous traitement [13,14]. De plus la fragilisation de la BEO facilite vraisemblablement le contact entre le contenu luminal et les terminaisons sensibles, et pourrait ainsi jouer un rôle dans la modulation des symptômes au cours du reflux.

Les buts de ce travail ont été ont été a) de développer une technique d'étude de la perméabilité oesophagienne à l'aide de chambres de Ussing modifiées ; b) de rechercher des corrélations entre des anomalies moléculaires et fonctionnelles détectées au niveau de la BEO et les différents types de reflux.

## 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *A Population étudiée*

De décembre 2005 à août 2006, 18 patients ayant une symptomatologie digestive compatible avec un RGO ont été inclus. Ces malades préalablement vus en consultation ont été inclus avant exploration de leur reflux ou après un bilan antérieur nécessitant d'être réactualisé. Tous les médicaments à visée gastro-intestinale ont été arrêtés au moins une semaine avant les explorations, réalisées dans un délai de deux semaines.

Les critères d'inclusion devaient tous être présents : a) symptômes digestifs compatibles avec un RGO (pyrosis, régurgitations, brûlure et / ou douleur épigastriques) ; b) malade pour lequel des investigations sont jugées nécessaires ; c) absence d'antécédent chirurgical digestif sus-mésocolique ; d) patient capable de remplir les fiches de suivi

symptomatique ; e) âge entre 18 et 70 ans ; f) consentement écrit signé ; g) affiliation à la sécurité sociale ou à un régime de protection sociale ; h) bilan d'hémostase normal.

Les critères d'exclusion étaient les suivants (un seul de ces critères interdisait l'inclusion) : a) âge < 18 ou > 70 ans ; b) endobrachyoesophage connu ; c) antécédent d'hémorragie digestive haute d'origine oesophagienne ; d) malade sous anti-inflammatoires non stéroïdiens, antiagrégants ou anticoagulants et ne pouvant l'interrompre ; e) antécédent chirurgical digestif sus-mésocolique ; f) consommation d'alcool > 40 g/j, de tabac > 10 cigarettes/j ; g) grossesse ou allaitement ; h) anomalies motrices sévères de l'œsophage ; i) non affilié à la sécurité sociale ou à un régime de protection sociale ; j) refus de signer le consentement éclairé ; k) incapable majeur ou sous tutelle ; l) sujet insuffisamment coopérant d'après l'investigateur ; m) allergie à la xylocaïne ; n) lésions nasales hémorragiques ; o) bilan d'hémostase anormal.

Des sujets témoins de 18 à 70 ans sans symptomatologie de RGO ou de dyspepsie, ayant les mêmes critères d'exclusion et d'inclusion (excepté la symptomatologie de RGO), ont été inclus à titre comparatif. Les témoins ont été recrutés dans le service d'hépatogastro-entérologie, essentiellement parmi les patients venant pour une coloscopie de dépistage sous anesthésie générale, permettant la réalisation supplémentaire d'une fibroscopie oeso-gastro-duodénale (FOGD) et de biopsies oesophagiennes. Les critères d'exclusion des témoins ont été élargis durant l'étude devant l'hétérogénéité des résultats initiaux, pour se rapprocher le plus possible de volontaires sains. Les critères d'exclusion secondairement introduits étaient les antécédents de maladie inflammatoire digestive et de troubles fonctionnels intestinaux.

### *B Explorations réalisées (figure 1)*

La FOGD avec biopsies, les explorations fonctionnelles et l'interrogatoire standardisé étaient réalisés chez les patients. Les témoins avaient uniquement une FOGD avec biopsies.

## 1 Interrogatoire standardisé

Après signature du consentement éclairé, un interrogatoire standardisé était systématiquement réalisé par le même médecin pour tous les patients (JG). Les scores de pyrosis, de régurgitations et de reflux total (pyrosis + régurgitations) étaient calculés [3 items quantifiés de 0 à 3 : fréquence (absent, occasionnel, pluri-hebdomadaire, quotidien), période de survenue (absent, jour, nuit, jour et nuit), intensité (absent, sans perturbation de l'activité quotidienne, perturbation épisodique ou permanente) ; 1 item de 0 à 2 : durée (absent, plusieurs minutes, plus longtemps)]. La somme de ces items correspondait au score par symptôme et la somme des 2 scores correspondait au score de reflux total. Une liste des traitements à visée oeso-gastrique était notée ainsi que leur date d'arrêt.

## 2 Enregistrement manométrique

Une manométrie oesophagienne était réalisée pour éliminer un trouble moteur oesophagien primitif et repérer le sphincter inférieur de l'œsophage, pour le placement ultérieur des sondes.

Un cathéter à usage unique était utilisé pour la manométrie. Deux séries de capteurs servaient à l'enregistrement : 3 capteurs distaux radiaires pour l'étude du sphincter inférieur de l'œsophage (SIO) et 4 capteurs longitudinaux espacés tous les 5 cm pour l'étude du corps de l'œsophage. Ces capteurs étaient reliés directement à l'ordinateur, qui enregistrait en temps réel les données obtenues lors de l'examen. Un capteur de déglutition était placé autour du cou du patient, afin de repérer les déglutitions. Les pressions étaient enregistrées en retirant progressivement la sonde de l'estomac vers le sphincter supérieur de l'œsophage, associé à des déglutitions humides répétées.

## 3 Enregistrement impédance et pH

Les enregistrements combinés de l'impédance et du pH endoluminale de l'œsophage étaient effectués à l'aide d'un cathéter MII-pH (ZAN-S61C01E, Sandhill Scientific, Inc.) à usage unique. Ce cathéter disposait de 6 segments de mesure de l'impédance dont les

centres sont situés à 2, 4, 8, 14 et 16 cm au-dessus du SIO, ainsi qu'une électrode de pH localisée à 4 cm de l'extrémité. Les 2 électrodes de pH étaient préalablement calibrées à pH 4 et 7. Le cathéter était placé de manière à réaliser un enregistrement du pH oesophagien à 5 cm au-dessus du SIO et des mesures de l'impédance à 3, 5, 9, 15, 17 cm au-dessus du SIO. Le cathéter était connecté au boîtier d'enregistrement ambulatoire permettant un enregistrement continu sur 24 h du pH et de l'impédance.

L'amplificateur d'impédance délivrait un courant alternatif entre 1 et 2 KHz, les variations des courants résultants étant fonction des modifications de l'impédance endoluminale. Les signaux des 6 canaux d'impédance et du canal pH étaient enregistrés à une fréquence d'échantillonnage de 50 par seconde. Les données étaient stockées dans le boîtier d'enregistrement ambulatoire, puis sauvegardées sur une carte Compact Flash 128 MB pour analyse (Logiciel Sleuth GER monitoring, Version 1.3, Sandhill Scientific Inc. 1999-2003).

Après une anesthésie à la xylocaïne, le cathéter à usage unique était introduit par voie nasale, puis placé selon les repères manométriques. L'enregistrement devait durer au moins 24 h en ambulatoire ou lors d'une courte hospitalisation en hôpital de semaine. Il n'y avait aucune restriction en terme d'activité ou d'alimentation (excepté les boissons à pH < 5 et les gommes à mâcher) ; les repas n'étaient pas standardisés. Une fiche de recueil d'événements était fournie. Il était demandé aux patients d'y noter l'heure et la nature des symptômes ressentis, l'heure et la durée des repas et des périodes en position allongée, toutes ces données étant recopiées par la suite sur les résultats d'impédancemétrie.

Analyse des données : une analyse automatique des données (logiciel Bioview Analysis version 4.7.4 Sandhill Scientific inc., 1999-2003) était d'abord réalisée pour analyser les résultats de la pHmétrie, exclusion faite des périodes de repas. Un reflux acide débutait lorsque le pH devenait inférieur à 4, et prenait fin lorsqu'il repassait à nouveau au dessus de 4. Le logiciel déterminait le pourcentage de temps sous pH 4 (limites supérieures normales du laboratoire : 4,2% en période totale, 6,2% en période diurne et 1,2% en période nocturne), le nombre de reflux acide et la clairance acide. Un symptôme relevé était

considéré comme associé à un épisode de reflux s'il survenait dans les 2 min avant sa perception [15]. Lorsqu'un patient notait plusieurs symptômes en moins de 2 min, un seul était pris en compte. Dans un deuxième temps, tous les tracés d'impédancemétrie étaient analysés manuellement par le même médecin (JG). Une fois les tracés analysés, une analyse par le logiciel permettait de calculer le nombre de reflux total, non acide, gazeux, liquide et mixte. Un reflux liquide était défini par une chute d'impédance rétrograde de 50% à point de départ distal (au niveau du SIO) et se propageant sur au moins 2 segments de mesure d'impédance. Seuls les reflux liquides d'au moins 3 s étaient pris en compte. Les reflux gazeux étaient définis par une augmentation rapide (3 k $\Omega$ /s) d'impédance > 5000  $\Omega$ , se propageant sur au moins 2 segments de mesure d'impédance, en l'absence de déglutition. Les reflux mixtes (liquide et gazeux) étaient définis par un reflux gazeux survenant immédiatement avant ou durant un reflux liquide [16]. Les épisodes de reflux étaient caractérisés aussi en acide, faiblement acide et non acide, selon les critères définis par Sifrim et al : le reflux acide correspond à une chute du pH < 4 ou à un reflux alors que le PH est déjà acide < 4, le reflux faiblement acide correspond à une chute du pH entre 4 et 6,5, les reflux non acides s'apparentant aux reflux à pH >6,5 [17]. Tous ces épisodes de reflux étaient caractérisés en position couchée et debout ; les repas étaient exclus des analyses. Les normes des indices utilisés étaient celles déterminées par Zerbib et al chez des volontaires sains sur un enregistrement de 24 h [16].

