

**MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES
SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional

Le 25 avril 2017

Par **Aurélie FANTOU**

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Evaluation de l'intérêt du blocage
thérapeutique de l'IL-22 BP au
cours de la maladie de Crohn**

Président du jury : **Mme Berthe-Marie IMBERT,**

Professeur de Virologie-Pharmacie-Nantes

Directeur de thèse : **M. Régis JOSIEN,**

Professeur d'Immunologie-Médecine- Nantes

Membres du jury : **Mme Tamara MATYSIAK-BUDNIK,**

Professeur d'Hépto-Gastro-Entérologie-Médecine-Nantes

Mme Caroline HEMONT,

Praticien Hospitalier Immunologie-Pharmacie-Nantes

Je remercie le Professeur Berthe-Marie Imbert pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Régis Josien pour votre encadrement ainsi que votre confiance témoignée tout au long de ce projet. Votre écoute et vos remarques ont épaissi avec finesse ce travail.

Je remercie le Professeur Tamara Matysiak Budnik pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie chaleureusement le Docteur Caroline Hémond d'avoir répondu favorablement et avec grand intérêt pour évaluer ce travail.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidée au cours de projet et en particulier Gaëlle, pour son savoir-faire précieux ainsi que la joie communicative de travailler à tes cotés.

Mes remerciements s'adressent également au Dr Jérôme Martin pour son soutien, ses conseils avisés ainsi que sa disponibilité.

Au terme de ces années de pharmacie, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers.

A mes parents pour leur soutien indéfectible.

Table des matières

I.	Introduction.....	1
1.	Immunité de la muqueuse intestinale	2
a)	Microbiote intestinal.....	2
b)	Les barrières épithéliales	4
c)	Le système immunitaire muqueux.....	10
2.	Aspects épidémiologiques, physiopathologiques, cliniques, diagnostics et de suivis des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)	14
a)	Définition.....	14
b)	Données épidémiologiques	15
c)	Les facteurs de prédispositions des MICI	17
d)	Mécanismes physiopathologiques.....	20
e)	Le tableau clinique observé au cours des MICI.....	23
f)	La stratégie diagnostic.....	24
g)	Principales stratégies thérapeutiques	27
h)	Evolution et suivi de l'activité des MICI	29
3.	Place des cytokines de l'immunité muqueuse (IL-22) et (IL-17) dans le maintien de l'homéostasie intestinale	33
a)	L'interleukine 22	33
b)	L'interleukine 17A	37
4.	L'interleukine 22 binding protein (IL-22BP)	39
a)	Caractérisation de l'IL-22BP	39
b)	Les sources de production de l'IL-22BP	39
c)	L'IL-22BP, un puissant régulateur des actions biologiques de l'IL-22.....	40
II.	Hypothèse.....	42
III.	Objectifs de l'étude	42

IV. Matériels et méthodes	43
1. Patients.....	43
2. RT-PCR quantitative en temps réel	44
a) Transcription inverse	44
b) PCR quantitative en temps réel (qPCR)	44
3. Stimulation cytokinique <i>ex vivo</i> de biopsies fraîches prélevées chez des patients atteints de MC.....	46
a) Protocole de stimulation des biopsies fraîches	46
b) Broyage des biopsies.....	48
c) Extraction de l'ARN.....	48
4. Marquage en immunohistochimie de l'IL-22BP sur des coupes de colons de patients souffrant de MICI	49
5. Mise au point d'une technique de dosage de l'IL-22BP : ELISA hIL-22BP.....	49
6. Analyses statistiques	50
V. Résultats.....	51
1. Augmentation de l'expression des cytokines pro inflammatoires au niveau de la muqueuse lésionnelle des patients atteints de MC et RCH.....	51
2. Etude de la régulation de l'expression des gènes cibles de l'IL-22 et IL-17	52
3. Analyse différentielle entre MC et RCH de la régulation de l'expression des gènes de réponse de l'IL-22 et IL-17.....	54
4. Stimulation <i>ex vivo</i> de biopsies fraîches de patients souffrant de MC.....	56
5. Evaluation de l'expression d'IL-22BP au cours des MICI.....	63
VI. Discussion	66
VII. Perspectives.....	71
VIII. Références bibliographiques.....	73

Tables des Figures

Figure 1 : Impacts des étapes de la vie et de facteurs exogènes sur le microbiote intestinal ..	3
Figure 2 : Types cellulaires composant l'épithélium d'une villosité intestinale.	5
Figure 3 : La barrière épithéliale intestinale	10
Figure 4 : Organisation du système immunitaire muqueux	11
Figure 5 : Immunité des muqueuses.....	13
Figure 6 : Evolution de l'incidence et de la prévalence mondiales des MICI.....	16
Figure 7 : Principaux facteurs de prédispositions des MICI	17
Figure 8 : Mécanisme physiopathologique proposé au cours des MICI	22
Figure 9 : Principaux aspects endoscopiques décrits au cours des MICI	25
Figure 10 : Principaux aspects histologiques décrits au cours des MICI.....	25
Figure 11 : Sources cellulaires et actions protectrices de l'IL-22 sur l'épithélium intestinal ..	36
Figure 12 : Actions synergiques et protectrices de l'IL-22 et de l'IL-17 sur la muqueuse intestinale.....	38
Figure 13 : L'IL-22BP produit par les PNE au niveau de la muqueuse intestinale humaine pourrait bloquer les actions protectrices de l'IL-22.	41
Figure 14 : Schéma synthétique de la procédure mise en œuvre pour la stimulation ex vivo des biopsies coliques fraîches prélevées chez des patients atteints de MC	46
Figure 15 : Dispositifs utilisés au cours des protocoles de stimulations.....	48
Figure 16 : Fold Change (FC) des gènes de l'IL-22, IL-17 et TNF au cours des MICI.....	51
Figure 17 : Fold Change (FC) des gènes cibles de l'IL-22 et IL-17 dans la cohorte de patients souffrant de MICI	53
Figure 18 : Analyse comparative entre MC et RCH.....	55
Figure 19 : Fold Change (FC) des différents gènes de réponse de l'IL-22 et IL-17 après stimulation cytokinique.....	57
Figure 20 : Analyse comparative des Fold Change (FC) des gènes de réponse de l'IL-22 et IL-17 en fonction du cocktail cytokinique choisi	60
Figure 21 : Comparaison des FC des gènes de réponse en fonction de l'ajout d'IL-22BP dans les conditions de stimulation	62
Figure 22 : Etude de la régulation de l'expression de l'IL-22BP au cours des MICI.....	64
Figure 23 : Courbe étalon du standard hIL-22BP dosé par méthode ELISA.....	65

