

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DES
PERTURBATIONS DU RENOUVELLEMENT DE L'EPITHELIUM
INTESTINAL ET DE L'ONCOGENESE AU COURS DES MALADIES
INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIE

Discipline : Médecine

Spécialité : Anatomie et Cytologie Pathologiques

présentée et soutenue publiquement par

BOSSARD Céline

Le 24 septembre 2008, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

Pr SCOAZEC Jean-Yves, PU-PH, Lyon

Dr SERVIN Alain, Directeur de Recherche INSERM, Chatenay-Malabry

Examineurs

Pr BRULEY DES VARANNES Stanislas, Pr. des Universités-Praticien hospitalier, Nantes

Dr FORGEZ Patricia, Directeur de Recherche INSERM, Paris

Dr JARRY Anne, Chargé de Recherche INSERM, Nantes **Co-directeur de Thèse**

Pr LABOISSE Christian, Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Nantes

Pr TERRIS Benoît, Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Paris

Directeur de Thèse

Pr MOSNIER Jean-François, Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Nantes

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABBREVIATIONS	5
INTRODUCTION GENERALE	9
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	13
1. Brefs rappels sur la barrière épithéliale intestinale	13
1.1. Définition de l'intestin.....	13
1.1.1. Aspects morphologiques de l'épithélium intestinal	14
1.1.2. Aspects morphologiques de l'épithélium colique.....	16
1.2. Une barrière physique étanche et modulable	18
1.3. Une barrière en perpétuel renouvellement	21
 <u>1^{ère} partie</u>	
2. L'oncogenèse au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.....	27
2.1. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou MICI	27
2.1.1. Définition, épidémiologie	27
2.1.2. Aspects clinico-pathologiques	27
2.1.3. Etiologie et facteurs étiopathogéniques	29
2.2. Le problème de la détection des lésions dysplasiques dans un contexte inflammatoire.	35
2.2.1. Une détection endoscopique difficile	36
2.2.2. Une nomenclature histologique ambiguë des lésions dysplasiques	38
2.2.3. Une prise en charge thérapeutique des lésions de dysplasie non codifiée	41
2.3. Les anomalies moléculaires associées à la séquence inflammation / dysplasie / cancer dans les MICI.....	42
2.3.1. Rappels sur les principales anomalies génétiques rencontrées dans la carcinogenèse colorectale sporadique	43
2.3.1.1. La voie d'instabilité chromosomique (CIN).....	43
2.3.1.1.1. Morphologie des lésions néoplasiques en muqueuse non inflammatoire associées à la voie CIN	45
2.3.1.1.2. Les principaux gènes impliqués dans la voie CIN	46
2.3.1.1.3. Méthodes de détection des anomalies génétiques associées à la voie CIN	57
2.3.1.2. La voie d'instabilité microsatellitaire (MSI)	60
2.3.1.2.1. Morphologie des lésions préneoplasiques et néoplasiques associées à la voie MSI.....	60
2.3.1.2.2. Principales anomalies moléculaires impliquées dans la voie MSI..	65
2.3.1.2.3. Méthodes de détection des anomalies moléculaires associées à la voie MSI	69
2.3.2. Les particularités génétiques associées à la carcinogenèse dans les MICI ...	71
2.3.2.1. La voie d'instabilité chromosomique	71
2.3.2.1.1. Les anomalies du gène <i>P53</i>	72
2.3.2.1.2. Les mutations du gène <i>KRAS</i>	73
2.3.2.1.3. Les anomalies du gène <i>APC</i>	74
2.3.2.2. La voie d'instabilité microsatellitaire.....	74
2.3.2.3. Implication du processus chronique inflammation / régénération dans l'apparition des anomalies moléculaires au cours de la carcinogenèse	75
2.3.3. Les marqueurs utilisés en pratique courante comme aide au diagnostic des lésions de dysplasie dans les MICI.....	76
2.3.4. La validation de marqueurs d'intérêt nécessite l'utilisation de bio-collection. .	78
2.3.5. Problème : quelle valeur prédictive faut-il donner aux anomalies moléculaires détectées précocément ?	79
2.4. Implication d'une hormone et de son récepteur dans la séquence inflammation / régénération / dysplasie / cancer associée aux MICI.....	81
2.4.1. Les principaux acteurs de la régénération épithéliale intestinale	81
2.4.2. La neurotensine : un bon candidat pour la régénération épithéliale ?	82

2.4.2.1.	Structure et biosynthèse de la neurotensine	82
2.4.2.2.	Localisation de la neurotensine	84
2.4.2.3.	Principaux effets biologiques périphériques de la neurotensine	85
2.4.2.4.	Preuves d'un effet trophique sur la muqueuse intestinale	86
2.4.2.5.	Les récepteurs de la neurotensine	87
2.4.3.	Preuves de l'implication du couple NT/NTS1 dans la modulation de l'inflammation intestinale et dans le processus de régénération épithéliale	89
2.4.4.	La neurotensine et son récepteur NTS1 : implication dans le processus de carcinogenèse associée au MICI ?	90

2^{ème} partie

3.	Mécanismes gouvernant l'homéostasie de la muqueuse intestinale.....	94
3.1.	Les principaux acteurs impliqués dans le maintien de l'homéostasie	94
3.1.1.	L'épithélium intestinal : une barrière physique et fonctionnelle interactive ...	96
3.1.1.1.	Le gel de mucus assure une protection de la barrière intestinale contre les micro-organismes.....	96
3.1.1.2.	L'épithélium intestinal : une barrière immunitaire innée.....	98
3.1.2.	La flore bactérienne commensale ou microbiote.....	100
3.1.2.1.	Définition	100
3.1.2.2.	Méthodes d'étude de la flore intestinale.....	101
3.1.2.3.	Répartition topographique et principales fonctions métaboliques de la flore intestinale	103
3.1.3.	Les cellules immunitaires résidentes de la muqueuse intestinale	106
3.1.3.1.	Inventaire et fonctions	110
3.1.3.1.1.	Les macrophages	112
3.1.3.1.2.	Les cellules dendritiques	115
3.1.3.1.3.	Les lymphocytes T	121
3.1.3.1.4.	Les cellules B.....	125
3.2.	Rôles de la flore intestinale dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse	128
3.2.1.	Influence de la flore intestinale sur les cellules épithéliales	128
3.2.1.1.	Méthodes d'étude	129
3.2.1.1.1.	Les modèles de culture cellulaire	129
3.2.1.1.2.	Les modèles animaux	129
3.2.1.1.3.	Les études de génomique fonctionnelle.....	130
3.2.1.2.	Etanchéité relative de la barrière épithéliale intestinale aux bactéries à l'état normal	131
3.2.1.3.	Moyens de « communication » entre la cellule épithéliale intestinale et la flore intestinale : les récepteurs de type Toll (TLR).....	132
3.2.1.3.1.	Définition des TLR	132
3.2.1.3.2.	Les TLR suscitent une réponse pro-inflammatoire	138
3.2.1.4.	TLR et mutualisme	140
3.2.2.	Influence de la flore intestinale sur les cellules immunitaires du chorion	144
3.3.	Les interactions cellules épithéliales / cellules immunitaires du chorion dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale	145
3.3.1.	Les éléments du dialogue : des cytokines et leurs récepteurs.....	148
3.3.1.1.	Les raisons d'un choix.....	148
3.3.1.1.1.	L'interféron γ	149
3.3.1.1.2.	Le TNF α	157
3.3.1.1.3.	L'IL17	165
3.3.1.2.	Les cytokines immunorégulatrices.....	170
3.3.1.2.1.	L'IL10	170
3.3.1.2.2.	Le TGF β	179
RESULTATS		186
Articles 1 et 2.....		186
1.	Introduction.....	186
2.	Résumé de l'article 1 " <i>Involvement of the serrated neoplasia pathway in inflammatory bowel disease-related colorectal oncogenesis</i> "	187

3. Résumé de l'article 2 " <i>Over-expression of neurotensin high-affinity receptor 1 (NTS1) in relation with its ligand neurotensin (NT) and nuclear β-catenin in inflammatory bowel disease-related oncogenesis</i> "	189
4. Discussion	190
Article 3	193
1. Introduction	193
2. Résumé de l'article 3 " <i>Mucosal IL-10 and TGF-β play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-γ mediated epithelial damage in human colon explants</i> "	194
3. Discussion	196
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	198
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	201
ANNEXE	237
1. Les fondements de la culture d'explant (ou culture organotypique) et ses applications .	
237	
1.1. La culture cellulaire	237
1.2. Culture d'explants	239

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADAM: a disintegrin and metalloproteinase
ADN: acide désoxyribonucléique
ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNr: acide désoxyribonucléique ribosomique
APC: adenomatous polyposis coli
ARN: acide ribonucléique
ARNm: acide ribonucléique messenger
AP-1: activator protein 1
BA: bleu alcian
BIP: bactericidal/permeability-increasing protein
BMP: bone morphogenetic protein
CAMP: cathelin antimicrobial peptide
CARD: caspase recruitment domain
CCR: cancer colorectal
CD: cluster of differentiation
Cdk: cyclin dependant kinase
CHO: Chinese hamster ovary cell
CK1 α : casein kinase 1 alpha
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
CPA: cellule présentatrice de l'antigène
CRE: AMPc responsive element
CREB/ATF: AMPc response element binding protein/activated transcription factor
DALM: dysplasia associated lesion or mass
DC: dendritic cell
DCC: deleted in colorectal carcinoma
DKK1: dickkopf 1
DPC4: deleted in pancreatic carcinoma
DMSO: dimethyl sulfoxide
DSS: dextran sulfate sodium
EGF: epidermal growth factor
EGFR: epidermal growth factor receptor
ELISA: enzyme-linked immunoabsorbent assay
ERK: extracellular regulated kinase
FACS: fluorescent activated cell sorter
FADD: Fas-associated death domain protein
FLI: follicule lymphoïde isolé
Fz: frizzled
GAF: gamma interferon activation factor

GALT: gut associated lymphoid tissue
 GAS: gamma interferon activation site
 G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor
 GM-CSF: granulocyte monocyte colony-stimulating factor
 GDP: guanosyl di-phosphate
 GLP2: glucagon-like protein 2
 GMPc: guanosyl monophosphate cyclique
 GPCR: G protein-coupled receptor
 GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 beta
 GTP: guanosyl tri-phosphate
 hBD: human beta defensin
 HD: human defensin
 HES: h matoxyline  osine safran
 HLA: human leucocyte antigen
 HNPCC: hereditary non polyposis colorectal cancer
 hMLH1: human mutL homologue 1
 hMSH2: human mutS homologue 2
 hMSH6: human mutS homologue 6
 hPMS1: human postmeiotic segregation increased
 hPMS2: human postmeiotic segregation increased 2
 H-RAS: Harvey-ras
 IFN γ : interferon gamma
 Ig: immunoglobuline
 IL: interleukine
 IP: inositol phosphate
 IPEX: immune dysr gulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked
 IRAK: interleukine 1 receptor activated kinase
 IRF1: interferon regulatory factor 1
 ISEMF: intestinal sub-epithelial myofibroblast
 JAM: junction adhesion molecule
 JNK: Jun N-terminal kinase
 K-RAS: Kirsten-ras
 LAP: latency-associated protein
 LIE: lymphocyte intra- pith lial
 LLC: large latent complexe
 LPS: lipopolysaccharide
 LTA: lipote ichoic acid
 LTBP: latent transforming growth factor-binding protein
 LTGF β : latent transforming growth factor
 LRR: leucin rich domain

MAP: mitogen activated protein
 MCR: mutation cluster region
 MCT1: monocarboxylate transporter 1
 MDP: muramyl dipeptide
 MICI: maladie inflammatoire chronique de l'intestin
 MMP: metalloproteinase
 MMR: mismatch repair
 MSI: microsatellite instable
 MSS: microsatellite stable
 NK: natural kinase
 NFκB: nuclear factor κB
 NN: neuromedine
 NOD: nucleotide-binding oligomérisation domain
 N-RAS: neuroblastoma-ras
 NT: neurotensine
 NTS1: neurotensine receptor 1
 OMS: Organisation Mondiale de la Santé
 PAMP: pathogen associated molecular pattern
 PAS: périodic acid schiff
 PEEC: pathogen-elicited epithelial chemoattractant
 PI3K: phosphoinositide kinase 3
 PLC: phospholipase C
 PR: polyarthrite rhumatoïde
 PRR: pattern recognition receptor
 PTEN: phosphatase and tensin homologue
 RCH: rectocolite ulcéro-hémorragique
 RER: replication error
 RFLP: restriction fragment length polymorphism
 RIP1: receptor-interacting protein 1
 RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction
 SCID: severe combined immunodeficiency
 SFRP: secreted frizzled related protein
 siRNA: small interfering ribonucleotide acid
 SLPI: secretory leucocyte protease inhibitor
 SNC: système nerveux central
 SSA: serrated sessile adenoma
 SSCP: single strand conformation polymorphism
 STAT: signal transducer and activator of transcription
 SLC: small latent complexe
 TACE: tumor necrosis factor converting enzyme

TCF4/LEF: T-cell factor 4 / lymphocyte enhancer factor

TCR: T-cell receptor

TGF: transforming growth factor

Th: T-helper

TIR: toll interleukine 1

TIR 8: Toll / interleukine 1 receptor 8

TLR: toll-like receptor

TNBS: trinitrobenzene sulfonic acid

TNF: tumor necrosis factor

TRADD: tumor necrosis factor associated death domain

TRAF2: tumor necrosis factor associated factor 2

TSLP: thymic stromal lymphopoietin

UFC: unité formant colonies

WIF1: Wnt inhibitor factor 1

Wnt: wint

ZO-1, -2: zonula occludens-1, -2

INTRODUCTION GENERALE

L'homéostasie, terme créé par Claude Bernard vers 1860, se définit comme « la capacité de l'organisme à maintenir un état de stabilité relative des différentes composantes de son milieu interne et ce, malgré les variations constantes de l'environnement externe ». Pour le colon, l'épithélium de la muqueuse, situé à l'interface entre le milieu intérieur et la lumière riche en populations bactériennes, est le pivot des mécanismes de l'homéostasie de la barrière intestinale. Cette homéostasie peut-être rompue au cours de 2 processus physiopathologiques. La prolifération des cellules épithéliales, qui en conditions physiologiques, participe au processus de « régénération » de la barrière intestinale suite à une agression du milieu extérieur, peut devenir incontrôlée et initier le processus d'oncogenèse. A l'inverse, au cours de processus inflammatoires, cette barrière intestinale peut subir une perte cellulaire accélérée. Ces 2 phénomènes, prolifération cellulaire et perte cellulaire, sont étroitement intriqués au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) que sont la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (RCH). En effet, ces 2 pathologies se caractérisent par des phases successives de remodelage et de destruction de la muqueuse intestinale qui peuvent évoluer à long terme vers des lésions de dysplasie et de cancer.

Jusqu'ici, ces problèmes d'homéostasie de la muqueuse intestinale n'ont été abordés chez les patients atteints de maladie de Crohn et de RCH que par des études descriptives, à partir de constatations endoscopiques et morphologiques. Nous manquons de données sur les aspects mécanistiques qui sous-tendent les différentes phases évolutives de ces 2 pathologies, que sont l'inflammation, la régénération, la dysplasie et le cancer. Ceci, en raison d'un manque d'études intégrant à la fois des données endoscopiques, morphologiques, biologiques, génétiques, et de biologie cellulaire. En outre, nous ne disposons pas de modèles aisément manipulables, permettant de reconstituer *ex vivo* le stress inflammatoire de la muqueuse et d'étudier son retentissement sur l'épithélium.

C'est pourquoi ce travail est divisé en 2 grandes parties. La première partie, clinico-pathologique, est fondée sur l'exploitation d'une cohorte de patients atteints de MICI, annotés cliniquement, et ayant développé des lésions coliques

régénératives, prénéoplasiques et néoplasiques reconstituant la séquence inflammation / régénération / dysplasie / cancer. A partir de cette cohorte, nous avons testé des marqueurs phénotypiques et génotypiques susceptibles d'être associés à chacune de ces étapes de carcinogenèse, et étudié la ré-expression d'une boucle de régulation autocrine / paracrine d'un facteur trophique pour les cellules épithéliales coliques. La seconde partie, fondamentale, a consisté à mettre au point un système de culture d'explants de muqueuse colique humaine normale permettant de recréer *ex vivo* l'initiation d'une réponse inflammatoire de type Th1 et d'étudier le comportement des cellules résidentes de la muqueuse au cours de ce processus.

Ce sont ces 2 approches, l'une clinico-pathologique et l'autre fondamentale, permettant de mieux comprendre les mécanismes de la perte de l'homéostasie de l'épithélium colique au cours des maladies inflammatoires, que nous allons brièvement décrire dans cette introduction.

La séquence inflammation / régénération / cancer dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Le risque de développer un cancer colorectal chez les patients atteints de MICI au cours de l'évolution de leur maladie est connu depuis longtemps. Depuis la description de cette séquence d'événements morphologiques - inflammation / régénération / cancer - par Riddell et al. à la fin des années 1970, on a cherché à comprendre les événements cellulaires et moléculaires qui sous-tendent l'apparition des lésions de dysplasie et de cancer dans ce contexte inflammatoire. En effet, ces anomalies cellulaires et moléculaires, survenant très précocement au cours du processus d'oncogenèse, sont incomplètement connues et différentes de celles impliquées dans la carcinogenèse colorectale sporadique. Or, de par leur caractère très précoce, elles pourraient servir de marqueurs prédictifs permettant d'identifier les patients à risque de développer un cancer colorectal, indispensables pour une prise en charge préventive optimale. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de nouveaux marqueurs cellulaires et moléculaires impliqués très précocement dans ce processus d'oncogenèse, à partir d'une cohorte de patients atteints de MICI, annotés cliniquement et morphologiquement.

Développement d'une nouvelle approche *ex vivo* des mécanismes de la perte d'homéostasie de la barrière intestinale

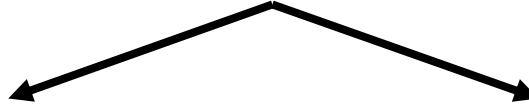
De nombreux modèles expérimentaux animaux ont été développés pour essayer de comprendre les mécanismes qui sous-tendent le maintien de l'intégrité de la muqueuse colique dans un environnement riche en bactéries. On ne sait pas actuellement si les résultats obtenus à partir de ces modèles animaux sont pertinents chez l'homme. Pour aborder 1) l'homéostasie immunologique de la muqueuse intestinale, et 2) sa relation avec l'épithélium, nous proposons une nouvelle approche fondée sur le maintien en culture d'explants de la muqueuse colique humaine. Cette approche a l'avantage de maintenir les rapports tridimensionnels entre les différentes cellules résidentes de la muqueuse. A partir de ce modèle expérimental, il est possible, grâce à des outils appropriés, de créer une rupture du dialogue intercellulaire et d'initier une inflammation. Les perspectives de ce modèle sont nombreuses, en physiologie, physiopathologie et pharmacologie. Cette approche expérimentale s'intègre dans une démarche translationnelle, entre la souris et la pathologie humaine.

En conclusion, cette thèse, visant à décrypter certains mécanismes de la perturbation de l'homéostasie épithéliale intestinale au cours de l'inflammation, se présente schématiquement comme suit :

Titre : Mécanismes cellulaires et moléculaires des perturbations du renouvellement de l'épithélium intestinal et de l'oncogenèse au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin



« Introduction générale » et « chapitre 1 » de la synthèse bibliographique



1^{ère} partie

Approche clinico-pathologique

Etude de nouveaux biomarqueurs impliqués dans la séquence inflammation / régénération / dysplasie / cancer dans les MICI à partir d'une bio-collection tissulaire

Synthèse bibliographique :
chapitre 2

Résultats : articles 1 et 2:

Bossard et al. *Involvement of the serrated neoplasia pathway in inflammatory bowel disease-related colorectal oncogenesis.* **Oncol Rep** 2007;**179:1123-31.**
Bossard et al. *Over-expression of neurotensine high-affinity receptor 1 (NTS1) in relation with its ligand neurotensin (NT) and nuclear β caténine in inflammatory bowel disease-related oncogenesis.* **Peptides** 28;2030-5.

Discussion

2^{ème} partie

Approche fondamentale

Développement d'une nouvelle approche ex vivo des mécanismes de la perte d'homéostasie de la barrière intestinale

Synthèse bibliographique :
chapitre 3

Résultats : article 3 :

Jarry, Bossard et al. *Mucosal IL10 and TGF β play crucial roles in preventing LPS-driven IFN γ mediated epithelial damage in human colon explants.* **J Clin Invest** 2008;**118:1132-42.**

Discussion

Un chapitre « conclusion générale et perspectives » visant à mettre en valeur le potentiel de valorisation de notre approche clôture cette thèse.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Brefs rappels sur la barrière épithéliale intestinale

1.1. Définition de l'intestin

L'intestin est divisé chez l'homme et la plupart des mammifères en deux parties, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) en amont de la valvule iléo-cæcale de Bauhin, et l'intestin distal (cæcum, colon droit, colon transverse, colon gauche et rectum) en aval. Cette valvule iléo-cæcale joue le rôle de barrière à sens unique entre l'iléon et le cæcum et empêche la contamination de l'iléon par le contenu du cæcum riche en bactéries.

L'intestin est constitué de 4 tuniques distinctes - la muqueuse, bordée d'un épithélium spécialisé, la sous-muqueuse, la musculieuse et la séreuse - schématisées sur la **Figure 1**.

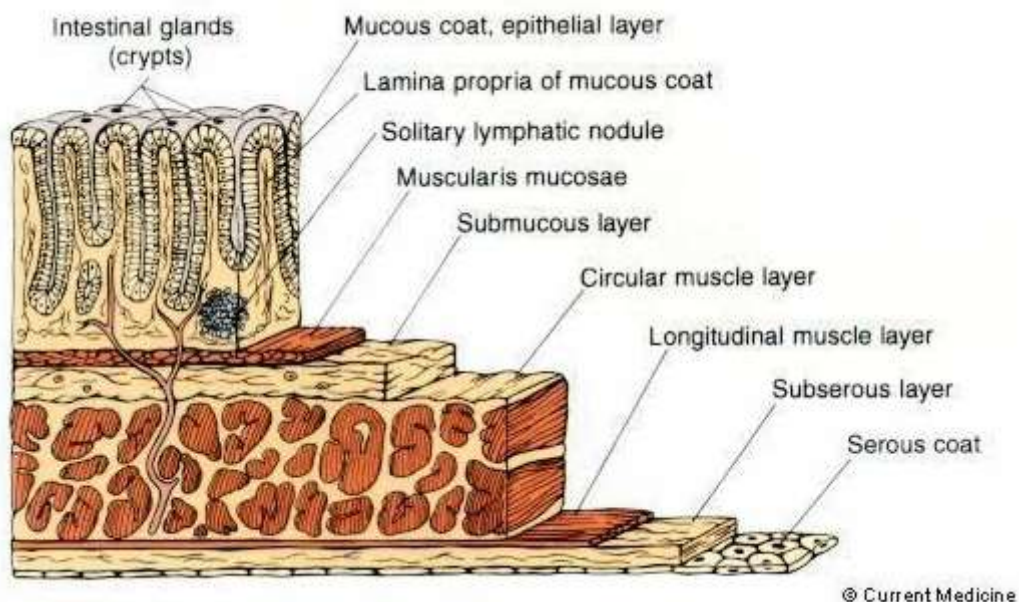


Figure 1 : Schéma de la paroi intestinale chez l'homme

L'intestin grêle est le principal lieu d'absorption des nutriments (glucides, protéines, acides aminés), électrolytes, vitamines et eau, alors que la principale fonction du colon est de transformer les résidus non digestibles de l'intestin grêle en fèces, par réabsorption d'eau et de sels solubles, le mucus sécrété par les cellules épithéliales favorisant notamment le passage de ce résidu solide. Ces fonctions différentes exercées par l'intestin grêle et le colon sont associées à des aspects morphologiques distincts de l'épithélium de revêtement de ces 2 portions du tube digestif.

1.1.1. Aspects morphologiques de l'épithélium intestinal (intestin grêle)

Afin d'augmenter l'efficacité d'assimilation des nutriments, la structure de l'intestin grêle offre une importante surface d'échanges avec 3 niveaux d'organisation de la muqueuse : les plis circulaires transversaux ou valvules conniventes de 1 cm de haut, les villosités intestinales de 0.5 à 1 mm de haut, et enfin les microvillosités de la bordure en brosse des cellules absorbantes (ou entérocytes), de 1 à 2 μm de hauteur, visibles en microscopie électronique. Cette bordure en brosse est recouverte d'une enveloppe formée de glycoprotéines transmembranaires ou adsorbées, le glycocalix, qui « héberge » de nombreuses hydrolases impliquées dans l'achèvement des dernières étapes de la digestion. Elle est visible sur coupes paraffinées, colorées au PAS, sous la forme d'un liseré apical presque continu. Dispersées parmi les entérocytes, principales cellules de l'épithélium des villosités, sont visibles quelques cellules à mucus, de rares cellules endocrines et quelques lymphocytes intra-épithéliaux T cytotoxiques CD8+. Au niveau de l'iléon, en regard des follicules lymphoïdes intra-muqueux des plaques de Peyer, l'épithélium de revêtement « associé aux follicules » prend un aspect particulier : le nombre de cellules à mucus diminue, les lymphocytes T intra-épithéliaux sont plus nombreux, plutôt de type helper CD4+, et les entérocytes sont associés à des cellules épithéliales spécialisées, les cellules M, dont le rôle est de capter les antigènes intra-luminaux par endocytose pour les présenter aux cellules immunocompétentes du chorion, au pôle basolatéral. En microscopie électronique, leur pôle apical est constitué de courts micro-replis (Owen et Jones, 1974), d'où leur nom.

Les cryptes, correspondant à des glandes tubuleuses droites enchâssées dans le chorion, sont impliquées dans le renouvellement des cellules épithéliales spécialisées. Elles sont bordées d'un épithélium dont la composition varie depuis le fond de la crypte jusqu'à son sommet : des cellules souches indifférenciées, des cellules de Paneth et des cellules endocrines dans le fond de la crypte, mêlées à une proportion croissante de cellules à mucus et d'entérocytes bien différenciés vers le sommet de la crypte (**Figure 2**). Les cellules endocrines, renfermant des granules intra-cytoplasmiques, infra-nucléaires, éosinophiles sur coupes colorées à l'HES (Hématéine-éosine-safran), sont mieux visualisées par des techniques immunohistochimiques avec des anticorps anti-chromogranine (Facer et al, 1985). L'identification précise du contenu hormonal, réalisée avec des anticorps plus spécifiques, a permis d'identifier plusieurs types de cellules endocrines le long de l'intestin chez l'homme, avec une distribution topographique particulière (Sjolund et al, 1983) : cellules à 5 hydroxytryptamine, substance P, somatostatine, cholécystokinine, motiline, sécrétine, GIP (gastric inhibitory polypeptide), gastrine, β endorphine, β lipotropine, neurotensine. Les cellules de Paneth renferment des granules intracytoplasmiques supra-nucléaires, éosinophiles, également visibles sur une coupe colorée à l'HES. Des études immunohistochimiques en microscopie optique ou en microscopie électronique ont permis d'identifier certains composants de ces granules et notamment de nombreuses substances antimicrobiennes [défensines (Porter et al, 1997), lysozyme (Geyer, 1973), phospholipase A2 (Kiyohara et al, 1992), SLPI -antimicrobial secretory leukocyte inhibitor- (Bergenfeldt et al, 1996), IgA (Satoh et al, 1986)] jouant un rôle dans l'immunité innée de la barrière intestinale.

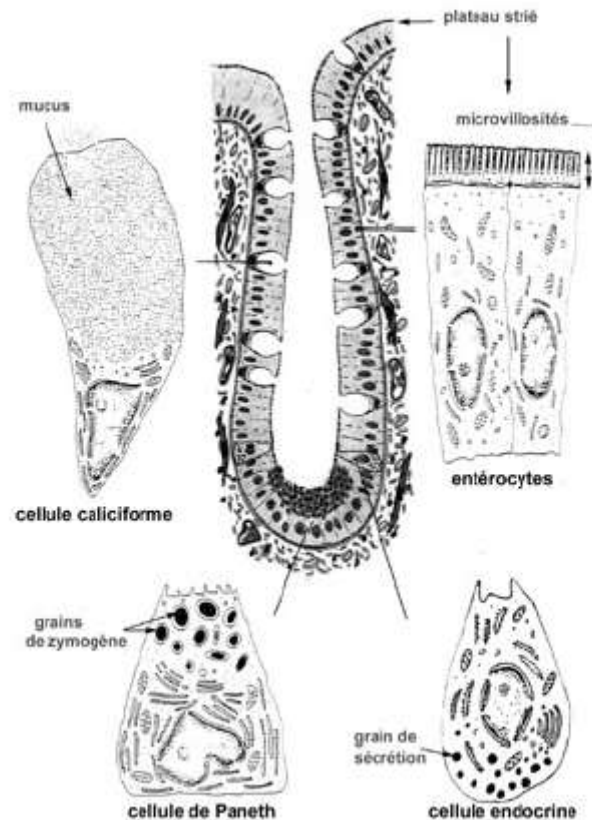


Figure 2 : Structure des cryptes de Lieberkuhn et des quatre types de cellules épithéliales spécialisées retrouvées au niveau de l'épithélium intestinal. (image N. Vacheret, UCB Lyon). Vue en coupe longitudinale montrant la distribution des différents types cellulaires dans l'intestin adulte.

1.1.2. Aspects morphologiques de l'épithélium colique

La surface de l'épithélium colique est plane, ponctuée d'invaginations cryptiques. L'épithélium de surface est constitué d'entérocytes, responsables de l'absorption d'eau et d'électrolytes, de quelques cellules à mucus et de quelques lymphocytes intra-épithéliaux. Des cellules M présentatrices de l'antigène, identiques à celles retrouvées en regard des plaques de Peyer intestinales, ont été mises en évidence en microscopie électronique dans l'épithélium situé en regard de nodules lymphoïdes hyperplasiques intra-muqueux (Fujimura et al, 1992). L'épithélium cryptique présente le même gradient spatio-temporel de prolifération et de différenciation que celui décrit pour l'intestin grêle. On note cependant que les cellules à mucus sont plus nombreuses (4 pour 1 entérocyte) et que les cellules endocrines sont plus rares. Les entérocytes présentent à leur pôle apical, de la

même manière qu'au niveau de l'intestin grêle, des microvillosités renfermant des enzymes associées à la bordure en brosse. Néanmoins, l'expression de ces enzymes, étudiée par immunohistochimie, plus importante dans le cæcum que dans le rectum (Young et al, 1992), est différente de celle rencontrée dans l'intestin grêle, certaines enzymes n'étant plus exprimées dans le colon.

Les cellules à mucus, beaucoup plus nombreuses dans le colon que dans l'intestin, renferment, au sein de granules intracytoplasmiques, des mucines que l'on peut mettre en évidence sur coupes paraffinées par des colorations histochimiques comme le Bleu alcian à pH acide (mettant en évidence les mucines acides) (Goldman et al, 1968). Elles sont classées en 3 groupes : les mucines sécrétées, les mucines membranaires et les mucines inclassables. Dans le colon, on retrouve MUC2 (mucine sécrétée), MUC1, MUC3, MUC11, MUC12, MUC17 (mucines membranaires), et MUC15, MUC20 (mucines inclassables). Ce sont des O-glycoprotéines de haut poids moléculaire (1 à $20 \cdot 10^6$ Da) composées d'un squelette polypeptidique appelé apomucine sur lequel se greffent des oligosaccharides répartis sous forme de glycoconjugués latéraux.

Les mucines sécrétées, libérées dans la lumière colique par exocytose, déterminent les propriétés rhéologiques du mucus qui recouvre l'épithélium colique (élasticité, viscosité, filance et adhérence). Elles jouent le rôle de barrière physique envers notamment les bactéries et les molécules de grande taille en raison de l'encombrement stérique créé par les chaînes oligosaccharidiques, et de barrière de diffusion sélective pour les petites molécules ioniques grâce aux différentes concentrations en oligosaccharides chargés négativement. Les mucines membranaires sont impliquées dans la signalisation cellulaire, les interactions cellule-cellule et les interactions cellule-matrice extracellulaire.

L'expression de ses mucines peut être mise en évidence par RT-PCR quantitative à partir de matériel cryopréservé ou par immunohistochimie sur coupes déparaffinées. Les anticorps monoclonaux disponibles, dirigés notamment contre MUC2, reconnaissent la protéine immature, peu glycosylée, présente dans l'appareil de Golgi et/ou le réticulum endoplasmique, mais pas la protéine mature entièrement glycosylée en raison de l'encombrement stérique généré par les chaînes glycaniques (Devine et al, 1993).

Le contenu des grains de sécrétion des cellules endocrines, très peu nombreuses dans le colon, est différent de celui des cellules endocrines de l'intestin grêle, renfermant essentiellement de la glicentine –peptide issu du clivage du pro-glucagon-, de la 5 hydroxytryptamine, du glucagon, de la substance P et de la somatostatine (Sjolund et al, 1983).

1.2. Une barrière physique étanche et modulable

L'intégrité de la barrière épithéliale est maintenue par un complexe jonctionnel intercellulaire composé des jonctions serrées, des jonctions d'ancrage (jonctions « adherens » et desmosomes) liées au cytosquelette d'actine et aux filaments intermédiaires respectivement, et les jonctions communicantes (gap junctions), les 2 premiers complexes constituant le complexe jonctionnel épithélial (Farquhar et Palade, 1963) (**Figure 3 et 4**).

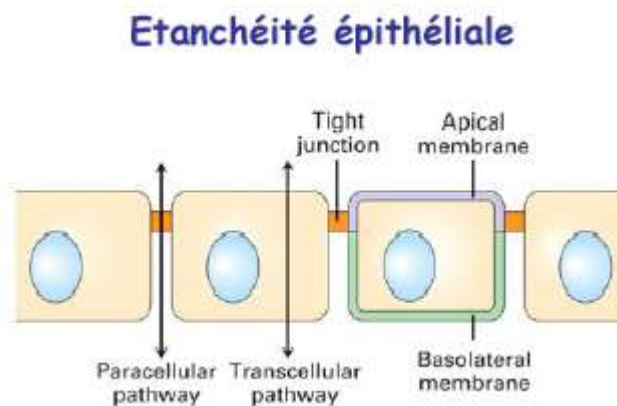


Figure 3 : L'étanchéité et la polarité de la barrière épithéliale intestinale sont assurées par des jonctions intercellulaires, dont les jonctions serrées.

Organisation des interactions cellulaires des cellules épithéliales

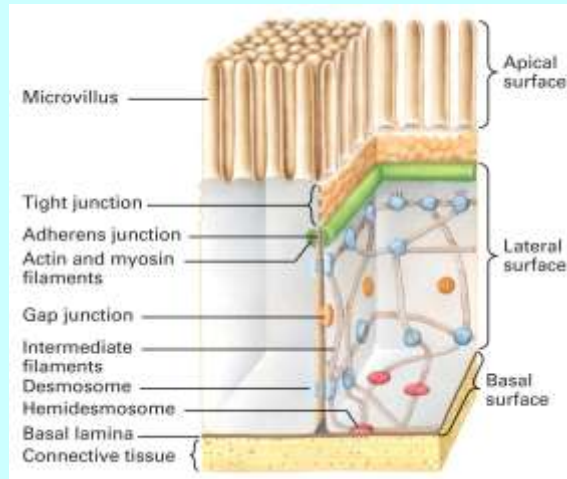


Figure 4 : Le complexe jonctionnel intercellulaire à l'origine du maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale, comporte de haut en bas, les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les jonctions communicantes (gap junction) et les desmosomes.

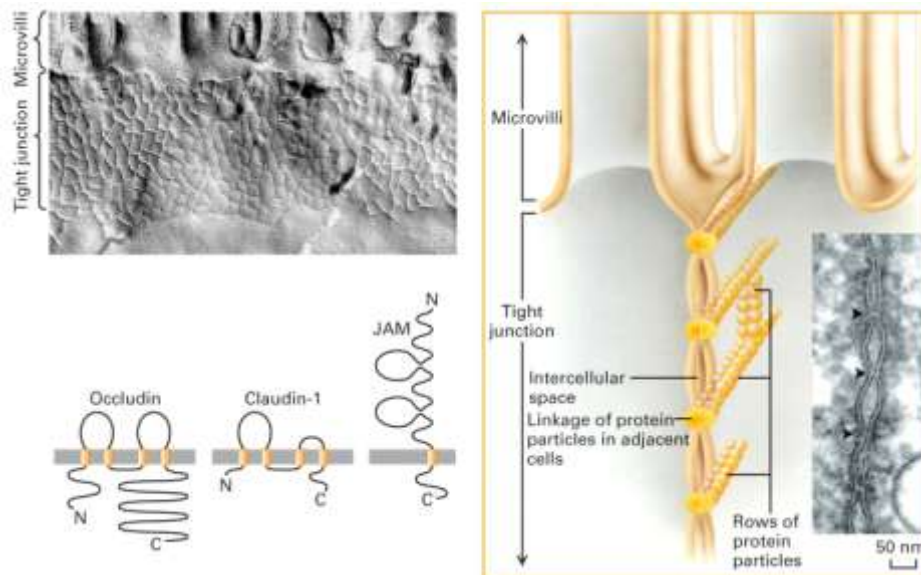


Figure 5 : Structure des jonctions serrées en microscopie électronique. Après cryofracture, les jonctions serrées montrent un réseau anastomotique de « fibrilles » dessinant des compartiments irréguliers entremêlés, ceinturant la cellule épithéliale.

Les jonctions serrées ont été identifiées en microscopie électronique dans les années 1960 par Farquhar et al (Farquhar et al, 1963), apparaissant comme une série de points de fusion membranaire (**Figure 5**) (Schneeberger et Lynch, 2004). Elles constituent, entre autre, un élément important dans l'établissement de la polarité cellulaire et dans la régulation de la perméabilité épithéliale intestinale. Elles limitent en effet la diffusion des composants membranaires (lipides et complexes protéiques) aboutissant ainsi à une composition moléculaire différente et donc des fonctions différentes entre les domaines apical et basolatéral de la cellule épithéliale. Elles sont composées de complexes multiprotéiques, parmi lesquels la protéine ZO-1 (Zonula Occludens 1), l'occludine et les claudines.

Les jonctions « adherens », situées immédiatement au dessous des jonctions serrées, au pôle basolatéral, forment une ceinture continue de contact intercellulaire. Le principal composant de ce complexe macromoléculaire est représenté par la E cadhérine - ou cadhérine épithéliale -, membre de la superfamille des cadhérines (**Figure 6**). Elle interagit indirectement avec les filaments d'actine du cytosquelette cellulaire via un groupe de protéines d'ancrage dont tous les intervenants moléculaires ne sont pas encore connus. L' α caténine interagit indirectement, avec la partie distale du domaine intracytoplasmique de la E cadhérine via la β caténine et la p120 caténine (Reynolds et al, 1994 ; Shibamoto et al, 1995).

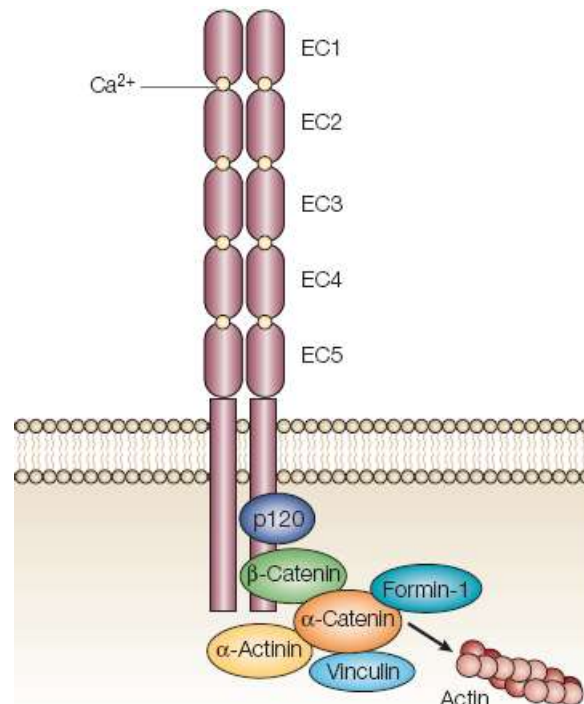


Figure 6 : La jonction adherens et le complexe E cadherine-β caténine. D'après Gumbiner BM, 2005

1.3. Une barrière en perpétuel renouvellement

Cette barrière épithéliale a longtemps été considérée comme une structure passive mais de nombreux travaux récents suggèrent qu'il s'agit d'une interface dynamique, en renouvellement constant. Elle est en effet constituée de différents compartiments, de prolifération, de différenciation et d'exfoliation, en parfait équilibre les uns avec les autres (**Figure 7**) (Potten, 1997 et 1998), ce processus de migration ascensionnel le long de la crypte durant entre 5 et 7 jours. Le concept selon lequel toutes les cellules épithéliales spécialisées sont issues d'une même cellule souche située à la base de la crypte est actuellement largement accepté.

La barrière épithéliale intestinale : une structure dynamique en renouvellement permanent

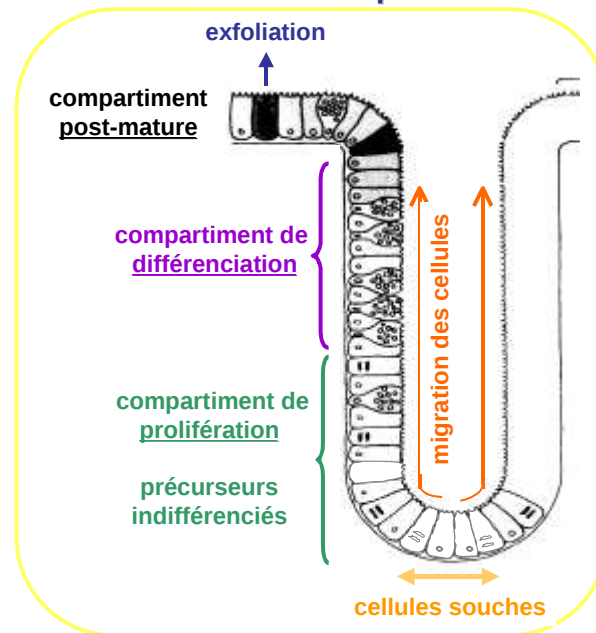
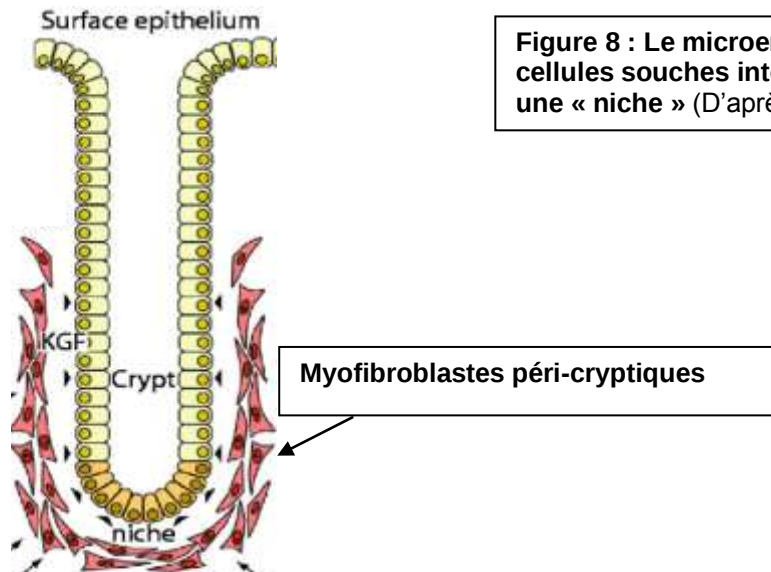


Figure 7 : Les différents compartiments d'une crypte épithéliale colique.

Ces cellules souches semblent évoluer dans un microenvironnement particulier, maintenu par des cellules mésenchymateuses, dont les myofibroblastes intestinaux sous-épithéliaux (ISEMF), présents dans le chorion, au contact de la crypte intestinale, l'ensemble constituant le compartiment des cellules souches ou « niche » (**Figure 8**). Le dialogue entre les cellules épithéliales et ces cellules mésenchymateuses semble donc indispensable pour le maintien de l'homéostasie de la muqueuse colique.



Cette homéostasie passe par une régulation fine des phénomènes de prolifération et de différenciation de l'épithélium intestinal. La division cellulaire est le résultat d'une succession de phases qui constituent le cycle cellulaire (**Figure 9**) : phase G1 (G, Gap), phase S (S, synthèse), phases G2 et M (M, mitose).

Durant la phase G1, la synthèse protéique est accrue et, si les conditions environnementales sont favorables, la cellule franchit un point de restriction et engage la division cellulaire. En revanche, si le point de restriction n'est pas franchi, les cellules entrent en quiescence (phase G0). Chaque étape du cycle cellulaire est contrôlée par des kinases dépendantes des cyclines (cdk). Par exemple, au cours de la phase G1, les cyclines D (D1, D2 et D3) peuvent se lier aux cdk 4 et 6. Ces cdk activées vont phosphoryler la protéine Rb, qui va activer le facteur de transcription E2F permettant la transcription de certains gènes codant pour des protéines nécessaires à la réplication de l'ADN durant la phase S (ADN polymérase, thymidine kinase) et à la progression dans le cycle cellulaire (cycline E). Les cdk sont soumises à des rétrocontrôles négatifs par l'intermédiaire de protéines inhibitrices réparties en 2 grandes familles : INK4 (p16, p15, p18, p19) et CIP/KIP (p21, p27, p57) (Weinstein, 2000). Cette régulation intracellulaire extrêmement fine est elle-même soumise à une régulation par des facteurs extracellulaires (mitogènes, facteurs de croissance...).

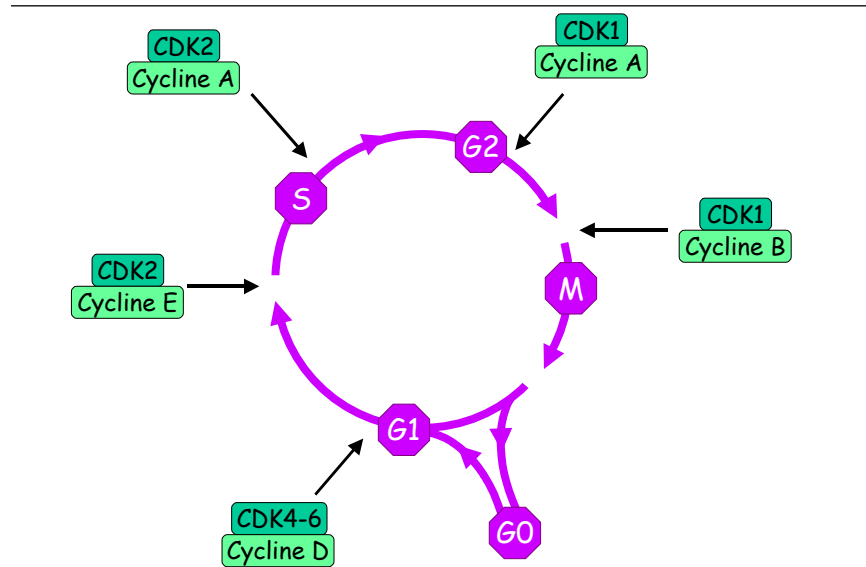


Figure 9: Les différentes phases du cycle cellulaire avec les principaux complexes cdk /cycline.

Des études récentes réalisées chez la souris montrent que la voie Wntless (Wnt)/ β caténine (**Figure 10**) joue un rôle clé dans le processus de prolifération cellulaire, la β caténine étant le principal messenger de cette voie de signalisation. En l'absence de stimulation par les ligands Wnt, glycoprotéines sécrétées de manière paracrine par différents types cellulaires (Cadigan et Nusse, 1997), le complexe cytoplasmique macromoléculaire constitué des protéines APC (Adenomatous Polyposis Coli) / axine / GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) / CK1 α (casein kinase 1 α) (Spink et al, 2000 ; Liu et al, 2002) maintient la β caténine à des taux cellulaires très bas. La GSK3 β phosphoryle les résidus sérine et thréonine de la région N-terminale de la β caténine, aboutissant à son ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome (Polakis, 2000 ; van Noort et al, 2002). En revanche, la fixation d'un ligand Wnt sur le récepteur transmembranaire Frizzled entraîne l'inhibition du complexe macromoléculaire par des mécanismes incomplètement élucidés (Wharton, 2003). La β caténine est alors libérée dans le cytoplasme et entre dans le noyau pour s'associer au complexe transcriptionnel TCF4/LEF (T-cell factor/lymphocyte enhancer factor), induisant la transcription de gènes cibles impliqués notamment dans la régulation de la prolifération cellulaire, comme *C-MYC* (He et al, 1998) ou *BCL1* codant pour la cycline D1 (Tetsu et McCormick, 1999) qui permettent notamment la progression de la cellule épithéliale dans le cycle cellulaire (van de Wetering et al, 2002).

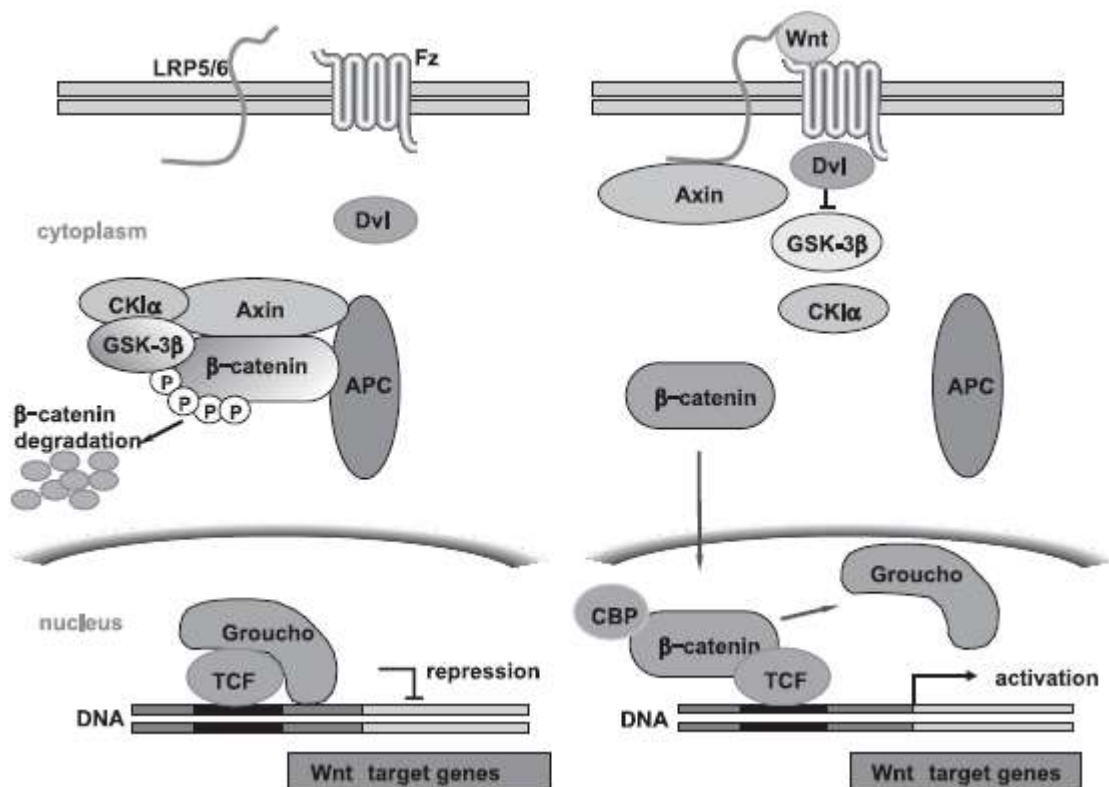


Figure 10 : La voie canonique wingless (Wnt)/β caténine. En l'absence de ligands, la β caténine est séquestrée par le complexe macromoléculaire formé des protéines APC, Axine, GSK-3β et CK1α et est phosphorylée par GSK-3β et CK1α aboutissant à sa dégradation par le protéasome (à gauche). La liaison d'un ligand Wnt au récepteur Frizzled et à son co-récepteur LRP5/6 (low- density lipoprotein receptor-related protein 5/6) médie un signal intracellulaire. Les kinases GSK-3β et CK1α sont inhibées par la protéine intra-cytoplasmique Disheveled (Dvl), aboutissant à la libération de la β caténine non phosphorylée dans le cytoplasme de la cellule. Celle-ci n'étant pas reconnue par le protéasome, elle n'est pas dégradée et est transloquée dans le noyau où elle active la transcription de gènes cibles en se liant à des facteurs de transcription comme TCF (à droite). D'après Takahashi-Yanaga et Sasaguri, 2007

Plusieurs études montrent que la voie Wnt/β caténine joue un rôle majeur dans l'homéostasie de la muqueuse intestinale (**Figure 11**). Andoh et al. ont montré l'expression des ARNm de plusieurs ligands Wnt (Wnt 3, Wnt 5a, et Wnt 5b) et de plusieurs récepteurs Fz (Fz1 à 7) à la fois dans l'épithélium cryptique colique et dans les myofibroblastes péri-cryptiques du chorion, suggérant un dialogue entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses (Andoh et al, 2007). Par ailleurs, Fevr et al. ont montré que l'invalidation tissu-spécifique du gène codant pour la β caténine au niveau de l'épithélium colique de souris par technologie Cre/loxP entraînait progressivement sur 4 jours une perte totale des cellules épithéliales coïncidant avec

une inhibition de la prolifération cellulaire et une diminution d'expression du gène *C-MYC* dans la crypte et un processus de différenciation entérocytaire prématurée, intéressant notamment le compartiment de prolifération renfermant les cellules souches (Fevr et al, 2007). Par ailleurs, l'inhibition de la voie Wnt chez la souris, suite à l'expression transgénique de la protéine extracellulaire Dkk1 (antagoniste Wnt), provoque l'inhibition de la prolifération épithéliale tout au long de l'intestin, associée à une perte progressive de l'architecture glandulaire, des ulcérations de la muqueuse puis la mort de l'animal (Pinto et al, 2003 ; Kuhnert et al, 2004).

Parallèlement, l'inactivation épigénétique par hyperméthylation des îlots CpG du promoteur du gène *DICKKOPF1* (*DKK1*) a été mise en évidence dans certains cancers colorectaux sporadiques avancés (Aguilera et al, 2006).

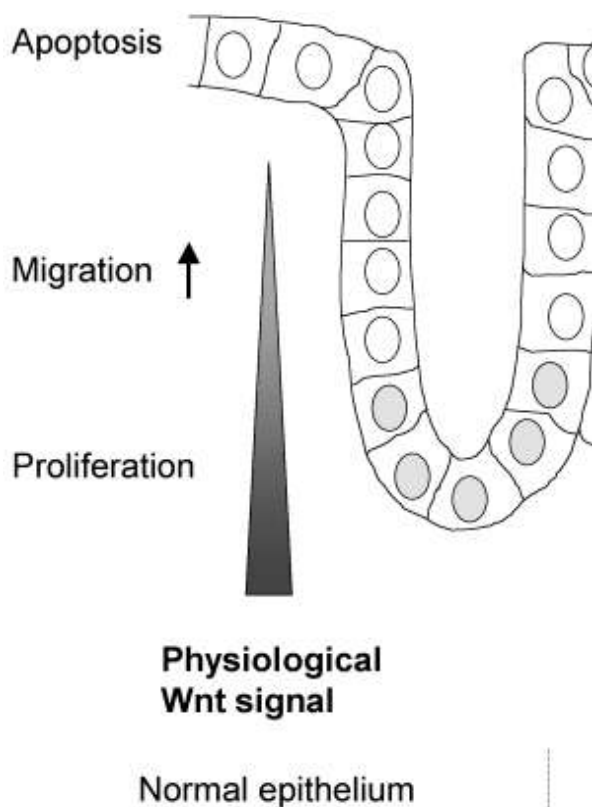


Figure 11 : Rôle de la voie Wnt/β caténine dans l'homéostasie de la muqueuse intestinale (d'après Behrens et Lustig, 2004)

2. L'oncogenèse au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

2.1. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou MICI

2.1.1. Définition, épidémiologie

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, regroupant la rectocolite ulcéro-hémorragique et la maladie de Crohn, sont des maladies inflammatoires de l'intestin, d'évolution chronique, atteignant en général des sujets jeunes (pic de fréquence entre 20 et 30 ans). Elles évoluent par poussées inflammatoires intestinales, à l'origine notamment de douleurs abdominales et de diarrhée, entrecoupées de périodes de rémission plus ou moins longues. Cette évolution particulière est à l'origine de lésions morphologiques intestinales d'âge différent que l'on peut distinguer, à l'échelle endoscopique et microscopique, en lésions inflammatoires aiguës et chroniques.

Ces 2 pathologies représentent un problème de santé publique dans les pays industrialisés : le taux de prévalence varie de 10 à 100 pour 100 000 habitants dans les pays d'Europe du Nord, Royaume-Uni et Amérique du Nord, où l'incidence a été croissante depuis les années 1960 avec un doublement de la fréquence des MICI en Europe notamment (Loftus, 2004). Alors que l'incidence et la prévalence se stabilisent actuellement dans ces pays, elle croît en Asie, dans les pays d'Europe du Sud et les pays en voie de développement, peut-être en raison de l'adoption d'un mode de vie de type « occidental » par ces populations. La morbidité est importante, en raison notamment du risque élevé de cancer colorectal, parfois multifocal, au cours de l'évolution de la maladie. Nous aborderons en détail cette complication et les problèmes qu'elle suscite, notamment en termes de dépistage et de prévention, dans les prochains paragraphes.

2.1.2. Aspects clinico-pathologiques

Le diagnostic de MICI repose sur un ensemble de critères cliniques, endoscopiques, et anatomopathologiques. Néanmoins, il n'existe pas de « gold standard » pour poser le diagnostic de MICI, et surtout pour faire le diagnostic

différentiel entre RCH et maladie de Crohn, notamment d'un point de vue microscopique sur des prélèvements biopsiques qui n'intéressent que la muqueuse.

La RCH atteint constamment le rectum et s'étend de manière continue, plus ou moins haut, vers le caecum en respectant l'intestin grêle. Les patients se présentent typiquement avec une diarrhée glairo-sanglante associée à des douleurs abdominales, évoluant par poussées entrecoupées de période de rémission. Macroscopiquement, les lésions sont diffuses, sans intervalle de muqueuse saine. Elles vont d'une muqueuse simplement oedématisée à une muqueuse recouverte de pus, ulcérée, saignant spontanément en nappe. Des formations polypoïdes correspondant à des pseudopolypes inflammatoires sont observées dans les affections anciennes. Sur le plan microscopique, les lésions observées atteignent essentiellement la muqueuse. Le diagnostic repose principalement sur 2 types de lésions : les lésions architecturales et les modifications inflammatoires. Les anomalies architecturales se caractérisent par des cryptes bifides, ramifiées, raccourcies. Les modifications inflammatoires sont caractérisées par un infiltrat inflammatoire assez marqué et diffus, au sein du chorion, composé notamment de polynucléaires neutrophiles faisant parfois exocytose dans l'épithélium bordant les cryptes, jusqu'à réaliser des abcès cryptiques (Figure 12).

La maladie de Crohn peut toucher l'ensemble du tube digestif, depuis la bouche jusqu'au canal anal. La présentation clinique est largement dépendante du segment intestinal atteint et peut revêtir différents symptômes tels qu'une diarrhée, des douleurs abdominales, de la fièvre ou des signes d'occlusion intestinale. L'évolution se caractérise également par des périodes de poussées symptomatiques, entrecoupées de périodes de rémission. Sur le plan macroscopique, les lésions observées sont très hétérogènes (lésions érythémateuses en plaques, ulcération aphtoïdes, linéaires ou en carte de géographie, fissures, fistule, sténose...) et entrecoupées de plages de muqueuse saine. Sur le plan microscopique, les lésions inflammatoires intéressent toute l'épaisseur de la paroi intestinale, mais sont focales et hétérogènes. Les modifications des cryptes sont mineures, l'infiltrat inflammatoire renferme, outre

des polynucléaires neutrophiles et des nodules lymphoïdes, quelques granulomes épithélioïdes et gigantocellulaires (**Figure 12**), non retrouvés dans la RCH.

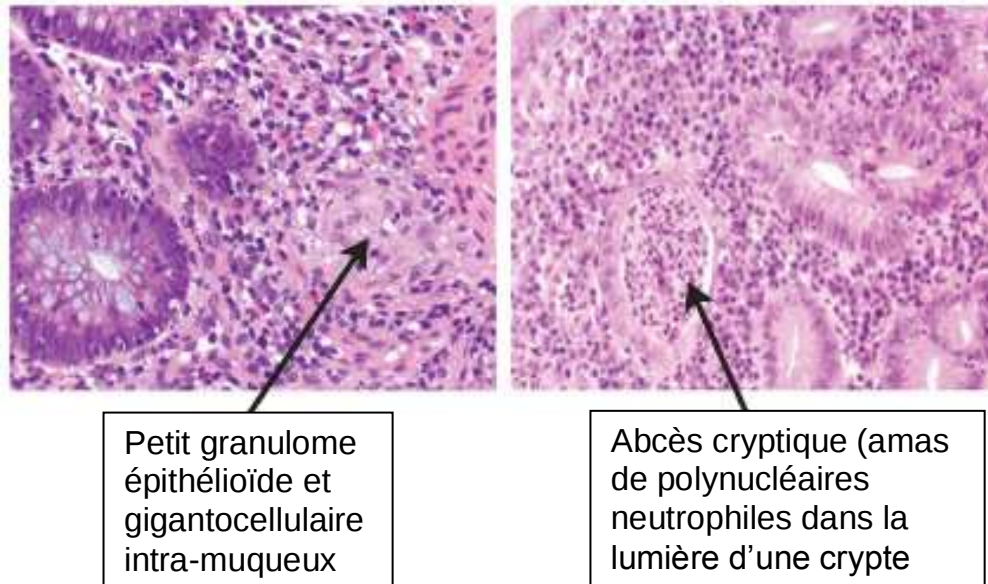


Figure 12 : Biopsies intestinales de patients atteints de maladie de Crohn (à gauche) et de RCH (à droite) en phase évolutive.

Le traitement est fondé non seulement sur le diagnostic précis de la maladie, mais aussi sur son activité, évaluée par des critères clinico-biologiques et histologiques. Le critère histologique principal pour grader l'activité des MICI est la présence de polynucléaires neutrophiles dans les structures épithéliales, avec ou sans lésion épithéliale telle que la cryptite (exocytose de polynucléaires dans l'épithélium de la crypte), et l'abcès cryptique (amas de polynucléaires dans la lumière de la crypte). Plusieurs scores sont utilisés pour tenter d'apprécier au mieux la sévérité de la maladie (Geboes et al, 1999 ; Geboes et al, 2000).

2.1.3. Etiologie et facteurs étiopathogéniques

Nota Bene : certains termes (microbiote, TLR, PPR...) font appel à des connaissances développées dans le chapitre 3 pour des raisons de plan.

La physiopathologie des MICI se révèle complexe et multifactorielle, et reste incomplètement élucidée. Les différentes théories actuellement acceptées sont fondées sur l'hypothèse que l'inflammation intestinale est le résultat d'une altération des interactions entre la flore intestinale et les cellules résidentes du chorion, dans un contexte de polymorphisme génétique affectant notamment la fonction de barrière épithéliale et la réponse immune innée et adaptative (Xavier et Podolsky, 2007 ; Sartor, 2008). Pendant longtemps, la maladie de Crohn et la RCH ont été associées à une réponse lymphocytaire T exagérée, de type Th1 (caractérisée par une production excessive d'interféron γ et de TNF α) pour la maladie de Crohn, et de type Th2 (production excessive d'interleukine 13) pour la RCH. Actuellement, les idées semblent beaucoup moins tranchées avec la découverte récente d'un autre sous-groupe de lymphocytes T effecteurs sécrétant de l'interleukine 17, dénommés Th17 (nous y reviendrons dans le chapitre sur l'IL17 p163) et de lymphocytes T régulateurs (chapitre sur les lymphocytes T de la muqueuse intestinale p120).

Outre des facteurs génétiques de susceptibilité, des facteurs environnementaux semblent être également impliqués. L'importance de chacun de ces facteurs, et la chronologie des événements aboutissant au développement d'une MICI sont encore loin d'être totalement décryptés (**Figure 13**).

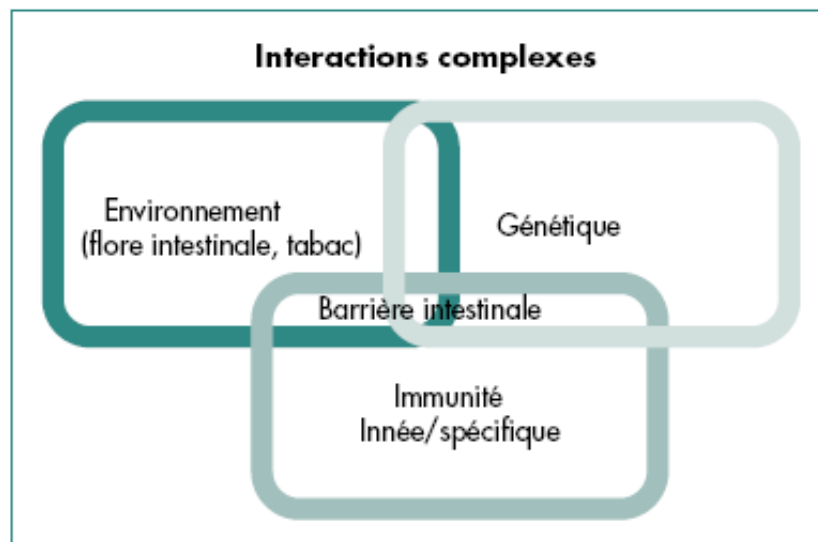


Figure 13 : Les différents acteurs connus pour être impliqués dans la pathogénie des MICI

Des facteurs génétiques ont été suspectés suite à l'observation de cas familiaux de MICI au cours d'études épidémiologiques, notamment chez des jumeaux homozygotes (Bonen et Cho, 2003), et le risque relatif de développer une MICI est

10 à 14 fois plus élevé pour un apparenté au premier degré d'un individu malade que celui de la population générale (Orholm et al, 1991). Des études de criblage du génome ont identifié plusieurs régions chromosomiques de susceptibilité, notamment dans les chromosomes 16, 12, 6, 14, 5, 19, 1 et 3 (ces régions étant encore appelées IBD1 à 9) (Baumgart et Carding, 2007). Dans quelques cas, le ou les gènes situés dans ces régions ont pu être identifiés, parmi lesquels OCTN1 et 2 sur le chromosome 5, IBD3 sur le chromosome 6 et le gène *NOD2* (Nucleotide-binding oligomerization domain 2a) encore appelé *CARD15* (caspase recruitment domain protein 15) dans la région péri-centromérique du chromosome 16 (IBD1) identifié en 2001 (Hugot et al, 2001 ; Ogura et al, 2001). Ce gène code pour un récepteur intracytoplasmique de l'immunité innée, encore appelé PPR (Pattern recognition receptor), exprimé par les monocytes-macrophages, les cellules dendritiques, les cellules épithéliales intestinales et les cellules de Paneth. Il reconnaît le dipeptide muramyl (MDP), un motif du peptidoglycane commun aux bactéries Gram+ et Gram-. L'activation de ce récepteur aboutit à une réponse inflammatoire via la voie NFκB ou la voie des MAPKinases, et à la mort cellulaire par apoptose (Le Bourhis et al, 2007). Plus de 30 mutations ont été répertoriées, permettant de parler de polymorphisme génétique, mais trois mutations ponctuelles de ce gène apparaissent plus fréquentes chez des patients atteints de maladie de Crohn ou de RCH (Baumgart et Carding, 2007). Il s'agit de substitutions nucléotidiques en position 2023 (R702W) et 2641 (G908R) et d'une insertion nucléotidique en position 2936 (1007fs), cette dernière étant à l'origine d'un décalage du cadre de lecture et la synthèse d'une protéine tronquée. Plus précisément, ces mutations sont plus fréquentes dans la maladie de Crohn (30%) que dans la RCH (5%), 2) le risque relatif de développer une maladie de Crohn chez les patients homozygotes ou hétérozygotes composites est multiplié par 40, alors que la présence d'une mutation à l'état hétérozygote simple ne multiplie le risque que par 3, et 3) seuls 15 à 20% des patients atteints de maladie de Crohn sont porteurs d'une mutation homozygote, et certains individus porteurs de cette mutation ne sont pas malades.

Ces mutations concernent le domaine C terminal riche en leucines de la protéine (domaine LRR), impliqué dans la reconnaissance des motifs bactériens. Elles sont responsables d'un défaut de reconnaissance des motifs MDP par les macrophages (Inohara et al, 2003). Les mécanismes exacts suivant lesquels ces

mutations sont responsables d'une susceptibilité accrue à la maladie de Crohn restent encore non élucidés, mais il semble qu'elles pourraient modifier le « dialogue » entre les cellules immunitaires et la flore intestinale. Des études chez la souris transgénique porteuse d'un gène *NOD2* muté ont montré que l'absence d'expression de *NOD2* entraîne une altération de la voie de signalisation induite par les TLR, une production accrue de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages stimulés par le MDP, et une diminution de synthèse de peptides antimicrobiens (α défensines) par les cellules épithéliales intestinales (Watanabe et al, 2004). Cette diminution de synthèse des α défensines est également retrouvée chez l'homme, au niveau des cellules de Paneth de l'iléon, mais aussi du colon, chez des patients atteints de maladie de Crohn (Wehkamp et al, 2004b). On peut penser que cette diminution de synthèse de peptides antimicrobiens favorise la prolifération bactérienne dans la lumière intestinale.

Un autre gène de susceptibilité a été mis en évidence récemment par Duerr et al. à partir d'une étude d'association du génome entier. Il s'agit du gène codant pour une sous-unité du récepteur à l'IL23, cytokine pro-inflammatoire produite par les cellules dendritiques activées et les macrophages. Ces auteurs montrent dans cette étude qu'un variant génétique situé au sein de ce gène (rs11209026) protège du risque de développer une maladie de Crohn (Duerr et al, 2006).

Des variations d'incidence en fonction des âges, du temps et de la situation géographique ont fait suggérer un rôle de certains facteurs environnementaux dans la susceptibilité aux MICI (Baumgart et Carding, 2007). Parmi ceux-ci, le tabac a un effet bien documenté, favorisant le développement de la maladie de Crohn et l'aggravant mais ayant un rôle protecteur vis-à-vis de la RCH (Loftus, 2004). L'appendicectomie aurait également cet effet, totalement opposé, sur le risque de développer une MICI, protecteur vis-à-vis de la RCH, mais prédisposant à la maladie de Crohn (Loftus, 2004). L'hygiène excessive, notamment alimentaire avec une consommation de produits de plus en plus stérilisés, pourrait avoir un rôle déclenchant dans la maladie de Crohn, limitant l'exposition du système immunitaire de la muqueuse aux antigènes environnementaux et donc limitant sa maturation et l'induction de la tolérance immunitaire (Baumgart et Carding, 2007).

A côté de ces facteurs génétiques et environnementaux de prédisposition, plusieurs arguments expérimentaux *in vitro* ou chez l'animal, et chez l'homme,

amènent à penser que l'inflammation intestinale dans les MICI résulte d'une réponse immunitaire, innée et adaptative, inappropriée envers la flore intestinale. Mais plusieurs questions restent en suspend : comment et pourquoi cette flore intestinale induit une réponse inflammatoire intestinale inappropriée ? Plusieurs pièces du puzzle ont été mises à jour mais il reste encore des inconnues (Baumgart et Carding, 2007) ; 1) Plusieurs études ont montré que la barrière épithéliale intestinale de patients atteints de maladie de Crohn et de RCH présente une moindre résistance et une perméabilité accrue, et que ces anomalies peuvent précéder les premiers symptômes cliniques (Irvine et Marshall, 2000 ; Zeissig et al, 2007) ; 2) La barrière épithéliale intestinale, considérée en tant que barrière immunitaire innée, est altérée chez les patients atteints de MICI : profil d'expression des TLR anormal (TLR3 sous-exprimé, TLR4 sur-exprimé ; expression de TLR9, expression de NOD2) ; 3) La reconnaissance des antigènes par les cellules dendritiques de la muqueuse intestinale est altérée chez les patients atteints de MICI. L'équipe de Baumgart a montré par ailleurs que le nombre de cellules dendritiques activées est augmenté dans la muqueuse inflammatoire de patients atteints de MICI par rapport à une muqueuse intestinale normale (Baumgart et al, 2004) et qu'elles présentent une réponse exagérée à différents stimuli d'origine bactérienne comme le LPS (Baumgart et al, 2005) ; 4) Les cellules présentatrices de l'antigène non professionnelles comme les cellules épithéliales intestinales, qui normalement induisent une anergie envers les lymphocytes T effecteurs de la muqueuse intestinale deviennent capables de les activer grâce notamment à l'expression anormale de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité chez des patients atteints de MICI (Mayer et al, 1991) ; 5) La balance entre les lymphocytes T effecteurs (Th1 et Th2) et les lymphocytes T régulateurs au sein de la muqueuse intestinale est déséquilibrée au profit des lymphocytes T effecteurs dans les MICI (réponse immunitaire de type Th1 dans la maladie de Crohn et de type Th2 dans la RCH).

Enfin, plusieurs arguments font penser actuellement qu'il existe un « dialogue » anormal entre les bactéries du microbiote et la barrière intestinale, ces dernières seraient à l'origine d'une stimulation antigénique permanente qui activerait les cellules immunitaires de la muqueuse, à l'origine d'une inflammation intestinale chronique (Sartor, 2008). Ces dernières années, un grand nombre de modèles animaux d'inflammation intestinale ont été développés afin de mieux comprendre la

pathogénie des MICI (Jurjus et al, 2004). Il s'agit 1) de modèles animaux de colite spontanée, survenant soit après invalidation de certains gènes (souris IL10^{-/-} par exemple) soit sur un terrain génétique particulier (les souris C3H/HeJBir), et 2) de modèles animaux de colite induite, soit par un agent chimique (DSS ou TNBS par exemple), soit par transfert de cellules à des souris SCID immunodéprimées (transfert d'une population de lymphocytes T CD4⁺CD45RB^{hi} dits « naïfs » par exemple) Dans la plupart de ces modèles, l'inflammation intestinale dépend de la présence de la flore bactérienne résidente puisque les animaux élevés dans des isolateurs stériles (en conditions axéniques dans lesquelles tout l'environnement air, nourriture, matériel, est stérile), ne présentent aucune ou très peu de lésion inflammatoire intestinale, comparativement aux animaux élevés en conditions conventionnelles. Chez l'homme, plusieurs constatations clinico-biologiques font également penser que la flore intestinale est impliquée dans le déclenchement de l'inflammation intestinale. Les MICI intéressent les segments intestinaux les plus riches en bactéries (Eckburg et Relman, 2007). La composition du microbiote est anormale chez les patients atteints de MICI (Frank et al, 2007), et les phénomènes d'invasion et de translocation bactérienne sont plus nombreux (Liu et al, 1995). Dans la maladie de Crohn, la virulence d'*Escherichia coli* est augmentée (Darfeuille-Michaud et al, 1998), et les bactéries adhérentes au mucus sont beaucoup plus nombreuses (Swidsinski et al, 2002). La diversion du flux fécal par une stomie réalisée en amont d'une anastomose iléocolique après résection chirurgicale de l'iléon terminal inflammatoire dans la maladie de Crohn protège cette anastomose d'une récurrence inflammatoire. La récurrence survient en revanche peu après le rétablissement de continuité, et la partie de l'iléon siège de la récurrence est colonisée par une flore intestinale de type colique (Rutgeerts et al, 1991). Les antibiotiques font partie de l'arsenal thérapeutique pour traiter notamment les atteints iléocoliques de la maladie de Crohn. Enfin, les travaux de Madsen et al chez la souris IL10^{-/-}, suggèrent que le développement de l'inflammation intestinale dans les MICI serait associé à une perte d'une fraction protectrice de la flore intestinale et que sa restauration pourrait avoir un intérêt thérapeutique (Madsen et al, 1999). Certains probiotiques (micro-organismes qui ingérés vivants en quantité suffisante sont capables d'exercer des effets bénéfiques sur l'hôte) sont pour cette raison utilisés

chez l'homme dans le traitement préventif et curatif des poussées de MICI (Venturi et al, 1999 ; Guslandi et al, 2000).