Des indices étaient ensuite calculés pour évaluer la force du lien entre les symptômes signalés durant l'enregistrement et le reflux : a) un indice de spécificité (IS) correspondant au rapport du nombre de symptômes associés à un reflux sur le nombre total de symptômes, multiplié par 100 (exprimé en pourcentage, et considéré significatif si  $\geq 50$  %) [18] ; b) un indice de probabilité d'association symptomatique ou *Symptom Association Probability* (SAP). Ce calcul consiste à « segmenter » l'enregistrement en périodes de 2 min (720 périodes pour un enregistrement de 24 heures), chacune de ces périodes étant caractérisée par l'une des quatre situations possibles (reflux [pH ou impédance] avec ou sans symptôme associé, et absence de reflux avec ou sans symptôme associé). Le calcul du

SAP permettait de définir la probabilité de liaison des symptômes avec le reflux, considérée significative lorsqu'elle est supérieure à 95 % [19]. Ces 2 indices étaient calculés pour chacun des symptômes et pour chaque type de reflux (acide, non acide et tous reflux confondus). Toutes les analyses excluaient les périodes des repas.

#### 4 Enregistrement par bilimétrie

L'enregistrement du reflux duodéno-gastro-oesophagien (RDGO) était réalisé par l'intermédiaire du système Bilitec 2000<sup>®</sup> (Medtronic, Maastricht, Pays Bas), utilisant une sonde mini-diode à usage unique d'1,5 mm de diamètre. Ce système utilise les propriétés optiques de la bilirubine (un des principaux constituants de la bile et donc du liquide duodénal), dont le pic d'absorption est situé à environ 450 nm. La sonde de détection était équipée à son extrémité d'une diode émettant, à intervalle régulier (toutes les 8 s) et de façon successive, deux longueurs d'onde à 470 (correspondant à la bilirubine) et 565 nm (signal de référence). Il a été montré que la différence des mesures d'absorbance à ces 2 longueurs d'onde était directement proportionnelle à la concentration de bilirubine (concentration elle-même corrélée au reflux des composants du liquide duodénal) [20,21]. Toutes ces données spectrophotométriques étaient converties en signal électrique, puis transmises au boîtier d'enregistrement durant les 24 h de l'examen, ces données étant ensuite chargées sur un ordinateur pour analyse.

La sonde mini-diode utilisée pour la détection des reflux de bilirubine était calibrée dans de l'eau à l'abri de la lumière, puis introduite par l'une des narines après une éventuelle anesthésie à la xylocaïne spray. Son extrémité inférieure était placée 5 cm au dessus du SIO. La sonde était ensuite connectée au boîtier d'enregistrement. Les heures de repas, de position allongée et de symptômes étaient notées sur une fiche d'événements afin de pouvoir les corrélérer ultérieurement avec les éventuels reflux de bilirubine. Pour cette exploration, les repas étaient standardisés selon la procédure habituelle d'enregistrement du laboratoire afin d'éviter les aliments interférant avec la lumière dans les mêmes longueurs d'onde que le système spectrophotométrique d'enregistrement (alimentation liquide pour

éviter l'incarcération d'aliment au niveau de la sonde, interdiction de consommation de boissons glacées, de soda, d'alcool, de café et de tabac). L'enregistrement se faisait lui aussi soit en ambulatoire, soit lors d'une courte hospitalisation en hôpital de semaine, sur une durée d'au moins 24 h. Les données étaient ensuite transférées sur l'ordinateur pour analyse (enregistrement et fiche d'événements).

Analyse des données : un reflux de bilirubine était défini par une élévation de l'absorbance au-dessus de 0,14 pendant au moins 10 s. Le logiciel, par analyse automatique, permettait de détecter des reflux et de les caractériser en durée et en intensité d'absorbance. Le pourcentage de temps total passé au-dessus d'une absorbance de 0,14 était calculé pour chaque sujet, ainsi que le nombre d'épisodes, la durée moyenne d'un reflux et le temps de clairance moyen des reflux de bilirubine. Ceci était calculé en position couchée, debout et sur la totalité de l'enregistrement. L'exposition à la bilirubine était considérée comme pathologique lorsque le temps absorbance  $>0,14$  dépassait 2,8 % du temps total d'enregistrement [22]. Le même IS que pour les reflux d'impédance était calculé. En raison de l'impossibilité de calculer le SAP avec le logiciel Bilitec<sup>®</sup>, l'indice de probabilité (IP) a été calculée, à l'aide d'une loi binomiale, afin de déclarer vraisemblable ou non l'association des épisodes de reflux avec les symptômes [23]. Cette probabilité prenait en compte le nombre de symptômes corrélés à un reflux, mais aussi la durée totale de l'enregistrement, l'exposition globale à la bilirubine, le nombre total d'épisodes de reflux et le nombre de symptômes.

## 5 Test de perfusion acide

Un test de perfusion acide [24], modifié, était réalisé en fin d'étude, par l'intermédiaire d'un cathéter à usage unique identique à celui utilisé pour la manométrie oesophagienne. Une perfusion de sérum salé était initialement instillée pendant plusieurs minutes, puis celle-ci était modifiée avec instillation d'acide chlorhydrique (HCL 0,1 N) à l'insu du patient et à un débit identique. Après 10 min ou moins en cas de douleur, la perfusion d'HCl était stoppée et à nouveau remplacée par du sérum physiologique. Ce test était réalisé à 2 reprises selon la

même procédure. Les symptômes survenant lors de l'instillation d'acide et leurs caractéristiques étaient notés, ainsi que leurs ressemblances vis-à-vis des symptômes habituels. Le test était jugé positif typique en cas de symptômes similaires lors des 2 tests, positif atypique lorsqu'un seul des 2 tests était positif et négatif lorsque aucun des 2 tests ne reproduisait de symptôme.

## 6 Fibroscopie oesogastroduodénale et biopsies

Une FOGD était réalisée sans ou avec une prémédication par diazépam per os 10 à 15 mg, 30 minutes avant chez les patients, et sous anesthésie générale chez les témoins recrutés par le biais de coloscopie de dépistage. Les rapports de la jonction oeso-gastrique étaient notés (pince diaphragmatique, ligne Z et limite supérieure des plis fundiques), ainsi que la taille de la hernie hiatale ou de l'endobrachyoesophage. Le grade de l'oesophagite selon la classification de Los Angeles était noté. A la fin de l'examen, 6 à 7 biopsies étaient réalisées au niveau de l'œsophage distal, 1 à 3 cm au-dessus de la ligne Z, grâce à une pince sans dard, de manière à ne pas modifier sa perméabilité. Ces biopsies étaient placées dans un même pot de sérum physiologique à 4°C étiqueté avec le code du patient, puis transmises au laboratoire.