Table des Tableaux

Tableau I : Résumé des principales caractéristiques cliniques des patients inclus dans notre étude.	44
Tableau II : Liste des différentes sondes TaqMan utilisées lors des qPCR	45
Tableau III : Principales caractéristiques des cytokines utilisées lors des stimulations <i>ex vivo</i> des biopsies coliques fraîches	47
Tableau IV : Caractéristiques des anticorps utilisés pour la réalisation de l'ELISA IL-22BP	49

Liste des Abréviations

ADNc: ADN complémentaire

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm: ARN messenger

Anti-TNF: anticorps anti-TNF

α -défensine: Alpha-défensine

β -défensine : Béta-défensine

BD2 : Béta-défensine 2

BD3 : Béta-défensine 3

CCR : C-C Chemokine Receptor

CD : Cluster Differentiation

CLA : Cutaneous Ligand Antigen

CLDN4 : Claudine 4

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

Ct : Cycle Seuil

CXCL : Chemokine (C-X-C motif) Ligand

DC : Dendritic cell

DSS : Dextran Sulfate Sodium

FUT2 : Galactoside 2 α L Fucosyl-Transferase 2

ELISA : Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay

EPCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule

FC : Fold Change

HD5 : α -défensine 5

HD6 : α -défensine 6

HPRT : Hypoxanthine PhosphoRibosylTransférase 1

IgA : Immunoglobuline de type A

IFN : Interféron

IL : Interleukine

IL-10 : Interleukine 10

IL-17A : Interleukine 17

IL-18 : Interleukine 18

IL-22 : Interleukine 22

IL-22BP : Interleukine 22 *binding protein*

ILC : Innate Lymphoid Cell ; cellule lymphoïde innée

JAK : Janus Activated Kinase

kDa : kilo Dalton

KO : Knockout

GVHD : Graft Versus Host Disease ; réaction du greffon contre l'hôte

LCN2 : Lipocaline 2

LyT : Lymphocytes

LyT CD4⁺ : Lymphocytes T CD4⁺

LTi : Lymphoid Tissue inducer

MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

MUC1 : Mucine 1

MUC2 : Mucine 2

MC : Maladie de Crohn

NOD2 : Nucleotide binding Oligomerization Domain 2

PAM : Peptide Antimicrobien

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PNN : Polynucléaires Neutrophiles

PNE : Polynucléaires Eosinophiles

qPCR : Polymérase Chain Reaction ; PCR en temps réel quantitative

ROR γ t : Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor γ t

RCH : Rectocolite Hémorragique

REG3G: Regenerating islet derived protein 3 gamma

TGF β : Transforming Growth Factor β

TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor ; facteur de nécrose tumorale

Treg: Lymphocyte T régulateur

u.a : unités arbitraires

I. Introduction

« Replanter un intestin malade avec des bactéries pour le guérir » telle est l'idée imagée et imaginée en 1989 par Justin Bennet et Mark Brinkman deux chercheurs implantés dans le Missouri pour guérir les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI).

Depuis une révolution de la prise en charge thérapeutique de patients souffrant de MICI a eu lieu. Ainsi, les biothérapies en particulier les anti-TNF, ont profondément modifié la prise en charge des patients atteints de maladie de Crohn et leur efficacité explique qu'elles sont de plus en plus utilisées. Pour autant, les variations inter-individuelles ou encore l'apparition de résistance à ces traitements nécessitent un effort constant de recherche vers le développement de nouveaux produits.

Récemment, il a été démontré que l'interleukine (IL-22), une cytokine naturellement présente dans le tube digestif, joue un rôle physiologique protecteur au cours de l'inflammation. Ce rôle protecteur est cependant altéré par une production anormale de son inhibiteur soluble naturel, l'*IL-22 binding protein* (IL-22BP) chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, et plus particulièrement ceux souffrant de maladie de Crohn.

Ainsi, après un point sur l'immunité des muqueuses ainsi que sur les connaissances actuelles concernant les MICI, nous évoquerons l'IL-22 ainsi que son inhibiteur soluble l'IL-22BP.

L'objectif principal de ce projet est donc de démontrer que le blocage de l'IL-22BP pourrait restaurer les effets protecteurs de l'IL-22 naturellement présente chez les patients atteints de maladie de Crohn.

1. *Immunité de la muqueuse intestinale*

a) Microbiote intestinal

L'épithélium intestinal humain est colonisé par un trillion de bactéries avec lesquelles il a établi une relation particulière basée sur un échange réciproque d'actions bénéfiques pour l'un ou l'autre des partenaires. Les germes composant ce microbiote intestinal humain sont répartis en des centaines d'espèces différentes dont un petit noyau d'espèces conservées. Il s'agit d'une communauté « résidente » dominante, dite commensale et autochtone, puisque dotée d'une grande stabilité et d'une activité métabolique aussi importante que celle du foie.

Les nouveaux outils développés avec notamment les approches métagénomiques ont permis d'explorer la fraction non cultivable de ces germes représentant au moins 70% du microbiote intestinal. L'étude réalisée en 2010 à partir de l'ADN bactérien extrait des selles de 124 Européens, a permis l'identification de 3,3 millions de gènes bactériens au sein du microbiote intestinal ce qui équivaut à cent cinquante fois le génome humain (Qin et al., 2010). Chaque microbiote intestinal humain est défini par noyau métagénomique puisque 50% des gènes d'un individu sont partagés par au moins 50% des individus de la cohorte. Cependant il existe quelques individualités puisque des gènes rares sont partagés par moins de 20% des individus de la cohorte. En 2014, à partir d'une cohorte d'échantillon plus large, (1267 échantillons provenant de trois continents différents) le catalogue bactérien a été approfondi et équivaut actuellement à 400 fois le génome humain soit une moyenne de 10 millions de gènes (Li et al., 2014a).

Le microbiote intestinal est dominé par deux phyla bactériens principaux, les Firmicutes et les Bacteroidetes, qui constituent près de 90 % de la population totale. Le phylum des Firmicutes est majoritairement composé de bactéries appartenant à la classe *Clostridia* comme par exemple les *Ruminococcus* spp. Le phylum des Bacteroidetes est, quant à lui, représenté par plusieurs genres de *Bacteroides*. Enfin le phylum des Actinobacteria comprend les Bifidobactéries (Qin et al., 2010). Dans son étude publiée en 2011, Arumugam a démontré qu'au sein d'une population composée d'Européens, Américains et Asiatiques, les individus se répartissent en trois « entérotypes » dominants chacun caractérisé par un agencement d'espèces dominées par les genres *Bactéroïdes*, *Ruminococcus* et *Prevotella* (Arumugam et al., 2011).