2.2. Le problème de la détection des lésions dysplasiques dans un contexte inflammatoire.

Les patients atteints de MICI présentent un risque 5 à 7 plus élevé de développer un cancer colorectal (CCR) durant l'évolution de leur maladie que la population générale (Ekbom et al, 1990a, b; Eaden et al, 2001). Ce risque est bien établi dans la RCH avec une prévalence globale de 3.7% qui peut atteindre 6% en cas de pancolite (Eaden et al, 2001), et semble être le même dans la maladie de Crohn avec atteinte colique (Greenstein et al, 1981 ; Gillen et al, 1994 ; Von Roon et al, 2007).

Ce risque dépend de 4 facteurs essentiels : la durée d'évolution de la maladie (Eaden et al, 2001a), l'étendue des lésions (Ekbom et al, 1990a; Mathy et al, 2003), une cholangite sclérosante associée (Broome et al, 1995 ; Brentnall et al, 1996a) et des antécédents familiaux de CCR (Nuako et al, 1998 ; Askling et al, 2001). En effet, la durée d'évolution de la maladie est le facteur de risque le plus important. En deçà de 8 à 10 ans d'évolution, le risque de CCR est très faible. En revanche, après 10 ans d'évolution, ce risque augmente de 0.5 à 1% par an (le risque cumulatif est de 2% à 10 ans d'évolution, 8% à 20 ans et 18% à 30 ans) (Eaden et al, 2001a). L'étendue des lésions représente un autre facteur de risque important de CCR. Une étude portant sur plus de 3000 patients atteints de RCH, examiné par lavement baryté, retrouve un risque croissant depuis les lésions de proctite où le ratio d'incidence est de 1.7 jusqu'au lésions de pancolite où ce même ratio est de 14.8 (Ekbom et al, 1990a). Cette augmentation de risque est également retrouvée quand on évalue les lésions de colite microscopiquement (Mathy et al, 2003), cette évaluation microscopique permettrait d'ailleurs de mieux préciser l'étendue des lésions. Comme dans la population générale, le risque de CCR augmente d'un facteur compris entre 2 et 3 en cas d'antécédents familiaux de CCR chez les patients atteints de MICI (Nuako et al, 1998 ; Askling et al, 2001). La co-existence d'une cholangite sclérosante primitive, maladie chronique d'étiologie inconnue, associée dans 70% des cas à une MICI, augmente d'un facteur 5 le risque de développer un

CCR (Broome et al, 1995 ; Brentnall et al, 1996a). Enfin, récemment, quelques études ont montré que l'index d'activité microscopique de la maladie, reflétant la sévérité des lésions inflammatoires, est un facteur de risque indépendant supplémentaire. L'index d'activité microscopique utilisé dans ces études varie entre 4 et 5 scores allant de 0 à 3 ou 4 (0, normal ; 1, quiescent/inflammation chronique ; 2, 3 et 4, inflammation active minime, modérée et sévère), en fonction de la présence ou non de polynucléaires neutrophiles dans le chorion, de l'importance des abcès cryptiques, et de la présence d'érosion ou d'ulcération de la muqueuse colique (Rutter et al, 2004 ; Gupta et al, 2007).

Etant donné le risque élevé de CCR au cours de l'évolution de la maladie, la plupart des experts recommande un programme de surveillance coloscopique rapprochée, après 8 à 10 ans d'évolution de la maladie, dans le but de détecter des lésions néoplasiques curables, cancéreuses, mais aussi plus précoces, dysplasiques (Eaden et Mayberry, 2002 ; Collins et al, 2006). Néanmoins, cette prise en charge préventive, qui consiste à utiliser les lésions de dysplasie épithéliale comme « précurseur », car susceptibles d'évoluer vers un cancer, et comme « indicateur » car associées à un risque accru (jusqu'à 40%) de cancer synchrone dans un autre secteur colique (Blackstone et al, 1981 ; Bernstein et al, 1994), a ses limites. Son efficacité n'est pas prouvée, l'adhésion des patients à ce programme de surveillance invasive rapprochée n'est pas totale (Lynch et al, 1993 ; Connell et al, 1994), la détection endoscopique des lésions de dysplasie est difficile (Bernstein et al, 1995 ; Eaden et al, 2000), il existe une grande variabilité d'interprétation histologique des prélèvements biopsiques entre pathologistes (Eaden et al, 2001b), et la prise en charge thérapeutique des lésions de dysplasie n'est pas consensuelle.

Nous allons détailler quelques uns de ces problèmes associés à cette démarche préventive.

2.2.1. Une détection endoscopique difficile

En dehors du cas particulier des MICI, la plupart des lésions dysplasiques du colon sont des lésions en relief, endoscopiquement visibles, classiquement dénommées « adénomes ». Mais il existe aussi des lésions totalement planes ou à

peine en relief, très difficilement repérables en endoscopie, appelées « adénomes plans » définis par une épaisseur inférieure à 2 fois celle de la muqueuse colique normale. C'est à ce type de lésions que le terme de « dysplasie » est habituellement réservé dans la pratique gastroentérologique, mais il est impensable de décrire un adénome comme non-dysplasique !

Les lésions de dysplasie dans un contexte de MICI se développent sur une muqueuse inflammatoire, et revêtent un aspect endoscopique très hétérogène, plan ou en relief (Tytgat et al, 1995 ; Torres et al, 1998) (**Figure 14**).

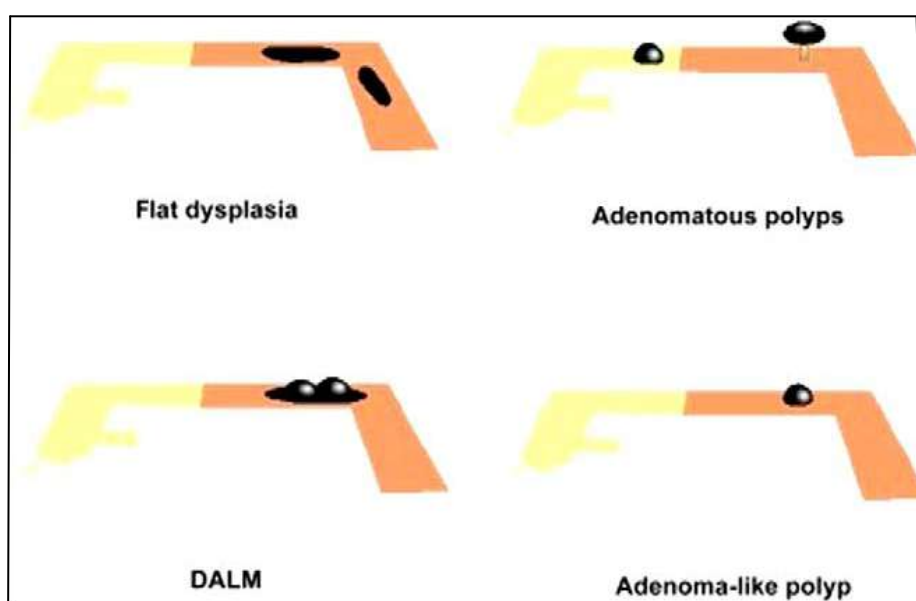


Figure 14 : Schéma illustrant les différents aspects endoscopiques des lésions de dysplasie en muqueuse inflammatoire (en orange). Ces lésions sont classées en 2 types en fonction de leur aspect plan ou surrélévé. Les lésions surrélévées, dénommées DALM, ont elles-mêmes un aspect très hétérogène : polypes unique ou multiples, discrète surélévation, plaque...D'après Itzkowitz et al, 2004

Les lésions de dysplasie en muqueuse plane sont pratiquement invisibles endoscopiquement, même si les progrès de l'endoscopie permettent d'envisager une amélioration dans le dépistage de ces lésions. La preuve du diagnostic repose donc, pour le moment, uniquement sur les données de l'examen microscopique d'une biopsie réalisée systématiquement « à l'aveugle ». Les lésions de dysplasie en relief, dénommées DALM (Dysplasia-associated lesion or mass) représentent en fait un groupe de lésions très hétérogènes prenant l'aspect endoscopique d'une plaque, d'une masse, d'une zone de rétrécissement ou d'un polype pédiculé ressemblant à

un polype adénomateux sporadique. Dans ce dernier cas, si le pied du polype est bien individualisé et n'est pas revêtu d'une muqueuse dysplasique, il peut être considéré comme un polype adénomateux sporadique sans rapport avec les lésions de colite. Dans le cas contraire, il est dénommé polype de type adénomateux (adenoma-like polyp) (Odze, 1999 ; Torres et al, 1998). Les DALM peuvent très facilement se dissimuler parmi les lésions purement inflammatoires, de type pseudopolypes, parfois nombreuses. Les DALM de type « adenoma-like » représentent, par ailleurs, un challenge diagnostique à la fois pour les endoscopistes, même expérimentés, et pour les pathologistes en raison de leur ressemblance avec les adénomes sporadiques, découverts en muqueuse inflammatoire, qui peuvent être rencontrés chez des patients atteints de MICI, sans avoir néanmoins de rapport avec le contexte inflammatoire. Or, la distinction entre ces 2 entités est importante puisque leur prise en charge thérapeutique est pour certains radicalement différente (polypectomie pour un adénome sporadique et colectomie pour une DALM) (Riddell, 1996 ; Engelskjerd et al, 1999 ; Odze, 1999).

2.2.2. Une nomenclature histologique ambiguë des lésions dysplasiques

D'une manière générale, le diagnostic de dysplasie épithéliale repose encore aujourd'hui uniquement sur les données microscopiques. Les lésions morphologiques caractéristiques de la dysplasie sont nombreuses et variées (Geboes, 1999), mais elles présentent cependant des caractères communs, puisqu'elles traduisent toutes des anomalies de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Ces caractères regroupent des anomalies architecturales (augmentation du nombre de glandes, dont la taille varie et les contours sont irréguliers ; disposition anarchique des glandes, parfois de forme complexe...), des anomalies cytonucléaires (rapport nucléocytoplasmique augmenté, basophilie du cytoplasme, noyaux anormaux de taille augmentée et de contours irréguliers), des anomalies de polarité cellulaire avec images de pseudostratification nucléaire et inversion de sécrétion), des anomalies de la différenciation avec perte de mucosecrétion, des signes d'une augmentation de prolifération cellulaire.

« Grader » une lésion de dysplasie, c'est évaluer sa sévérité et donc son pronostic, en fonction de critères morphologiques (cytologiques et architecturaux) qui

permettent de classer cette lésion dans un groupe de valeur pronostique. Or, les nomenclatures utilisées pour désigner des lésions identiques sont très variables selon le moment et selon les écoles, occidentales ou japonaises notamment. Dans les pays occidentaux, un schéma en deux grades, bas grade et haut grade, a été adopté, notamment pour la classification des lésions dysplasiques survenant dans un contexte de MICI (Riddell et al, 1983), et repris dans la deuxième édition de la classification OMS des lésions néoplasiques gastrointestinales parue en 1990 (Jass et al, 1990). Ce schéma distingue des lésions non dysplasiques, des lésions peut être dysplasiques et des lésions dysplasiques de bas grade et de haut grade (**Figure 15**).

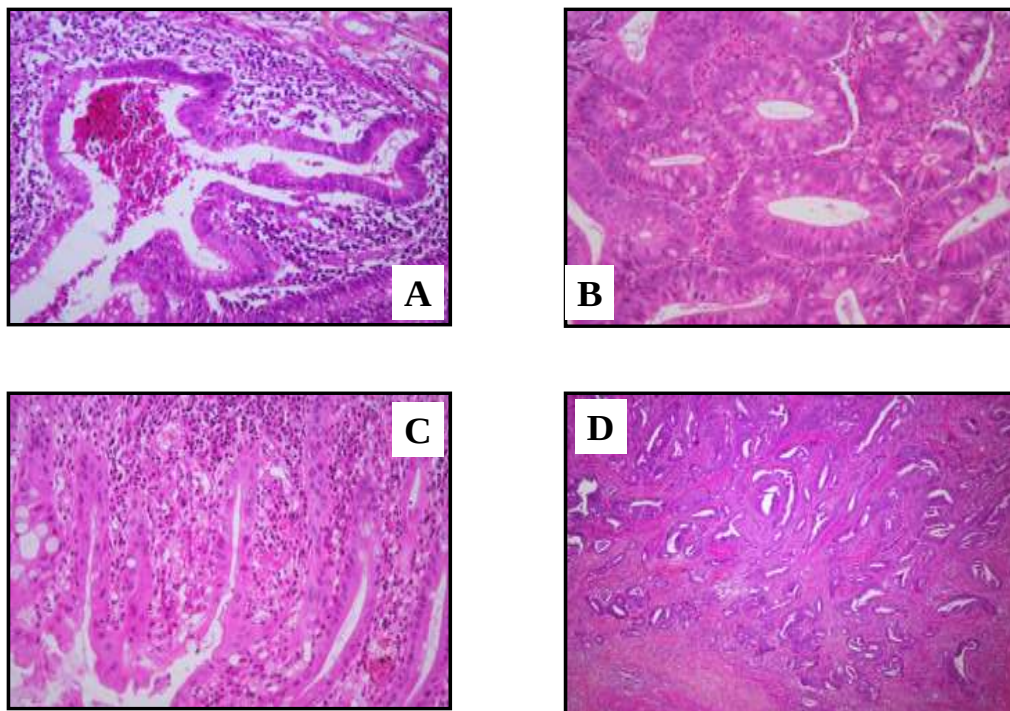


Figure 15 : Grading histologique des lésions néoplasiques selon la classification de Riddell. A, Lésion peut-être dysplasique (PED) : crypte colique présentant une distorsion architecturale, et quelques anomalies cytonucléaires dans un chorion très inflammatoire; B, Adénome tubuleux en dysplasie de bas grade (polype) : glandes coliques tassées les unes contre les autres, constituées de cellules épithéliales aux noyaux pseudostratifiés, présentant quelques anomalies cytonucléaires ; diminution de la mucosecrétion; C, Dysplasie de haut grade en muqueuse plane : anomalies cytonucléaires majeures avec disparition de la mucosecrétion; D, adénocarcinome infiltrant

Parallèlement, les auteurs japonais établissent une classification des lésions dysplasiques très différente de celle adoptée par l'OMS, n'utilisant jamais le terme de dysplasie au profit du terme atypie, et subdivisant les lésions épithéliales digestives en 5 groupes (lésions bénignes sans atypies, lésions bénignes avec atypies, lésions

frontières entre bénignité et malignité, lésions suspectes de malignité et lésions sûrement malignes) en fonction de critères cytologiques et architecturaux (Kozuka et al, 1975).

En pratique, les différences dans les critères diagnostiques et de terminologie rendent très difficile la comparaison entre les études occidentales et japonaises, et la mise en place d'études internationales. Pour cette raison, une nouvelle classification des lésions dysplasiques du tube digestif a vu le jour sous l'impulsion d'un médecin néerlandais installé au Japon, Ronald Schlemper, et a été publiée en 2000, sous le nom de classification de Vienne (Schlemper et al, 2000). Elle propose un compromis entre les habitudes occidentales et les habitudes japonaises, en regroupant les lésions néoplasiques épithéliales en 5 catégories (**Tableau 1**).

	Classification de Vienne	Classification de Vienne révisée
Catégorie 1	Absence de néoplasie/dysplasie	Absence de néoplasie/dysplasie
Catégorie 2	Indéterminée pour la néoplasie/dysplasie	Indéterminée pour la néoplasie/dysplasie
Catégorie 3	Néoplasie non invasive de bas grade (adénome/dysplasie de bas grade)	Néoplasie intra-muqueuse de bas grade (adénome/dysplasie de bas grade)
Catégorie 4	Néoplasie non invasive de haut grade 4.1 - adénome/dysplasie de haut grade 4.2 - carcinome non invasif (carcinome in situ) 4.3 - suspicion de carcinome invasif	Néoplasie intra-muqueuse de haut-grade 4.1 - adénome/dysplasie de haut grade 4.2 - carcinome non invasif (carcinome in situ) 4.3 - suspicion de carcinome invasif 4.4 – carcinome intra-muqueux
Catégorie 5	Néoplasie invasive 5.1- carcinome intra-muqueux (envahissant la sous muqueuse) 5.2- carcinome envahissant la sous-muqueuse ou au-delà	Carcinome envahissant la sous-muqueuse

Tableau 1 : comparaison entre la première classification de Vienne (colonne de gauche) et la classification de Vienne révisée (colonne de droite) des lésions dysplasiques intestinales

Très rapidement, dans la même année, des modifications ont été proposées, pour répondre notamment à certaines difficultés de reproductibilité, avec notamment une redéfinition des catégories 4 et 5, donnant lieu à une classification de Vienne révisée (**Tableau 1**, colonne de droite) (Dixon et al, 2002). Cette classification révisée a été adoptée en partie dans la plus récente édition de la classification OMS des tumeurs digestives, dans laquelle le terme de dysplasie est remplacé par celui de néoplasie intra-épithéliale, et où 2 grades seulement de sévérité (bas grade et haut grade) sont retenus (Hamilton et Aaltonen, 2000). Néanmoins, malgré cet effort

d'uniformisation, on trouve encore aujourd'hui dans la majorité des comptes-rendus anatomopathologiques le terme dysplasie !

Le diagnostic de dysplasie épithéliale n'est pas toujours aisé, mais est particulièrement difficile dans le domaine de la pathologie inflammatoire. Cette difficulté est liée à plusieurs problèmes : difficultés d'identification, mauvaise reproductibilité entre les pathologistes, et terminologie ambiguë et très évolutive.

En effet, le diagnostic de dysplasie est source d'une plus grande variabilité d'interprétation entre pathologistes, d'autant plus grande que les observateurs sont moins experts dans le domaine (Dixon, 1988 ; Eaden et al, 2001 ; Odze et al, 2002 et 2003; Riddell, 1995). Le taux de concordance entre pathologistes est satisfaisant en ce qui concerne les lésions de dysplasie de haut grade, néanmoins, il est médiocre pour les dysplasies de bas grade et les lésions peut-être dysplasiques (Collins et al, 1987). Le terme « peut-être dysplasique » est utilisé notamment quand, dans un contexte très inflammatoire de colite active, on ne peut préciser la nature dystrophique ou dysplasique des anomalies cytonucléaires observées au sein de la muqueuse. En effet, en cas de colite active, les anomalies cytonucléaires observées au niveau des cellules épithéliales peuvent donner le change pour une lésion de dysplasie. Idéalement, dans ces circonstances, une nouvelle série de biopsies doit être réalisée à distance de cette poussée inflammatoire. Cependant, c'est durant cette phase de régénération épithéliale faisant suite à une poussée inflammatoire aiguë que le diagnostic différentiel entre une lésion dysplasique et une lésion régénérative est le plus difficile à établir. En effet, cette phase de prolifération épithéliale accrue, régénérative, en réponse à une perte de substance plus ou moins étendue de la muqueuse, est responsable d'anomalies de l'architecture glandulaire et d'anomalies cytonucléaires caractérisées par un hyperchromatisme nucléaire, une pseudostratification nucléaire, et une diminution de la mucosecrétion, presque identiques à celle que l'on retrouve dans les lésions de dysplasie.

2.2.3. Une prise en charge thérapeutique des lésions de dysplasie non codifiée

Cette difficulté diagnostique prend d'autant plus d'importance que la prise en charge thérapeutique diffère selon l'aspect macroscopique de la lésion (muqueuse

plane, DALM ou adénome sporadique) et le grade histologique. Bien qu'elle ne soit pas totalement codifiée, certaines équipes préconisent la réalisation d'une colectomie dès le stade de dysplasie de bas grade en muqueuse plane tant le risque de cancer associé est grand (~ 10%) (Ullman, 2003). Pour d'autres, la colectomie ne s'impose que devant une dysplasie de haut grade où le risque de cancer associé s'approche des 30% (Odze, 2003). Par ailleurs, la distinction entre adénome sporadique et DALM de type « adenoma-like » est importante puisque les adénomes sporadiques peuvent être traités par simple polypectomie quelque soit le grade de la dysplasie et quelque soit la localisation de la lésion par rapport à l'inflammation, alors que les DALM de type « adenoma-like » sont d'emblée des indications à la colectomie, car elles présentent un risque élevé de transformation carcinomateuse (Odze, 1999). Cependant, même dans les séries où les patients sont suivis très régulièrement par des coloscopies rapprochées, certains développent quand même des cancers sans lésions précurseurs diagnostiquées au préalable (Lofberg R, 1992).

Par conséquent, l'amélioration de cette stratégie de prévention du cancer nécessite 1) l'augmentation du taux de détection endoscopique des lésions de dysplasie, notamment en muqueuse plane, 2) l'augmentation de la reproductibilité du diagnostic histologique de la dysplasie en muqueuse inflammatoire, ou 3) l'utilisation d'autres marqueurs prédictifs du risque de cancer que la dysplasie.

2.3. Les anomalies moléculaires associées à la séquence inflammation / dysplasie / cancer dans les MICI

Comme dans la carcinogenèse colorectale sporadique, le développement du cancer au cours des MICI est supposé suivre un processus multi-étapes, évolutif, impliquant une instabilité génomique, puis une accumulation de mutations aboutissant à une expansion clonale. Les anomalies moléculaires associées à la séquence inflammation / dysplasie / cancer colorectal dans les MICI (étudiés essentiellement dans la RCH, étant donné son tropisme colorectal) ne sont pas totalement identifiées. De nombreux points semblent communs avec la carcinogenèse colorectale sporadique. Dans un premier temps, je détaillerai les

principales anomalies moléculaires associées à la carcinogenèse sporadique. Dans un deuxième temps, je détaillerai les particularités moléculaires de la carcinogenèse associée aux MICI.

2.3.1. Rappels sur les principales anomalies génétiques rencontrées dans la carcinogenèse colorectale sporadique

Les 2 voies de carcinogenèse colorectale sporadique

Voie CIN ou LOH (85%)	Voie MSI (15%)
Instabilité chromosomique	Instabilité microsatellitaire
Tumeurs hyperploïdes	Tumeurs para-diploïdes
LOH 17p ++; 18q ++; 5q	Pas (peu) pertes d'hétérozygoties
Perte fonction APC, précoce	Perte de la fidélité de la réplication de l'ADN Phénotype MSI
Mutations p53, K-ras	Pas de mutation APC ni p53, mais TGF β RII, β -caténine, B-RAF...
Localisation colique distale	Localisation colique proximale
Pronostic plus péjoratif	Pronostic plus favorable

2.3.1.1. La voie d'instabilité chromosomique (CIN)

La voie CIN est caractérisée par des pertes ou des gains chromosomiques, responsables d'une aneuploïdie (anomalie de nombre des chromosomes) et d'aberrations chromosomiques (délétions alléliques, translocations, amplifications) (Lengauer et al, 1997), une des caractéristiques de la majorité des tumeurs colorectales sporadiques survenant très précocément durant le processus de

carcinogénèse (Shih et al, 2001) mais dont le mécanisme moléculaire reste incomplètement élucidé.

C'est en 1988 que l'équipe de Vogelstein caractérise pour la première fois, à partir d'une large série d'adénomes et de cancers colorectaux sporadiques, la fréquence, et le stade à partir duquel apparaissent les délétions alléliques des chromosomes 5q, 18q et 17p, retrouvées très fréquemment dans les CCR sporadiques (Vogelstein et al, 1988).

La délétion 5q est observée dans 29% des adénomes en dysplasie moyenne, 30% des adénomes en dysplasie sévère, et 58% des cancers. La délétion 18q est retrouvée dans 13% des adénomes en dysplasie légère, 11% des adénomes en dysplasie moyenne, 47% des adénomes en dysplasie sévère et 73% des cancers. La délétion 17p est mise en évidence dans 6% des adénomes en dysplasie légère, 6% des adénomes en dysplasie moyenne, 17% des adénomes en dysplasie de haut grade et 60% des CCR. De cette observation, ils suggèrent un modèle de carcinogénèse colorectale sporadique tentant d'expliquer l'évolution clonale des tumeurs colorectales par l'acquisition séquentielle de mutations (Fearon et Vogelstein, 1990). Au début du processus, l'inactivation des 2 allèles du gène *APC* induit le développement des lésions adénomateuses en donnant aux cellules un avantage sélectif permettant l'expansion clonale. La mutation d'un oncogène, *KRAS* est néanmoins nécessaire pour favoriser la croissance des lésions adénomateuses, la transformation carcinomateuse étant médiée par des anomalies génétiques supplémentaires de gènes suppresseurs de tumeur comme *P53*, *SMAD4* et d'autres gènes suppresseurs de tumeur situés en 18q (**Figure 16**).

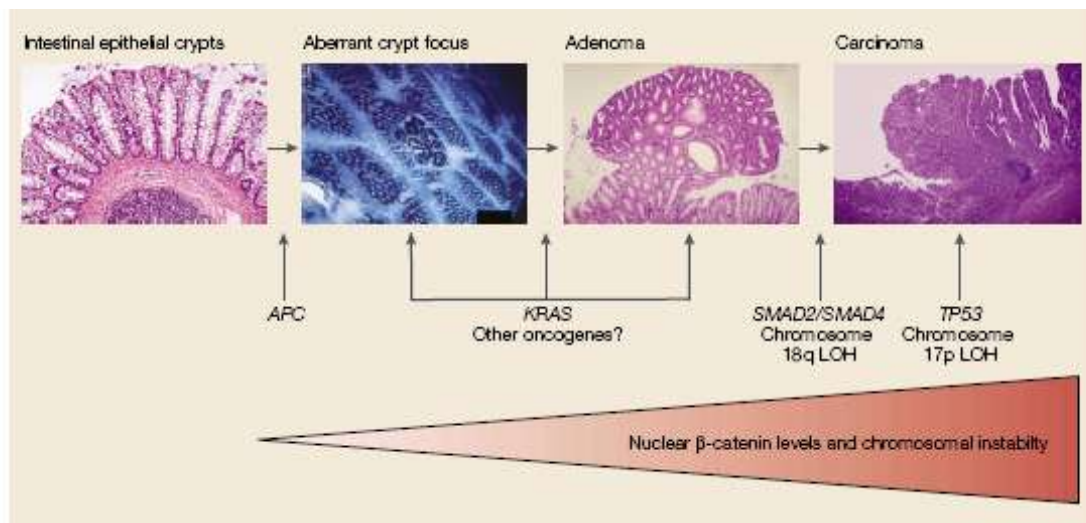


Figure 16: Modèle de carcinogenèse colorectale sporadique avec acquisition successive d'anomalies génétiques associant l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur et l'activation de proto-oncogènes. D'après Fodde et al, 2001

2.3.1.1.1. Morphologie des lésions néoplasiques en muqueuse non inflammatoire associées à la voie CIN

Les lésions dysplasiques conventionnelles sont classées en 2 grands types selon leur aspect endoscopique : les lésions planes ou déprimées et les lésions en relief, pédiculées ou sessiles (que l'on désigne habituellement « adénome »). Par ailleurs, selon leurs aspects architecturaux, on décrit 3 types de lésions :

- l'adénome tubuleux correspond à une prolifération de structures glandulaires dysplasiques au sein du chorion (**Figure 17A**).
- l'adénome vilieux est formé d'expansions digitiformes centrées par des fibres de la musculaire muqueuse et directement revêtues par un épithélium de surface, dysplasique, sans formation glandulaire (**Figure 17B**).
- l'adénome tubulo-vilieux associe les 2 contingents tubuleux et vilieux en proportion variable

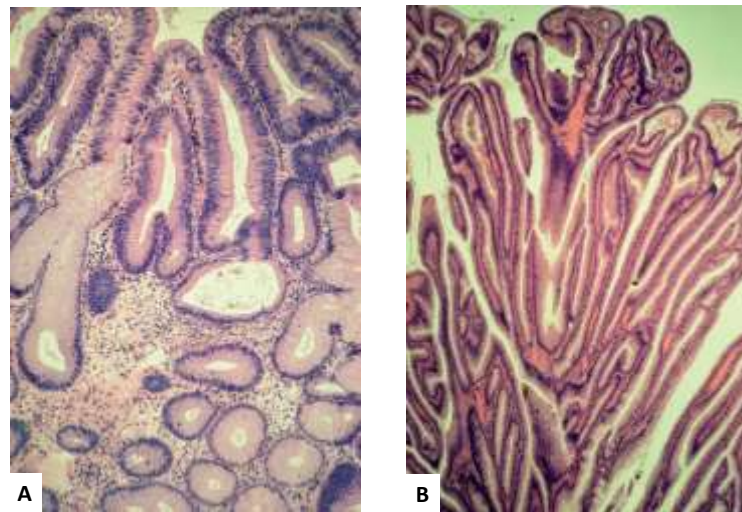


Figure 17 : aspects histologiques d'un adénome tubuleux (A) et d'un adénome vilieux (B)

Concernant les lésions cancéreuses conventionnelles, la majorité correspond à des adénocarcinomes lieberkuhnien bien à moyennement différenciés (**Figure 18**).

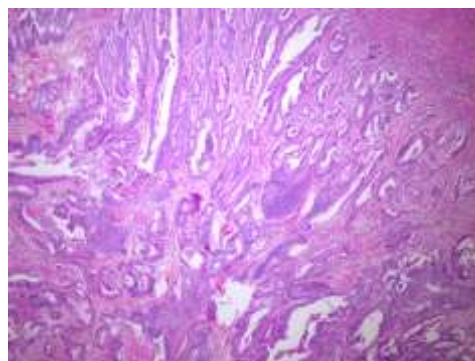


Figure 18: Aspects histologiques d'un adénocarcinome lieberkuhnien bien à moyennement différencié.

2.3.1.1.2. Les principaux gènes impliqués dans la voie CIN

2.3.1.1.2.1. Le gène *APC* en 5q21

La localisation du gène associé à la polypose adénomateuse familiale (PAF), maladie héréditaire à transmission autosomique dominante caractérisée par une polypose colorectale prédisposant au cancer colorectal, a été facilitée par l'identification d'une délétion germinale du locus 5p21 chez un patient atteint de la PAF (Herrera et al, 1986). Par la suite, le clonage de cette région 5p21 chez des patients atteints de PAF a permis d'identifier le gène *APC*, siège de mutations germinales sur l'un des allèles (délétions ou mutations ponctuelles de type mutation faux-sens) (Grodén et al, 1991). Dans le même temps, Su et al. met en évidence une mutation faux sens au niveau de l'homologue murin du gène *APC*, identique à celle retrouvée chez l'homme, chez des souris Min (multiples intestinal neoplasia) développant de multiples adénomes intestinaux prédisposant au cancer colorectal (Su et al, 1992). Ces résultats, chez l'homme et chez la souris, apportent l'évidence que l'inactivation germinale d'*APC* prédispose au CCR et suggèrent qu'il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur.

Dans les CCR sporadiques, les mutations somatiques des 2 allèles du gène *APC* surviennent très précocément, dans 4,6% des foyers de cryptes aberrantes microdisséquées (Smith et al, 1994). Elles sont retrouvées dans 63% des adénomes et environ 70% des CCR (Powell et al, 1992). Il s'agit de mutations faux-sens, de délétions ou d'insertions de nucléotides conduisant à un décalage du cadre de lecture. Elles surviennent au niveau des exons 5-8, 9-14 mais surtout (65%) dans la première moitié de l'exon 15 – désignée MCR (mutations cluster region) - (Fearnhead et al, 2001).

Ce gène code pour une protéine de 312kDa, constituée de 2843 acides aminés et organisée en 4 domaines : un domaine aminoterminal qui permet son oligomérisation, un domaine qui renferme des motifs *armadillo* (motifs trouvés dans la protéine *armadillo* de la drosophile, homologue de la β caténine chez les vertébrés), une région centrale constituée de séquences répétées de 15 et 20 acides aminés, site de liaison à la β caténine et de dégradation de cette protéine, et de sites de liaison à l'axine, et une partie carboxyterminale (**Figure 19**).

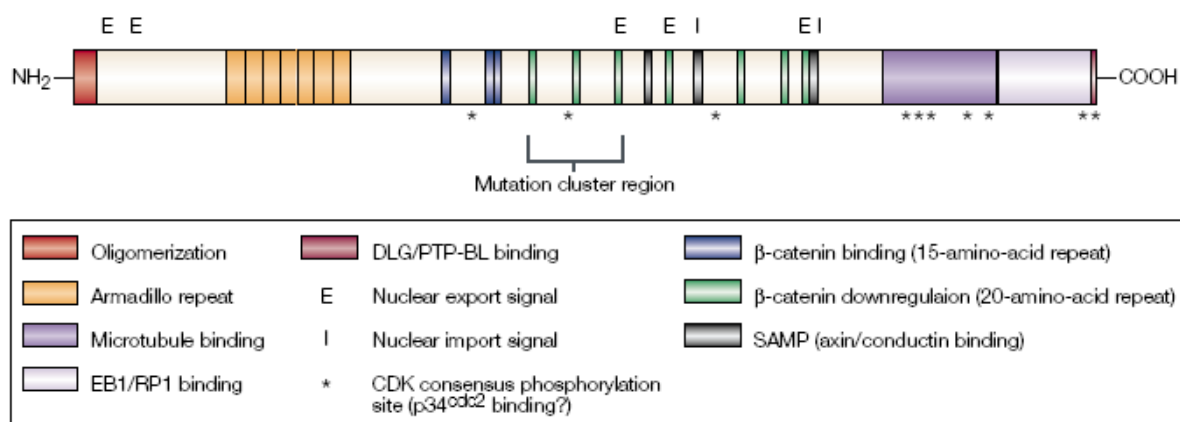


Figure 19: Schéma illustrant les différents domaines de la protéine APC chez l'homme. D'après Fodde et al, 2001

Les altérations génétiques, observées essentiellement dans la région MCR, génèrent l'expression d'une protéine tronquée, non fonctionnelle, généralement amputée de tous les sites de fixation à l'axine, et d'un nombre variable de répétitions de 20 aa associées à la dégradation de β caténine (Miyoshi et al, 1992 ; Miyaki et al, 1994).

La protéine APC a de multiples fonctions. Elle intervient dans la régulation de la voie de transduction du signal Wnt en séquestrant la β caténine, messenger secondaire de cette voie de signalisation, l'empêchant d'exercer son activité transcriptionnelle nucléaire (Polakis, 1997). Dans l'épithélium intestinal normal, la protéine APC est présente essentiellement dans les cellules post-répliques situées au sommet de la crypte (Smith et al, 1993), alors que la β caténine nucléaire est présente exclusivement dans les cellules du fond de la crypte. Ce profil d'expression est en accord avec le rôle de la voie de signalisation Wnt/ β caténine dans le maintien du compartiment des cellules souches et dans la différenciation intestinale (**Figure 12**). Des cellules issues de la lignée cancéreuse colique humaine, SW480, caractérisées par l'expression d'une protéine APC tronquée (1-1337 aa) présentent des taux élevés de β caténine intracytoplasmique. La transfection du gène APC sauvage dans ces cellules est responsable d'une importante diminution des taux intracytoplasmiques avec un immunomarquage uniquement membranaire de la β caténine (Munemitsu et al, 1995). Plusieurs résultats suggèrent qu'APC favorise

l'apoptose des cellules qui atteignent le sommet de la crypte. En effet, la ré-expression d'APC dans des cellules tumorales induit l'apoptose de ces cellules (Morin et al, 1996). La protéine APC intervient également dans la ségrégation des chromosomes durant la mitose, via son domaine C-terminal de fixation aux microtubules via la protéine EB1 (Munemitsu et al, 1994). Durant la métaphase, APC est localisée au niveau du kinétochore des chromosomes. Des cellules souches embryonnaires de souris porteuses de la mutation APC^{1638T} ^{-/-}, responsable d'une protéine tronquée dépourvue uniquement de son domaine carboxyterminal, sont incapables de séparer correctement leur chromosomes, et l'analyse de leur caryotype après une vingtaine de divisions mitotiques montre une importante aneuploïdie (tétraploïdie) et de nombreuses translocations chromosomiques (Fodde et al, 2001 ; Kaplan et al, 2001). Cette aneuploïdie serait la conséquence de la sortie prématurée de la phase M du cycle cellulaire de cellules présentant des altérations du fuseau mitotique induites par l'inactivation d'APC, suivie d'une réentrée en phase G1 de ces cellules possédant un ADN complet répliqué, au lieu d'une entrée en apoptose (Dikovskaya et al, 2007).

2.3.1.1.2.2. Le gène *KRAS* situé sur le chromosome 12

Des mutations activatrices de l'oncogène *KRAS* (Kirsten-ras) ont été rapportées dans environ 50% des adénomes et des cancers (Vogelstein et al, 1988). Ces mutations sont également retrouvées dès le stade de cryptes aberrantes dans 13% des cas (Smith et al, 1994). Il s'agit de mutations intéressant les codons 12, 13 et 61 de l'exon 1 (Bos, 1989), les codons 12 et 13 étant les plus fréquemment mutés.

Ce gène appartient à une famille de 3 gènes homologues *HRAS* (Harvey-ras), *NRAS* (Neuroblastoma-ras) et *KRAS* (Kirsten-ras). Le gène *KRAS*, situé sur le chromosome 12, est constitué de quatre exons codant pour une protéine de 189 acides aminés de 21 kDa, p21-ras. La protéine p21-ras, ubiquitaire, est localisée dans la membrane plasmique, et lie les nucléotides à guanine GDP (Guanosyl di-phosphate) et GTP (Guanosyl tri-phosphate). Elle représente le prototype d'une grande famille regroupée sous le nom de « petites protéines G ». Elle est activée

lorsqu'elle lie le GTP, son activité GTPase intrinsèque provoque un retour à l'état inactif liant le GDP (**Figure 20**).

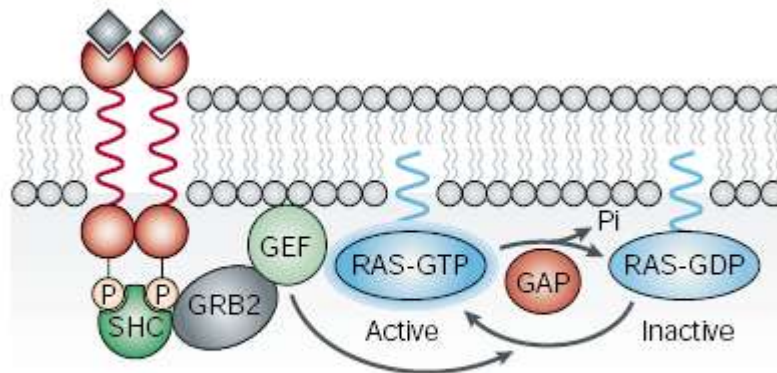


Figure 20: Mécanisme d'activation de la protéine p21-ras. L'état d'activation de p21-ras dépend de l'hydrolyse du GTP lié à p21-ras, catalysé par une GTPase, GAP (GTPase activating protein) et par le remplacement du GDP par un GTP, assuré par un facteur d'échange de nucléotide guanine (GEF, Guanine nucleotide exchange factors). D'après Downward J, 2003

P21-ras joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose cellulaire, dont la voie des MAP kinases (Downward et al, 2003) (**Figure 21**). Cette voie de signalisation est activée suite à la liaison d'un ligand, comme l'EGF (Epidermal Growth Factor), à son récepteur membranaire à activité tyrosine kinase, comme EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor). Plusieurs familles d'effecteurs en aval sont impliquées (Shields JM, 2000). La première famille à avoir été caractérisée est celle des sérine/thréonine kinases raf, constituée de 3 membres : c-raf1, braf et araf (Chong et Guan, 2003). Ces effecteurs raf activés initient la cascade des protéines MAP (Mitogen Activated Protein) aboutissant à l'activation des protéines kinase ERK (ERK 1 et 2-extracellular-regulated kinase) dont certains substrats sont des facteurs de transcription (McKay et Morrison, 2007). La stimulation de ces facteurs transcriptionnels entraîne l'expression de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Raman et al, 2007).

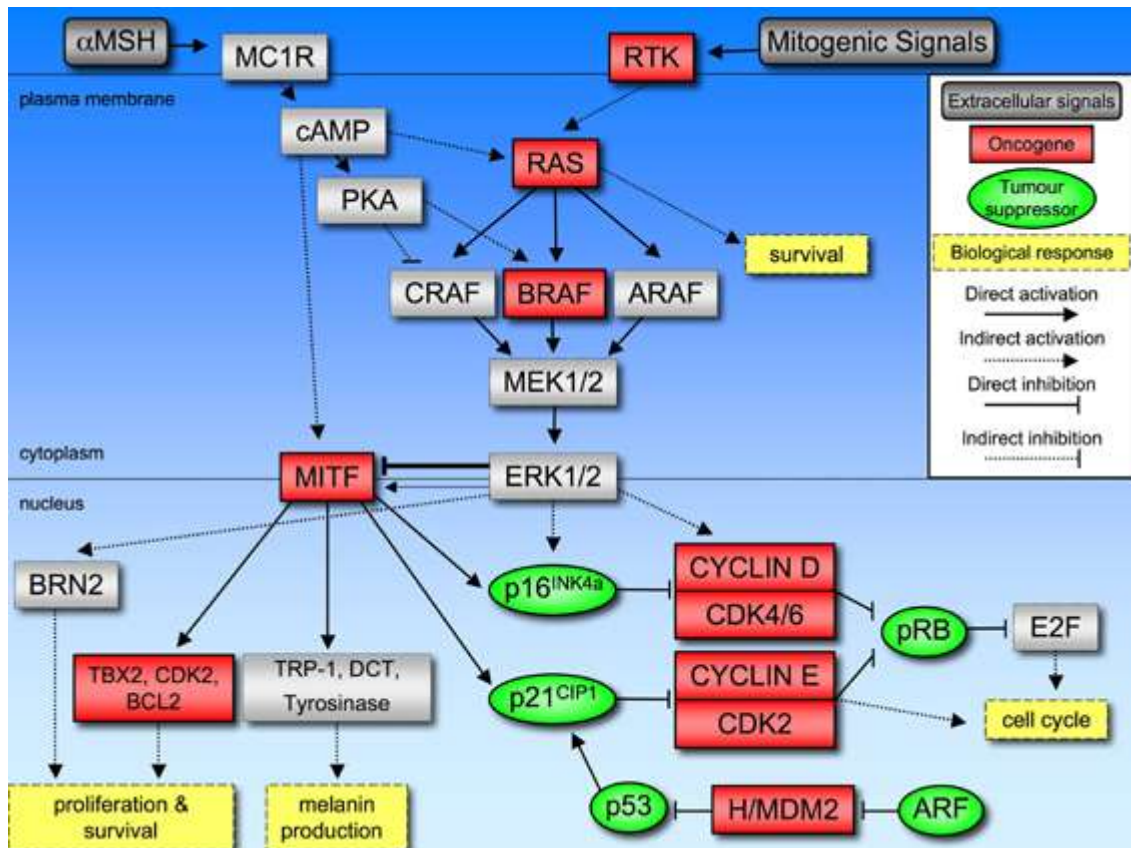


Figure 21: La voie de signalisation ras / raf / mek / erk.

Les mutations ponctuelles de *KRAS* ont lieu à l'intérieur ou à proximité des sites de liaison aux nucléotides guanine et sont responsables d'une inhibition de l'activité GTPasique intrinsèque de la protéine qui reste liée au GTP et figée dans son état activé (Barbacid, 1987). Des études ont montré que la transfection de l'oncogène *RAS* dans des cellules tumorales issues de la lignée SW480 est responsable d'un caryotype instable (de Vries et al, 1993). Plus récemment, des expériences sur lignée cellulaire ont suggéré que les mutations activatrices de *RAS* joueraient un rôle dans l'initiation de l'instabilité chromosomique, via l'activation de la voie des MAPK kinases (Saavedra et al, 2000) en affectant les points de contrôle G1 et G2/M du cycle cellulaire et en inhibant l'apoptose cellulaire (Orecchia et al, 2000). L'activation de p21-ras affecte la régulation transcriptionnelle de *MDM2* entraînant une résistance des cellules à l'apoptose induite par p53 (Ries et al, 2000).

2.3.1.1.2.3. Les gènes situés en 18q

Concernant les délétions en 18q, retrouvées dans environ 70% des CCR sporadiques, mais pas dans les adénomes ou les carcinomes intra-muqueux (Miyaki et al, 1990), un premier gène candidat a été identifié en séquençant cette région, nommé *DCC* (deleted in colorectal carcinoma) mais aucune mutation inactivatrice n'a été mise en évidence sur le 2^{ème} allèle.

Un autre gène suppresseur de tumeur, *DPC4* (deleted in pancreatic cancer) codant pour la protéine smad4 (homologue humain de sma-4 chez *Caenorhabditis elegans*) a été identifié en 18q21. *DPC4* a été retrouvé inactivé initialement dans les cancers du pancréas puis dans un nombre variable (10 à 35%) de CCR sporadiques (Hahn et al, 1996; Thiagalingam et al, 1996). L'inactivation de *DPC4* par mutations ponctuelles faux-sens ou délétions survient tardivement dans le processus de carcinogenèse colorectale, retrouvée dans 10% des carcinomes intra-muqueux, 7% des adénocarcinomes infiltrants, et 35% des adénocarcinomes métastatiques (Miyaki et al, 1999). Ce gène contient 11 exons et code pour une protéine de 552 aa présentant 2 régions appelées mad homology 1 et 2 (MH1 et MH2) situées respectivement à l'extrémité N et C-terminale (Hahn et al, 1996). Le domaine MH1 est impliqué dans la liaison à l'ADN, tandis que le domaine MH2 participe à l'homo- ou l'hétéro-oligomérisation de la protéine. Les protéines smad sont des messagers de la voie de signalisation du TGF β qui est connu pour inhiber la prolifération des cellules épithéliales normales. Paradoxalement, il a été montré que le TGF β pouvait induire la prolifération de cellules épithéliales tumorales et favoriser un phénotype invasif caractérisé par l'expression de marqueurs mésenchymateux comme la vimentine et la perte d'expression de molécules d'adhérence intercellulaire comme la E-cadhérine, définissant la transition épithélio-mésenchymateuse (Massague et al, 2000). Le TGF β regroupe une famille de cytokines ubiquitaires comportant 3 isoformes, TGF β 1, TGF β 2 et TGF β 3, pouvant se lier à 3 types de récepteurs transmembranaires, TGF β RI, TGF β RII et TGF β RIII, à activité tyrosine kinase pour les 2 premiers (Piek et al, 1999). La liaison du TGF β au TGF β RII entraîne le recrutement et la phosphorylation du TGF β RI, puis à l'activation des protéines SMAD. TGF β RI activé phosphoryle les protéines smad2 et smad3, qui forment un complexe hétéro-oligomérique avec smad4. Ces complexes smad2/smad3 et smad3/smad4 sont transloqués dans le noyau et jouent le rôle de facteurs de

transcription au niveau de gènes cibles impliqués dans la régulation du cycle cellulaire comme *C-MYC*, *CDC25A*, et les inhibiteurs des cdk, *P15*, *P21*, *P27*...(Figure 22).

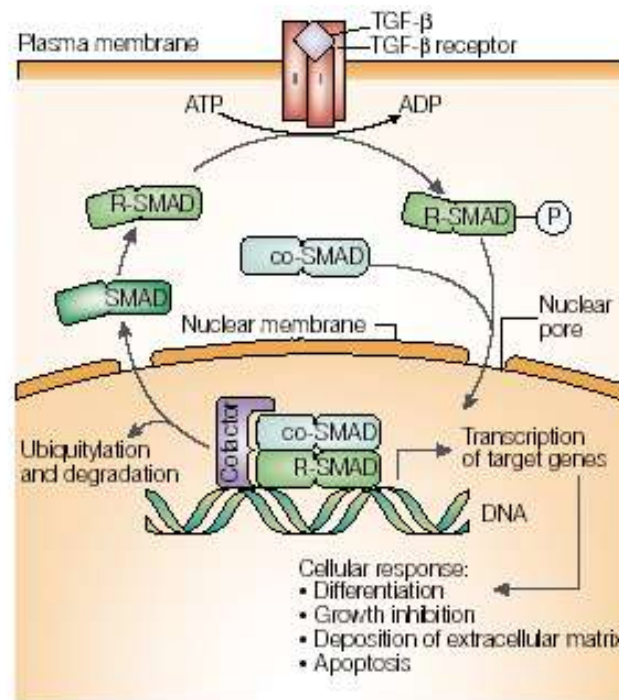


Figure 22: La voie de signalisation médiée par le TGFβ dans les cancers colorectaux. Dans le colon, le TGFβ exerce un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire en se liant à son récepteur hétérodimérique constitué des sous-unités RI et RII, responsable de l'activation des protéines Smad en aval qui activent (ou répriment) la transcription de gènes cibles comme P21.

Plus de 80% des anomalies génétiques de *SMAD4* surviennent dans le domaine MH2, notamment au niveau du codon 361, responsables d'un défaut d'oligomérisation de la protéine. Des études ont montré que la ré-expression de *smad4* dans des cellules tumorales issues de la lignée SW480 restaurait une morphologie épithéliale et induisait la transcription de la E cadhérine. De plus, Reinacher-Schick et al. ont montré dans des cancers du colon présentant une perte d'expression de *smad4* qu'une proportion significative de ces tumeurs présentaient également une perte d'expression de la E-cadhérine, suggérant un rôle de *smad4* dans la transition épithélio-mésenchymateuse et donc dans le phénotype invasif de certaines tumeurs (Reinacher-Schick et al, 2004). Néanmoins, tous les mécanismes impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire induite par la voie du TGFβ sont loin d'être élucidés.

2.3.1.1.2.4. Le gène *P53* situé en 17p

Le gène *P53* code pour une phosphoprotéine découverte en 1979 de manière simultanée par 4 équipes. Trois de ces équipes s'intéressaient aux virus cancérigènes et ont découvert une protéine de 53kDa capable d'interagir avec la protéine T du virus SV40 (les équipes de McCormick, Lane, Levine et May). En 1983, l'équipe de Levine est la première à isoler le gène *p53* chez la souris et l'année suivante, le gène *P53* est isolé chez l'homme. L'étude de ses propriétés a conduit à considérer ce gène comme un oncogène. C'est en 1989 que l'équipe de Vogelstein découvre que ces gènes, isolés chez la souris et chez l'homme, étaient mutés, et reclassent ce gène parmi les gènes suppresseurs de tumeur. En effet, ils montrent que l'inactivation de ce gène est la conséquence de la perte d'hétérozygotie en 17p sur un allèle, suivie d'une mutation inactivatrice sur l'allèle restant (Baker et al, 1989 et 1990), en accord avec la théorie des 2 événements moléculaires de Knudson expliquant l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur (Knudson, 1985).

L'inactivation de *P53* est retrouvée tardivement au stade de dysplasie de haut grade (Baker et al, 1989 ; Fearon et al, 1990), suggérant un rôle dans la progression tumorale, mais pas dans son initiation. Les mutations du gène sont retrouvées dans 40 à 50% des cas de CCR (Iacopetta et al, 2003). La majorité (environ 80%) correspond à des mutations inactivatrices faux-sens, situées principalement au niveau de 5 codons (175, 245, 248, 273, et 282) (Beroud et Soussi, 2003) entre les exons 5 et 8 (codons 130 à 286), codant pour le domaine central de liaison à l'ADN, le gène renfermant 11 exons au total. Cependant, la fréquence des mutations survenant en dehors de ce domaine (presque 14%) est biaisée puisque la majorité des études (40%) n'analysent que les exons 5 à 8, alors que seulement 14% des études analysent le gène entier, excepté l'exon 1 non codant (Soussi et Beroud, 2001). Ces mutations intéressent les exons 4, 10 et 9 et sont le plus souvent de type mutation non-sens ou insertion/délétion avec décalage du cadre de lecture, responsables d'une protéine tronquée (Soussi et Beroud, 2001). Alors que la plupart des gènes suppresseurs de tumeur sont inactivés par des mutations non-sens responsables d'un défaut de synthèse de la protéine ou de la synthèse d'une

protéine tronquée, plus de 80% des mutations de *P53* entraînent la synthèse d'une protéine stabilisée et inactive (Soussi et Beroud, 2001). Elles sont plus fréquemment retrouvées au niveau du colon distal et du rectum (45%) qu'au niveau du colon proximal (34%) et sont associées à un stade avancé (Dukes D) (Russo et al, 2005), sans véritable impact sur le pronostic.

p53, surnommée le « gardien du génome » (Lane, 1992), est un facteur de transcription oligomérique de 393 résidus, organisé en cinq régions fonctionnelles. Ces régions incluent un domaine d'activation transcriptionnelle N-terminal (résidus 1-44), un domaine de régulation riche en proline (résidus 62-94), un domaine de liaison à l'ADN (résidus 110-292), un domaine d'oligomérisation (résidus 325-363) et enfin un domaine multi-fonctionnel C-terminal impliqué dans la régulation de la liaison à l'ADN (résidus 363-393) (**Figure 23**).

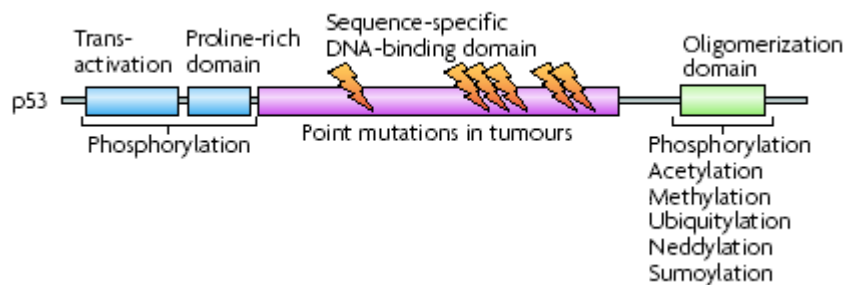


Figure 23: Structure de la protéine p53. Les principaux domaines fonctionnels de p53 sont schématisés sur cette figure : le domaine N-terminal de transactivation, le domaine central de liaison à l'ADN et le domaine C-terminal de régulation. P53 est soumise à de nombreuses modifications post-transcriptionnelles (phosphorylation, acétylation...) qui peuvent affecter la fonction et la stabilité de p53. La plupart des mutations surviennent au niveau du domaine central de liaison à l'ADN. D'après Vousden et Lane, 2007

p53 contrôle l'expression ou la répression de multiples gènes impliqués notamment dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence, la réparation des dommages de l'ADN créés par des génotoxiques (Gatz et Wiesmuller, 2006), l'angiogenèse (Teodoro et al, 2006), la régulation du stress oxydatif (Bensaad et al, 2005) ou la différenciation cellulaire (Murray-Zmijewski et al, 2006) (**Figure 24**). On considère souvent que les conséquences de l'activation de p53 se résument à un dilemme cellulaire entre l'arrêt du cycle cellulaire (en G1 et/ou en G2) et l'apoptose.

Dans le premier cas, la cellule disposerait d'un temps supplémentaire pour réparer l'ADN suite à des dommages et se remettre en ordre de marche avant d'initier la synthèse d'ADN ou la mitose. Dans le second cas, la cellule serait poussée à se « suicider » plutôt que de dupliquer et transmettre de l'ADN endommagé au-delà de ses capacités de réparation.

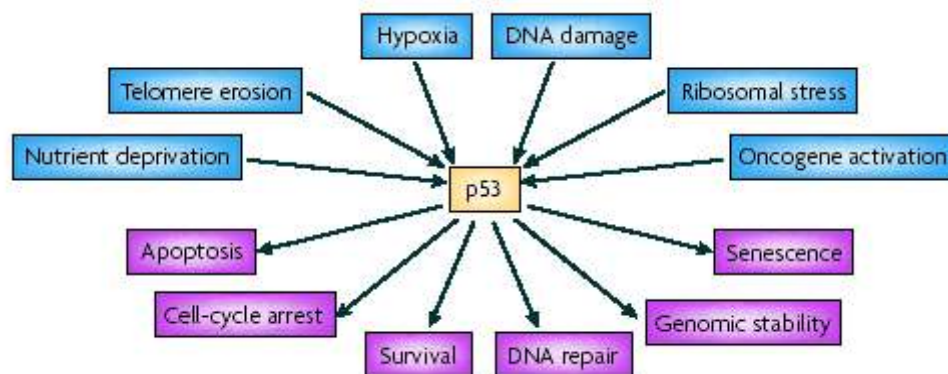


Figure 24: Conditions d'activation de p53 (bleu) et réponses cellulaires induites par p53 (violet).

A l'état normal, les taux intra-cellulaires de p53 sont très faibles, la protéine étant très rapidement dégradée par le protéasome après ubiquitination par des ubiquitine-ligases. Elle est activée en réponse à certains signaux suite à une série de modifications post-traductionnelles coordonnées, telles que l'acétylation ou la phosphorylation. Ces modifications activatrices sont consécutives à un stress génotoxique tels que les rayonnements UV, alpha, gamma, les cancérigènes ou les drogues cytotoxiques, ou à une hypoxie, une perte d'adhésion inter-cellulaire... En situation de stress, il existe une compétition entre les mécanismes d'ubiquitination responsables de sa dégradation et les mécanismes d'acétylation des mêmes résidus lysines de la partie C-terminale, responsables de sa stabilisation (Ito, 2002 ; Li, 2002). La voie d'adressage au protéasome semble jouer un rôle majeur dans la régulation de p53. Ce phénomène a été initialement mis en évidence dans des cellules infectées par le virus HPV E6, induit par une ligase virale (Scheffner et al, 1993). Par la suite, une autre protéine-ligase, mdm 2 (mouse double-minute 2), a été mise en évidence, capable d'induire la dégradation de p53 indépendamment de tout

autre facteur (Haupt et al, 1997). La protéine mdm 2 est responsable également du blocage de l'activité transcriptionnelle de p53, car elle se lie à la région N-terminale de p53, qui contient le domaine minimal de transactivation. Une boucle de rétrocontrôle négatif a été mise en évidence entre p53 et mdm 2 (Wu et al, 1993). Dans une cellule normale, p53 stimule la transcription de *MDM2* en se liant à son promoteur, et entraîne une augmentation des taux intra-cellulaires de mdm2. Mdm 2 se lie au domaine N-terminal de transactivation de p53 inhibant son activité transcriptionnelle et permet la dégradation de p53 grâce à son activité ubiquitine-ligase (Honda et al, 1997). L'importance de mdm 2 dans la régulation de p53 a été confirmée par l'invalidation du gène *MDM2* chez la souris. Cette invalidation est responsable d'une létalité précoce au stade embryonnaire, due à un défaut d'inhibition de l'apoptose induite par p53 (Marine et al, 2006). Mdm 2 peut être inactivée par acétylation, entraînant une augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 (Wang et al, 2004).

D'autres protéines-ligases ont été mises en évidence récemment, impliquées dans la dégradation de p53 indépendamment de mdm 2, comme pirh2 (Leng et al, 2003) ou cop1 (constitutively photomorphogenic 1) (Dornan et al, 2004).

2.3.1.1.3. Méthodes de détection des anomalies génétiques associées à la voie CIN

2.3.1.1.3.1. La voie Wnt/ β caténine

Les mutations inactivatrices du gène *APC* s'accompagnent d'un défaut de dégradation de la β caténine dans le cytoplasme, de sa translocation nucléaire et de son activation transcriptionnelle au niveau de gènes cibles impliqués notamment dans la prolifération cellulaire via la voie Wnt (Polakis, 1999).

Les mutations activatrices du gène *CTNNB1* codant pour la β caténine, qui semblent mutuellement exclusives avec les mutations *APC*, sont très peu fréquentes dans les cancers colorectaux sporadiques, et entraînent également un défaut de dégradation cytoplasmique de la β caténine (Polakis, 1999).

L'expression nucléaire de la β caténine, résultant de ce défaut de dégradation, peut-être mise en évidence par technique immunohistochimique sur coupes déparaffinées. Elle croît depuis le stade adénome (50%) jusqu'au stade cancer (78.8%) (Hao et al, 1997). Cependant, le nombre de noyaux tumoraux marqués en immunohistochimie, essentiellement retrouvés au niveau du front d'invasion tumoral, dépasse rarement 10% (Brabletz et al, 1998) et le comptage des noyaux marqués est très difficile, le marquage nucléaire étant souvent estompé par un marquage cytoplasmique plus ou moins intense. D'autre part, d'authentiques lésions de dysplasie ou de cancer, issues de patients atteints d'une polypose adénomateuse familiale présentant une inactivation complète d'APC, sont dénuées d'immunomarquage nucléaire comme des cas de polypes gastriques présentant une mutation de *CTNNB1* (Kobayashi et al, 2000). A l'inverse, cet immunomarquage n'est pas restreint aux tumeurs associées à une inactivation d'APC ou à une mutation activatrice de *CTNNB1*, suggérant d'autres mécanismes encore inconnus associés à cette accumulation nucléaire de β caténine (Rimm et al, 1999).

Par conséquent, la β caténine ne semble pas être un témoin fidèle de l'activation de la voie Wnt. L'étude de l'expression de gènes cibles de la β caténine, *CMYC*, *BCL1* ou *SOX9*, comme témoin de l'activation de la voie Wnt serait peut-être plus sensible et donc plus intéressante. En effet, c-myc est retrouvé surexprimé dans environ 70% des CCR sporadiques (Finley G, 1989), mais cette surexpression est liée à un processus d'amplification du gène dans environ 30% de ces cancers (Augenlicht et al, 1997), ce qui rend son étude inopérante comme témoin de l'activation de la voie Wnt.

2.3.1.1.3.2. Les mutations activatrices du gène *KRAS*

Les mutations activatrices de l'oncogène *KRAS* peuvent être détectées par des techniques de séquençage direct, néanmoins cette technique n'est pas suffisamment sensible pour des échantillons renfermant moins de 20% d'allèles mutés (Bar-Eli et al, 1989). De ce fait, des techniques ultra-sensibles de PCR multiplexe, capables de détecter une mutation au sein d'un prélèvement tissulaire renfermant une minorité de cellules tumorales ont été mises au point (Khanna et al, 1999). Nous avons, au sein

de notre équipe, mis au point et validé une technique de PCR en temps réel, spécifique d'allèle pour la détection des mutations des codons 12 et 13 de l'exon 1 du gène *KRAS* et des mutations V600E du gène *BRAF* (Bézieau et al, 2001 ; Jarry et al, 2004). La PCR en temps réel est basée sur la mesure de la fluorescence émise à la fin de chaque cycle par le SYBR Green, celle-ci étant proportionnelle à la quantité de gène amplifié. Ce test est suffisamment sensible pour détecter une mutation dans 2% des cellules de l'échantillon testé, équivalent à 1% d'ADN muté compte tenu de l'hétérozygotie allélique. Cette technique est applicable sur de l'ADN extrait à partir de tissus fixés et paraffinés.

2.3.1.1.3.3. Les mutations du gène *P53*

La technique de choix pour analyser le statut mutationnel du gène *P53*, constitué de 12 exons, est le séquençage de l'ensemble des exons (excepté l'exon 1) à partir de l'ADN génomique extrait au mieux à partir de tissu congelé (Soussi et Beroud, 2001), mais il s'agit d'une technique complexe, coûteuse et longue, non applicable en routine. La plupart des mutations (mutations faux-sens) sont responsables de la stabilisation d'une protéine inactive qui s'accumule dans le noyau et devient donc détectable par des techniques immunohistochimiques (Dowell et al, 1994). L'anticorps le plus fréquemment utilisé est un anticorps monoclonal D0-7 (Dako) qui reconnaît à la fois la protéine sauvage et la protéine mutée. Néanmoins, le taux de corrélation entre l'accumulation nucléaire de la protéine mise en évidence par immunohistochimie et la mutation du gène n'est que de 80%, avec à la fois des faux-positifs et des faux-négatifs (Bell et al, 1993, Costa et al, 1995 ; Mulder et al, 1995 ; Bouzourene et al, 2000). En effet, les mutations de type insertion/délétion ou non-sens situées au niveau des exons 4, 10 et 9 ne permettent pas de détecter la protéine puisque en général elle n'est pas synthétisée. La détection immunohistochimique isolée de p53 est donc insuffisante pour déduire le statut mutationnel du gène. Nenutil et al. ont donc proposé l'analyse concomitante de l'expression de p53 et de mdm2, protéine codée par l'un des gènes cibles de p53, pour définir le statut mutationnel de *P53*. En effet, alors que l'activation de p53 sauvage induit l'expression de mdm2, p53 mutée n'en est plus capable. Les

mutations faux-sens habituelles sont responsables d'une surexpression de p53 accompagnée d'une expression normale de mdm2. Les mutations non-sens ou de type insertion/délétion responsables de l'absence de synthèse de la protéine sont accompagnées d'une très faible expression des 2 protéines. En résumé, une forte expression de p53 sans augmentation de mdm2 identifie les mutations inactivatrices responsables d'une stabilisation de p53, alors qu'une forte expression de p53 associée à une forte expression de mdm2 reflète l'activation de p53 sauvage. Néanmoins, le taux de corrélation phénotype/génotype avec cette approche n'est que de 86.6% (Nenutil et al, 2005).

2.3.1.2. La voie d'instabilité microsatellitaire (MSI)

La voie d'instabilité microsatellitaire est caractérisée par des anomalies de taille de courtes séquences nucléotidiques, dénommées séquences microsatellites, qui sont des séquences répétées de quelques nucléotides situées le plus souvent dans des régions non codantes, introniques, du génome. Ce sont Ionov et al. qui, les premiers en 1993, ont suggéré cette voie de carcinogenèse en mettant en évidence des microdélétions somatiques survenant de manière extensive au niveau de séquences répétées dans 12% des cancers colorectaux testés dans leur étude. Ce profil mutationnel était associé à des caractéristiques cliniques et génotypiques particulières : 68% des cancers étaient localisés au niveau du cæcum ou du colon droit, 86% étaient de type moyennement à peu différencié et n'étaient quasiment jamais associés à une mutation de *P53* ou de *KRAS* (Ionov et al, 1993). Un ensemble d'éléments cliniques, morphologiques et moléculaires, que nous allons détailler dans les paragraphes suivants, ont fait suggérer à certains auteurs à la fin des années 1990 que 2 voies de carcinogenèse colorectale sporadique différentes existaient – l'instabilité chromosomique et l'instabilité microsatellitaire (Lengauer et al, 1997).

2.3.1.2.1. Morphologie des lésions préneoplasiques et néoplasiques associées à la voie MSI

Jass et al., à la fin des années 1990, confirment au cours d'une étude de corrélation anatomoclinique et moléculaire que les tumeurs MSI correspondent plus fréquemment à des adénocarcinomes mucineux, ou peu différenciés de type médullaire, le plus souvent associés à un stroma riche en lymphocytes, ou festonné (Makinen, 2007) et localisés au niveau du colon droit (Jass et al, 1998) (**Figure 28**). Cette équipe a proposé une nouvelle voie de carcinogenèse colorectale pour expliquer la survenue de certains CCR sporadiques, notamment MSI, à partir de polypes festonnés, la voie des tumeurs festonnées (« serrated neoplasia pathway ») (Jass et al, 1999, 2000, 2001). Cette proposition a amené à reconsidérer une entité jusque là prise pour une tumeur bénigne non évolutive, le polype hyperplasique. En effet, avant le milieu des années 1990, la majorité des polypes colorectaux était divisée globalement en 2 groupes, les polypes hyperplasiques et les adénomes, seuls les derniers étant considérés de manière consensuelle comme des lésions précurseurs du CCR. Puis progressivement, sont apparus dans la littérature quelques indices amenant à réévaluer cet ancien « dogme ». Quelques articles rapportaient, en effet, l'existence de polypes hyperplasiques, le plus souvent de grande taille et situés au niveau du colon droit, contigus à d'authentiques adénocarcinomes (Warner et al, 1994). Finalement, l'analyse de la littérature, de plus en plus riche sur le sujet, a permis de mettre en évidence que cette entité – polype hyperplasique - représentait en fait un large spectre lésionnel, hétérogène à la fois sur le plan morphologique et moléculaire, renfermant des sous-groupes de lésions au potentiel de transformation maligne. C'est ainsi que Longacre et Fénoglio-Preiser, analysant une série de « polypes mixtes hyperplasiques et adénomateux » renomment ce polype hyperplasique, « adénome festonné », caractérisé par un potentiel évolutif puisque certains d'entre eux (11% dans leur étude) renferment des foyers d'adénocarcinomes intra-muqueux (Longacre et Fénoglio-Preiser, 1990). En 1996, Torlakovic et Snover suggèrent que « la polypose hyperplasique », entité mal définie ressemblant sur le plan endoscopique à la polypose familiale adénomateuse mais sans risque de transformation maligne (puisque constituée uniquement de polypes hyperplasiques), doit être considérée finalement comme une condition à risque de transformation adénocarcinomateuse, suite à la description de cas d'adénocarcinomes synchrones ou métachrones. Et, en réévaluant rétrospectivement, selon les critères morphologiques de Longacre et Fénoglio-

Preiser, les « polypes hyperplasiques » de 5 patients souffrant d'une polypose hyperplasique, ils montrent en effet que ces lésions correspondent en fait à des adénomes festonnés dont l'aspect morphologique varie énormément depuis des lésions franchement adénomateuses jusqu'à des lésions difficilement distinguables de polypes hyperplasiques ne présentant pas de manière évidente de foyers de dysplasie (Torlakovic et Snover, 1996). Etant donné cette difficulté diagnostique, la même équipe tente d'apporter des critères morphologiques plus fiables et proposent, à partir d'une étude morphologique rétrospective portant sur 289 polypes festonnés, que selon l'étendue du compartiment de prolifération, on distingue 1) les polypes hyperplasiques caractérisés par un compartiment de prolifération cantonné à la base de la crypte (**Figure 25**) et 2) les adénomes festonnés sessiles (SSA) caractérisés par une zone de prolifération dépassant la moitié inférieure de la crypte (**Figure 26**) (Torlakovic et al, 2003 ; Torlakovic et al, 2008). Les aspects morphologiques étant de mieux en mieux précisés, quelques études identifient la présence de SSA à l'endroit où se développe, en moyenne 7 ans plus tard, un adénocarcinome MSI (Goldstein et al, 2003).

Néanmoins, ce spectre lésionnel [polype hyperplasique, adénome festonné sessile, adénome festonné traditionnel (**Figure 27**)] fait appel à des dénominations ambiguës – le terme dysplasique ne définit pas les mêmes critères que ceux utilisés pour le diagnostic d'adénome conventionnel-, et surtout manque de critères diagnostiques stricts et reproductifs rendant leur identification et leur classification difficiles pour le pathologiste, ces imprécisions engendrant une certaine confusion chez les gastro-entérologues d'autant que leur prise en charge thérapeutique n'est pas encore codifiée et que la signification clinique de ces différentes catégories de polypes est loin d'être élucidée.

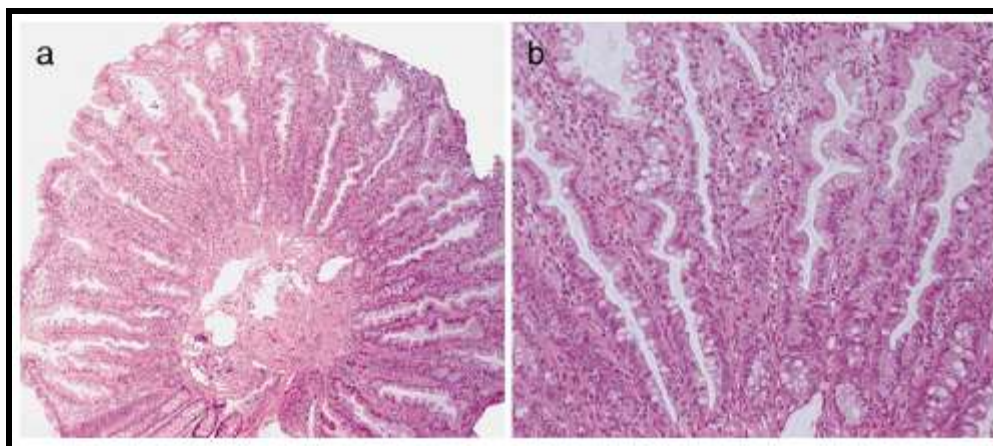


Figure 25 : Le polype hyperplasique. Aspect festonné intéressant le 1/3 supérieur de la crypte

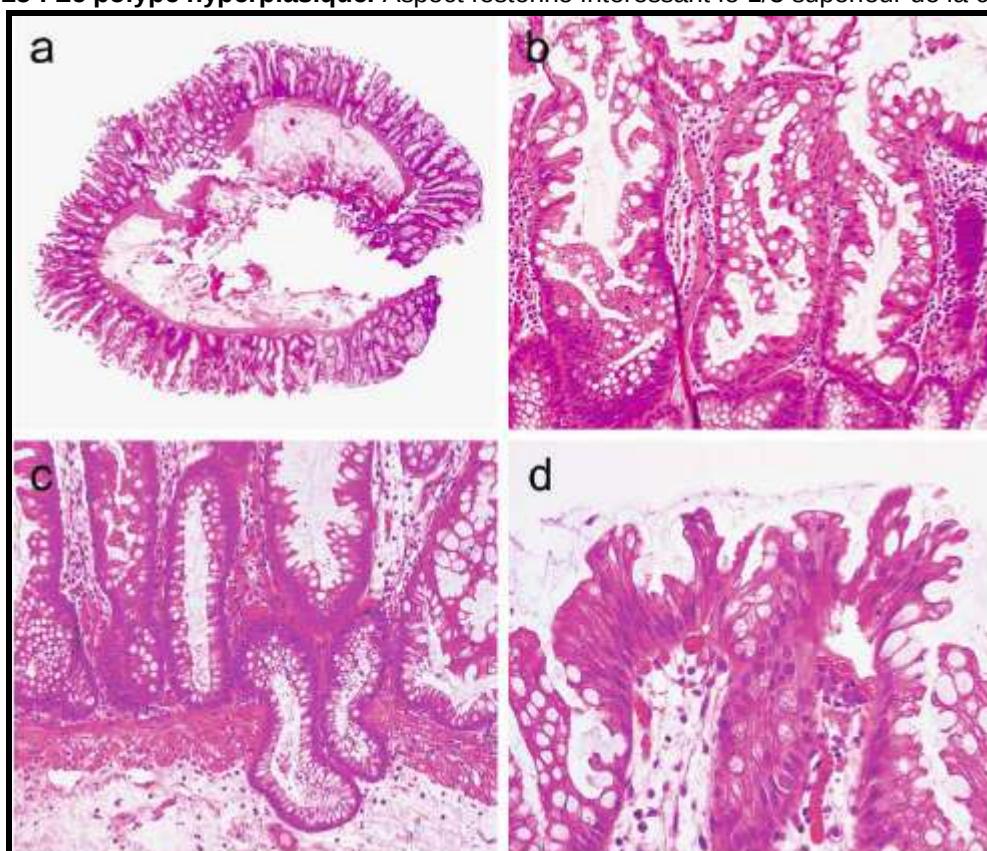


Figure 26 : L'adénome festonné sessile. Les aspects festonnés intéressent toute la hauteur de la crypte. Les cryptes sont dilatées à leur partie basale et celle-ci s'horizontalise contre la musculaire muqueuse. Pas de dysplasie associée

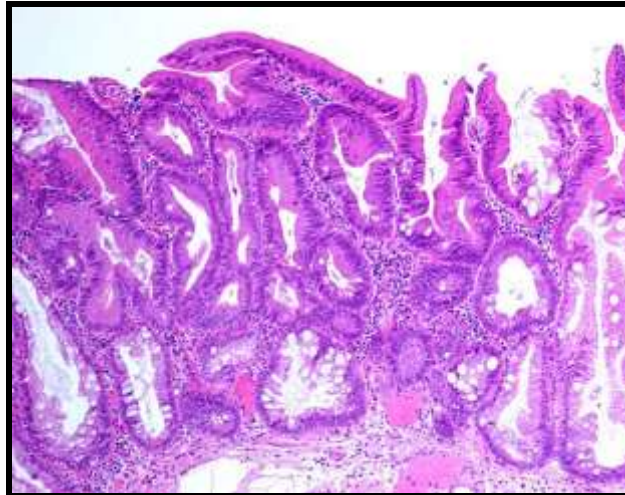


Figure 27 : L'adénome festonné traditionnel ou classique. Les cryptes sont bordées de cellules cylindriques ou cytoplasme plus éosinophile, moins sécrétant. Les pseudostratifications nucléaires sont plus marquées et les mitoses plus nombreuses.