### 1) Analyses des biopsies

#### a) Perméabilité et chambre de Ussing

Les 2 biopsies de plus grande taille et arrondies étaient choisies pour l'étude de la perméabilité paracellulaire, pour un bon fonctionnement des chambres de Ussing. Les biopsies étaient orientées sous microscope optique (face luminale et basale), puis montées entre 2 demi-chambres. Deux adaptateurs comportant une ouverture de 1,7 mm de diamètre maintenaient la biopsie oesophagienne en place. Chaque demi-chambre contenait 2 ml de milieu organotypique et était en contact avec la face luminale ou basale de la biopsie. Ce milieu de survie utilisé était le milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Auckland,

Nouvelle Zélande), auquel était ajouté de la glutamine, du NaHCO<sub>3</sub> à 4,5 g/ml, de l'eau stérile déminéralisée, du sérum de veau fœtal, de la pénicilline, de la streptomycine, de la gentamycine et de l'amphotéricine-β. Les milieux des 2 demi-chambres étaient oxygénés par un système de bullage automatique, permettant également leur homogénéisation. La température était maintenue à 37°C et contrôlée par une sonde de température indépendante placée dans une chambre contenant le milieu témoin. Après une période d'équilibration des milieux de 30 min, le marqueur de perméabilité était ajouté à la face luminale de la biopsie. Trois marqueurs de taille différente ont été utilisés : le dextran (concentration 1 mg/ml, poids moléculaire 4,4 kD ; Sigma, St Louis, USA), l'inuline (1 mg/ml, 2 à 5 kD ; Sigma St Louis, USA) et l'acide sulfonique (0,1 mg/ml, 478 D ; Molecular Probes, Oregon, USA). Ces différents marqueurs étaient couplés à une molécule fluorescence pour permettre sa quantification : la fluorescéine isothiocyanate. La fluorescence était mesurée avant l'adjonction du marqueur de perméabilité afin de définir le niveau basal de fluorescence. Puis, la fluorescence du milieu était mesurée toutes les 15 min pendant 1 heure après l'ajout du marqueur, puis toutes les 60 min pendant 3 heures. Les intensités de fluorescence étaient mesurées en utilisant un lecteur de plaque (multilabel counter, Wallac 1420 Victor), puis normalisées par rapport à la fluorescence basale.

#### b) Etude transcriptomique

Deux biopsies par patient étaient utilisées pour les analyses transcriptomiques. L'ARN total de ces biopsies était extrait selon le protocole du kit Qiagen : Rneasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne). L'ARN extrait était dosé au Nanodrop et la Reverse Transcription effectuée à partir de 5 µg d'ARN maximum en utilisant un mélange associant de l'eau stérile, une solution tampon, du dithiothreitol à 0,1 M, du dNTP à 10 mM, des hexamères aléatoires, des inhibiteurs de Rnase (Promega, Madison, USA) et des enzymes type *Super Script II Reverse Transcriptase*. La PCR quantitative était ensuite réalisée pour chaque protéine étudiée a) ZO-1 et Occludine pour l'analyse des protéines de jonction ; b) Interleukine type 8 (IL-8), interleukine la plus étudiée dans le RGO, comme marqueur de

l'inflammation et comme marqueur témoin du bon fonctionnement de notre technique de *reverse transcriptase polymerase chain reaction*. La PCR quantitative utilisait la préparation suivante : eau stérile, solution tampon, dNTP à 10 mM, amorce sens et antisens à 10 mM (Sigma), Syber Green (composé fluorescent intercalant) et polymérase. Compte-tenu de la variabilité de taille des échantillons initiaux, les résultats obtenus étaient difficiles à comparer. Les résultats ont été pondérés en fonction du résultat de la PCR quantitative de l'ARN d'une autre protéine ubiquitaire au niveau des cellules épithéliales oesophagiennes, la protéine ribosomale S6. Les résultats ont été exprimés en  $\Delta Ct$ , correspondant à la différence entre le cycle de sortie de la PCR de la protéine étudiée et celui de S6 (le cycle de sortie correspond au temps nécessaire pour arriver au seuil de détection de l'ARN après amplification ; ainsi plus l'expression d'ARN est importante, moins l'amplification est nécessaire et plus le cycle de sortie est court). L'expression des résultats des PCR était basée sur la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [25]. Cette expression permet la quantification relative d'un signal PCR d'une protéine étudiée chez un groupe de patient, par rapport au même signal chez une population témoin.

### *C Analyse statistique*

Compte tenu des effectifs réduits et de la distribution souvent non normale des valeurs, nous avons exprimé les résultats en médiane (accompagnée des 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> percentiles). Les données ont été comparées par le test de Mann et Whitney. Les données ont été corrélées entre elles par le test de Spearman. Une valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme significative. Seule l'expression des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilisait les moyennes (accompagnées des écarts-types) [25].

### 3 RÉSULTATS

#### *A Population étudiée*

Vingt patients ont été inclus dans l'étude, 16 d'entre eux ont été analysés. Trois ont été exclus de l'analyse en raison d'une symptomatologie dyspeptique prédominante identifiée après l'interrogatoire systématique et 1 du fait de la mise en évidence d'une maladie des spasmes diffus lors de la manométrie oesophagienne. Quatre patients avaient une oesophagite (25 %), dont 1 de grade A (6 %) et 3 de grade B (19 %). Le groupe patient comprenait 4 hommes et 12 femmes, avec un âge médian de 51,4 ans (extrêmes 18-71). La symptomatologie était à type d'éructions prédominantes pour 5 d'entre eux (31%), un score médian de pyrosis de 4,9 (extrêmes 0-11), un score médian de régurgitations de 2,5 (extrêmes 0-9) et un score médian de reflux de 7,5 (extrêmes 4-15).

Vingt trois témoins ont été inclus dans l'étude, 13 ont été analysés. Dix témoins ont dû être retirés de l'analyse, du fait de la découverte d'une oesophagite chez 8 d'entre eux (35 %), d'une maladie de Crohn chez 1 témoin et d'un problème anesthésique pour un autre témoin. La population témoin était composée de 8 hommes et de 5 femmes, avec un âge médian de 50,9 ans (33-62 ans).

Au total, les résultats de notre étude portent donc sur 16 patients et 13 témoins.

#### *B Résultats des explorations (tableau I)*

##### 1) Manométrie oesophagienne et test de perfusion acide

Six des 14 patients avaient une pression moyenne du SIO faible < 10 cm H<sub>2</sub>O (43 %). Le test de perfusion acide était positif typique chez 5 patients (31 %), positif atypique chez 3 patients (19 %), soit 50 % de test positif.

##### 2) Exposition acide oesophagienne (EAO)

L'EAO n'a pu être mesurée que chez 14 patients en raison de problèmes techniques. L'EAO était pathologique pour au moins une des 3 périodes chez 9 patients (64 %). Le test de perfusion acide n'était pas plus souvent positif chez les malades ayant une EAO pathologique (55 %), que chez ceux ayant une EAO normale (40 %).

### 3) Exposition oesophagienne à la bilirubine (EOB)

Chez 10 patients, l'EOB était normale, quelle que soit la période considérée (62 %). En revanche, chez les 6 autres patients (38 %), l'EOB était très pathologique en période totale, diurne et nocturne.

Sur la période totale, 5 des 6 patients ayant une EOB pathologique avaient une EAO pathologique, caractérisant leur reflux en bilieux et acide (tableau I).

### 4) Impédancemétrie

Parmi les 14 patients ayant eu une impédancemétrie, 4 patients (29 %) avaient une exposition oesophagienne au reflux d'impédance (EORI) pathologique, pour au moins une des 3 périodes. Ces 4 patients avaient une EOB totale pathologique, et 3 d'entre eux avaient une EAO totale pathologique (tableau I).

Les reflux d'impédance étaient à prédominance non acide pour 8 patients (57 %), acide pour 5 patients (36 %) et indifférent (autant de reflux acides que non acides) pour 1 patient (7 %).

### 5) Analyse des symptômes

#### a) Bilimétrie

Durant la bilimétrie, 13 des 16 patients ont signalé la survenue d'au moins un symptôme. Trois patients (19 %) avaient un IS de plus de 50 % (tous symptômes confondus). L'IP n'était pas significatif (soit  $> 0,05$ ) chez tous les patients.

#### b) pH-impédancemétrie

Treize patients sur 14 ont signalé la survenue d'au moins un symptôme durant l'enregistrement. Les symptômes les plus fréquemment signalés étaient les éructations (28% des symptômes), la toux (17 %), les régurgitations (17 %), le pyrosis (17 %), les douleurs épigastriques (17 %) et les nausées (4 %).

L'IS était significatif ( $>50$  %), pour au moins un des 2 symptômes les plus fréquents signalés, chez 7 patients (50 %). Le SAP était significatif (soit  $> 95$  %), pour au moins un de ces 2 symptômes signalés, chez 5 patients (36%). Un SAP et un IS significatifs étaient observés, pour au moins un des symptômes, chez 5 patients (36%) (tableau I).

Parmi les 4 patients ayant une EAO, une EORI et une FOGD normales, 2 avaient un IS et/ou un SAP significatif. Les indices ont donc eu un intérêt pour le diagnostic chez 2 patients (50 %).

### C) *C Résultats de la perméabilité et des analyses transcriptomiques*

#### 1 Comparaisons patients versus témoins

##### a) Perméabilité épithéliale

Seules les mesures réalisées chez 7 témoins et 7 patients ont pu être comparées ; ces résultats correspondaient aux mesures effectuées à l'aide du flux d'acide sulfonique (478 D), protéine de faible poids moléculaire ayant une perméabilité linéaire.