Introduction

La flore commensale est établie approximativement vers l'âge de 2-3 ans et reste stable tout au long de la vie adulte pour évoluer ensuite avec le vieillissement. Cependant la composition du microbiote intestinal peut être plus ou moins impacté par le mode de naissance, l'allaitement maternel, les traitements antibiotiques ou les régimes alimentaires (Ottman et al., 2012) (**Figure 1**)

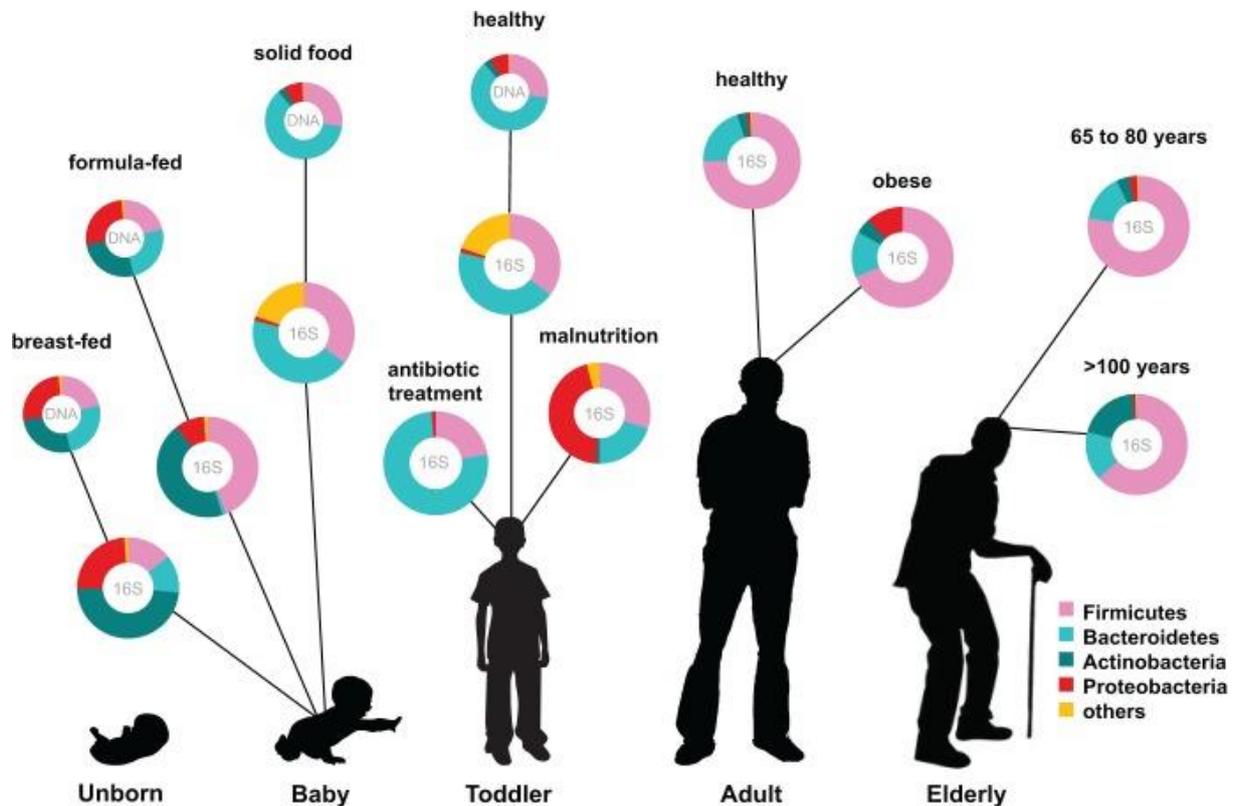


Figure 1 : Impacts des étapes de la vie et de facteurs exogènes sur la composition du microbiote intestinal (Ottman et al., 2012)

La muqueuse intestinale fournit un environnement riche en nutriments indispensables à la survie du microbiote qui en retour exerce des fonctions importantes à la physiologie humaine définissant ainsi un équilibre symbiotique. Parmi ces fonctions, les bactéries de la flore commensale jouent un rôle important dans la maturation (mise en place des organes lymphoïdes tertiaires : follicules lymphoïdes) et l'éducation du système immunitaire (induction de réponses régulatrices face à des stimulations par les antigènes alimentaires) (Belkaid and Hand, 2014). Dans son étude, Macpherson démontre que les plaques de Peyer issues de souris axéniques sont appauvries en lymphocytes T CD4⁺ et en plasmocytes sécréteurs d'IgA (Macpherson et al., 2001). Le microbiote exerce aussi des fonctions métaboliques essentielles notamment en synthétisant des acides biliaires, des vitamines ou

Introduction

des acides gras à chaîne carbonée courte dotés de propriétés immunorégulatrices. Ces germes commensaux représentent des acteurs clés de la digestion notamment de par leur implication dans le métabolisme des fibres ou des xénobiotiques (Qin et al., 2010). Enfin le microbiote intestinal est doté d'un pouvoir de barrière limitant ainsi l'invasion de la muqueuse intestinale par des germes pathogènes. En effet, les germes commensaux contribuent à la fortification de la barrière intestinale par divers mécanismes : stimulation de la production de peptides antimicrobiens (PAMs) ou promotion de la régénération des cellules épithéliales afin de constituer une barrière étanche. De plus ces bactéries empêchent la croissance et l'adhérence des germes pathogènes en limitant le niveau d'oxygène disponible ou en diminuant l'expression de leurs facteurs de virulence. Enfin les bactéries de la flore commensale sont en compétition directe avec les bactéries pathogènes vis à vis des sources d'énergie (nutriments présents au niveau de l'épithélium intestinal) (Belkaid and Hand, 2014). Ainsi, l'ensemble des germes composant le microbiote intestinal occupe une place privilégiée au sein de l'organisme humain au vu de leur nombreuses fonctions essentielles. Les récents travaux ont permis de mettre en évidence qu'un appauvrissement de la flore commensale était impliqué dans différents mécanismes aboutissant au déclenchement de maladies inflammatoires chroniques comme la maladie de Crohn, la Rectocolite Hémorragique ou encore l'obésité et le diabète (Levy et al., 2017).