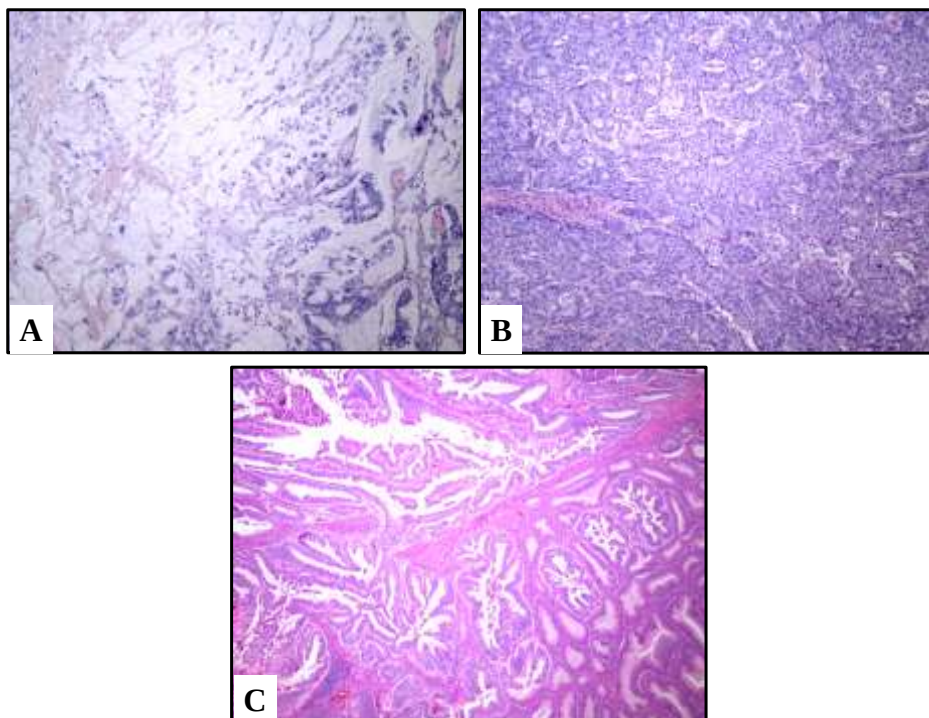


Figure 28 : Aspects morphologiques des différents types d'adénocarcinome susceptibles de présenter une instabilité microsatellitaire. Adénocarcinome mucineux (A), adénocarcinome de type médullaire (B), adénocarcinome festonné (C).

Parallèlement aux efforts réalisés afin d'améliorer le diagnostic de ces lésions, le lien entre ces lésions et le CCR MSI est de plus en plus suggéré. Hawkins et al.,

en comparant l'aspect des polypes sur des pièces de colectomie pour adénocarcinome MSI ou MSS, montrent que le nombre de polypes festonnés (HP et SSA) est significativement plus élevé dans le groupe de CCR MSI que dans le groupe de CCR MSS, et que 30% de ces polypes festonnés ont perdu l'expression de hMLH1 par hyperméthylation du promoteur de *hMLH1* (Hawkins et Wards, 2001). Cette instabilité microsatellitaire associée à une perte d'expression de hMLH1 par hyperméthylation du promoteur, décrite dans d'autres études (Torlakovic et al, 2003) conforte, pour certains, l'idée que ces polypes festonnés constituent de véritables lésions préneoplasiques et qu'il existe une voie alternative « festonnée » de carcinogenèse colorectale (Jass et al, 2001). D'autres anomalies génétiques allant dans le même sens sont mises en évidence, notamment la mutation du gène *BRAF* retrouvée spécifiquement dans les SSA et les CCR MSI (Kambara et al, 2004).

2.3.1.2.2. Principales anomalies moléculaires impliquées dans la voie MSI

Cette instabilité microsatellitaire est le plus souvent due à une anomalie d'un des gènes *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, *hPMS1* ou *hPMS2* (« care taker gene » ou « gènes gardiens ») codant pour des protéines impliquées dans la réparation des mésappariements des bases de l'ADN survenus durant le processus de réplication (Peltomäki et al, 2001) (**Figure 29**).

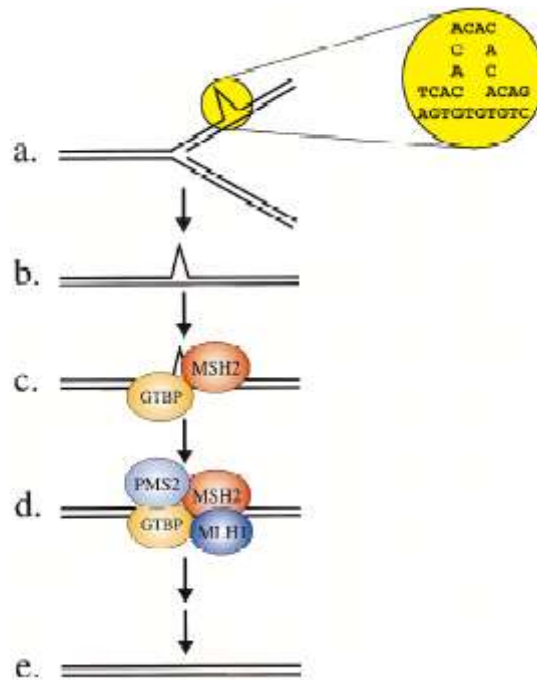


Figure 29 : Le système de réparation des mésappariements de bases de l'ADN durant le processus de réplication.

Or les erreurs des ADN polymérases sont particulièrement fréquentes au niveau des séquences microsatellites du génome. La perte des fonctions de réparation post-réplication se traduit par un phénotype mutateur (Eshleman et al, 1995) : les séquences microsatellites altérées sont la cible de mutations somatiques de type insertion-délétion. Ce phénotype MSI, autrefois appelé RER pour Replication Error, associé au syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer), est également observé dans 10 à 15% des CCR sporadiques (Thibodeau et al, 1993). Cependant, à la différence de ce syndrome héréditaire qui se caractérise par une mutation germinale d'*hMLH1*, *hMSH2*, ou *hMSH6*, les CCR sporadiques présentent une inactivation bi-allélique, le plus souvent d'*hMLH1*, par un processus épigénétique d'hyperméthylation des îlots CpG du promoteur du gène (Veigl et al, 1998 ; Herman et al, 1998).

Trente à quarante pourcents des CCR sporadiques associés à une instabilité microsatellitaire présentent une mutation du gène *BRAF* (Rajagopalan et al, 2002 ; Wang et al, 2003 ; Deng et al, 2004). Ces mutations sont également associées à la transformation des polypes hyperplasiques et des adénomes festonnés, retrouvées dans 20 à 36% des polypes hyperplasiques et dans 80 à 100% des adénomes

festonnés (Chan et al, 2003 ; Kambara et al, 2004). Parallèlement, seuls 5 à 10 % des CCR sporadiques MSS présentent une mutation du gène *BRAF* (Wang et al, 2003).

Le gène *BRAF* code pour une protéine appartenant à la famille des protéines kinases raf constituée de 3 membres : araf, braf et craf. Le clonage de ces 3 gènes humains a eut lieu dans la fin des années 1980 (Beck et al, 1987 ; Ikawa et al, 1988). En 2003, une omission de 3 nucléotides du premier exon dans la séquence du gène *BRAF* a été identifiée et corrigée, à l'origine du changement de dénomination de la mutation V599E en V600E (Kumar et al, 2003). Le gène *BRAF* comporte 18 exons et code pour une sérine / thréonine kinase cytoplasmique de 766 aa (84kDa) qui intervient dans la voie de signalisation des MAP kinases que nous avons décrit précédemment. Les protéines raf comportent 3 régions conservées, CR1, CR2 et CR3. Les régions CR1 et CR2 sont des domaines régulateurs. La région CR1 contient le domaine de liaison à p21-ras (RBD, Ras Binding Domain) et le domaine riche en cystéine (CRD, Cystein Rich Domain) impliqué dans le recrutement de braf à la membrane plasmique. La région CR3 contient le domaine kinase. La phosphorylation de 2 résidus (T599 et S602) au sein de ce domaine est nécessaire pour l'activation de la protéine braf (**Figure 30**) (Tran et al, 2005).

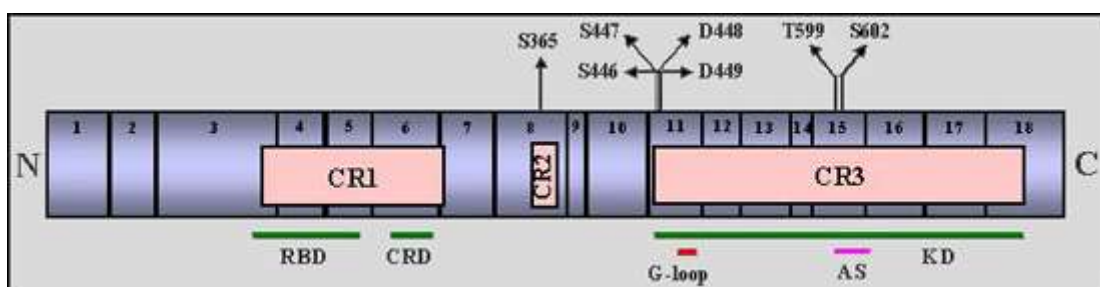


Figure 30: Schéma illustrant les différents domaines de la protéine braf. Les 3 domaines CR1, CR2 et CR3 sont communs aux 3 protéines raf ; les domaines RBD (Ras binding domain), CRD (Cysteine-rich domain) et KD (Kinase domain) propres à la protéine braf ; AS : domaine d'activation dans l'exon 15 ; les flèches indiquent les principaux sites de phosphorylation. C: Carboxyl-terminal; N: Amino-terminal.

Des mutations du gène *BRAF* ont été retrouvées dans un certain nombre de tumeurs, notamment les mélanomes (66%) (Davies et al, 2002 ; Gorden et al, 2003), les carcinomes papillaires de la thyroïde (30 à 69%) (Nikiforova et al, 2003 ; Kimura

et al, 2003) et les adénocarcinomes coliques sporadiques (5 à 15%) (Davies et al, 2002 ; Yuen et al, 2002 ; Wang et al, 2003). La majorité (80%) des mutations de *BRAF* correspondent à une substitution isolée dans l'exon 15 d'une thymine en adénosine responsable du remplacement d'une valine par un acide glutamique au niveau du résidu 600 (V600E) de la protéine braf (Davies et al, 2002) (**Figure 31**). Cette insertion d'un résidu chargé négativement au centre d'un site majeur de phosphorylation de la protéine braf, entre le résidu T599 et S602, entraîne son activation constitutionnelle, et par conséquent l'autonomisation de la voie des MAP kinases, indépendamment de p21-ras.

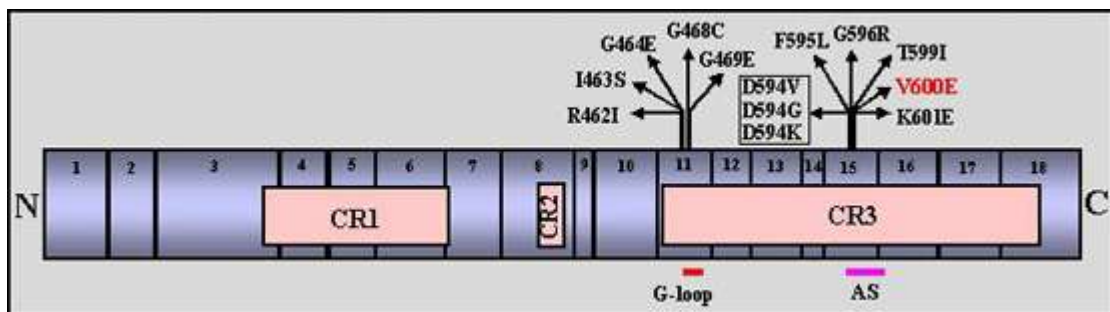


Figure 30: Schéma illustrant la position des différentes mutations du gène *BRAF* retrouvées dans le cancer colorectal sporadique. La mutation la plus fréquemment retrouvée est la mutation V600E.

Le rôle oncogénique de braf a surtout été étudié dans des lignées de mélanocytes. Des cellules, issues d'une lignée de mélanocytes immortels de souris (cellules melan-a), transfectés avec un fragment d'ADN comportant la mutation V600E, sont capables de proliférer sans support, et l'injection sous-cutanée de ces cellules à la souris nude est responsable du développement de tumeurs (Wellbrock et al, 2004). De plus, la suppression du mutant *BRAF* V600E par siRNA (small interfering RNA) inhibe la prolifération, la transformation tumorale, l'invasion tumorale et induit l'apoptose (Hingorani et al, 2003). Très récemment, le même type d'expérience a été réalisé sur des lignées de cellules humaines, RKO et CO115, issues de cancer colorectal MSI par hyperméthylation du promoteur de *hMLH1*, présentant la mutation *BRAF* V600E. Preto et al montrent que l'inhibition de *BRAF* muté par siRNA bloque la prolifération cellulaire et s'associe à une inhibition de l'activation de ERK, une diminution de l'expression de cycline D1 et une augmentation de l'expression de p27. De plus, cette inhibition de *BRAF* muté induit

l'apoptose cellulaire via une diminution d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Preto et al, 2008).

Les CCR sporadiques associés à un phénotype MSI peuvent également présenter des mutations du gène *KRAS*, avec une fréquence moindre que celle observée pour le gène *BRAF* puisque retrouvées dans seulement 18% des cas (Oliveira et al, 2004). Par ailleurs, les mutations de *BRAF* et de *KRAS* sont mutuellement exclusives au cours de la carcinogenèse colique (Rajagopalan et al, 2002). L'ensemble de ces résultats suggère que ces tumeurs MSI progressent selon la même voie de signalisation, RAS/RAF/MAP kinase, dérégulée au niveau d'une seule kinase ras ou raf. Globalement, elles surviennent dans des contextes anatomo-cliniques différents : les mutations de *KRAS* surviennent plus fréquemment dès les stades initiaux de dysplasie des adénomes tubuleux et /ou villositaires sporadiques du colon alors que les mutations de *BRAF* semblent plutôt associées à la transformation néoplasique des polypes hyperplasiques et des adénomes festonnés (Chan et al, 2003).

2.3.1.2.3. Méthodes de détection des anomalies moléculaires associées à la voie MSI

Le phénotype MSI est mis en évidence lors de la comparaison des produits d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de loci microsatellites, obtenus à partir de l'ADN tumoral et non tumoral du même patient. Ces analyses moléculaires peuvent être réalisées à partir de tissu congelé ou de tissu fixé. Le phénotype MSI se traduit par l'apparition d'allèles de taille différente dans la tumeur, n'existant pas dans l'ADN non tumoral du patient. Les recommandations actuelles sont d'utiliser un panel, constitué de 5 marqueurs mononucléotidiques quasi-monomorphes (BAT25, BAT26, NR21, NR22 et NR24) pour la détection du phénotype MSI, et de définir le phénotype MSI « high » par la présence de deux marqueurs instables (ou plus de 30% des microsatellites instables si l'analyse est étendue à un plus grand nombre de microsatellites). Les tumeurs présentant un seul marqueur instable, appelées « MSI-Low », ne présentent pas de caractéristiques cliniques, histologiques et moléculaires

différentes des tumeurs ayant des séquences MicroSatellites Stables (MSS) et sont donc actuellement considérées comme telles (Umar et al, 2004). La recherche d'une mutation délétère d'un gène du système MMR ne sera réalisée qu'après une consultation d'oncogénétique et accord du patient, dans un laboratoire agréé, sur la base des critères cliniques et de l'analyse des marqueurs microsatellites complétés par l'étude immunohistochimique des protéines MMR.

L'analyse immunohistochimique permet de détecter un défaut d'expression des protéines du système MMR (MLH1, MSH2, MSH6) dans les cellules tumorales et a été proposée comme solution alternative à l'analyse moléculaire pour la détermination du phénotype MSI. Ces analyses ont une sensibilité moins bonne que l'analyse moléculaire (66 à 92% selon les séries), du fait de mutations ne modifiant pas l'épitope reconnu par l'anticorps, ou touchant d'autres gènes impliqués dans le syndrome HNPCC, mais aussi du fait de difficultés techniques et/ou d'interprétation du marquage. La spécificité de ces techniques est en revanche excellente (voisine de 100%) et elles ont l'intérêt d'indiquer la protéine défectueuse et d'orienter ainsi les analyses complémentaires.

La mutation V600E du gène *BRAF*, de loin la plus fréquente, est détectée dans la plupart des études par amplification d'un fragment du gène suivie d'une analyse par SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) (Kimura et al, 2003), séquençage direct (Gorden et al, 2003), ou RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Rimoldi et al, 2003). Néanmoins ces techniques sont longues et pas suffisamment sensibles pour détecter un faible pourcentage de cellules mutées au sein d'un échantillon tissulaire. Nous avons donc utilisé la même technique de PCR en temps réel, spécifique d'allèle mise au point et validée au sein de notre équipe pour la détection des mutations V600E (Jarry et al, 2004).

2.3.2. Les particularités génétiques associées à la carcinogenèse dans les MICI

Nous décrivons ce chapitre dans le contexte du début des années 2000 où on calquait la voie de carcinogenèse colorectale associée aux MICI essentiellement sur la voie classique d'instabilité chromosomique de la carcinogenèse colorectale sporadique. Quelques études seulement commençaient à impliquer la voie d'instabilité microsatellitaire, deuxième grande voie de carcinogenèse colorectale sporadique, dans ce processus de carcinogenèse associée aux MICI.

Sur le plan morphologique, seules les lésions classiques associées à cette voie d'instabilité chromosomique étaient rapportées : adénome conventionnel, en muqueuse plane ou surélevée ; adénocarcinome lieberkuhnien.

2.3.2.1. La voie d'instabilité chromosomique

Les anomalies moléculaires associées à la voie d'instabilité chromosomique sont celles décrites dans la carcinogenèse colorectale sporadique. Cependant, l'ordre de survenue dans la progression tumorale et la fréquence de certaines d'entre elles sont différentes (Willenbacher et al, 1999) (**Tableau 2 et Figure 31**).

	CCR sporadiques	CCR associés aux MICI
Lésion précancéreuse	Polype adénomateux	Dysplasie en muqueuse plane ou en muqueuse surélevée (DALM)
Fréquence des mutations	APC (60%) et KRAS (40-60%) P53 (70%)	APC (6%) et KRAS (20-50%) P53 (80-100%)
Ordre des mutations	APC précoce et P53 tardive	P53 précoce, APC tardive
Contexte inflammatoire	Non. Pas d'anomalies en tissu sain	Oui. Anomalies moléculaires retrouvées en muqueuse inflammatoire

Tableau 2 : Comparaison des caractéristiques morphologiques et moléculaires des CCR sporadiques et survenant dans un contexte de MICI

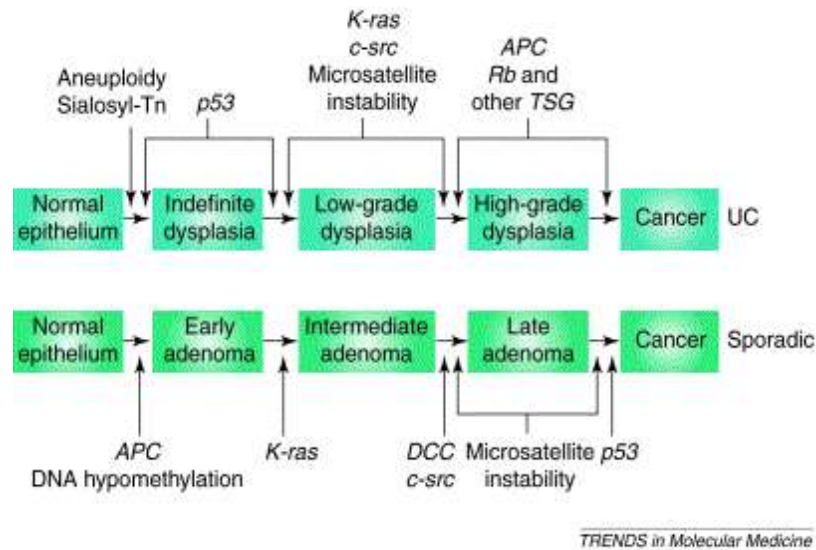


Figure 31 : Séquence d'apparition des anomalies moléculaires dans la carcinogenèse colorectale sporadique et dans la carcinogenèse colorectale associée aux MICI. D'après Rhodes et Campbell, 2002

L'aneuploïdie est fréquente, retrouvée précocément depuis les lésions purement inflammatoires jusqu'au cancer (Lofberg et al, 1987 et 1992 ; Rubin et al, 1992 ; Burmer et al, 1992 ; Lindberg et al, 1999 ; Willenbacher et al, 1999). Les pertes d'hétérozygotie concernent notamment le chromosome 18 avec perte de l'ensemble du chromosome 18 ou le locus 18q (69% des cancers, 43% des dysplasies, 36 % des muqueuses inflammatoires) (Willenbacher et al, 1999 ; Terdiman et al, 2002), le chromosome 17p (LOH *P53* : 71% des cancers, 50% des dysplasies et 25% des muqueuses inflammatoires) (Greenwald et al, 1992 ; Fogt et al, 1998), le chromosome 9 (9p21-LOH *P16* : 37% des cancers, 50% des dysplasies et 40% des muqueuses inflammatoires), le chromosome 3 (3p25-LOH *VHL* dans 50% des dysplasies) (Fogt et al, 1998) et le chromosome 5 (5q21-LOH *APC* : 50% des cancers, 27% des dysplasies) (Fogt et al, 1998 ; Greenwald et al, 1992).

2.3.2.1.1. Les anomalies du gène *P53*

Les anomalies de *P53* sont impliquées plus précocément dans le processus de carcinogenèse associé aux MICI. Les pertes d'hétérozygotie du gène ont d'abord été rapportées dans les lésions de dysplasie avec une fréquence augmentant avec le grade histologique (Burmer GC, 1992). Les mutations inactivatrices du gène, le plus souvent situées dans les exons 8, 5 ou 7, ont ensuite été retrouvées dans les lésions de dysplasie (~ 50%) et cancer (entre 80 et 100%) (Brentnall et al, 1994 ; Harpaz et al, 1994 ; Holzmann et al, 1998), accompagnant (Yin et al, 1993) ou précédant (Brentnall et al, 1994) les pertes d'hétérozygotie. Enfin, ces mutations ont également été observées dans les muqueuses inflammatoires ou régénératives (jusqu'à 40% des cas), dénuées de toutes lésions tumorales chez des patients atteints de RCH (Yin et al, 1993 ; Brentnall et al, 1994 ; Holzmann et al, 1998 ; Hussain et al, 2000). Yoshida et al. ont ainsi montré une surexpression croissante de p53 avec la sévérité des lésions néoplasiques associées à la RCH (Yoshida et al, 2006).

2.3.2.1.2. Les mutations du gène *KRAS*

Les résultats concernant les mutations du gène *KRAS* sont variables, dépendants du nombre de patients étudiés (généralement de petites séries de quelques dizaines de patients) et de la technique utilisée, les techniques de séquençage étant moins sensibles (Burmer et al, 1990 ; Kern et al, 1994 ; Fogt et al, 1998 ; Holzmann et al, 1998 ; Lyda et al, 2000). Globalement, 3-44% des lésions de dysplasie tout grade confondu et 22-50% des cancers sur MICI sont mutés. Cependant, des techniques très sensibles comme la PCR spécifique d'allèle (Chaubert et al, 1994 ; Kern et al, 1994) permettent de détecter une petite sous-population de cellules mutées, notamment en muqueuse inflammatoire ou régénérative (14% à 29%) (Chaubert et al, 1994 ; Andersen et al, 1999). Globalement, la prévalence des mutations activatrices de *KRAS* est similaire à celle retrouvée dans la carcinogenèse sporadique, mais elles surviennent plus précocément, dès le stade inflammatoire.

2.3.2.1.3. Les anomalies du gène *APC*

L'implication du gène *APC* et les relations entre *APC* et β caténine dans la carcinogenèse associée aux MICI semblent être différentes de celles décrites dans la carcinogenèse sporadique. En effet, les pertes d'hétérozygotie en 5q comme les mutations inactivatrices du gène *APC* dans la région MCR (située entre les codons 686 et 1693) sont rapportées plus tardivement et moins fréquemment. Les mutations ne sont retrouvées que dans 14% des lésions de dysplasie de bas grade, 50% des lésions de dysplasie de haut grade et 14% des cancers associés à la RCH (Tarmin et al, 1995 ; Aust et al, 2002 ; Redston et al, 1995) (mais l'étude de l'ensemble des exons n'a jamais été rapportée, et la méthode d'étude utilisée – l'analyse des protéines synthétisées *in vitro* à partir des séquences codantes amplifiées de la région MCR - ne mets en évidence que les mutations stop et non les substitutions). Par ailleurs, les mutations du gène *CTNNB1* codant pour la β caténine ne sont pas retrouvées (Aust et al, 2002). La même équipe a montré d'autre part par méthode immunohistochimique sur coupes déparaffinées que l'expression cytoplasmique et/ou nucléaire de la β caténine est beaucoup moins fréquente dans les cancers associés à la RCH que dans les cancers sporadiques : dans une série de 33 cancers associés à la RCH, 22% ne présentaient aucun marquage cytoplasmique et 48% d'entre eux présentaient un marquage nucléaire, visible uniquement dans 4% des noyaux. Comparativement, parmi les 42 cancers sporadiques testés avec le même anticorps, 76% présentaient un marquage cytoplasmique et 81% présentaient un marquage nucléaire, visible dans 10% des noyaux (Aust et al, 2001). Cette étude confirme la difficulté d'interprétation de l'immunomarquage nucléaire de la β caténine.

2.3.2.2. La voie d'instabilité microsatellitaire

Cette voie d'instabilité microsatellitaire semble également participer au développement du cancer colorectal associé aux MICI, même si les résultats des études de phénotype MSI, réalisées le plus souvent chez des patients atteints de RCH, plus rarement de maladie de Crohn, sont très variables et parfois même

discordants. Le phénotype MSI-H a ainsi été rapporté au niveau de la muqueuse régénérative ou inflammatoire dans 18 à 50% des cas (Brentnall et al, 1996b ; Heinen et al, 1997 ; Ishitsuka et al, 2001), dans 0 à 67% des lésions de dysplasie (Suzuki et al, 1994 ; Brentnall et al, 1996b) et dans une proportion de cancers, allant de 0% à 67% selon les études (Suzuki et al, 1994 ; Brentnall et al, 1996b; Willenbacher et al, 1999 ; Noffsinger et al, 2000 ; Lyda et al, 2000 ; Aust et al, 2005 ; Schulmann et al, 2005 ; Tahara et al, 2005). De plus, des études transversales réalisées rétrospectivement chez les mêmes patients retrouvent cette instabilité microsatellitaire depuis la muqueuse inflammatoire jusqu'au cancer développé plus de 10 ans après les premières biopsies analysées. La grande variabilité des résultats rapportés peut s'expliquer en partie par l'hétérogénéité et le nombre des marqueurs utilisés (jusqu'à 12) et des critères d'instabilité appliqués : de 2 marqueurs ou plus avec instabilité microsatellitaire définissant le haut niveau d'instabilité (MSI-H), certains auteurs sont passés à 3 ou 4 marqueurs (Willenbacher et al, 1999 ; Umetani et al, 1999). Comme dans les CCR sporadiques MSI, ce phénotype instable est dû à une hyperméthylation du promoteur du gène *hMLH1* (Fleisher et al, 2000 ; Aust et al, 2005 ; Schulmann et al, 2005).

De nombreuses données associées à cette voie d'instabilité microsatellitaire restent néanmoins à étudier dans un contexte de MICI. D'une part, les aspects cliniques et morphologiques des lésions tumorales MSI sont inexistantes au début des années 2000 et l'implication du gène *BRAF* dans la carcinogenèse associée aux MICI est vraisemblable, mais reste à approfondir puisqu'une seule étude décrit l'existence de la mutation V600E dans une série de cancers développés sur RCH (Aust et al, 2005). D'autre part, aucune description de polype festonné n'a été rapportée dans la littérature jusqu'à ce jour, seuls des aspects régénératifs hyperplasiques et hypercriniques ressemblant au polype hyperplasique.

2.3.2.3. Implication du processus chronique inflammation / régénération dans l'apparition des anomalies moléculaires au cours de la carcinogenèse

A la différence de la carcinogenèse colorectale sporadique, dans la carcinogenèse associée aux MICI, plusieurs anomalies génétiques apparaissent très

tôt, avant le développement de lésions définies histologiquement comme dysplasiques, vraisemblablement en raison du contexte inflammatoire chronique. Des preuves indirectes de l'implication des phénomènes inflammatoires chroniques dans ce processus de carcinogenèse viennent des modèles animaux de carcinogenèse colorectale développée dans un contexte de colite inflammatoire « chronique » au TNBS (Santiago et al, 2007). Yoshida et al. ont d'ailleurs montré que l'exposition *in vitro* de cellules épithéliales issues d'une lignée de cancer du rectum associé à la RCH [établie par Yamashita et al. (Yamashita et al, 2004)] à de fortes concentrations d'acide butyrique, connue pour être libérée en grande quantité par la flore commensale des patients atteints de RCH (Linskens et al, 2001), induit d'importants dommages au niveau de l'ADN des cellules épithéliales, attestés par la surexpression des ARN codant pour la protéine p53R2, sous-unité régulatrice de la ribonucléotide réductase, qui a un rôle de catalyseur dans le processus de réparation de l'ADN (Yoshida et al, 2006).

2.3.3. Les marqueurs utilisés en pratique courante comme aide au diagnostique des lésions de dysplasie dans les MICI

Le diagnostic et le grading des lésions de dysplasie – seul marqueur prédictif d'évolution vers le cancer retenu actuellement - sur les seules données morphologiques étant très difficile pour le pathologiste, différents marqueurs d'aide ont été proposés, corrélés à l'analyse morphologique. Ces propositions reposent en grande partie sur la mise en évidence par immunohistochimie à partir de coupes paraffinées des anomalies moléculaires décrites au cours de la séquence inflammation / régénération / dysplasie / cancer.

La plupart des mutations inactivatrices de *P53* entraînent une stabilisation de la protéine qui devient alors détectable par une technique immunohistochimique réalisée sur coupes déparaffinées (Baas et al, 1994). Cette technique est actuellement exploitée en pratique comme marqueur pour aider à différencier les lésions inflammatoires / régénératives des lésions réellement dysplasiques, en fonction de l'intensité du marquage et de la localisation des cellules épithéliales marquées le long de la crypte (Taylor et al, 1993 ; Krishna et al, 1995 ; Wong et al, 2000). Cependant, Yoshida et al. ont bien montré à partir de coupes paraffinées,

sériées, intéressant des muqueuses inflammatoires, régénératives, et des lésions de dysplasie et de cancer, après microdissection de cryptes coliques, que la concordance entre surexpression de la protéine, analysée par immunohistochimie, et mutation du gène étudiée par séquençage de l'ensemble des régions codantes (exons 2 à 11) n'était pas parfaite (Yoshida et al, 2004) . En effet, 15% des muqueuses régénératives et 19% des lésions de dysplasie de bas grade présentaient une surexpression de la protéine sans mutation détectée, alors que 31% des muqueuses régénératives, 19% des lésions de dysplasie de bas grade et 20% des lésions de dysplasie de haut grade présentaient une mutation du gène sans surexpression de la protéine. De plus, toutes les cryptes en dysplasie de bas grade ne présentaient pas de mutation *P53* (seules 38% étaient mutées). Par conséquent, l'hyperexpression de la protéine n'est pas toujours corrélée à l'existence d'une mutation et l'existence d'une mutation n'est pas parfaitement corrélée au grade lésionnel. Il est intéressant de noter dans cette étude que les cas présentant une surexpression de p53 sans mutation du gène étaient associés à une surexpression de P16^{INK4A}, inhibant la progression G1-S du cycle cellulaire et BAX, protéine pro-apoptotique, suggérant l'induction p53-dépendant d'un processus de réparation de l'ADN ou de mort cellulaire programmée le cas échéant.

Par ailleurs, certains auteurs ont tenté d'utiliser l'expression immunohistochimique du couple p53/ β caténine pour différencier les adénomes sporadiques des DALM de type « adenoma-like » étant donné la prise en charge thérapeutique très différente de ces 2 types lésionnels (Walsh et al, 1999) : une expression forte et diffuse de p53 associée à l'absence d'expression de β caténine étant en faveur d'une DALM. Néanmoins, la faible sensibilité de chacun de ces marqueurs rend la valeur de ce test limitée pour un screening initial. Cette étude est la seule à avoir étudié le statut de la β caténine dans les lésions prénéoplasiques, retrouvant en l'occurrence un immunomarquage nucléaire +/- cytoplasmique faible, dans seulement 8% des DALM contre 40% des adénomes sporadiques, et confirme la difficulté d'interprétation de cet immunomarquage rencontrée dans l'étude de Aust et al. dans les cancers associés à la RCH.

2.3.4. La validation de marqueurs d'intérêt nécessite l'utilisation de bio-collection.

Une collection biologique est définie comme la réunion, à des fins scientifiques, de prélèvements biologiques effectués sur un groupe de personnes, sélectionnées en fonction de caractéristiques cliniques ou biologiques, cette réunion étant soumise à déclaration (Loi du 6/01/1978). Les échantillons biologiques sont obtenus dans le cadre de la prise en charge thérapeutique du malade ou dans le cadre d'une recherche clinique. Au cœur de l'accès à l'échantillon se situe donc le consentement du malade, obtenu par le médecin après information éclairée. Les lois relatives au droit des malades, à la bioéthique et à la politique de santé publique encadrent désormais les activités de collecte, de conservation et de cession des échantillons biologiques d'origine humaine (Loi n° 2004-800 relative à la bioéthique, Loi n° 2004-801 relative à la protection des personnes, Loi n° 2004-806 relative à la politique de santé publique, et décret n° 2007-1220 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain).

L'utilisation de ces bio-collections est indispensable pour identifier et valider à grande échelle des cibles thérapeutiques, des outils diagnostiques, de nouveaux biomarqueurs, pour étudier des variations phénotypiques, génétiques ou épidémiologiques, pour caractériser de nouvelles entités pathologiques fondée sur des critères moléculaires. Plus particulièrement, la structuration actuelle à l'échelon national de collections tumorales thématiques, ou tumorothèques, donne une opportunité à la recherche fondamentale et à la recherche clinique d'avancer de façon concomitante dans le domaine de la cancérologie. Néanmoins, la qualité et la pertinence des données obtenues reposent non seulement sur celles des prélèvements biologiques mais aussi sur celles des données cliniques et anatomo-pathologiques associées.

Plusieurs types de collections peuvent être constitués : des banques d'ADN ou d'ARN, des liquides biologiques (plasma, sérum, LCR, urine...), des cultures primaires de cellules normales ou cancéreuses et de lignées, la cryopréservation de culture ou de lignées nécessitant un conditionnement dans un milieu particulier

contenant du glycérol ou du DMSO. Ces prélèvements sont cryopréservés à -80°C, ou au mieux, dans de l'azote liquide à -196°C permettant l'arrêt de toute activité enzymatique protéasique endonucléasique. Elles permettent d'effectuer des études de génomique, de protéomique et même de pharmacogénomique.

Un autre type de collection biologique est exploitable, à partir de tissus fixés et paraffinés. Ces prélèvements constituent un outil précieux notamment pour la réalisation d'études rétrospectives. L'avantage de ce type de prélèvements est la possibilité de confronter in situ les données purement morphologiques aux données phénotypiques par des techniques immunohistochimiques, mais aussi génotypiques grâce à l'hybridation in situ. De plus, même après des années de stockage, l'ADN génomique reste conservé, extractible et exploitable pour certaines études de biologie moléculaire (seules les amplifications par PCR de fragments d'ADN 90 à 390 paires de bases sont possibles en raison de la fragmentation de l'ADN engendrée par le formaldéhyde), mais aussi des études d'expression de protéines par des techniques d'immunohistochimie réalisées au mieux sur puces tissulaires.

2.3.5. Problème : quelle valeur prédictive faut-il donner aux anomalies moléculaires détectées précocément ?

La plupart des anomalies génétiques rapportées au cours de la séquence inflammation – dysplasie – cancer sont retrouvées très précocément dès le stade inflammatoire / régénératif posant le problème de leur signification : s'agit-il d'anomalies non encore fixées, engendrées par le turn-over cellulaire accru dans ce contexte de régénération épithéliale répétée ? ou de véritables lésions préneoplasiques, très précoces sur le plan génétique, n'ayant pas encore de traduction morphologique ? La signification biologique de ces anomalies génétiques ne pourra être apportée qu'au cours de larges études prospectives de surveillance endoscopique. Seules des études de ce genre permettront de mettre en évidence la valeur prédictive de tel ou tel marqueur génétique, suffisamment sensible, spécifique, robuste et de détection aisée en pratique courante. Cependant, étant donné la faible incidence des cancers survenant dans un contexte de MICI comparativement aux cancers sporadiques, il est difficile de réunir suffisamment de cas pour tester et

valider ce ou ces marqueurs d'intérêt sans études multicentriques menées à long terme.

Seules quelques études prospectives ont été rapportées dans la littérature analysant surtout la valeur prédictive de l'aneuploïdie. Ces études montrent que cette anomalie génétique, détectée par cytométrie en flux à partir de prélèvements biopsiques étagés chez des patients suivis pour une RCH ou une maladie de Crohn pendant au maximum une dizaine d'années, à tendance à s'étendre topographiquement avec le temps, précède le plus souvent de plusieurs années le développement des lésions de dysplasie, mais peut aussi être synchrone ou même postérieure à ces lésions chez un certain nombre de patients (Lofberg et al, 1991 et 1992 ; Rubin et al, 1992 ; Befrits et al, 1994). De plus Lofberg et al. décrivent l'apparition de cancers, *de novo*, sans mise en évidence préalable de lésions de dysplasie ou d'aneuploïdie (Lofberg et al, 1992). Ces différentes études montrent donc que ce marqueur, utilisé seul, n'est pas suffisamment fiable comme facteur prédictif du risque de cancer (Lindberg et al, 1999).

Très récemment, Moriyama et al. ont suivi l'évolution d'une série de 39 patients atteints de RCH en fonction du statut méthylé ou non de la protéine p14^{ARF}, dont le rôle physiologique est de stopper le cycle cellulaire en phase G1 et G2, analysé à partir de biopsies prélevées au cours de coloscopies régulièrement espacées. Ils montrent que l'incidence cumulée des lésions de dysplasie est significativement plus importante dans le groupe des patients présentant une p14 méthylée que dans le groupe des patients présentant une p14 normale sur une période de surveillance coloscopique de 42 mois (Moriyama et al, 2007). Néanmoins, étant donné la taille de l'échantillon étudié, ces résultats demandent à être confirmés sur une cohorte plus large de patients atteints de RCH, mais aussi de maladie de Crohn.

2.4. Implication d'une hormone et de son récepteur dans la séquence inflammation / régénération / dysplasie / cancer associée aux MICI

Une des principales caractéristiques des MICI est la succession des épisodes de destruction épithéliale liés aux poussées inflammatoires aiguës et des phases de régénération de cet épithélium. Or, de nombreux modèles expérimentaux murins de colite induite par le DSS ou le TNBS ont bien montré que cette succession de destruction épithéliale suivie de régénération favorisait le développement du cancer (Okayasu et al, 2002 ; Santiago et al, 2007). Le contrôle de la régénération épithéliale, processus adaptatif, doit donc être finement régulé pour éviter l'initiation du processus de carcinogénèse.

2.4.1. Les principaux acteurs de la régénération épithéliale intestinale

La régénération épithéliale est influencée et régulée par de nombreux facteurs, notamment des facteurs de croissance et les hormones du tractus gastro-intestinal, qui par l'intermédiaire de leur récepteur jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Il s'agit principalement de récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase ou de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G.

Les facteurs de croissance sont des peptides endogènes solubles qui exercent leurs effets en se fixant à des récepteurs cellulaires spécifiques. Ils régulent notamment l'homéostasie et la régénération de la barrière épithéliale. Historiquement, l'EGF (epithelial growth factor) a été le facteur de croissance le plus étudié pour son rôle dans les processus de ré-épithélialisation. En effet, Goodlad et al. ont montré que l'administration intra-veineuse d'EGF recombinant à des rats était responsable d'une augmentation de la prolifération cellulaire au niveau notamment de l'épithélium colique (Goodlad et al, 1987). Plus tard, l'importance de l'EGF dans les phénomènes de réparation épithéliale chez l'homme a été mise en évidence par Wright et al. Ils ont remarqué qu'une ulcération de l'épithélium intestinal, quelque soit sa localisation, induisait, au niveau des berges de cette ulcération, l'émergence de cellules épithéliales à la base des cryptes qui produisaient et sécrétaient de l'EGF

(Wright et al, 1990). L'EGF-R, récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase, a été par la suite localisé au pôle basolatéral de l'entérocyte au niveau de la crypte intestinale (Playford et al, 1996).

Récemment, le GLP 2 (Glucagon-like peptide 2) a fait l'objet d'études sur son implication comme facteur trophique pour la muqueuse intestinale (Drucker et al, 2000). En effet, l'administration de ce peptide à des rats entraîne l'augmentation de la prolifération cellulaire épithéliale au niveau des cryptes intestinales (Drucker et al, 1996). De plus, des injections sous-cutanées de GLP 2 réduisent la sévérité des lésions de colite induites au DSS chez la souris (poids et longueur du colon plus grands, diminution des territoires de destruction muqueuse, longueur des cryptes plus grande) via notamment une augmentation du nombre de cellules en cycle au niveau des cryptes (Drucker et al, 1999). Ce peptide, sécrété par les cellules entérochromaffines (cellules L) de l'iléon et du colon agit en se liant à un récepteur transmembranaire lié à une protéine G, exprimé également par ces mêmes cellules épithéliales, suggérant un mode d'action autocrine et paracrine.

2.4.2. La neurotensine : un bon candidat pour la régénération épithéliale ?

2.4.2.1. Structure et biosynthèse de la neurotensine

La neurotensine (NT), a été isolée et purifiée pour la première fois à partir d'extraits d'hypothalami bovins par Carraway et Leeman en 1973 sur la base de sa capacité à induire une hypotension chez le rat (Carraway et Leeman, 1973), et quelques années plus tard à partir d'extraits intestinaux de différentes espèces, notamment chez l'homme (Hammer et al, 1980). Elle doit son nom à sa localisation neuronale et à ses propriétés hypotensives.

La séquence primaire de la neurotensine a été identifiée en 1975 (Carraway et Leeman, 1975) (**Figure 32**). Le clonage et le séquençage de l'ADN complémentaire codant pour le précurseur de ce tridécapéptide à partir de muqueuses intestinales de chien a révélé la présence de la NT mais aussi d'un hexapeptide, la Neuromédine N (NN) (Dobner et al, 1987). La séquence protéique de ce précurseur prédite à partir de l'ADNc d'hypothalamus bovin et d'intestin de chien varie seulement de 9 sur 170

acides aminés, suggérant une forte homologie inter-espèces. En particulier, la région C-terminale qui comprend NT et NN est homologue à 100% quelque soit l'espèce. Le gène codant pour ce précurseur a été cloné chez le rat. Il a une taille de 10,2 kilobases (Kb) et comprend 4 exons et 3 introns (Kislauskis et al, 1988). Le domaine codant pour la NT et la NN se situe dans l'exon 4. On distingue pour ce gène 2 transcrits de 1 et 1,5Kb, dûs à des sites de polyadénylation différents, retrouvés dans le cerveau et l'intestin. Dans l'intestin, la forme de 1 Kb est majoritaire (Kislauskis et al, 1988). La traduction de ces ARNm conduit à la synthèse d'un précurseur protéique de 170 acides aminés contenant dans sa partie C-terminale une copie de NT et de NN (Bean et al, 1992). La maturation de ce précurseur au niveau de doublets d'acides aminés Lys-Arg basiques par des pro-hormones convertases (PC) permet l'obtention des peptides NT et NN mais aussi de formes plus longues appelées large-NN et large-NT avec des profils de maturation différents selon les tissus (Carraway et al, 1991). Il n'existe pas encore de preuves formelles quant à l'éventuelle activité biologique de ces formes longues. Néanmoins, quelques indices font penser qu'elles possèdent une activité hormonale. Elles sont relarguées dans la circulation portale après exposition de l'intestin grêle à l'acide oléique (Carraway et al, 1992). Plus récemment, il a été mis en évidence à partir d'une étude sur la lignée d'adénocarcinome colique humain HT29 exprimant NST1, une liaison des protéines recombinantes des formes longues de la NT et la NN au récepteur NTS1, suivi de son activation. D'autre part, ces mêmes auteurs ont montré que ces formes longues avaient une durée de vie plus longue que leur contrepartie, détectables jusqu'à 24h dans le milieu de culture cellulaire, contre 5h pour la NT (Friry et al, 2002).

La NT est rapidement dégradée par un ensemble de peptidases cytosoliques et membranaires (Checler et al, 1986). L'activité biologique de la NT réside dans la partie C-terminale du peptide et le fragment 8-13 présente une activité pharmacologique plus puissante que le peptide naïf (Kanba, 1988), par conséquent, le clivage primaire de la NT conduit toujours à son inactivation biologique puisque les sites de clivage primaires, Pro7-Arg8, Arg8-Arg9 et Pro10-Tyr11, sont situés dans cette partie active. Cette dégradation rapide de la NT limite certaines études des processus biologiques associés à la NT. Pour palier à ce problème, de nombreux analogues plus stables ont été synthétisés incluant des peptides linéaires ou

cycliques ou des agonistes non peptidiques (Garcia-Garayoa et al, 2001 ; Achilefu et al, 2003 ; Kokko et al, 2003).

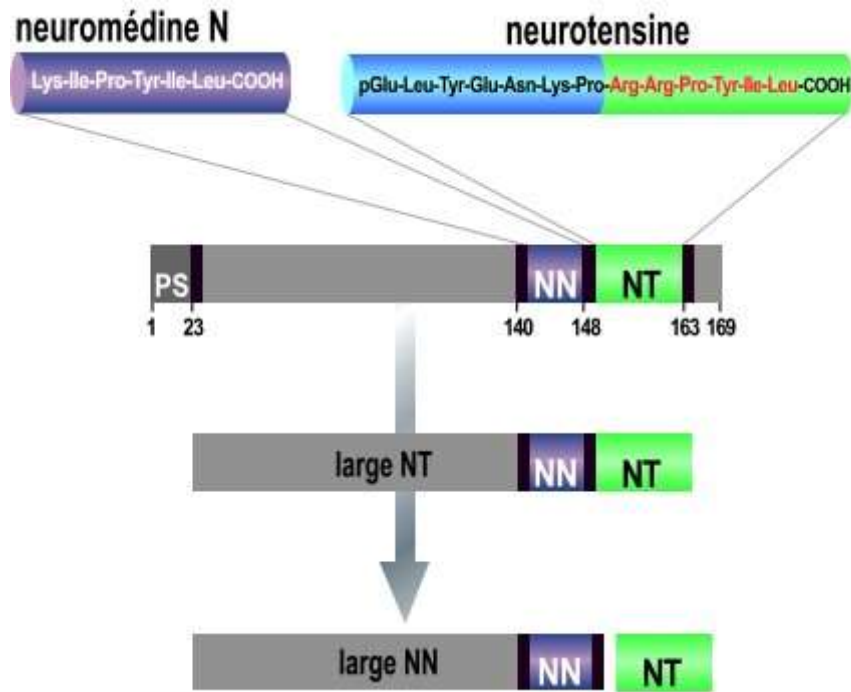


Figure 32 : Représentation schématique du précurseur de la neurotensine et des peptides libérés après maturation différentielle par les pro-hormones convertases chez le rat. NT : neurotensine ; NN : neuromédine ; PS : peptide signal.

2.4.2.2. Localisation de la neurotensine

Des techniques de radio-immunologie ont permis d'étudier la distribution de la NT d'abord chez le rat puis chez l'homme (Reinecke, 1985).

Elle est largement distribuée dans le système nerveux central au niveau des corps cellulaires et/ou des terminaisons nerveuses des neurones et n'est jamais retrouvée dans les cellules gliales.

En périphérie, la majorité de la NT (90%) est retrouvée au niveau du tractus gastro-intestinal (jéjunum et iléon), plus particulièrement dans les cellules épithéliales entérochromaffines (cellules N). Les cellules N libèrent la NT localement mais aussi dans la circulation sanguine. Par ailleurs, la NT est retrouvée dans les plexus nerveux myentériques et sous-muqueux de l'estomac, de l'intestin grêle et du colon mais également dans les fibres innervant les vaisseaux sanguins, dans le cœur, et

dans les cellules chromaffines de la médullosurrénale. Ainsi, les effets de la NT sur le tractus gastro-intestinal peuvent être médiés par un mécanisme hormonal, via la libération de NT par les cellules N dans la circulation sanguine systémique, mais aussi par des mécanismes paracrines ou autocrines impliquant la libération locale de NT par les cellules N et les fibres nerveuses.

La NT est retrouvée à des taux variables le long de l'intestin. Sa concentration est importante dans l'iléon, modérée dans le jéjunum et le duodénum et nulle dans le colon (Rosell et Rokaeus, 1981). Elle est néanmoins retrouvée chez l'homme dans le colon fœtal puis elle disparaît à l'âge adulte (Evers et al, 1993). Elle réapparaît dans des lignées de cancer colique humain (HT29, HCT116, LoVo) comme le témoin d'une résurgence onco-foetale (Evers et al, 1992).

2.4.2.3. Principaux effets biologiques périphériques de la neurotensine

Les principaux effets induits par la neurotensine en périphérie, outre ses effets vasodilatateurs qui ont permis sa découverte en 1973, sont résumés dans la **figure 33**.

Au niveau digestif, les taux de NT plasmatique augmentent après la prise alimentaire et notamment après l'ingestion de lipides (Ferris et al, 1981). Il s'ensuit une diminution des sécrétions acides gastriques, une augmentation de la glycémie et des sécrétions exocrines du pancréas (Baca et al, 1982) et une augmentation de la sécrétion de chlore au niveau de la muqueuse colique (Prasad et al, 2004). Elle agit également sur la musculature lisse du tractus gastro-intestinal, en induisant soit la contraction, soit la relaxation en fonction de l'innervation de chaque muscle lisse. Elle ralentit la vidange de l'estomac (Kihl et al, 1981) et elle augmente la compliance rectocolique (van der veek et al, 2004).

A coté de ces effets sur le système digestif, l'administration intraveineuse de NT entraîne des effets cardiovasculaires complexes et variables selon les espèces étudiées. L'hypotension, décrite chez le rat et le chien après injection IV de NT, n'est pas observée chez l'homme (Carraway et Leeman, 1973). D'autres études réalisées chez le chien ont montré que de faibles concentrations de NT provoquaient une

vasoconstriction dans le tissu adipeux et le tractus gastro-intestinal (Rosell et Rokaeus, 1981).

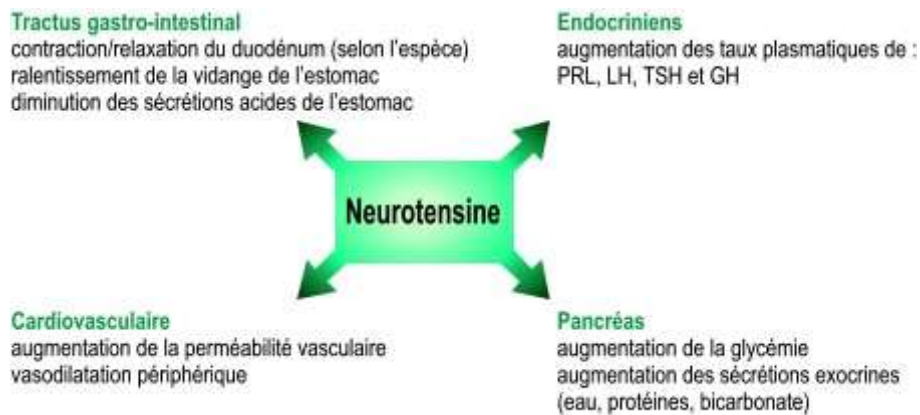


Figure 33 : Effets pharmacologiques induits par la neurotensine au niveau des organes périphériques. PRL : prolactine ; LH, hormone lutéinisante ; TSH : thyroïdostimuline ; GH : hormone de croissance.

2.4.2.4. Preuves d'un effet trophique sur la muqueuse intestinale

Plus récemment, de nombreuses expériences réalisées *in vivo* chez l'animal ont montré un effet trophique de la NT sur la muqueuse intestinale. Evers et al. ont montré que l'administration sous-cutanée de NT pendant 10 jours à des rats nourris normalement était responsable d'une augmentation de poids de la muqueuse colique (Evers et al, 1992a), liée d'une part à une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales de la muqueuse colique chez le rat jeune (âgé de 2 mois), et d'autre part à une hypertrophie de ces mêmes cellules chez le rat âgé (24 mois). La même équipe a montré par ailleurs que des injections sous-cutanées répétées de NT durant 7 jours atténuait l'atrophie de la muqueuse intestinale de rats en restriction calorique (Evers et al, 1992b) ou stimulait, toujours chez des rats, la croissance de la muqueuse de l'intestin grêle résiduelle suite à l'amputation d'environ 80% d'intestin grêle proximal ou distal (Izokura et al, 1992).

2.4.2.5. Les récepteurs de la neurotensine

Les diverses activités biologiques de la NT sont médiées par des récepteurs spécifiques. Trois récepteurs ont été mis en évidence, NTS1 et NTS2 membranaires appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines-G (GPCR), et plus récemment NTS3 ou gp95/sortiline. Notre travail portant uniquement sur NTS1, nous ne détaillerons que les données concernant ce récepteur. La mise au point de ligands radiomarqués par l'iode¹²⁵ (Sadoul et al, 1984) a permis la caractérisation des sites de liaison de la neurotensine. Ainsi, ces expériences de liaison ligand-récepteur sur des homogénats de cerveau de rat ont révélé l'existence de deux sites de liaison pour la NT, un site de haute affinité ($K_d = 0,1-0,3$ nM) et un de moins haute affinité ($K_d = 4-5$ nM) (Mazella et al, 1983). Par la suite, la lévocabastine, un antagoniste des récepteurs H1 de l'histamine, a permis d'inhiber spécifiquement la liaison des analogues de la NT au site de moins haute affinité permettant ainsi la discrimination entre site de haute affinité (insensible à la lévocabastine) et les sites de plus faible affinité (Schotte et al, 1986). D'autres différences existent pour distinguer ces deux sites de liaison comme la forte sensibilité aux ions sodium et au GTP du site de haute affinité par rapport au site de moins haute affinité (Mazella et al, 1987).

Le clonage moléculaire des ADNc codant pour ces 2 récepteurs, NTS1 de haute affinité et NTS2 de faible affinité, et leurs expressions respectives dans des systèmes cellulaires eucaryotes, ont apporté des informations complémentaires sur leurs propriétés de liaison respectives. C'est en 1990 que le premier récepteur a été cloné par expression dans l'ovocyte de xénope à partir d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) de cerveau de rat (rNTS1) (Tanaka et al, 1990). L'homologue humain (hNTS1) a été cloné par expression à partir d'une banque d'ADNc de cellules issues d'un adénocarcinome de côlon humain, les cellules HT29 (Vita et al, 1993a). Ces deux types d'ADNc (3,6 kb pour le rNTS1 et 4 kb pour le hNTS1) présentent 84 % d'homologie et codent pour des protéines de 424 et 418 résidus, respectivement. Les gènes codant pour ces récepteurs de haute affinité sont localisés sur la bande H du chromosome 2 pour la souris et sur le bras long (20q13) du chromosome 20 pour l'homme (Laurent et al, 1994).

Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines-G et de ce fait, présente une structure similaire à sept domaines transmembranaires hydrophobes avec une extrémité amino-terminale extracellulaire et une extrémité carboxy-terminale intracytoplasmique (**Figure 34**).

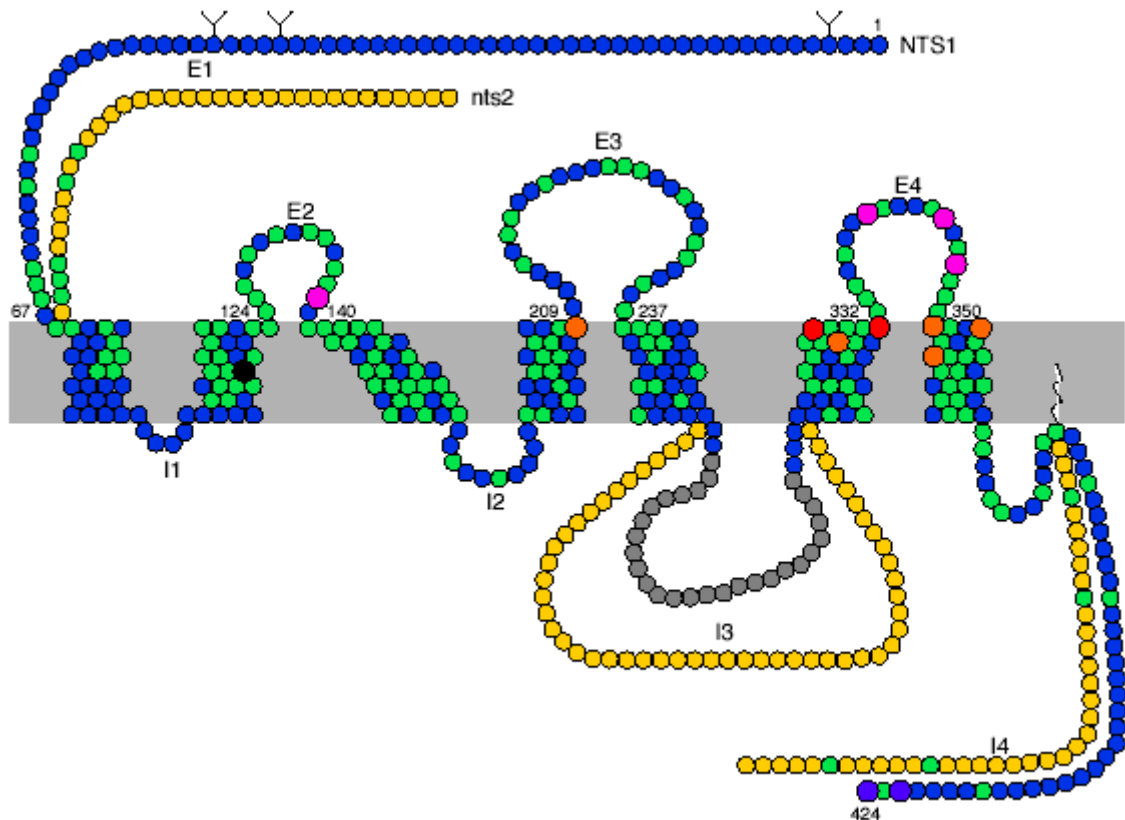


Figure 34 : Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G spécifiques de la neurotensine. NTS1 (bleu) et NTS2 (jaune). D'après Vincent et al, 1999

La distribution des sites de liaison de la NT des mammifères est bien documentée dans le SNC, étudiée notamment par des techniques de liaison de ligand radiomarqué ou par hybridation *in situ* des ARNm. La distribution des récepteurs est moins bien documentée dans les autres organes, en particulier dans le tube digestif. La présence de récepteurs dans ces organes a initialement été établie par leur sensibilité à répondre à ce peptide. L'expression de NTS1, plus spécifiquement au niveau de l'intestin chez l'homme, a pu être étudiée au niveau de son ARNm depuis le clonage du récepteur. Vita et al. retrouvent une faible expression des ARNm dans l'intestin grêle par Northern blot (Vita et al, 1993a) alors

que Maoret et al. ne détectent aucun signal en RT-PCR sur des cellules épithéliales isolées de muqueuse jéjunale et colique (Maoret et al, 1994).

La liaison de la NT au NTS1 entraîne, de manière générale, la stimulation de la phospholipase C (PLC) par l'intermédiaire des protéines-G de type Gq. Ceci conduit à la formation d'inositols phosphates et de diacylglycérol. Ce mode de transduction du signal a été démontré sur un grand nombre de systèmes cellulaires aussi différents que les neuroblastomes de souris N1E-115, les adénocarcinomes humains HT29 ou encore dans les cellules COS et CHO (chinese hamster ovary cells) après transfection de l'ADNc codant pour le NTS1 (Vincent et al, 1999). Ces cascades d'évènements sont inhibées en présence de l'antagoniste non peptidique SR48692. Cette production d'inositols phosphates est suivie par la mobilisation des réserves calciques de la cellule. L'élévation du calcium intracellulaire représente, suivant le type cellulaire, un second message intracellulaire qui peut entraîner l'activation de la guanylate cyclase conduisant ainsi à la formation de GMPc.

2.4.3. Preuves de l'implication du couple NT/NTS1 dans la modulation de l'inflammation intestinale et dans le processus de régénération épithéliale

Les résultats publiés dans la littérature concernant le rôle de la neurotensine dans les processus inflammatoires intestinaux sont variés, parfois contradictoires avec tantôt des effets pro-inflammatoires dans les colites aiguës, tantôt des effets régénératifs dans les colites chroniques, suggérant une modulation des effets en fonction de la nature des dommages tissulaires et du type de réponse inflammatoire engendrée.

Castagliuolo et al. ont montré chez des rats que durant la colite aiguë induite par l'administration *in situ* de la toxine A, une endotoxine libérée par *Clostridium difficile*, la NT, via son récepteur NTS1, dont la surexpression (ARNm et protéine) précède l'apparition des lésions morphologiques, était responsable de la dégranulation mastocytaire et de l'afflux de polynucléaires neutrophiles dans le chorion, à l'origine des dommages tissulaires (Castagliuolo et al, 1999).

La même équipe a montré, à l'inverse, à partir d'un modèle murin de colite chronique induite par le dextran sodium sulfate (DSS), caractérisé par la survenue d'une perte de poids et d'une diarrhée en rapport avec des ulcérations muqueuses, plusieurs résultats suggérant la participation du couple NT/NTS1 dans le processus de régénération épithéliale (Brun et al, 2005). Ils observent une surexpression de NT (ARNm et protéine) pendant la phase inflammatoire mais uniquement après l'établissement des dommages épithéliaux, en même temps qu'une surexpression de NTS1 (protéine et ARN). Ces taux restent élevés au cours du processus de régénération et de réparation épithéliale qui fait suite à l'arrêt du DSS. De plus, l'administration intrapéritonéale d'un antagoniste spécifique de NTS1, SR-48642, concomitamment au DSS 1) aggrave la sévérité clinique et histologique de la colite avec des ulcérations muqueuses plus étendues et 2) inhibe le processus de régénération et de réparation épithéliale qui fait suite à l'arrêt du DSS (persistance de la perte de poids et de la diarrhée, persistance des ulcérations muqueuses). A l'inverse, l'administration continue sous-cutanée de NT, concomitamment au DSS, améliore significativement la colite avec réduction de la perte de poids et diminution du nombre des ulcérations muqueuses. La même équipe retrouve une surexpression de NTS1, au niveau protéique dans les cellules épithéliales de la muqueuse colique inflammatoire par technique immunohistochimique, et au niveau des ARNm détectés par RT-PCR chez des patients atteints de RCH (Brun et al, 2005).

2.4.4. La neurotensine et son récepteur NTS1 : implication dans le processus de carcinogenèse associée au MICI ?

Plusieurs preuves de l'implication de la NT et de son récepteur NTS1 dans le processus de carcinogenèse colorectale ont été décrites dans la littérature. Yoshinaga et al. montrent que la NT stimule *in vitro* la croissance cellulaire de la lignée cancéreuse colique humaine LoVo, et son administration pendant 28 jours à des souris Balb/c inoculées avec des cellules issues de la lignée cancéreuse colique murine MC-26, ou à des souris nude xénogreffées avec des cellules de la lignée LoVo, est responsable d'une augmentation de taille, de poids et de contenu en ADN,

ARN et protéines de la tumeur (Yoshinaga et al, 1992). La NT a donc un effet trophique sur les cellules tumorales de certains cancers coliques.

Par ailleurs, le récepteur NTS1, non exprimé par l'épithélium colique humain normal, est surexprimé dans plusieurs lignées cancéreuses coliques humaines : SW480, HT29, HT29 CI 19A, HT29 CI 16E, HT29 CI 27H, HCT116, SW480, SW620 (Maoret et al, 1994), et est fonctionnel puisque sa stimulation entraîne une exocytose de mucus dans certaines lignées (Bou-Hanna et al, 1994). D'autre part, NTS1 est exprimé par l'épithélium colique fœtal. Cette re-expression pourrait être le fait d'une dérégulation classiquement décrite pour de nombreux gènes dans les cellules tumorales. En effet, certains gènes sont exprimés au stade fœtal puis réprimés à l'âge adulte pour être dérégulés lors du processus de carcinogenèse, comme c'est le cas pour la NT (Evers et al, 1996c). L'expression du NTS1 pourrait donc représenter une modification phénotypique précoce des cellules tumorales dans certains cancers du colon et le maintien de la dérégulation du NTS1 permettrait à la NT d'exercer son effet trophique sur ce type de cancers. D'ailleurs, environ 28% des adénocarcinomes colorectaux chez l'homme surexpriment à la fois le ligand et son récepteur, quelque soit le stade de la tumeur (Evers et al, 1996c). De la même manière, 30% des adénocarcinomes canalaire du sein co-expriment la NT et son récepteur (Souaze et al, 2006a). La ré-expression concomitante de NT et de NTS1 pourrait donc représenter un mécanisme de type onco-fœtal de prolifération cellulaire. Le problème posé est de savoir à quelle étape du processus de carcinogenèse cette expression concomitante apparaît.

Ces résultats suggèrent l'existence d'une boucle de régulation autocrine ou paracrine de prolifération cellulaire, d'autant que l'inhibition du récepteur NTS1 par un antagoniste, SR48692, au niveau des cellules d'une lignée de cancer mammaire humain (MDA-MB-231), xénogreffées à la souris nude, entraîne une diminution significative du volume tumoral (Souaze et al, 2006a). En effet, il a été mis en évidence à partir d'une étude réalisée sur la lignée HT29 que la NT est capable de réguler l'expression de son propre récepteur par des mécanismes moléculaires distincts, dépendants du temps d'exposition et de la dose de NT : 1) une déstabilisation de l'ARNm de NTS1 lors d'un traitement prolongé et 2) une activation de la transcription du gène codant pour NTS1 lors d'une stimulation courte et soutenue (Souaze et al, 1997).

Quels sont les mécanismes responsables de la dérégulation pathologique de *NTS1* dans certains cancers du colon ? L'analyse des séquences du promoteur de *NTS1* a révélé de nombreux éléments de réponse aux facteurs de transcription de la famille Tcf (thymocyte cell factor) et LEF (lymphocyte enhancer factor) (Le et al, 1997) dont l'un des membres, Tcf4, a été retrouvé dans la lignée HT29 (Korinek et al, 1997). Ce facteur peut se lier à la β caténine cytoplasmique libre, en excès, notamment dans les cancers du colon présentant une inactivation du gène *APC*, et former un complexe transactivateur capable de migrer dans le noyau et d'induire la transcription de certains gènes cibles (Korinek et al, 1997 ; Morin et al, 1997) impliqués notamment dans la carcinogenèse (van Es JH, 2003). L'équipe de Forgez a publié plusieurs résultats démontrant *in vitro* que *NTS1* est une cible transcriptionnelle de la voie Wnt/ β caténine et que la restauration du processus physiologique de dégradation de cette protéine induit une diminution d'expression de *NTS1* (Souaze et al, 2006b). Ils ont montré par des expériences de co-transfection de vecteurs d'expression de Tcf4 et β caténine dans les cellules cos-7, que le promoteur du gène *NTS1* était bien sensible au complexe β caténine/Tcf4 avec une activité transcriptionnelle multipliée par 4 à 5. De plus, les facteurs Wnt induisent l'expression des ARNm de *NTS1* dans des cellules épithéliales mammaires normales en culture avec mise en évidence de la β caténine dans les noyaux de ces cellules, supportant l'hypothèse que le gène *NTS1* est une cible transcriptionnelle de la voie Wnt/ β caténine. De plus, cette expression des ARNm de *NTS1* est bien due à une stabilité de la β caténine puisque l'expression du gène *APC* sauvage, dans des cellules HT29 transfectées avec une construction comportant la partie codante d'*APC* contrôlée par un promoteur inducible, entraîne la dégradation de la β caténine cytoplasmique et une diminution d'expression de *NTS1*. Enfin, ce lien entre l'expression de *NTS1* et l'activité transcriptionnelle de la β caténine est confirmé par immunohistochimie sur coupes tissulaires d'adénomes développés chez des patients atteints de polypose adénomateuse colique familiale, maladie héréditaire rare caractérisée par une mutation constitutionnelle du gène *APC*. Cette étude montre dans 6/8 adénomes une corrélation entre l'expression de *NTS1* et la localisation nucléaire et/cytoplasmique de la β caténine. A la lumière de ces résultats, nous avons voulu déterminer 1) si dans un contexte inflammatoire où la muqueuse colique est sujette à des phases successives de destruction et de régénération épithéliale le

couple NTS1/NT ne serait pas particulièrement impliqué dans cette séquence inflammation / régénération / dysplasie / cancer et 2) si cette expression ne serait pas également régulée par la β caténine. Ce travail sera exposé dans la première partie de cette thèse.

3. Mécanismes gouvernant l'homéostasie de la muqueuse intestinale

La muqueuse intestinale représente un écosystème complexe qui, en conditions physiologiques, est dans un état d'homéostasie. A côté de ses fonctions de digestion, de transport de nutriments, d'échange d'eau et d'électrolytes, de synthèse endocrine et paracrine d'hormones, l'épithélium intestinal joue un rôle majeur dans l'établissement d'une barrière entre la lumière intestinale abritant une myriade de micro-organismes commensaux et le milieu intérieur, et notamment les cellules du chorion sous-jacent. Cette barrière est essentielle pour protéger l'hôte contre l'invasion et la dissémination systémique des micro-organismes commensaux et pathogènes, notamment au niveau du colon où la concentration en micro-organismes est la plus importante. Nous allons voir que cet état d'homéostasie de la muqueuse peut-être assimilé à un état de « paix armée ». En effet, cet équilibre résulte d'interactions très complexes entre la flore commensale et les cellules de la muqueuse intestinale, cellules épithéliales et cellules immunitaires du chorion. Il s'agit d'un état d'équilibre précaire puisque toute modification de l'un de ces 3 principaux acteurs peut aboutir à l'induction d'un processus inflammatoire. Les mécanismes très complexes gouvernant cette homéostasie sont encore incomplètement décryptés. Nous allons détailler dans ce chapitre tout d'abord les acteurs impliqués dans cet état d'homéostasie, puis essayer de comprendre les relations complexes qu'ils entretiennent les uns avec les autres pour maintenir cette homéostasie.

3.1. Les principaux acteurs impliqués dans le maintien de l'homéostasie

Les 3 acteurs principaux impliqués dans cette homéostasie intestinale sont les cellules épithéliales, la flore bactérienne commensale et les cellules immunitaires du chorion. Ils constituent un réseau cellulaire intégré « communiquant » par des interactions cellulaires et/ou des effecteurs moléculaires (nutriments, anticorps, chimiokines, cytokines) qui concourent à la protection de l'hôte (**Figures 35 et 36**).