Les autres résultats, non utilisés, correspondaient aux mesures de perméabilité paracellulaire à l'aide de protéines de plus haut poids moléculaire (dextran, inuline :  $\approx 4$ kD). La perméabilité paracellulaire de l'épithélium oesophagien aux protéines de haut poids moléculaire était faible et il n'existait pas de différence significative entre les témoins et les patients (résultats non montrés).

Le flux médian d'acide sulfonique (figure 2) tendait à être plus élevé chez les patients RGO que chez les témoins ( $p=0,165$ ), surtout en cas d'oesophagite (3,4 fois le témoin).

#### b) Protéines de jonction et IL-8

L'expression de l'ARN de ZO-1 (figure 3) et de l'occludine (figure 4) dans les biopsies oesophagiennes n'était pas significativement différente entre les patients ( $n=11$ ) et les témoins ( $n=8$ ). L'expression de l'ARN de l'IL-8 (figure 5) chez les patients était significativement plus élevée que chez les témoins ( $p=0,043$ ), avec une expression 5,3 fois supérieure.

### 2 Comparaisons entre les sous-groupes de patients

Les patients ont été divisés selon le caractère pathologique ou non de l'EAO, de l'EOB, de l'EORI et de l'endoscopie. Ces 2 sous-groupes étaient comparés.

Seule l'expression de l'ARN codant pour ZO-1 et IL-8 était plus élevée chez les patients ayant une EOB pathologique (respectivement  $p=0,048$  et  $p=0,012$ , soit une expression 8 et 12 fois plus importante).

### 3 Corrélations entre les sous-groupes de patients

#### b) Corrélations type de reflux et perméabilité

Il y avait une corrélation significative entre la perméabilité de l'épithélium oesophagien et l'EAO (figures 6) d'une part ( $r=0,919$  ;  $n=7$  ;  $p<0,001$ ), et avec l'EORI (figure 7) d'autre part ( $r=0,739$  ;  $n=7$  ;  $p=0,0384$ ).

En revanche, il n'y avait pas de corrélation statistiquement significative entre l'EOB et la perméabilité de l'épithélium oesophagien ( $r=0,679$  ;  $n=7$  ;  $p=0,0735$ ).

#### c) Corrélations type de reflux et protéines de jonction ou IL-8

Il n'y avait pas de corrélation statistiquement significative entre l'EAO, l'EOB ou l'EORI et l'expression dans les biopsies oesophagiennes des ARN de ZO-1, de l'occludine ou de l'IL-8.

#### 4 DISCUSSION

Les apports principaux de ce travail sont de deux ordres : d'une part il montre que l'étude de la perméabilité oesophagienne à l'aide de biopsies prélevées au cours d'une endoscopie est possible, en utilisant des chambres de Ussing adaptées, et d'autre part qu'il existe une corrélation entre la perméabilité oesophagienne et l'agression par le reflux.

Les résultats de ce travail doivent cependant être considérés avec prudence car il ne s'agit que de données préliminaires portant sur un petit nombre de malades et de témoins. De plus les patients inclus dans cette étude, si ils avaient des symptômes de reflux, étaient des patients particuliers car adressés à un centre référence, consultant principalement pour un deuxième avis, et souvent dans le cadre d'un reflux atypique ou résistant au traitement. Le caractère atypique de cette population est attesté par une majorité de manifestations symptomatiques non typiques de reflux signalées par ces patients lors des enregistrements. Les enregistrements montrent tout de même un vraisemblable reflux pathologique chez 75% des patients (en considérant l'un au moins des 4 résultats suivants : pHmétrie, bilimétrie, impédancemétrie et/ou relation symptômes-reflux). Il est notable que 6 des 16 patients avaient un reflux duodéno-gastro-oesophagien, avec chez 5 d'entre eux un reflux acide associé. En revanche l'impédancemétrie oesophagienne n'était pathologique que chez 4 patients. Cette faible positivité de l'impédancemétrie dans ce groupe de patients peut suggérer a) pour une part des seuils de positivité un peu élevés [16], et b) la non prise en compte de reflux induisant une acidification prolongée, alors que la conductance oesophagienne est revenue à la normale.

Pour des raisons de sécurité invoquées par la Direction Générale de la Santé, il n'a pas été possible d'inclure des témoins volontaires sains. Cette contrainte a limité les comparaisons puisque les témoins retenus n'ont pu avoir qu'une exploration endoscopique avec biopsies, limitant ainsi les corrélations ultérieures avec les paramètres d'exposition au reflux au seul groupe des malades ayant un RGO. Surtout, et en dépit d'une particulière attention pour ne pas retenir de patients ayant des symptômes éventuellement compatibles avec un RGO chez ces témoins, le taux d'oesophagite chez ces « patients-témoins » était

particulièrement élevé, à 35%, alors que les taux d'oesophagite observés dans des populations asymptomatiques se situent aux alentours de 10% [26]. Cette observation souligne l'importance de comparer les malades ayant un RGO avec des sujets sains asymptomatiques, et le caractère indispensable de la vérification endoscopique de l'intégrité oesophagienne. A l'inverse les malades RGO inclus avaient un taux d'oesophagite faible (25%) par rapport au pourcentage habituel observé au cours du RGO, de l'ordre de 40 à 50% [27,28]. Ce taux réduit est vraisemblablement lié à la prise antérieure et souvent récente d'IPP.

A notre connaissance, notre étude est la première à évaluer les liens entre les paramètres ultrastructuraux et fonctionnels épithéliaux et les caractéristiques physico-chimiques du reflux chez l'homme. Cette recherche a d'abord imposé la mise au point d'une mesure de la perméabilité épithéliale oesophagienne à partir de biopsies prélevées en endoscopie. La perméabilité a été étudiée par la mesure du flux de protéines à travers des biopsies fraîches en chambre d'Ussing (*ex vivo*). Nous avons adapté la méthode déjà utilisée pour l'étude de la perméabilité colique [29,30]. La plus petite taille (2 à 3 mm de diamètre) des biopsies oesophagiennes a nécessité l'interposition de 2 disques perforés d'un orifice de 1,7 mm de diamètre (compromis surface d'échange/étanchéité) dans la chambre. Initialement nous avons mesuré la perméabilité à l'aide du dextran et de l'inuline, protéines de relativement haut poids moléculaire (2 à 5 kD). Nous avons dû changer de traceurs car, à la différence d'une muqueuse glandulaire colique ou iléale, l'épithélium oesophagien chez l'homme, qu'il s'agisse des témoins ou des patients ayant RGO, s'est révélé très peu perméable à ces protéines. L'utilisation de l'acide sulfonique (478 D), de maniement plus simple que le <sup>51</sup>Cr, a permis, par son faible poids moléculaire, d'étudier la perméabilité de l'épithélium pluri-stratifié de l'oesophage (perméabilité linéairement croissante au cours du temps – résultats du laboratoire non publiés).

Nos résultats sur cette petite série objectivent une tendance non significative à l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium oesophagien chez les patients ayant un RGO par rapport aux témoins, surtout en cas d'oesophagite (3,4 fois le témoin). La figure 2

montre que la perméabilité était basse chez 5 des 7 témoins étudiés. Si cette tendance se confirme sur un plus grand nombre de sujets sains asymptomatique, il sera nécessaire de documenter les nombreux paramètres pouvant contribuer à expliquer une perméabilité accrue chez certains sujets sains (température, stress, intégrité muqueuse, contenu physicochimique du milieu apical ou basal [31], ou véritable sous-population de témoins).

Des travaux de microscopie électronique mais également en microscopie optique ont montré qu'il existait un élargissement des espaces intercellulaires dans l'épithélium oesophagien des malades ayant un RGO, érosif ou non [14]. Une part importante de la cohésion cellulaire et de la régulation de la perméabilité épithéliale paracellulaire est sous le contrôle des jonctions serrées. Les jonctions serrées sont liées à la présence de protéines intracellulaires et transmembranaires connectées aux protéines du cytosquelette. Dans ce travail nous avons étudié 1 protéine à domaine principal intra-cellulaire, ZO-1, et une protéine à domaine principal transmembranaire, l'occludine (figure 6) [9,10]. Nos résultats sur ces faibles effectifs n'objectivent pas de modification significative de l'expression de l'ARN de ZO-1 et de l'occludine dans les biopsies oesophagiennes des patients, excepté pour ZO-1 dans le sous-groupe de patients ayant une EOB pathologique ( $p=0,048$ ). La tendance observée d'une hyperexpression des protéines de jonction, si elle se confirme, peut être interprétée comme un mécanisme de défense visant à consolider l'intégrité de l'épithélium et à limiter le passage paracellulaire de molécules potentiellement toxiques comme les acides biliaires. Jusqu'à maintenant seule une étude a évalué l'expression de ces protéines dans le reflux, avec également une absence de différence significative de l'expression de l'ARN de ZO-1 et de l'occludine entre des patients ayant un RGO non érosif et des patients ayant un RGO avec oesophagite [32].