Pour permettre l'équilibre de cette symbiose hôte/microbiote et ainsi empêcher une activation spontanée du système immunitaire pouvant conduire à une inflammation chronique non contrôlée, il est important de limiter les contacts entre les germes commensaux et la muqueuse intestinale (Bessman and Sonnenberg, 2016). Cette ségrégation est assurée par les actions combinées de l'épithélium intestinal et du système immunitaire muqueux.

b) Les barrières épithéliales

Plusieurs types cellulaires, composant l'épithélium intestinal, assurent diverses fonctions et contribuent au renouvellement de ce dernier.

i. Les cellules épithéliales intestinales

Les cellules spécialisées intestinales sont retrouvées pour la plupart au niveau des villosités de l'intestin. Ainsi nous pouvons distinguer quatre types cellulaires principaux :

Introduction

- Les cellules caliciformes ou les cellules de goblet assurent la production de mucus jouant un rôle majeur dans la protection de la muqueuse intestinale.
- Les cellules entéroendocrines sont spécialisées dans la sécrétion d'hormones.
- Les entérocytes exercent un rôle d'échange (absorption de petites molécules, d'ions et d'eau).
- Les cellules de Paneth localisées au niveau des cryptes, sont impliquées dans la défense vis-à-vis des pathogènes présents dans la lumière intestinale via la production de peptides antimicrobiens (PAMs).

Au niveau des cryptes sont localisées les cellules souches intestinales assurant le renouvellement de l'épithélium intestinal.

La **Figure 2** décrit les différents types cellulaires composant la muqueuse intestinale.

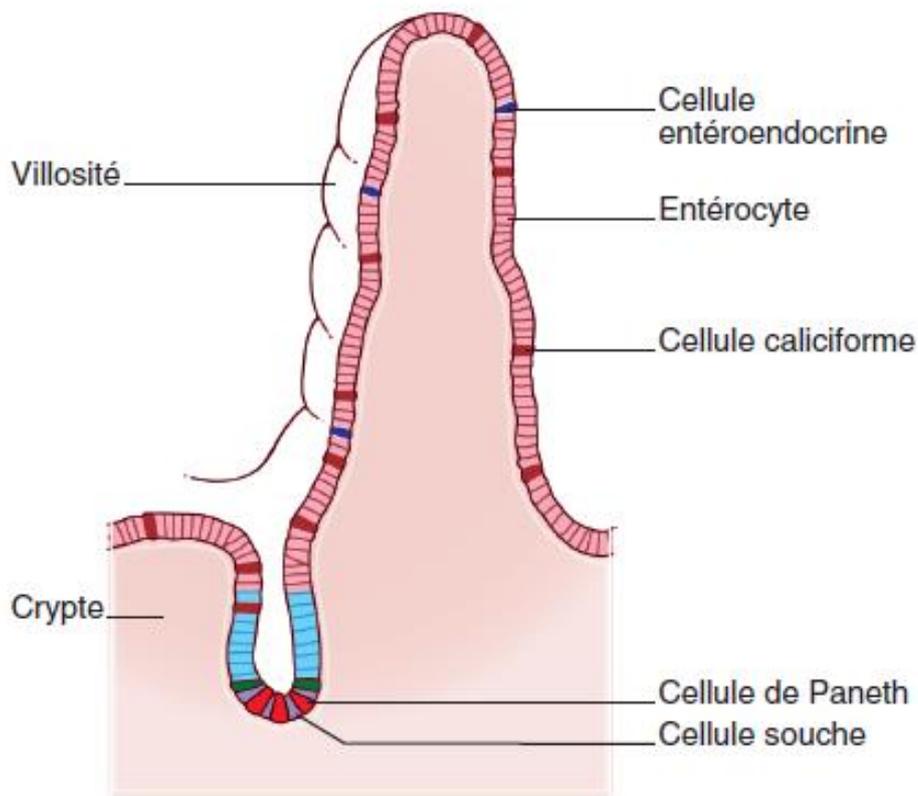


Figure 2 : Types cellulaires composant l'épithélium d'une villosité intestinale. (Les fondamentaux de la pathologie digestive Elsevier 2014)

L'épithélium muqueux digestif représente ainsi une barrière protégeant de l'invasion des tissus sous-jacents par les micro-organismes pathogènes ainsi que les germes commensaux.

ii. La barrière mécanique

Les jonctions serrées, établies entre les cellules épithéliales, assurent une barrière mécanique. Ces dernières sont composées au pôle apical de protéines comme les claudines ou les occludines et au pôle basal de jonctions adhérentes (cadhérines) et de desmosomes. Ces derniers jouent un rôle dans la modulation de l'ouverture des jonctions.

Cette barrière est renforcée par les actions d'enzymes, du pH, des PAMs et du mucus constituant ainsi un arsenal chimique protégeant de l'invasion microbienne.

iii. La barrière chimique

Les défensines, peptides cationiques de poids moléculaire compris entre 3 et 5 kilo dalton (kDa) sont des peptides antimicrobiens (PAMs) sécrétés dans la lumière intestinale en réponse à divers stimulus (Hazlett and Wu, 2011). Leur structure se compose de deux feuilletés bêta reliés entre eux par des ponts disulfures. Une modification post-traductionnelle, assurée à la fois par l'appareil de Golgi et ensuite par les trypsines humaines, est nécessaire pour la maturation de la forme pré-pro-défensine en une défensine fonctionnelle. Une fois active, de par leur caractère amphiphile, les défensines reconnaissent la membrane chargée négativement des micro-organismes, s'y insèrent en établissant des lésions électrostatiques. Leur présence aboutit à la formation de pores, à une hyperperméabilité en raison d'une rupture des membranes et enfin à la mort du pathogène (Hancock et al., 2016). Les défensines sont classées en deux catégories en fonction du réarrangement entre les cystéines, définissant ainsi les alpha-défensines (α -défensines,) et les bêta-défensines (β -défensines).

- ✓ L' α -défensine 5 (HD5) codée par le gène *DEFA5* et l' α -défensine 6 (HD6) codée par le gène *DEFA6* sont deux α -défensines produites puis stockées dans les granulations des cellules de Paneth. Un signal constitutif ou inductible aboutit à une dégranulation des vésicules puis à la sécrétion d' α -défensines dans la lumière intestinale. La sécrétion inductible peut être régulée soit par le facteur de transcription TCF4, soit par la voie de signalisation NF-kB activée en réponse à la reconnaissance par le récepteur cytosolique NOD2 de son ligand bactérien (Gallo and Hooper, 2012). De par son activité bactéricide contre les bacilles Gram négatif (BGN) et le *Staphylococcus aureus*, HD5 limite la colonisation bactérienne intestinale et contribue ainsi au contrôle de l'environnement du microbiote intestinale (Salzman et al., 2003). De plus cette défensine possède aussi un pouvoir antiparasitaire contre les micro-sporidies de *Toxoplasma gondii* et antivirale en limitant les infections par le virus de

Introduction

l'immunodéficience humaine ou les virus *Herpès simplex*. L'activité antimicrobienne d'HD6 est plus modeste.