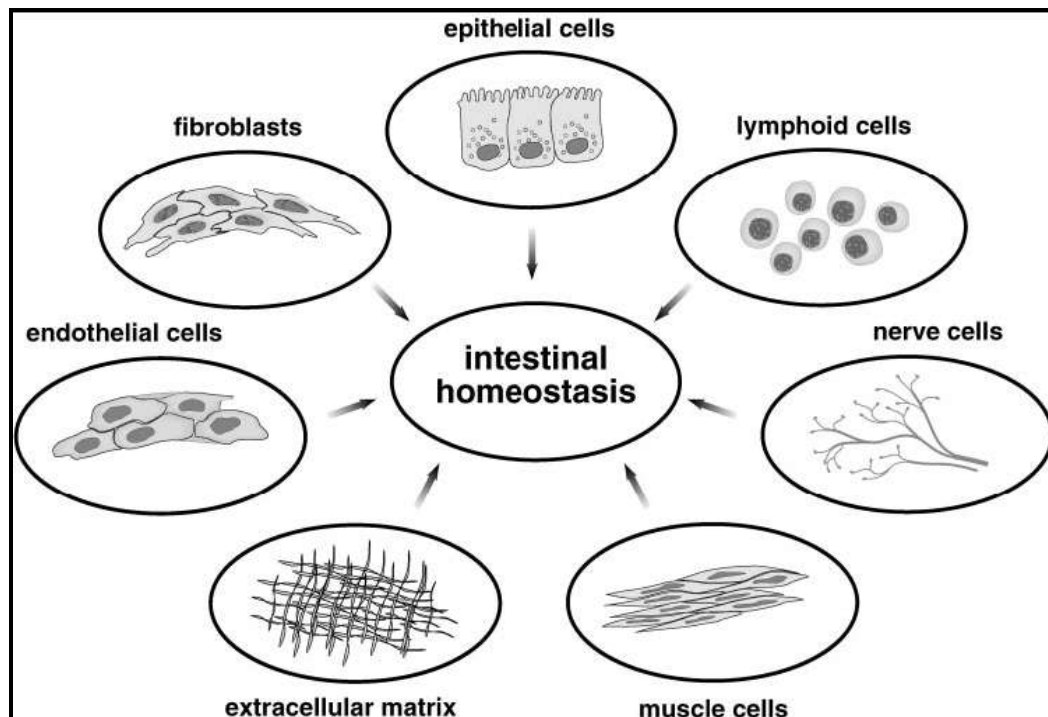


Figure 35 : L'homéostasie intestinale est le résultat d'un ensemble d'interactions finement régulées entre toutes les cellules de la muqueuse intestinale (d'après Fiocchi et al, 1997)

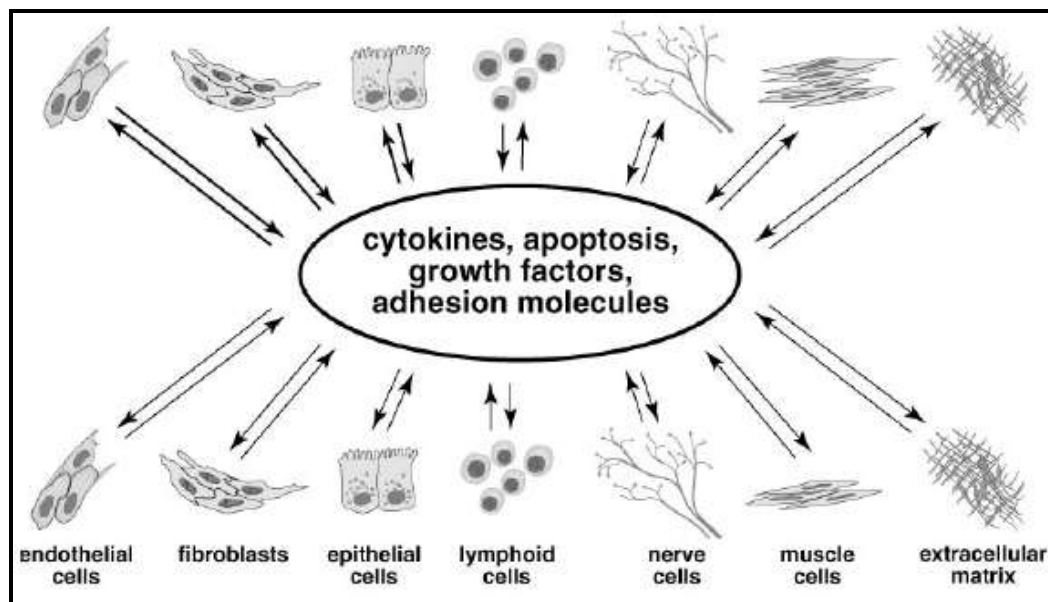


Figure 36 : Interactions multidirectionnelles entre les cellules de la muqueuse intestinale par l'intermédiaire de cytokines et de facteurs de croissance sécrétés, et de molécules d'adhésion de surface (d'après Fiocchi et al, 1997)

3.1.1. L'épithélium intestinal : une barrière physique et fonctionnelle interactive

L'épithélium intestinal représente schématiquement 3 barrières en une (Madara et al, 1990) : une barrière physique, une barrière immunitaire innée et une barrière immunitaire adaptative. Néanmoins, cette barrière n'est pas absolue et des interactions existent entre la flore et les cellules du chorion, les cellules épithéliales jouant le rôle de médiateur principal dans ce dialogue. En effet, la cellule épithéliale, avec la cellule dendritique du chorion, est le principal « interlocuteur » des micro-organismes de la flore intestinale (Kagnoff et Eckmann, 1997). Les mécanismes mis en jeu par cette barrière épithéliale pour contrer l'invasion des micro-organismes dans les tissus sous-jacents et empêcher l'induction d'une réponse inflammatoire sont loin d'être tous décryptés, mais feraient intervenir des moyens de défense à la fois passifs et actifs.

3.1.1.1. Le gel de mucus assure une protection de la barrière intestinale contre les micro-organismes

Nous avons vu dans la première partie de cette synthèse bibliographique que l'épithélium intestinal constitue une barrière physique en perpétuel renouvellement, et relativement étanche à l'invasion de micro-organismes grâce notamment au système de jonctions intercellulaires (jonctions serrées et jonctions adhérentes) (Laukoetter et al, 2006) et à la présence au pôle apical des cellules épithéliales d'un « film » continu de mucus qui participe à cette fonction de barrière par différents mécanismes.

Des études *in vitro* à partir de cellules épithéliales polarisées, issues de la lignée cancéreuse colique humaine, T84, cultivées à confluence sur filtre, montrent qu'après une agression (toxine bactérienne, acides biliaires...), l'ajout de mucines coliques humaines et de peptides en trèfle (trefoil peptides) intestinaux au pôle apical de la monocouche de cellules épithéliales accélère le processus de réparation de la barrière épithéliale (Kindon et al, 1995).

De plus, ce gel de mucus joue un rôle de filtre qui limite la pénétration des molécules et des micro-organismes en fonction de leur taille et de leur charge: cette propriété a été démontrée *in vivo* chez le rat (Szentkuti, 1997). Des nanoparticules de latex chargées positivement sont piégées dans le mucus chargé négativement, tandis que des particules de latex fluorescentes chargées négativement sont capables de diffuser à travers ce gel de mucus. Par ailleurs, le temps nécessaire au passage des nanoparticules s'avère proportionnel à leur diamètre. Ainsi, des particules de 14 nm peuvent atteindre très rapidement, en 2 minutes, l'épithélium alors que la diffusion des molécules plus grosses (415 nm de diamètre) peut prendre jusqu'à 30 minutes, les particules de 1000 nm étant incapables de franchir cette barrière de mucus. Il laisse donc passer des nanosphères de la taille des virus (jusqu'à 451 nm de diamètre) mais piège des microsphères de la taille de bactéries (1.09µm de diamètre).

Le gel de mucus constitue, de manière indirecte, une barrière chimique, participant à la défense immunitaire innée : les IgA, le lysozyme et les peptides antimicrobiens présents dans le mucus contribuent à la protection antibactérienne non spécifique. Enfin, le mucus servirait de véritable barrière contre les micro-organismes pathogènes en facilitant sa propre colonisation par les bactéries du microbiote, beaucoup plus nombreuses. En effet, il semble que les micro-organismes issues du microbiote et les micro-organismes pathogènes puissent adhérer à certains épitopes spécifiques au niveau des chaînes glycaniques des mucines (Wadolkowsky et al, 1988 ; Matsumura et al, 1999 ; Sudha et al, 2001 ; Kinoshita et al, 2007). Par un effet de compétition, le gel de mucus jouerait un rôle important dans la protection de la muqueuse intestinale envers les micro-organismes pathogènes, non pas d'un point de vue qualitatif, puisque ces interactions ne sont pas spécifiques du microbiote, mais d'un point de vue quantitatif. En effet, le mucus est colonisé en permanence par les micro-organismes du microbiote qui s'y multiplient, saturant ainsi les sites de fixation pour des éventuels micro-organismes pathogènes. Non fixés, ceux-ci sont éliminés plus rapidement par le transit intestinal. De plus, ce piégeage des micro-organismes par les mucines les empêchent d'atteindre la cellule épithéliale. Des travaux réalisés *in vitro* montrent que l'ajout de mucines au pôle apical de cellules épithéliales issues de la lignée de cancer du colon humain bien

différencié, Caco 2, en culture, prévient la translocation de bactéries inoculées à ce même pôle apical (Gork et al, 1999). D'ailleurs, l'analyse morphologique sur coupes tissulaires congelées ou paraffinées du mucus recouvrant la muqueuse colique humaine montre que les bactéries sont retrouvées essentiellement dans la couche supérieure du mucus, très peu dans la couche inférieure au contact des cellules épithéliales (Matsuo et al, 1997).

3.1.1.2. L'épithélium intestinal : une barrière immunitaire innée

L'épithélium intestinal est également capable de déployer des moyens de défense active par la synthèse de peptides dits « en trèfle » (trefoil peptide ; petites protéines résistantes aux protéases qui protègent contre certaines toxines bactériennes) et d'agents antimicrobiens incluant le lysozyme, les défensines, les cathélicidines, le BIP (bactericidal/permeability-increasing protein) entre autres (Dann et Eckmann, 2007) (**Tableau 3**). Leur synthèse et sécrétion sont soit constitutives, soit inducibles par certains micro-organismes ou leurs produits (LPS), ou certaines cytokines comme le TNF ou l'IL1 β (Wehkamp et al, 2007).

Les défensines sont des petits peptides antimicrobiens de nature cationique, non glycosylés, et amphiphiles, de 12 à 50 acides aminés, caractérisés par 3 ponts disulfures, qui exercent, *in vitro*, des propriétés essentiellement antibactériennes, mais aussi antifongiques et antivirales pour certaines (White et al, 1995). Leur rôle *in vivo* est beaucoup moins connu. Elles sont représentées par les α défensines, dont 2 [Human Defensin (HD)- 5 et HD6] sont produites principalement par les cellules de Paneth du fond de la crypte de l'intestin grêle (Ouellette et Bevins, 2001), et les β défensines, produites par un grand nombre de cellules épithéliales, dont les cellules entérocytaires de l'intestin grêle et du colon. hBD-1 (human β defensin-1) est produite constitutivement (Zhao et al, 1996) tandis que hBD-2 à 4 sont produites et sécrétées dans la lumière intestinale après induction par le LPS ou la flagelline (O'Neil et al, 1999 ; Fahlgren et al, 2004). Leur caractéristique amphiphile leur permettrait de lyser la membrane des micro-organismes (White et al, 1995) permettant ainsi de réguler la densité et la constitution de la flore microbienne dans la lumière intestinale (Wehkamp et al, 2005).

Les cathélicidines, autres peptides antimicrobiens faisant partie d'une famille de protéines précurseurs (Dann et al, 2007), sont également de petits peptides cationiques dont la synthèse épithéliale intestinale peut être induite notamment par le butyrate (Schauber et al, 2003). Chez l'homme, une seule cathélicidine a été mise en évidence. Sa maturation protéolytique donne naissance à un peptide antimicrobien mature, LL-37 (ou CAP18), constitué de 37 acides aminés, codé par le gène *CAMP* (*cathelin antimicrobial peptide*) (Cowland et al, 1995)

Plus récemment, l'équipe de Colgan a montré l'expression au niveau ARNm et protéique d'un autre peptide antimicrobien, le BPI (Bactericidal/Permeability-Increasing protein), par différentes lignées cancéreuses coliques humaines comme Caco-2, T84 ou SW480. Les auteurs observent de plus une co-localisation intracytoplasmique dans des structures endosomales de la protéine avec le TLR4, après exposition des cellules au LPS, (Canny et al, 2006) pouvant intervenir dans le processus de « détoxification » du LPS.

Molecule	Defensive role
Secretory mucins	Mucus gel formation; physical barrier; molecular sieve; reduces shear stress; blocks chemical insults; binding sites for intestinal flora; traps and expels pathogens
Gastric acid	Antimicrobial
Lysozyme	Antibacterial
Antimicrobial peptides (defensins)	Antimicrobial
Trefoil factor proteins	Epithelial restitution; epithelial continuity
Epithelium/tight junctions	Mechanical barrier
Toll-like receptors	Innate recognition of pathogens

Tableau 3: Moyens de défense innée de la barrière épithéliale intestinale. D'après Moncada et al, 2003

Nous allons voir dans les chapitres suivants que l'épithélium intestinal constitue également une barrière fonctionnelle interactive, «dialoguant» à la fois avec les bactéries endoluminales et avec les cellules immunitaires résidentes du chorion pour maintenir l'homéostasie de la muqueuse intestinale (**Figure 37**).

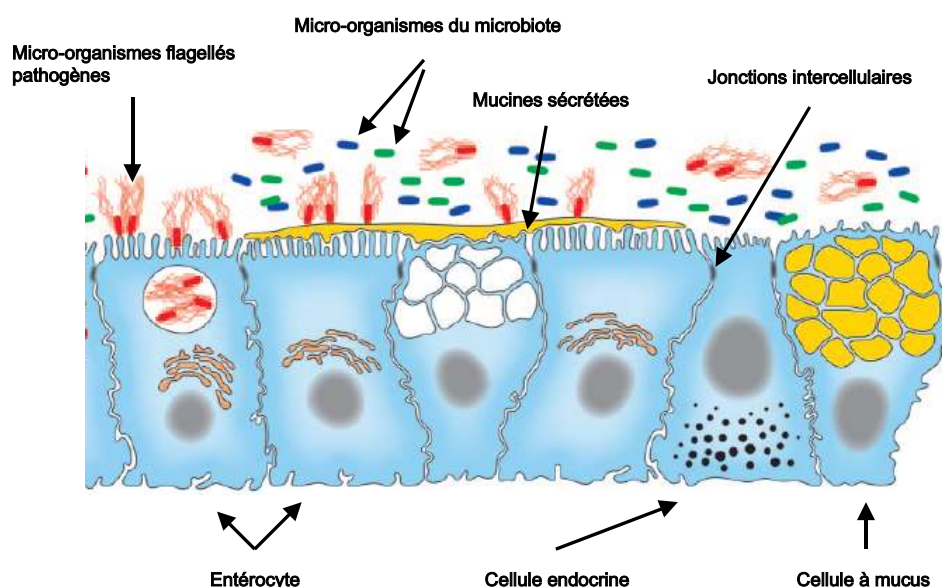


Figure 37 : Schéma illustrant les différents « acteurs » de la barrière épithéliale colique. Le système de jonction intercellulaire, au pôle apical des cellules épithéliales (cellules à mucus, entérocytes, cellules endocrines) est responsable de la cohésion de l'épithélium et participe au contrôle de la perméabilité de la barrière épithéliale. Les mucines sécrétées à la surface de l'épithélium, constituant le mucus, et les peptides antimicrobiens jouent le rôle de barrière physico-chimique contre les micro-organismes pathogènes.

3.1.2. La flore bactérienne commensale ou microbiote

3.1.2.1. Définition

On peut définir de façon simplifiée la flore intestinale normale comme l'ensemble des micro-organismes (environ 10^{14}) présents dans l'écosystème intestinal et assurant des relations symbiotiques avec l'hôte (Bourlioux et al, 2003).

En effet, au cours de l'évolution, une coexistence « pacifique » s'est développée entre la flore intestinale et l'hôte, et chaque protagoniste profite de cette relation (Backhed et al, 2005). De ce fait, le terme de « flore commensale », que l'on retrouve assez fréquemment dans la littérature pour définir cette flore intestinale, est inapproprié. Le terme de commensalisme implique par définition l'absence de réciprocité dans cette interaction biologique. Or, en fait, et l'hôte et la flore tirent partie de cette relation biologique. Les principales sources de carbone et d'énergie de la flore sont représentées par les glucides et les protéines non digérés dans la partie supérieure du tractus digestif, ainsi que par les mucines sécrétées par les cellules épithéliales. Les cellules épithéliales coliques, en contrepartie, réabsorbent une partie des métabolites issus de la fermentation par la flore des substrats non digestibles, parmi lesquels les acides gras à chaînes courtes. Parmi ceux-ci, le butyrate représente le substrat énergétique majeur de la cellule épithéliale colique. Il s'agit donc plutôt d'un exemple de mutualisme ou de relation symbiotique entre la flore intestinale et l'hôte, plutôt que d'une relation commensale.

La colonisation de la lumière intestinale commence dès les premières heures de vie. A la naissance en effet, le tube digestif du nouveau-né est stérile.

3.1.2.2. Méthodes d'étude de la flore intestinale

Cet écosystème a longtemps, et reste encore, considéré comme une « boîte noire », impénétrable, en raison de l'impossibilité de cultiver *in vitro*, dans des conditions adéquates, la majorité des bactéries colonisant l'intestin. En effet, la grande majorité de ces bactéries ne peut se développer une fois extraite de la niche écologique dans laquelle elles évoluent. Ces niches représentent des environnements très particuliers qu'il est quasi impossible de reproduire en laboratoire. En outre, les différentes espèces bactériennes cohabitent entre elles et établissent des interactions symbiotiques largement inconnues.

Dans les années 1970, la microbiologie digestive a connu son essor avec la maîtrise de la culture en anaérobiose grâce aux travaux de Hungate et al. (Hungate RE, 1969) et de Freter et al, ces derniers mettant en place le système de la chambre

de Freter, enceinte à atmosphère contrôlée qui permet de manipuler des échantillons et des milieux sur boîtes de Pétri en absence d'oxygène (Freter et al, 1974). Ces progrès ont permis d'isoler et d'inventorier de nombreuses espèces microbiennes donnant une vue d'ensemble de la composition de la flore fécale humaine cultivable (Moore et Holdeman, 1974). Ils ont conduit à la description des flores dominante, sous-dominante et en transit. Les genres bactériens anaérobies dominants ainsi répertoriés sont *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium* et *Clostridium*. Seuls 25 à 40 espèces composeraient la flore dominante d'un individu, parfois dite autochtone (Savage, 1977). Cette flore dominante, constituée de micro-organismes présents à des niveaux de population de 10^8 à 10^{11} UFC/par grammes de fèces (UFC = Unités Formant Colonies) représente plus de 90% de la flore totale et est constituée majoritairement de bactéries. Les champignons et les Archaea comprennent moins de 0.05% et 1% de la flore résidente respectivement (Simon et Gorbach, 1984). Les micro-organismes moins représentés (10^6 à 10^8 /grammes de fèces), étudiés grâce au développement de milieux de culture sélectifs composent la flore sous-dominante constituée de différentes espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (surtout *E.coli*) et les genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Desulfovibrio*, *Methanobrevibacter*. Enfin, une fraction mineure, composée de micro-organismes, parfois aérobies, présents à des niveaux inférieurs à 10^6 grammes de fèces, ne font que transiter dans le tube digestif ; il s'agit de la flore allochtone.

Néanmoins, malgré les progrès techniques récents utilisant notamment de nombreux milieux de culture *in vitro*, ces méthodes d'identification de la flore fécale ont des limites. Seuls les micro-organismes pour lesquels la niche écologique peut être reproduite *in vitro* peuvent être isolés et identifiés. Plus de 50% de la flore microbienne intestinale dominante n'est pas cultivable à ce jour en conditions classiques d'anaérobiose car dépendante d'interactions avec des partenaires ou exigeant des apports nutritionnels difficiles à mettre en œuvre *in vitro*.

A la fin des années 1980, le développement des phylogénies ribosomiques et leur application à l'écologie microbienne (Olsen et al, 1986 ; Stahl et al, 1988) ont représenté un progrès majeur vers l'utilisation de techniques indépendantes de la culture. Les techniques fondées sur la recherche des séquences du gène codant

pour l'ARN ribosomique, marqueur phylogénétique reconnu, permettent une prise en compte assez exhaustive de la flore microbienne dominante. Le clonage et le séquençage de l'ADNr 16S ont ainsi révélé d'une part que la majorité des bactéries fécales appartient à 3 lignées phylogénétiques majeures : le groupe *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella*, le groupe *Clostridium coccoides* et le groupe *Clostridium leptum*, et d'autre part que plus de 80% des espèces moléculaires observées ne sont actuellement pas cultivées (Gill et al, 2006). Par ailleurs, les méthodes moléculaires telles que l'électrophorèse en milieu dénaturant de l'ARN 16S amplifié par PCR (Zoetendal et al, 1998), ou l'hybridation in situ couplée à la cytométrie (Harmsen et al, 2000) permettent une analyse à haut débit de la composition de la flore intestinale.

Néanmoins, le développement de nouvelles stratégies d'isolement par culture anaérobie est essentiel, pour explorer les interactions hôte-bactérie et bactérie-bactérie, et identifier formellement les espèces nouvelles découvertes par ces techniques de biologie moléculaire.

3.1.2.3. Répartition topographique et principales fonctions métaboliques de la flore intestinale

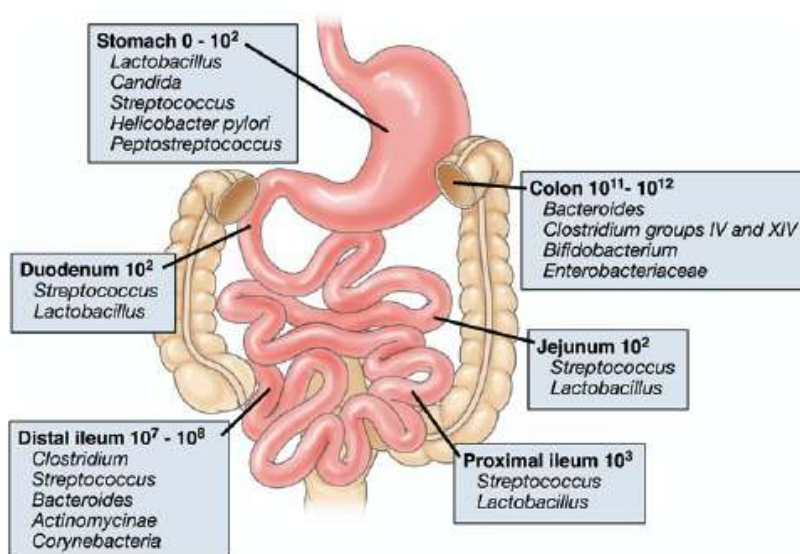


Figure 38 : Répartition et concentrations luminales des espèces microbiennes dominantes dans les différents segments du tube digestif. D'après Sartor, 2008.

La répartition de la flore varie selon les segments du tube digestif (**Figure 38**). Elle dépend de la teneur du milieu en oxygène, des sécrétions du tube digestif, des nutriments disponibles et de la vitesse du transit (rapide de la bouche au cæcum, plus lent du cæcum au rectum). Globalement il existe un gradient croissant oral-aboral. Dans l'estomac, du fait d'un pH bas, la flore est quasi inexistante (inférieure à 10^3 UFC/g). Dans l'intestin grêle, on observe une variation quantitative (duodénum 10^3 - 10^4 UFC/g, jéjunum 10^4 - 10^6 UFC/g, iléon 10^6 - 10^8 UFC/g) et qualitative : diminution progressive du nombre des bactéries aérobies au profit des bactéries anaérobies strictes. Les bactéries habituellement présentes dans l'intestin grêle appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, et à quelques espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* à des concentrations faibles jusqu'à l'iléon où elles apparaissent dominées par des espèces anaérobies à Gram négatif appartenant au genre *Bacteroides*. Dans le côlon, le ralentissement du transit est associé à une augmentation importante de la population bactérienne (de 10^9 à 10^{11} UFC/g), exclusivement anaérobie. Il représente la seule zone colonisée de façon permanente par une flore résidente.

Les principales sources de carbone et d'énergie de cette flore sont représentées par des substrats exogènes que sont les glucides (principalement l'amidon résistant à l'action des amylases pancréatiques et les polyosides végétaux – cellulose et pectines) et les protéines non digérés dans la partie supérieure du tractus digestif (Cummings et Englyst, 1987). Les mucines sécrétées par les cellules caliciformes, les cellules épithéliales desquamées, les enzymes pancréatiques et les différents stérols (cholestérol, acides biliaires) contenus dans les sécrétions biliaires représentent également une partie des sources disponibles (Salysers et al, 1982, MacFarlane et Gibson, 1996). Les polymères complexes sont dégradés par une grande variété d'hydrolases (polysaccharidases, glycosydases, protéases, peptidases) en oligomères ou monomères (oses, acides aminés) assimilables par les bactéries (McCarthy et Salysers, 1986 ; Tancula et al, 1992), le métabolisme des glucides étant quantitativement plus important que le métabolisme des autres substrats. La fermentation de ces substrats glucidiques, oses et oligosides, par la flore conduit à la production d'acides gras à chaînes courtes (principalement acétate, propionate, et butyrate) (Miller et Wolin, 1979, Pryde et al, 2002) et de gaz (CO_2 , H_2 , H_2S et CH_4 chez 30 à 50% des individus, produit par 2 espèces d'archaéa

métanogènes) (MacFarlane et Gibson, 1996 ; Suarez et al, 1997). L'ensemble de ces réactions de fermentation permet d'une part aux bactéries d'obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance et au maintien de leurs fonctions cellulaires, et permet d'autre part à l'hôte d'absorber et d'utiliser les métabolites formés, notamment les acides gras à chaînes courtes.

Le butyrate représente le principal substrat énergétique de l'épithélium colique (Cummings et al, 1984). Il est réabsorbé par la cellule épithéliale via un transporteur apical spécifique, MCT1 (monocarboxylate transporter 1) (Ritzhaupt et al, 1998). Le butyrate semble également jouer un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse colique, en inhibant la prolifération cellulaire et en induisant la différenciation cellulaire et l'apoptose (Augeron et Labois, 1984 ; Heerdt et al, 1997). En outre, il induit, notamment dans les lignées colorectales humaines HT29 et T84, l'expression et la sécrétion de la phosphatase alcaline intestinale (Hodin et al, 1996), protéine de la bordure en brosse entérocytaire récemment impliquée dans le processus de « détoxification » du LPS en déphosphorylant le lipide A à l'origine des effets endotoxémiques du LPS (Goldberg et al, 2008).

Les effets non énergétiques du butyrate seraient liés à la modulation de l'expression de nombreux gènes, consécutive notamment à l'inhibition des histones désacétylases (Mariadason et al, 2000 ; Della Ragione et al, 2001). Ces gènes, dont l'accessibilité par des facteurs de transcription est alors facilitée, sont impliqués notamment dans la régulation du cycle cellulaire comme *p21*, inhibiteur des complexes cycline-cdk, qui permet l'arrêt des cellules en phase G0/G1 du cycle (Siavoshian et al, 2000), ou l'apoptose comme *BAK* (Chirakkal et al, 2006).

Le butyrate aurait également une activité anti-inflammatoire. L'équipe de Segain montre *in vitro* que le butyrate diminue la production de cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF, par la muqueuse colique ou les cellules circulantes de patients atteints de maladie de Crohn, en inhibant l'activation du facteur de transcription NFκB (Segain et al, 2000). Ces résultats expérimentaux sont confirmés *in vivo* dans une étude réalisée chez des patients atteints de RCH. En effet, l'administration locale de butyrate pendant plus de 8 semaines chez ces patients est associée à une diminution de l'index d'activité de la maladie, une diminution des taux de NFκB activé

dans les macrophages, et une diminution du nombre de polynucléaires neutrophiles dans le chorion de la muqueuse colique (Luhrs et al, 2002). Cette inhibition de l'activation de NF κ B serait liée à une inhibition de la dégradation de la protéine I κ B α (Segain et al, 2003) dépendante du protéasome. L'activité anti-inflammatoire du butyrate serait également liée à une inhibition de la voie de signalisation médiée par l'IFN γ , cytokine pro-inflammatoire (Klampfer et al, 2003).

Cet acide gras à chaînes courtes jouerait donc un rôle dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse colique en contrôlant, par des effets nutritionnels et de signalisation, le renouvellement des cellules épithéliales, et en régulant la réponse des cellules inflammatoires de la muqueuse.

3.1.3. . Les cellules immunitaires résidentes de la muqueuse intestinale

Le système immunitaire lymphoïde associé à la muqueuse intestinale ou GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue) est considéré comme le plus vaste et le plus complexe de tout l'organisme, en contact potentiel avec une quantité importante d'antigènes étrangers. En conditions physiologiques, la réponse immunitaire de la muqueuse intestinale est parfaitement contrôlée et contenue, puisque le chorion est totalement dénué de lésions inflammatoires. Par conséquent, la réponse immunitaire doit être en constant équilibre entre l'induction d'une réponse immunitaire protectrice contre les micro-organismes pathogènes d'une part, et d'autre part par l'induction d'un état de tolérance vis-à-vis d'antigènes exogènes du non-soi représentés par les antigènes alimentaires (la tolérance orale) et les bactéries de la microbiote. La littérature à ce sujet est extrêmement vaste et nous n'avons pas la prétention, ici, de résumer l'ensemble des travaux s'y rapportant. Nous définirons dans un premier temps les mécanismes supposés impliqués dans la tolérance, puis nous décrirons les cellules immunitaires résidentes du chorion de la muqueuse intestinale et nous résumerons leurs fonctions respectives. Nous reconnaissons que ce choix, de faire précéder la description des cellules immunitaires par les mécanismes de la tolérance est arbitraire, mais il nous semble correspondre à une meilleure approche compréhensive du sujet.

L'importance du système immunitaire dans l'homéostasie intestinale a été révélée par des travaux réalisés chez la souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency). En effet, des injections de différentes sous-populations lymphocytaires T chez cette souris immunodéficiente entraînent soit le développement de lésions de colite grave soit leur amélioration (Morrissey et al, 1993 ; Powrie et al, 1993).

En conditions physiologiques, d'une manière générale, la tolérance au soi est une caractéristique fondamentale du système immunitaire, essentielle au maintien de l'homéostasie. C'est un état permanent qui fait intervenir des mécanismes actifs du système immunitaire. Pour induire cette tolérance, le système immunitaire fait intervenir différents mécanismes au niveau du thymus (tolérance centrale) et au niveau périphérique (tolérance périphérique). La tolérance centrale entraîne par sélection négative la mort par apoptose de 99% des thymocytes auto-réactifs produits. La tolérance centrale implique également la production de lymphocytes T régulateurs dont le rôle est de maintenir inactifs des lymphocytes T potentiellement réactifs. Cependant, ces mécanismes centraux ne peuvent expliquer totalement la tolérance au soi, et d'autres mécanismes périphériques sont mis en place par l'organisme. Cette tolérance périphérique a pour but d'éliminer les éventuels clones T auto-réactifs ayant échappé à la délétion thymique, ou les clones dirigés contre des auto-antigènes absents du thymus. Cinq mécanismes majeurs ont été proposés pour expliquer l'induction ou le maintien d'un état de tolérance : l'anergie clonale, l'ignorance immunologique, la délétion clonale, la déviation immune ou la suppression active (**Figure 39**) (Kamradt et Mitchison, 2001). Nous allons brièvement les décrire.

L'anergie clonale correspond à un état de non-réponse stable et spécifique des lymphocytes T à un antigène, les cellules même après stimulation ne prolifèrent pas. Cet état d'anergie des lymphocytes T est induit par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) généralement après stimulation antigénique incomplète. L'anergie peut-être définie comme une « paralysie fonctionnelle » des lymphocytes T caractérisée par une incapacité de production de cytokines. Les lymphocytes T

anergiques sont cependant toujours capables de répondre aux cytokines sécrétées par d'autres cellules. Il s'agit donc d'un état réversible.

L'ignorance immune correspond à l'absence de contact entre la CPA et le lymphocyte T.

La délétion clonale implique l'induction d'une mort cellulaire par apoptose des lymphocytes T activés, principalement par la voie Fas/Fasligand.

La déviation immune correspond à l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil de sécrétion de cytokines de type Th2 (IL4, IL5, IL6, IL10) mais aussi Th3 (TGF- β) ou Tr1 (IL10). Ces 2 derniers profils peuvent intervenir dans les mécanismes de suppression. La déviation immune est liée au développement préférentiel de lymphocytes T CD4⁺ Th2 sans développement de lymphocytes T CD4⁺ Th1. Différents facteurs interviennent dans la détermination de la réponse immune vers un profil de type 1 ou de type 2. Il est classiquement admis qu'une quantité importante d'IL12 sécrétée par la cellule dendritique joue un rôle fondamental dans l'orientation de la réponse immune vers une réponse de type Th1, alors que la production d'IL4 ou d'une faible quantité d'IL12 oriente la réponse immune vers une réponse de type Th2 (Rissoan et al, 1999).

La suppression active concerne la capacité de certaines populations de lymphocytes T CD4⁺, mais aussi CD8⁺, à réguler la réponse immune : il s'agit des lymphocytes T dits suppresseurs ou régulateurs. Différents modèles expérimentaux ont montré dans les années 1990 le rôle des lymphocytes T régulateurs dans l'induction d'un état de tolérance aux antigènes du soi (Shevach et al, 2001), notamment au niveau de la muqueuse intestinale (Groux et al, 1997), mais aussi aux allo-antigènes chez des animaux tolérants après transplantation d'organe (Waldmann et Cobbold, 2001). Il est d'ailleurs possible de transférer la capacité de tolérer un greffon allogénique à un animal naïf par transfert de cette population lymphocytaire.

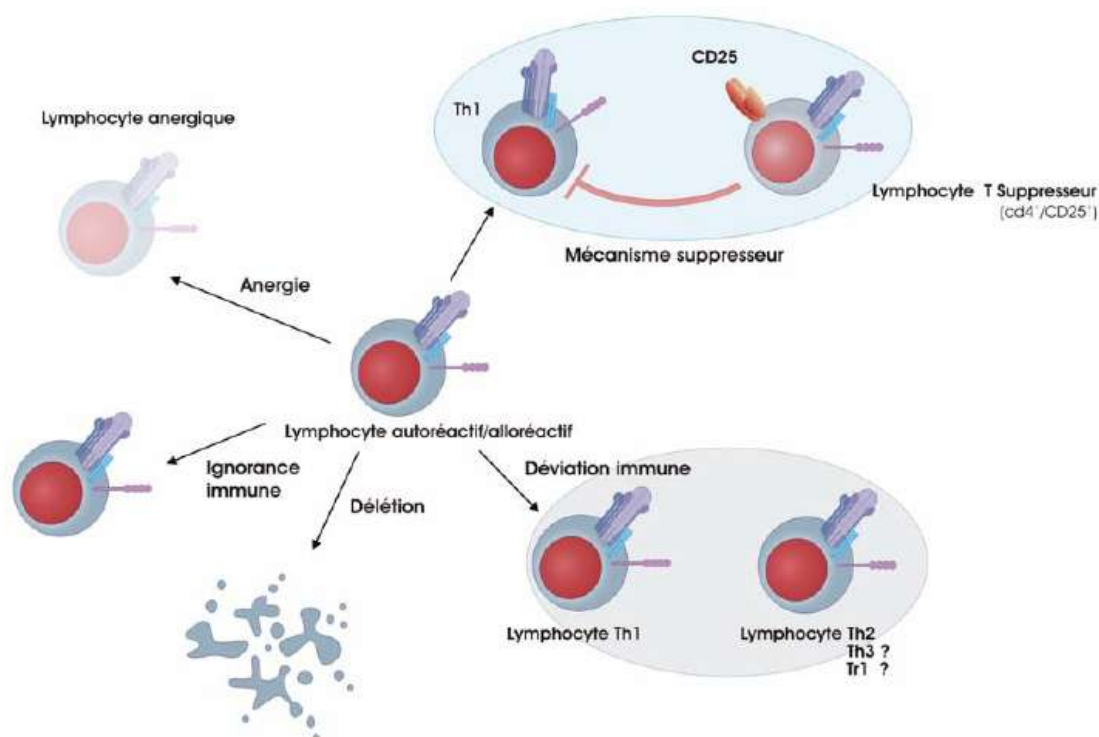


Figure 39 : Les différents mécanismes de tolérance périphérique. Le contrôle de clones lymphocytaires auto-réactifs ou allo-réactifs peut être réalisé dans l'organisme par différents mécanismes. L'anergie conduit à l'absence de réponse proliférative des lymphocytes T, même après stimulation adéquate. La délétion clonale correspond à une élimination par apoptose des clones T. L'ignorance immune est la conséquence de l'absence de contact entre la cellule présentatrice de l'antigène et le lymphocyte T. La déviation immune correspond au développement de lymphocytes T ayant un profil de sécrétion cytokinique de type 2 (IL4, IL5), Tr1 (IL10) ou Th3 (TGF β). Les mécanismes de suppression induisent l'induction de lymphocytes T régulateurs/suppresseurs.

Ces mécanismes, supposés induire un état de tolérance immunitaire, ont pour but de contrer la réponse immunitaire effectrice médiée notamment par les lymphocytes T helpers (Th) ou auxiliaires. C'est dans les années 1980 que Tim Mosmann a proposé une classification des lymphocytes T auxiliaires à partir de données obtenues chez le rongeur (Mosmann et Coffman, 1989). Les lymphocytes de type 1 (Th1) synthétisent de l'IL-2 et de l'interféron gamma (IFN- γ) et les lymphocytes de type 2 (Th2) synthétisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. Alors que l'IFN- γ et l'IL-2 contribuent directement aux mécanismes de défense anti-infectieuse, les effets des cytokines Th2 semblent favoriser le système de défense antiparasitaire mais aussi le développement de la réaction allergique. L'IL-4 est ainsi, avec l'IL-13, une cytokine clé pour la commutation isotypique vers la chaîne ϵ des immunoglobulines et donc pour la production d'IgE. L'IL-5 favorise l'activation des polynucléaires éosinophiles et stimule leur survie dans les tissus.

Ce concept d'équilibre Th1–Th2 a par la suite été étendu à l'homme, bien que certaines nuances doivent être apportées. Alors que l'identification des cellules Th1 et Th2 peut être faite chez la souris en se fondant sur le profil de production cytokinique, ce clivage est plus difficile chez l'homme, les lymphocytes pouvant synthétiser des cytokines de manière plus ubiquitaire, probablement en fonction du type de stimulus. La production d'IFN- γ est, par exemple, souvent le fait de cellules synthétisant par ailleurs des cytokines Th2 comme l'IL-4 (Perez-Cruz et al, 2000). Les cytokines jouent un rôle majeur dans l'orientation de cet équilibre Th1/Th2, en particulier l'IL12 pour l'induction de la différenciation Th1, et l'IL4 pour la différenciation Th2 (Glimcher et al, 2000). L'IL18 module également le développement d'une réponse de type Th1 (Dinarello et al, 1999).

	Th1	Th2
Sécrétion cytokinique		
IL2	+	-
IFN γ	++	-
TNF β	+	-
GM-CSF	++	+
IL3	++	++
IL4	-	++
IL5	-	++
IL10	-	++
IL13	-	++
Fonctions		
Aide à la production de l'ensemble des anticorps	+	++
Production d'éosinophiles et de mastocytes	-	+
Activation des macrophages	++	-
Hypersensibilité retardée	++	-
Activation des lymphocytes T cytotoxiques	++	-

Tableau 4: Sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires : sécrétion de cytokines et fonctions (D'après Fossiez et al, 1996).

3.1.3.1. Inventaire et fonctions

L'intestin représente le premier organe immunitaire de l'organisme concentrant environ 70% des lymphocytes de tout l'organisme (Newberry, 2008). Le système immunitaire intestinal peut être divisé en 2 grandes parties : 1) le compartiment lymphoïde organisé, responsable de l'induction de la réaction immunitaire intestinale

(plaques de Peyer retrouvées essentiellement dans la sous-muqueuse de l'intestin grêle ; follicules lymphoïdes isolés dans le chorion qui ont l'apparence microscopique d'une plaque de Peyer ; ganglions mésentériques) et, 2) le compartiment lymphoïde diffus correspondant au site effecteur, constitué de cellules immunitaires dispersées au sein de l'épithélium intestinal et au sein du chorion (**Figure 40**).

Les sites inducteurs (follicules lymphoïdes isolés dans la muqueuse colique et ganglions mésentériques) sont les sites où les antigènes intra-luminaux sont captés et induisent une réponse immunitaire. Les sites effecteurs (la muqueuse intestinale) sont les sites où les cellules immunitaires se différencient et exercent leurs fonctions : réponse cellulaire médiée par les lymphocytes T et réponse humorale locale (sécrétion d'IgA) médiée par les lymphocytes B.

Les lymphocytes T et B sensibilisés par l'antigène dans les sites inducteurs vont migrer vers les sites effecteurs en suivant le cycle hémolympatique. Ce flux spécifique de lymphocytes entre les sites inducteurs et les sites effecteurs se fait grâce à l'expression d'intégrines membranaires par les lymphocytes T (l'intégrine $\alpha 4 \beta 7$) reconnues par des adhésines exprimées à la surface des cellules endothéliales qui bordent les veinules post-capillaires du chorion de la muqueuse intestinale (MadCAM-1) (Butcher et al, 1996). L'existence de ce cycle a été mise en évidence par des expériences de transferts cellulaires. Les blastes T et B à IgA des sites inducteurs marqués à la thymidine tritiée et injectées à des receveurs syngéniques ne migrent pas directement dans la muqueuse, mais migrent rapidement dans les ganglions mésentériques où ils séjournent quelques jours avant de devenir capables de migrer dans la muqueuse au terme d'une étape de maturation (Roux et al, 1981). Les cellules immunitaires du chorion sont essentiellement des cellules mononuclées. C'est ce compartiment que nous allons détailler.

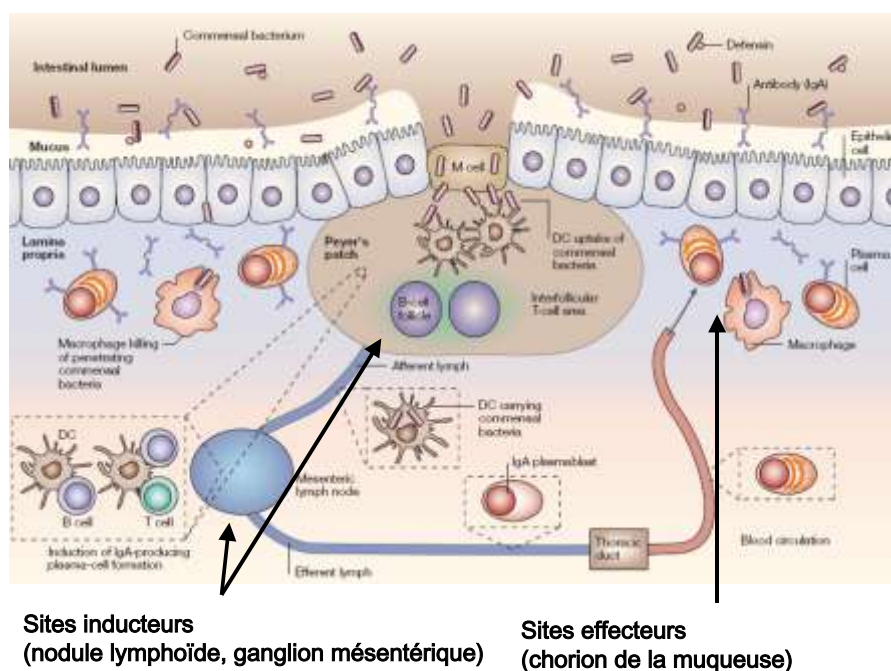


Figure 40 : Le système immunitaire intestinal et le cycle hémolympathique. DC : cellule dendritique (d'après Macpherson et Harris, 2004)

3.1.3.1.1. Les macrophages

Les macrophages intestinaux résidents de la muqueuse intestinale représentent 10 à 20% des cellules mononucléées du chorion, faisant de l'intestin le plus vaste réservoir de macrophages chez l'homme (Lee et al, 1985). Ils sont dérivés des monocytes circulants, après un processus de maturation au sein de la muqueuse, et entrent en apoptose au bout de quelques semaines, remplacés alors par de nouveaux monocytes circulants recrutés. Les facteurs qui interviennent dans ce recrutement, en conditions physiologiques, ne sont pas encore connus (Smith et al, 2005). Ils sont situés juste au dessous de l'épithélium, site privilégié pour phagocyter les débris cellulaires issus de cellules épithéliales apoptotiques non desquamées dans la lumière intestinale et les éventuels micro-organismes pathogènes qui auraient traversé la barrière épithéliale. Ils sont parfois difficiles à repérer sur coupe histologique colorée à l'hématéine-éosine, sauf s'ils renferment dans leur cytoplasme du pigment (hemosidérine, dépôts issus de l'ingestion de laxatifs de type anthracène)

ou des mucines (ils prennent alors le nom de muciphages) suite à l'ingestion de mucus issu des cellules caliciformes. Ils peuvent alors être mis en évidence par des techniques d'immunohistochimie avec des anticorps dirigés contre le CD68 (**Figure 41**) ou les myéloperoxydases intracytoplasmiques.

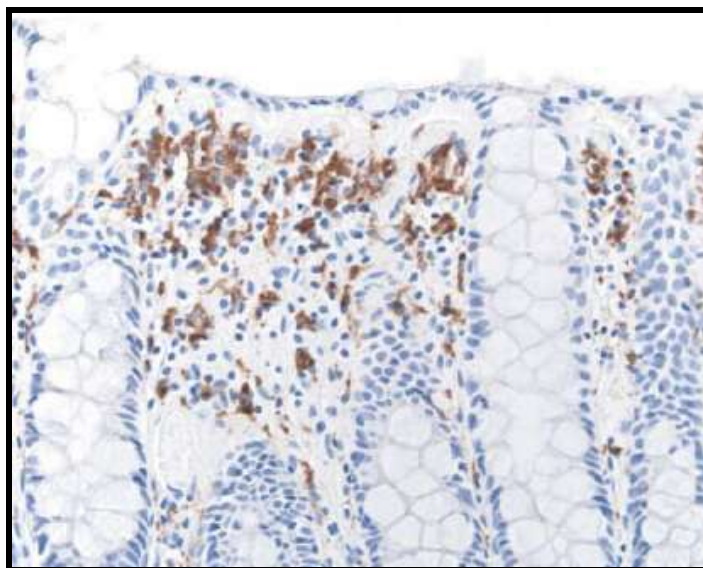


Figure 41 : Macrophages CD68+ dans le chorion de la muqueuse colique humaine normale, situés juste au-dessous de la barrière épithéliale.

Dans le chorion, les monocytes circulants recrutés subissent un processus de maturation et acquièrent un phénotype et des propriétés fonctionnelles de macrophages résidents, différents de ceux des monocytes circulants, ce processus impliquant vraisemblablement le TGF β présent dans le chorion de la muqueuse intestinale (Smith et al, 2005). Rogler et al ont montré que le phénotype des macrophages résidents de la muqueuse colique est différent de celui des monocytes circulants (**Figure 42**). En effet, ils ont isolé les macrophages résidents de muqueuses coliques humaines normales, traitées par digestion enzymatique à la collagénase, à l'aide de billes magnétiques couplées à l'anticorps CD33, reconnaissant une glycoprotéine membranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines dont l'expression est restreinte aux cellules monocytaires. Puis, par cytométrie de flux (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter), ils ont montré que ces macrophages résidents exprimaient très peu, à la différence des monocytes circulants, le CD14, récepteur membranaire de haute affinité au complexe LPS/LBP (lipopolysaccharide/Lipopolysaccharide-binding protein), et les molécules de co-

stimulation CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2) (Rogler et al, 1998). Smith et al ont montré les mêmes résultats pour les macrophages résidents isolés par élutriation à partir de muqueuses jéjunales normales humaines. Ils montrent par ailleurs la faible expression ou l'absence d'expression d'autres récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire innée comme le CD89, récepteur membranaires aux IgA1 et IgA2, le CD16, récepteur aux IgG, le CD32 et CD64, récepteurs au complément CR3 et CR4, et les récepteurs aux facteurs de croissance IL2 et IL3 et l'intégrine LFA1 (Leukocyte function-associated antigen 1), molécule d'adhésion aux cellules endothéliales. En conséquence, ces macrophages sont profondément anergiques, en particulier au LPS malgré l'expression à la membrane de TLR4 (Toll-like receptor 4), récepteur transmembranaire reconnaissant le LPS, et aux IgA (Smith et al, 2001 ; Smythies et al, 2005). L'absence d'expression des molécules de co-stimulation explique leur incapacité de jouer le rôle de cellule présentatrice de l'antigène pour les lymphocytes T CD4 *in vitro* (Schenk et al, 2005), indispensables pour induire une réponse immunitaire adaptative. Ces macrophages sont également caractérisés par l'absence de production et de sécrétion (ou très faible) de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1, l'IL6, le TNF α (Tumor necrosis factor) ou l'IL8 après stimulation par le LPS, par rapport à des monocytes circulants stimulés de la même manière. Ils conservent néanmoins leur capacité de phagocytose (matériel inerte, levure, bactérie, cellule apoptotique), et leur activité de microbicide, mais ces activités ne s'accompagnent de sécrétion ni de cytokines pro-inflammatoires ni de cytokines de co-stimulation (IL1, IL10 et IL12) nécessaires à l'activation des lymphocytes T auxiliaires, contrairement aux monocytes circulants (Smith et al, 2005).

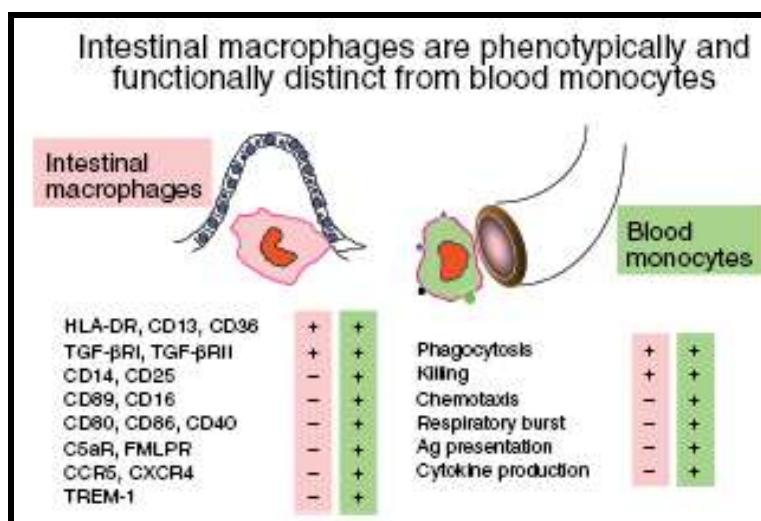


Figure 42 : Les différences phénotypiques et fonctionnelles entre monocytes circulants et macrophages du chorion de la muqueuse colique normale chez l'homme.

3.1.3.1.2. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques tirent leur nom du fait qu'elles sont recouvertes d'un écheveau de longues extensions membranaires qui ressemblent aux dendrites des cellules nerveuses. Elles constituent une population hétérogène de cellules d'origine hématopoïétique. Elles interviennent à différents niveaux dans le système immunitaire incluant l'établissement de mécanismes de tolérance centrale dans le thymus, l'entretien des mécanismes de tolérance périphérique, l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire innée et adaptative. Ces fonctions diverses sont accomplies par différentes sous-populations de cellules dendritiques qui se distinguent en fonction de leurs caractéristiques morphologiques, phénotypiques, fonctionnelles et anatomiques (Liu et al, 2001). Les mécanismes précis et les médiateurs qui orientent les cellules dendritiques vers le développement d'une réponse immune efficace ou vers l'induction de mécanismes de tolérance font l'objet de nombreux travaux et ne sont pas encore complètement élucidés.

Les mécanismes de défense contre les antigènes étrangers sont basés sur la coexistence de 2 systèmes que sont l'immunité innée, non spécifique de l'antigène, et l'immunité adaptative, spécifique de l'antigène. Les cellules dendritiques constituent un lien entre ces 2 réponses de par leur capacité à répondre rapidement à un pathogène, notamment viral, en sécrétant de l'IFN α/β , et à stimuler les cellules de l'immunité innée sans reconnaissance spécifique, puis ensuite à initier une

réponse spécifique de cet antigène, grâce aux interactions qu'elles sont capables d'établir avec les principaux effecteurs de l'immunité adaptative (lymphocytes T et B) (Liu et al, 2001).

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices de l'antigène dites « professionnelles » qui appréhendent l'antigène et le présentent aux lymphocytes T auxiliaires « naïfs » : ce sont les seules cellules immunitaires capables d'initier une réponse immunitaire primaire permettant ensuite l'établissement d'une mémoire immunologique. La cellule dendritique reconnaît les antigènes extracellulaires grâce à des récepteurs membranaires (PRR, Pattern Recognition Receptors). Les antigènes sont ensuite endocytés, puis rejoignent le phagosome qui fusionne avec le lysosome. Les protéines antigéniques sont alors scindées en petits peptides qui s'associent aux molécules HLA de classe II ou aux molécules HLA de classe I. L'ensemble est exporté à la membrane et présenté aux lymphocytes T auxiliaires (pour les peptides associés aux molécules HLA de classe II) ou aux lymphocytes T cytotoxiques (pour les peptides associés aux molécules HLA de classe I). Ce processus d'apprêtement antigénique fait passer les cellules dendritiques d'un stade immature à un stade mature, les cellules matures n'exprimant plus les PRR (Banchereau et al, 2000). La présentation antigénique au lymphocyte T s'accompagne d'une activation lymphocytaire qui se traduit par la sécrétion de cytokines, de type Th1 (essentiellement $IFN\gamma$ et IL2) induisant l'expansion de la réponse cellulaire, ou de type Th2 (IL4, IL5, IL10, IL13) favorisant la réponse anticorps.

Pour plus de clarté, nous restreindrons notre propos aux cellules dendritiques humaines. Bien que la souris représente un bon modèle d'études des cellules dendritiques, il existe d'importantes différences phénotypiques entre les cellules dendritiques humaines et murines (Shortman et Liu, 2002). Chez l'homme, il existe 2 grandes familles de cellules dendritiques : les cellules dendritiques myéloïdes et les cellules dendritiques plasmacytoïdes, de découverte plus récente.

Parmi les cellules dendritiques myéloïdes, on distingue 4 stades différents de différenciation en fonction de leur localisation anatomique (**Figure 43**). Dans le sang, on retrouve principalement des cellules dendritiques à 2 stades de maturation

différents : les précurseurs de cellules dendritiques (pré-DC) qui sont en transit de la moëlle vers les tissus périphériques, et les cellules dendritiques immatures, en transit des tissus périphériques vers les ganglions (Robinson et al, 1999). Les pré-DC vont donc migrer vers les tissus périphériques, s'y fixer et y résider sous forme de cellules dendritiques immatures résidentes.

Chez l'homme, contrairement à la souris, très peu d'études sont consacrées aux cellules dendritiques matures isolées de tissus périphériques (Shortman et Liu, 2002). Dans ces tissus, on distingue les cellules dendritiques interstitielles retrouvées dans les muqueuses (dans les épithéliums stratifiés des muqueuses orales et génitales) et dans la plupart des organes profonds (cœur, poumon, foie, rein, tractus gastro-intestinal) et les cellules de Langerhans au sein de l'épiderme. Le dernier stade de maturation est représenté par la cellule dendritique mature qui migre au niveau des organes lymphoïdes secondaires, et dénommée cellule interdigitée.

Les cellules dendritiques myéloïdes ont initialement été nommées DC1 car elles sont capables d'orienter la réponse immunitaire adaptative vers une réponse de type Th1 grâce à leur grande capacité de production d'IL12 lors du processus de maturation (Vieira et al, 2000). Au stade immature, les cellules dendritiques sont très efficaces pour la prise en charge des antigènes, notamment via les PRR. Les cellules dendritiques myéloïdes circulantes expriment préférentiellement les TLR 1, 2, 3 et 4. Elles n'expriment pas les TLR7 et TLR9 (Muzio et al, 2000 ; Kadowaki et al, 2001, Hart et al, 2005).

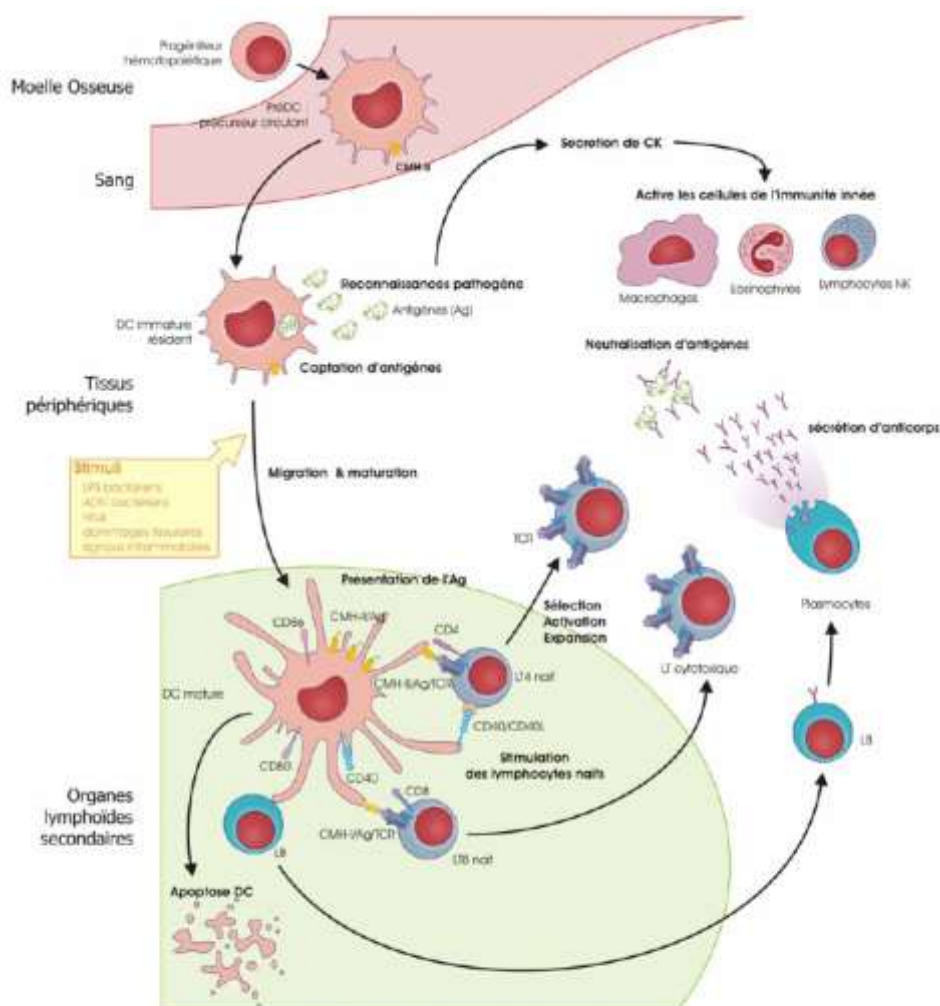


Figure 43: Les 4 stades de maturation des cellules dendritiques myéloïdes. Elles dérivent d'un progéniteur hématopoïétique médullaire qui se différencie en précurseur de cellule dendritique (pré-DC). Celui-ci transite par le sang vers les tissus périphériques où il résidera sous forme de cellule dendritique immature qui possède des capacités maximales de captation des antigènes. Sous l'influence de différents stimuli, les cellules dendritiques mûrissent et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour initier la réponse immunitaire adaptative par interaction avec les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, et les lymphocytes B. La maturation des cellules dendritiques s'accompagne de l'expression de molécules de co-stimulation comme le CD80, CD40 et CD86 et de l'expression du complexe HLA-DR/peptide antigénique à la surface cellulaire.

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes ont pendant longtemps intrigué les anatomopathologistes en raison de leur ressemblance avec les plasmocytes, mais ne possèdent pas d'immunoglobulines intra-cytoplasmiques. Comme elles exprimaient le marqueur T CD4 et qu'elles étaient retrouvées dans les zones T dépendantes des organes lymphoïdes, Lennert les dénomma cellules T plasmacytoïdes (Lennert et al, 1975). Elles possèdent des caractéristiques qui leur sont propres, elles n'expriment pas notamment le CD11c ni le CD1c comme les cellules dendritiques myéloïdes (Dzionek et al, 2000).

Les cellules dendritiques résidentes du chorion de la muqueuse intestinale ont été beaucoup moins étudiées que leurs homologues contenues dans les plaques de Peyer en raison de leur difficulté d'isolement. Elles sont beaucoup moins nombreuses que les macrophages résidents, formant un réseau lâche autour des cryptes intestinales (Pavli et al, 1996), dans ce qui est appelé chez la souris les cryptoplaques (Kanamori et al, 1996), ou au sein des follicules lymphoïdes isolés. Elles présentent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles qui les distinguent des cellules dendritiques circulantes.

Stagg et al ont été les premiers à isoler, dans le chorion de muqueuse colique humaine normale, des cellules dendritiques présentant un phénotype et des propriétés fonctionnelles de cellules dendritiques immatures myéloïdes (expression faible du CD40, CD83 et du CD86, pas d'expression du CD80 ou du CD25, mais capacité d'endocytose). Ils ont également montré que ces cellules dendritiques immatures sont capables de suivre un processus de maturation leur permettant de stimuler la prolifération de lymphocytes T allogéniques. Ils ont en effet isolé dans le surnageant du milieu de culture d'explants de muqueuse colique désépithélialisée, maintenus en culture durant 24h, des cellules dendritiques présentant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de cellules dendritiques matures (expression forte des molécules de costimulation CD40, CD80, CD86, CD83 et CD25, capacité moindre d'endocytose) (Bell et al, 2001). Par ailleurs, des travaux réalisés à partir d'un modèle de co-culture sur filtre Transwell (pores de 3µm), comprenant des cellules de la lignée Caco-2, cultivées à confluence, et des cellules dendritiques immatures de souris placées au pôle basolatéral, montrent que les cellules dendritiques sont capables au bout de 4h de co-culture d'internaliser des bactéries ajoutées au milieu de culture, au pôle apical de la monocouche de cellules épithéliales, grâce à l'ouverture des jonctions serrées intercellulaires par des prolongements cytoplasmiques, sans affecter la résistance électrique transépithéliale. Cette capacité d'internalisation est retrouvée *in vivo* chez la souris concernant des bactéries pathogènes mais aussi du microbiote (Rescigno et al, 2001).

La capture d'une bactérie ou d'un produit bactérien par la cellule dendritique résidente intestinale entraîne un processus de maturation cellulaire qui génère une cellule présentatrice de l'antigène fonctionnelle, puisqu'elle est capable *in vitro* de

stimuler la prolifération de lymphocytes T naïfs, (Pavli et al, 1993). Cette cellule dendritique résidente produit constitutivement de l'IL10, mais pas d'IL6 ni d'IL12 (Hart et al, 2005), et induit préférentiellement une réponse immunitaire adaptative de type Th2, même après capture d'une bactérie pathogène. A l'inverse, les cellules dendritiques circulantes, activées avec les mêmes antigènes, du microbiote ou pathogènes, induisent plutôt une réponse de type Th1 (Rimoldi et al, 2005). A la différence des cellules dendritiques circulantes, seule une infime proportion de cellules dendritiques résidentes expriment les récepteurs membranaires TLR2 (récepteur au peptidoglycane et aux lipoprotéines des bactéries Gram +) ou TLR4 (récepteur membranaire au LPS des bactéries Gram -) (Hart et al, 2005). Niess et al. (Niess et al, 2005) ont montré par ailleurs, chez la souris, que les cellules dendritiques résidentes du chorion sont caractérisées par l'expression du récepteur CX3CR1, dont le ligand est une chimiokine transmembranaire, la fractalkine, exprimée à la surface des cellules épithéliales coliques humaines (Lucas et al, 2001). Ils montrent également, sur le plan fonctionnel, que l'expression de ce récepteur est indispensable, 1) à l'émission de dendrites entre les cellules épithéliales par les cellules dendritiques résidentes, puisque chez les souris invalidées pour le gène *CX3CR1*, les cellules dendritiques ne présentent pas de dendrites entre les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale et, 2) à la possibilité pour les cellules dendritiques résidentes de capturer des bactéries pathogènes ou du microbiote, présentes dans la lumière intestinale (Niess et al, 2005). En fait, des études réalisées chez la souris tendent à montrer que les cellules dendritiques résidentes du chorion capteraient (« antigen sampling ») en permanence les antigènes présents dans la lumière intestinale, lesquels seraient par la suite transportés uniquement dans les ganglions mésentériques, et non dans les autres compartiments lymphoïdes, pour induire une réponse immunitaire adaptative locale (activation de cellules T et synthèse d'IgA par les cellules B) (Macpherson et Uhr, 2004). En effet, une étude réalisée chez la souris invalidée pour le gène codant pour le récepteur aux chimiokines CCL19 et CCL21, CCR7, récepteur dont l'expression augmente au cours du processus de maturation cellulaire permettant aux cellules matures de traverser la paroi des vaisseaux lymphatiques et d'accéder aux ganglions mésentériques, montre que les cellules dendritiques du chorion sont incapables de migrer vers les organes lymphoïdes inducteurs (ganglions mésentériques) et d'induire une tolérance

immunitaire orale (Worbs et al, 2006). Ainsi, les cellules dendritiques auraient un rôle majeur de couplage entre l'immunité innée et adaptative.

	Cellules dendritiques myéloïdes résidentes du chorion	Cellules dendritiques myéloïdes circulantes (cellules « naïves ») qui migrent depuis la moëlle osseuse jusqu'aux tissus périphériques
Récepteur à la fraktaline CX3CR1	+	-
Expression des PRR (Pathogen Receptor) TLR2 TLR4	Faible Faible	Forte Forte
Réponse immunitaire adaptative induite	Th2	Th1
Cytokines produites	IL10 ++ IL6 -, IL12 -	IL12++

Tableau 5 : Différences phénotypiques et fonctionnelles entre cellules dendritiques myéloïdes résidentes de la muqueuse intestinale et cellules dendritiques circulantes

3.1.3.1.3. Les lymphocytes T

La plupart des données disponibles dans la littérature sur les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des lymphocytes de la muqueuse intestinale colique sont issus de travaux réalisés chez la souris. Nous n'aborderons ici que les données décrites chez l'homme.

Dans l'intestin humain, 2 grandes populations de lymphocytes T sont décrites, les lymphocytes T intra-épithéliaux (LIE) et les lymphocytes T du chorion. Les LIE sont en contact étroit avec le pôle basolatéral de la cellule épithéliale. Ils sont essentiellement de phénotype CD3+, TCR $\alpha\beta$ +, CD8+ thymo-dépendants mais aussi thymo-indépendants pour un certain nombre d'entre eux (Cerf-Bensussan et al, 1985 ; Guy-Grand et al, 1991). Ces LIE se distinguent des lymphocytes présents dans les autres sites lymphoïdes par 3 caractéristiques : une morphologie de grand lymphocyte granuleux (ces granules cytoplasmiques renfermant du granzyme et de la perforine) (Cerf-Bensussan et al, 1985), l'expression pour la majorité d'entre eux

du CD45RO qui témoigne de leur état activé (Jarry et al, 1990), et l'expression de l'intégrine $\alpha E\beta 7$ qui permet la liaison avec la E cadhérine exprimé au pôle basolatéral de la cellule épithéliale (Cepek et al, 1994). Les lymphocytes T du chorion sont facilement reconnaissables morphologiquement avec leur noyau arrondi de petite taille à la chromatine dense, au sein d'un cytoplasme à peine visible. Le chorion représente le site de différenciation terminale des lymphocytes issus des sites inducteurs (notamment les plaques de Peyer). Il s'agit principalement de lymphocytes T auxiliaires CD4+, associés à une minorité de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (James et al, 1986) (**Tableau 6, Figure 44**). La fonction exacte de ces lymphocytes du chorion est mal connue, mais comme la majorité des LIE, ces lymphocytes du chorion ont un phénotype mémoire CD45RO +, indiquant une première exposition antigénique, comparativement aux lymphocytes T circulants constitués à part égale de lymphocytes T naïfs CD45RA + (n'ayant pas encore rencontré l'antigène) et de lymphocytes T mémoires CD45RO + (Braunstein et al, 1997).

Sur le plan fonctionnel, plusieurs expériences *in vitro* montrent qu'ils sont anergiques vis-à-vis de différents stimuli antigéniques médiés par le complexe TCR/CD3, ou de stimuli cytokiniques comme l'IL2, comparativement aux lymphocytes T circulants, alors qu'ils sont très répondeurs à des signaux de prolifération médiés par la protéine membranaire CD2 (molécule membranaire accessoire qui renforce l'interaction entre le lymphocyte T et la CPA) (Qiao et al, 1991). Cette diminution de réactivité antigénique – ou anergie - serait due à des médiateurs produits localement au sein de la muqueuse intestinale puisque des lymphocytes T circulants cultivés dans le milieu de culture de muqueuses intestinales normales présentent les mêmes propriétés (Qiao et al, 1991 et 1993). Braunstein et al. ont montré que les lymphocytes T isolés de muqueuses coliques humaines normales pouvaient sécréter, uniquement après stimulation via le CD2, de grandes quantités d'IL10, comparativement aux lymphocytes T circulants (Braunstein et al, 1997). Khoo et al. ont montré *in vitro*, à partir d'un modèle de co-culture de lymphocytes T CD4+ isolés de muqueuse colique normale et de lymphocytes T circulants autologues, que les lymphocytes T du chorion étaient capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T circulants stimulés par des CPA autologues présentant des antigènes dérivés de bactéries commensales. De plus, l'ajout

d'anticorps neutralisants anti-IL10 ou anti-TGF- β dans le milieu de co-culture était responsable de la réversion de cette propriété suppressive/régulatrice des lymphocytes T du chorion envers les lymphocytes T circulants (Khoo et al, 1997).

Une sous-population de lymphocytes T régulateurs ou suppresseurs (T reg) essentiellement décrite et étudiée dans le domaine de la transplantation, à l'origine de l'induction d'une tolérance vis-à-vis des allo-antigènes (Waldmann et Cobbold, 2001), a également été isolée dans le chorion de la muqueuse intestinale chez l'homme par l'équipe de Watanabe et al. (Makita et al, 2004), en fonction de l'expression de certains marqueurs, successivement CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL2) puis Foxp3 (Forkhead box protein 3, facteur de transcription nécessaire au développement thymique des Treg) (Izcue et Powrie, 2008) (**Tableau 6**). C'est Sakaguchi et al qui caractérisent les premiers chez la souris cette sous-population de lymphocytes T reg CD4⁺ CD25⁺ impliqués dans la tolérance immunitaire envers des antigènes du soi et du non soi. Ils montrent en effet que l'injection de TCD4⁺ issus de ganglions et de rate de souris, n'exprimant plus le CD25 à des souris athymiques est responsable du développement de nombreuses pathologies auto-immunes, et que l'injection de TCD4⁺ CD25⁺ très précocément après la première injection prévient le développement de ces pathologies (Sakaguchi et al, 1995).

Chez l'homme, ils représentent environ 6% des lymphocytes T CD4⁺ du chorion dans les muqueuses normales, non inflammatoires (Makita et al, 2004 ; Uhlig et al, 2006). Leur nombre augmente en conditions inflammatoires (MICI, mais aussi diverticulite, colite pseudomembraneuse, colite à CMV) (Uhlig et al, 2006). Uhlig et al. montrent sur coupes tissulaires d'appendice normal qu'ils expriment de l'IL10 (par méthode immunohistochimique) (Uhlig et al, 2006). Des expériences de co-cultures cellulaires ont montré leur capacité à réprimer la prolifération de lymphocytes T effecteurs et leur synthèse cytokinique (IL2, IL5, TNF α , IFN γ , propriété régulatrice) et leur incapacité à proliférer (propriété anergique) suite à une stimulation (Makita et al, 2004). Ces propriétés immunorégulatrices semblent plutôt médiées par contact cellulaire plutôt que par sécrétion cytokinique. Par ailleurs, les patients atteints du syndrome IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked), maladie autoimmune secondaire à une mutation du gène *FOXP3*, développent entre autre une entéropathie sévère, montrant l'importance de ces lymphocytes T reg

CD4+ CD25+ Foxp3+ dans le contrôle de la réponse immunitaire intestinale (Bacchetta et al, 2006).

D'autres lymphocytes T régulateurs (Tr1) ont été décrits chez l'homme, générés à partir de lymphocytes naïfs circulants stimulés, *in vitro*, par des monocytes allogéniques en présence d'IL10. Ils se caractérisent par une synthèse accrue d'IL 10, peu d'IL2 et pas d'IL4 (Groux et al, 1997). Aucune étude ne fait part de leur présence dans le chorion de la muqueuse intestinale chez l'homme. Bien que de nombreux modèles murins aient décrits l'importance des lymphocytes T régulateurs dans la régulation de l'immunité intestinale, leur rôle fonctionnel chez l'homme reste à éclaircir.

Type de lymphocytes	Propriétés
Lymphocytes T mémoires CD45R0+ Lymphocytes T CD4 + Lymphocytes T CD8 +	Anergiques après stimulation via le complexe TCR/CD3 Sécrétion d'IL10 après stimulation
Lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ Foxp3 +	Repressions des lymphocytes T effecteurs

Tableau 6: Différentes sous-populations de lymphocytes T du chorion chez l'homme

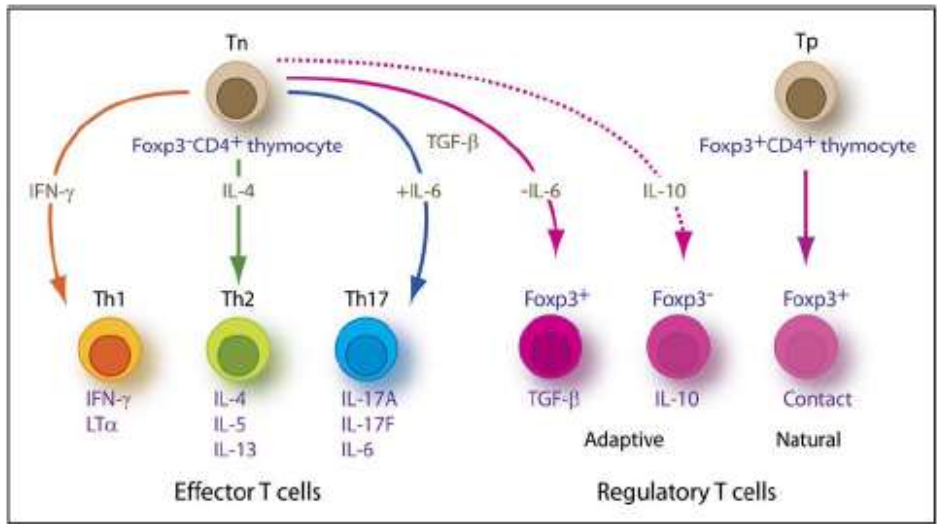


Figure 44 : Différents types de lymphocytes T CD4+. Les cytokines associées aux flèches sont celles qui induisent la différenciation d'un type lymphocytaire particulier. Les cytokines listées en dessous de chacun des types lymphocytaires correspondent aux cytokines sécrétées par ceux-ci. Tn : lymphocyte T naïf, post-thymique ; Tp : précurseur thymique. D'après Weaver et al, 2006

3.1.3.1.4. Les cellules B

Les lymphocytes B, beaucoup moins nombreux que les lymphocytes T, sont essentiellement retrouvés au niveau des follicules lymphoïdes isolés (FLI) dans le chorion, dont la morphologie et l'organisation ressemble à celles des plaques de Peyer (centre germinatif, épithélium associé au follicule, CPA). Leur structure a essentiellement été étudiée dans l'intestin grêle de souris (Hamada et al, 2002). Les lymphocytes B contenus dans ces FLI participent à l'élaboration d'une réponse immunitaire adaptative spécifique d'un antigène puisqu'ils sont à l'origine de la synthèse d'Ig spécifiques par les plasmocytes (Lorenz et Newberry, 2004).