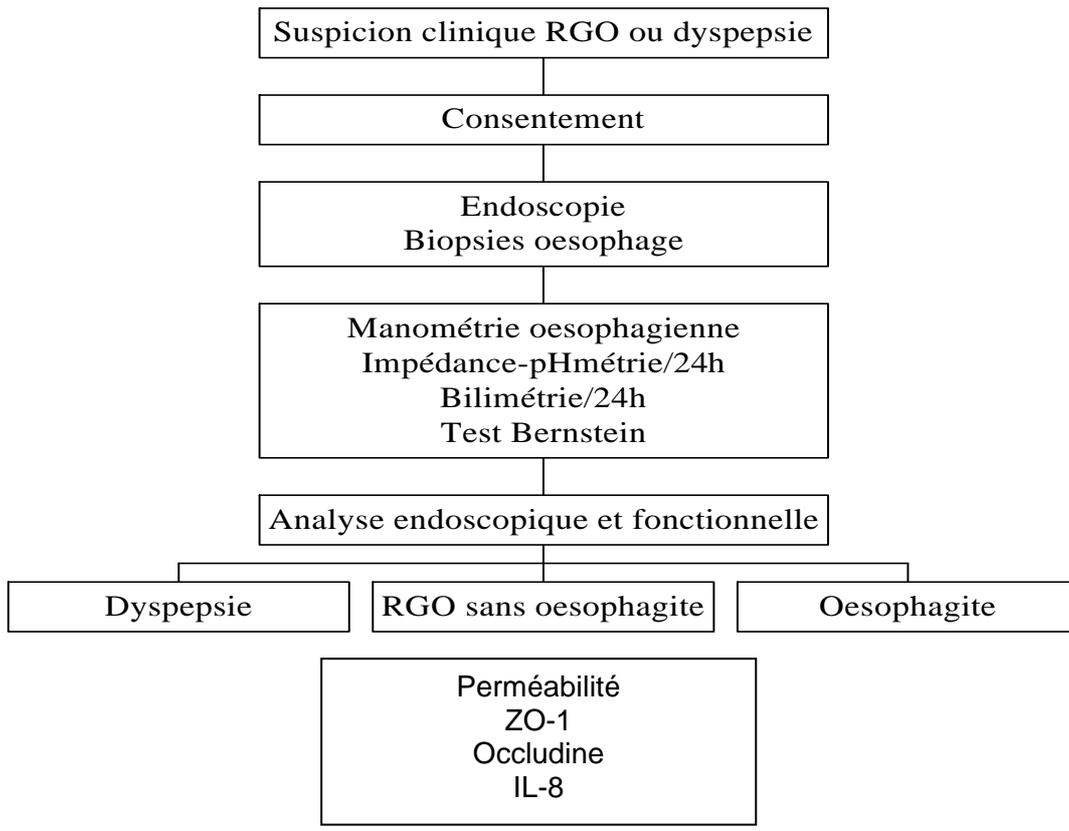
Nos résultats confirment l'élévation de l'expression d'IL-8 (3 à 10 fois) au cours du RGO [33,34]. De façon intéressante, nos résultats montrent une augmentation plus marquée de l'expression d'IL-8 en cas d'EOB pathologique (12 fois plus d'IL-8). La réponse inflammatoire accrue en cas de reflux biliaire pourrait être un reflet indirect de la plus grande agressivité du reflux à contenu duodénal et acide par rapport au reflux à contenu acide seul.

Ce résultat est à rapprocher de la plus grande fréquence du reflux biliaire chez les malades ayant un endobrachyoesophage [35,36].

La corrélation observée entre la perméabilité oesophagienne et l'exposition acide de l'oesophage ou l'exposition au reflux d'impédance est une donnée originale chez l'homme. Cette augmentation de la perméabilité liée à la sévérité du reflux était attendue d'après les données animales [11,12,]. Ce résultat doit inciter à rechercher dans le futur des liens entre la perméabilité et d'autres paramètres cliniques, et notamment l'hypersensibilité oesophagienne observée chez certains malades [37]. Dans le futur, de façon à homogénéiser les volumes tissulaires et éviter le « parasitage » sous-épithélial, il apparaît utile, pour la détermination des protéines de jonctions, d'envisager des techniques de microdissection manuelle avec séparation de l'épithélium du sous-épithélium. Dans l'avenir outre ces améliorations techniques, d'autres protéines de jonction et/ou du cytosquelette seront à étudier, ainsi que les corrélations avec les anomalies histologiques [34].

## FIGURES ET TABLEAU

### Schéma d'étude patient



### Schéma d'étude témoin

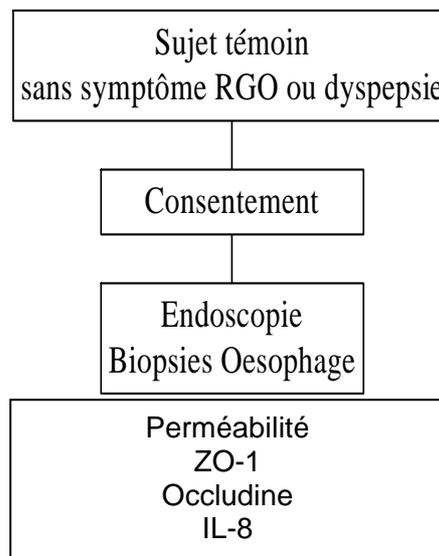


Figure 1 : Protocoles d'étude chez les patients et les témoins

Tableau I : Synthèse des résultats des explorations. EAO=Exposition acide oesophagienne ; EOB= Exposition oesophagienne à la bilirubine ; EORI=Exposition oesophagienne au reflux d'impédance ; Pm SIO=pression moyenne du sphincter inférieur de l'œsophage ; / = examen non réalisé ; + = résultat pathologique ; - = résultat normal

	Oesophagite	Pm SIO <10 cm H <sub>2</sub> O	Bernstein	EAO	EOB	EORI	Lien symptôme- reflux acide	Lien symptôme- reflux bilieux
1	Oui (B)	-	+	+	+	-	-	+
2	Oui (A)	+	+	/	-	/	/	-
3	Oui (B)	-	-	+	+	+	-	+
4	Oui (B)	+	+	+	+	-	-	-
5	Non	+	+	+	+	+	+	-
6	Non	-	+	-	+	+	+	+
7	Non	+	+	+	-	-	+	-
8	Non	-	-	-	-	-	-	-
9	Non	-	-	+	-	-	-	-
10	Non	-	-	/	-	/	/	-
11	Non	+	-	-	-	-	+	-
12	Non	-	-	-	-	-	+	-
13	Non	-	-	+	+	+	-	-
14	Non	-	+	+	-	-	-	-
15	Non	-	-	+	-	-	-	-
16	Non	+	+	-	-	-	-	-
Total pathologique	4	6	8	9	6	4	5	3

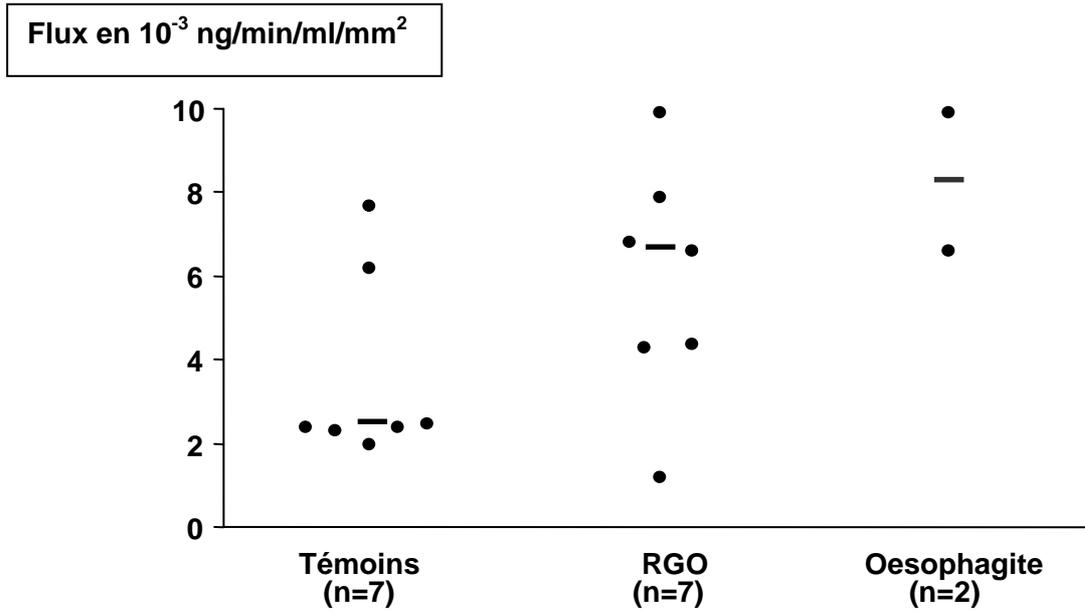


Figure 2 : Perméabilité (•) de l'épithélium oesophagien chez les patients avec ou sans oesophagite et les témoins, représentée par le flux transépithélial d'acide sulfonique ( $10^{-3}$  ng/min/ml/mm<sup>2</sup>) et les médianes (-) de chaque sous-groupe.