- ✓ Trente-huit β -défensines sont actuellement décrites chez l'homme. Leurs productions sont assurées majoritairement par les cellules épithéliales de la peau, du tractus digestif, respiratoire et uro-génital mais aussi les macrophages, les monocytes ainsi que les cellules dendritiques (Hazlett and Wu, 2011). La β -défensine 1 (BD1) est produite constitutivement au niveau du colon. Tandis que les β -défensines 2 et 3 (BD2 et BD3) codées respectivement par les gènes *DEFB4A/DEF4B* et *DEFB103B/DEFB103A*, sont sécrétées dans la lumière colique et à plus faible niveau dans celle iléale en réponse à divers stimulus. Les voies de signalisation issues des cytokines pro-inflammatoires (l'IL-1 β , TNF ou l'IL-22) ou des récepteurs de l'immunité innée (Toll-like receptors TLRs / le récepteur cytosolique NOD2 pour nucleotide binding oligomerization domain 2) représentent les principaux signaux de stimulation de l'expression de ces PAMs (Kolls et al., 2008 ; Gallo and Hooper, 2012). Suite à leurs libérations dans la lumière intestinale via leurs activités antibactériennes, antivirales et antiparasitaires, les β -défensines jouent un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale en limitant les translocations microbiennes (Hancock et al., 2016).

En plus de ce rôle de renforcement des barrières épithéliales, les défensines possèdent des actions pro-inflammatoires à l'origine du recrutement des macrophages, des monocytes et des mastocytes via la sécrétion de chimiokines et de cytokines. Cette activité chimiotactique des défensines est dépendante de leurs structures puisqu'elle s'affaiblit en l'absence de pont disulfure. Cet afflux de leucocytes sur le site inflammatoire permet ainsi de combattre l'infection avec d'autant plus d'efficacité.

La lipocaline 2 (LCN2), un peptide antimicrobien de 25 kDa, est aussi impliquée dans la protection de l'invasion de la muqueuse intestinale par des pathogènes et/ou les germes de la flore commensale. Son pouvoir antibactérien s'exerce via sa capacité à neutraliser les sidérophores. Il s'agit de chélateurs de fer produits et sécrétés par les micro-organismes pour leur assurer des réserves essentielles à leur développement. De cette façon, la LCN2 les prive de leur ressource en nutriment principale (Flo et al., 2004). Les polynucléaires neutrophiles (PNN), les macrophages ou encore les cellules épithéliales de la peau ou intestinales

Introduction

constituent ces sources principales de production. La LCN2 est ensuite stockée dans les granulations des PNN avant d'être libérée dans la lumière intestinale en réponse aux signaux en partie dirigés par les cytokines de l'immunité muqueuse : l'IL-22 et l'IL-17 (Kolls et al., 2008a).

Dans leurs travaux, Moschen et ses collaborateurs soulignent son rôle primordial dans la protection de la muqueuse intestinale contre les processus inflammatoires. En effet les absences combinées de son activité bactériostatique et de celle immunorégulatrice de l'IL-10 laissent l'opportunité à une colonisation par des germes tels que *Alistipes spp*, provoquant une inflammation intestinale qui, si elle n'est pas contrôlée, peut conduire à un développement tumoral (Moschen et al., 2016).

Un autre PAM appartenant à la famille REG (Regenerative Islet Derived Proteins) joue un rôle prépondérant dans la protection de la barrière épithéliale. Il s'agit de REG3 gamma (REG3G), une lectine de type C, de poids moléculaire égal à 15kDa et codé par le gène *REG3G*. Ce peptide est synthétisé sous la forme d'un pro-peptide nécessitant l'action de trypsine pour scinder le domaine N-terminal et permettre ainsi sa maturation. Grâce à son domaine carbohydate, REG3G reconnaît le peptidoglycane des bacilles Gram positif (BGP) limite ainsi l'implantation et la colonisation par certains germes tels que *Listeria monocytogenes* et *Enterococcus faecalis* (Vaishnava et al., 2011). Au cours des premiers mois de vie, l'expression de REG3G est induite au niveau de l'intestin grêle pour façonner la composition de la flore intestinale. Ce peptide est produit constitutivement par les cellules de Paneth, tandis que sa production colique est induite au cours d'infections ou lors de processus inflammatoires. Ainsi les signaux issus des récepteurs de l'immunité innée (TLR4 et TLR5) contribuent, via des voies de signalisation dépendantes de la voie Myd88 ou celle de l'IL-22, à sa sécrétion dans la lumière colique (Gallo and Hooper, 2012).

Les cellules de goblet synthétisent des protéines glycolysées, les mucines (MUC) entrant dans la composition du mucus. Ce gel visqueux, renouvelé toutes les 6/12 heures tapisse l'épithélium intestinal d'une couche épaisse contribuant ainsi au maintien d'une barrière étanche au pôle apical (Johansson and Hansson, 2016). La composition, la densité et l'épaisseur du mucus, fluctuantes le long de l'intestin, sont en corrélation directe avec l'invasion microbienne. Ainsi la couche de mucus est plus épaisse au niveau du colon qu'au

Introduction

niveau de l'iléon. Deux catégories de mucines composent le mucus : les mucines sécrétées et celles membranaires.

- ✓ Les mucines sécrétées (MUC2, MUC5 et MUC6) forment un gel hydraté d'épaisseur comprise entre 300 et 700µm et composé de deux couches. La couche extérieure, assez mince, est colonisée par différents germes ; tandis que la couche interne proche de l'épithélium intestinal ne renferme aucun germe. De cette façon, ce gel muqueux empêche l'adhérence des pathogènes et constitue une matrice captant et concentrant les PAMs. Parmi les mucines sécrétées, la mucine 2 (MUC2), codée par le gène *MUC2*, correspond à une protéine trimérique dont les sous-unités sont reliées entre elles par des ponts disulfures. En plus de ces propriétés de barrière, MUC2 possède une activité tolérogène en induisant la production de cytokines immunorégulatrices comme IL-10 et le TGFβ (Transforming Growth Factor β) par les cellules dendritiques(DCs).
- ✓ Les mucines membranaires telles que MUC1, MUC3A/B, MUC12, MUC13 et MUC17 composent le glycocalix : une dense macromolécule d'épaisseur comprise entre 30 et 500nm à la surface de la muqueuse intestinale. Le gène *MUC1* code pour la mucine 1 (MUC1), un hétérodimère formé d'une chaîne alpha permettant l'adhésion au pôle apical et d'une chaîne bêta impliquée dans la signalisation intracellulaire. Sa surexpression, sa localisation aberrante ou la modification de sa glycosylation sont associées aux carcinomes.