Les plasmocytes du chorion, facilement reconnaissables morphologiquement avec leur noyau excentré renfermant une chromatine mottée, sécrètent principalement des immunoglobulines d'isotype IgA (80%), avec 2 sous-classes (IgA1 et IgA2 à part égale, non retrouvées dans le sérum) et à un moindre degré des IgM (16%), et des IgG (5%) (Brandtzaeg et al, 2005). Seules les IgA et les IgM sont sécrétées dans la lumière intestinale. En effet, ces immunoglobulines sont synthétisées sous la forme de dimères (IgA) ou de polymères (plg) (IgM) caractérisés par la présence, en plus des chaînes légères et lourdes, d'une chaîne J liée de manière covalente aux chaînes lourdes (**Figure 45**).

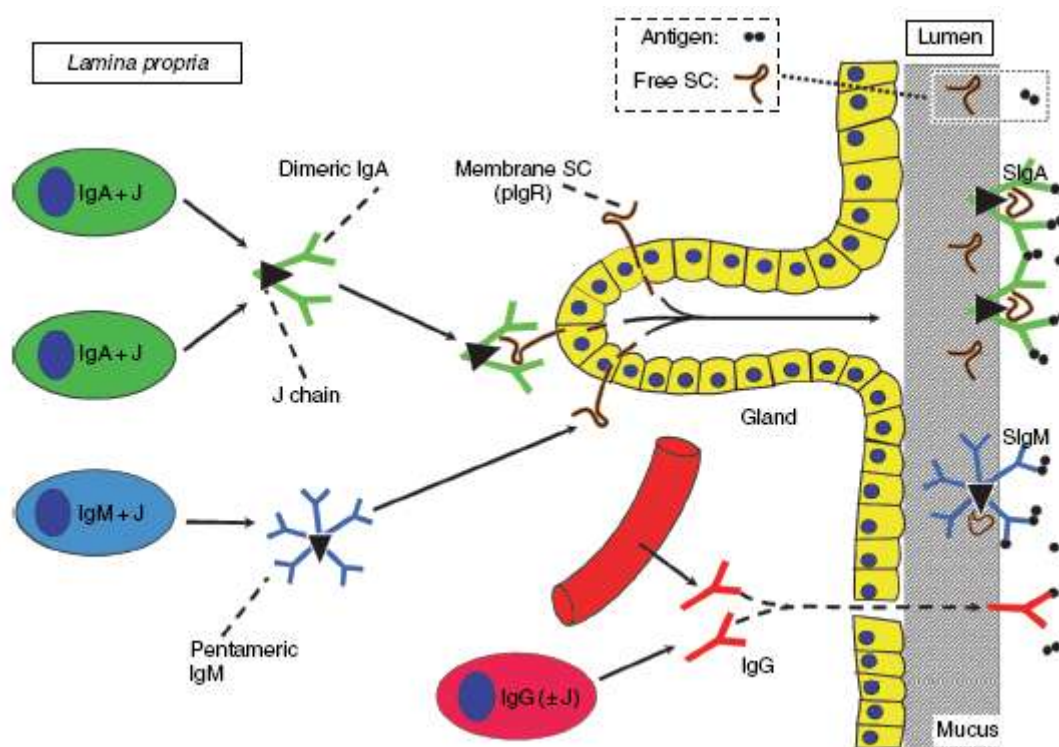


Figure 45: Synthèse d'Ig dimérique (IgA) ou polymériques (IgM) par les plasmocytes du chorion et sécrétion dans la lumière intestinale. D'après Brantzaeg et al, 2005

L'ensemble est transloqué à travers la cellule épithéliale dans la lumière intestinale. Ce processus de translocation (**Figure 46**) dépend d'une glycoprotéine transmembranaire exprimée au pôle basolatéral de la cellule épithéliale, et appelée récepteur aux immunoglobulines polymériques, pIgR. L'IgA dimérique et l'IgM polymériques se lient à ce récepteur de manière covalente. Le complexe est internalisé par endocytose, puis transporté par transcytose au pôle apical des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale et sécrété dans la lumière intestinale où une étape de protéolyse libère le récepteur (le composant sécrétoire) de l'Ig qui devient une Ig sécrétoire, Slg. Chaque jour, chez l'homme, approximativement 3g d'IgA sont ainsi sécrétés dans la lumière intestinale. Il semble que l'induction de la synthèse d'IgA soit indépendante des lymphocytes T auxiliaires.

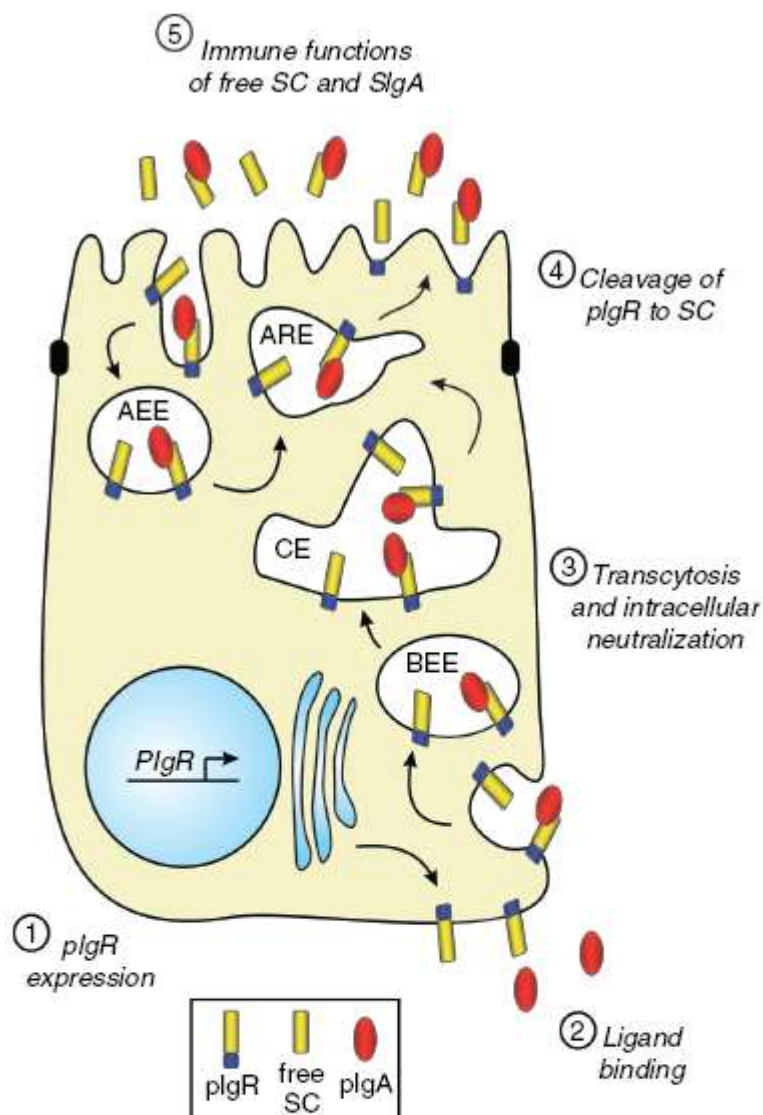


Figure 46 : Mécanisme de « transfert » des IgA via le récepteur aux immunoglobulines polymérique du récepteur exprimé au pôle basal de la cellule épithéliale colique. D'après Kaetzel et al, 2005

Ce système de translocation des Ig depuis le chorion vers la lumière intestinale ne représente pas seulement un moyen de « transport » des Ig. Il peut intéresser également les complexes Ig/antigènes pour des antigènes qui auraient réussi à franchir la barrière épithéliale (Kaetzel et al, 1994). De plus, les IgA ont la capacité de neutraliser la réplication virale dans la cellule épithéliale au cours du processus de transcytose (Burns et al, 1996).

Plusieurs expériences réalisées chez la souris montrent que les IgA seraient dirigées contre les micro-organismes du microbiote puisque chez les animaux spécifiquement dépourvus de micro-organismes pathogènes connus, l'induction et la

synthèse des IgA sécrétoires persiste (MacPherson et al, 2000). Différents effets indirects sur les micro-organismes du microbiote ont été observés. La sécrétion des anticorps limite la translocation bactérienne, mesurée par le nombre de micro-organismes vivants présents dans les ganglions mésentériques (Macpherson et al, 2004b), vraisemblablement en augmentant l'encombrement stérique des particules microbiennes. Les bactéries sont en effet « enrobées » d'IgA sécrétoires, empêchant l'action d'éventuelles adhésines bactériennes (Van der Waaij et al, 1996). Les IgA sécrétoires semblent contrôler la composition de la flore intestinale puisque des souris transgéniques AID $-/-$ (molécule impliquée dans la commutation isotypique IgM-IgA) dépourvues d'IgA présentent une expansion du nombre de bactéries filamenteuses dans la lumière intestinale responsable d'une stimulation de la réponse immunitaire (hyperplasie des FLI, des follicules lymphoïdes des ganglions mésentériques) (Suzuki et al, 2004). Enfin, paradoxalement, les IgA peuvent faciliter la translocation bactérienne, en regard des plaques de Peyer ou des follicules lymphoïdes isolés où les cellules M, situées dans l'épithélium sus-jacent, possèdent un récepteur aux IgA (Corthesy, 2007).

3.2. Rôles de la flore intestinale dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse

La liste des fonctions bénéfiques des micro-organismes du microbiote sur la muqueuse intestinale ne cesse de s'accroître. À côté de la fermentation de substrats glucidiques non digestibles à l'origine d'une source d'énergie non négligeable pour la cellule épithéliale, les micro-organismes du microbiote sont impliqués dans le maintien d'une barrière épithéliale fonctionnelle efficace, et dans le développement et le fonctionnement du système immunitaire de la muqueuse intestinale.

3.2.1. Influence de la flore intestinale sur les cellules épithéliales

L'étude du mutualisme entre la flore bactérienne intestinale et l'hôte a une longue histoire. En effet, ce concept de mutualisme n'est pas nouveau et date de

l'ère pasteurienne. La relation symbiotique entre l'hôte et les bactéries du microbiote se situe à plusieurs niveaux.

3.2.1.1. Méthodes d'étude

3.2.1.1.1. Les modèles de culture cellulaire

Le microbiote représente une « barrière » microbienne limitant l'invasion des micro-organismes pathogènes présents éventuellement dans la lumière intestinale. Cette propriété a été démontrée pour certaines souches bactériennes par plusieurs expériences *in vitro* à partir de modèles de culture de cellules épithéliales intestinales. L'équipe de Servin a montré, par exemple, que quelques souches de *bifidobacterium*, bactérie Gram+ anaérobie appartenant au microbiote, étaient capable d'inhiber l'invasion d'une monocouche de cellules épithéliales issues de la lignée Caco-2 par *Salmonella typhimurium* et de tuer les bactéries pathogènes ayant au préalable pénétré la monocouche cellulaire (Liévin et al, 2000). La même équipe montre que *Lactobacillus acidophilus* LB diminue également l'invasion apicale de la monocouche de cellules épithéliales issues de la lignée Caco-2 (clone TC7) par *Salmonella typhimurium*, inhibe sa croissance intra-cellulaire et inhibe la sécrétion d'IL8 induite par l'adhérence de *Salmonella typhimurium* aux cellules épithéliales (Coconnier et al, 2000). Wehkamp et al. ont par ailleurs montré que la souche Nissle 1917 d'*Escherishia coli*, comme d'autres bactéries du microbiote comme *Lactobacillus*, est capable d'induire l'expression de la $\beta 2$ défensine par les cellules épithéliales issues de la lignée Caco-2 (Wehkamp et al, 2004a), contribuant ainsi à la défense immunitaire innée de la barrière épithéliale intestinale.

3.2.1.1.2. Les modèles animaux

L'importance de la flore intestinale dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale a été mise en évidence notamment en comparant des animaux

dépourvus de flore intestinale ou axéniques (élevés en conditions stériles dans des isolateurs) avec des animaux génétiquement identiques abritant une flore intestinale. Brièvement, l'élevage de ce type d'animaux débute par la collecte et l'introduction dans les isolateurs d'utérus de femelles gravides. La descendance, axénique est élevée en isolateur sur plusieurs générations. Ces conditions d'élevage, en atmosphère contrôlée permettent aussi, par inoculation d'une ou plusieurs souches bactériennes commensales ou pathogènes, de manipuler la flore (animaux gnotoxéniques).

Les animaux axéniques perdent du poids (ils excrètent 90% de calories en plus dans les fèces que ne le font les animaux conventionnels) (Wostmann et al, 1983), la vitesse du transit intestinal est ralentie, et la structure et le renouvellement de l'épithélium colique sont modifiés chez les animaux axéniques. Ceux-ci présentent une dilatation du caecum et une atrophie marquée de la muqueuse colique (Alam et al, 1994). Le nombre de cellules par cryptes est diminué d'environ 20%, intéressant notamment les cellules à mucus avec diminution significative de l'épaisseur du gel de mucus à la surface des cellules épithéliales (Enss et al, 1992 ; Alam et al, 1994 ; Kandori et al, 1996). La composition du mucus est d'ailleurs modifiée : le ratio entre les mucines neutres et les mucines acides dans le colon est plus élevé en conditions axéniques, et les sulfomucines sont plus nombreuses que les sialomucines (Szentkuti et al, 1990 ; Ens et al, 1992 ; Sharma et al, 1995 ; Hooper et al, 1999). La durée du cycle cellulaire est plus longue chez l'animal axénique (66 versus 50h chez l'animal conventionnel). Le renouvellement de l'épithélium colique apparaît donc ralenti en l'absence de flore (Alam et al, 1994).

Par ailleurs, l'équipe de Gordon et al montre que la colonisation du tractus intestinal d'une souris axénique par la bactérie anaérobie du microbiote *Bacteroides thetaiotaomicron* est suivie de la production de peptides antimicrobiens par la cellule épithéliale (Hooper et al, 2003).

3.2.1.1.3. Les études de génomique fonctionnelle

L'émergence des techniques de génomique fonctionnelle permettant d'analyser simultanément l'expression de milliers de gènes a permis de compléter les

connaissances sur cette relation étroite entre la flore et les cellules épithéliales. En effet, elle est capable de moduler l'expression génique des cellules épithéliales. Hooper et al. ont en effet montré récemment, en comparant les profils d'expression génique des cellules épithéliales et du chorion (isolées par microdissection laser sur coupes tissulaires congelées) de l'intestin grêle distal, de souris axéniques et de souris colonisées par la bactérie anaérobie du microbiote *Bacteroides thetaiotaomicron* à l'aide de puces à ADN, que la flore bactérienne du microbiote est capable de moduler de nombreux aspects de la physiologie intestinale de l'hôte. L'absence de flore s'accompagne en effet d'une variation de l'expression d'environ une centaine de gènes codant pour des protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires : le transport des nutriments et le métabolisme des enzymes impliquées dans la production d'énergie cellulaire, la fonction de barrière épithéliale avec la synthèse de peptides antimicrobiens, la réponse aux hormones, la composition de la matrice extra-cellulaire, et certaines voies de transduction du signal (Hooper et al, 2001 et 2003).

3.2.1.2. Etanchéité relative de la barrière épithéliale intestinale aux bactéries à l'état normal

La notion d'étanchéité de la barrière épithéliale est très relative puisque d'anciennes observations chez l'homme rapportent une translocation physiologique de produits bactériens et de bactéries à travers la barrière épithéliale sans déclencher de réponse intestinale inflammatoire. En effet, Shatten et al. rapportent la présence d'une bactériémie portale chez 7 patients sur 25 opérés par laparotomie pour diverses pathologies (cholécystite chronique, pancréatite chronique, ulcère gastrique...), le plus souvent des cocci Gram + (Schatten et al, 1955). De la même manière, Jacob et al rapportent la présence d'une endotoxémie portale chez 32 patients sur 34 patients, associée pour 1 malade à une bactériémie portale. De plus, 4 de ces patients présentaient une endotoxémie systémique dans un contexte d'hépatopathie pour 3 d'entre eux (Jacob et al, 1977). Ce passage dans la circulation systémique en cas de défaillance hépatique suggère un rôle de clairance hépatique des produits bactériens qui ont traversé la barrière épithéliale. Des expériences

réalisées chez l'animal ont en effet montré que cette endotoxémie portale était en condition physiologique rapidement éliminée par les cellules du système réticuloendothélial du foie (Ruitter et al, 1981).

3.2.1.3. Moyens de « communication » entre la cellule épithéliale intestinale et la flore intestinale : les récepteurs de type Toll (TLR)

Les micro-organismes qui ont réussi à pénétrer le gel de mucus et à résister aux agents antimicrobiens peuvent atteindre la barrière épithéliale. Leur reconnaissance par la cellule épithéliale se fait alors grâce à des récepteurs peu spécifiques de l'immunité innée, les PPR (Pattern recognition Receptor), représentés par les TLR (les récepteurs de type Toll) que nous allons détailler et les récepteurs NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain).

3.2.1.3.1. Définition des TLR

De découverte récente, les TLR sont des récepteurs impliqués dans la reconnaissance sélective des micro-organismes et le déclenchement d'une réponse immunitaire innée et adaptative. Leur découverte a permis une avancée considérable dans la compréhension des mécanismes de l'immunité innée. Initialement découverte chez *Drosophila melanogaster*, la protéine Toll est impliquée dans l'orientation de la polarité ventro-dorsale au stade embryonnaire. Toll a ensuite été identifié comme un récepteur pouvant initier une réponse immunitaire vis-à-vis d'un micro-organisme (Lemaitre et al, 1997). En 1997, l'équipe de Janeway rapporte le clonage de *human Toll*, premier homologue humain du gène *Toll* de la drosophile, qui sera par la suite appelé *TLR4* (Toll-like Receptor 4) (Medzhitov et al, 1997).

Actuellement, 10 récepteurs de type Toll ont été clonés chez l'homme et ont été nommés TLR 1 à 10 (Aderem et Ulevitch, 2000). Les récepteurs de type Toll sont des récepteurs transmembranaires de type I exprimés par un grand nombre de cellules. Ils appartiennent, avec les récepteurs NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain), aux 2 principaux récepteurs essentiels pour la

reconnaissance extra-cellulaire ou intra-cellulaire des motifs moléculaires portés par la myriade de micro-organismes du microbiote ou pathogènes présents dans la lumière intestinale. Alors que leur rôle dans la reconnaissance des micro-organismes pathogènes a été largement étudié, leurs interactions avec les micro-organismes du microbiote sont largement méconnues.

Actuellement, plus de 20 membres de la famille des récepteurs NOD ont été découverts. Néanmoins, les voies de signalisation induites par ce type de récepteur sont largement inconnues. Chez l'homme, 8 membres d'entre eux ont été identifiés dont NOD1 et NOD2. Il s'agit de récepteurs intracytoplasmiques qui reconnaissent les peptidoglycanes. NOD1 reconnaît plus particulièrement le tripeptide muramyl (iE-DAP, γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid) des bactéries Gram – (Girardin et al, 2003a) tandis que NOD2 reconnaît le dipeptide muramyl (MDP, Muramyl Dipeptide) commun au peptidoglycane de toutes les espèces bactériennes quelque soit leur caractéristiques de coloration au Gram (Girardin et al, 2003b). Les récepteurs NOD sont constitués d'un domaine C terminal riche en leucines (LRR), site de reconnaissance des PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern), d'un domaine N terminal CARD (Caspase recruitment domain) nécessaire à l'activation de la voie de signalisation NF κ B, et d'un domaine central d'oligomérisation, NBD (Carneiro et al, 2004) (**Figure 47**). Des mutations du gène codant pour NOD2 ont été mises en évidence chez 25 à 35% des patients atteints de maladie de Crohn (Newman et Siminovitch, 2005), associées entre autres à une diminution de synthèse des α défensines par les cellules de Paneth (Wehkamp et al, 2004b) (voir paragraphe 2.1.3.)

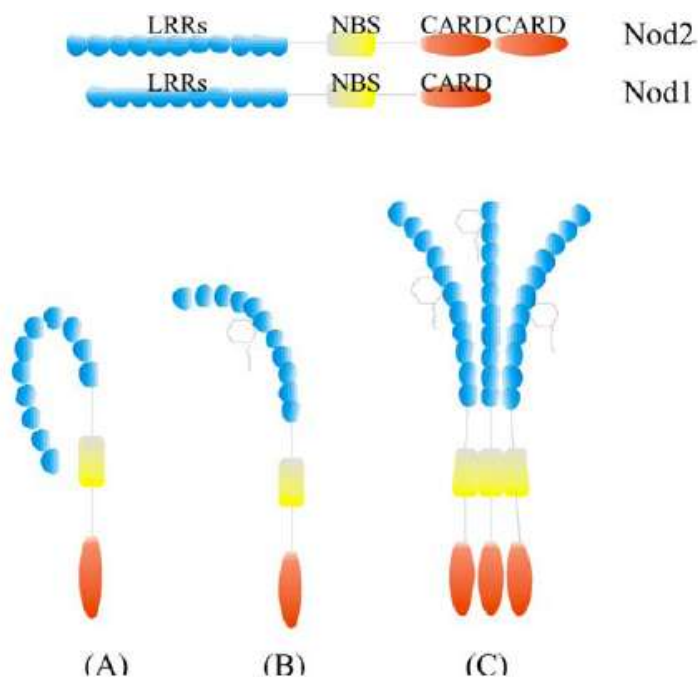


Figure 47 : Les différents domaines de NOD1 et NOD2. A) A l'état de base, le domaine LRR est replié prévenant ainsi l'oligomérisation et l'activation des protéines NOD. B) La liaison d'un ligand entraîne le « dépliement » de la protéine, permettant l'oligomérisation et l'activation (C). D'après Carneiro et al, 2004

Les TLR ont fait l'objet d'études plus approfondies et détaillées. Ils sont constitués d'un domaine extra-cellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intra-cellulaire (**Figure 48**).

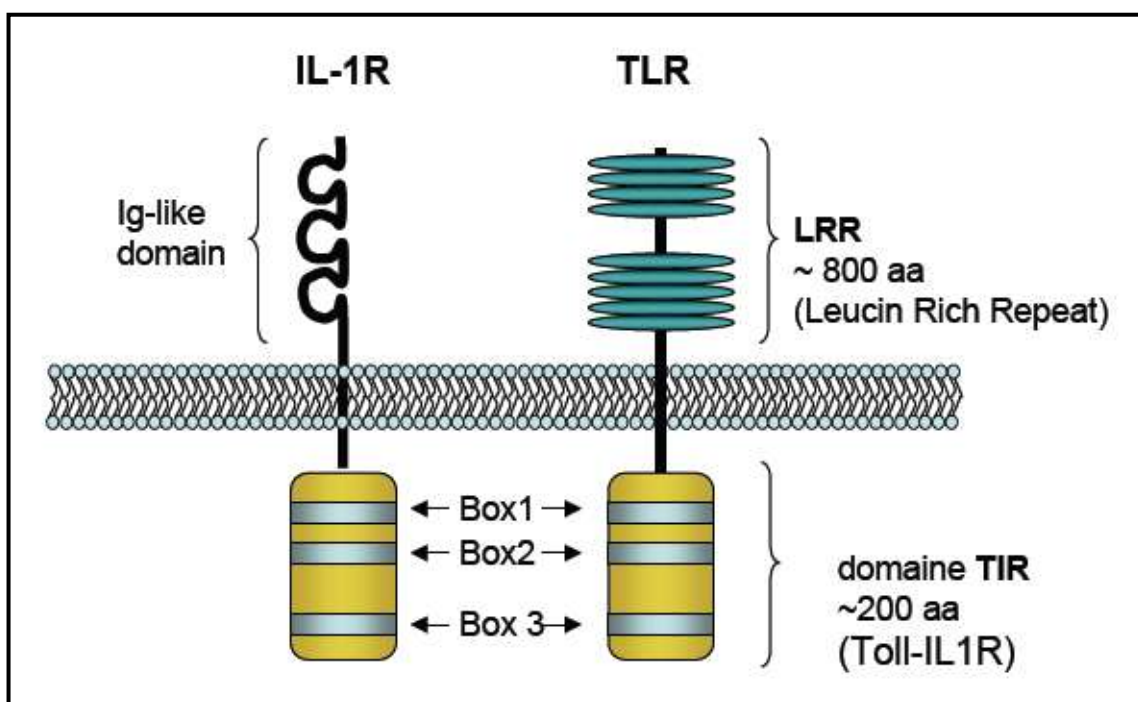


Figure 48: Structure des TLR. Un domaine extra-cellulaire riche en leucines, un domaine transmembranaire, et un domaine intra-cellulaire homologue à celui du récepteur à l'IL1 appelé domaine TIR

La partie extracellulaire est composée de motifs répétés riches en leucine (LRR : Leucine Rich Repeat) ; de tels motifs sont fréquemment retrouvés dans la séquence de plusieurs récepteurs de l'immunité. Le domaine transmembranaire contient un domaine riche en cystéines. Le domaine intracellulaire est homologue à celui du récepteur à l'interleukine 1 et est appelé domaine TIR (Toll Interleukine-1 Receptor). Ce domaine TIR a été remarquablement conservé durant l'évolution, et induit l'activation de voies de signalisation que nous allons détailler au paragraphe suivant.

Les TLR humains diffèrent les uns des autres essentiellement au niveau de leur domaine extracellulaire, c'est-à-dire la partie du récepteur impliquée dans la reconnaissance spécifique des PAMP, ces motifs moléculaires très conservés au cours de l'évolution, exprimés par les micro-organismes (et souvent communs à de nombreuses espèces) et absents chez les eucaryotes supérieurs. Ces motifs sont généralement essentiels à la survie des micro-organismes, limitant ainsi l'apparition de mutants pouvant échapper à la reconnaissance (Medzhitov et al, 1997). Ces motifs correspondent par exemple au LPS (lipopolysaccharide), complexe macromoléculaire toxique présent de manière constitutive dans la membrane externe de toutes les bactéries à Gram négatif (reconnu par TLR4), au peptidoglycan (TLR2/6), à l'acide lipoteïchoïque (LTA) (TLR2/6), à la flagelline caractéristique des bactéries flagellées (TLR5) ou aux îlots CpG non méthylés de l'ADN des procaryotes (TLR9) (**Figure 49**).

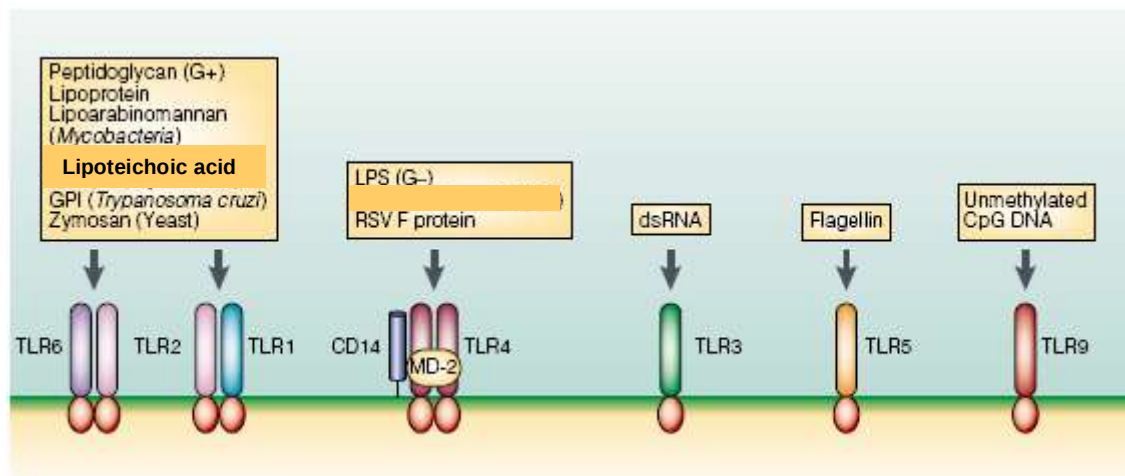


Figure 49 : Les TLR reconnaissent une grande variété de PAMP, en particulier le LPS. Sa reconnaissance est facilitée par 2 protéines accessoires, CD14 et MD-2. D'après Medzhitov et al, 2001

Ces récepteurs transmembranaires sont exprimés à la surface cellulaire (TLR1, 2, 4, 5, 6) ou ont une expression endosomiale (TLR3, 7, 8, 9) (**Figure 50**). Chez l'homme, les TLR2 et TLR4 sont de loin les plus étudiés.

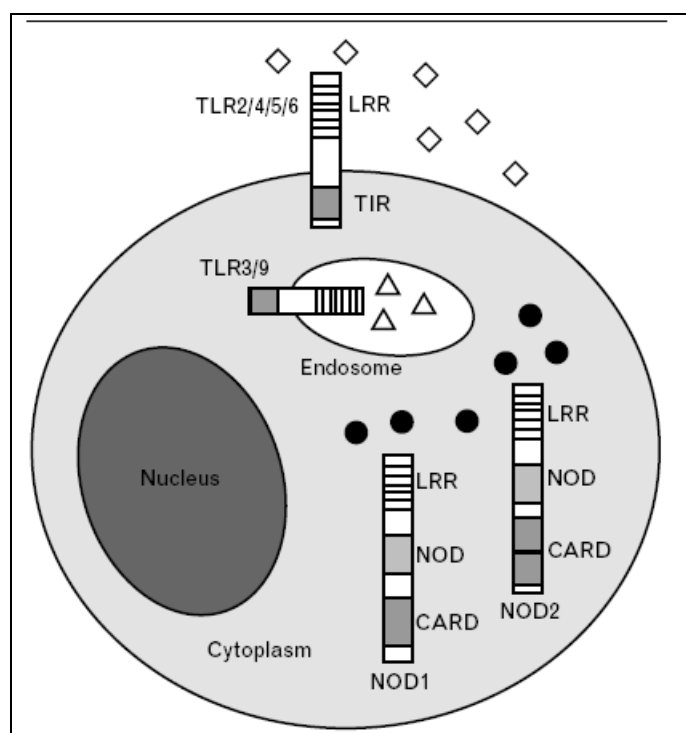


Figure 50: Localisation cellulaire des différents TLR et des récepteurs NOD. Les TLR et les récepteurs NOD sont les 2 principaux groupes de récepteurs cellulaires impliqués dans la reconnaissance des différents motifs moléculaires portés par les micro-organismes pathogènes ou du

microbiote. Les TLR sont exprimés soit à la surface cellulaire où ils reconnaissent les motifs microbiens présents dans la lumière intestinale, soit dans les endosomes où ils reconnaissent les motifs microbiens phagocytés (▲). Les récepteurs NOD sont localisés dans le cytoplasme où ils reconnaissent les motifs microbiens présents dans le cytoplasme (●). D'après Eckmann et al, 2006

Dans l'intestin humain, les différents TLR sont exprimés par les cellules qui interviennent dans la défense de l'organisme : les cellules immunitaires du chorion (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes) et les cellules épithéliales intestinales (Iwasaki et Medzhitov, 2004 ; Abreu et al, 2005 ; Hart et al, 2005) (**Tableau 7**).

TLRs	Large intestine
1	+ RNA (8, 9) (function unknown)
2	+ RNA (8, 9) (function unknown)
3	+ Protein (89) RNA (9) (function unknown)
4 (MD2)	+ RNA (5), protein (89), RNA (9) (function unknown)
5	+ Protein (89), RNA (9) (function unknown)
6	+ RNA (8, 9) (function unknown)
7	+ RNA (9) (function unknown)
8	+ RNA (9) (function unknown)
9	+ RNA (9) (function unknown)
10	Not expressed (91)

Tableau 7: Expression des TLR dans la muqueuse colique humaine (*in vivo* ou cellules isolées). D'après Abreu et al, 2005

Ref 8 :Mehmed et al, 2003

Ref 9 :Otte et al, 2004

Ref 89 :Cario et Podolsky, 2000

Les cellules épithéliales intestinales humaines normales expriment (ARNm) les TLR 1 à 6, peu TLR7 et n'expriment pas TLR10 (Otte et al, 2004). En immunohistochimie, sur coupes tissulaires, les quelques anticorps disponibles et suffisamment sensibles ne permettent de détecter l'expression et surtout la localisation que de certains TLR : TLR4 (expression faible, membranaire), TLR3 et TLR5 (expression cytoplasmique) (Cario et Podolsky, 2000), TLR9 (expression membranaire) (Lee et al, 2006). L'expression des TLR a surtout été analysée sur les cellules épithéliales issues des différentes lignées plus ou moins différenciées de cancer colorectal humain (**Tableau 8**). Par exemple, certains auteurs retrouvent une expression au pôle apical de TLR2 et TLR4 dans Colo 205 et SW480 (Otte et al, 2004), et dans T84 (uniquement au stade bien différencié) (Cario et al, 2002), et une

expression de TLR5 au pôle baso-latéral par T84 (Gewirtz, 2001). En revanche, Caco 2 et HT29 qui expriment TLR2 n'expriment pas ou très faiblement TLR4 (Abreu et al, 2001).

TLRs	SW480	Caco2	T84	HT-29
1	+ RNA, protein (9)	+ RNA (low level) (8)	+ RNA (8)	+ RNA (8)
2	+* (9), (36)	+ RNA, protein (92), + RNA (5), poorly responsive to ligands (6, 8), ND	+ RNA, (-protein) poorly responsive to ligands (8), +protein (92)	+ RNA, poorly responsive to ligands (8)
3	+ RNA, protein (9)	ND	+ RNA (92)	+ RNA, not detectable at protein level (92)
4 (MD2)	+* (9), (7), (36)	+ RNA, not functional (5, 6), + protein (92)	+* Very low level expression, not functional (5) (92)	+* Very low level expression, not functional (5-7)
5	+ RNA, protein (9)	+ Functional (93)	+ Protein (basolateral expression) functional (10)	+ HT-29/19A, functional (93)
6	+ RNA, protein (9) (36)	+ RNA low level, poorly responsive to ligands (8)	+ RNA, poorly responsive to ligands (8)	+ RNA, poorly responsive to ligands (8)
7	+ RNA, protein (9)	ND	ND	ND
8	+ RNA, protein (9)	ND	ND	ND
9	+ RNA, protein (9)	ND	ND	+ Protein (31) functional (secretion of IL-8) (94)
10	+ RNA, protein (9)	ND	ND	± RNA (91)

Tableau 8: Expression des TLR dans les principales lignées cancéreuses coliques humaines.
D'après Abreu MT, 2005

3.2.1.3.2. Les TLR suscitent une réponse pro-inflammatoire

Les TLR peuvent activer plusieurs mécanismes de l'immunité innée tels que la phagocytose, la synthèse de peptides antimicrobiens, et participer à l'induction d'une réponse immunitaire adaptative via la synthèse de cytokines, de chimiokines et de molécules de co-stimulation (Iwasaki et Medzhitov, 2004).

Des expériences réalisées *in vitro* sur la lignée cellulaire humaine de monocytes THP-1 transfectés par un mutant de TLR4 constitutivement actif ont montré que l'activation de TLR4 est responsable de l'induction de plusieurs gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1, l'IL6, des chimiokines comme l'IL8 participant au recrutement des polynucléaires sur le site de l'agression, et des molécules de co-stimulation, comme B7.1, nécessaires à l'activation des lymphocytes T naïfs (Medzhitov et al, 1997). Concernant la cellule épithéliale intestinale, des études *in vitro* ont montré que l'exposition de certaines lignées cancéreuses coliques humaines (comme HT29 ou SW480) au LPS était responsable d'une activation de NFkB (Cario et al, 2000), et de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL8 (Funda et al, 2001 ; Otte et al, 2004). Ces données

suggèrent que la cellule épithéliale peut initier une réponse inflammatoire via l'activation des TLR qu'elle exprime.

Cette réponse inflammatoire passe par l'activation de différentes voies de signalisation en fonction de l'interaction du domaine TIR avec différentes protéines adaptatrices comme MyD88, MAL/TIRAP, TRIF/TICAM-1 ou TRAM/TIRP/TICAM-2, ces protéines activant 2 principales voies de signalisation passant par les MAPKinases (Mitogen-Activated Protein Kinases) ou NFkB (Kawai et Akira, 2007). La voie de signalisation la mieux caractérisée est celle de l'activation du facteur de transcription NFkB. Après stimulation d'un TLR, MyD88 est recruté au niveau du domaine TIR et induit la phosphorylation de la kinase IRAK (IL-1 receptor-associated kinase) et l'activation de la molécule TRAF6 (TNF-receptor-associated factor 6). L'activation de TRAF6 entraîne la phosphorylation des kinases IKK [IkB (Inhibitor of NFkB) kinases] ce qui permet la translocation nucléaire des sous-unités p50/p65 de NFkB. Après activation de TRAF6, la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase), point de convergence de nombreux signaux cellulaires initiés à la membrane, peut être elle aussi activée et aboutit à l'activation du facteur de transcription AP-1. L'activation de ces 2 voies de signalisation, NFkB et MAPK, est à l'origine de plusieurs réponses cellulaires, notamment de type inflammatoire. (**Figure 51**).

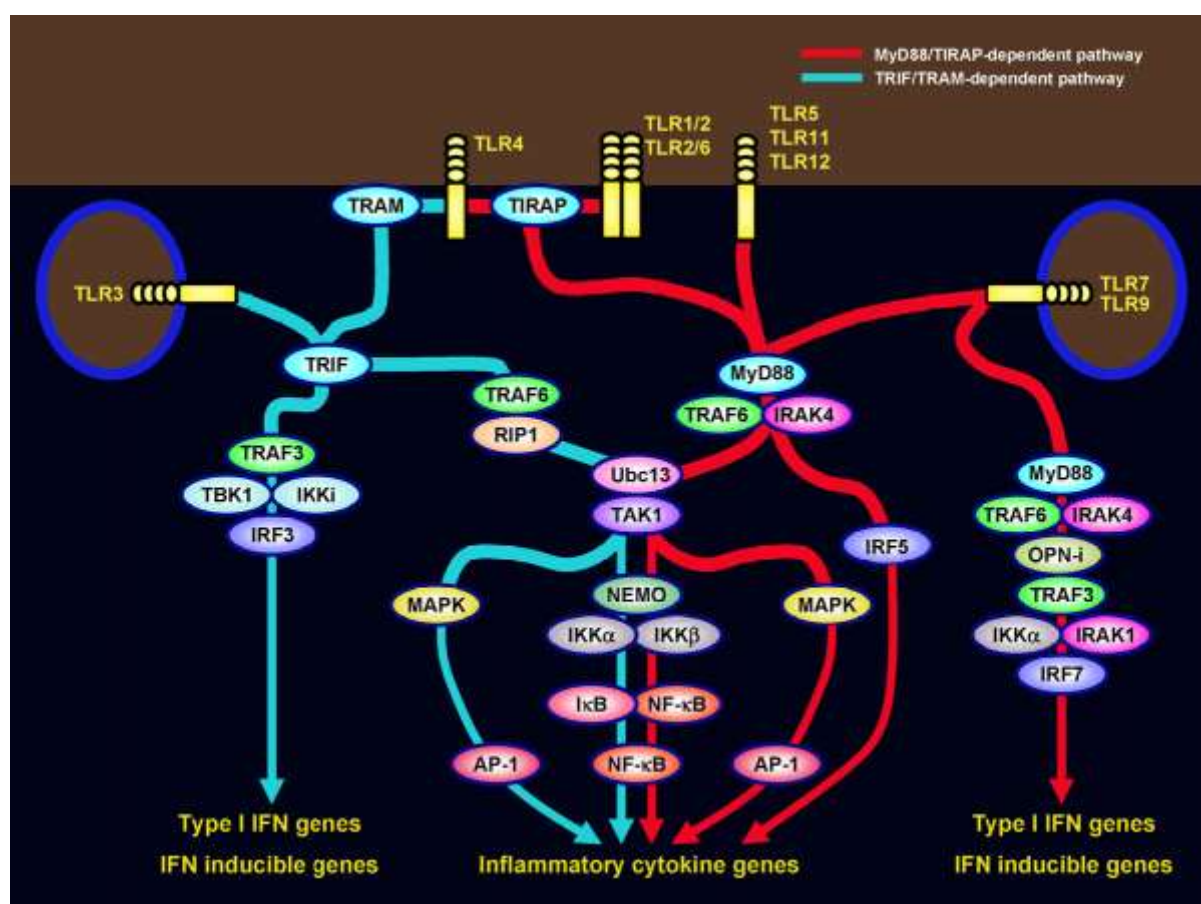


Figure 51 : Voie de signalisation induite par l'activation du TLR4 (d'après Kawai et Akira, 2007)

3.2.1.4. TLR et mutualisme

Malgré une proximité immédiate entre la flore bactérienne et les cellules immunitaires résidentes du chorion, la muqueuse intestinale normale n'est pas inflammatoire. En effet, le chorion, en conditions physiologiques, est dénué de polynucléaires neutrophiles. Les cellules épithéliales, avec les cellules dendritiques, sont les principaux « interlocuteurs » entre les micro-organismes présents dans la lumière intestinale (pathogènes et du microbiote) et les cellules immunitaires du chorion. Ces micro-organismes, qu'ils soient pathogènes ou du microbiote, sont reconnus par les mêmes récepteurs, en particulier les TLR. Néanmoins, ce mode de reconnaissance identique (puisque les PAMP portés par les micro-organismes ne sont pas spécifiques des pathogènes) semble entraîner des réponses totalement opposées : réponse inflammatoire aiguë contre les micro-organismes pathogènes,

tolérance et protection de la muqueuse intestinale pour les micro-organismes du microbiote.

La compréhension des voies de signalisation induites par les TLR dans la cellule épithéliale intestinale est limitée par l'absence d'anticorps fiables permettant d'analyser l'expression et la localisation cellulaire de ceux-ci, et l'incapacité d'étudier *in vivo* sur le plan fonctionnel ces voies de signalisation. Les informations dont nous disposons dans la littérature sont issues d'études *in vitro*.

La reconnaissance des micro-organismes du microbiote par les cellules épithéliales via les TLR est indispensable pour assurer l'homéostasie de la barrière intestinale et la protéger des agressions. En effet, Rakoff-Nahoum et al. montrent que des souris invalidées pour les gènes codant pour MyD88 (Myeloid Differentiation factor 88, molécule adaptatrice associée aux TLR, indispensable à l'induction de cytokines pro-inflammatoires), TLR2 ou TLR4 présentent une importante perte de poids associée à de multiples ulcérations de la muqueuse colique, puis une mortalité accrue après administration dans l'eau de boisson de faible dose de DSS (Dextran Sodium Sulfate), agent connu pour être directement toxique pour l'épithélium intestinal, comparativement aux souris sauvages présentant peu de morbidité. De plus, les auteurs montrent dans cette étude que les explants de muqueuse colique des souris MyD88 *-/-* sont incapables d'induire la sécrétion de cytokines comme l'IL6 ou le TNF avant et après administration de DSS, comparativement aux souris sauvages. Les mêmes résultats sont obtenus en administrant des antibiotiques aux souris sauvages pour stériliser le contenu de la lumière intestinale. A l'inverse, l'administration dans l'eau de boisson de produits bactériens comme le LPS (ligand de TLR4) ou l'acide lipotéichoïque (ligand de TLR2) permet aux souris sauvages déplétées en flore bactérienne de retrouver une protection de la muqueuse vis-à-vis du DSS (Rakoff-Nahoum et al, 2004).

A côté de cet effet protecteur sur la barrière épithéliale envers les agressions, chimiques notamment, les TLR, via le microbiote ou leurs produits, sont impliqués dans l'intégrité de cette barrière épithéliale intestinale en induisant l'assemblage des jonctions serrées. En effet, l'équipe de Podolsky montre sur les lignées Caco-2 et HT29 cultivées sur filtre, que l'activation de TLR2 induit une augmentation de la

résistance transépithéliale associée à une redistribution apicale de la protéine ZO-1, associée aux jonctions serrées (Cario et al, 2004). La même équipe montre sur des explants de muqueuse colique issues de souris invalidées pour les gènes codant pour MyD88 ou TLR2 après traitement par le DSS, une disparition de la protéine ZO-1 au niveau des jonctions serrées et une dislocation du complexe membranaire d'adhérence intercellulaire lié à la E-cadhérine, anomalies non observées chez les souris sauvages ou les souris invalidées non traitées par le DSS (Cario et al, 2007).

Les mécanismes selon lesquels la muqueuse intestinale dans son ensemble discrimine les bactéries « bénéfiques » des bactéries pathogènes restent largement inconnus. Plusieurs hypothèses sont avancées : 1) la compartimentalisation des TLR, absents au pôle apical, redistribués au pôle basolatéral, peut-être secondaire à un rétrocontrôle négatif induit par le ligand, 2) la synthèse de molécules régulatrices ou inhibitrices de la cascade de signalisation des TLR, ou 3) la production de cytokines anti-inflammatoires dites tolérogènes comme l'IL10 ou le TGF β .

La polarisation des signaux de la réponse innée semble très importante dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse. Par exemple, Lee et al. ont montré très récemment que la stimulation du pôle apical de cellules épithéliales par des ligands spécifiques de TLR9 inhibe la voie de signalisation NF κ B par inhibition de la dégradation d'I κ B, alors que la stimulation du pôle basolatéral de ces mêmes cellules épithéliales entraîne une dégradation d'I κ B et une activation de NF κ B (Lee et al, 2006). Abreu et al montrent par ailleurs que l'expression membranaire de TLR4 (ARNm, protéine) est très faible dans la cellule épithéliale, et que l'expression de la molécule accessoire MD-2 (indispensable à l'activation de la voie de signalisation induite par TLR4 après stimulation par le LPS) est indétectable dans les lignées Caco-2, HT29 et T84, expliquant la non-réponse de ces 3 lignées au LPS (Abreu et al, 2001). Cette faible expression du TLR4 et cette absence d'expression de MD-2 sont retrouvées dans l'épithélium colique normal (ARNm et protéine) (Cario et al, 2000 ; Cario et Podolsky, 2000; Abreu et al, 2002).

Plusieurs études suggèrent que le microbiote, par une activation permanente des TLR, régule leur expression membranaire. En effet, la colonisation de souris axéniques par *Enterococcus faecalis* entraîne une activation précoce et transitoire de NF κ B via TLR2, et l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-

inflammatoires. Néanmoins, cette induction de NF κ B n'entraîne morphologiquement aucune lésion inflammatoire et est associée à une diminution d'expression de TLR2 par les cellules épithéliales (Ruiz et al, 2005). Lee et al montrent que la stimulation de la lignée Caco-2 au pôle apical par un ligand spécifique de TLR9 entraîne une inhibition de NF κ B par défaut de dégradation de I κ B. Par contre, la stimulation de Caco-2 au pôle baso-latéral restaure la dégradation d'I κ B, ce qui permet la translocation nucléaire de NF κ B et la synthèse d'IL8. Les niveaux d'expression de TLR9 sur Caco-2 sont identiques au pôle apical et au pôle baso-latéral (Lee et al, 2006). Des études sur d'autres lignées cancéreuses coliques humaines (Colo 205, SW480 et T84) montrent que l'exposition prolongée (24h) de ces lignées avec le LPS ou l'acide lipotéichoïque entraîne une réaction de «tolérance croisée» à ces 2 ligands dès 6h d'exposition. En effet, une deuxième exposition est incapable d'induire l'activation de la voie MAPKinase et la synthèse d'IL8 après l'arrêt de la première exposition. Cette « anergie » dure environ 24h. Ce mécanisme de «tolérance» passe par une diminution d'expression au pôle apical des TLR2 et 4, mais aussi par une surexpression de la protéine inhibitrice Tollip (Toll-interacting protein) (Otte et al, 2004) connue pour interférer avec la protéine IRAK (IL-1R-activated kinase) (Zhang et Ghosh, 2002).

Plusieurs autres expériences montrent également l'expression de molécules inhibitrices des voies de signalisation NF κ B, ou MAPK, induites par les TLR, possiblement à l'origine d'une «tolérance» des micro-organismes du microbiote par les cellules épithéliales. Par exemple, Melmed et al montrent que les 3 lignées cellulaires HT29, Caco-2 et T84 ne répondent pas à l'activation du TLR2 par plusieurs ligands spécifiques (comme l'acide lipotéichoïque ou le peptidoglycane) bien qu'elles expriment au pôle apical ce TLR. Elles expriment en revanche fortement l'inhibiteur de la protéine IRAK, Tollip (Melmed et al, 2003). TIR8 (Toll/IL-1R 8), protéine inhibitrice de la voie de signalisation induite par l'activation de IL-1R mais aussi de TLR4 en interférant directement avec la liaison de TRAF6 et d'IRAK, est fortement exprimée dans les lignées HT29 et T84, et est responsable d'une non-réponse des cellules épithéliales au LPS, à l'IL1 ou à l'IL18 (Wald et al, 2003).

3.2.2. Influence de la flore intestinale sur les cellules immunitaires du chorion

La complexité des interactions entre les cellules de la muqueuse intestinale, en particulier les cellules immunitaires, et le microbiote a rendu extrêmement difficile leur étude chez l'homme. C'est pour cette raison que la plupart des données disponibles ont été obtenues à partir de modèles animaux. En 1968, Perey et Good montrent que la ligature chirurgicale de la lumière appendiculaire (préservant la circulation sanguine et lymphatique) réalisée dès la naissance chez des lapins pour prévenir la colonisation bactérienne à partir du colon était responsable de l'absence de développement des follicules lymphoïdes du chorion de la muqueuse appendiculaire. La restauration de la flore caecale dans la lumière appendiculaire était suivie, 3 semaines après, par le développement des follicules lymphoïdes (Perey et Good, 1968). Par la suite, le développement des techniques d'élevage d'animaux axéniques en isolateurs a permis la comparaison de ces animaux avec des animaux conventionnels ou à flore contrôlée, et le décryptage encore loin d'être complet des interactions complexes à l'origine d'une relation symbiotique entre le microbiote et l'hôte.

La première différence à être caractérisée entre ces 2 groupes d'animaux a été la production d'IgA : le taux d'IgA sécrétoire mesuré dans la muqueuse intestinale des animaux axéniques est significativement plus bas que chez les animaux conventionnels, ces taux se normalisant en quelques semaines après colonisation bactérienne de l'intestin (Benveniste et al, 1971). Par ailleurs, les plaques de Peyer sont hypoplasiques, dépourvues de centres germinatifs ou centrées par des centres germinatifs rudimentaires. Le nombre de lymphocytes T CD4 dans le chorion est réduit, ainsi que le nombre de LIE CD8 (Macpherson et al, 2001). Ces anomalies morphologiques sont de plus accentuées chez les animaux axéniques nourris avec des aliments purifiés ne contenant que des acides aminés, des glucides et des lipides, par rapport à des animaux nourris avec des aliments autoclavés dans lesquels peuvent persister des produits bactériens. D'autre part, ces anomalies ne sont pas limitées à la muqueuse intestinale, mais s'étendent aussi à la rate et aux ganglions mésentériques (Hooijkaas et al, 1984). L'équipe de Cebra a étudié, chez la souris axénique, la séquence des modifications du système immunitaire

consécutives à la recolonisation du tractus digestif par des bactéries du microbiote. Initialement, la production d'IgA est très faible et les bactéries peuvent être retrouvées vivantes après mise en culture d'extraits tissulaires de rate ou de ganglion mésentérique plus de 100 jours après la colonisation, suggérant une invasion bactérienne. La disparition de ce processus coïncide avec l'apparition des IgA sécrétoires, mais aussi avec l'augmentation du nombre de lymphocytes T CD4 et de macrophages activés dans le chorion, ainsi que du nombre de LIE (Shroff et al, 1995). Cette recolonisation bactérienne expérimentale de l'intestin de souris axénique reproduit en quelque sorte la colonisation microbienne du tube digestif du nouveau-né juste après sa naissance. Ce rôle majeur du microbiote dans l'induction du développement du GALT ne semble pas médié par toutes les bactéries, mais seulement par certaines espèces, isolées (Shroff et al, 1995 ; Talham et al, 1999) ou associées à d'autres espèces spécifiques (Rhee et al, 2004), mettant en évidence les relations très complexes qui existent au sein de cette niche écologique.

Le microbiote, en plus de ses capacités à induire le développement du GALT, semble également intervenir dans la régulation de la réponse immunitaire adaptative. L'équipe de Stagg a montré en effet que l'ajout d'un probiotique, renfermant 8 souches différentes de bactéries du microbiote, au milieu de co-culture de cellules dendritiques issues du chorion de muqueuse colique humaine normale associées à des lymphocytes T CD4 naïfs allogéniques est associé à une production accrue d'IL10 et une diminution d'IL12 par les cellules dendritiques, et inhibe la génération de lymphocytes T auxiliaires de type Th1 caractérisés par la production d'IFN γ (Hart et al, 2004). Ce contrôle de l'expression de l'IL12, cytokine produite par les cellules dendritiques en réponse à des micro-organismes pathogènes, est considéré comme un des éléments essentiels qui concourent à l'état de tolérance qui caractérise la muqueuse intestinale (Duchmann et al, 1996).

3.3. Les interactions cellules épithéliales / cellules immunitaires du chorion dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale

Pendant de nombreuses années, la cellule épithéliale intestinale était considérée comme faisant partie d'une barrière épithéliale totalement passive envers

les nombreux antigènes présents dans la lumière intestinale. Ces 20 dernières années, les différentes études s'intéressant à l'immunité et à l'homéostasie de la muqueuse intestinale ont fini par bouleverser totalement ce concept et à démontrer la participation active des cellules épithéliales dans l'immunorégulation de la muqueuse sous-tendue par des interactions complexes avec les cellules immunitaires. Ces études expérimentales, réalisées *in vitro*, essentiellement à partir de modèles de co-cultures cellulaires, ont apporté plusieurs arguments suggérant le potentiel des cellules épithéliales à apprêter (« antigen processing ») et à présenter l'antigène aux cellules immunitaires du chorion, et à activer ou à réguler la réponse de ces cellules via la sécrétion de cytokines et de chimiokines.

Blumberg et al ont montré initialement que les cellules épithéliales exprimaient, dans le cytoplasme et au niveau de la membrane du pôle baso-latéral, des molécules apparentées aux molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) comme le CD1d, par immunohistochimie sur coupes tissulaires de muqueuse intestinale humaine normale (Blumberg et al, 1991). Ces molécules, associées à des molécules de co-stimulation comme la gp180 et le CD58 (Framson et al, 1999) sont capables d'activer, dans des expériences de co-culture de cellules épithéliales et de lymphocytes T circulants, des lymphocytes T CD8⁺ caractérisés par des fonctions suppressives (inhibition de la prolifération de lymphocytes T CD4⁺) (Allez et al; 2002). Dans le même temps, d'autres études ont montré une faible expression constitutive de molécules de classe II du CMH (HLA-DR et HLA-DQ) au pôle basolatéral des cellules épithéliales (Mayrhofer et Spargo, 1989), cette expression augmentant dans un contexte inflammatoire sous l'influence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ (Mayer et al, 1991). *In vitro*, dans ce contexte inflammatoire uniquement, les cellules épithéliales exprimant ces molécules ont la capacité de stimuler la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ (Hershberg et al, 1997). Ces études suggèrent que les cellules épithéliales sont capables de présenter l'antigène aux cellules immunitaires du chorion et de les activer différemment en fonction du contexte, inflammatoire ou non.

L'équipe de Rescigno a montré plus récemment que la culture de cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes circulants dans le surnageant du

milieu de culture de cellules épithéliales différenciées, Caco2, entraîne l'induction de cellules dendritiques « non-inflammatoires ». Ces cellules dendritiques sont en effet incapables de sécréter de l'IL12 et d'induire une réponse lymphocytaire de type Th1 en réponse à une bactérie pathogène. Par contre, elles sont capables de sécréter de l'IL10 et d'induire une réponse de type Th2. Ce contrôle de l'équilibre Th1/Th2 par la cellule épithéliale, via la cellule dendritique, se fait entre autre par l'intermédiaire d'un facteur soluble, synthétisé de manière constitutive par la lignée Caco2, le TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) (Rimoldi et al, 2005 ; Zeuthen et al, 2008). Cette cytokine, isolée initialement à partir d'une lignée murine de cellules stromales thymiques, et dont le gène a été cloné en 2000 par Sims et al, serait impliquée dans la croissance et la différenciation des cellules pré-B en cellules B (Sims et al, 2000).

Par ailleurs, plusieurs études montrent que des cellules épithéliales isolées de muqueuse colique humaine normale synthétisent et sécrètent *in vitro*, après stimulation, des chimiokines comme l'IL8 (Jung et al, 1995 ; Branka et al, 1997) qui attire les polynucléaires neutrophiles sur le site de l'agression, MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) (Jung et al, 1995) qui attire les monocytes/macrophages, ou RANTES (Yang et al, 1997) qui attire les lymphocytes T et les polynucléaires éosinophiles. La synthèse de ces chimiokines fait suite à une stimulation des cellules épithéliales par divers facteurs tels que l'IL1 β , une infection par des bactéries pathogènes invasives (*Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes*) ou des toxines bactériennes.

De plus, la cellule épithéliale colique humaine normale est également capable d'exprimer (ARNm) et de sécréter, *in vitro*, des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL6, le GM-CSF, l'IL-1 α et l'IL-1 β (Stadnyck, 1994 ; Jung et al, 1995, Eckmann et al, 1995 ; Yang et al, 1997 ; Jarry et al, 1999), constitutivement (IL6, IL-1 α , IL-1 β) ou en réponse à des bactéries pathogènes invasives, des produits bactériens ou d'autres cytokines comme l'IL1 β ou le TNF α (IL6, TNF α , TGF β et GM-CSF). D'autres cytokines comme l'IL7, connue pour être une cytokine impliquée dans le contrôle de la croissance et de la différenciation des lymphocytes T (Watanabe M, 1995) et l'IL18 (Okazawa et al, 2004) sont également exprimées de manière constitutive (ARNm et protéine) par les cellules épithéliales isolées de muqueuse

colique humaine normale. En outre, les lymphocytes T isolés de muqueuse colique normale expriment le récepteur à l'IL7 contrairement aux lymphocytes circulants (Watanabe et al, 1995), suggérant l'existence d'un « dialogue » possible entre cellules épithéliales et cellules immunitaires résidentes du chorion.

Néanmoins, l'analyse approfondie du profil de synthèse et de sécrétion des cytokines par les cellules épithéliales intestinales humaines normales est rendue difficile par la pureté relative de certaines préparations de cellules épithéliales isolées à partir de muqueuses coliques (certaines techniques enzymatiques d'isolement laissant persister quelques cellules mononucléées du chorion), la courte viabilité de ces cellules en culture, et l'absence de lignées issues de cellules épithéliales intestinales normales. Par conséquent, les études concernant le profil cytokinique des lignées cancéreuses coliques humaines (T84, HT29, SW620, Caco2...) sont beaucoup plus nombreuses, mais montrent des disparités de sécrétion entre lignées, et des différences avec les cellules épithéliales coliques « normales », ce qui peut s'expliquer par microenvironnement différent (Eckmann et al, 1993).

Parallèlement à cette capacité d'émission de messages cytokiniques, la cellule épithéliale est également une cible pour des cytokines et chimiokines sécrétées cette fois par les cellules immunitaires via l'expression membranaire de récepteurs. Shirota et al. ont montré par exemple l'expression (ARNm) du récepteur à l'IL6 dans les cellules épithéliales isolées de muqueuse colique normale (Shirota et al, 1990). Plus récemment, l'équipe de Mayer montre, par des techniques de cytométrie en flux, l'expression constitutive des récepteurs pour l'IL1 β , l'IL6, et le GM-CSF dans les cellules épithéliales isolées de muqueuse colique humaine normale (Panja et al, 1998).

3.3.1. Les éléments du dialogue : des cytokines et leurs récepteurs

3.3.1.1. Les raisons d'un choix

Les cytokines sont des polypeptides et des glycoprotéines solubles ayant une action locale, autocrine ou paracrine, que l'on peut considérer, de par certaines caractéristiques, comme des « hormones » impliquées dans les réponses immunitaire et inflammatoire (Dinarello et al, 2007). La littérature renferme une myriade d'articles sur les cytokines et chimiokines synthétisées au sein de la muqueuse intestinale, dans des modèles d'inflammation faisant intervenir les cellules résidentes mais aussi les cellules circulantes. Or, la contribution des cellules résidentes de la muqueuse, qui sont censées être impliquées dans l'initiation de la réponse inflammatoire, et notamment des cellules épithéliales, est encore relativement mal connue.

Les informations disponibles dans la littérature sur la production de cytokines par les cellules épithéliales proviennent quasiment exclusivement d'études sur lignées cancéreuses, qui ne sont que des approximations plus ou moins hasardeuses de la situation physiologique. Nous avons déjà rencontré ce problème d'hétérogénéité du comportement biologique des lignées cancéreuses lors de l'étude de l'expression des TLR. Pour des raisons de clarté, nous avons limité notre étude bibliographique aux cytokines qui interviennent dans le modèle expérimental d'activation des cellules résidentes de la muqueuse colique qui a fait l'objet de notre étude, c'est-à-dire l'interféron γ (IFN γ), le TNF α (Tumor necrosis factor α) et l'IL17 comme cytokines pro-inflammatoires, et l'IL10 et le TGF β (Transforming Growth Factor β) comme cytokines immuno-régulatrices. De nombreux modèles d'animaux génétiquement modifiés ont montré que ces 2 cytokines jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale. Le dernier modèle généré avec des souris invalidées à la fois pour le gène codant pour le TGF β RII et pour le gène codant pour l'IL10R2 suggère, de surcroît, que l'effet immunorégulateur de ces 2 cytokines est synergique (Kang et al, 2008).

3.3.1.1.1. L'interféron γ

3.3.1.1.1.1. Définition, production

C'est Isaacs et Lindenmann qui découvrent en 1957 une substance qui protège les cellules d'une infection virale. Ils lui donnent le nom d'interféron puisqu'elle est responsable d'un processus dénommé « interférence » au cours duquel l'infection expérimentale d'un animal par un virus « empêche » l'infection par un autre virus inoculé 48h plus tard (Isaacs et Lindenmann, 1957). Les interférons sont classés en 2 types selon leur origine cellulaire et leurs propriétés biologiques, les interférons de type I et de type II. Les interférons de type I ou « antiviraux » renferment 7 classes : IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ , IFN ω , IFN δ et IFN τ , ces 2 derniers interférons n'étant pas retrouvés chez l'homme. C'est seulement en 1978 que les molécules d'interférons ont été purifiées (Rubinstein et al, 1978) permettant leur étude chimique, biologique et immunologique. Les interférons de type I sont synthétisés par pratiquement toutes les cellules de l'organisme, notamment les leucocytes (IFN α), et les fibroblastes (IFN β). Les gènes codant pour ceux-ci sont tous situés sur le bras court du chromosome 9. Ce sont des substances antivirales et antibactériennes. L'IFN γ est le seul interféron de type II ou « immun », et c'est cette forme d'interféron que nous allons détailler dans cette synthèse bibliographique.

Le gène codant pour l'IFN γ a été cloné et séquencé (Taya et al, 1982). Il est situé en 12q14 (Naylor et al, 1983 ; Zimonjic et al, 1995) et est constitué de 3 introns. Le promoteur renferme des éléments de régulation de la transcription, avec 2 éléments « enhancer » et 2 éléments « silencer » situés en amont de la boîte TATA (Chrivia et al, 1990) responsables d'une expression tissu-spécifique. Plusieurs facteurs nucléaires se lient à ces motifs, comme GATA 3, CREB/ATF, NFAT, NF κ B et YY1 (Cippitelli et al, 1995 ; Penix et al, 1993 ; Sica et al, 1997). Plus récemment ont été mis en évidence des îlots CpG susceptibles d'être méthylés, et donc de participer également à la régulation de l'expression du gène (Jones et Chen, 2006).

Ce gène code pour une cytokine pro-inflammatoire « prototypique » de la réponse immunitaire de type Th1. Elle est constituée de 166 acides aminés, incluant une séquence signal clivable de 23 acides aminés (Rinderknecht et al, 1984). L'unité fonctionnelle de l'IFN γ est un homodimère symétrique, non covalent, de 34kDa, dont la structure tertiaire ressemble à celle de l'IL10 (Ealick et al, 1991 ; Walter et Nagabhushan, 1995). Chaque monomère est constitué de 6 hélices α (Walter et al, 1995). Au sein de l'homodimère, ces hélices sont distribuées de telle façon que les 4

premières hélices d'un monomère (hélices A à D) forment avec les 2 dernières hélices de second monomère (hélices E' et F') le domaine actif (Randal et Kossiakoff, 2001).

L' $\text{IFN}\gamma$ est sécrété principalement par les lymphocytes T CD4 de type Th1 (**Figure 52**), les cellules Natural Killer (NK) et les lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Seuls les lymphocytes T mémoires (CD45RO) sont capables de sécréter l' $\text{IFN}\gamma$, les lymphocytes T naïfs (CD45RA) en sont incapables. Il est également sécrété par les lymphocytes B, les cellules NK/T et les cellules présentatrices de l'antigène professionnelles (monocyte, macrophage, cellule dendritique) (Mosmann et Coffman, 1989).

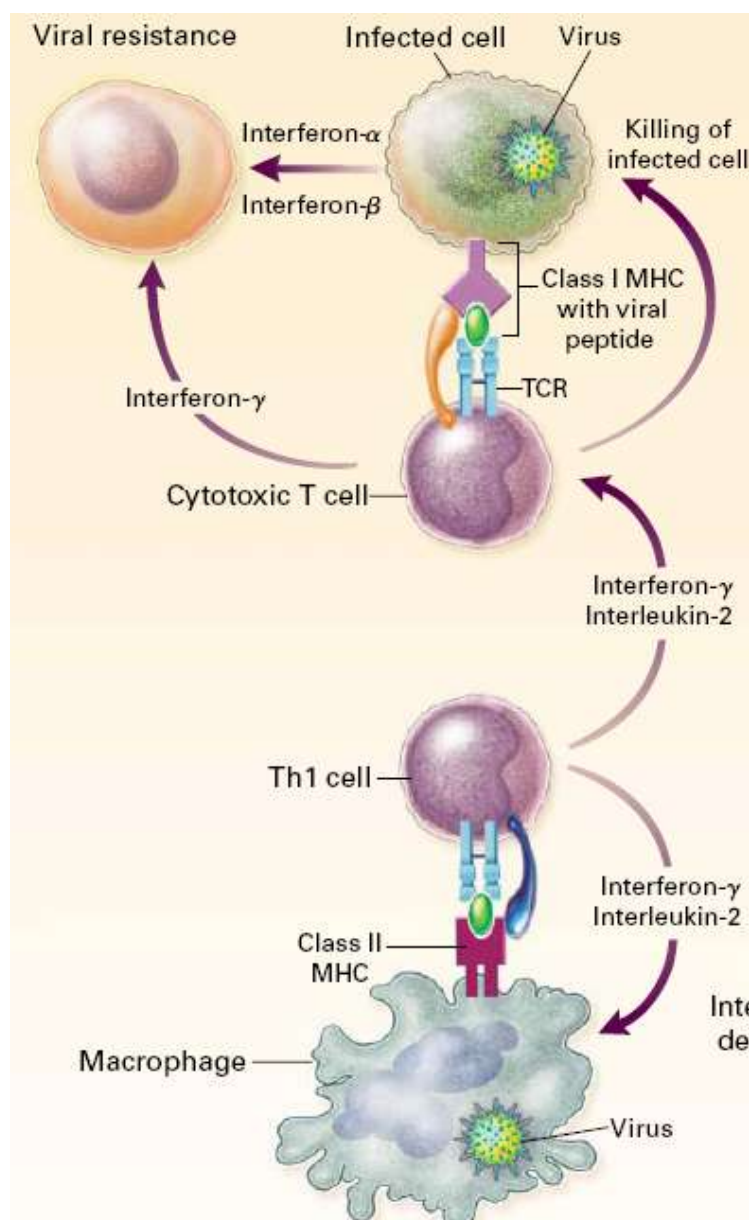


Figure 52 : La réponse lymphocytaire de type Th1. La majorité des lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) reconnaissent des antigènes présentés par les molécules de classe I du CMH, et tuent les cellules infectées, prévenant ainsi la réplication virale. Les lymphocytes T activés sécrètent de l' $\text{IFN}\gamma$ qui associé aux interférons α et β sécrétés par la cellule infectée

L'IFN γ n'est synthétisé qu'après stimulation des cellules productrices par certains antigènes, certains mitogènes comme les entérotoxines staphylococciques A et B, l'activation du récepteur T ou certaines cytokines. En effet, 3 cytokines sont connues pour induire la synthèse d'IFN γ , il s'agit de l'IL2, l'IL12 et de l'IL18, ces 2 dernières cytokines agissant de manière synergique (Ye et al, 1995). L'IL18 a été initialement identifiée comme étant un « facteur inductible de l'IFN γ ou IGIF (interferon gamma inducible factor) » dans le sérum et le foie de souris infectées par la bactérie *Propionibacterium acnes* puis exposées au LPS (Dinarello et al, 1998). En synergie avec l'IL12, l'IL18 induit l'expression d'IFN γ dans les lymphocytes T de type Th1 et dans les lymphocytes B (Yoshimoto et al, 1998).

Dans la muqueuse intestinale, MacDonald et al ont montré que les cellules mononuclées isolées du chorion de muqueuses coliques normales n'exprimaient pas (au niveau protéique par technique ELISA) d'IFN γ , comparativement à celles isolées de muqueuses inflammatoires issues de patients atteints de maladie de Crohn, de RCH ou de colite indéterminée (MacDonald et al, 1990).

La production et les effets de l'IFN γ ont été largement étudiés dans les MICI, et notamment dans la maladie de Crohn. Cette maladie inflammatoire est caractérisée, entre autre, par un déséquilibre entre les lymphocytes T effecteurs et les lymphocytes T régulateurs, au profit des lymphocytes T effecteurs produisant et sécrétant des cytokines pro-inflammatoires de type Th1, comme l'IL12, l'IL18 et l'IFN γ qui stimulent la synthèse d'IL1, de TNF α et d'IL6 par les macrophages (Baumgart et Carding, 2007). L'équipe de Fiocchi a d'ailleurs montré chez des enfants atteints de maladie de Crohn que la production d'IFN γ par les lymphocytes T CD4 $^{+}$ isolés de la muqueuse intestinale, induite par l'IL12, était dépendante de la durée d'évolution de la maladie, maximale lors de la première poussée, et diminuant au fur et à mesure que la maladie évoluait dans le temps. Cette synthèse maximale d'IFN γ est également observée dans les lymphocytes T CD4 $^{+}$ issues de muqueuses intestinales infectées par un micro-organisme pathogène. Dans les 2 cas, cette production d'IFN γ est en rapport avec une expression élevée du récepteur de haute affinité à l'IL12 (IL12R β 2) par ces lymphocytes T (Kugathasan et al, 2007). De plus, des interactions sont suspectées entre le TNF α et l'IFN γ . Des patients atteints de

maladie de Crohn et traités par anti-TNF α présentent une nette diminution du nombre de cellules mononuclées sécrétant de l'IFN γ dans le chorion de leur muqueuse intestinale (Plévy et al, 1997).

La régulation de l'expression de l'IFN γ est complexe et encore incomplètement élucidée. Elle ferait intervenir des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. Ye et al ont montré dans une lignée de lymphoblastes T CD4 $^{+}$ humains (Jurkat) et une lignée de cellules NK humaines (YT) que le facteur de transcription YY1 (Yin-Yang 1) est capable d'interagir avec des séquences « silencer » présentes dans le promoteur du gène et d'inhiber ainsi la transcription du gène (Ye et al, 1996). Il semble, de plus, que la méthylation d'îlots CpG, présents au niveau du promoteur du gène soit impliquée dans la régulation de son expression. En effet, Jones et Chen ont récemment constaté que l'ADN isolé de lymphocytes T CD4 $^{+}$ naïfs qui ne synthétisent pas d'IFN γ , issus de ganglions et de rate de souris, est hypométhylé au niveau des 6 îlots CpG présents dans la région promotrice et hyperméthylé au niveau des 2 îlots CpG, situés immédiatement en amont du promoteur, présents dans la région transcriptionnelle. En revanche, après 6j de culture et stimulation adéquate (IL12 et anti-IL4 pour une différenciation Th1, ou IL4 et anti-IFN γ pour une différenciation Th2), les lymphocytes T activés différenciés en lymphocytes T de type Th1, sécrétant de l'IFN γ , présentent une hypométhylation de la région promotrice et de la région transcriptionnelle. A l'inverse, les lymphocytes T différenciés Th2 présentent une hyperméthylation des régions promotrice et transcriptionnelle. De plus, l'hyperméthylation de l'îlot CpG en position 53 dans le promoteur empêche la fixation du facteur de transcription AP1 et inhibe la transcription du gène dans les lymphocytes Th2 (Jones et Chen, 2006). Enfin, dans les cellules NK et dans les lymphocytes T, l'augmentation de la sécrétion d'IFN γ est précédée par une augmentation du taux des ARNm codant pour l'IFN γ et de la synthèse protéique. L'accumulation des ARNm serait liée à une activité transcriptionnelle accrue mais aussi à une stabilisation des ARNm (Hardy et Sawada, 1989 ; Chan et al, 1992).

3.3.1.1.1.2. Les récepteurs à l'IFN γ

Le récepteur de l'IFN γ est un récepteur transmembranaire constitué de 2 sous-unités, la chaîne α ou IFN γ R1 de 90 kDa, de haute affinité, codée par un gène situé sur le chromosome 6 cloné (Rashidbaigi et al, 1986) et la chaîne β ou IFN γ R2 de 314 acides aminés, de faible affinité, codée par un gène situé sur le chromosome 21, cloné également. Chaque chaîne α est pré-assemblée à une chaîne β . Chacune des chaînes α et β est associée à une kinase Jak (Janus Kinase) (Jak 1 à IFN γ R1 et Jak 2 à IFN γ R2) (Igarashi et al, 1994). La transduction du signal commence avec l'interaction de l'homodimère avec les 2 chaînes α du récepteur, induisant alors la dimérisation de ces 2 chaînes (Greenlund et al, 1993) (**Figure 53**). Il s'ensuit une transphosphorylation des kinases Jak, qui phosphorylent les résidus tyrosines 457 de chacune des chaînes α , créant ainsi 2 sites de liaison juxtaposés pour les domaines SH2 de la protéine cytoplasmique Stat 1 (Signal Transducers and Activators of Transcription). La phosphorylation de Stat 1 liée au niveau du résidu tyrosine 701 entraîne une rapide dissociation du complexe récepteur/Stat1 et la formation d'homodimères Stat1, nommés GAF (Gamma-interferon activation factor). Ces dimères sont alors transloqués dans le noyau où ils se lient à des séquences GAS (Gamma interferon activated site) situées dans le promoteur de gènes cibles (Petska et al, 1997), lesquels correspondent essentiellement à des gènes codant pour des facteurs de transcription, comme IRF-1 (interferon regulatory factor 1) (Darnell et al, 1994). D'autres voies de signalisation peuvent être activées comme les voies PI3K, NF κ B ou MAPK (Ramana et al, 2002).