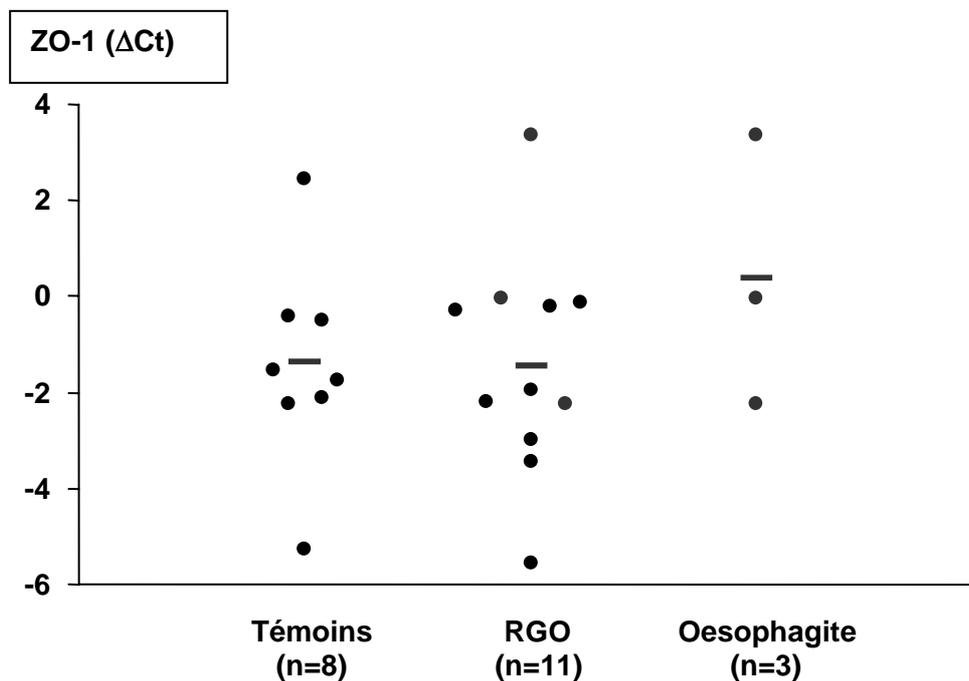


Figure 3 : Expression de l'ARN de ZO-1 (•) au sein des biopsies oesophagiennes des témoins et des patients avec ou sans oesophagite, pondérée par la PCR de la protéine de référence S6 ( $\Delta$ Ct) et les médianes (-) de chaque sous-groupe

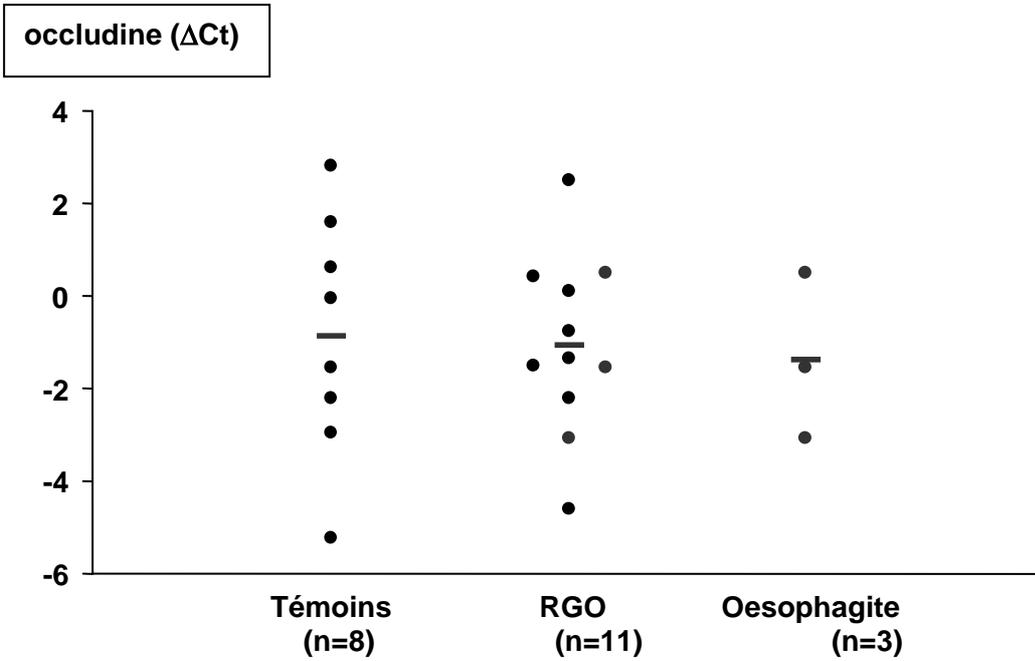


Figure 4 : Expression de l'ARN de l'occludine (•) au sein des biopsies oesophagiennes des témoins et des patients avec ou sans oesophagite, pondérée par la PCR de la protéine de référence S6 (ΔCt) et les médianes (-) de chaque sous-groupe

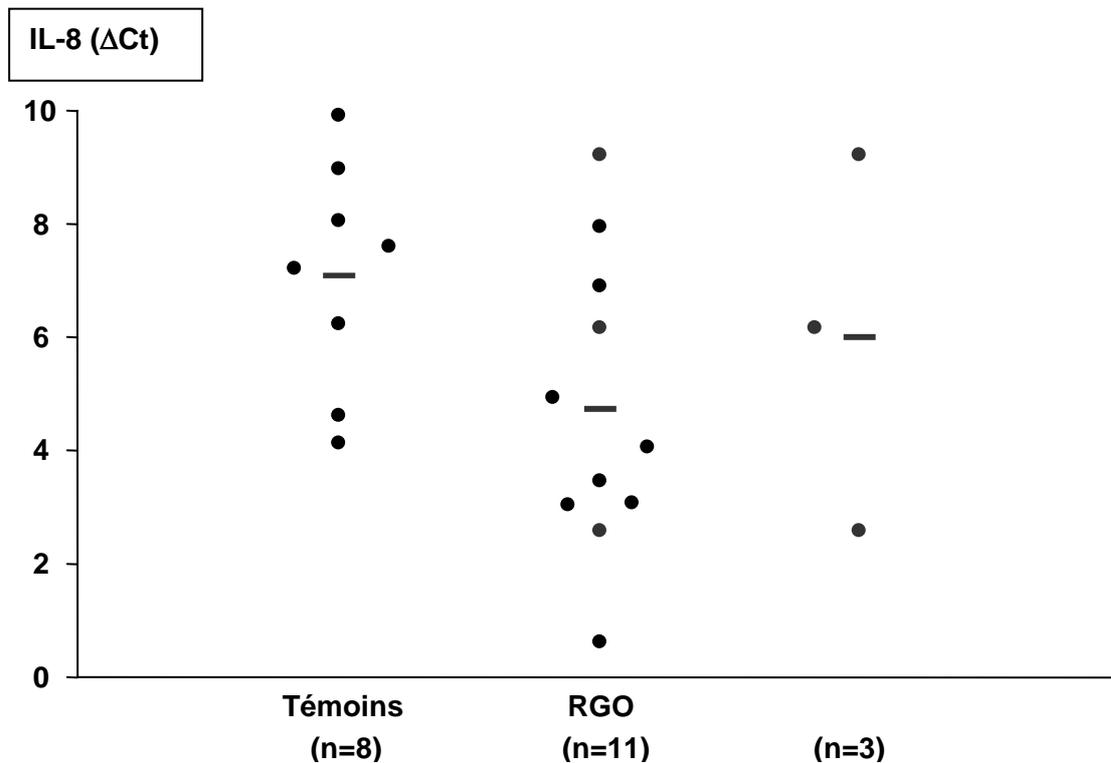


Figure 5 : Expression de l'ARN de l'IL-8 (•) dans les biopsies oesophagiennes des témoins et des patients RGO avec ou sans oesophagite, pondérée par la PCR de la protéine de référence S6 (ΔCt) et les médianes (-) de chaque sous-groupe.