Leurs expressions sont sous la régulation de cytokines telles que l'IL-4, IL-13, IL-9 mais aussi des signaux issus de l'activation des récepteurs de l'immunité innée présents à la surface des DCs (TLR). De plus, ces cytokines en modulant l'expression de la glycosyltransférase, contrôlent aussi le niveau de glycosylation des mucines. Ce taux est non négligeable puisque constituant une source d'énergie pour les germes commensaux, il est directement corrélé aux propriétés de barrière. La libération des mucines dans la lumière intestinale est sous le contrôle du récepteur NLRP6 appartenant à la famille du récepteur cytosolique NOD.

La **Figure 3** illustre la barrière constituée par les actions combinées des PAMs et du mucus pour limiter l'implantation et la colonisation de la muqueuse intestinale par les pathogènes et/ou les germes de la flore commensale.

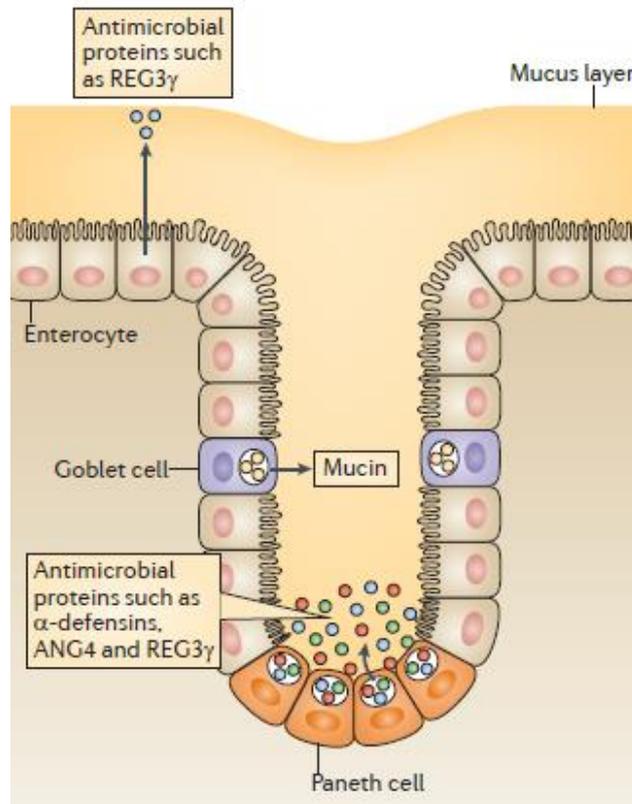


Figure 3 : La barrière épithéliale intestinale (Gallo and Hooper, 2012)

iv. La barrière microbienne

Cette fonction majeure dépendante des germes commensaux a été détaillée précédemment.

c) Le système immunitaire muqueux

Le système immunitaire muqueux est défini par l'ensemble des structures lymphoïdes associées aux surfaces muqueuses. Ce dernier a acquis une tolérance aux germes de la flore commensale tout en les empêchant d'envahir la muqueuse. De plus il doit maintenir une capacité à monter une réponse efficace à l'encontre de micro-organismes pathogènes. A cette fin, le système immunitaire muqueux est organisé en site muqueux inducteurs et effecteurs.

i. Organisation du système immunitaire muqueux

Les sites muqueux inducteurs correspondent à des structures lymphoïdes organisées, au niveau desquelles sont initiées les réponses immunitaires adaptatives. Parmi les sites muqueux inducteurs, nous pouvons distinguer les tissus lymphoïdes associées aux muqueuses (MALT) et les ganglions lymphatiques drainant la muqueuse tels que les ganglions mésentériques. Les MALT décrivent une organisation similaire aux ganglions lymphatiques avec des follicules B et des zones T contenant des DCs et des macrophages. Cependant ces

Introduction

derniers possèdent la particularité de ne pas présenter de voies lymphatiques afférentes : les antigènes pénètrent dans les structures du MALT via l'épithélium associé au follicule (FAE pour Follicle Associated Epithelium). Les follicules lymphoïdes isolés ou les plaques de Peyer (lorsque ces follicules sont supérieurs à 5) constituent des MALT.

Les sites muqueux effecteurs correspondent aux zones au niveau desquelles se déroulent les mécanismes effecteurs des réponses immunitaires muqueuses, c'est à dire l'épithélium et la *lamina propria*. Au sein de ces sites sont retrouvés majoritairement les lymphocytes intra-épithéliaux ainsi qu'un grand nombre de leucocytes. La **Figure 4** synthétise l'organisation du système immunitaire muqueux.

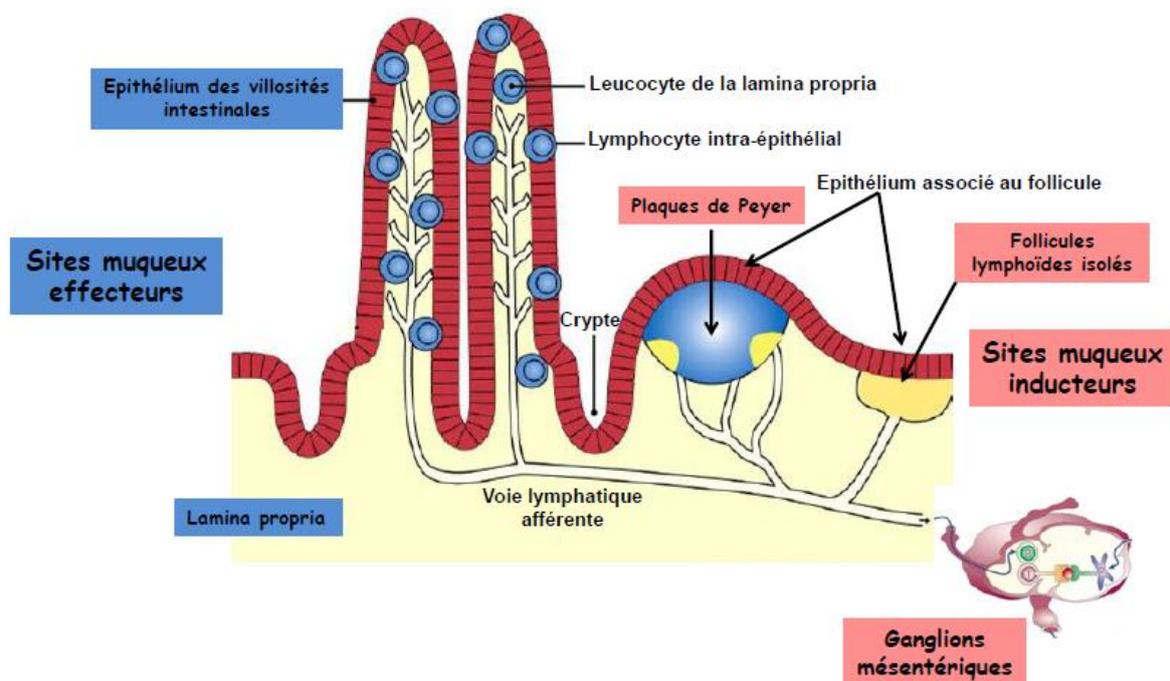


Figure 4 : Organisation du système immunitaire muqueux (Cellular and Molecular Immunology, Abbas)