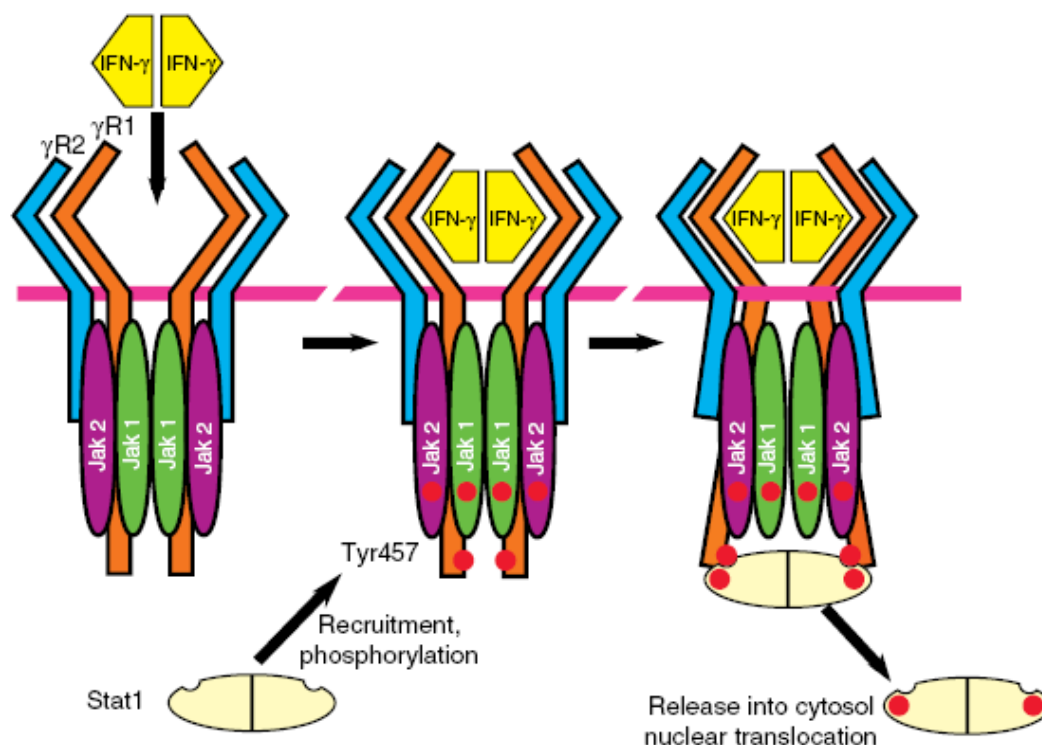


Figure 53 : Le récepteur à l'IFN γ et son mode d'activation. D'après Pestka et al, 2004

Ce récepteur est exprimé de façon presque ubiquitaire à la membrane des cellules nucléées: lymphocytes B et macrophages des organes lymphoïdes et des plaques de Peyer ; cellules endothéliales ; cellules épithéliales coliques, iléales et gastriques, alvéolaires pulmonaires, des glandes salivaires, des tubules rénaux et de l'endomètre (Valente et al, 1992).

3.3.1.1.1.3. Les activités biologiques

Les souris déficientes en IFN γ (Dalton et al, 1993) ou en son récepteur IFN γ -R1 (Huang et al, 1993) présentent un développement normal de leur système immunitaire. Néanmoins, ces souris ont une susceptibilité accrue aux infections, particulièrement aux bactéries intra-cellulaires (Cooper et al, 1993) et à de nombreux virus (Muller et al, 1994). A l'inverse, l'expression aberrante de l'IFN γ sous le contrôle de promoteurs tissu-spécifiques chez des souris transgéniques, génère des réactions inflammatoires tissu-spécifiques, responsables de destructions tissulaires (Young et Hardy, 1995).

Chez l'homme, des mutations germinales inactivatrices des gènes codant pour les chaînes α ou β du récepteur à l'IFN γ ont été décrites. Elles sont associées au rare syndrome de susceptibilité aux mycobactéries (syndrome de Mendelian) responsables d'infections généralisées à mycobactéries (Newport et al, 1996). De plus, les patients atteints de ce syndrome présentent également des anomalies fonctionnelles des polynucléaires neutrophiles (diminution du chimiotactisme) et des cellules NK, (diminution d'activité) soulignant l'importance de l'IFN γ dans la réponse inflammatoire et immunitaire.

Les effets cellulaires de l'IFN γ sont nombreux (Schroder et al, 2004). L'IFN γ augmente l'expression membranaire des molécules de classe I du CMH, et augmente ainsi la capacité de reconnaissance des peptides étrangers par les lymphocytes T cytotoxiques. Il augmente également l'expression des molécules de classe II du CMH, et améliore ainsi l'activation des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs. L'IFN γ est la cytokine majeure de la réponse immunitaire de type Th1. Elle induit en effet une réponse immunitaire innée à médiation cellulaire (via l'activation des cellules NK et des macrophages), et une réponse immunitaire adaptative cytotoxique (via l'activation des lymphocytes T cytotoxiques) (Boehm et al, 1997). Elle influence la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs vers un phénotype Th1, en association avec l'IL12. D'ailleurs, l'IFN γ induit *in vitro* la production d'IL12 par des macrophages issus d'une lignée murine (Yoshida et al, 1994). Finalement, l'IL12 et l'IFN γ font le lien entre la reconnaissance d'un pathogène par les cellules de l'immunité innée et l'induction d'une réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire. Les PAMP, dont le LPS, induisent la sécrétion d'IL12 par les cellules qui les ont reconnus (macrophages, cellules dendritiques) (Heufler et al, 1996). Celles-ci induisent la synthèse d'IFN γ par les lymphocytes T CD4⁺ naïfs après présentation antigénique (Macatonia et al, 1995). Cette sécrétion d'IFN γ , induite par l'IL12, participe à un feedback positif en stimulant la production d'IL12 par les macrophages, stabilisant la réponse Th1 (Boehm et al, 1997). A côté de l'IL12, l'IL18 joue également un rôle important dans l'induction de la synthèse d'IFN γ (Dinarello et al, 1999 ; Akira, 2000).

Dans la muqueuse intestinale, des études *in vivo* chez la souris montrent que l'IFN γ est impliqué dans l'altération de la barrière épithéliale intestinale. L'équipe de

Bueno montre que des souris exposées à un stress répété présentent une hyperexpression colique (ARNm et protéine) d'IFN γ , associée à une augmentation de la perméabilité paracellulaire intestinale, sans anomalie morphologique décelable histologiquement. Cette perméabilité anormale est responsable d'une translocation bactérienne dans le foie (Ferrier et al, 2003).

Chez l'homme, des études *in vitro* montrent que l'IFN γ augmente la perméabilité paracellulaire intestinale. En effet, l'exposition d'une monocouche de cellules épithéliales issues de la lignée de cancer colique humain T84 à l'IFN γ induit une diminution de la résistance transépithéliale, en rapport avec des modifications d'expression des protéines du complexe jonctionnel comme une diminution d'expression de l'occludine, de la claudine 2 ou de la protéine ZO-1, associées à une répartition anormale de ZO-2 et de l'occludine (Madara et al, 1989 ; Youakim et al, 1999 ; Willemsen et al, 2005). Ces modifications d'expression des protéines du complexe jonctionnel s'associent à une perturbation de l'organisation du cytosquelette d'actine au pôle apical des cellules épithéliales (Li et al, 2008).

3.3.1.1.2. Le TNF α

3.3.1.1.2.1. Définition, production

Le TNF α , connu aussi sous le nom de cachectine [responsable de la cachexie des patients atteints de cancer (Beutler et Cerami, 1988)], a été initialement décrit comme une glycoprotéine, induite par une endotoxine, capable de tuer des cellules tumorales *in vitro* et de générer des lésions de nécrose hémorragique au niveau de tumeurs transplantées chez des souris infectées par le Bacille de Calmette et Guérin (Carswell et al, 1975). Son nom provient de sa capacité à lyser les cellules tumorales de nombreuses lignées en induisant l'apoptose. Le TNF α a depuis été impliqué en pathologies infectieuse, inflammatoire et tumorale. Ses effets sont multiples. Il agit comme médiateur dans la réponse pro-inflammatoire, il module la réponse des cellules immunitaires, il agit comme facteur de croissance sur les fibroblastes et c'est

un facteur anti-viral. Son rôle dans les pathologies inflammatoires a notamment été mis en évidence par l'efficacité clinique des anticorps anti-TNF α administrés à des patients souffrant de pathologies inflammatoires chroniques, dont les MICI (Van Dulleman et al, 1995 ; Targan et al, 1997). En effet, le chorion de la muqueuse intestinale de patients atteints de maladie de Crohn en phase active renferme un nombre accru de cellules mononuclées sécrétant des taux élevés de TNF (ARNm et protéine) (Reinecker et al, 1993 ; Breese et al, 1994 ; Plevy et al, 1997).

Le TNF appartient à une super-famille de molécules solubles ou transmembranaires, structuralement proches, constituée de plus de 20 membres incluant le TNF β , le CD40 ligand ou Fas ligand (Darnay et Aggarwal, 1999).

Le gène codant pour le TNF α a été cloné chez l'homme en 1985 (Pennica et al, 1985). Il est situé en 6p21, au milieu des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité. Son promoteur renferme des séquences activatrices (« enhancer ») et des séquences répressives (« silencer ») impliquées dans la régulation de la transcription du gène (Fong et al, 1994). Il renferme des séquences consensus CRE (AMPC responsive element) pouvant lier les protéines jun appartenant au complexe de transcription AP-1. Ces séquences sont indispensables pour l'activation de la transcription du gène codant pour le TNF α par les lymphocytes T activés (Tsai et al, 1996). Il possède également la séquence consensus κ B permettant la fixation du facteur de transcription NF κ B (Trede et al, 1993). Ces facteurs de transcription participent à la régulation de l'expression du gène et les interactions entre facteurs de transcription semblent varier selon le type cellulaire et le stimulus extracellulaire (Tsai et al, 1996). D'autre part, Wax et al. ont montré la présence de motifs riches en adénine (A) et uridine (U) dans la région 3' non codante des ARNm codant pour le TNF α , ceux-ci empêchant la fixation stable de la sous-unité ribosomique 40S aux ARN (Wax et al, 2005). Enfin, il a été identifié un polymorphisme sur le promoteur du gène, en position 308 (Wilson et al, 1993), responsable d'une production variable de TNF α . En effet, ce polymorphisme crée 2 allèles, le *TNF1* à l'origine d'une production « normale » de TNF α et le *TNF2*, à l'origine d'une surproduction de TNF α . La présence de l'allèle *TNF2* a été associée notamment à la survenue de choc septique (Mira et al, 1999).

Le gène *TNF* code pour une protéine non glycosylée, précurseur transmembranaire de 233 acides aminés (26kDa), le pro-TNF, qui peut-être clivé au niveau du domaine extracellulaire, libérant une forme soluble de 177 acides aminés dont le poids moléculaire est de 17 kDa (Idriss et Naismith, 2000). Ce clivage est effectué spécifiquement par une molécule de la famille dite ADAM (a disintegrin and metalloproteinase), ADAM-17, connue aussi sous le nom de TACE (TNF α converting enzyme) (Black et al, 1997). Dans la muqueuse intestinale colique, la protéine ADAM-17 est exprimée par les cellules mononuclées du chorion et les cellules épithéliales (Blanchot-Jossic et al, 2005), et est largement impliquée dans le clivage de la pro-forme membranaire du TNF (Kirke Gaard et al, 2004). Les 2 formes, membranaire et soluble, sont actives ; la forme membranaire se liant préférentiellement au TNFR2 lors de contact intercellulaire (Grell et al, 1996). La forme active de la composante soluble est constituée de l'association de 3 molécules identiques. Cet homotrimère doit interagir avec un récepteur homotrimérique pour déclencher l'activation de voies de signalisation intracellulaire.

Le TNF α est principalement synthétisé par les lymphocytes T CD4+ et les macrophages activés, mais aussi par les cellules NK, les polynucléaires et les lymphocytes B. Il peut être synthétisé également par les kératinocytes, les cellules de Paneth, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes en réponse à un stress environnemental (inflammation, infection, traumatisme...) (Vassalli et al, 1992). Dans la muqueuse intestinale issue de patients atteints de MICI, le TNF α est synthétisé par les cellules mononuclées du chorion (MacDonald et al, 1990 ; Murch et al, 1993 ; Reinecker et al, 1993 ; Breese et al, 1994), mais aussi par les cellules épithéliales intestinales, en réponse à une infection par des bactéries pathogènes (et non par des bactéries du microbiote) (Jung et al, 1995).

Sa synthèse et sa sécrétion sont induites par des stimuli variés. Le principal stimulus pour les macrophages est le LPS qui induit une augmentation de transcription du gène par un facteur 3, une augmentation du taux des ARNm par un facteur compris entre 50 et 100 et une augmentation du taux de protéine sécrétée par un facteur 10000 (Wilson et al, 1995). Cet effet est accentué en incubant au préalable les macrophages avec de l'IFN γ . Les autres stimuli sont l'IL2, le GM-CSF,

les infections virales, l'entérotoxine B staphylococcique, un grand nombre de bactéries pathogènes Gram+ et Gram-, l'irradiation...(Vassalli et al, 1992). La régulation de la synthèse du TNF est complexe et s'effectue à la fois au niveau transcriptionnel, et post-transcriptionnel. Le TNF induit la transcription de son propre gène via l'activation de la voie NF κ B, mais induit également des éléments de régulation négative comme la tristetraproline, protéine cytoplasmique qui déstabilise les ARNm codant pour le TNF (Carballo et al, 1998), ou l'IL10 (van der Poll et al, 1997).

3.3.1.1.2.2. Les récepteurs du TNF α

Parmi les 41 membres de la famille des récepteurs au TNF, 2 sont spécifiques du TNF α , le TNF-R1 et le TNF-R2 (Schulze-Osthoff et al, 1998) (**Figure 54**). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires dépourvues d'activité enzymatique, constituées d'un domaine extracellulaire N-terminal contenant 4 motifs riches en cystéines, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire. Le domaine extracellulaire où se fixe le ligand, renferme des motifs de 40 acides aminés riches en cystéine, se répétant entre 2 et 6 fois. Les résidus cystéine peuvent former des ponts disulfures stabilisant ainsi le récepteur activé sous la forme de dimère ou de trimère (Banner et al, 1993). La différence structurale entre le TNF-R1 (55 kDa) et TNF-R2 (75 kDa) est la présence d'un « domaine de mort » (death domain) (Vandenabeele et al, 1995) à l'origine d'activités biologiques différentes.

La fixation du TNF- α sur son récepteur TNF-R1 initie l'activation du trimère en conduisant l'association « des domaines de mort » interagissant avec les protéines adaptatrices TRADD (TNF receptor-associated death domain protein) (Hsu et al, 1995). La protéine TRADD, une fois couplée au récepteur, peut interagir avec les protéines TRAF2 (TNF α -receptor associated factor 2), RIP1 (Receptor-interacting protein 1) et FADD (Fas-associated death domain protein). De l'association entre TRADD et TRAF2 résulte l'activation de la voie NF- κ B ainsi que l'activation de la cascade des MAP Kinases. L'association entre TRADD et FADD permet le recrutement de la pro-caspase 8, responsable du déclenchement de l'apoptose.

En ce qui concerne l'activation de TNF-R2, les protéines intervenant dans l'induction des signaux de transduction sont différentes, mais elles aboutissent également à l'activation des voies MAP kinase et NF- κ B (Baud et Karin, 2001).

La variabilité des effets cellulaires du TNF α peut être expliquée par l'expression différentielle des récepteurs au TNF, mais aussi par le recrutement de protéines adaptatrices différentes. L'activation des facteurs de transcription NF κ B et AP-1 entraînent la transcription de gènes cibles du TNF α , impliqués dans la prolifération cellulaire ou l'inflammation, la suppression de l'apoptose générant l'inflammation.

Les récepteurs au TNF sont exprimés par presque tous les types cellulaires nucléés, expliquant de ce fait les activités biologiques pléiotropes du TNF α . Le TNFR1 est plutôt exprimé par les cellules sensibles aux effets cytotoxiques alors que le TNFR2 est plutôt exprimé par les cellules d'origine myéloïde. Il existe des versions solubles de ces récepteurs capables de « séquestrer » le ligand et d'en diminuer ainsi les effets biologiques. Ces TNF-BP (Binding Protein) sont des fragments tronqués de la partie extracellulaire du récepteur. Ils sont présents dans les urines et le plasma (le TNF étant retrouvé dans le sérum à l'état normal).

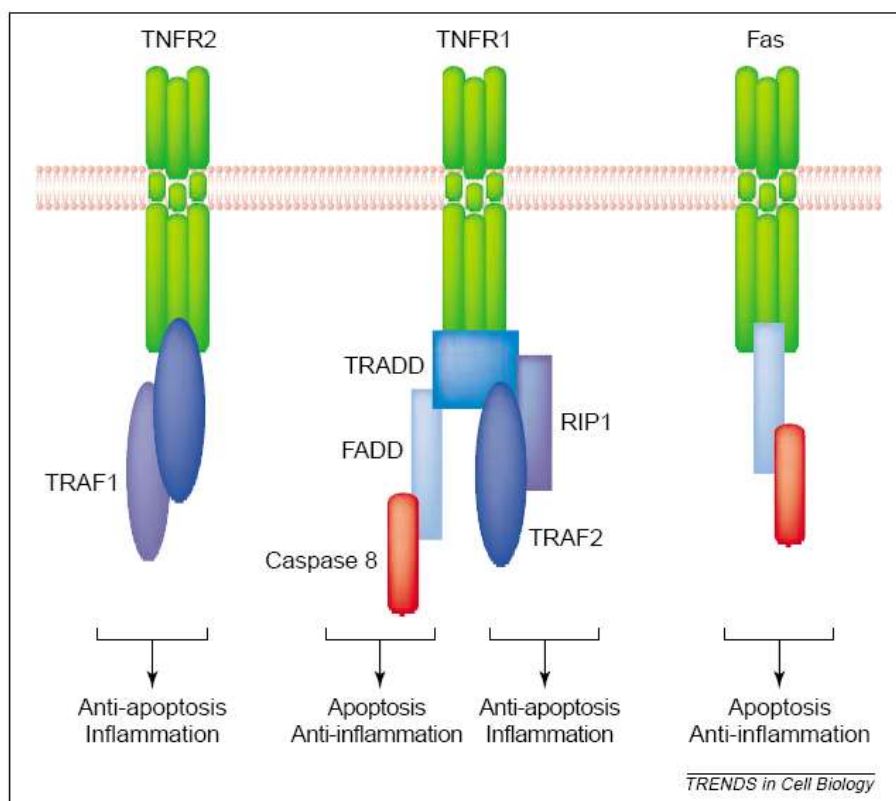


Figure 54 : Les 2 récepteurs au TNF, TNFR1 et TNFR2. Les récepteurs au TNF sont exprimés par presque tous les types cellulaires nucléés, expliquant de ce fait les activités biologiques pléiotropes du $\text{TNF}\alpha$. Le TNFR1 est plutôt exprimé par les cellules sensibles aux effets cytotoxiques alors que TNFR2 est plutôt exprimé par les cellules d'origine myéloïde. Ils génèrent des effets variables en fonction des protéines adaptatrices recrutées (inflammation, apoptose, prolifération, différenciation). D'après Baud et Karin, 2001.

3.3.1.1.2.3. Les activités biologiques

Le $\text{TNF}\alpha$ est à l'origine de multiples actions biologiques que nous n'allons pas toutes détailler ici. Il est surtout impliqué dans la pathogénie de divers processus inflammatoires et dysimmunitaires (Kollias et Kontoyiannis, 2002 ; Bradley et al, 2008). Cette cytokine pro-inflammatoire majeure intervient dans la mort cellulaire par apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire. Le $\text{TNF}\alpha$ est également impliqué dans la carcinogenèse (Mocellin et al, 2005). Chez l'homme, aucun syndrome héréditaire associé à un défaut de production de $\text{TNF}\alpha$ n'a été décrit. Les informations dont nous disposons sur les activités biologiques du $\text{TNF}\alpha$ *in vivo* viennent notamment des études réalisées chez la souris transgénique, surexprimant le $\text{TNF}\alpha$ de manière tissu-spécifique, ou invalidée pour les gènes codant pour ses récepteurs, ou des études réalisées avec des anticorps bloquant chacun des 2 récepteurs. Ces études montrent que 1) les souris surexprimant le $\text{TNF}\alpha$ de manière

tissu-spécifique développent des pathologies dépendantes de l'expression du TNFR1. Quand le transgène est sous le contrôle du promoteur de l'insuline par exemple, on observe des lésions non diabétogènes « d'insulinite » avec dissociation des îlots de Langerhans par un infiltrat lymphocytaire dense (Higuchi et al, 1992). Quand le transgène est sous la dépendance du promoteur du CD2 (marqueur spécifique des lymphocytes T), on observe des nécroses tissulaires diffuses (Probert et al, 1993).

TNFR1 est le récepteur le plus largement exprimé par les cellules de l'organisme, et est responsable de la majorité des effets pro-inflammatoires du TNF (Pfeffer et al, 1993 ; Rothe et al, 1993 ; Erickson et al, 1994). A l'inverse, la prolifération des thymocytes dépendante du $\text{TNF}\alpha$, les nécroses cutanées médiées par le $\text{TNF}\alpha$, et l'apoptose des lymphocytes T activés sont plutôt médiés par le TNFR2 (Sheehan et al, 1995 ; Tartaglia et al, 1993a et b).

Dans la muqueuse intestinale, de nombreuses études réalisées *in vitro* et *in vivo*, chez la souris et chez l'homme montrent que le $\text{TNF}\alpha$ est impliqué dans la rupture de la barrière épithéliale. Les mécanismes semblent très variés et incomplètement élucidés.

Chez la souris, Fries et al montrent que dans les lésions de colite induites par le DNBS (dinitrobenzene sulfonic acid) associé à l'éthanol, l'occludine et la protéine ZO-1, 2 protéines transmembranaires appartenant aux jonctions serrées et aux jonctions adherens respectivement, et qui sont normalement exprimées au pôle apical des entérocytes, présentent une expression cytoplasmique et nucléaire. L'administration d'un anti- $\text{TNF}\alpha$ empêche cette redistribution anormale des 2 protéines. De la même manière, les souris invalidées pour le gène codant pour le TNFR1 conservent une distribution normale de l'occludine dans les entérocytes après injection de DNBS/éthanol (Fries W, 2008).

Chez l'homme, les patients atteints de MICI, notamment ceux atteints de maladie de Crohn en poussée évolutive, présentent des taux élevés de $\text{TNF}\alpha$ sérique (Komatsu et al, 2001) et intra-muqueux (Schreiber et al, 1999), et le nombre de lymphocytes T intra-muqueux sécrétant du $\text{TNF}\alpha$ est élevé (Breese et al, 1994). Ces patients présentent parallèlement une augmentation de perméabilité de la barrière épithéliale intestinale, que ce soit en zone inflammatoire ou non-

inflammatoire (Bjarnason et al, 1983 ; Soderholm et al, 2002). Les causes et les conséquences de cette altération de la barrière épithéliale sont imparfaitement connues et font l'objet de nombreuses discussions. Est-elle la conséquence d'une inflammation de la muqueuse ou la cause, en facilitant le passage de bactéries et d'antigènes endoluminaux dans le chorion initiant ainsi une réponse inflammatoire ? Elle peut précéder de plusieurs années les premiers symptômes cliniques chez des patients présentant des antécédents familiaux de maladie de Crohn (Hollander et al, 1993 ; Irvine et al, 2000). Cette augmentation de perméabilité de la muqueuse intestinale est également mise en évidence chez certains membres de la famille au premier degré de patients atteints de maladie de Crohn, porteurs notamment de la mutation 3020insC du gène *CARD15/NOD2* mais cliniquement asymptomatiques (Buhner et al, 2006). Des études cliniques montrent de manière indirecte que le $\text{TNF}\alpha$ intervient dans l'augmentation de perméabilité de la muqueuse intestinale. En effet, l'administration d'un anti- $\text{TNF}\alpha$ (infiximab) à des patients atteints de maladie de Crohn en poussée évolutive permet de diminuer significativement l'activité de la maladie et la perméabilité de la muqueuse intestinale, à des niveaux sensiblement normaux (Suenart et al, 2002).

D'un point de vue mécanistique, il semble que l'augmentation de la perméabilité épithéliale induite par le $\text{TNF}\alpha$ implique des modifications fonctionnelles et structurelles du complexe jonctionnel réalisé par les jonctions serrées et les jonctions adhérents. Plusieurs études *in vitro* sur culture de cellules épithéliales issues de lignées (T84, Caco2, HT29) montrent en effet que l'augmentation de la perméabilité épithéliale induite par le $\text{TNF}\alpha$ est corrélée à la diminution d'expression et à l'internalisation des protéines transmembranaires du complexe jonctionnel, comme l'occludine et les claudines (Schmitz et al, 1999 ; Gitter et al, 2000 ; Bruewer et al, 2003 ; Ma et al, 2004). L'étude de Soderholm, réalisée sur des explants de muqueuse iléale de patients atteints de maladie de Crohn, montre que le $\text{TNF}\alpha$ pourrait faciliter, par ailleurs, le passage transcellulaire d'antigènes, éventuellement bactériens, à travers la barrière épithéliale. Ils montrent en effet que le nombre d'endosomes contenant de la peroxydase de raifort dans les entérocytes de muqueuses iléales non inflammatoires chez ces patients est plus élevé que dans les muqueuses iléales de sujets sains. Cette augmentation de perméabilité

transcellulaire est parallèle à l'augmentation d'expression du $\text{TNF}\alpha$ dans la muqueuse (Soderholm et al, 2004).

Le $\text{TNF}\alpha$ induit également la mort des cellules épithéliales par apoptose, en synergie avec l' $\text{IFN}\gamma$ (Abreu-Martin et al, 1995). Ces 2 cytokines semblent interagir étroitement dans la réponse inflammatoire de type Th1. L' $\text{IFN}\gamma$ est connu pour augmenter l'expression des récepteurs au $\text{TNF}\alpha$ à la surface des cellules épithéliales issues de la lignée HT29 (Ruggiero et al, 1986) et le $\text{TNF}\alpha$ augmente la production d' $\text{IFN}\gamma$ par les lymphocytes T intra-muqueux (Plevy et al, 1997 ; Prehn et al, 1999).

Par ailleurs, d'autres études sur lignées cancéreuses coliques humaines montrent que le $\text{TNF}\alpha$ induit la sécrétion de chimiokines, dont l'IL8, par les cellules épithéliales (Abreu-Martin et al, 1995 ; Yang et al, 1997). Cette chimiokine, impliquée dans le recrutement de polynucléaires et de lymphocytes T sur le lieu de l'inflammation, pourrait amplifier la réaction inflammatoire.

3.3.1.1.3. L'IL17

3.3.1.1.3.1. Définition, production

L'IL17 (ou IL17A) est une cytokine de découverte plus récente qui présente plus de 50% d'homologies avec une glycoprotéine sécrétée et codée par le gène 13 du virus Herpes saimiri (HVS-13). Elle appartient à une famille de 6 membres au total (IL17A à F), présentant entre 20 et 50% d'homologies entre eux (Kolls et Linden, 2004). Le gène codant pour cette cytokine a été isolé en 6p12 et cloné chez l'homme en 1996 (Fossiez et al, 1996). Son promoteur renferme des séquences consensus CRE pour la liaison des protéines de la famille CREB/ATF (AMPc responsive element binding protein / Activated Transcription Factor). En effet, l'activation transcriptionnelle du promoteur de l'IL17 par la protéine Tax du virus HTLV1 est dépendante de la voie CREB/ATF (Dodon et al, 2004). Il code pour une protéine de 155 acides aminés (20 kDa) qui est sécrétée sous la forme d'un homodimère (Yao et al, 1995) ou d'un hétérodimère avec l'IL17F. Il semblerait même que cet

hétérodimère soit la forme dominante de cette cytokine *in vivo* chez l'homme (Wright et al, 2007).

L'équipe de Fossiez n'a pas détecté de transcrits codant pour l'IL17 chez l'homme, en conditions physiologiques, dans les lymphocytes (T CD4+ ou CD8+, et B) ou les monocytes circulants, comme d'ailleurs dans un bon nombre de tissus adultes normaux, dont l'intestin et le colon (Fossiez et al, 1996). Ces transcrits ne sont retrouvés dans les lymphocytes T CD4+ circulants qu'après incubation *in vitro* avec du PMA (phorbol-12-myristate-13-acétate) et de la ionomycine, la source principale d'IL17 étant le lymphocyte T CD4+ de type mémoire CD45RO+ (Yao et al, 1995 ; Fossiez et al, 1996). Par la suite, l'expression de l'IL17 a été retrouvée dans les lymphocytes T CD8+ mémoires humains circulants stimulés *in vitro* de la même façon (Shin et al, 1999), les monocytes circulants activés par du LPS (Verreck et al, 2004) et les polynucléaires éosinophiles issus de lavages broncho-alvéolaires ou circulants chez des patients asthmatiques (Molet et al, 2001).

Chez la souris, les lymphocytes T CD4+ synthétisant l'IL17 ont été dénommés lymphocytes Th17. Ce 3^{ème} groupe de lymphocytes T helper permet d'expliquer la pathogénie de 2 modèles murins d'autoimmunité (encéphalite autoimmune et arthrite induite par le collagène) (Langrish et al, 2005). Ces lymphocytes T sécrètent en plus de l'IL17, de l'IL17F, de l'IL22, de l'IL26, du TNF α et plusieurs chimiokines (Liang et al, 2006 ; Stockinger et Veldhoen, 2007), agissant de concert pour médier les effets pro-inflammatoires de cette sous-populations de lymphocytes T effecteurs.

Plusieurs cytokines chez l'homme sont capables de stimuler la synthèse d'IL17 par des lymphocytes T isolés du sang circulant et stimulés *in vitro* par des anticorps mitogéniques (CD3 et CD28), comme l'IL2, l'IL15, l'IL18, l'IL21 et l'IL23, alors que l'IL12 l'inhibe (Verreck et al, 2004 ; Hoeve et al, 2006). Très récemment, l'équipe de Yamamura a montré que cette sous-population de lymphocytes T, isolés parmi les lymphocytes T CD4+ mémoires du sang circulant stimulés par l'association PMA/ionomycine présentent un profil d'expression spécifique de récepteurs à différentes chimiokines - CCR2+ CCR5 - alors que les lymphocytes CCR2- seraient plutôt de type Th1, sécrétant de l'IFN γ (Sato et al, 2007). Chez la souris, plusieurs auteurs ont montré *in vivo* (à partir de modèles de transgénèse) et *in vitro* que l'IL6, le TGF β , et l'IL21 initient la différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs en

lymphocytes T CD4⁺ de type Th17, et que l'IL23 amplifie ce processus grâce à l'expression du récepteur à l'IL23 spécifiquement à la surface de ces cellules. En revanche, l'IFN γ et l'IL4 l'inhibent (Bettelli et al, 2006 ; Mangan et al, 2006).

3.3.1.1.3.2. Les récepteurs de l'IL17

Le récepteur à l'IL17, IL17R, est un récepteur transmembranaire d'environ 130 kDa, découvert en 1995 (Yao et al, 1995 et 1997). Il ne présente aucune homologie structurale avec les autres récepteurs cytokiniques connus. Il est codé par un gène situé en 22q11, cloné. Il est constitué d'un domaine extra-cellulaire de 293 acides aminés, un domaine transmembranaire de 21 acides aminés et d'une queue cytoplasmique de 525 acides aminés (Yao et al, 1997). Il forme un complexe membranaire, au moins homodimérique, pré-assemblé, et la liaison ligand/récepteur, de faible affinité, semble engendrer une séparation du domaine intracytoplasmique. Le domaine extracellulaire est constitué de 2 domaines de type fibronectine III (Shen et Gaffen, 2008).

Ce récepteur est exprimé (ARNm ou protéine) chez l'homme par plusieurs types cellulaires (cellules épithéliales, cellules mésothéliales, cellules endothéliales, fibroblastes, lymphocytes B et T, monocytes) (Silva et al, 2003). Cinq autres récepteurs transmembranaires à l'IL17 ont été décrits chez l'homme (IL17RB à E) (Moseley et al, 2003).

Les connaissances actuelles sur les voies de signalisation activées par la liaison ligand/récepteur sont limitées (Shen et Gaffen, 2008) vraisemblablement en raison du fait que le récepteur à l'IL17 présente très peu d'homologie avec les autres récepteurs cytokiniques. Par conséquent, la compréhension des voies de transduction du signal induite par ce récepteur doit être fondée sur les gènes cibles de l'IL17 et leur promoteur respectif. Parmi ceux-ci, l'IL6 a été le premier gène cible identifié, et reste le standard pour tester l'activité de l'IL17 (Yao et al, 1995 ; Fossiez et al, 1996). L'IL6 est une cytokine pro-inflammatoire, mais elle intervient également dans le processus de différenciation des lymphocytes T Th17, suggérant une boucle de régulation positive induite par l'IL17. L'IL17 active l'IL6 de manière synergique

avec d'autres cytokines comme l'IFN γ , l'IL1 β , le TNF α et l'IL22 (Chabaud et al, 1998 ; Kolls et Linden, 2004 ; Liang et al, 2006). Par conséquent, il semble que la plupart des gènes cibles induits par l'IL17, sinon tous, soit régulée de manière synergique par plusieurs cytokines. De ce fait, en pratique, la réponse à l'IL17 est souvent évaluée de concert avec le TNF α . Les mécanismes sous-tendant cette activité synergique sont mal connus. Il semble que l'IL17 stabilise les transcrits de certains gènes. Par exemple, l'IL17 avec le TNF α stabilisent les transcrits IL6 (Hennes et al, 2004) peut-être via la voie MAP Kinase (Faour et al, 2003). Mais l'IL17 avec le TNF sont aussi capables d'activer de manière additive le promoteur de l'IL6 (Ruddy et al, 2004). D'autre part, l'IL17 active la voie NF κ B dont l'isoforme principale est constituée des composants p65 et p50 (Hwang et al, 2004).

3.3.1.1.3.3. Les activités biologiques

La plupart des études expérimentales chez la souris suggère que l'IL17 coordonne la réponse inflammatoire principalement par l'induction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, et le recrutement des polynucléaires par le lymphocyte T activé. L'IL17 est considérée comme une cytokine à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Les études réalisées chez la souris invalidée, soit pour le gène codant pour le récepteur de l'IL17 soit pour le gène codant pour l'IL17, montrent que la réponse lymphocytaire est totalement abolie (Nakae et al, 2002), responsable d'une susceptibilité aux infections bactériennes souvent léthales (Ye et al, 2001).

Chez l'homme, plusieurs études montrent que l'IL17 est impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques et dysimmunitaires comme l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, le psoriasis, le rejet de greffe de rein (Moseley et al, 2003).

Par exemple, il semble exister une corrélation entre l'asthme et une expression accrue de l'IL17 dans les cellules macrophagiques des alvéoles pulmonaires (Molet et al, 2001), et l'exposition de cellules épithéliales bronchiques à l'IL17 recombinante *in vitro* entraîne la sécrétion d'IL8 par ces cellules épithéliales (Laan et al, 1999).

Des explants de synoviale de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde (PR) cultivés *ex vivo* sécrètent spontanément de l'IL17, tandis que des explants de synoviale normale n'en sécrètent pas. Une étude immunohistochimique montre que la source de cette IL17 semble être les lymphocytes T du chorion (Chabaud et al, 1999). De plus, des taux élevés d'IL17 sont retrouvés dans le liquide articulaire de patients atteints de PR (Ziolkowska et al, 2000). *In vitro*, l'IL17 induit la synthèse de métalloprotéinases, d'IL8, de MCP-1, d'IL6 par les synoviocytes isolés de synoviale de patients atteints de PR, et cette synthèse est corrélée à la destruction tissulaire d'explants de synoviale en culture, étudiée par la mesure des taux d'un peptide libéré lors de la dégradation du collagène de type I (Laan et al, 1999 ; Fossiez, 1996 ; Chabaud et al, 2000).

Quelques données sont également disponibles en pathologie inflammatoire intestinale. Chez les souris invalidées pour le gène codant pour l'IL10 (souris IL10 $-/-$) développant spontanément des lésions de colite, Yen et al retrouvent une expression accrue d'IL17 (ARNm) dans la muqueuse colique inflammatoire. Cette cytokine semble jouer un rôle dans les lésions inflammatoires puisque sa neutralisation diminue la sévérité des lésions (Yen et al, 2006). Les mêmes résultats sont obtenus par Elson et al dans un modèle de souris SCID restaurée par le transfert de lymphocytes T CD4⁺ sécrétant de l'IL17, ce transfert étant responsable de sévères lésions de colite (Elson et al, 2007). Chez l'homme, des taux élevés d'IL17 (ARNm et protéine) sont mis en évidence dans la muqueuse colique de patients atteints de RCH ou de maladie de Crohn, comparativement à des muqueuses normales ou issues de colites ischémiques ou infectieuses (absence de cellules exprimant l'IL17 en immunohistochimie). De plus, cette expression accrue s'observe essentiellement en phase active, très peu en phase quiescente. Elle concerne les macrophages et les lymphocytes T CD3⁺ du chorion (Fujino et al, 2003). De plus, Andoh et al. ont montré *in vitro* que l'IL17 entraîne, en synergie avec le $\text{TNF}\alpha$, la synthèse et la sécrétion de facteurs de croissance pour les cellules hématopoïétiques comme le G-CSF (Granulocyte Colony-stimulating factor) ou le GM-CSF (Granulocyte-Monocyte Colony-stimulating factor), de cytokines pro-inflammatoires (IL6) et de métalloprotéinases (MMP-1 et MMP-3) par les myofibroblastes isolés de muqueuse colique normale (Andoh et al, 2005 ; Yagi et al, 2007), favorisant une réponse

inflammatoire. Néanmoins, son rôle exact dans l'initiation de cette réponse inflammatoire reste non élucidé.

3.3.1.2. Les cytokines immunorégulatrices

3.3.1.2.1. L'IL10

3.3.1.2.1.1. Définition, production

L'interleukine 10 a été identifiée pour la première fois en 1989 comme une cytokine, produite par des lymphocytes T murins de type Th2 activés, capable d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires (IL2, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$) par les lymphocytes de type Th1 (Fiorentino et al, 1989). Immédiatement après cette découverte, des auteurs ont montré, chez la souris, que des lymphocytes B normaux ainsi que les lymphocytes B issus de certains lymphomes de phénotype B exprimaient de l'IL10, soit après stimulation par le LPS, soit de manière constitutive respectivement (O'Garra, 1990). Dans le même temps, Moore et al identifient un homologue viral (78% d'homologie dans la séquence en acides aminés) de l'IL10, BCRF1 (ou vIL10), codé par le génome du virus Epstein-Barr (Moore et al, 1990). L'ensemble de ces résultats a fait suggérer que l'IL10, et son homologue viral, jouaient un rôle dans la suppression de la réponse immunitaire de l'hôte (anti-tumorale et anti-virale). C'est l'établissement et l'analyse de souris invalidées pour le gène codant pour l'IL10 qui a permis de mettre en évidence son rôle important dans l'homéostasie intestinale, puisque ces souris développent spontanément des lésions inflammatoires limitées à l'intestin grêle et au colon (lésions d'entérocolite) (Kuhn et al, 1993).

Le gène codant pour l'IL10, chez l'homme, est situé sur le chromosome 1, et est constitué de 5 exons (Kim et al, 1992). Son clonage, à partir d'un clone T humain spécifique de la toxine tétanique qui sécrétait, en plus de l'IL10, de l'IL2, de l'IL4, de

l'IL5, et de l'IFN γ , a permis d'identifier la séquence en acides aminés de la protéine dont le poids moléculaire est de 18kDa (Vieira et al, 1991).

L'IL10 est biologiquement active sous la forme d'un homodimère non covalent constitué de 2 chaînes α polypeptidiques de 160 acides aminés chacune (Zdanov et al, 1995), similaires à l'IFN γ .

Son expression est régulée par différents mécanismes, transcriptionnels et post-transcriptionnels, selon le type cellulaire. L'équipe de Tone et al a montré que, contrairement à d'autres cytokines pour lesquelles l'expression du gène est régulée par les facteurs de transcription tels que NF κ B, C/EBP et AP-1, la transcription de l'IL10 peut être régulée par les facteurs de transcriptions Sp1 et Sp3, lesquels sont exprimés de manière constitutive par de nombreux types cellulaires (Tone et al, 2000). Ce résultat peut permettre d'expliquer comment le gène codant pour l'IL10 peut continuer à être transcrit quand ceux codant pour d'autres cytokines sont inactifs. Cependant, bien que de nombreux types cellulaires expriment des transcrits codant pour l'IL10, les niveaux d'expression de la protéine sont extrêmement variables d'un type cellulaire à l'autre. La même équipe a montré que cette variation d'expression au niveau protéique pouvait être expliquée par la présence de plusieurs copies de séquences AUUUA au niveau des transcrits, considérées comme des éléments d'instabilité favorisant la dégradation des ARNm, ces séquences étant retrouvées dans la région 3' non traduite des ARNm de l'IL10 dans des cellules non stimulées (Powell et al, 2000). La combinaison de ces 2 phénomènes – expression constitutive et régulation fine de l'expression au niveau post-transcriptionnel – pourrait expliquer une réponse immunorégulatrice rapide dans les processus inflammatoires.

La détection de l'IL10, *in vivo*, est très difficile en raison de sa demi-vie courte et de sa sécrétion rapide. La plupart des études s'intéressant aux différents types cellulaires capables de synthétiser de l'IL10, chez la souris ou chez l'homme, sont issues d'expérimentations *in vitro*, à partir de modèles de cultures cellulaires dans différentes conditions de stimulation. L'IL10 est détectée dans ces modèles, soit dans le surnageant du milieu de culture, soit en intracellulaire par cytométrie en flux.

Chez la souris, les études ont montré que l'IL10 peut être produite par différents types de cellules immunitaires, parmi lesquelles les macrophages ou les cellules dendritiques après stimulation par des îlots CpG d'ADN de procaryotes via TLR9 (Boonstra et al, 2006), les cellules NK, les lymphocytes B après stimulation par le LPS (Gieni et al, 1997) et les lymphocytes T (Moore et al, 2001). Concernant les lymphocytes T, l'IL10 a été initialement décrite comme une cytokine produite spécifiquement par les lymphocytes T CD4⁺ de type Th2 pour inhiber les cellules présentatrices de l'antigène et les macrophages (Moore et al, 2001). Des études plus récentes ont montré que l'IL10 pouvait être produite également par les lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (T reg), les lymphocytes T de type Th17 et par les lymphocytes T CD4⁺ de type Th1 (Moore et al, 2001). Ces lymphocytes T de type Th1, produisant à la fois de l'IFN γ et de l'IL10, ont été mis en évidence chez la souris invalidée pour le gène codant pour l'IL10, infectée par des agents pathogènes intracellulaires comme par exemple *Toxoplasma gondii*, ou *Leishmania major* (Anderson et al, 2007 ; Jankovic et al, 2007). L'IL10 produite par ces lymphocytes T préviendrait une réponse inflammatoire systémique excessive au cours de ces infections (Trinchieri et al, 2001). Dans la muqueuse colique murine normale, l'IL10 est exprimée (protéine/IHC) par les lymphocytes T reg CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ (Uhlig et al, 2006).

Chez l'homme, les données sont largement moins fournies. De Waal Malefyt et al montrent que des monocytes isolés du sang circulant de donneurs sains sont capables de sécréter de l'IL10 après stimulation par le LPS (de Waal Malefyt et al, 1991). Par ailleurs, des clones lymphocytaires T de type Th1 et Th2, obtenus après stimulation de lymphocytes T circulants par *Mycobacterium tuberculosis* et *Toxocara canis* respectivement, sont capables de sécréter de l'IL10 après stimulation par un ester de phorbol (PMA) associé à un anti-CD3 (Del Prete et al, 1993).

Dans la muqueuse intestinale humaine normale, l'IL10 est exprimée au niveau ARN (hybridation in situ) et protéique (immunohistochimie) par les cellules mononuclées du chorion à des niveaux faibles (Autschbach et al, 1998) parmi lesquelles les lymphocytes T reg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Uhlig et al, 2006). Braunstein et al montrent que la sécrétion d'IL10 par les lymphocytes T isolés du chorion de muqueuse colique normale n'est pas constitutive, mais inductible après

stimulation par un anti-CD2 (Braunstein et al, 1997). L'IL10 est également détectée dans le surnageant de milieu de culture de fibroblastes isolés de muqueuse colique humaine normale, et des expériences de coculture montrent que l'IL10 fibroblastique prolonge la survie des lymphocytes T mémoires isolés du chorion de la muqueuse colique par inhibition de l'apoptose (Ina et al, 2005). Une seule étude, jusqu'à présent, rapporte l'expression de l'IL10 par les cellules épithéliales de la muqueuse colique humaine normale. Il s'agit de l'étude d'Autschbach et al qui décrit l'expression de l'IL10 par les cellules épithéliales de l'épithélium de surface et des cryptes, détectée par immunohistochimie et par hybridation *in situ*. Aucune étude n'aborde la sécrétion, constitutive ou inductible, de l'IL10 par ces cellules épithéliales coliques humaines.

3.3.1.2.1.2. Les récepteurs à l'IL10

Le récepteur à l'IL10 est constitué de 2 sous-unités polypeptidiques transmembranaires, IL10R1 et IL10R2, membres de la famille des récepteurs à l'IFN.

L'IL10R1 est la sous-unité qui se lie à l'IL10. C'est un polypeptide glycosylé de 578 acides aminés (90 kDa) (Tan et al, 1993 ; Liu et al, 1994), lié à la kinase Jak1. Il est exprimé de manière constitutive par la plupart des cellules hématopoïétiques, les macrophages et les cellules dendritiques ayant les niveaux d'expression les plus élevés, notamment après stimulation. Il est aussi exprimé par des cellules non hématopoïétiques, cette expression étant cette fois-ci le plus souvent induite *in vitro* par différents stimuli. Par exemple, chez la souris, le LPS induit l'expression de l'IL10R1 par les fibroblastes (Weber-Nordt et al, 1994). Chez l'homme, les glucocorticoïdes induisent son expression par des kératinocytes normaux (Michel et al, 1997).

L'IL10R2 est la sous-unité dédiée à la transduction du signal d'activation, comme pour la sous-unité R2 du récepteur à l'IFN γ . Cette sous-unité est partagée avec les récepteurs pour d'autres cytokines comme l'IL22, l'IL26, l'IL28 et l'IL29 (Pestka et al, 2004). Elle interagit de manière constitutive avec la kinase Tyk2

(Kotenko et al, 1996). Son rôle est aussi important que celui de la sous-unité R1 puisque les souris invalidées pour le gène codant pour IL10R2 présentent les mêmes lésions d'entérocolite que les souris IL10^{-/-} (Spencer et al, 1998).

L'expression des 2 sous-unités fonctionnelles IL10R1 et IL10R2, au niveau ARNm, est rapportée dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle et du colon chez la souris (Denning et al, 2000). Chez l'homme, une étude rapporte l'expression des récepteurs à l'IL10 (ARNm) par les cellules épithéliales coliques normales, sans différencier les 2 sous-unités (Bourreille et al, 1999).

La liaison du ligand à la sous-unité R1 induit l'activation de la voie de signalisation Jak/Stat (Moore et al, 2001) (**Figure 55**). Les kinases Jak1 et Tyk2 sont activées par phosphorylation, entraînant en aval le recrutement et la phosphorylation de Stat 3, Stat 1 et Stat 5. Il s'ensuit la formation d'homo- et d'hétérodimères de ces protéines Stat qui sont très rapidement, en quelques secondes, transloqués dans le noyau pour induire la transcription de gènes cibles (Wehinger et al, 1996 ; Pranada et al, 2004).

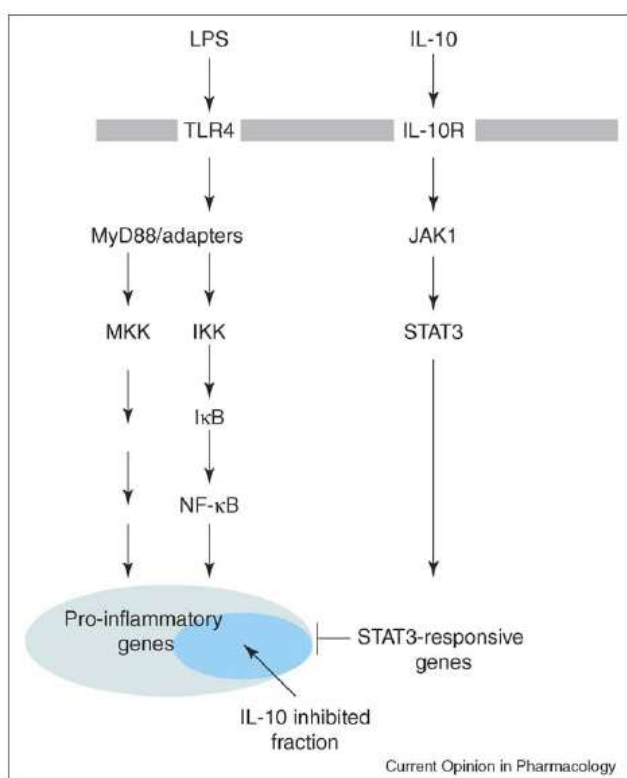


Figure 55 : La voie de signalisation induite par l'IL10. L'activation de Stat3 induit l'expression de gènes qui inhibent la réponse pro-inflammatoire, suscitée par exemple par l'activation de TLR4. D'après Murray et al, 2006

Parmi ces gènes, *SOCS 1* est connu pour être le principal inhibiteur physiologique de la transduction du signal induit par l'IFN γ , l'IL4 et l'IL10 (Alexander et al, 1999 ; Naka et al, 2001 ; Ding et al, 2003). Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'inhibition de la synthèse de nombreuses cytokines et chimiokines par les macrophages et les cellules dendritiques activés par les agonistes des TLR comme le LPS sont très controversés, notamment en raison de l'inadéquation entre la rapidité avec laquelle le facteur de transcription Stat3 semble agir au niveau transcriptionnel et le temps incompressible nécessaire pour mettre en évidence les variations d'expression des gènes. S'agit-il d'un contrôle au niveau transcriptionnel (Murray, 2005 et 2006), dépendant de Stat3 ? de manière directe ou indirecte ? S'agit-il d'un contrôle post-transcriptionnel par dégradation des ARNm ? ou une combinaison des 2 mécanismes ? (Moore et al, 2001 ; Donnelly et al, 1999 ; Williams et al, 2004). Par exemple, Lang et al. montre *in vitro* dans des macrophages isolés de moelle osseuse de souris IL10 $-/-$ et stimulés par le LPS que l'IL10 induit très rapidement (dès 45 minutes) l'expression d'une quarantaine de gènes comme *SOCS3* (impliqué dans l'inhibition de la réponse macrophagique à l'IFN γ) et *BCL3* [impliqué dans la régulation de l'activation de NF κ B, et responsable de l'inhibition de la synthèse de TNF α par des macrophages activés par le LPS (Kuwata et al, 2003)] et réprime environ 20 à 25% des gènes exprimés normalement après activation par le LPS, comme TNF α , IL6, IL12p40, IL18 (Lang et al, 2002). Néanmoins, ces résultats montrent que l'inhibition, par l'IL10, de l'expression de la majorité des gènes induits par le LPS n'a pas lieu au niveau transcriptionnel.

3.3.1.2.1.3. Les rôles physiologiques

Ces dernières années, les activités biologiques de l'IL10 à l'échelon cellulaire, puis à l'échelon de l'organisme entier, ont été intensivement étudiées, la principale motivation de ces efforts étant le développement de l'IL10 comme une nouvelle thérapeutique immunorégulatrice de choix dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. En effet, l'IL10 serait capable, contrairement à d'autres molécules, comme les anticorps monoclonaux humanisés anti-TNF α , dirigées contre une seule cytokine, de cibler plusieurs médiateurs pro-inflammatoires.

Une étude clé suggère que l'IL10 n'est pas une cytokine de plus à rajouter à la myriade de cytokines déjà connues..., mais joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie de l'écosystème intestinal. Il s'agit du travail de Kuhn et al. qui montre que l'inactivation du gène codant pour l'IL10 chez la souris est responsable d'une colite spontanée médiée par une réponse inflammatoire de type Th1 (Kuhn et al, 1993). Ces résultats ont été confortés par les études réalisées sur des souris atteintes d'un déficit immunitaire combiné sévère (SCID) auxquelles on injecte soit des lymphocytes T naïfs (CD45RB^{hi}) soit des lymphocytes T matures (CD45RB^{lo}). Seul le premier groupe de souris développe des lésions de colite sévère, ce qui suggère un rôle majeur d'une population de lymphocytes T régulateurs dans l'homéostasie de la muqueuse intestinale, principalement via l'IL10 et le TGFβ (Groux et al, 1997 ; Read et al, 1998 ; Asseman et al, 1999).

De plus, en l'absence d'IL10, la muqueuse semble développer spontanément une réponse inflammatoire incontrôlée contre la flore intestinale du microbiote. En effet, seules les souris IL10 -/- abritant une flore intestinale développent des lésions de colite, alors que les souris IL10 -/- élevées en conditions axéniques ne développent pas de lésions inflammatoires intestinales (Sellon et al, 1998).

L'ensemble de ces résultats suggère donc que des antigènes intraluminaux, probablement issus du microbiote, induisent le développement de lymphocytes T régulateurs, source d'IL10 et de TGFβ, exerçant une immunosuppression au sein de la muqueuse intestinale et prévenant de ce fait les lésions de colite.

Les nombreux travaux, préalables à ces études, ont exploré le rôle de l'IL10 *in vitro* à l'échelon cellulaire, à partir de modèles de cocultures, le plus souvent chez la souris. Ces travaux montrent que la principale fonction physiologique de l'IL10 est de bloquer de manière indirecte l'activation des lymphocytes T de type Th1 en régulant la réponse des macrophages activés par des micro-organismes et/ou leurs produits (modulation de synthèse de diverses cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, de monoxyde d'azote et d'expression de molécules de costimulation) (Moore et al, 2001). Elle inhibe en effet l'expression de certaines molécules de costimulation comme le CD80, le CD86, ICAM1, ou les molécules de classe II du CMH par les monocytes-macrophages activés (Ding et al, 1993 ; Willems et al, 1994). Elle inhibe

également la sécrétion d'IL1 β , d'IL6, d'IL8, du TNF α , de l'IL12, de l'IL18, du G-CSF, du GM-CSF et de nombreuses chimiokines impliquées dans le recrutement de monocytes, de cellules dendritiques, de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes T, par les monocytes/macrophages activés par le LPS (Bogdan et al, 1991 ; de Wall Malefyt et al, 1991 ; Fiorentino et al, 1991a). De plus, l'ajout d'IL10 dans le milieu de culture de cellules dendritiques immatures dérivées de monocytes humains circulants inhibe le processus de maturation de ces CPA qui sont incapables d'activer des lymphocytes T CD4+ (Groux et al, 1996 ; Steinbrink et al, 1997). Elle inhibe également la sécrétion de nombreuses cytokines et chimiokines par des polynucléaires neutrophiles activés par du LPS ou du TNF α (Cassatella et al, 1993). Dans la muqueuse intestinale, toujours chez la souris, l'IL10 bloque la synthèse d'IFN γ et d'IL2 par les lymphocytes T de type Th1 (Fiorentino et al, 1991b) et exerce un rôle antiprolifératif sur les lymphocytes T (Schreiber et al, 1997). Par ailleurs, selon la source cellulaire de l'IL10, la régulation de la réponse immunitaire semble différente. L'équipe de Müller montre que des souris présentant une inactivation du gène codant pour l'IL10 spécifiquement dans les lymphocytes T (par une méthode Cre/loxP), meurent rapidement suite à une infection par *Toxoplasma gondii*, comme les souris IL10 $-/-$, alors qu'elles développent une réponse immunitaire innée adaptée en réponse au LPS (Roers et al, 2004), suggérant que cette source lymphocytaire d'IL10 n'intervient pas dans la régulation de la réponse au LPS. En effet, l'injection intra-péritonéale de LPS à ces souris n'est pas létale et n'entraîne pas d'élévation sérique du TNF α , de l'IFN γ ou de l'IL12, comparativement aux souris IL10 $-/-$ qui décèdent très rapidement au bout de 3 jours avec des taux sériques de TNF α , d'IFN γ et d'IL12 très élevés (Roers et al, 2004).

Une étude *in vitro* sur la lignée cancéreuse colique humaine T84 montre que l'ajout d'IL10 dans le milieu de culture prévient l'augmentation de perméabilité paracellulaire induite par l'IFN γ ou le TNF α (Madsen et al, 1997). Cette étude suggère donc que l'IL10 exogène pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité d'une monocouche de cellules épithéliales.

Jusqu'à présent, aucune étude n'a démontré formellement le rôle immunorégulateur de l'IL10 chez l'homme, au sein de la muqueuse intestinale, par

manque de modèle expérimental suffisamment adapté. La compréhension des mécanismes de l'homéostasie de la muqueuse intestinale humaine n'est possible qu'en conservant les interactions entre les cellules résidentes de la muqueuse, sans faire intervenir les cellules circulantes. Un tel modèle pose des problèmes techniques: le maintien en culture *ex vivo* d'une muqueuse normale ainsi que la fiabilité et la reproductibilité du modèle. Nous reviendrons sur ce point ultérieurement dans les annexes techniques concernant l'historique des cultures d'explants.

Plusieurs études cliniques multicentriques ont tenté d'utiliser en thérapeutique, chez des patients atteints de MICI, les propriétés immunorégulatrices de l'IL10, nécessaire au maintien de l'homéostasie de l'écosystème intestinal chez la souris. Ces études, testant différentes doses d'IL10, administrée en systémique par voie sous-cutanée, chez des patients atteints de maladie de Crohn à différents degrés d'activité, ont montré que l'IL10 est bien tolérée mais qu'elle n'entraîne pas d'augmentation significative du taux de rémission ou d'amélioration des symptômes cliniques par rapport au traitement placebo (Fedorak et al, 2000 ; Schreiber et al, 2000 ; Colombel et al, 2001). Dans certains cas même, à forte dose, une accentuation des phénomènes inflammatoires et/ou des effets secondaires (anémie, maux de tête) sont observés, en raison notamment d'une augmentation de production d'IFN γ contrecarrant les effets anti-inflammatoires de l'IL10 (Herfarth et Scholmerich, 2002 ; Tilg et al, 2002).

Ces résultats décevants peuvent s'expliquer par l'analyse des données obtenues chez l'animal. En effet, les études réalisées chez la souris IL10 $-/-$ montrent clairement que l'IL10 semble exercer ses propriétés immunorégulatrices uniquement au niveau de la muqueuse intestinale, rendant obligatoire sa biodisponibilité locale en cas d'administration systémique. Ainsi, l'inefficacité relative des injections systémiques d'IL10 chez l'homme pourrait-être liée à son élimination rapide dans la circulation, avant d'atteindre le tissu cible (Chernoff et al, 1995). Plusieurs expériences chez l'animal ont montré une meilleure efficacité des « thérapies locales » en utilisant différents systèmes « d'administration locale » tels que les adénovirus synthétisant de l'IL10 (Barbara et al, 2000 ; Lindsay et al, 2002) ou l'administration orale de certaines bactéries du microbiote modifiées génétiquement pour sécréter de l'IL10 (Steidler et al, 2000). D'autre part, l'étude de Barbara et al

montre chez des rats présentant une colite induite au DNB (dinitrobenzene sulfonic acid) que l'administration de l'IL10 doit être très précoce, avant ou durant la phase d'initiation de la réponse inflammatoire, pour être efficace et diminuer significativement les lésions de colique (Barbara et al, 2000).

En conclusion, l'ensemble de ces données montre que les effets de l'IL10 sont différents selon sa voie d'administration, systémique ou locale. Il est donc nécessaire d'étudier les effets biologiques de l'IL10, *in situ*, au sein des cellules résidentes de la muqueuse intestinale, avant d'envisager le développement de thérapies ciblées.

3.3.1.2.2. Le TGF β

3.3.1.2.2.1. Définition, production

Le TGF β (transforming growth factor 1) est un membre de la superfamille du TGF β , incluant entre autres les BMP (Bone Morphogenetic Proteins), les activines, les inhibines, et différents facteurs de croissance (Chang et al, 2002). Il existe 3 isoformes du TGF β chez l'homme, le TGF β 1, le TGF β 2 et le TGF β 3, codés par 3 gènes distincts (Govinden et Bhoola, 2003). Ces isoformes sont très similaires d'un point de vue structural (80% d'homologies entre les séquences protéiques). Le TGF β 1 étant l'isoforme prédominante, nous ne décrivons que cette isoforme dans ce mémoire.

Le TGF β 1 est produit par de nombreux types cellulaires (plaquettes, cellules immunitaires dont les lymphocytes T régulateurs, fibroblastes, cellules tumorales) (Letterio et Roberts, 1998). Il est synthétisé sous la forme d'un précurseur immature de 390 acides aminés, le LTGF β (latent TGF β ou pré-pro-TGF β), constitué d'un peptide signal de sécrétion dans sa région amino-terminale, d'une région centrale appelée LAP (latency-associated protein), et d'une région carboxyterminale constitué du TGF β bio-actif après maturation (**Figure 56**) (Barcellos Hoff et al, 1996). Le LTGF β peut être sécrété sous la forme d'un petit complexe, SLC (small latent

complex) ou sous la forme d'un large complexe, LLC (large latent complex) lorsque le LAP est associé de manière covalente à la LTBP (latent TGF β -binding protein). Les peptides LAP confèrent la latence du complexe alors que la LTBP permet la fixation du TGF β 1 à la matrice extra-cellulaire et son stockage (Annes et al, 2003). Les changements de conformation du LLC ou du SLC sont induits soit par un clivage protéolytique des LAP par différentes protéases, soit par des interactions physiques des LAP avec d'autres protéines, ce qui aboutit à la libération d'une forme bioactive homodimérique de 24 kDa du TGF β 1.

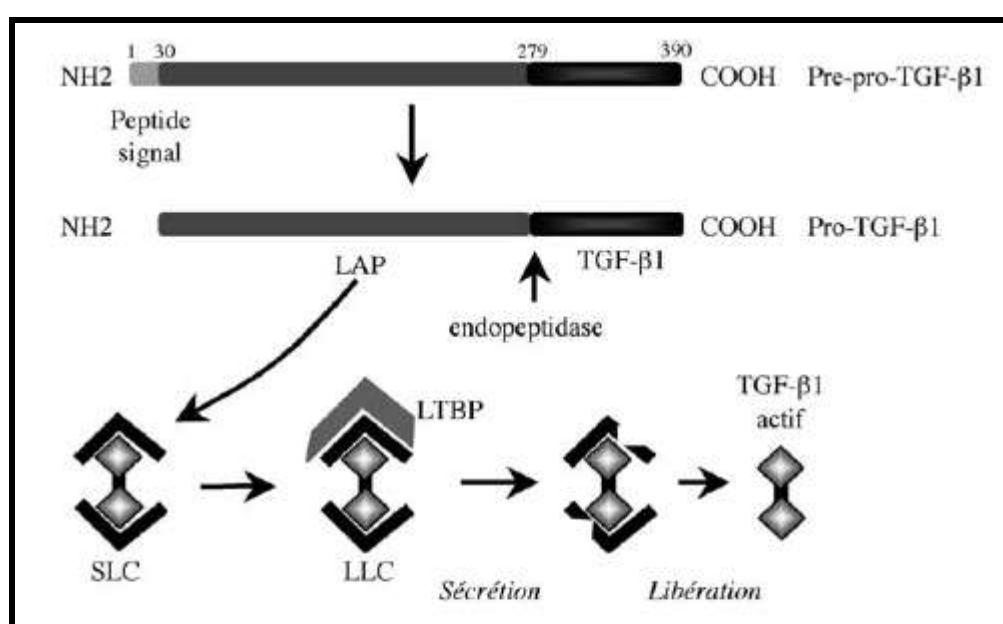


Figure 56 : La maturation du TGF β . D'après Javelaud et Mauviel, 2004

Le TGF β 1 est codé par un gène situé en 19q13, cloné. L'analyse de son promoteur a montré la présence d'au moins 7 sites de fixation au facteur de transcription Sp1 (Kim et al, 1989) et un site de fixation pour le complexe AP-1 (Activator-protein-1), constitué des 2 protéines c-jun et c-fos, impliqué dans l'auto-induction de la transcription du gène par le TGF β 1 lui-même (Kim et al, 1990). A côté de cette régulation transcriptionnelle de l'expression du TGF β 1 par le TGF β 1 lui-même, des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle (Wager et Assoian, 1990 ; Scotto et Assoian, 1993), ou traductionnelle (Assoian et al, 1987) ont été rapportés.

3.3.1.2.2.2. Les récepteurs au TGF β 1

Le TGF β 1 induit une réponse cellulaire en se fixant à des récepteurs membranaires spécifiques à activité sérine/thréonine kinase dont l'expression est ubiquitaire (Attisano et Wrana JL, 1998 ; Massague J, 2000). La famille des récepteurs au TGF β 1 est constituée de 2 sous-familles, similaires d'un point de vue structural, les récepteurs de type I et de type II (TGF β RI et TGF β RII). Ces récepteurs sont constitués d'un domaine extracellulaire riche en cystéine et d'un domaine intracellulaire permettant la transduction du signal. Le TGF β RII a une activité kinase intrinsèque tandis que le TGF β RI doit être phosphorylé pour être actif. Le TGF β 1 se fixe au TGF β RII, formant un complexe hétérodimérique capable de recruter le TGF β RI et de l'activer par phosphorylation des résidus sérines et thréonines présents dans son domaine GS. Le betaglycane, un protéoglycane transmembranaire connu aussi sous le nom de TGF β RIII permet la fixation du TGF β 1 au TGF β RII avec une meilleure affinité.

La transduction du signal des récepteurs jusqu'au noyau est assurée principalement par la phosphorylation d'une famille de protéines cytoplasmiques, les Smads, homologues des protéines Sma de *Caenorhabditis elegans* et Mad de la Drosophile (Massague et al, 2000). Cette famille est divisée en 3 groupes fonctionnels différents : les Smad associés au récepteur (R-Smad, Smad 2 et 3), particulièrement au TGF β RI, un co-Smad (Smad 4), médiateur commun pour tous les membres de la famille du TGF β qui à un rôle de facteur de transcription, et un Smad inhibiteur (I-Smad, Smad 7) qui, soit s'associe au TGF β RI activé et empêche la phosphorylation des R-Smad ou recrute 2 ubiquitine-ligases au niveau du TGF β RI activé qui entraînent la dégradation du complexe des récepteurs (Miyazono et al, 2000).

Smad 2 est recruté par le TGF β RI dont l'activité kinase phosphoryle les résidus sérine présents à l'extrémité C-terminale. Il s'ensuit une dissociation de Smad 2 activé du récepteur, et une association avec Smad 4, ce complexe migrant vers le noyau pour se fixer sur les séquences promotrices de gènes cibles soit de façon directe, soit en association avec d'autres facteurs de transcription. Ces protéines Smad jouent un rôle important, notamment au cours du développement puisque les invalidations bi-alléliques de Smad 2, Smad 3, ou Smad 4 chez la souris sont létales dès le stade embryonnaire (Weinstein et al, 1998).

D'autres voies de signalisation peuvent être activées par le TGF β 1, selon le contexte et le type cellulaire. Il s'agit de la voie MAP Kinase et de la voie PI-3K (Mulder, 2000), sans que les mécanismes impliqués et l'importance relative de ces voies dans la modification des réponses cellulaires au TGF β 1 soient clairement définis pour le moment.

3.3.1.2.2.3. Les rôles physiologiques du TGF β 1

C'est dans les années 1990 que l'analyse des modèles de souris invalidées pour le gène codant pour le TGF β 1 a permis de mettre en évidence le rôle de cette cytokine, notamment dans la régulation de la réponse immunitaire (Shull et al, 1992 ; Kulkarni et al, 1993 ; Kulkarni et al, 1995). A la différence des souris IL10 $-/-$ où l'inflammation est restreinte à l'intestin, ces souris TGF β 1 $-/-$ présentent des lésions inflammatoires multi-tissulaires, incluant l'intestin. Le taux de mortalité intra-utérine est élevé. Seul 1/3 des souris invalidées parvient à se développer jusqu'à la naissance mais meurt très rapidement au bout de 2 à 3 semaines après avoir développé une réaction inflammatoire systémique incontrôlée associée à une perte de poids importante. L'autopsie de ces souris révèle des taux circulants élevés d'IFN γ et une infiltration massive pluri-tissulaire par des lymphocytes et des macrophages, responsable entre autres de lésions marquées d'endocardite et de myocardite, et au niveau intestinal, de lésions de colite et de gastrite. Les lymphocytes T semblent être les principaux médiateurs de cette réaction inflammatoire généralisée puisqu'une déplétion en lymphocytes T effecteurs CD4 $^{+}$ (Letterio et al, 1996) ou CD8 $^{+}$ (Kobayashi et al, 1999) améliore la survie et diminue l'intensité des lésions inflammatoires. Néanmoins, ces études ne permettent pas d'analyser les mécanismes exacts selon lesquels le TGF β 1 semble contrôler la réponse lymphocytaire T étant donné d'une part, l'expression très large du TGF β 1 et de ses récepteurs, et d'autre part le taux de mortalité élevé de ces souris. Dans les années 2000, les mécanismes immunorégulateurs induits par le TGF β 1 ont commencé à être décryptés grâce à la mise au point de souris transgéniques exprimant spécifiquement dans certains types cellulaires une forme tronquée du TGF β RII, ou n'exprimant pas dans certains types cellulaires le TGF β RII (Gorelik et

Flavell, 2000 et 2002; Lucas et al, 2000 ; Laouar et al, 2005). Les résultats de ces études montrent que le TGF β 1 maintient un état de tolérance immunitaire via un effet direct sur la prolifération, l'activation et la différenciation des lymphocytes T effecteurs et T régulateurs, ces effets étant dépendants de l'état de différenciation de la cellule cible et du contexte cytokinique (Li et Flavell, 2008). En effet, l'inhibition de la voie du TGF β 1 spécifiquement dans les lymphocytes T est à l'origine, dans la plupart des organes, d'une diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs et d'une expansion des lymphocytes T effecteurs activés, entraînant un taux de mortalité néonatal aussi élevé que celui observé chez les souris TGF β 1 -/- (Gorelik et Flavell, 2000 ; Li et al 2006). L'inhibition de la différenciation lymphocytaire T de type Th1 semble être liée à l'inhibition de la synthèse d'IFN γ par les cellules de l'immunité innée, et notamment par les cellules NK. En effet, selon les résultats de Laouar et al., les souris transgéniques exprimant un dominant-négatif du TGF β RII spécifiquement dans les cellules NK présentent une accumulation de ces cellules dans la rate. Ces cellules NK sont capables de sécréter des taux élevés d'IFN γ de manière prolongée après une infection par *Leishmania*, et déclenchent une réponse immunitaire adaptative de type Th1 (Laouar et al, 2005).

Par ailleurs, des études plus récentes *in vitro* à partir de modèles de cocultures de cellules mononuclées de souris montrent que le TGF β 1 joue également un rôle dans la différenciation de lymphocytes T naïfs CD4⁺ en lymphocytes T de type Th17 pro-inflammatoires en présence de cytokines inflammatoires comme l'IL6 (Mangan et al, 2006 ; Veldhoen et Stockinger, 2006). Chez l'homme, le TGF β 1 ne semble pas induire *in vitro* la différenciation Th17, inhibant au contraire la production d'IL17 (Acosta-Rodriguez et al, 2007).

De nombreuses études *in vitro* ont montré que le TGF β 1 contrôle également de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la migration, l'adhésion et la mort cellulaire selon le type cellulaire et le stade de différenciation (Roberts et al, 1998). Il exerce un effet anti-prolifératif sur les cellules épithéliales, endothéliales, neuronales et certaines cellules mésenchymateuses par différents mécanismes, dont l'induction transcriptionnelle des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (p21, p15), l'inhibition d'expression de c-myc (Ten Dijke et al, 2002), ou l'inhibition d'expression des protéines Id (Inhibitor of differentiation) (Kang et al, 2003). Le TGF β 1 joue également un rôle dans le processus de

cicatrisation, en régulant l'expression des protéines de la matrice extra-cellulaire et en inhibant la dégradation de la matrice extra-cellulaire (Verrecchia et Mauviel, 2002). Il est donc considéré comme un facteur anabolique puissant et sa sur-expression est associée à différentes pathologies fibrosantes (Varga, 2002). Enfin, le TGF β 1 intervient dans le développement embryonnaire, y compris dans le processus d'implantation de l'œuf (Akhurst et al, 1992), ce qui peut expliquer les taux élevés de mortalité intra-utérine des souris TGF β 1 -/-.

Plusieurs travaux expérimentaux plaident en faveur d'une implication du TGF β 1 dans l'homéostasie de la muqueuse intestinale. En effet, les souris TGF β 1 -/- développent, entre autres, des lésions de colite (Shull et al, 1992 ; Kulkarni et al, 1993 et 1995). La colite induite par l'injection systémique de lymphocytes T CD4+RB^{high} chez la souris SCID peut être prévenue par l'injection de lymphocytes T reg CD4+RB^{low} qui inhibent la réponse inflammatoire de type Th1, via la production de cytokines immunorégulatrices dont le TGF β 1 puisque cette propriété est abolie par un anticorps anti-TGF β 1 (Powrie et al, 1996). Pour analyser plus spécifiquement le rôle du TGF β 1 dans l'homéostasie intestinale, Hahm et al ont généré des souris transgéniques capables de surexprimer un dominant négatif du gène codant pour le TGF β RII sous le contrôle du promoteur du peptide en trèfle, TFF3, spécifique des cellules épithéliales intestinales. Ils montrent que ces souris, caractérisées par une voie TGF β 1 déficiente uniquement dans les cellules épithéliales intestinales, développent spontanément des lésions de colite dès lors qu'elles sont en contact avec les bactéries de la flore intestinale. Ces lésions inflammatoires sont associées à une élévation des taux de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1 β , l'IL2, l'IFN γ et le TNF α , mais aussi de l'IL10 dans l'intestin (Hahm et al, 2001).