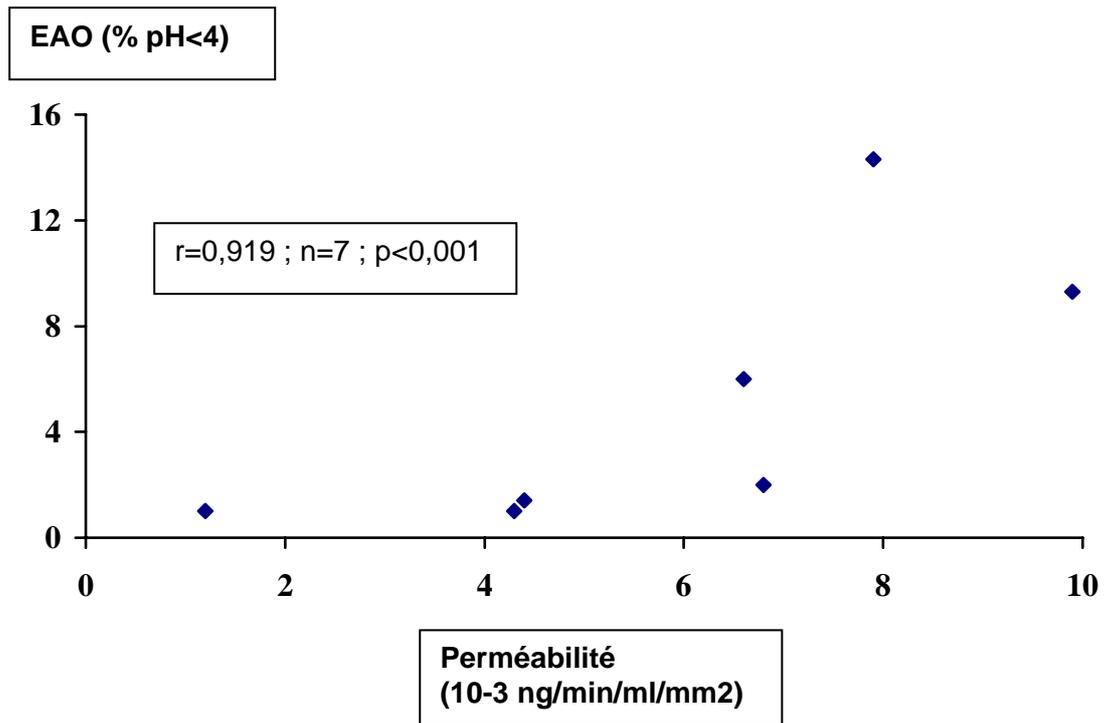


Figure 6 : Corrélation (Spearman) entre l'exposition acide oesophagienne (EAO) et la perméabilité de l'épithélium oesophagien, représentée par le flux d'acide sulfonique

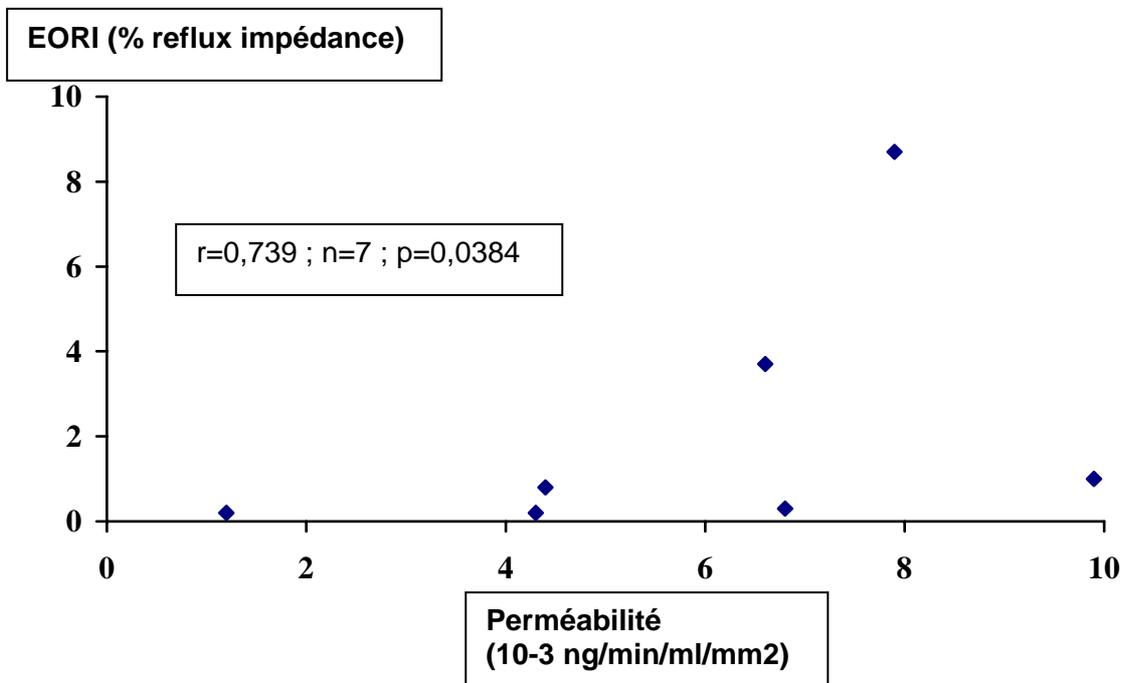


Figure 7 : Corrélation (Spearman) entre l'exposition oesophagienne au reflux d'impédance (EORI) et la perméabilité de l'épithélium oesophagien, représentée par le flux d'acide sulfonique

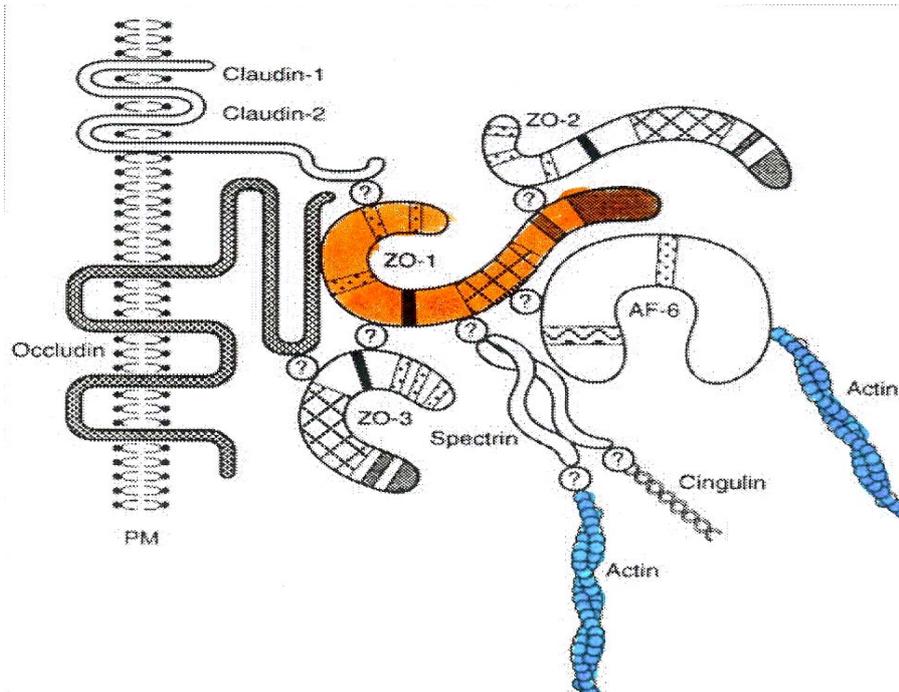


Figure 8 : Schéma des protéines connues au niveau des jonctions serrées et leur intrication avec le cytosquelette.