ii. La réponse du système immunitaire muqueux

L'épithélium associé au follicule (FAE) assure le passage d'antigènes dans le MALT où ils sont pris en charge par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Des cellules M, retrouvées à ce niveau de la muqueuse, sont spécialisées dans le transport actif d'antigènes vers le follicule sous-jacent. Les antigènes circulants peuvent aussi directement être captés par les dendrites des DCs résidentes de la *lamina propria* (DC CD103⁺ CD11b⁺). Cette capture par les DCs provoque leur activation puis leur migration vers le ganglion mésentérique drainant où sont initiées les réponses immunitaires adaptatives intestinales. Ces DCs résidentes possèdent la

Introduction

caractéristique d'exprimer une déshydrogénase (RALDH) fortement impliquée dans le métabolisme de la vitamine A en acide rétinoïque.

Cette production d'acide rétinoïque par les DCs influence et organise les réponses au sein des ganglions mésentériques en 1) Induisant l'expression de récepteurs de « homing » intestinal ($\alpha 4\beta 7$, CCR9) à la surface des lymphocytes activés, 2) Orientant la commutation isotypique vers les immunoglobulines de type A (IgA) et 3) Favorisant la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ (LyTCD4⁺) naïfs en T régulateurs (Treg) (Coombes and Powrie, 2008).

Après activation au niveau des ganglions mésentériques, les lymphocytes effecteurs retournent grâce aux récepteurs de « homing » sur les sites effecteurs muqueux. Ainsi nous pouvons distinguer au sein des lymphocytes effecteurs (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010) :

- des lymphocytes T alpha beta intra-épithéliaux (CD8⁺) impliqués dans la reconnaissance et l'élimination de cellules épithéliales exprimant un phénotype anormal suite à une infection ou un stress.
- des lymphocytes T gamma delta intra-épithéliaux (10% des IEL). Ces lymphocytes lorsqu'ils sont stimulés par de l'acide rétinoïque sécrètent de l'IL-22.
- des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs majoritairement Th17, spécialisés dans la production d'IL-22 et d'IL-17, Th1 spécialisés dans la production de TNF et d'INF γ , ou Treg. Les Treg en régulant la balance de différenciation Th1/Th17 jouent un rôle majeur dans le maintien de la symbiose hôte/microbiote.
- des plasmocytes productrices d'IgA transportées à travers la barrière épithéliale avant d'être sécrétées dans la lumière intestinale définissant ainsi les IgA sécrétoires. Ces dernières, adsorbées dans la couche de mucus ont pour fonction majeure d'empêcher des contacts trop rapprochés entre les bactéries commensales et les cellules épithéliales. En effet, ces immunoglobulines sont capables de neutraliser des toxines et des micro-organismes retrouvés dans la lumière intestinale ou au sein de la *lamina propria*.

La **Figure 5** illustre l'équilibre finement régulé, entre les bactéries commensales et le système immunitaire muqueux, permettant d'empêcher l'implantation de pathogènes tout en limitant une réaction inflammatoire de l'organisme contre le microbiote intestinal. Par la suite, nous allons voir qu'une rupture de cet équilibre sous l'influence de plusieurs facteurs peut conduire au développement de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI).