De plus, l'équipe de Strober montre que le TGF β 1, sécrété par les lymphocytes T du chorion lors du phénomène de tolérance orale (Neurath et al, 1996) ou administré de manière systémique via un plasmide codant pour la forme active du TGF β 1 (Kitani et al, 2000) est capable de prévenir la colite de type Th1 induite par l'administration intra-rectale de TNBS (acide 2, 4, 6 trinitrobenzène sulfonique) et de diminuer les lésions inflammatoires une fois la colite établie. Cette production de TGF β 1 est associée, d'une part à une diminution de sécrétion d'IFN γ et d'IL12, et d'autre part à une augmentation de sécrétion d'IL10 par les mêmes cellules mononuclées isolées du chorion de la muqueuse colique et stimulées *ex vivo* (Kitani

et al, 2000). De la même manière, dans le modèle de colite de type Th2 induite à l'oxazolone, les cellules mononuclées isolées du chorion de la muqueuse colique sont capables *ex vivo* de sécréter des taux élevés de TGF β à l'état de base, et l'administration d'un anticorps anti-TGF β aggrave la sévérité des lésions inflammatoires (Boirivant et al, 1998). Chez l'homme, des taux élevés de TGF β 1 ont été rapportés dans la muqueuse intestinale de patients atteints de MICI en phase active, essentiellement dans les cellules mononuclées du chorion, sans effets bénéfiques néanmoins sur l'évolution des lésions inflammatoires (Babyatsky et al, 1996 ; Monteleone et al, 2004). Ce constat, assez paradoxal, s'explique peut-être par une voie de signalisation du TGF β 1 défectueuse. En effet, l'équipe de MacDonald retrouve une expression élevée de Smad 7 dans les lymphocytes T isolés du chorion de muqueuses intestinales chez des patients atteints de MICI et des taux très bas de Smad 3 phosphorylé. L'inhibition de Smad 7 permet *in vitro* de restituer la réponse au TGF β 1 des lymphocytes T isolés du chorion (Monteleone et al, 2001).

L'ensemble de ces données soulève plusieurs questions non encore résolues. Les 2 cytokines immunorégulatrices, l'IL10 et le TGF β 1, agissent-elles de manière identique chez la souris et chez l'homme ? Existe-t-il des interactions entre l'IL10 et le TGF β 1 au cours de la réponse immunorégulatrice au sein de la muqueuse intestinale chez l'homme ? Si oui, à quelle étape de la réponse ?

RESULTATS

Articles 1 et 2 (*Chapitre 2 de la bibliographie*)

1. Introduction

Les patients atteints de MICI présentent un risque accru de survenue d'un cancer colorectal au cours de l'évolution de leur maladie selon la séquence inflammation / régénération / dysplasie / cancer. Les mécanismes de carcinogenèse sont multifactoriels mais les anomalies moléculaires et cellulaires à l'origine de ce processus sont incomplètement élucidées. Les anomalies connues ont une fréquence et une séquence de survenue différentes de celles impliquées dans la carcinogenèse colorectale sporadique. De nombreux arguments, directs ou indirects, suggèrent l'implication de l'inflammation chronique en tant que facteur prédisposant au cancer, à l'origine de cette différence. Par exemple, l'équipe de Ullman a récemment montré à partir d'une étude de population de plus de 400 patients atteints de RCH que l'index d'activité de la colite évalué histologiquement est étroitement corrélé au risque de cancer colorectal (Gupta et al, 2007).

Les 2 articles présentés ci-après s'inscrivent dans une approche commune, anatomoclinique, visant à définir des marqueurs prédictifs de progression vers le cancer chez des patients atteints de MICI. Cette approche est fondée sur l'exploitation d'une même cohorte de patients atteints de MICI et ayant développé des lésions tumorales au cours de l'évolution de leur maladie. Ce travail nous a permis d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de la carcinogenèse dans ce contexte inflammatoire. Au début de notre étude, les anomalies moléculaires rapportées au cours du processus de carcinogenèse dans les MICI concernaient principalement la voie d'instabilité chromosomique : mutation ou perte d'hétérozygotie du gène *APC* peu fréquentes et tardives, anomalies précoces des gènes *P53* (mutations, perte d'allèle ou duplication du chromosome 17) et *KRAS* (mutations, perte d'allèle). Cependant, de plus en plus d'études, aboutissant parfois à des résultats contradictoires, tentaient de démontrer l'implication de la voie d'instabilité microsatellitaire dans ce processus de carcinogenèse, avec une fréquence plus élevée [jusqu'à 67% des cas de cancers (Tahara et al, 2005)] que dans la carcinogenèse colorectale sporadique. Or, étant donné l'association étroite

entre l'instabilité microsatellitaire et la mutation du gène *BRAF* dans la carcinogenèse colorectale sporadique, nous avons recherché si cette mutation pouvait également être impliquée dans la carcinogenèse associée aux MICI. Dans le premier article, nous avons donc étudié le statut des gènes *BRAF*, *KRAS*, le statut microsatellitaire, et le profil d'expression des protéines MMR, p53 et β caténine à chacune des étapes de la séquence de carcinogenèse associée aux MICI, à partir d'une cohorte de patients atteints de rectocolite hémorragique ou de maladie de Crohn et ayant développé des lésions tumorales.

Dans le deuxième article, nous avons voulu étudier l'implication d'un facteur trophique pour l'épithélium intestinal, la neurotensine, et de son récepteur, NTS1, dans le processus de carcinogenèse associée aux MICI. La neurotensine est un neuropeptide, considérée comme une hormone, impliquée à la fois dans la progression de la réponse inflammatoire intestinale et dans le processus de régénération épithéliale aboutissant à la cicatrisation. Par ailleurs, elle facilite la prolifération des cellules épithéliales issues de lignées cancéreuses en culture. Cette double implication dans l'inflammation/régénération épithéliale et la carcinogenèse résulte de l'activation de son récepteur NTS1, dont l'expression peut-être régulée par la neurotensine ou par la β caténine. Compte-tenu du fait que l'expression de NTS1 par les cellules tumorales représente une cible thérapeutique potentielle, nous avons étudié, à partir de la même cohorte de patients, l'expression du couple NT/NTS1 corrélée à celle de la β caténine à chacune des étapes de la séquence de carcinogenèse associée aux MICI.

2. Résumé de l'article 1 *“Involvement of the serrated neoplasia pathway in inflammatory bowel disease-related colorectal oncogenesis”*

*Le but de cette étude est d'identifier des lésions festonnées coliques en muqueuse inflammatoire chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, de caractériser leur statut moléculaire (mutation des gènes *BRAF*, *KRAS*, statut microsatellitaire, et protéines MMR), et de vérifier que ces anomalies moléculaires sont spécifiques de « la voie des tumeurs festonnées ». Les lésions tumorales de 36 patients atteints de MICI ont été colligées et relues rétrospectivement, incluant 13 adénocarcinomes (1 mucineux et 12 conventionnels),*

28 dysplasies (1 adénome festonné traditionnel et 27 adénomes conventionnels) et 1 polype hyperplasique. Le polype hyperplasique et l'adénome festonné traditionnel sont caractérisés par la mutation BRAF V600E isolée. L'adénocarcinome mucineux, situé à proximité de l'adénome festonné présente à la fois la mutation BRAF V600E et un statut microsatellitaire instable avec perte d'expression de la protéine hMLH1. La mutation KRAS n'est retrouvée dans aucune de ces 3 lésions festonnées, et la mutation BRAF n'est retrouvée dans aucune des lésions tumorales conventionnelles.

Les lésions festonnées existent en muqueuse inflammatoire dans les MICI et sont associées à un profil moléculaire caractéristique : survenue de la mutation BRAF V600E dès le stade polype hyperplasique, suivie d'une instabilité microsatellitaire au stade cancer. Nous avons donc identifié pour la première fois la voie des tumeurs festonnées dans la carcinogenèse colorectale associée aux MICI.

3. Résumé de l'article 2 *“Over-expression of neurotensin high-affinity receptor 1 (NTS1) in relation with its ligand neurotensin (NT) and nuclear β -catenin in inflammatory bowel disease-related oncogenesis “*

Nous avons étudié l'expression du récepteur à la neurotensine de type 1 (NTS1) au cours du processus de carcinogenèse colorectale associée aux MICI, à partir d'une cohorte de 30 patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique ayant développé des lésions de dysplasie ou de cancer durant l'évolution de leur maladie.

Le pourcentage de cellules épithéliales exprimant NTS1 augmente progressivement depuis le stade inflammatoire jusqu'au cancer où l'expression de NTS1 est significativement plus élevée que dans la muqueuse inflammatoire ($p=0.0169$). Le nombre de cellules épithéliales exprimant NTS1 augmente parallèlement au cours du processus de carcinogenèse. Enfin, NTS1 étant un gène cible de la β caténine, nous avons retrouvé une expression concomitante de NTS1 et de β caténine, sans expression de NT, dans un certain nombre de lésions de dysplasie et de cancer.

Cette étude suggère donc 2 voies d'expression de NTS1 au cours du processus de carcinogenèse associée aux MICI : l'une dépendante de l'expression de NT, l'autre associée à l'activation de la voie APC/ β caténine, ces 2 voies n'étant pas mutuellement exclusives.

4. Discussion

Ces 2 articles montrent 2 résultats importants, 1) une voie de carcinogenèse jusque là non décrite dans les MICI, la voie des tumeurs festonnées, et 2) l'existence d'une connexion entre l'expression du couple NT/NTS1 et le processus de carcinogenèse associée aux MICI.

Nous avons décrit dans le premier article une voie de carcinogenèse non attendue dans les MICI, la voie des tumeurs festonnées, dont l'implication a été par la suite confirmée par d'autres auteurs, notamment l'équipe de Odze, dans le même type de pathologie (Srivastava et al, 2008). Sur le plan moléculaire, la séquence d'apparition des anomalies moléculaires caractérisée par la survenue précoce de la mutation *BRAF* V600E suivie par la perte d'expression de la protéine hMLH1 est similaire à celle décrite dans la voie des tumeurs festonnées sporadiques (O'Brien et al, 2006).

Ce résultat soulève la question du rôle des événements épigénétiques dans la carcinogenèse associée aux MICI, tels que l'hyperméthylation aberrante des îlots CpG présents dans le promoteur de nombreux gènes, notamment des gènes suppresseurs de tumeur comme *hMLH1*, *p16*, *p14*, *MGMT* (O-6-Methylguanine DNA methyltransferase), *MINT1* (Methylated in Tumor 1), *MINT2*, *MINT31*, *APC*. L'hyperméthylation aberrante du promoteur de certains gènes peut survenir au cours de 2 processus : 1) durant la carcinogenèse, impliquant le plus souvent des gènes suppresseurs de tumeur, appelés gènes de type C, retrouvés méthylés uniquement dans le cancer et 2) au cours du processus de vieillissement physiologique, intéressant des gènes différents, appelés gènes de type A, retrouvés méthylés dans les tissus sains mais aussi dans les tissus tumoraux (Toyota et Issa, 1999). Ce phénomène épigénétique, initialement décrit dans certains cancers colorectaux sporadiques, qualifiés alors de tumeurs CIMP (CpG island methylator phenotype) (Toyota et Issa, 1999), est considéré désormais, pour certains auteurs, comme un des mécanismes de carcinogenèse colorectale, au sein duquel on peut inclure la voie d'instabilité microsatellitaire (Issa et al, 2005).

Plusieurs études récentes, utilisant un panel plus large de gènes cibles, susceptibles d'être méthylés (Weisenberger et al, 2006 ; Goel et al, 2007 ; Nagasaka et al, 2008) tendent à montrer que les mutations activatrices des gènes *BRAF* et

KRAS entraînent un phénotype CIMP ou « méthylateur » (Toyota et Issa, 1999 ; Toyota et al 2000). Ceci est cohérent avec l'idée selon laquelle ces 2 protéines appartiennent à la même voie de signalisation. Ces résultats suggèrent que les mutations activatrices de ces 2 gènes, *BRAF* et *KRAS* sont impliquées dans le contrôle de ce processus épigénétique de méthylation aberrante. En d'autres termes, la question revient à savoir si ces mutations sont capables d'entraîner une régulation épigénétique de certains gènes ? La réponse a été apportée dans plusieurs études, notamment celle d'Ordway et al. sur des fibroblastes de rat, et celle de Gazin et al. à partir de la lignée NIH 3T3 issue de fibroblastes embryonnaires de souris, ces cellules étant transfectées avec un mutant *KRAS* (Ordway et al, 2004 ; Gazin et al, 2007). Ces 2 études montrent en effet que le profil d'expression génique de ces cellules transfectées renferme un nombre important de gènes réprimés, notamment des gènes suppresseurs de tumeurs comme *DNMT1*, ou des gènes pro-apoptotiques comme *FAS*, et le traitement de ces cellules par un agent déméthylant comme la 5 aza 2' deoxycytidine (5 aza) restaure leur expression.

L'implication de ce phénomène épigénétique dans la carcinogenèse colorectale associée aux MICI reste controversée en raison de résultats contradictoires selon les études. En effet, certains auteurs rapportent un degré de méthylation élevé dans les lésions tumorales survenant dans un contexte inflammatoire (Issa et al, 2000 ; Fleisher et al, 2000), d'autres retrouvent un degré de méthylation beaucoup moins marqué dans les cancers associés à la RCH que dans les cancers sporadiques (Konishi et al, 2007). Cette variabilité des résultats, problème déjà rencontré pour le statut MSI, est vraisemblablement multifactorielle. Elle peut s'expliquer par 1) l'utilisation de méthodologies diagnostiques différentes avec des sensibilités variables, 2) l'utilisation d'un panel plus ou moins large de gènes cibles [6 gènes cibles canoniques –hMLH1, p16, p14, MINT1, MINT2, MINT31- (Toyota et al, 2000) ou plus], puisque l'expérience montre que la densité de méthylation est très variable d'un gène à l'autre (Nagasaka et al, 2008), 3) le manque de définition consensuelle du statut CIMP (densité de méthylation des îlots CpG $\geq 5\%$ ou 15% selon les études, intéressant au moins 2 gènes cibles sur 6 de type C (Toyota et al, 2000)] concourant à l'utilisation de dénominations très variables (CIMP+, CIMP-, CIMP high, CIMP low...) et enfin 4) l'implication plus marquée du processus de méthylation lié à l'âge dans ce contexte inflammatoire. En effet, l'équipe de Issa rapporte des taux plus

élevés de méthylation liée à l'âge (concernant des gènes de type A) que de méthylation spécifique du cancer (concernant des gènes de type C) dans la muqueuse inflammatoire située à proximité de lésions de dysplasie, et dans les lésions de dysplasie et de cancer chez des patients atteints de RCH, comparativement à des patients atteints de cancer colorectal sporadique (Issa et al, 2001 ; konishi et al, 2007). Par ailleurs, ces études moléculaires n'ont pas été corrélées aux caractéristiques histopathologiques des lésions, notamment leur aspect festonné, à l'instar de ce qui a été fait dans la carcinogenèse colorectale sporadique (O'Brien et al, 2006).

Nous avons montré dans le second article qu'en étudiant le profil d'expression d'un facteur trophique pour l'épithélium, la neurotensine NT, et de son récepteur NTS1, il était possible de définir 2 groupes de cancers colorectaux associés aux MICI : un premier groupe que l'on pourrait qualifier « d'hormonodépendant », où l'expression aberrante du NTS1 par les cellules tumorales est corrélée à l'expression de son ligand, et un second groupe, où l'expression aberrante du NTS1 est sous le contrôle de la β caténine. Ce mécanisme original d'oncogenèse, jusque là non décrit dans les cancers colorectaux associés aux MICI, ouvre des perspectives intéressantes sur le plan thérapeutique. En effet, une nouvelle thérapeutique ciblée s'est récemment développée notamment dans le domaine des tumeurs digestives endocrines, la radiothérapie interne vectorisée. Elle consiste à irradier une cible tumorale au moyen de ligands (vecteur) couplés à des atomes radioactifs, injectés par voie veineuse, spécifiques d'un récepteur exprimé par les cellules tumorales. La faisabilité et l'efficacité de cette alternative thérapeutique a été démontré dans des essais de phase II dans certaines tumeurs endocrines digestives surexprimant le récepteur à la somatostatine, responsable de réponse tumorale objective et durable (Kwekkeboom et al, 2005). Des essais de biodisponibilité ont été réalisés avec succès avec des analogues stables de la neurotensine chez la souris nude xénotransplantée avec des cellules tumorales issues de la lignée HT29 surexprimant le NTS1 (Garcia-Garayoa et al, 2006) et des essais thérapeutiques chez l'animal sont en cours.

Article 3 (*Chapitre 3 de la bibliographie*)

1. Introduction

Au cours des 2 articles précédents, nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'oncogenèse impliqués dans un contexte inflammatoire chronique où les cellules épithéliales sont la cible d'une agression à l'origine de leur destruction, laquelle est suivie d'une étape de régénération épithéliale pouvant initier le processus de carcinogenèse.

Dans ce troisième article, nous nous sommes intéressés à un autre aspect de la biologie des cellules épithéliales : leur rôle immunomodulateur dans l'homéostasie de la barrière intestinale. Cependant, pour tester 1) la capacité des cellules épithéliales normales à produire et à sécréter des cytokines dans un environnement qui reproduit celui de la muqueuse colique normale et 2) l'implication des cellules épithéliales dans le maintien de l'homéostasie, nous manquions de modèle approprié. Jusqu'ici, les études menées pour préciser le rôle des différents acteurs de la barrière intestinale (cellules épithéliales, cellules immunitaires résidentes et microbiote) dans l'homéostasie intestinale ont été réalisées à partir de modèles *in vitro* de co-cultures de cellules épithéliales issues de lignées cancéreuses humaines, ou de modèles *in vivo* murins. Or, les modèles *in vitro* sont d'une part réducteurs, ne reproduisant pas les multiples interactions existant entre les différentes cellules résidentes de la muqueuse intestinale, et d'autre part ne permettent pas d'extrapoler les résultats obtenus à l'épithélium intestinal normal. L'équipe à laquelle j'appartiens a développé une méthode de culture de cellules épithéliales isolées à très court terme (Branka et al, 1997) mais il s'agit d'une approche très lourde qui se prête peu à l'expérimentation. Les modèles *in vivo*, représentés par les souris invalidées pour les gènes codant pour l'IL10 ou le TGF β 1, qui ont eu le mérite de mettre en évidence le rôle immunorégulateur de ces 2 cytokines dans le maintien de l'homéostasie intestinale, ne traduisent pas obligatoirement les mécanismes réellement impliqués *in situ* chez l'homme. Nous avons donc voulu aborder le problème à l'aide d'un système expérimental permettant de maintenir au maximum les interactions entre les cellules résidentes de la muqueuse intestinale normale, y compris les cellules épithéliales. Nous avons opté pour la culture d'explants, ce qui n'était pas un choix évident au

premier abord car considéré comme un modèle « vieillot », ne permettant que des études descriptives. Cependant, nous avons pensé que les nouveaux outils et techniques mis à notre disposition (anticorps neutralisants, RT-PCR quantitative...) pouvaient permettre d'optimiser cette approche. Anne Jarry a développé une méthode expérimentale permettant de cultiver les différentes tuniques du colon humain normal. Elle s'est aperçu que les explants de muqueuse, contrairement à ceux de la sous-muqueuse qui produisaient du $TNF\alpha$, étaient d'une grande stabilité en culture, même après un stress hypoxique post-chirurgicale (Jarry et al, 2006). Ces résultats supposaient un dialogue entre les cellules résidentes de la muqueuse responsable d'un état d'anergie. Dans ce troisième article, notre hypothèse était que la cellule épithéliale pouvait exercer un rôle immunomodulateur, c'est-à-dire qu'elle était capable de sécréter des cytokines pro- et/ou anti-inflammatoires. Nous avons donc essayer de comprendre les mécanismes impliqués dans cet état « d'anergie » de la muqueuse colique à partir d'explants de muqueuse colique humaine normale, maintenus en culture durant 48h, en rompant le « dialogue » des cellules résidentes entre elles grâce à l'utilisation d'anticorps anti-IL10 ou anti-TGF β RII neutralisants.

2. Résumé de l'article 3 *"Mucosal IL-10 and TGF- β play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN- γ mediated epithelial damage in human colon explants"*

L'IL10 est une cytokine immunomodulatrice qui joue un rôle fondamental dans la prévention des lésions d'entéocolite chez la souris. Néanmoins, les fonctions de l'IL10 au sein de la muqueuse intestinale chez l'homme sont très mal connues. Nous montrons dans cet article que l'IL10 est exprimée et sécrétée de manière constitutive par la muqueuse colique humaine normale, incluant les cellules épithéliales. La déplétion en IL10 dans les explants de muqueuse colique induit à la fois une diminution d'expression du gène cible de l'IL10, BCL3, aux fonctions immunosuppressives, et une augmentation de sécrétion d'IFN γ , de $TNF\alpha$ et d'IL17. De manière intéressante, l'inhibition du TGF β induit également une production d'IFN γ . De plus, les taux élevés d'IFN γ produits suite à la déplétion en IL10 sont responsables d'une destruction de l'épithélium de surface et des cryptes intestinales, principalement par apoptose. La polymyxine B, utilisé comme agent neutralisant du

LPS endogène, entraîne l'inhibition de la production d'IFN γ et le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale. Enfin, l'ajout de bactéries commensales au milieu de culture d'explants déplétés en IL10 et en LPS reproduit les effets du LPS endogène, induisant la sécrétion d'IFN γ . Ces résultats démontrent que la déplétion en IL10 au sein de la muqueuse colique humaine entraîne une réponse inflammatoire in situ médiée par l'IFN γ et induite par le LPS des bactéries commensales. Ils montrent également que l'IL10 et le TGF β jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse colique humaine.

3. Discussion

L'approche consistant à exploiter la culture d'explants par des outils très innovants a montré des résultats qui ont dépassé nos espérances. Ce modèle expérimental *ex vivo* a permis d'analyser *in situ* les interactions entre les différentes cellules qui constituent cet écosystème intestinal. Il nous a permis de montrer que 1) la source majeure de l'IL10 dans la muqueuse est la cellule épithéliale, 2) l'IL10 et le TGF β sont responsables du maintien de l'homéostasie de la muqueuse, 3) la déplétion en IL10 ou en TGF β est responsable d'une réponse inflammatoire de type Th1 avec production d'IFN γ , à l'origine de la destruction de la barrière épithéliale 4) cette réponse inflammatoire est médiée par le LPS endogène, et exacerbée en présence d'une souche de bactéries commensales vivantes.

Cette nouvelle approche expérimentale a permis de montrer pour la première fois chez l'homme que les cellules résidentes de la muqueuse colique normale sont capables de sécréter de l'IL10, dont la cellule épithéliale, bousculant le concept selon lequel l'IL10 de la muqueuse intestinale est synthétisée principalement par les cellules immunitaires (lymphocytes T régulateurs, macrophages, cellules dendritiques). De plus, il s'agit d'une production constitutive, sécrétée par une cellule considérée comme faisant partie du système immunitaire inné. L'IL10 ne peut donc pas être considérée comme une cytokine anti-inflammatoire ou immunosuppressive, au même titre que les stéroïdes, par exemple, qui sont produits en situation de stress pour récupérer un état physiologique. L'IL10 est plutôt une cytokine du « mutualisme », sécrétée de manière constitutive, et permettant de maintenir la cohabitation entre les 3 acteurs de l'écosystème intestinal que sont le microbiote, les cellules épithéliales et les cellules immunitaires résidentes. Nous montrons bien, dans ce système où les produits bactériens ont accès à la totalité de la muqueuse (situation vraisemblablement pas aussi anti-physiologique que cela puisse paraître) que ceux-ci n'entraînent pas de réponse inflammatoire spontanée en conditions normales. Cette réponse ne survient qu'en situation de déplétion en IL10 ou de blocage de la voie du TGF β . Ce qui pose le problème de savoir qu'elles sont les cibles cellulaires de ces 2 cytokines immunorégulatrices.

Notre résultat a même des implications en cancérologie puisqu'à la suite de notre travail, un article vient de montrer la production d'IL10 par les cellules épithéliales coliques issues de la lignée HT29 (Are et al, 2008). Ce résultat suggère que le maintien de la production d'IL10 par les cellules tumorales pourrait avoir un rôle dans l'échappement de la tumeur à la surveillance du système immunitaire.

Ce nouveau modèle expérimental de culture d'explants de muqueuse colique présente plusieurs avantages et ouvre des perspectives très larges. La grande nouveauté de ce système est qu'il permet de reproduire *ex vivo*, uniquement à partir des cellules résidentes de la muqueuse colique, les étapes initiales d'une réponse inflammatoire de type Th1. Ainsi, il permet de montrer que tous les éléments nécessaires et suffisants pour initier cette réponse inflammatoire sont présents au sein d'une muqueuse colique normale. Ces toutes premières étapes du processus inflammatoire peuvent être détaillées et hiérarchisées grâce à la possibilité qu'il offre de réaliser des études de cinétique dans le temps. On peut donc ainsi 1) préciser la hiérarchie de survenue des différents événements aboutissant à la réponse inflammatoire de type Th1, 2) déterminer les interactions (si elles existent) entre l'IL10 et le TGF β et 3) déterminer leurs cibles cellulaires respectives impliquées dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse colique. Au-delà de ces aspects, ce système permet d'avoir accès à la signature transcriptomale globale d'une muqueuse colique à la phase initiale d'une réponse inflammatoire (Werner et Haller, 2007).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Si on devait définir cette thèse par quelques mots-clés, ceux-ci comprendraient inflammation intestinale, carcinogenèse colique et homéostasie de la barrière intestinale. Dans ces 3 domaines, nous avons apporté des éléments nouveaux : 1) la rupture de cette barrière épithéliale au cours d'un processus inflammatoire chronique induit une nouvelle voie de carcinogenèse, la voie des tumeurs festonnées, jamais décrite dans la carcinogenèse associée aux MICI, 2) cette rupture de la barrière épithéliale durant la réponse inflammatoire est suivie d'une phase de régénération épithéliale qui coïncide avec l'expression du récepteur à la neurotensine, NTS1, elle-même associée au processus de carcinogenèse colique, et 3) le rôle majeur de l'IL10 et du TGF β *in situ* dans le maintien du mutualisme au sein de l'écosystème intestinal chez l'homme.

Quelles vont-être les directions privilégiées que je suivrai dans un avenir proche ? Notre objectif est double : 1) mieux appréhender les toutes premières étapes d'initiation d'une réponse inflammatoire intestinale chez l'homme en se focalisant notamment sur la hiérarchisation des événements cellulaires et moléculaires à l'origine de cette réponse, et 2) étudier de nouvelles voies de signalisation impliquées dans la progression inflammation / régénération épithéliale / dysplasie / cancer au niveau de la muqueuse intestinale.

Le premier objectif est difficile à atteindre à partir de prélèvements tissulaires issus de patients atteints de MICI, puisque par définition, la maladie inflammatoire est déjà établie. Par conséquent, le modèle original de culture d'explants développé par Anne Jarry me paraît, en tant que pathologiste, le meilleur modèle pour analyser finement les mécanismes d'initiation de l'inflammation et leur chronologie, mais aussi les mécanismes de régénération épithéliale qui suit la destruction épithéliale. Ce modèle permet effectivement d'intégrer à la fois les données morphologiques et biologiques, à travers notamment des études mécanistiques. Nous allons donc poursuivre l'exploitation de ce modèle de culture d'explants pour compléter nos données sur les conséquences *in situ* d'une rupture de l'homéostasie intestinale engendrée par une perte du dialogue entre les cellules résidentes de la muqueuse

colique. Parmi les pistes qui pourront être poursuivies dans l'avenir, citons par exemple :

- La hiérarchisation des effets de l'IL10 et du TGF β dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale, en d'autres termes, l'identification des cellules résidentes cibles sur lesquelles s'exercent les effets de ces 2 cytokines (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes T effecteurs ou régulateurs, cellules épithéliales).
- L'identification ainsi que le décryptage des mécanismes d'activation des tout premiers médiateurs biologiques qui initient la réponse inflammatoire. Parmi les candidats potentiels, citons par exemple l'IL12, l'IL23, l'IL18, et à travers l'IL18, le complexe de l'inflammasome impliquant la caspase 1, encore appelée caspase « inflammatoire », (Martinon et Tschopp, 2007), présente dans les cellules épithéliales intestinales (Jarry et al, 1999). L'identification de ces tout premiers médiateurs pourrait avoir une implication thérapeutique puisque nous disposons d'agents biologiques et pharmacologiques permettant de les antagoniser, comme par exemple les dimères d'IL12p40 ou les inhibiteurs de la caspase 1.
- La régulation de l'expression des TLR par l'IL10 et le TGF β , dans la mesure où les TLR sont les « bio-senseurs » des molécules qui déclenchent l'inflammation.
- Les mécanismes à l'origine de l'apoptose précoce des cellules épithéliales au cours de la réponse immunitaire de type Th1. Est-elle dépendante de l'activation des caspases classiques comme la caspase 3, ou est-elle en liaison directe avec l'activation de la caspase 1 de l'inflammasome ?
- Plus spécifiquement, l'équipe BioMétaDys s'intéresse à la voie de signalisation Notch, impliquée notamment dans la transition prolifération/différentiation épithéliale (van Es et al, 2005). Récemment, des travaux tendent à montrer que cette voie est également impliquée dans l'homéostasie du système immunitaire (Kubo, 2007). Par conséquent, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la voie Notch, peut permettre de disséquer et de mieux comprendre les relations entre l'immunité de la muqueuse intestinale et la prolifération/différentiation épithéliale, deux processus impliqués dans l'inflammation intestinale et ses conséquences.

Le deuxième objectif, c'est-à-dire l'étude de nouvelles voies de signalisation impliquées dans la progression inflammation / régénération épithéliale / dysplasie / cancer au niveau de la muqueuse intestinale, sera appréhendé, d'une part 1) grâce au développement de nouvelles bio-collections tissulaires chez l'homme, et d'autre part 2) grâce au développement de nouveaux modèles expérimentaux. Le pathologiste dispose d'une situation privilégiée, à l'interface entre la clinique et la recherche fondamentale, dans la mesure où il dispose de bio-collections tissulaires qu'il peut exploiter notamment par l'intermédiaire des Tissu Microarrays (TMA), et qui sont renseignées cliniquement. Ce potentiel d'exploitation très riche devrait nous permettre, à l'avenir, d'explorer les mécanismes d'oncogenèse associés aux MICI, en essayant de définir de nouvelles voies d'oncogenèse pouvant avoir une répercussion anatomo-clinique. Par ailleurs, le modèle de souris C57BL6 invalidée pour le gène codant pour l'IL10 qui développe spontanément des lésions inflammatoires chroniques intestinales évoluant vers des lésions de régénération, de dysplasie et de cancer, constitue un modèle expérimental de colite pour étudier, sur une échelle de temps très courte (quelques semaines à quelques mois), les anomalies cellulaires et moléculaires précoces associées au processus de carcinogenèse dans ce contexte inflammatoire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abreu-Martin MT, Vidrich A, Lynch DH, Targan SR. Divergent induction of apoptosis and IL-8 secretion in HT-29 cells in response to TNF-alpha and ligation of Fas antigen. *J Immunol* 1995;155:4147-54.
- Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001;167:1609-16.
- Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS, Gonsky R, Zhou Y, Hu B, Arditi M. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:20431-7.
- Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 2005;174:4453-60.
- Achilefu S, Srinivasan A, Schmidt MA, Jimenez HN, Bugaj JE, Erion JL. Novel bioactive and stable neurotensin peptide analogues capable of delivering radiopharmaceuticals and molecular beacons to tumors. *J Med Chem* 2003;46:3403-11.
- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007;8:942-9.
- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406:782-7.
- Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, Garcia JM, Munoz A, Esteller M, Gonzalez-Sancho JM. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 2006;25:4116-21.
- Akhurst RJ, Fitzpatrick DR, Fowles DJ, Gatherer D, Millan FA, Slager H. The role of TGF-beta s in mammalian development and neoplasia. *Mol Reprod Dev* 1992;32:127-35.
- Akira S. The role of IL-18 in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12:59-63.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
- Alam M, Midtvedt T, Uribe A. Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand J Gastroenterol* 1994;29:445-51.
- Alexander WS, Starr R, Metcalf D, Nicholson SE, Farley A, Elefanty AG, Brysha M, Kile BT, Richardson R, Baca M, Zhang JG, Willson TA, Viney EM, Sprigg NS, Rakar S, Corbin J, Mifsud S, DiRago L, Cary D, Nicola NA, Hilton DJ. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol* 1999;66:588-92.
- Allez M, Brimmes J, Dotan I, Mayer L. Expansion of CD8+ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2002;123:1516-26.
- Andersen SN, Lovig T, Clausen OP, Bakka A, Fausa O, Rognum TO. Villous, hypermucinous mucosa in long standing ulcerative colitis shows high frequency of K-ras mutations. *Gut* 1999;45:686-92.
- Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 2007;204:285-97.
- Andoh A, Yasui H, Inatomi O, Zhang Z, Deguchi Y, Hata K, Araki Y, Tsujikawa T, Kitoh K, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y. Interleukin-17 augments tumor necrosis factor-alpha-induced granulocyte and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor release from human colonic myofibroblasts. *J Gastroenterol* 2005;40:802-10.
- Andoh A, Bamba S, Brittan M, Fujiyama Y, Wright NA. Role of intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammation and regenerative response in the gut. *Pharmacol Ther* 2007;114:94-106.
- Are A, Aronsson L, Wang S, Greicius G, Lee YK, Gustafsson JA, Pettersson S, Arulampalam V. Enterococcus faecalis from newborn babies regulate endogenous PPARgamma activity and IL-10 levels in colonic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:1943-8.
- Askling J, Dickman PW, Karlen P, Brostrom O, Lapidus A, Lofberg R, Ekblom A. Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2001;120:1356-62.

- Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999;190:995-1004.
- Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Raines EW, Ross R, Sporn MB. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:6020-4.
- Augenlicht LH, Wadler S, Corner G, Richards C, Ryan L, Multani AS, Pathak S, Benson A, Haller D, Heerdt BG. Low-level c-myc amplification in human colonic carcinoma cell lines and tumors: a frequent, p53-independent mutation associated with improved outcome in a randomized multi-institutional trial. *Cancer Res* 1997;57:1769-75.
- Augeron C, Laboisie CL. Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res* 1984;44:3961-9.
- Aust DE, Terdiman JP, Willenbacher RF, Chew K, Ferrell L, Florendo C, Molinaro-Clark A, Baretton GB, Lohrs U, Waldman FM. Altered distribution of beta-catenin, and its binding proteins E-cadherin and APC, in ulcerative colitis-related colorectal cancers. *Mod Pathol* 2001;14:29-39.
- Aust DE, Terdiman JP, Willenbacher RF, Chang CG, Molinaro-Clark A, Baretton GB, Lohrs U, Waldman FM. The APC/beta-catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: a mutational analysis. *Cancer* 2002;94:1421-7.
- Aust DE, Haase M, Dobryden L, Markwarth A, Lohrs U, Wittekind C, Baretton GB, Tannapfel A. Mutations of the BRAF gene in ulcerative colitis-related colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2005;115:673-7.
- Autschbach F, Braunstein J, Helmke B, Zuna I, Schurmann G, Niemir ZI, Wallich R, Otto HF, Meuer SC. In situ expression of interleukin-10 in noninflamed human gut and in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 1998;153:121-30.
- Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 2003;116:21724.
- Attisano L, Wrana JL. Mads and Smads in TGF beta signalling. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:188-94.

B

- Baas IO, Mulder JW, Offerhaus GJ, Vogelstein B, Hamilton SR. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J Pathol* 1994;172:5-12.
- Babyatsky MW, Rossiter G, Podolsky DK. Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996;110:975-84.
- Baca I, Feurle GE, Schwab A, Mittmann U, Knauf W, Lehnert T. Effect of neurotensin on exocrine pancreatic secretion in dogs. *Digestion* 1982;23:174-83.
- Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, Dagna-Bricarelli F, Sartirana C, Matthes-Martin S, Lawitschka A, Azzari C, Ziegler SF, Levings MK, Roncarolo MG. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest* 2006;116:1713-22.
- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915-20.
- Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:217-21.
- Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990;50:7717-22.
- Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 1993;73:431-45.
- Barbacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987;56:779-827.
- Barbara G, Xing Z, Hogaboam CM, Gauldie J, Collins SM. Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. *Gut* 2000;46:344-9.
- Bar-Eli M, Ahuja H, Foti A, Cline MJ. N-RAS mutations in T-cell acute lymphocytic leukaemia: analysis by direct sequencing detects a novel mutation. *Br J Haematol* 1989;72:36-9.

- Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11:372-7.
- Baumgart DC, Metzke D, Wiedenmann B, Dignass AU. Activated dendritic cells are significantly increased in inflamed intestinal mucosa of inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology* 2004;126:A159.
- Baumgart DC, Metzke D, Schmitz J, Scheffold A, Sturm A, Wiedenmann B, Dignass AU. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut* 2005;54:228-36.
- Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627-40.
- Bean AJ, Dagerlind A, Hokfelt T, Dobner PR. Cloning of human neurotensin/neuromedin N genomic sequences and expression in the ventral mesencephalon of schizophrenics and age/sex matched controls. *Neuroscience* 1992;50:259-68.
- Beck TW, Huleihel M, Gunnell M, Bonner TI, Rapp UR. The complete coding sequence of the human A-raf-1 oncogene and transforming activity of a human A-raf carrying retrovirus. *Nucleic Acids Res* 1987;15:595-609.
- Befrits R, Hammarberg C, Rubio C, Jaramillo E, Tribukait B. DNA aneuploidy and histologic dysplasia in long-standing ulcerative colitis. A 10-year follow-up study. *Dis Colon Rectum* 1994;37:313-9; discussion 319-20.
- Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 2004;48:477-87.
- Bell SM, Scott N, Cross D, Sagar P, Lewis FA, Blair GE, Taylor GR, Dixon MF, Quirke P. Prognostic value of p53 overexpression and c-Ki-ras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1993;104:57-64.
- Bell SJ, Rigby R, English N, Mann SD, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. Migration and maturation of human colonic dendritic cells. *J Immunol* 2001;166:4958-67.
- Bensaad K, Vousden KH. Savior and slayer: the two faces of p53. *Nat Med* 2005;11:1278-9.
- Benveniste J, Lespinats G, Salomon J. Serum and secretory IgA in axenic and holoxenic mice. *J Immunol* 1971;107:1656-62.
- Bergenfeldt M, Nystrom M, Bohe M, Lindstrom C, Polling A, Ohlsson K. Localization of immunoreactive secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in intestinal mucosa. *J Gastroenterol* 1996;31:18-23.
- Bernstein CN, Shanahan F, Weinstein WM. Are we telling patients the truth about surveillance colonoscopy in ulcerative colitis? *Lancet* 1984; 343:71-4.
- Bernstein CN, Weinstein WM, Levine DS, Shanahan F. Physicians' perceptions of dysplasia and approaches to surveillance colonoscopy in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1995;90:2106-14.
- Beroud C, Soussi T. The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools. *Hum Mutat* 2003;21:176-81.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-8.
- Beutler B, Cerami A. The common mediator of shock, cachexia, and tumor necrosis. *Adv Immunol* 1988;42:213-31.
- Bezieau S, Devilder MC, Avet-Loiseau H, Mellerin MP, Puthier D, Pennarun E, Rapp MJ, Harousseau JL, Moisan JP, Bataille R. High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Hum Mutat* 2001;18:212-24.
- Bjarnason I, O'Morain C, Levi AJ, Peters TJ. Absorption of 51chromium-labeled ethylenediaminetetraacetate in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1983;85:318-22.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 1997;385:729-33.
- Blackstone MO, Riddell RH, Rogers BH, Levin B. Dysplasia-associated lesion or mass (DALM) detected by colonoscopy in long-standing ulcerative colitis: an indication for colectomy. *Gastroenterology* 1981;80(2):366-74.
- Blanchot-Jossic F, Jarry A, Masson D, Bach-Ngohou K, Paineau J, Denis MG, Laboisie CL, Mosnier JF. Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *J Pathol* 2005;207:156-63.
- Blumberg RS, Terhorst C, Bleicher P, McDermott FV, Allan CH, Landau SB, Trier JS, Balk SP. Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1991;147:2518-24.

- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997;15:749-95.
- Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 1991;174:1549-55.
- Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 1998;188:1929-39.
- Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:521-36.
- Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M, Marques R, Asselin-Paturel C, Pereira JP, Bates EE, Akira S, Vieira P, Liu YJ, Trinchieri G, O'Garra A. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol* 2006;177:7551-8.
- Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682-9.
- Bou-Hanna C, Berthon B, Combettes L, Claret M, Labois CL. Role of calcium in carbachol- and neurotensin-induced mucin exocytosis in a human colonic goblet cell line and cross-talk with the cyclic AMP pathway. *Biochem J* 1994;299 (Pt 2):579-85.
- Bouma ME, Beutler I, Pessah M, Heinzmann C, Lusis AJ, Naim HY, Ducastelle T, Leluyer B, Schmitz J, Infante R, et al. Description of two different patients with abetalipoproteinemia: synthesis of a normal-sized apolipoprotein B-48 in intestinal organ culture. *J Lipid Res* 1990;31:1-15.
- Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nutr* 2003;78:675-83.
- Bourreille A, Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Siavoshian S, Vallette G, Galmiche JP, Blottiere HM. Lack of interleukin 10 regulation of antigen presentation-associated molecules expressed on colonic epithelial cells. *Eur J Clin Invest* 1999;29:48-55.
- Bouzourene H, Gervaz P, Cerottini JP, Benhattar J, Chaubert P, Saraga E, Pampallona S, Bosman FT, Givel JC. p53 and Ki-ras as prognostic factors for Dukes' stage B colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2000;36:1008-15.
- Brabletz T, Jung A, Hermann K, Gunther K, Hohenberger W, Kirchner T. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol Res Pract* 1998;194:701-4.
- Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008;214:149-60.
- Brandtzaeg P, Johansen FE. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev* 2005;206:32-63.
- Branka JE, Vallette G, Jarry A, Bou-Hanna C, Lemarre P, Van PN, Labois CL. Early functional effects of *Clostridium difficile* toxin A on human colonocytes. *Gastroenterology* 1997;112:1887-94.
- Braunstein J, Qiao L, Autschbach F, Schurmann G, Meuer S. T cells of the human intestinal lamina propria are high producers of interleukin-10. *Gut* 1997;41:215-20.
- Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio P, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994;106:1455-66.
- Brentnall TA, Crispin DA, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Rubin CE, Stevens AC, Burner GC. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994;107:369-78.
- Brentnall TA, Haggitt RC, Rabinovitch PS, Kimmey MB, Bronner MP, Levine DS, Kowdley KV, Stevens AC, Crispin DA, Emond M, Rubin CE. Risk and natural history of colonic neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1996;110:331-8a.
- Brentnall TA, Crispin DA, Bronner MP, Cherian SP, Hueffed M, Rabinovitch PS, Rubin CE, Haggitt RC, Boland CR. Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer Res* 1996;56:1237-40b.
- Broome U, Lofberg R, Veress B, Eriksson LS. Primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: evidence for increased neoplastic potential. *Hepatology* 1995;22:1404-8.
- Browning TH, Trier JS. Organ culture of mucosal biopsies of human small intestine. *J Clin Invest* 1969;48:1423-32.
- Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 2003;171:6164-72.

- Brun P, Mastrotto C, Beggiao E, Stefani A, Barzon L, Sturniolo GC, Palu G, Castagliuolo I. Neuropeptide neurotensin stimulates intestinal wound healing following chronic intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G621-9.
- Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, Kuechler I, Krueger S, Schmidt HH, Lochs H. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 2006;55:342-7.
- Burner GC, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Crispin DA, Brentnall TA, Kolli VR, Stevens AC, Rubin CE. Neoplastic progression in ulcerative colitis: histology, DNA content, and loss of a p53 allele. *Gastroenterology* 1992;103:1602-10.
- Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science* 1996;272:104-7.
- Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272:60-6.

C

- Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997;11:3286-305.
- Canny GO, Trifonova RT, Kindelberger DW, Colgan SP, Fichorova RN. Expression and function of bactericidal/permeability-increasing protein in human genital tract epithelial cells. *J Infect Dis* 2006;194:498-502.
- Carballo E, Lai WS, Blackshear PJ. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* 1998;281:1001-5.
- Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000;68:7010-7 a
- Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 2000;164:966-72 b
- Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology* 2004;127:224-38.
- Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2007;132:1359-74.
- Carneiro LA, Travassos LH, Philpott DJ. Innate immune recognition of microbes through Nod1 and Nod2: implications for disease. *Microbes Infect* 2004;6:609-16.
- Carraway R, Leeman SE. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem* 1973;248:6854-61.
- Carraway R, Leeman SE. The amino acid sequence of a hypothalamic peptide, neurotensin. *J Biol Chem* 1975;250:1907-11.
- Carraway RE, Mitra SP, Paradise C. Characterization of large neuromedin-N using antisera towards regions of the neurotensin/neuromedin-N precursor. *Peptides* 1991;12:601-7.
- Carraway RE, Mitra SP, Spaulding G. Posttranslational processing of the neurotensin/neuromedin-N precursor. *Ann N Y Acad Sci* 1992;668:1-16.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:3666-70.
- Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993;178:2207-11.
- Castagliuolo I, Wang CC, Valenick L, Pasha A, Nikulasson S, Carraway RE, Pothoulakis C. Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic inflammation. *J Clin Invest* 1999;103:843-9.
- Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DL, Brenner MB. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* 1994;372:190-3.
- Cerf-Bensussan N, Guy-Grand D, Griscelli C. Intraepithelial lymphocytes of human gut: isolation, characterisation and study of natural killer activity. *Gut* 1985;26:81-8.
- Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* 1998;161:409-14.

- Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1999;42:963-70.
- Chabaud M, Garnerio P, Dayer JM, Guerne PA, Fossiez F, Miossec P. Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2000;12:1092-9.
- Chan SH, Kobayashi M, Santoli D, Perussia B, Trinchieri G. Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J Immunol* 1992;148:92-8.
- Chan TL, Zhao W, Leung SY, Yuen ST. BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer Res* 2003;63:4878-81.
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 2002;23:787-823.
- Checler F, Vincent JP, Kitabgi P. Purification and characterization of a novel neurotensin-degrading peptidase from rat brain synaptic membranes. *J Biol Chem* 1986;261:11274-81.
- Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel JB, Kennedy JS, Rabson AR, Wolff SM, Dinarello CA. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J Immunol* 1995;154:5492-9.
- Chirakkal H, Leech SH, Brookes KE, Prais AL, Waby JS, Corfe BM. Upregulation of BAK by butyrate in the colon is associated with increased Sp3 binding. *Oncogene* 2006;25:7192-200.
- Chong H, Guan KL. Regulation of Raf through phosphorylation and N terminus-C terminus interaction. *J Biol Chem* 2003;278:36269-76.
- Chrivia JC, Wedrychowicz T, Young HA, Hardy KJ. A model of human cytokine regulation based on transfection of gamma interferon gene fragments directly into isolated peripheral blood T lymphocytes. *J Exp Med* 1990;172:661-4.
- Cippitelli M, Sica A, Viggiano V, Ye J, Ghosh P, Birrer MJ, Young HA. Negative transcriptional regulation of the interferon-gamma promoter by glucocorticoids and dominant negative mutants of c-Jun. *J Biol Chem* 1995;270:12548-56.
- Coconnier MH, Lievin V, Lorrot M, Servin AL. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infecting human enterocyte-like Caco-2/TC-7 cells. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:1152-7.
- Collins PD, Mpofu C, Watson AJ, Rhodes JM. Strategies for detecting colon cancer and/or dysplasia in patients with inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;CD000279.
- Collins RH, Jr., Feldman M, Fordtran JS. Colon cancer, dysplasia, and surveillance in patients with ulcerative colitis. A critical review. *N Engl J Med* 1987;316:1654-8.
- Colombel JF, Rutgeerts P, Malchow H, Jacyna M, Nielsen OH, Rask-Madsen J, Van Deventer S, Ferguson A, Desreumaux P, Forbes A, Geboes K, Melani L, Cohard M. Interleukin 10 (Tenovil) in the prevention of postoperative recurrence of Crohn's disease. *Gut* 2001;49:42-6.
- Connell WR, Lennard-Jones JE, Williams CB, Talbot IC, Price AB, Wilkinson KH. Factors affecting the outcome of endoscopic surveillance for cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994;107:934-44.
- Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 1993;178:2243-7.
- Costa A, Marasca R, Valentinis B, Savarino M, Faranda A, Silvestrini R, Torelli G. p53 gene point mutations in relation to p53 nuclear protein accumulation in colorectal cancers. *J Pathol* 1995;176:45-53.
- Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett* 1995;368:173-6.
- Cummings JH. Colonic absorption: the importance of short chain fatty acids in man. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1984;93:89-99.
- Cummings JH, Englyst HN. Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am J Clin Nutr* 1987;45:1243-55.
- Corthesy B. Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? *J Immunol* 2007;178:27-32.

D

- Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 1993;259:1739-42.

- Dann SM, Eckmann L. Innate immune defenses in the intestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:115-20.
- Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;115:1405-13.
- Darnay BG, Aggarwal BB. Signal transduction by tumour necrosis factor and tumour necrosis factor related ligands and their receptors. *Ann Rheum Dis* 1999;58 Suppl 1:I2-I13.
- Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415-21.
- Davies EG, Isaacs D, Levinsky RJ. Defective immune interferon production and natural killer activity associated with poor neutrophil mobility and delayed umbilical cord separation. *Clin Exp Immunol* 1982;50:454-60.
- de Vries JE, Kornips FH, Marx P, Bosman FT, Geraedts JP, ten Kate J. Transfected c-Ha-ras oncogene enhances karyotypic instability and integrates predominantly in aberrant chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;67:35-43.
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-20.
- Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 1993;150:353-60.
- Della Ragione F, Criniti V, Della Pietra V, Borriello A, Oliva A, Indaco S, Yamamoto T, Zappia V. Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Lett* 2001;499:199-204.
- Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.
- Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, Truta B, Sleisenger MH, Kim YS. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:191-5.
- Denning TL, Campbell NA, Song F, Garofalo RP, Klimpel GR, Reyes VE, Ernst PB. Expression of IL-10 receptors on epithelial cells from the murine small and large intestine. *Int Immunol* 2000;12:133-9.
- Devine PL, McGuckin MA, Birrell GW, Whitehead RH, Sachdev GP, Shield P, Ward BG. Monoclonal antibodies reacting with the MUC2 mucin core protein. *Br J Cancer* 1993;67:1182-8.
- Dikovskaya D, Schiffmann D, Newton IP, Oakley A, Kroboth K, Sansom O, Jamieson TJ, Meniel V, Clarke A, Nathke IS. Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *J Cell Biol* 2007;176:183-95.
- Dinarello CA, Novick D, Puren AJ, Fantuzzi G, Shapiro L, Muhl H, Yoon DY, Reznikov LL, Kim SH, Rubinstein M. Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. *J Leukoc Biol* 1998;63:658-64.
- Dinarello CA. Interleukin-18. *Methods* 1999;19:121-32.
- Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* 2007;37 Suppl 1:S34-45.
- Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 1993;151:1224-34.
- Ding Y, Chen D, Tarcsfalvi A, Su R, Qin L, Bromberg JS. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses. *J Immunol* 2003;170:1383-91.
- Dixon MF, Brown LJ, Gilmour HM, Price AB, Smeeton NC, Talbot IC, Williams GT. Observer variation in the assessment of dysplasia in ulcerative colitis. *Histopathology* 1988;13:385-97.
- Dobner PR, Barber DL, Villa-Komaroff L, McKiernan C. Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:3516-20.
- Dodon MD, Li Z, Hamaia S, Gazzolo L. Tax protein of human T-cell leukaemia virus type 1 induces interleukin 17 gene expression in T cells. *J Gen Virol* 2004;85:1921-32.
- Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:563-73.
- Dornan D, Bheddah S, Newton K, Ince W, Frantz GD, Dowd P, Koeppen H, Dixit VM, French DM. COP1, the negative regulator of p53, is overexpressed in breast and ovarian adenocarcinomas. *Cancer Res* 2004;64:7226-30.

- Dowell SP, Wilson PO, Derias NW, Lane DP, Hall PA. Clinical utility of the immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens. *Cancer Res* 1994;54:2914-8.
- Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:11-22.
- Drucker DJ, Erlich P, Asa SL, Brubaker PL. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7911-6.
- Drucker DJ, Yusta B, Boushey RP, DeForest L, Brubaker PL. Human [Gly2]GLP-2 reduces the severity of colonic injury in a murine model of experimental colitis. *Am J Physiol* 1999;276:G79-91.
- Drucker DJ, Lovshin J, Baggio L, Nian M, Adatia F, Boushey RP, Liu Y, Saleh J, Yusta B, Scrocchi L. New developments in the biology of the glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2. *Ann N Y Acad Sci* 2000;921:226-32.
- Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer zum Buschenfelde KH, Neurath M. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur J Immunol* 1996;26:934-8.
- Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000;165:6037-46.

E

- Eaden JA, Ward BA, Mayberry JF. How gastroenterologists screen for colonic cancer in ulcerative colitis: an analysis of performance. *Gastrointest Endosc* 2000;51:123-8.
- Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001;48:526-35.a
- Eaden JA, Abrams K, McKay H, Denley H, Mayberry J. Inter-observer variation between general and specialist gastrointestinal pathologists when grading dysplasia in ulcerative colitis. *J Pathol* 2001;194:152-7.b
- Eaden JA, Mayberry JF. Guidelines for screening and surveillance of asymptomatic colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2002;51 Suppl 5:V10-2.
- Ealick SE, Cook WJ, Vijay-Kumar S, Carson M, Nagabhushan TL, Trotta PP, Bugg CE. Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science* 1991;252:698-702.
- Eckburg PB, Relman DA. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin Infect Dis* 2007;44:256-62.
- Eckmann L, Jung HC, Schurer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology* 1993;105:1689-97.
- Eckmann L, Reed SL, Smith JR, Kagnoff MF. *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. *J Clin Invest* 1995;96:1269-79.
- Eckmann L. Sensor molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2006;22:95-101.
- Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990;323:1228-33. a
- Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* 1990;336:357-9. b
- Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, Fick RB, Kastelein RA. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* 2007;132:2359-70.
- Engelsgjerd M, Farraye FA, Odze RD. Polypectomy may be adequate treatment for adenoma-like dysplastic lesions in chronic ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999;117:1288-94; discussion 1488-91.
- Erickson SL, de Sauvage FJ, Kikly K, Carver-Moore K, Pitts-Meek S, Gillett N, Sheehan KC, Schreiber RD, Goeddel DV, Moore MW. Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* 1994;372:560-3.
- Eshleman JR, Lang EZ, Bowerfind GK, Parsons R, Vogelstein B, Willson JK, Veigl ML, Sedwick WD, Markowitz SD. Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene* 1995;10:33-7.

- Evers BM, Izukura M, Chung DH, Parekh D, Yoshinaga K, Greeley GH, Jr., Uchida T, Townsend CM, Jr., Thompson JC. Neurotensin stimulates growth of colonic mucosa in young and aged rats. *Gastroenterology* 1992;103:86-91 a
- Evers BM, Izukura M, Townsend CM, Jr., Uchida T, Thompson JC. Neurotensin prevents intestinal mucosal hypoplasia in rats fed an elemental diet. *Dig Dis Sci* 1992;37:426-31 b
- Evers BM, Ishizuka J, Chung DH, Townsend CM, Jr., Thompson JC. Neurotensin expression and release in human colon cancers. *Ann Surg* 1992;216:423-30; discussion 430-1 c
- Evers BM, Rajaraman S, Chung DH, Townsend CM, Jr., Wang X, Graves K, Thompson JC. Differential expression of the neurotensin gene in the developing rat and human gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 1993;265:G482-90.
- Evers BM, Zhou Z, Dohlen V, Rajaraman S, Thompson JC, Townsend CM, Jr. Fetal and neoplastic expression of the neurotensin gene in the human colon. *Ann Surg* 1996;223:464-70; discussion 470-1.

F

- Facer P, Bishop AE, Lloyd RV, Wilson BS, Hennessy RJ, Polak JM. Chromogranin: a newly recognized marker for endocrine cells of the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1985;89:1366-73.
- Fahlgren A, Hammarstrom S, Danielsson A, Hammarstrom ML. beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2004;137:379-85.
- Faour WH, Mancini A, He QW, Di Battista JA. T-cell-derived interleukin-17 regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA through restricted activation of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade: role of distal sequences in the 3'-untranslated region of COX-2 mRNA. *J Biol Chem* 2003;278:26897-907.
- Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963;17:375-412.
- Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001;10:721-33.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
- Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, Rutgeerts P, Schreiber S, Wild G, Hanauer SB, Kilian A, Cohard M, LeBeaut A, Feagan B. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000;119:1473-82.
- Ferrier L, Mazelin L, Cenac N, Desreumaux P, Janin A, Emilie D, Colombel JF, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L. Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology* 2003;125:795-804.
- Ferris CF, Hammer RA, Leeman SE. Elevation of plasma neurotensin during lipid perfusion of rat small intestine. *Peptides* 1981;2 Suppl 2:263-6.
- Fevr T, Robine S, Louvard D, Huelsken J. Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol* 2007;27:7551-9.
- Finley GG, Schulz NT, Hill SA, Geiser JR, Pipas JM, Meisler AI. Expression of the myc gene family in different stages of human colorectal cancer. *Oncogene* 1989;4:963-71.
- Fiocchi C. Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol* 1997;273:G769-75.
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081-95.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147:3815-22 a
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991;146:3444-51 b
- Fleisher AS, Esteller M, Harpaz N, Leytin A, Rashid A, Xu Y, Liang J, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Wilson KT, James SP, Herman JG, Meltzer SJ. Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Res* 2000;60:4864-8.

- Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH, Clevers H. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 2001;3:433-8.
- Fogt F, Vortmeyer AO, Stolte M, Mueller E, Mueller J, Noffsinger A, Poremba C, Zhuang Z. Loss of heterozygosity of the von Hippel Lindau gene locus in polypoid dysplasia but not flat dysplasia in ulcerative colitis or sporadic adenomas. *Hum Pathol* 1998;29:961-4.
- Fong CL, Siddiqui AH, Mark DF. Identification and characterization of a novel repressor site in the human tumor necrosis factor alpha gene. *Nucleic Acids Res* 1994;22:1108-14.
- Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996;183:2593-603.
- Framson PE, Cho DH, Lee LY, Hershberg RM. Polarized expression and function of the costimulatory molecule CD58 on human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 1999;116:1054-62.
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13780-5.
- Freter R. Interactions between mechanisms controlling the intestinal microflora. *Am J Clin Nutr* 1974;27:1409-16.
- Fries W, Muja C, Crisafulli C, Cuzzocrea S, Mazzon E. Dynamics of enterocyte tight junctions: effect of experimental colitis and two different anti-TNF strategies. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G938-47.
- Friry C, Feliciangeli S, Richard F, Kitabgi P, Rovere C. Production of recombinant large proneurotensin/neuromedin N-derived peptides and characterization of their binding and biological activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:1161-8.
- Fujimura Y, Hosobe M, Kihara T. Ultrastructural study of M cells from colonic lymphoid nodules obtained by colonoscopic biopsy. *Dig Dis Sci* 1992;37:1089-98.
- Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:65-70.
- Funda DP, Tuckova L, Farre MA, Iwase T, Moro I, Tlaskalova-Hogenova H. CD14 is expressed and released as soluble CD14 by human intestinal epithelial cells in vitro: lipopolysaccharide activation of epithelial cells revisited. *Infect Immun* 2001;69:3772-81.

G

- Garcia-Garayoa E, Allemann-Tannahill L, Blauenstein P, Willmann M, Carrel-Remy N, Tourwe D, Iterbeke K, Conrath P, Schubiger PA. In vitro and in vivo evaluation of new radiolabeled neurotensin(8-13) analogues with high affinity for NT1 receptors. *Nucl Med Biol* 2001;28:75-84.
- Garg K, Lynch DA, Newell JD. Inflammatory airways disease in ulcerative colitis: CT and high-resolution CT features. *J Thorac Imaging* 1993;8:159-63.
- Gatz SA, Wiesmuller L. p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ* 2006;13:1003-16.
- Geboes K. Dysplasia in the gastrointestinal tract. *Hepatogastroenterology* 1999;46(26):657-60.
- Geboes K, Desreumaux P, Jouret A, Ectors N, Rutgeerts P, Colombel JF. [Histopathologic diagnosis of the activity of chronic inflammatory bowel disease. Evaluation of the effect of drug treatment. Use of histological scores]. *Gastroenterol Clin Biol* 1999;23:1062-73.
- Geboes K, Riddell R, Ost A, Jensfelt B, Persson T, Lofberg R. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut* 2000;47:404-9.
- Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001;167:1882-5.
- Geyer G. Lysozyme in Paneth cell secretions. *Acta Histochem* 1973;45:126-32.
- Gieni RS, Umetsu DT, DeKruyff RH. Ly1- (CD5-) B cells produce interleukin (IL)-10. *Cell Immunol* 1997;175:164-70.
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006;312:1355-9.
- Gillen CD, Andrews HA, Prior P, Allan RN. Crohn's disease and colorectal cancer. *Gut* 1994;35:651-5.

- Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zahringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003;300:1584-7 a
- Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003;278:8869-72 b
- Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *Faseb J* 2000;14:1749-53.
- Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 2000;14:1693-711.
- Goel A, Nagasaka T, Arnold CN, Inoue T, Hamilton C, Niedzwiecki D, Compton C, Mayer RJ, Goldberg R, Bertagnolli MM, Boland CR. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology* 2007;132:127-38.
- Goldberg RF, Austen WG, Jr., Zhang X, Munene G, Mostafa G, Biswas S, McCormack M, Eberlin KR, Nguyen JT, Tatlidede HS, Warren HS, Narisawa S, Millan JL, Hodin RA. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3551-6.
- Goldman H, Ming SC. Mucins in normal and neoplastic gastrointestinal epithelium. *Histochemical distribution. Arch Pathol* 1968;85:580-6.
- Goldstein NS, Bhanot P, Odish E, Hunter S. Hyperplastic-like colon polyps that preceded microsatellite-unstable adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 2003;119:778-96.
- Goodlad RA, Wilson TJ, Lenton W, Gregory H, McCullagh KG, Wright NA. Intravenous but not intragastric urogastrone-EGF is trophic to the intestine of parenterally fed rats. *Gut* 1987;28:573-82.
- Gorden A, Osman I, Gai W, He D, Huang W, Davidson A, Houghton AN, Busam K, Polsky D. Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Res* 2003;63:3955-7.
- Gorelik L, Flavell RA. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 2000;12:171-81.
- Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2002;2:46-53.
- Gork AS, Usui N, Ceriati E, Drongowski RA, Epstein MD, Coran AG, Harmon CM. The effect of mucin on bacterial translocation in I-407 fetal and Caco-2 adult enterocyte cultured cell lines. *Pediatr Surg Int* 1999;15:155-9.
- Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 2003;98:257-65.
- Grasset E, Bernabeu J, Pinto M. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: effect of secretagogues. *Am J Physiol* 1985;248:C410-8.
- Greenlund AC, Schreiber RD, Goeddel DV, Pennica D. Interferon-gamma induces receptor dimerization in solution and on cells. *J Biol Chem* 1993;268:18103-10.
- Greenstein AJ, Sachar DB, Smith H, Janowitz HD, Aufses AH, Jr. A comparison of cancer risk in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Cancer* 1981;48:2742-5.
- Greenwald BD, Harpaz N, Yin J, Huang Y, Tong Y, Brown VL, McDaniel T, Newkirk C, Resau JH, Meltzer SJ. Loss of heterozygosity affecting the p53, Rb, and mcc/apc tumor suppressor gene loci in dysplastic and cancerous ulcerative colitis. *Cancer Res* 1992;52:741-5.
- Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995;83:793-802.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;66:589-600.
- Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996;184:19-29.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-42.
- Guignot J, Bernet-Camard MF, Pous C, Plancon L, Le Bouguenec C, Servin AL. Polarized entry of uropathogenic Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain IH11128 into human epithelial cells: evidence for alpha5beta1 integrin recognition and subsequent internalization through a pathway involving caveolae and dynamic unstable microtubules. *Infect Immun* 2001;69:1856-68.
- Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:622-34.

- Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, Hossain S, Matula S, Kornbluth A, Bodian C, Ullman T. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology* 2007;133:1099-105; quiz 1340-1.
- Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:1462-4.
- Guy-Grand D, Cerf-Bensussan N, Malissen B, Malassis-Seris M, Briottet C, Vassalli P. Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J Exp Med* 1991;173:471-81.
- Garcia-Garayoa E, Maes V, Blauenstein P, Blanc A, Hohn A, Tourwe D, Schubiger PA. Double-stabilized neurotensin analogues as potential radiopharmaceuticals for NTR-positive tumors. *Nucl Med Biol* 2006;33:495-503.

H

- Hahm KB, Im YH, Parks TW, Park SH, Markowitz S, Jung HY, Green J, Kim SJ. Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;49:190-8.
- Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996;271:350-3.
- Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, Takahashi H, Masunaga Y, Hachimura S, Kaminogawa S, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T, Kiyono H, Yamamoto H, Ishikawa H. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol* 2002;168:57-64.
- Hamilton SR, Aaltonen LA. WHO classification of tumours. Tumours of the digestive system. Lyon;IARC Press; 2000.
- Hammer RA, Leeman SE, Carraway R, Williams RH. Isolation of human intestinal neurotensin. *J Biol Chem* 1980;255:2476-80.
- Hao X, Tomlinson I, Ilyas M, Palazzo JP, Talbot IC. Reciprocity between membranous and nuclear expression of beta-catenin in colorectal tumours. *Virchows Arch* 1997;431:167-72.
- Hardy KJ, Sawada T. Human gamma interferon strongly upregulates its own gene expression in peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170:1021-6.
- Harmsen HJ, Gibson GR, Elferich P, Raangs GC, Wildeboer-Veloo AC, Argaz A, Roberfroid MB, Welling GW. Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2000;183:125-9.
- Harpaz N, Peck AL, Yin J, Fiel I, Hontanosas M, Tong TR, Laurin JN, Abraham JM, Greenwald BD, Meltzer SJ. p53 protein expression in ulcerative colitis-associated colorectal dysplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 1994;25:1069-74.
- Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA, Knight SC, Stagg AJ. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 2004;53:1602-9.
- Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2005;129:50-65.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997;387:296-9.
- Hawkins NJ, Ward RL. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1307-13.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281:1509-12.
- Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH. Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function. *Cell Growth Differ* 1997;8:523-32.
- Heinen CD, Noffsinger AE, Belli J, Straughen J, Fischer J, Groden J, Fenoglio-Preiser CM. Regenerative lesions in ulcerative colitis are characterized by microsatellite mutation. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;19:170-5.

- Henness S, Johnson CK, Ge Q, Armour CL, Hughes JM, Ammit AJ. IL-17A augments TNF- α -induced IL-6 expression in airway smooth muscle by enhancing mRNA stability. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:958-64.
- Herfarth H, Scholmerich J. IL-10 therapy in Crohn's disease: at the crossroads. Treatment of Crohn's disease with the anti-inflammatory cytokine interleukin 10. *Gut* 2002;50:146-7.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6870-5.
- Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg AA. Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* 1986;25:473-6.
- Hersherg RM, Framson PE, Cho DH, Lee LY, Kovats S, Beitz J, Blum JS, Nepom GT. Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing. *J Clin Invest* 1997;100:204-15.
- Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM, Romani N, Schuler G. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 1996;26:659-68.
- Higuchi Y, Herrera P, Muniesa P, Huarte J, Belin D, Ohashi P, Aichele P, Orci L, Vassalli JD, Vassalli P. Expression of a tumor necrosis factor alpha transgene in murine pancreatic beta cells results in severe and permanent insulinitis without evolution towards diabetes. *J Exp Med* 1992;176:1719-31.
- Hingorani SR, Jacobetz MA, Robertson GP, Herlyn M, Tuveson DA. Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer Res* 2003;63:5198-202.
- Hodin RA, Meng S, Archer S, Tang R. Cellular growth state differentially regulates enterocyte gene expression in butyrate-treated HT-29 cells. *Cell Growth Differ* 1996;7:647-53.
- Hoeve MA, Savage ND, de Boer T, Langenberg DM, de Waal Malefyt R, Ottenhoff TH, Verreck FA. Divergent effects of IL-12 and IL-23 on the production of IL-17 by human T cells. *Eur J Immunol* 2006;36:661-70.
- Hollander D. Permeability in Crohn's disease: altered barrier functions in healthy relatives? *Gastroenterology* 1993;104:1848-51.
- Holzmann K, Klump B, Borchard F, Hsieh CJ, Kuhn A, Gaco V, Gregor M, Porschen R. Comparative analysis of histology, DNA content, p53 and Ki-ras mutations in colectomy specimens with long-standing ulcerative colitis. *Int J Cancer* 1998;76:1-6.
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 1997;420:25-7.
- Hooijkaas H, Benner R, Pleasants JR, Wostmann BS. Isotypes and specificities of immunoglobulins produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered "antigen-free" diet. *Eur J Immunol* 1984;14:1127-30.
- Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001;291:881-4.
- Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* 2003;4:269-73.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995;81:495-504.
- Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM, Aguet M. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 1993;259:1742-5.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
- Hussain SP, Amstad P, Raja K, Amb S, Nagashima M, Bennett WP, Shields PG, Ham AJ, Swenberg JA, Marrogi AJ, Harris CC. Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res* 2000;60:3333-7.
- Hwang SY, Kim JY, Kim KW, Park MK, Moon Y, Kim WU, Kim HY. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R120-8.
- Hungate RE. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes In: Norris JR, Ribbons DW, eds. *Methods in microbiology*, Vol 3B. New York: Academic Press, 1969:117.

I

- Iacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat* 2003;21:271-6.
- Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000;50:184-95.
- Igarashi K, Garotta G, Ozmen L, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Lerner AC, Finbloom DS. Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J Biol Chem* 1994;269:14333-6.
- Ikawa S, Fukui M, Ueyama Y, Tamaoki N, Yamamoto T, Toyoshima K. B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. *Mol Cell Biol* 1988;8:2651-4.
- Ina K, Kusugami K, Kawano Y, Nishiwaki T, Wen Z, Musso A, West GA, Ohta M, Goto H, Fiocchi C. Intestinal fibroblast-derived IL-10 increases survival of mucosal T cells by inhibiting growth factor deprivation- and Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 2005;175:2000-9.
- Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003;278:5509-12.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
- Irvine EJ, Marshall JK. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* 2000;119:1740-4.
- Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957;147:258-67.
- Ishitsuka T, Kashiwagi H, Konishi F. Microsatellite instability in inflamed and neoplastic epithelium in ulcerative colitis. *J Clin Pathol* 2001;54:526-32.
- Issa JP. The epigenetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2000;910:140-53; discussion 153-5.
- Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res* 2001;61:3573-7.
- Issa JP, Shen L, Toyota M. CIMP, at last. *Gastroenterology* 2005;129:1121-4.
- Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987-95.
- Izcue A, Powrie F. Special regulatory T-cell review: Regulatory T cells and the intestinal tract--patrolling the frontier. *Immunology* 2008;123:6-10.
- Izukura M, Evers BM, Parekh D, Yoshinaga K, Uchida T, Townsend CM, Jr., Thompson JC. Neurotensin augments intestinal regeneration after small bowel resection in rats. *Ann Surg* 1992;215:520-6; discussion 526-7.

J

- Jacob AI, Goldberg PK, Bloom N, Degenshein GA, Kozinn PJ. Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 1977;72:1268-70.
- James SP, Fiocchi C, Graeff AS, Strober W. Phenotypic analysis of lamina propria lymphocytes. Predominance of helper-inducer and cytolytic T-cell phenotypes and deficiency of suppressor-inducer phenotypes in Crohn's disease and control patients. *Gastroenterology* 1986;91:1483-9.
- Jarry A, Cerf-Bensussan N, Brousse N, Selz F, Guy-Grand D. Subsets of CD3+ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur J Immunol* 1990;20:1097-103.
- Jarry A, Vallette G, Branka JE, Laboisie C. Direct secretory effect of interleukin-1 via type I receptors in human colonic mucous epithelial cells (HT29-C1.16E). *Gut* 1996;38:240-2.
- Jass JR, Do KA, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP, Searle J, Radford-Smith G, Young J, Leggett B. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* 1998;42:673-9.
- Jarry A, Vallette G, Cassagnau E, Moreau A, Bou-Hanna C, Lemarre P, Letessier E, Le Neel JC, Galmiche JP, Laboisie CL. Interleukin 1 and interleukin 1beta converting enzyme (caspase 1)

expression in the human colonic epithelial barrier. Caspase 1 downregulation in colon cancer. *Gut* 1999;45:246-51.

- Jarry A, Masson D, Cassagnau E, Parois S, Laboisie C, Denis MG. Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E. *Mol Cell Probes* 2004;18:349-52.

- Jarry A, Bach-Ngohou K, Masson D, Dejoie T, Lehur PA, Mosnier JF, Denis MG, Laboisie CL. Human colonic myocytes are involved in postischemic inflammation through ADAM17-dependent TNFalpha production. *Br J Pharmacol* 2006;147:64-72.

- Jarry A, Bossard C, Bou-Hanna C, Masson D, Espaze E, Denis MG, Laboisie CL. Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. *J Clin Invest* 2008;118:1132-42.

- Jass JR, Sobin LH, Watanabe H. The World Health Organization's histologic classification of gastrointestinal tumors. A commentary on the second edition. *Cancer*. 1990;66:2162-7.

- Jass JR. Serrated adenoma and colorectal cancer. *J Pathol* 1999;187:499-502.

- Jass JR, Iino H, Ruzsiewicz A, Painter D, Solomon MJ, Koorey DJ, Cohn D, Furlong KL, Walsh MD, Palazzo J, Edmonston TB, Fishel R, Young J, Leggett BA. Neoplastic progression occurs through mutator pathways in hyperplastic polyposis of the colorectum. *Gut* 2000;47:43-9.

- Jass JR. Serrated route to colorectal cancer: back street or super highway? *J Pathol* 2001;193:283-5.

- Jones B, Chen J. Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. *Embo J* 2006;25:2443-52.

- Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi-Cherradi S, Casanova JL. Infections in IFNGR-1-deficient children. *J Interferon Cytokine Res* 1997;17:583-7.

- Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med* 2007;204:273-83.

- Janssen PJ, de Visser M, Verwijnen SM, Bernard BF, Srinivasan A, Erion JL, Breeman WA, Vulto AG, Krenning EP, de Jong M. Five Stabilized ¹¹¹In-labeled neurotensin analogs in nude mice bearing HT29 tumors. *Cancer Biother Radiopharm* 2007;22:374-81.

- Javelaud D, Mauviel A. Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1161-5.

- Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 1995;95:55-65.

- Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004;50:81-92.

K

- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001;194:863-9.

- Kaetzel CS, Robinson JK, Lamm ME. Epithelial transcytosis of monomeric IgA and IgG cross-linked through antigen to polymeric IgA. A role for monomeric antibodies in the mucosal immune system. *J Immunol* 1994;152:72-6.

- Kaetzel CS. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev* 2005;206:83-99.

- Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* 1997;100:6-10.

- Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, McGivern A, Matsubara N, Tanaka N, Higuchi T, Young J, Jass JR, Leggett BA. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 2004;53:1137-44.

- Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001;344:655-64.

- Kanamori Y, Ishimaru K, Nanno M, Maki K, Ikuta K, Nariuchi H, Ishikawa H. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit+ IL-7R+ Thy1+ lymphohemopoietic progenitors develop. *J Exp Med* 1996;184:1449-59.