REFERENCES

1. Gotley DC, Morgan AP, Ball D, Owen RW, Cooper MJ. Composition of gastro-esophageal refluxate. *Gut* 1991;32:1093-9
2. Bremner RM, Crookes PF, DeMeester TR, Peters JH, Stein HJ. Concentration of refluxed acid and esophageal mucosal injury. *Am J Surg* 1992;164:522-6
3. Zerbib F, Bruley des Varannes S, Scarpignato C, Leray V, d'Amato M, Rozé C, Galmiche JP. Simultaneous assessment of lower esophageal sphincter function and fundic tone after a mixed meal in healthy humans : role of endogenous cholecystokinin. *Am J Physiol* 1998;275:G1266-73.
4. Zerbib F, Bruley des Varannes S, Ropert A, Lamouliatte H, Quinton A, Galmiche JP. et al. Proximal gastric tone in gastro-esophageal reflux disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:511-5.
5. Koek GH, Tack J, Sifrim D, Lerut T, Janssens J. The role of acid and duodenal gastroesophageal reflux in symptomatic GERD. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2033-40.
6. Silny J, Knigge KP, Fass J, Rau G, Matern S, Schumpelick V. Verification of the intraluminal electrical impedance measurement for the recording of gastrointestinal motility. *J Gastrointest Motil* 1993;5:107-22.
7. Sifrim D, Silny J, Holloway RH, Janssens JJ. Patterns of gas and liquid reflux during transient lower esophageal sphincter relaxation : a study using intraluminal electrical impedance. *Gut* 1999;44:47-54.
8. Orlando RC, Lacy ER, Tobey NA, Cowart K. Barriers to paracellular permeability in rabbit esophageal epithelium. *Gastroenterology* 1992;102:910-23.
9. Cereijido M, Shoshani L, Contreras RG. Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G477-G482.
10. Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli : nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G851-G857.
11. Tobey NA, Hosseini SS, Caymaz-Bor C, Wyatt HR, Orlando GS, Orlando RC. The role of pepsin in acid injury to esophageal epithelium. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3062-70
12. Orlando RC, Powell DW, Carney CN. Pathophysiology of acute acid injury in rabbit esophageal epithelium. *J Clin Invest* 1981;68:286-93

13. Calabrese C, Areni A, Miglioli M, Difebo G. Omeprazole and ultrastructural modifications occurring in reflux esophagitis. *Gastroenterology* 2002 ;122:837
14. De Hertogh G, Ectors N, VAN Eyken P, Geboes K. Review article:the nature of esophageal injury in gastro-esophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24(suppl.2):17-26
15. Lam HGT, Breumelhof R, Roelofs JMM, Van Berge-Henegouven GP, Smout AJPM. What is the optimal time window in symptom analysis of 24-hour esophageal pressure and pH data ? *Dig Dis Sci* 1994;39:402-9
16. Zerbib F, des Varannes SB, Roman S, Poudoux P, Artigue F, Chaput U et al. Normal value and day-to-day variability of 24-h ambulatory esophageal impedance-pH monitoring in a Belgian-French cohort of healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:1011-21
17. Sifrim D, Castell D, Dent J, Kahrilas PJ. Gastro-esophageal reflux monitoring:review and consensus report on detection and definitions acid, non-acid, and gas reflux. *Gut* 2004;53:1024-31
18. Breumelhof R, Smout AJ. The symptom sensitivity index:a valuable additional parameter in 24-hour esophageal pH records. *Am J Gastroenterol* 1991;86:160-4
19. Weusten BL, Roelofs JM, Akkermans LM, Van Berge-Henegouwen GP, Smout AJ. The symptom-association probability:an improved method for symptom analysis of 24-hour esophageal pH data. *Gastroenterology* 1994;107:1741-5
20. Bechi P, Pucciani F, Baldini F, Cosi F, Falciai R, Mazzanti R et al. Long-term ambulatory enterogastric reflux monitoring. Validation of a new fiberoptic technique. *Dig Dis Sci* 1993;38:1297-306
21. Vaezi MF, Lacamera RG, Richter JE. Validation studies of Bilitec 2000:an ambulatory duodenogastric reflux monitoring system. *Am J Physiol* 1994;267:G1050-7
22. Tack J, Bisschops R, Koek G, Sifrim D, Lerut T, Janssens J. Dietary restrictions during ambulatory monitoring of duodenogastric reflux. *Dig Dis Sci* 2003;48:1213-20
23. Ghillebert G, Janssens J, Vantrappen G, Nevens F, Piessens J. Ambulatory 24-hour intra-esophageal pH and pressure recordings vs. Provocation tests in the diagnosis of chest pain of esophageal origin. *Gut* 1990;31:738-44
24. Bernstein LM, Baker LA. A clinical test for esophagitis. *Gastroenterology* 1958;34:760-81
25. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta Ct) Method. *Methods* 2001;25:402-8

26. Ronkainen J, Aro P, Storskrubb T, Johansson SE, Lind T, Bolling-Sternevald E et al. High prevalence of gastroesophageal reflux symptoms and esophagitis with or without symptom in the general adult Swedish population: a Kalixanda study report. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:275-85
27. Dent J, Brun J, Fendrick AM, et al. on behalf Genval Working Group. An evidence-based appraisal of reflux disease management-The Genval workshop report. *Gut* 1999;44(suppl 2):S1-16
28. El-Serag HB, Sonnenberg A. Associations between different forms of gastro-esophageal reflux disease. *Gut* 1997;41:594-9
29. Soderholm JD, Peterson KH, Olaison G, Franzen LE, Westrom B, Magnusson KE et al. Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* 1999;117:65-72
30. Wallon C, Braaf Y, Wolving M, Olaison G, Soderholm JD. Endoscopic biopsies in Ussing chambers evaluated for studies of macromolecular permeability in human colon. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:586-595
31. Baumgart DC, Dignass AU. Intestinal Barrier Function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:685-94
32. Moenkemueller K, Peitz U, Wex T, Beyer M, Kolfenbach S, Malfertheiner P. Patients with non-erosive reflux disease (NERD) demonstrate upregulation of TRPV1 receptors in the distal esophagus as compared to other GERD groups. *Gastroenterology* 2006;130:A396
33. Kanazawa Y, Isomoto H, Wen CY, Wang AP, Saenko VA, Ohtsuru A et al. Impact of endoscopically minimal involvement on IL-8 mRNA expression in esophageal mucosa of patients with non-erosive reflux disease. *World J Gastroenterol* 2003;9:2801-4
34. Isomoto H, Saenko VA, Kanazawa Y, Nishi Y, Ohtsuru A, Inoue K et al. Enhanced expression of interleukin-8 and activation of nuclear factor kappa-B in endoscopy-negative gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2004;99:589-97
35. Dresner SM, Griffin SM, Wayman J, Bennett MK, Hayes N, Raimes SN. Human model of duodenogastro-esophageal reflux in the development of Barrett's metaplasia. *Br J Surg* 2003;90:1120-8
36. Vaezi MF, Richter JE. Role of acid and duodenogastroesophageal reflux in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 1996 ;111 :1192

37. Shi G, Bruley des Varannes S, Scarpignato C, Le Rhun M, Galmiche JP. Reflux related symptoms in patients with normal esophageal exposure to acid. *Gut* 1995;37:457-64

## RESUME

NOM : GEAY

PRENOM : JULIEN

**Introduction** : Au cours du reflux gastro-oesophagien (RGO), la barrière épithéliale oesophagienne (BEO) intervient de façon mal connue dans le contrôle des symptômes et des lésions muqueuses.

**Buts** : Les buts de cette étude étaient a) de caractériser l'intégrité ultra-structurale et fonctionnelle de la BEO (perméabilité, protéines de jonction, cytokines), et b) de rechercher des corrélations entre les modifications de la BEO et les caractéristiques des reflux au cours du RGO.

**Méthodes** : Seize patients ayant une fibroscopie oeso-gastro-duodénale avec biopsies œsophagiennes et des explorations fonctionnelles pour des symptômes de RGO, et 13 témoins asymptomatiques ayant une endoscopie avec biopsies œsophagiennes ont été inclus. La perméabilité épithéliale était étudiée sur les biopsies en chambres de Ussing modifiées, et l'ARN des protéines de jonction (ZO-1 et occludine) et de l'IL-8 était quantifié.

**Résultats** : la perméabilité oesophagienne tendait à être plus élevée chez les patients ( $p=0,165$ ). L'ARN codant pour ZO-1 et IL-8 était significativement augmenté en cas d'exposition oesophagienne à la bilirubine pathologique ( $p=0,048$  et  $p=0,012$  respectivement). La perméabilité était corrélée au reflux d'impédance ( $r=0,739$  ;  $n=7$  ;  $p=0,0384$ ) et au reflux acide ( $r=0,919$  ;  $p<0,001$ ).

**Conclusion** : La perméabilité de la BEO humaine peut être mesurée sur des biopsies prélevées en endoscopie. Les modifications de la BEO semblent varier selon le type de reflux. Ces résultats préliminaires incitent à poursuivre la caractérisation des paramètres fonctionnels de la BEO au cours du RGO.

**Mots-clés** : Reflux gastro-oesophagien – Perméabilité – Barrière épithéliale oesophagienne – pH-impédancemétrie–Bilimétrie.