- Kanba KS, Kanba S, Nelson A, Okazaki H, Richelson E. [³H]neurotensin(8-13) binds in human brain to the same sites as does [³H]neurotensin but with higher affinity. *J Neurochem* 1988;50:131-7.

- Kang SS, Bloom SM, Norian LA, Geske MJ, Flavell RA, Stappenbeck TS, Allen PM. An antibiotic-responsive mouse model of fulminant ulcerative colitis. *PLoS Med* 2008;5:e41.
- Kang Y, Chen CR, Massague J. A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 2003;11:915-26.
- Kaplan KB, Burds AA, Swedlow JR, Bekir SS, Sorger PK, Nathke IS. A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 2001;3:429-32.
- Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol* 2007;19:24-32.
- Kern SE, Redston M, Seymour AB, Caldas C, Powell SM, Kornacki S, Kinzler KW. Molecular genetic profiles of colitis-associated neoplasms. *Gastroenterology* 1994;107:420-8.
- Khanna M, Park P, Zirvi M, Cao W, Picon A, Day J, Paty P, Barany F. Multiplex PCR/LDR for detection of K-ras mutations in primary colon tumors. *Oncogene* 1999;18:27-38.
- Khoo UY, Proctor IE, Macpherson AJ. CD4+ T cell down-regulation in human intestinal mucosa: evidence for intestinal tolerance to luminal bacterial antigens. *J Immunol* 1997;158:3626-34.
- Kihl B, Rokaeus A, Rosell S, Olbe L. Fat inhibition of gastric acid secretion in man and plasma concentrations of neurotensin-like immunoreactivity. *Scand J Gastroenterol* 1981;16:513-26.
- Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Fukunari H, Tanaka K, Miyaki M. Loss of expression of the DCC gene during progression of colorectal carcinomas in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1992;52:3801-3.
- Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Khan TA, Moore KW. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol* 1992;148:3618-23.
- Kim SJ, Glick A, Sporn MB, Roberts AB. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *J Biol Chem* 1989;264:402-8.
- Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M, Roberts AB. Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* 1990;10:1492-7.
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:1454-7.
- Kondon H, Pothoulakis C, Thim L, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology* 1995;109:516-23.
- Kinoshita H, Uchida H, Kawai Y, Kitazawa H, Miura K, Shiiba K, Horii A, Saito T. Quantitative evaluation of adhesion of lactobacilli isolated from human intestinal tissues to human colonic mucin using surface plasmon resonance (BIACORE assay). *J Appl Microbiol* 2007;102:116-23.
- Kirkegaard T, Pedersen G, Saermark T, Brynskov J. Tumour necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) activity in human colonic epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2004;135:146-53.
- Kislauskis E, Bullock B, McNeil S, Dobner PR. The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences. *J Biol Chem* 1988;263:4963-8.
- Kitani A, Fuss IJ, Nakamura K, Schwartz OM, Usui T, Strober W. Treatment of experimental (Trinitrobenzene sulfonic acid) colitis by intranasal administration of transforming growth factor (TGF)-beta1 plasmid: TGF-beta1-mediated suppression of T helper cell type 1 response occurs by interleukin (IL)-10 induction and IL-12 receptor beta2 chain downregulation. *J Exp Med* 2000;192:41-52.
- Kiyohara H, Egami H, Shibata Y, Murata K, Ohshima S, Ogawa M. Light microscopic immunohistochemical analysis of the distribution of group II phospholipase A2 in human digestive organs. *J Histochem Cytochem* 1992;40:1659-64.
- Klampfer L, Huang J, Sasazuki T, Shirasawa S, Augenlicht L. Inhibition of interferon gamma signaling by the short chain fatty acid butyrate. *Mol Cancer Res* 2003;1:855-62.
- Knudson AG, Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 1985;45:1437-43.
- Kobayashi M, Honma T, Matsuda Y, Suzuki Y, Narisawa R, Ajioka Y, Asakura H. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000;82:1689-93.
- Kobayashi S, Yoshida K, Ward JM, Letterio JJ, Longenecker G, Yaswen L, Mittleman B, Mozes E, Roberts AB, Karlsson S, Kulkarni AB. Beta 2-microglobulin-deficient background ameliorates lethal phenotype of the TGF-beta 1 null mouse. *J Immunol* 1999;163:4013-9.
- Kokko KP, Hadden MK, Orwig KS, Mazella J, Dix TA. In vitro analysis of stable, receptor-selective neurotensin[8-13] analogues. *J Med Chem* 2003;46:4141-8.
- Kollias G, Kontoyiannis D. Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:315-21.

- Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004;21:467-76.
- Komatsu M, Kobayashi D, Saito K, Furuya D, Yagihashi A, Araake H, Tsuji N, Sakamaki S, Niitsu Y, Watanabe N. Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR. *Clin Chem* 2001;47:1297-301.
- Konishi K, Shen L, Wang S, Meltzer SJ, Harpaz N, Issa JP. Rare CpG island methylator phenotype in ulcerative colitis-associated neoplasias. *Gastroenterology* 2007;132:1254-60.
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 1997;275:1784-7.
- Kotenko SV, Izotova LS, Pollack BP, Muthukumaran G, Paukku K, Silvennoinen O, Ihle JN, Pestka S. Other kinases can substitute for Jak2 in signal transduction by interferon-gamma. *J Biol Chem* 1996;271:17174-82.
- Krishna M, Woda B, Savas L, Baker S, Banner B. Expression of p53 antigen in inflamed and regenerated mucosa in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Mod Pathol* 1995;8:654-7.
- Kubo M. Notch: filling a hole in T helper 2 cell differentiation. *Immunity*. 2007;27(1):3-5.
- Kugathasan S, Saubermann LJ, Smith L, Kou D, Itoh J, Binion DG, Levine AD, Blumberg RS, Fiocchi C. Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late inflammatory bowel disease. *Gut* 2007;56:1696-705.
- Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-74.
- Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, Chu P, Lee M, Yuan J, Nusse R, Kuo CJ. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:266-71.
- Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:770-4.
- Kulkarni AB, Ward JM, Yaswen L, Mackall CL, Bauer SR, Huh CG, Gress RE, Karlsson S. Transforming growth factor-beta 1 null mice. An animal model for inflammatory disorders. *Am J Pathol* 1995;146:264-75.
- Kumar R, Angelini S, Hemminki K. Activating BRAF and N-Ras mutations in sporadic primary melanomas: an inverse association with allelic loss on chromosome 9. *Oncogene* 2003;22:9217-24.
- Kuwata H, Watanabe Y, Miyoshi H, Yamamoto M, Kaisho T, Takeda K, Akira S. IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages. *Blood* 2003;102:4123-9.

L

- Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lotvall J, Sjostrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, Linden A. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 1999;162:2347-52.
- Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-6.
- Lang R, Rutschman RL, Greaves DR, Murray PJ. Autocrine deactivation of macrophages in transgenic mice constitutively overexpressing IL-10 under control of the human CD68 promoter. *J Immunol* 2002;168:3402-11.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201:233-40.
- Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol* 2005;6:600-7.
- Laukoetter MG, Bruewer M, Nusrat A. Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Curr Opin Gastroenterol* 2006;22:85-9.
- Laurent P, Clerc P, Mattei MG, Forgez P, Dumont X, Ferrara P, Caput D, Rostene W. Chromosomal localization of mouse and human neurotensin receptor genes. *Mamm Genome* 1994;5:303-6.

- Le F, Groshan K, Zeng XP, Richelson E. Characterization of the genomic structure, promoter region, and a tetranucleotide repeat polymorphism of the human neurotensin receptor gene. *J Biol Chem* 1997;272:1315-22.
- Le Bourhis L, Benko S, Girardin SE. Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1479-84.
- Le Goffe C, Vallette G, Jarry A, Bou-Hanna C, Laboisie CL. The in vitro manipulation of carbohydrate metabolism: a new strategy for deciphering the cellular defence mechanisms against nitric oxide attack. *Biochem J* 1999;344 Pt 3:643-8.
- Le Goffe C, Vallette G, Charrier L, Candelon T, Bou-Hanna C, Bouhours JF, Laboisie CL. Metabolic control of resistance of human epithelial cells to H₂O₂ and NO stresses. *Biochem J* 2002;364:349-59.
- Lee J, Mo JH, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu YT, Lee HK, Shen C, Cojocaru G, Shenouda S, Kagnoff M, Eckmann L, Ben-Neriah Y, Raz E. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol* 2006;8:1327-36.
- Lee SH, Starkey PM, Gordon S. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. *J Exp Med* 1985;161:475-89.
- Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:14614-9.
- Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, Parant JM, Lozano G, Hakem R, Benchimol S. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* 2003;112:779-91.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997;386:623-7.
- Lennert K, Kaiserling E, Muller-Hermelink HK. Letter: T-associated plasma-cells. *Lancet* 1975;1:1031-2.
- Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, Dang H, Kong L, Nakabayashi T, Mackall CL, Gress RE, Roberts AB. Autoimmunity associated with TGF-beta1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. *J Clin Invest* 1996;98:2109-19.
- Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998;16:137-61.
- Li H, Chen J, Huang A, Stinson J, Heldens S, Foster J, Dowd P, Gurney AL, Wood WI. Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:773-8.
- Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006;25:455-71.
- Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity* 2008;28:468-76.
- Li Q, Zhang Q, Wang M, Zhao S, Ma J, Luo N, Li N, Li Y, Xu G, Li J. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction. *Clin Immunol* 2008;126:67-80.
- Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006;203:2271-9.
- Lievin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000;47:646-52.
- Lindberg JO, Stenling RB, Rutegard JN. DNA aneuploidy as a marker of premalignancy in surveillance of patients with ulcerative colitis. *Br J Surg* 1999;86:947-50.
- Lindsay J, Van Montfrans C, Brennan F, Van Deventer S, Drillingburg P, Hodgson H, Te Velde A, Sol Rodriguez Pena M. IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis. *Gene Ther* 2002;9:1715-21.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002;108:837-47.
- Liu Y, Wei SH, Ho AS, de Waal Malefyt R, Moore KW. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* 1994;152:1821-9.
- Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF. Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* - Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of

inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504-17.

- Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 2001;106:259-62.
- Lofberg R, Tribukait B, Ost A, Brostrom O, Reichard H. Flow cytometric DNA analysis in longstanding ulcerative colitis: a method of prediction of dysplasia and carcinoma development? *Gut* 1987;28:1100-6.
- Lofberg R, Brostrom O, Karlen P, Ost A, Tribukait B. Carcinoma and DNA aneuploidy in Crohn's colitis--a histological and flow cytometric study. *Gut* 1991;32:900-4.
- Lofberg R, Lindquist K, Veress B, Tribukait B. Highly malignant carcinoma in chronic ulcerative colitis without preceding dysplasia or DNA aneuploidy. Report of a case. *Dis Colon Rectum* 1992;35:82-6.
- Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1990;14:524-37.
- Lorenz RG, Newberry RD. Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1029:44-57.
- Lucas AD, Chadwick N, Warren BF, Jewell DP, Gordon S, Powrie F, Greaves DR. The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo. *Am J Pathol* 2001;158:855-66.
- Lucas PJ, Kim SJ, Melby SJ, Gress RE. Disruption of T cell homeostasis in mice expressing a T cell-specific dominant negative transforming growth factor beta II receptor. *J Exp Med* 2000;191:1187-96.
- Luhrs H, Gerke T, Muller JG, Melcher R, Schaubert J, Boxberger F, Scheppach W, Menzel T. Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:458-66.
- Lyda MH, Noffsinger A, Belli J, Fenoglio-Preiser CM. Microsatellite instability and K-ras mutations in patients with ulcerative colitis. *Hum Pathol* 2000;31:665-71.

M

- Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G367-76.
- Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995;154:5071-9.
- MacDonald TT, Hutchings P, Choy MY, Murch S, Cooke A. Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin Exp Immunol* 1990;81:301-5.
- Macfarlane, G. T., and G. R. Gibson. 1996. Carbohydrate fermentation, energy transduction and gas metabolism in the human large intestine, p. 269-318. *In* R. I. Mackie and B. A. White (ed.), *Ecology and physiology of gastrointestinal microbes*, vol. 1: Gastrointestinal fermentations and ecosystems. Chapman & Hall, New York, N.Y.
- Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 2000;288:2222-6.
- Macpherson AJ, Hunziker L, McCoy K, Lamarre A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect* 2001;3:1021-35.
- Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004;4:478-85.
- Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004;303:1662-5.
- Madara JL, Stafford J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1989;83:724-7.
- Madara JL, Nash S, Moore R, Atisook K. Structure and function of the intestinal epithelial barrier in health and disease. *Monogr Pathol* 1990:306-24.

- Madsen KL, Lewis SA, Tavernini MM, Hibbard J, Fedorak RN. Interleukin 10 prevents cytokine-induced disruption of T84 monolayer barrier integrity and limits chloride secretion. *Gastroenterology* 1997;113:151-9.
- Madsen KL, Malfair D, Gray D, Doyle JS, Jewell LD, Fedorak RN. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:262-70.
- Makinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology* 2007;50:131-50.
- Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Watanabe M. CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol* 2004;173:3119-30.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006;441:231-4.
- Maoret JJ, Pospai D, Rouyer-Fessard C, Couvineau A, Labois C, Voisin T, Laburthe M. Neurotensin receptor and its mRNA are expressed in many human colon cancer cell lines but not in normal colonic epithelium: binding studies and RT-PCR experiments. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:465-71.
- Mariadason JM, Corner GA, Augenlicht LH. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res* 2000;60:4561-72.
- Marine JC, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F, Lozano G. Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ* 2006;13:927-34.
- Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 2007;14(1):10-22.
- Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000;103:295-309.
- Mathy C, Schneider K, Chen YY, Varma M, Terdiman JP, Mahadevan U. Gross versus microscopic pancolitis and the occurrence of neoplasia in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:351-5.
- Matsumura A, Saito T, Arakuni M, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. New binding assay and preparative trial of cell-surface lectin from *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 1999;82:2525-9.
- Matsuo K, Ota H, Akamatsu T, Sugiyama A, Katsuyama T. Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. *Gut* 1997;40:782-9.
- Mayer L, Eisenhardt D, Salomon P, Bauer W, Plous R, Piccinini L. Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991;100:3-12.
- Mayrhofer G, Spargo LD. Subcellular distribution of class II major histocompatibility antigens in enterocytes of the human and rat small intestine. *Immunol Cell Biol* 1989;67 (Pt 4):251-60.
- Mazella J, Poustis C, Labbe C, Checler F, Kitabgi P, Granier C, van Rietschoten J, Vincent JP. Monoiodo-[Trp11]neurotensin, a highly radioactive ligand of neurotensin receptors. Preparation, biological activity, and binding properties to rat brain synaptic membranes. *J Biol Chem* 1983;258:3476-81.
- Mazella J, Amar S, Bozou JC, Kitabgi P, Vincent JP. Functional properties and molecular structure of central and peripheral neurotensin receptors. *J Recept Res* 1987;7:157-65.
- Mazzarella G, Stefanile R, Camarca A, Giliberti P, Cosentini E, Marano C, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Sette A, Troncone R, Gianfrani C. Gliadin activates HLA class I-restricted CD8+ T cells in celiac disease intestinal mucosa and induces the enterocyte apoptosis. *Gastroenterology* 2008;134:1017-27.
- McCarthy RE, Salyers AA. Evidence that polygalacturonic acid may not be a major source of carbon and energy for some colonic Bacteroides species. *Appl Environ Microbiol* 1986;52:9-16.
- McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 2007;26:3113-21.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
- Medzhitov R. Toll like receptors and innate immunity. *Nat Rev* 2001;1:135-145.
- Melmed G, Thomas LS, Lee N, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, Zhou Y, Hu B, Arditi M, Abreu MT. Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol* 2003;170:1406-15.

- Michel G, Mirmohammadsadegh A, Olasz E, Jarzebska-Deussen B, Muschen A, Kemeny L, Abts HF, Ruzicka T. Demonstration and functional analysis of IL-10 receptors in human epidermal cells: decreased expression in psoriatic skin, down-modulation by IL-8, and up-regulation by an antipsoriatic glucocorticosteroid in normal cultured keratinocytes. *J Immunol* 1997;159:6291-7.
- Miller TL, Wolin MJ. Fermentations by saccharolytic intestinal bacteria. *Am J Clin Nutr* 1979;32:164-72.
- Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riche F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *Jama* 1999;282:561-8.
- Miyaki M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Enomoto M, Igari T, Tanaka K, Muraoka M, Takahashi H, Amada Y, Fukayama M, et al. Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res* 1994;54:3011-20.
- Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T, Mori T. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 1999;18:3098-103.
- Miyazono K. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:15-22.
- Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992;1:229-33.
- Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:35-53.
- Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, Olivenstein R, Elias J, Chakir J. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:430-8.
- Moncada DM, Kammanadiminti SJ, Chadee K. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends Parasitol* 2003;19:305-11.
- Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2001;108:601-9.
- Monteleone G, Mann J, Monteleone I, Vavassori P, Bremner R, Fantini M, Del Vecchio Blanco G, Tersigni R, Alessandrini L, Mann D, Pallone F, MacDonald TT. A failure of transforming growth factor-beta1 negative regulation maintains sustained NF-kappaB activation in gut inflammation. *J Biol Chem* 2004;279:3925-32.
- Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 1990;248:1230-4.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
- Moore WE, Holdeman LV. Special problems associated with the isolation and identification of intestinal bacteria in fecal flora studies. *Am J Clin Nutr* 1974;27:1450-5.
- Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7950-4.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275:1787-90.
- Moriyama T, Matsumoto T, Nakamura S, Jo Y, Mibu R, Yao T, Iida M. Hypermethylation of p14 (ARF) may be predictive of colitic cancer in patients with ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum* 2007;50:1384-92.
- Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, Liggitt D, Watson JD. CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *J Exp Med* 1993;178:237-44.
- Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:155-74.
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.

- Mulder JW, Wielenga VJ, Polak MM, van den Berg FM, Adolf GR, Herrlich P, Pals ST, Offerhaus GJ. Expression of mutant p53 protein and CD44 variant proteins in colorectal tumorigenesis. *Gut* 1995;36:76-80.
- Mulder KM. Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:23-35.
- Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994;264:1918-21.
- Munemitsu S, Souza B, Muller O, Albert I, Rubinfeld B, Polakis P. The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Cancer Res* 1994;54:3676-81.
- Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3046-50.
- Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1993;34:1705-9.
- Murray PJ. The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8686-91.
- Murray PJ. STAT3-mediated anti-inflammatory signalling. *Biochem Soc Trans* 2006;34:1028-31.
- Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* 2006;13:962-72.
- Muzio M, Bosio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000;164:5998-6004.

N

- Nagasaka T, Koi M, Kloor M, Gebert J, Vilkin A, Nishida N, Shin SK, Sasamoto H, Tanaka N, Matsubara N, Boland CR, Goel A. Mutations in both KRAS and BRAF may contribute to the methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 2008;134:1950-60, 1960 e1.
- Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kawazoe Y, Kohzaki H, Morita Y, Nakagawa R, Narazaki M, Adachi K, Yoshimoto T, Nakanishi K, Kishimoto T. SOCS-1/SSI-1-deficient NKT cells participate in severe hepatitis through dysregulated cross-talk inhibition of IFN-gamma and IL-4 signaling in vivo. *Immunity* 2001;14:535-45.
- Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 2002;17:375-87.
- Naylor SL, Sakaguchi AY, Shows TB, Law ML, Goeddel DV, Gray PW. Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J Exp Med* 1983;157:1020-7.
- Nenutil R, Smdrova J, Pavlova S, Hanzelkova Z, Muller P, Fabian P, Hrstka R, Janotova P, Radina M, Lane DP, Coates PJ, Vojtesek B. Discriminating functional and non-functional p53 in human tumours by p53 and MDM2 immunohistochemistry. *J Pathol* 2005;207:251-9.
- Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Presky DH, Waegell W, Strober W. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. *J Exp Med* 1996;183:2605-16.
- Newberry RD. Intestinal lymphoid tissues: is variety an asset or a liability? *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24:121-8.
- Newman B, Siminovich KA. Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:401-7.
- Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, Levin M. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 1996;335:1941-9.
- Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005;307:254-8.
- Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE. BRAF mutations in thyroid tumors are

restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5399-404.

- Noffsinger A, Kretschmer S, Belli J, Fogt F, Fenoglio-Preiser C. Microsatellite instability is uncommon in intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:378-84.

- Nuako KW, Ahlquist DA, Mahoney DW, Schaid DJ, Siems DM, Lindor NM. Familial predisposition for colorectal cancer in chronic ulcerative colitis: a case-control study. *Gastroenterology* 1998;115:1079-83.

O

- Obert G, Peiffer I, Servin AL. Rotavirus-induced structural and functional alterations in tight junctions of polarized intestinal Caco-2 cell monolayers. *J Virol* 2000;74:4645-51.

- O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, Amoroso M, Farraye FA. Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1491-501.

- Odze RD. Adenomas and adenoma-like DALMs in chronic ulcerative colitis: a clinical, pathological, and molecular review. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1746-50.

- Odze RD, Goldblum J, Noffsinger A, Alsaigh N, Rybicki LA, Fogt F. Interobserver variability in the diagnosis of ulcerative colitis-associated dysplasia by telepathology. *Mod Pathol* 2002;15:379-86.

- Odze R. Diagnostic problems and advances in inflammatory bowel disease. *Mod Pathol* 2003;16:347-58.

- O'Garra A, Stapleton G, Dhar V, Pearce M, Schumacher J, Rugo H, Barbis D, Stall A, Cupp J, Moore K, et al. Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *Int Immunol* 1990;2:821-32.

- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.

- Ohmori H, Dohrman AF, Gallup M, Tsuda T, Kai H, Gum JR, Jr., Kim YS, Basbaum CB. Molecular cloning of the amino-terminal region of a rat MUC 2 mucin gene homologue. Evidence for expression in both intestine and airway. *J Biol Chem* 1994;269:17833-40.

- Okayasu I, Yamada M, Mikami T, Yoshida T, Kanno J, Ohkusa T. Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1078-83.

- Oliveira C, Westra JL, Arango D, Ollikainen M, Domingo E, Ferreira A, Velho S, Niessen R, Lagerstedt K, Alhopuro P, Laiho P, Veiga I, Teixeira MR, Ligtenberg M, Kleibeuker JH, Sijmons RH, Plukker JT, Imai K, Lage P, Hamelin R, Albuquerque C, Schwartz S, Jr., Lindblom A, Peltomaki P, Yamamoto H, Aaltonen LA, Seruca R, Hofstra RM. Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. *Hum Mol Genet* 2004;13:2303-11.

- Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol* 1986;40:337-65.

- O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999;163:6718-24.

- Ordway JM, Williams K, Curran T. Transcription repression in oncogenic transformation: common targets of epigenetic repression in cells transformed by Fos, Ras or Dnmt1. *Oncogene* 2004;23:3737-48.

- Orecchia R, Infusini E, Sciutto A, Rapallo A, Di Vinci A, Nigro S, Geido E, Giaretti W. Ki-ras activation in vitro affects G1 and G2M cell-cycle transit times and apoptosis. *J Pathol* 2000;190:423-9.

- Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;324:84-8.

- Otte JM, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2004;126:1054-70.

- Ouellette AJ, Bevins CL. Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:43-50.

- Owen RL, Jones AL. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* 1974;66:189-203.

P

- Panja A, Goldberg S, Eckmann L, Krishen P, Mayer L. The regulation and functional consequence of proinflammatory cytokine binding on human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1998;161:3675-84.
- Pavli P, Hume DA, Van De Pol E, Doe WF. Dendritic cells, the major antigen-presenting cells of the human colonic lamina propria. *Immunology* 1993;78:132-41.
- Pavli P, Maxwell L, Van de Pol E, Doe F. Distribution of human colonic dendritic cells and macrophages. *Clin Exp Immunol* 1996;104:124-32.
- Peiffer I, Guignot J, Barbat A, Carnoy C, Moseley SL, Nowicki BJ, Servin AL, Bernet-Camard MF. Structural and functional lesions in brush border of human polarized intestinal Caco-2/TC7 cells infected by members of the Afa/Dr diffusely adhering family of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2000;68:5979-90.
- Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:735-40.
- Penix L, Weaver WM, Pang Y, Young HA, Wilson CB. Two essential regulatory elements in the human interferon gamma promoter confer activation specific expression in T cells. *J Exp Med* 1993;178:1483-96.
- Pennica D, Hayflick JS, Bringman TS, Palladino MA, Goeddel DV. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:6060-4.
- Perey DY, Good RA. Experimental arrest and induction of lymphoid development in intestinal lymphoepithelial tissues of rabbits. *Lab Invest* 1968;18:15-26.
- Perez-Cruz I, Fallen P, Madrigal JA, Cohen SB. Naive T cells from cord blood have the capacity to make Types 1 and 2 cytokines. *Immunol Lett* 2000;75:85-8.
- Pestka S, Kotenko SV, Muthukumaran G, Izotova LS, Cook JR, Garotta G. The interferon gamma (IFN-gamma) receptor: a paradigm for the multichain cytokine receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:189-206.
- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004;22:929-79.
- Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, Mak TW. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 1993;73:457-67.
- Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *Faseb J* 1999;13:2105-24.
- Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 2003;17:1709-13.
- Playford RJ, Hanby AM, Gschmeissner S, Peiffer LP, Wright NA, McGarrity T. The epidermal growth factor receptor (EGF-R) is present on the basolateral, but not the apical, surface of enterocytes in the human gastrointestinal tract. *Gut* 1996;39:262-6.
- Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, Carramanzana NM, Deem RL, Shealy D, Targan SR. A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* 1997;159:6276-82.
- Polakis P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1997;1332:F127-47.
- Polakis P. The oncogenic activation of β catenin. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:15-21.
- Porter EM, Liu L, Oren A, Anton PA, Ganz T. Localization of human intestinal defensin 5 in Paneth cell granules. *Infect Immun* 1997;65:2389-95.
- Potten CS, Hume WJ, Reid P, Cairns J. The segregation of DNA in epithelial stem cells. *Cell* 1978;15:899-906.
- Potten CS. Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am J Physiol* 1997;273:G253-7.
- Potten CS. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998;353:821-30.

- Powell MJ, Thompson SA, Tone Y, Waldmann H, Tone M. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *J Immunol* 2000;165:292-6.
- Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992;359:235-7.
- Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 1993;5:1461-71.
- Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996;183:2669-74.
- Pranada AL, Metz S, Herrmann A, Heinrich PC, Muller-Newen G. Real time analysis of STAT3 nucleocytoplasmic shuttling. *J Biol Chem* 2004;279:15114-23.
- Prasad R, Venkatasubramanian J, Amde M, Rao MC. Phospholipase C and src tyrosine kinases mediate neurotensin-stimulated Cl- secretion in rabbit proximal colon. *Dig Dis Sci* 2004;49:1318-26.
- Prehn JL, Landers CJ, Targan SR. A soluble factor produced by lamina propria mononuclear cells is required for TNF-alpha enhancement of IFN-gamma production by T cells. *J Immunol* 1999;163:4277-83.
- Preto A, Figueiredo J, Velho S, Ribeiro AS, Soares P, Oliveira C, Seruca R. BRAF provides proliferation and survival signals in MSI colorectal carcinoma cells displaying BRAF(V600E) but not KRAS mutations. *J Pathol* 2008;214:320-7.
- Probert L, Keffer J, Corbella P, Cazlaris H, Patsavoudi E, Stephens S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G. Wasting, ischemia, and lymphoid abnormalities in mice expressing T cell-targeted human tumor necrosis factor transgenes. *J Immunol* 1993;151:1894-906.
- Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 2002;217:133-9.

Q

- Qiao L, Schurmann G, Betzler M, Meuer SC. Activation and signaling status of human lamina propria T lymphocytes. *Gastroenterology* 1991;101:1529-36.
- Qiao L, Schurmann G, Autschbach F, Wallich R, Meuer SC. Human intestinal mucosa alters T-cell reactivities. *Gastroenterology* 1993;105:814-9.

R

- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418:934.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118:229-41.
- Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007;26:3100-12.
- Ramana CV, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol* 2002;23:96-101.
- Randal M, Kossiakoff AA. The structure and activity of a monomeric interferon-gamma:alpha-chain receptor signaling complex. *Structure* 2001;9:155-63.
- Rashidbaigi A, Langer JA, Jung V, Jones C, Morse HG, Tischfield JA, Trill JJ, Kung HF, Pestka S. The gene for the human immune interferon receptor is located on chromosome 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:384-8.
- Read S, Mauze S, Asseman C, Bean A, Coffman R, Powrie F. CD38+ CD45RB(low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. *Eur J Immunol* 1998;28:3435-47.
- Redston MS, Papadopoulos N, Caldas C, Kinzler KW, Kern SE. Common occurrence of APC and K-ras gene mutations in the spectrum of colitis-associated neoplasias. *Gastroenterology* 1995;108:383-92.

- Reinacher-Schick A, Baldus SE, Romdhana B, Landsberg S, Zapatka M, Monig SP, Holscher AH, Dienes HP, Schmiegel W, Schwarte-Waldhoff I. Loss of Smad4 correlates with loss of the invasion suppressor E-cadherin in advanced colorectal carcinomas. *J Pathol* 2004;202:412-20.
- Reinecke M. Neurotensin. Immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone. *Prog Histochem Cytochem* 1985;16:1-172.
- Reinecker HC, Steffen M, Witthoeft T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A. Enhanced secretion of tumour necrosis factor- α , IL-6, and IL-1 β by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993;94:174-81.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001;2:361-7.
- Reynolds AB, Daniel J, McCrean PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 1994;14:8333-42.
- Rhee KJ, Sethupathi P, Driks A, Lanning DK, Knight KL. Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. *J Immunol* 2004;172:1118-24.
- Rhodes JM, Campbell BJ. Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared. *Trends Mol Med* 2002;8:10-6.
- Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC, Ahren C, Correa P, Hamilton SR, Morson BC, et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* 1983;14:931-68.
- Riddell RH. Implications of a diagnosis of dysplasia in ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1995;30 Suppl 8:25-9.
- Riddell RH. Premalignant and early malignant lesions in the gastrointestinal tract: definitions, terminology, and problems. *Am J Gastroenterol* 1996;91:864-72.
- Ries S, Biederer C, Woods D, Shifman O, Shirasawa S, Sasazuki T, McMahon M, Oren M, McCormick F. Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell* 2000;103:321-30.
- Rimm DL, Caca K, Hu G, Harrison FB, Fearon ER. Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. *Am J Pathol* 1999;154:325-9.
- Rimoldi D, Salvi S, Lienard D, Lejeune FJ, Speiser D, Zografos L, Cerottini JC. Lack of BRAF mutations in uveal melanoma. *Cancer Res* 2003;63:5712-5.
- Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, Nespoli A, Viale G, Allavena P, Rescigno M. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2005;6:507-14.
- Rinderknecht E, O'Connor BH, Rodriguez H. Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. *J Biol Chem* 1984;259:6790-7.
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999;283:1183-6.
- Ritzhaupt A, Wood IS, Ellis A, Hosie KB, Shirazi-Beechey SP. Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport L-lactate as well as butyrate. *J Physiol* 1998;513 (Pt 3):719-32.
- Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF- β . *Miner Electrolyte Metab* 1998;24:111-9.
- Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999;29:2769-78.
- Roers A, Siewe L, Strittmatter E, Deckert M, Schluter D, Stenzel W, Gruber AD, Krieg T, Rajewsky K, Muller W. T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. *J Exp Med* 2004;200:1289-97.
- Rogler G, Hausmann M, Vogl D, Aschenbrenner E, Andus T, Falk W, Andreesen R, Scholmerich J, Gross V. Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin Exp Immunol* 1998;112:205-15.
- Rosell S and R  k  us A. Actions and possible hormonal functions of circulating neurotensin. *Clinical Physiology* 1981;1:3-20.
- Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H, Lang Y, Koebel P, Kontgen F, Althage A, Zinkernagel R, Steinmetz M, Bluethmann H. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-

mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 1993;364:798-802.

- Rouet-Benzineb P, Rouyer-Fessard C, Jarry A, Avondo V, Pouzet C, Yanagisawa M, Laboisie C, Laburthe M, Voisin T. Orexins acting at native OX(1) receptor in colon cancer and neuroblastoma cells or at recombinant OX(1) receptor suppress cell growth by inducing apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279:45875-86.
- Roux ME, McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Lamm ME. Differentiation pathway of Peyer's patch precursors of IgA plasma cells in the secretory immune system. *Cell Immunol* 1981;61:141-53.
- Rubin CE, Haggitt RC, Burmer GC, Brentnall TA, Stevens AC, Levine DS, Dean PJ, Kimmey M, Perera DR, Rabinovitch PS. DNA aneuploidy in colonic biopsies predicts future development of dysplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1992;103:1611-20.
- Rubinstein M, Rubinstein S, Familletti PC, Gross MS, Miller RS, Waldman AA, Pestka S. Human leukocyte interferon purified to homogeneity. *Science* 1978;202:1289-90.
- Ruddy MJ, Shen F, Smith JB, Sharma A, Gaffen SL. Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. *J Leukoc Biol* 2004;76:135-44.
- Ruggiero V, Tavernier J, Fiers W, Baglioni C. Induction of the synthesis of tumor necrosis factor receptors by interferon-gamma. *J Immunol* 1986;136:2445-50.
- Ruiter DJ, van der Meulen J, Brouwer A, Hummel MJ, Mauw BJ, van der Ploeg JC, Wisse E. Uptake by liver cells of endotoxin following its intravenous injection. *Lab Invest* 1981;45:38-45.
- Ruiz PA, Hoffmann M, Szcesny S, Blaut M, Haller D. Innate mechanisms for *Bifidobacterium lactis* to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats. *Immunology* 2005;115:441-50.
- Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2005;23:7518-28.
- Rutgeerts P, Goboos K, Peeters M, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, Kerremans R, Vantrappen G. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 1991;338:771-4.
- Rutter, M, Saunders B, Wilkinson K, Rumbles S, Schofield G, Kamm M, Williams C, Price A, Talbot I, Forbes A. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2004;126(2):451-9.

S

- Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM, Wang J, Ouyang B, Elisei R, Stambrook PJ, Fagin JA. The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. *Oncogene* 2000;19:3948-54.
- Sadoul JL, Mazella J, Amar S, Kitabgi P, Vincent JP. Preparation of neurotensin selectively iodinated on the tyrosine 3 residue. Biological activity and binding properties on mammalian neurotensin receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120:812-9.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-64.
- Salyers AA, O'Brien M, Kotarski SF. Utilization of chondroitin sulfate by *Bacteroides thetaiotaomicron* growing in carbohydrate-limited continuous culture. *J Bacteriol* 1982;150:1008-15.
- Santiago C, Pagan B, Isidro AA, Appleyard CB. Prolonged chronic inflammation progresses to dysplasia in a novel rat model of colitis-associated colon cancer. *Cancer Res* 2007;67:10766-73.
- Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008;134:577-94.
- Sato W, Aranami T, Yamamura T. Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. *J Immunol* 2007;178:7525-9.
- Satoh Y, Ishikawa K, Tanaka H, Ono K. Immunohistochemical observations of immunoglobulin A in the Paneth cells of germ-free and formerly-germ-free rats. *Histochemistry* 1986;85:197-201.
- Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1977;31:107-33.
- Schatten WE, Desprez JD, Holden WD. A bacteriologic study of portal-vein blood in man. *AMA Arch Surg* 1955;71:404-9.

- Schaubert J, Svanholm C, Termen S, Iffland K, Menzel T, Scheppach W, Melcher R, Agerberth B, Luhrs H, Gudmundsson GH. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut* 2003;52:735-41.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993;75:495-505.
- Schenk M, Bouchon A, Birrer S, Colonna M, Mueller C. Macrophages expressing triggering receptor expressed on myeloid cells-1 are underrepresented in the human intestine. *J Immunol* 2005;174:517-24.
- Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, Dixon MF, Fenoglio-Preiser CM, Flejou JF, Geboes K, Hattori T, Hirota T, Itabashi M, Iwafuchi M, Iwashita A, Kim YI, Kirchner T, Klimpfinger M, Koike M, Lauwers GY, Lewin KJ, Oberhuber G, Offner F, Price AB, Rubio CA, Shimizu M, Shimoda T, Sipponen P, Solcia E, Stolte M, Watanabe H, Yamabe H. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut* 2000;47:251-5.
- Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 1):137-46.
- Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286(6):C1213-28.
- Schotte A, Leysen JE, Laduron PM. Evidence for a displaceable non-specific [3H]neurotensin binding site in rat brain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1986;333:400-5.
- Schreiber S. Interleukin-10 in the intestine. *Gut* 1997;41:274-5.
- Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J, Hamling J, Koop I, Groessner B, Lochs H, Raedler A. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet* 1999;353:459-61.
- Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, Wild G, Williams CN, Nikolaus S, Jacyna M, Lashner BA, Gangl A, Rutgeerts P, Isaacs K, van Deventer SJ, Koningsberger JC, Cohard M, LeBeaut A, Hanauer SB. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000;119:1461-72.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75:163-89.
- Schulmann K, Mori Y, Croog V, Yin J, Olaru A, Sterian A, Sato F, Wang S, Xu Y, Deacu E, Berki AT, Hamilton JP, Kan T, Abraham JM, Schmiegel W, Harpaz N, Meltzer SJ. Molecular phenotype of inflammatory bowel disease-associated neoplasms with microsatellite instability. *Gastroenterology* 2005;129:74-85.
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998;254:439-59.
- Scotto L, Assoian RK. A GC-rich domain with bifunctional effects on mRNA and protein levels: implications for control of transforming growth factor beta 1 expression. *Mol Cell Biol* 1993;13:3588-97.
- Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000;47:397-403.
- Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Sauzeau V, Bourreille A, Hilaret G, Cario-Toumaniantz C, Pacaud P, Galmiche JP, Loirand G. Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis. *Gastroenterology* 2003;124:1180-7.
- Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 1998;66:5224-31.
- Sheehan KC, Pinckard JK, Arthur CD, Dehner LP, Goeddel DV, Schreiber RD. Monoclonal antibodies specific for murine p55 and p75 tumor necrosis factor receptors: identification of a novel in vivo role for p75. *J Exp Med* 1995;181:607-17.
- Shen F, Gaffen SL. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine* 2008;41:92-104.
- Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001;182:58-67.
- Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi M, et al. Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J Cell Biol* 1995;128:949-57.
- Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol* 2000;10:147-54.

- Shih IM, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2001;61:818-22.
- Shin HC, Benbernou N, Esnault S, Guenounou M. Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway. *Cytokine* 1999;11:257-66.
- Shirota K, LeDuy L, Yuan SY, Jothy S. Interleukin-6 and its receptor are expressed in human intestinal epithelial cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1990;58:303-8.
- Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002;2:151-61.
- Shroff KE, Meslin K, Cebra JJ. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun* 1995;63:3904-13.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359:693-9.
- Sica A, Dorman L, Viggiano V, Cippitelli M, Ghosh P, Rice N, Young HA. Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J Biol Chem* 1997;272:30412-20.
- Sigot M. La culture d'organes. *Presse Universitaire de France*, 1968.
- Silva WA, Jr., Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanette DL, Santos AR, Zago MA. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2003;21:661-9.
- Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 1984;86:174-93.
- Simon-Assmann PM, Keding M, Grenier JF, Haffen K. Control of brush border enzymes by dexamethasone in the fetal rat intestine cultured in vitro. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1982;1:257-65.
- Sims JE, Williams DE, Morrissey PJ, Garka K, Foxworthe D, Price V, Friend SL, Farr A, Bedell MA, Jenkins NA, Copeland NG, Grabstein K, Paxton RJ. Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. *J Exp Med* 2000;192:671-80.
- Sjolund K, Sanden G, Hakanson R, Sundler F. Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemical study. *Gastroenterology* 1983;85:1120-30.
- Smith AJ, Stern HS, Penner M, Hay K, Mitri A, Bapat BV, Gallinger S. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 1994;54:5527-30.
- Smith KJ, Johnson KA, Bryan TM, Hill DE, Markowitz S, Willson JK, Paraskeva C, Petersen GM, Hamilton SR, Vogelstein B, et al. The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:2846-50.
- Smith PD, Smythies LE, Mosteller-Barnum M, Sibley DA, Russell MW, Merger M, Sellers MT, Orenstein JM, Shimada T, Graham MF, Kubagawa H. Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J Immunol* 2001;167:2651-6.
- Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev* 2005;206:149-59.
- Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005;115:66-75.
- Soderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzen LE, Lindmark T, Wiren M, Tagesson C, Sjolund R. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* 2002;50:307-13.
- Soderholm JD, Streutker C, Yang PC, Paterson C, Singh PK, McKay DM, Sherman PM, Croitoru K, Perdue MH. Increased epithelial uptake of protein antigens in the ileum of Crohn's disease mediated by tumour necrosis factor alpha. *Gut* 2004;53:1817-24.
- Souzae F, Rostene W, Forgez P. Neurotensin agonist induces differential regulation of neurotensin receptor mRNA. Identification of distinct transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 1997;272:10087-94.
- Souzae F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, Bruyneel E, Attoub S, Gespach C, Gompel A, Forgez P. Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Res* 2006;66:6243-9 a
- Souzae F, Viardot-Foucault V, Rouillet N, Toy-Miou-Leong M, Gompel A, Bruyneel E, Comperat E, Faux MC, Mareel M, Rostene W, Flejou JF, Gespach C, Forgez P. Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/beta-catenin pathway is an early event in human colonic adenomas. *Carcinogenesis* 2006;27:708-16 b
- Soussi T, Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2001;1:233-40.

- Spencer SD, Di Marco F, Hooley J, Pitts-Meek S, Bauer M, Ryan AM, Sordat B, Gibbs VC, Aguet M. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J Exp Med* 1998;187:571-8.
- Spink KE, Polakis P, Weis WI. Structural basis of the Axin-adenomatous polyposis coli interaction. *Embo J* 2000;19:2270-9.
- Srivastava A, Redston M, Farraye FA, Yantiss RK, Odze RD. Hyperplastic/serrated polyposis in inflammatory bowel disease: a case series of a previously undescribed entity. *Am J Surg Pathol* 2008;32:296-303.
- Stadnyk AW. Cytokine production by epithelial cells. *Faseb J* 1994;8:1041-7.
- Stahl DA, Flesher B, Mansfield HR, Montgomery L. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:1079-84.
- Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000;289:1352-5.
- Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997;159:4772-80.
- Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007;19:281-6.
- Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, Gould KA, Dove WF. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 1992;256:668-70.
- Suarez F, Furne J, Springfield J, Levitt M. Insights into human colonic physiology obtained from the study of flatus composition. *Am J Physiol* 1997;272:G1028-33.
- Sudha PS, Devaraj H, Devaraj N. Adherence of *Shigella dysenteriae* 1 to human colonic mucin. *Curr Microbiol* 2001;42:381-7.
- Suenaeert P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, Geboes K, Ceuppens JL, Rutgeerts P. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2000-4.
- Suzuki H, Harpaz N, Tarmin L, Yin J, Jiang HY, Bell JD, Hontanosas M, Groisman GM, Abraham JM, Meltzer SJ. Microsatellite instability in ulcerative colitis-associated colorectal dysplasias and cancers. *Cancer Res* 1994;54:4841-4.
- Suzuki K, Meek B, Doi Y, Muramatsu M, Chiba T, Honjo T, Fagarasan S. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:1981-6.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44-54.
- Szentkuti L. Light microscopical observations on lumenally administered dyes, dextrans, nanospheres and microspheres in the gel mucus layer of the rat distal colon. *J Control Release* 1997;46:233-42.

T

- Tahara T, Inoue N, Hisamatsu T, Kashiwagi K, Takaishi H, Kanai T, Watanabe M, Ishii H, Hibi T. Clinical significance of microsatellite instability in the inflamed mucosa for the prediction of colonic neoplasms in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:710-5.
- Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. The Wnt/beta-catenin signaling pathway as a target in drug discovery. *J Pharmacol Sci* 2007;104:293-302.
- Talham GL, Jiang HQ, Bos NA, Cebra JJ. Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. *Infect Immun* 1999;67:1992-2000.
- Tan JC, Indelicato SR, Narula SK, Zavodny PJ, Chou CC. Characterization of interleukin-10 receptors on human and mouse cells. *J Biol Chem* 1993;268:21053-9.
- Tanaka K, Masu M, Nakanishi S. Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 1990;4:847-54.
- Tancula E, Feldhaus MJ, Bedzyk LA, Salyers AA. Location and characterization of genes involved in binding of starch to the surface of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J Bacteriol* 1992;174:5609-16.

- Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997;337:1029-35.
- Tarmin L, Yin J, Harpaz N, Kozam M, Noordzij J, Antonio LB, Jiang HY, Chan O, Cymes K, Meltzer SJ. Adenomatous polyposis coli gene mutations in ulcerative colitis-associated dysplasias and cancers versus sporadic colon neoplasms. *Cancer Res* 1995;55:2035-8.
- Tartaglia LA, Goeddel DV, Reynolds C, Figari IS, Weber RF, Fendly BM, Palladino MA, Jr. Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Immunol* 1993;151:4637-41 a
- Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF, Goeddel DV. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 1993;73:213-6 b
- Taya Y, Devos R, Tavernier J, Cheroutre H, Engler G, Fiers W. Cloning and structure of the human immune interferon-gamma chromosomal gene. *Embo J* 1982;1:953-8.
- Taylor HW, Boyle M, Smith SC, Bustin S, Williams NS. Expression of p53 in colorectal cancer and dysplasia complicating ulcerative colitis. *Br J Surg* 1993;80:442-4.
- Ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* 2002;191:1-16.
- Teodoro JG, Parker AE, Zhu X, Green MR. p53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase. *Science* 2006;313:968-71.
- Terdiman JP, Aust DE, Chang CG, Willenbacher RF, Baretton GB, Waldman FM. High resolution analysis of chromosome 18 alterations in ulcerative colitis-related colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;136:129-37.
- Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422-6.
- Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, Willson JK, Markowitz S, Hamilton SR, Kern SE, Kinzler KW, Vogelstein B. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet* 1996;13:343-6.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
- Tilg H, van Montfrans C, van den Ende A, Kaser A, van Deventer SJ, Schreiber S, Gregor M, Ludwiczek O, Rutgeerts P, Gasche C, Koningsberger JC, Abreu L, Kuhn I, Cohard M, LeBeaut A, Grint P, Weiss G. Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. *Gut* 2002;50:191-5.
- Tone M, Powell MJ, Tone Y, Thompson SA, Waldmann H. IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Immunol* 2000;165:286-91.
- Torlakovic E, Snover DC. Serrated adenomatous polyposis in humans. *Gastroenterology* 1996;110:748-55.
- Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G, Nesland JM. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol* 2003;27:65-81.
- Torlakovic EE, Gomez JD, Driman DK, Parfitt JR, Wang C, Benerjee T, Snover DC. Sessile serrated adenoma (SSA) vs. traditional serrated adenoma (TSA). *Am J Surg Pathol* 2008;32:21-9.
- Torres C, Antonioli D, Odze RD. Polypoid dysplasia and adenomas in inflammatory bowel disease: a clinical, pathologic, and follow-up study of 89 polyps from 59 patients. *Am J Surg Pathol* 1998;22:275-84.
- Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol* 1999;9:349-57.
- Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:710-5.
- Tran NH, Wu X, Frost JA. B-Raf and Raf-1 are regulated by distinct autoregulatory mechanisms. *J Biol Chem* 2005;280:16244-53.
- Trede NS, Castigli E, Geha RS, Chatila T. Microbial superantigens induce NF-kappa B in the human monocytic cell line THP-1. *J Immunol* 1993;150:5604-13.
- Tsai ML, Chen WC, Wang YC, Hung KL. Cerebrospinal fluid interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in children with central nervous system infections. *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi* 1996;37:16-21.
- Tytgat GN, Dhir V, Gopinath N. Endoscopic appearance of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Eur J Cancer* 1995;31A:1174-7.

U

- Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, Tannapfel A, Fontenot JD, Ramsdell F, Powrie F. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 2006;177:5852-60.
- Ullman TA. Patients with low-grade dysplasia should be advised to undergo colectomy. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:267-9; discussion 273-5.
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:261-8.

V

- van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002;111:241-50.
- van der Poll T, Jansen PM, Montegut WJ, Braxton CC, Calvano SE, Stackpole SA, Smith SR, Swanson SW, Hack CE, Lowry SF, Moldawer LL. Effects of IL-10 on systemic inflammatory responses during sublethal primate endotoxemia. *J Immunol* 1997;158:1971-5.
- van der Veek PP, Schots ED, Masclee AA. Effect of neurotensin on colorectal motor and sensory function in humans. *Dis Colon Rectum* 2004;47:210-8.
- van der Waaij LA, Limburg PC, Mesander G, van der Waaij D. In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut* 1996;38:348-54.
- van Dullemen HM, van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, Woody J. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995;109:129-35.
- van Es JH, Barker N, Clevers H. You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:28-33.
- van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, Cozijnsen M, Robine S, Winton DJ, Radtke F, Clevers H. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 2005;435(7044):959-63.
- van Noort M, Meeldijk J, van der Zee R, Destree O, Clevers H. Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *J Biol Chem* 2002;277:17901-5.
- Vandenabeele P, Declercq W, Vanhaesebroeck B, Grooten J, Fiers W. Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells. *J Immunol* 1995;154:2904-13.
- Varga J. Scleroderma and Smads: dysfunctional Smad family dynamics culminating in fibrosis. *Arthritis Rheum* 2002;46:1703-13.
- Vassalli P, Grau GE, Piguet PF. TNF in autoimmune diseases, graft-versus-host reactions, and pulmonary fibrosis. *Immunol Ser* 1992;56:409-30.
- Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8698-702.
- Veldhoen M, Stockinger B. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends Immunol* 2006;27:358-61.
- Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E, Brigidi P, Matteuzzi D, Campieri M. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:1103-8.
- Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* 2002;118:211-5.
- Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff TH. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4560-5.

- Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang MN, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, deVries JE, Roncarolo MG, Mosmann TR, Moore KW. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1172-6.
- Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kalinski P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol* 2000;164:4507-12.
- Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P. Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:302-9.
- Vita N, Laurent P, Lefort S, Chalon P, Dumont X, Kaghad M, Gully D, Le Fur G, Ferrara P, Caput D. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS Lett* 1993;317:139-42.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.
- von Roon AC, Reese G, Teare J, Constantinides V, Darzi AW, Tekkis PP. The risk of cancer in patients with Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2007;50:839-55.
- Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:275-83.

W

- Wadolkowski EA, Laux DC, Cohen PS. Colonization of the streptomycin-treated mouse large intestine by a human fecal *Escherichia coli* strain: role of adhesion to mucosal receptors. *Infect Immun* 1988;56:1036-43.
- Wager RE, Assoian RK. A phorbol ester-regulated ribonuclease system controlling transforming growth factor beta 1 gene expression in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 1990;10:5983-90.
- Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, Towne J, Sims JE, Stark GR, Li X. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 2003;4:920-7.
- Waldmann H, Cobbold S. Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells? *Immunity* 2001;14:399-406.
- Walsh SV, Loda M, Torres CM, Antonioli D, Odze RD. P53 and beta catenin expression in chronic ulcerative colitis--associated polypoid dysplasia and sporadic adenomas: an immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 1999;23:963-9.
- Walter MR, Nagabhushan TL. Crystal structure of interleukin 10 reveals an interferon gamma-like fold. *Biochemistry* 1995;34:12118-25.
- Walter MR, Windsor WT, Nagabhushan TL, Lundell DJ, Lunn CA, Zauodny PJ, Narula SK. Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. *Nature* 1995;376:230-5.
- Wang L, Cunningham JM, Winters JL, Guenther JC, French AJ, Boardman LA, Burgart LJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Thibodeau SN. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res* 2003;63:5209-12.
- Wang X, Taplick J, Geva N, Oren M. Inhibition of p53 degradation by Mdm2 acetylation. *FEBS Lett* 2004;561:195-201.
- Warner AS, Glick ME, Fogt F. Multiple large hyperplastic polyps of the colon coincident with adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 1994;89:123-5.
- Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, Ishikawa H, Aiso S, Hibi T, Ishii H. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest* 1995;95:2945-53.
- Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 2004;5:800-8.
- Wax SD, Nakamura H, Anderson PJ. The tumor necrosis factor-alpha AU-rich element inhibits the stable association of the 40S ribosomal subunit with RNA transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:1100-6.
- Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006;24:677-88.

- Weber-Nordt RM, Meraz MA, Schreiber RD. Lipopolysaccharide-dependent induction of IL-10 receptor expression on murine fibroblasts. *J Immunol* 1994;153:3734-44.
- Wehinger J, Gouilleux F, Groner B, Finke J, Mertelsmann R, Weber-Nordt RM. IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett* 1996;394:365-70.
- Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, Enders C, Sonnenborn U, Nuding S, Bengmark S, Fellermann K, Schroder JM, Stange EF. NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* 2004;72:5750-8 a
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schroder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004;53:1658-64 b
- Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Bevins CL, Stange EF. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2:406-15.
- Wehkamp J, Schaubert J, Stange EF. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:32-8.
- Weinstein IB. Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis* 2000;21:857-64.
- Weinstein M, Yang X, Li C, Xu X, Gotay J, Deng CX. Failure of egg cylinder elongation and mesoderm induction in mouse embryos lacking the tumor suppressor smad2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9378-83.
- Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass J, Haile R, Laird PW. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38:787-93.
- Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, Karasarides M, Martin J, Niculescu-Duvaz D, Springer CJ, Marais R. V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res* 2004;64:2338-42.
- Werner T, Haller D. Intestinal epithelial cell signalling and chronic inflammation: From the proteome to specific molecular mechanisms. *Mutat Res* 2007;622:42-57.
- Wharton KA, Jr. Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev Biol* 2003;253:1-17.
- Willems F, Marchant A, Delville JP, Gerard C, Delvaux A, Velu T, de Boer M, Goldman M. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol* 1994;24:1007-9.
- Willemsen LE, Hoetjes JP, van Deventer SJ, van Tol EA. Abrogation of IFN-gamma mediated epithelial barrier disruption by serine protease inhibition. *Clin Exp Immunol* 2005;142:275-84.
- Willenbacher RF, Aust DE, Chang CG, Zelman SJ, Ferrell LD, Moore DH, 2nd, Waldman FM. Genomic instability is an early event during the progression pathway of ulcerative-colitis-related neoplasia. *Am J Pathol* 1999;154:1825-30.
- Williams L, Bradley L, Smith A, Foxwell B. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol* 2004;172:567-76.
- Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993;177:557-60.
- Wilson AG, Duff GW. Tumor necrosis factor. *Lancet* 1995;345:649.
- Wong NA, Mayer NJ, MacKell S, Gilmour HM, Harrison DJ. Immunohistochemical assessment of Ki67 and p53 expression assists the diagnosis and grading of ulcerative colitis-related dysplasia. *Histopathology* 2000;37:108-14.
- Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, Forster R, Pabst O. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 2006;203:519-27.
- Wostmann BS, Larkin C, Moriarty A, Bruckner-Kardoss E. Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats. *Lab Anim Sci* 1983;33:46-50.
- Wright JF, Guo Y, Quazi A, Luxenberg DP, Bennett F, Ross JF, Qiu Y, Whitters MJ, Tomkinson KN, Dunussi-Joannopoulos K, Carreno BM, Collins M, Wolfman NM. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J Biol Chem* 2007;282:13447-55.

- Wright NA, Poulsom R, Stamp GW, Hall PA, Jeffery RE, Longcroft JM, Rio MC, Tomasetto C, Chambon P. Epidermal growth factor (EGF/URO) induces expression of regulatory peptides in damaged human gastrointestinal tissues. *J Pathol* 1990;162:279-84.

- Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 1993;7:1126-32.

X

-Xavier RJ, Podolsky DK, Unraveling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-34.

Y

- Yagi Y, Andoh A, Inatomi O, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Inflammatory responses induced by interleukin-17 family members in human colonic subepithelial myofibroblasts. *J Gastroenterol* 2007;42:746-53.

- Yamashita K, Yasuda S, Kuba T, Otani Y, Fujiwara M, Okayasu I. Unique characteristics of rectal carcinoma cell lines derived from invasive carcinomas in ulcerative colitis patients. *Cancer Sci* 2004;95:211-7.

- Yang SK, Eckmann L, Panja A, Kagnoff MF. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology* 1997;113:1214-23.

- Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JI, Spriggs MK. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 1995;3:811-21.

- Yao Z, Spriggs MK, Derry JM, Strockbine L, Park LS, VandenBos T, Zappone JD, Painter SL, Armitage RJ. Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. *Cytokine* 1997;9:794-800.

- Ye J, Ortaldo JR, Conlon K, Winkler-Pickett R, Young HA. Cellular and molecular mechanisms of IFN-gamma production induced by IL-2 and IL-12 in a human NK cell line. *J Leukoc Biol* 1995;58:225-33.

- Ye P, Garvey PB, Zhang P, Nelson S, Bagby G, Summer WR, Schwarzenberger P, Shellito JE, Kolls JK. Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:335-40.

- Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006;116:1310-6.

- Yin J, Harpaz N, Tong Y, Huang Y, Laurin J, Greenwald BD, Hontanosas M, Newkirk C, Meltzer SJ. p53 point mutations in dysplastic and cancerous ulcerative colitis lesions. *Gastroenterology* 1993;104:1633-9.

- Yoshida A, Koide Y, Uchijima M, Yoshida TO. IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:857-61.

- Yoshida T, Matsumoto N, Mikami T, Okayasu I. Upregulation of p16(INK4A) and Bax in p53 wild/p53-overexpressing crypts in ulcerative colitis-associated tumours. *Br J Cancer* 2004;91:1081-8.

- Yoshida T, Haga S, Numata Y, Yamashita K, Mikami T, Ogawa T, Ohkusa T, Okayasu I. Disruption of the p53-p53r2 DNA repair system in ulcerative colitis contributes to colon tumorigenesis. *Int J Cancer* 2006;118:1395-403.

- Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 1998;161:3400-7.

- Yoshinaga K, Evers BM, Izukura M, Parekh D, Uchida T, Townsend CM, Jr., Thompson JC. Neurotensin stimulates growth of colon cancer. *Surg Oncol* 1992;1:127-34.

- Youakim A, Ahdieh M. Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol* 1999;276:G1279-88.

- Young GP, Macrae FA, Gibson PR, Alexeyeff M, Whitehead RH. Brush border hydrolases in normal and neoplastic colonic epithelium. *J Gastroenterol Hepatol* 1992;7:347-54.

- Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol* 1995;58:373-81.
- Yuen ST, Davies H, Chan TL, Ho JW, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Tsui WW, Chan AS, Futreal PA, Stratton MR, Wooster R, Leung SY. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res* 2002;62:6451-5.

Z

- Zdanov A, Schalk-Hihi C, Gustchina A, Tsang M, Weatherbee J, Wlodawer A. Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure* 1995;3:591-601.
- Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007;56:61-72.
- Zeuthen LH, Fink LN, Frokiaer H. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology* 2008;123:197-208.
- Zhang G, Ghosh S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem* 2002;277:7059-65.
- Zhao C, Wang I, Lehrer RI. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* 1996;396:319-22.
- Zimonjic DB, Rezanka LJ, Evans CH, Polymeropoulos MH, Trent JM, Popescu NC. Mapping of the immune interferon gamma gene (IFNG) to chromosome band 12q14 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1995;71:247-8.
- Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H, Maslinski W. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* 2000;164:2832-8.
- Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3854-9.
- Zweibaum A, Pinto M, Chevalier G, Dussaulx E, Triadou N, Lacroix B, Haffen K, Brun JL, Rousset M. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *J Cell Physiol* 1985;122:21-9.

ANNEXE

1. Les fondements de la culture d'explant (ou culture organotypique) et ses applications

Il nous faut commencer ce chapitre par deux définitions, celle de culture cellulaire et celle de culture d'explants. Cette distinction entre deux types de culture a été faite dès 1925 par Maximow (cité dans Sigot, 1968). Cet auteur fait la distinction entre culture à « croissance histiotypique » (appelée maintenant culture cellulaire) dans laquelle les cellules mènent leur vie propre (l'unité est représentée par la cellule) et « culture d'explants » à « croissance organotypique » (les organes explantés gardent leur structure complexe). Dans les deux cas, le but poursuivi est de maintenir « *ex vivo* » des « ensembles » cellulaires, mais avec toutefois des approches et même des « philosophies » très différentes. Curieusement, dans la littérature, la culture cellulaire a soulevé beaucoup plus d'intérêts que la culture d'explants, preuve en est avec les 50187 citations trouvées en interrogeant Medline (Pubmed) avec les mots clés « cell culture » alors que « seulement » 3256 citations sont trouvées avec « explant culture ».

1.1. La culture cellulaire

Elle peut se définir comme l'ensemble des méthodes visant à la production de cellules *in vitro*, ces cellules formant un ensemble homogène bien caractérisé, sans maintien de l'architecture du tissu d'origine. Ces cellules entretenues en culture forment des souches et des lignées qui sont entretenues en flacons, soit sous forme de cultures adhérentes, soit en suspension. A chaque passage des cellules (repiquage), celles-ci sont dissociées et reprennent un cycle de prolifération. Historiquement, on note que nombre de milieux de culture cellulaire dérivent de travaux de virologues des années 1950-60, pour qui il était indispensable de produire des cellules en grand nombre afin d'assurer la réplication virale ou pour étudier les effets cytopathogènes ou transformants de virus. On comprend donc que dès leur origine, les techniques de culture cellulaire aient eu pour principal but de favoriser la

prolifération cellulaire. Ainsi ont été élaborés des milieux de culture synthétiques très riches, systématiquement supplémentés lors de leur emploi par du sérum bovin fœtal connu pour apporter des facteurs de croissance, des facteurs d'adhésion et des facteurs de détoxification. Enfin, la standardisation des milieux a abouti à la mise sur le marché de milieux de culture parfaitement « antiphysiologiques », dont la composition est très éloignée de celle du plasma, avec notamment des concentrations en glucose qui peuvent atteindre jusqu'à 4,5g/l (milieu de Dulbecco). Un avantage d'un tel milieu est qu'il permet la multiplication cellulaire sans provoquer rapidement de déplétion en nutriments et donc sans nécessiter des renouvellements fréquents du milieu des flacons de culture. En fait, on sait maintenant que de tels milieux de culture riches en glucose provoquent une dérive métabolique des cellules, celles-ci tirant exclusivement leur énergie d'une dégradation purement glycolytique du glucose. Ces milieux peuvent aussi interférer avec la différenciation cellulaire puisqu'il a été montré dès le début des années 1980 que la manipulation du substrat hydrocarboné des cellules en culture peut modifier leur différenciation (Zweibaum et al, 1985). En outre, des concentrations élevées de glucose induisent un pouvoir réducteur très élevé, parfaitement inadéquat lorsque l'on veut étudier les mécanismes physiologiques de résistance des cellules *in vitro* à un stress oxydatif (Le Goffe et al, 1999 et 2002).

Dans le domaine de la recherche en gastroentérologie, et plus spécialement dans celui de la biologie des cellules épithéliales digestives, l'impossibilité de cultiver des cellules épithéliales intestinales différenciées normales a pendant longtemps constitué un verrou technologique. La disponibilité, depuis le début des années 80, de lignées cancéreuses coliques humaines qui expriment un phénotype de cellules épithéliales intestinales différenciées HT29.cl.16 E (Augeron et Labois, 1984), ou Caco-2 (Grasset et al, 1984) par exemple, a permis des avancées dans la compréhension de fonctions spécialisées de l'épithélium intestinal. On peut citer ainsi, de manière non exhaustive, le contrôle neuro-peptidergique de la sécrétion de mucines (Bou-Hanna et al, 1994), les rapports bactéries/virus - cellules épithéliales (Brunet et al, 2000 ; Guignot et al, 2001 ; Peiffer et al, 2000), le dialogue entre les cellules épithéliales et les cellules immunitaires (Jarry et al, 1996) notamment à travers des modèles de co-cultures cellulaires (Rimoldi et al, 2005 ; Zeuthen et al,

2008). Toutefois, ces modèles tumoraux ont des limites, liées au caractère tumoral des cellules et/ou à un mode de culture inadapté à la recherche envisagée, qui ne sont parfois pas pris en compte dans l'extrapolation qui est faite des données, et qui imposent des vérifications, certes limitées, sur la base de cellules normales isolées par exemple.

1.2. Culture d'explants

La culture d'explants procède d'une « philosophie » différente, puisqu'elle vise à étudier les rapports architecturaux et fonctionnels induits par le « dialogue » entre plusieurs types cellulaires qui forment l'explant maintenu *ex vivo*, en le soustrayant à la multitude de médiateurs provenant de l'organisme, en d'autres termes, en supprimant ses afférences vasculaires et nerveuses.

Historiquement, la culture d'explants a été développée principalement par des embryologistes (Sigot, 1968). Comme les explants maintenus *in vitro* ne doivent pas dépasser quelques millimètres, un organe embryonnaire entier peut être maintenu comme explant, c'est pourquoi ce type de culture est parfois appelé, improprement, culture d'organe. En 1926, débutent les travaux de culture d'explants du laboratoire Strangeways à Cambridge. Après la mort de Strangeways, l'équipe de H. Fell sera seule ou presque, pendant des années à exploiter le domaine de la culture organotypique en l'appliquant au développement des organes embryonnaires d'oiseaux et de mammifères (Sigot, 1968). Des progrès importants dans la technique de culture d'explants furent ensuite réalisés par Wolff et Haffen qui établirent des principes généraux applicables à de nombreux types d'explants, et parmi lesquels : fournir relativement peu de substances nutritives aux explants, de façon à éviter une multiplication trop importante des cellules qui perdent leurs caractéristiques originelles, et fournir aux cellules un substrat défavorable à leur migration de façon à les empêcher de quitter l'explant.

Dans le domaine de la gastroentérologie, ce sont principalement les travaux de Trier et de son équipe (Browning et al, 1969) à Boston, de Haffen à Strasbourg

(Simon-Asseman et al, 1982) ou de Schmitz à Necker (Bouma et al, 1990) qui ont montré l'intérêt de la culture d'explants de muqueuse intestinale humaine ou animale pour des études de développement (maturation des enzymes de bordure en brosse notamment), ou de physiologie (synthèse macromoléculaire). En pathologie, la culture d'explants s'est révélée être un outil particulièrement puissant pour l'étude de la physiopathologie de la maladie coeliaque par exemple (Mazzarella et al, 2008). Le plus souvent, les explants ou biopsies de muqueuse intestinale sont maintenus sur grille métallique atoxique, à l'interface liquide/air en milieu de type Trowell.

Il est étonnant de constater que, depuis les années 1960, les approches analytiques et interventionnelles des explants en culture, incluant ELISA (cytokines par exemple), RT-PCR pour la quantification d'ARN, manipulations pharmacologiques et neutralisation de récepteurs ont progressé, alors que la base méthodologique n'a pas changé (Monteleone et al, 2001) depuis les travaux de Trier dans les années 1960-70 (culture sur grille) (Browniny et al, 1969). Or, la culture organotypique sur grille est difficilement standardisable, et ne résout pas le problème des contraintes physiques (rétraction) exercées par des tissus de textures variées après dissection, qui provoquent « *per se* » des modifications majeures. En outre, la création d'une interface air ambiant / milieu de culture est de maintien difficile et non physiologique dans le domaine intestinal, et n'assure pas une viabilité optimale. Enfin, l'absence d'agitation risque de créer un micro-environnement peri-tissulaire à l'origine d'artefacts. Toutes ces constatations amènent à renouveler en profondeur la méthode de culture d'explants. Déjà, MacDonald et son équipe ont proposé une méthode de culture comprenant 95% O₂ et 5% CO₂ (Monteleone et al, 2001). Récemment, les problèmes de la rétraction des explants et de la création de micro-environnements ont été résolus par Anne Jarry qui a mis au point une technique de fixation de l'explant sur un silicone inerte, avec maintien d'une agitation constante de l'explant immergé dans un milieu contenant 95% O₂, 5% CO₂ (Rouet-Benzineb et al, 2004 ; Jarry et al, 2006 ; Jarry et al, 2008). Cette concentration en CO₂ est tout à fait appropriée à l'efficacité du tampon bicarbonate du milieu de culture (RPMI 1640). Dans ces conditions de culture, le dialogue intercellulaire est parfaitement maintenu, comme le montrent les expériences de blocage de la signalisation IL-10 et TGF- β (Jarry et al, 2008).

La figure ci-dessous illustre la méthode de culture d'explants utilisée dans ce travail, ainsi que ses applications potentielles.

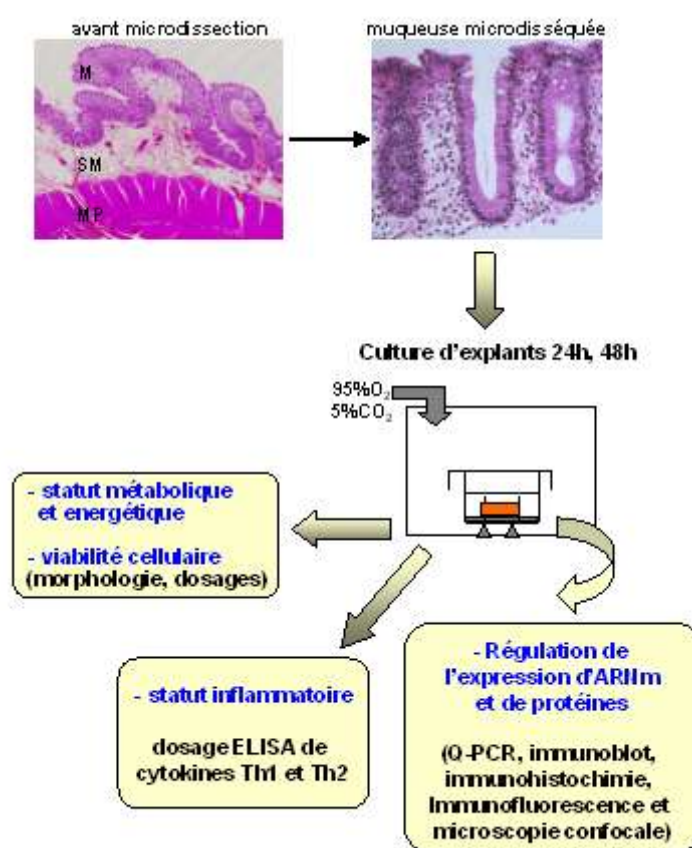


Figure 56: Modèle de culture d'explant de muqueuse colique humaine. La muqueuse est microdissectée sous loupe binoculaire, à partir de paroi colique humaine normale prélevée sur des pièces de résection chirurgicale à distance d'un cancer. Les fragments de muqueuse microdissectée (20-30mg) sont épinglés sur des boîtes de Pétri recouvertes de silicone (Sylgard, VWR) dans du RPMI (RPMI / BSA 0,01%, / antibiotiques). La culture s'effectue pendant 24h ou 48h, dans un récipient hermétique contenant du carbogène (95% O₂, 5% CO₂) à 37°C sur une table à agitation (30rpm). A la fin de la culture, le milieu de culture est récupéré, ce qui permet par exemple le dosage de cytokines par ELISA. Les fragments de tissu sont coupés en deux, une partie permettant l'extraction d'ARN puis des analyses de RT-PCR quantitative, l'autre partie permettant une analyse morphologique et immunohistochimique des cellules résidentes de la muqueuse après inclusion en paraffine. Ces explants peuvent être soumis à des traitements par des agents pharmacologiques ou des anticorps neutralisants (Jarry et al, 2006 et 2008).

RESUME / SUMMARY

L'homéostasie de la barrière intestinale peut-être rompue au cours de 2 processus physiopathologiques : 1) la prolifération incontrôlée des cellules épithéliales au cours d'un processus de régénération cicatricielle pouvant initier un processus d'oncogenèse, et 2) une perte cellulaire accélérée suite à une réponse inflammatoire de la muqueuse. Ce travail de thèse est divisé en 2 parties. L'une, clinico-pathologique et biologique, est fondée sur l'exploitation d'une population de patients atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) et ayant développé des lésions coliques selon la séquence inflammation / régénération / dysplasie / cancer. Cette approche a permis de valider des marqueurs phénotypiques et génotypiques susceptibles d'être associés à chacune des étapes du processus d'oncogenèse. L'autre, fondamentale, est fondée sur l'exploitation d'un nouveau modèle de culture d'explants de muqueuse colique humaine normale et a permis de recréer *ex vivo* l'initiation d'une réponse inflammatoire de type Th1. Ces 2 approches ont apporté des éléments nouveaux :

- Le remodelage épithélial au cours des MICI est associé à la voie des tumeurs festonnées, voie de carcinogenèse récemment décrite dans les cancers du colon sporadiques, définie par une signature morphologique et oncogénétique originale (mutation de *BRAF* et statut MSI de la tumeur) (article 1)

- La régénération épithéliale au cours des MICI coïncide avec l'expression du récepteur de la neurotensine, NTS1. Cette expression est régulée soit par son propre ligand, la neurotensine, soit par la β caténine (article 2)

- L'intégrité de la barrière épithéliale intestinale chez l'homme est dépendante de 2 cytokines dites « cytokines du mutualisme », l'IL10 et le TGF β , produites par les cellules résidentes de la muqueuse. En l'absence d'IL10, le LPS endogène déclenche une réponse immunitaire de type Th1 à l'origine de la rupture de la barrière épithéliale (article 3).

En conclusion, les approches que nous avons développées, à l'origine de résultats originaux, serviront à mieux définir les rapports entre l'inflammation intestinale et l'oncogenèse colorectale.

The intestinal mucosa homeostasis can be disturbed during two related physiopathological processes: 1) an uncontrolled proliferation of epithelial cells during inflammatory repair leading to oncogenesis, and 2) an accelerated cellular loss during intestinal inflammatory response. This work is divided into 2 parts. The first approach is based on a cohort of patients suffering from inflammatory bowel disease (IBD) with lesions evolving towards cancer through the inflammation / regeneration / dysplasia / cancer sequence. This approach led us to validate several phenotypic and genotypic markers likely to be associated with the stepwise process of oncogenesis. The other approach is based on the exploitation of a new explant culture model of human normal colonic mucosa that led us to recreate *ex vivo* the initiation of a Th1 inflammatory response. New findings resulting from these 2 approaches are as follows:

- Epithelial remodelling during IBD is associated with the serrated pathway of oncogenesis, first described in sporadic colon cancer. This pathway is defined by a morphological and oncogenetic signature (BRAF mutation and MSI status of the tumor) (article 1)

- Epithelial regeneration during IBD is associated with the expression of the neurotensin receptor, NTS1. NTS1 expression is regulated by its ligand, neurotensin or by β catenin (article 2)

- Finally, the human intestinal epithelial barrier integrity depends on 2 immunoregulatory cytokines, IL10 and TGF β , produced by mucosal resident cells. After IL10 depletion, endogenous LPS triggers a Th1 immune response leading to epithelial barrier disruption (article 3)

In conclusion, the approaches developed led to new findings which will help define the mechanistic link between intestinal inflammation and oncogenesis.

MOTS-CLES / KEY WORDS

Inflammation intestinale, carcinogénèse colique, homéostasie, barrière épithéliale intestinale, IL10, TGF β , culture d'explants

Intestinal inflammation, colonic carcinogenesis, intestinal barrier homeostasis, IL10, TGF β , explant culture

LABORATOIRE

BOSSARD Céline, EA 4273 - Biométadys, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 NANTES Cedex 01