Introduction

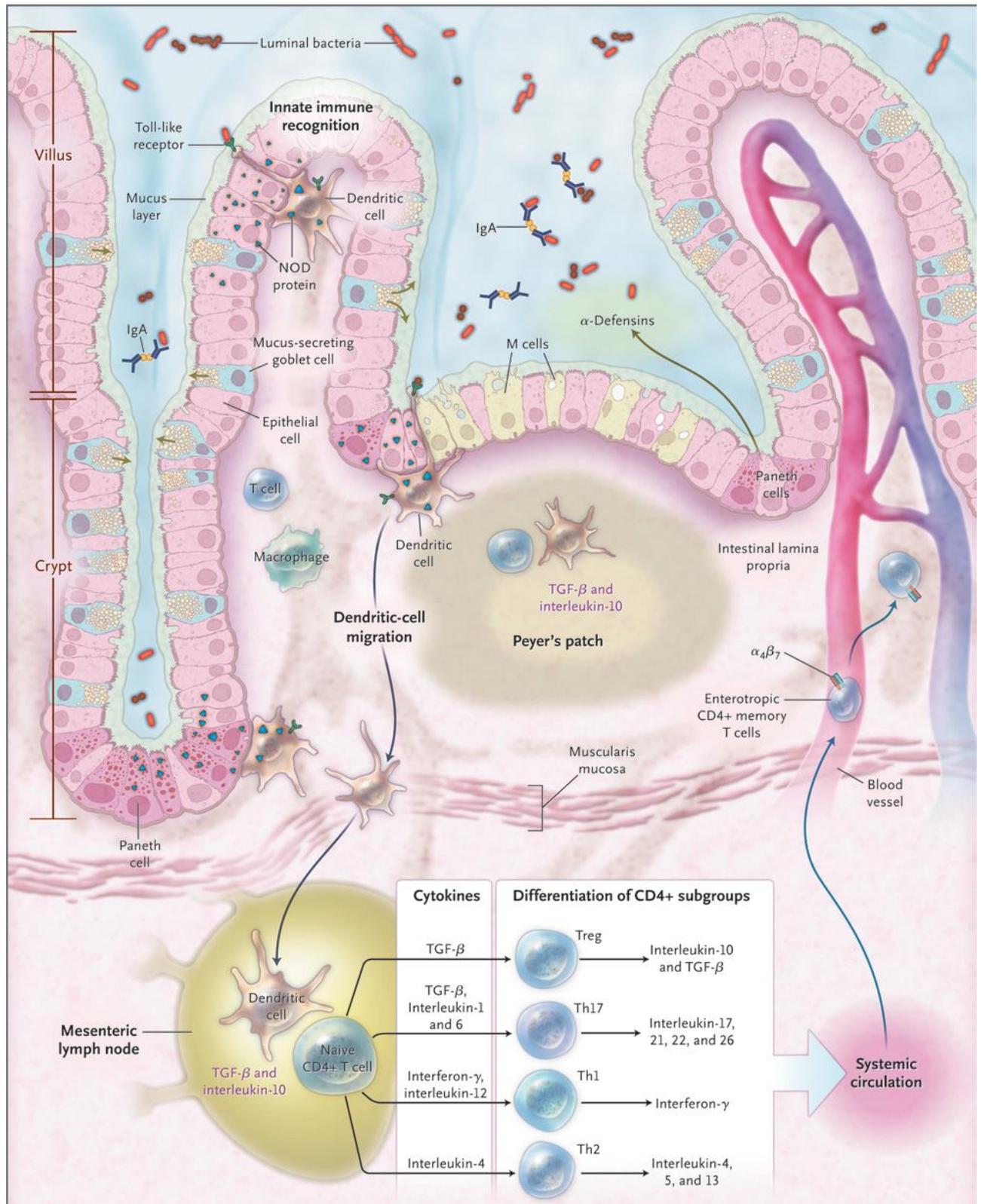


Figure 5 : Immunité des muqueuses (Abraham and Cho, 2009) La muqueuse intestinale via les actions des PAMs, du mucus et de la flore commensale constitue une barrière contre les bactéries contenues dans la lumière intestinale. Le système immunitaire muqueux s'active en réponse à la présentation d'antigène par les DCs et aboutit à la production de plasmocytes sécrétant d'IgA et à la différenciation des T naïfs en Th17 sécrétant d'IL-22 et d'IL-17, en Th1 sécrétant de TNF ou d'INF γ ou encore en Treg sécrétant d'IL-10 ou de TGF β .

2. Aspects épidémiologiques, physiopathologiques, cliniques, diagnostics et de suivis des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)

La maladie de Crohn (MC) et la Rectocolite Hémorragique (RCH) sont les deux entités principales regroupées sous le terme de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin. Ces pathologies affectent environ 1,5 millions d'Américains et 2,2 millions d'Européens. Le retentissement de ces pathologies est important puisqu'il s'agit d'affections de longue durée, altérant la qualité de vie et nécessitant le recours à des thérapeutiques lourdes.

a) Définition

La RCH est caractérisée par une inflammation chronique et évoluant par poussées, de la couche épithéliale superficielle de la muqueuse colique. Cette pathologie atteint constamment le rectum et s'étend de manière continue plus ou moins haut vers le cæcum, respectant l'intestin grêle. Selon l'étendue des lésions nous pouvons parler de rectite (atteinte unique du rectum), de recto-sigmoïdite (atteinte combinée du rectum et du colon sigmoïde), de recto-colite gauche (atteinte du rectum, du colon sigmoïde et descendant) et enfin de pancolite lorsque l'ensemble du colon est touché (Baumgart and Sandborn, 2007). Les formes rectite et recto-sigmoïdite sont décrites dans 55% des cas, la recto- colite gauche dans 25% des cas et la pancolite dans seulement 20% des cas (Neurath, 2014).

Depuis qu'elle a été décrite en 1932 par le médecin américain Burril B.Crohn à l'hôpital du Mont Sinaï, la MC se caractérise par une inflammation chronique et discontinue de l'ensemble des couches de la muqueuse intestinale pouvant toucher n'importe quel segment du tube digestif. Ainsi, dans 47% des cas la MC atteint isolément l'iléon et dans 28% des cas seulement le colon. Les formes iléo-coliques touchent 21% des malades et les formes totales sont retrouvées seulement dans 3% des cas. Il existe quelque rares cas de localisation des lésions au niveau de l'estomac et/ou du duodénum. Dans 30 à 50% des cas, des lésions anopérinéales correspondant à des lésions de la partie interne de l'anus et de la partie basse du rectum sont retrouvées (Baumgart and Sandborn, 2007). La classification de Montréal distingue trois phénotypes selon les caractéristiques initiales de la maladie : sténosant, fistulisant et inflammatoire (Silverberg et al., 2005).

La classification entre MC et RCH basée sur des critères cliniques, endoscopiques, histologiques et radiologiques, n'est souvent pas aisée. D'autres étiologies peuvent aussi être incriminées comme responsable d'iléite ou de colite. Ainsi des agents infectieux parmi

Introduction

lesquels certaines bactéries (*Campylobacter spp*, *Yersinia spp*), certains parasites (*Entamoeba histolytica*) ou en certains virus (cytomégalovirus, *Herpès simplex*) ont été décrits. Parmi les étiologies non infectieuses nous pouvons noter les causes inflammatoires (les diverticulites, la sarcoïdose), toxiques (AINS, certaines chimiothérapies), malignes (cancer colorectal ou certains lymphomes) et enfin celle vasculaires (vascularites).

b) Données épidémiologiques

L'incidence mondiale de la MC est estimée entre 0,3-12,7 cas pour 100 000 Européens et entre 0 et 20,2 cas pour 100 000 Nord-Américains (Molodecky et al., 2012). Celle de la RCH, sensiblement similaire, est comprise entre 0,6 et 24,3 pour les Européens et entre 0 et 19,2 pour les Nord-Américains. De plus, l'incidence et la prévalence de ces pathologies n'ont cessé de croître ces dernières années (**Figure 6**) essentiellement au sein des populations urbaines établies dans des pays industrialisés (Ananthakrishnan, 2015). Cependant, l'incidence ne semble pas être influencée par le sexe mais plutôt par les appartenances ethniques. Ainsi, les populations juives d'origine ashkénaze encourent un risque trois fois plus élevé de développer une pathologie chronique de l'intestin (Bernstein et al., 2006).

Ces dernières décennies ont aussi été marquées par une élévation de l'incidence au sein de zones géographiques peu touchées jusque-là. Il s'agit essentiellement du continent asiatique (Japon, Hong Kong et la Corée), le continent Africain, le Sud de l'Amérique et l'Arabie Saoudite. (Ananthakrishnan, 2015). Ces populations émergentes ne partagent pas le même patrimoine génétique que les populations caucasiennes soulignant ainsi fortement l'impact de l'environnement dans l'apparition des MICI.

Ces pathologies se déclarent le plus souvent chez l'adulte jeune : la moyenne d'âge lors de la première crise se situe entre 15 et 40 ans (Neurath, 2014).

Introduction

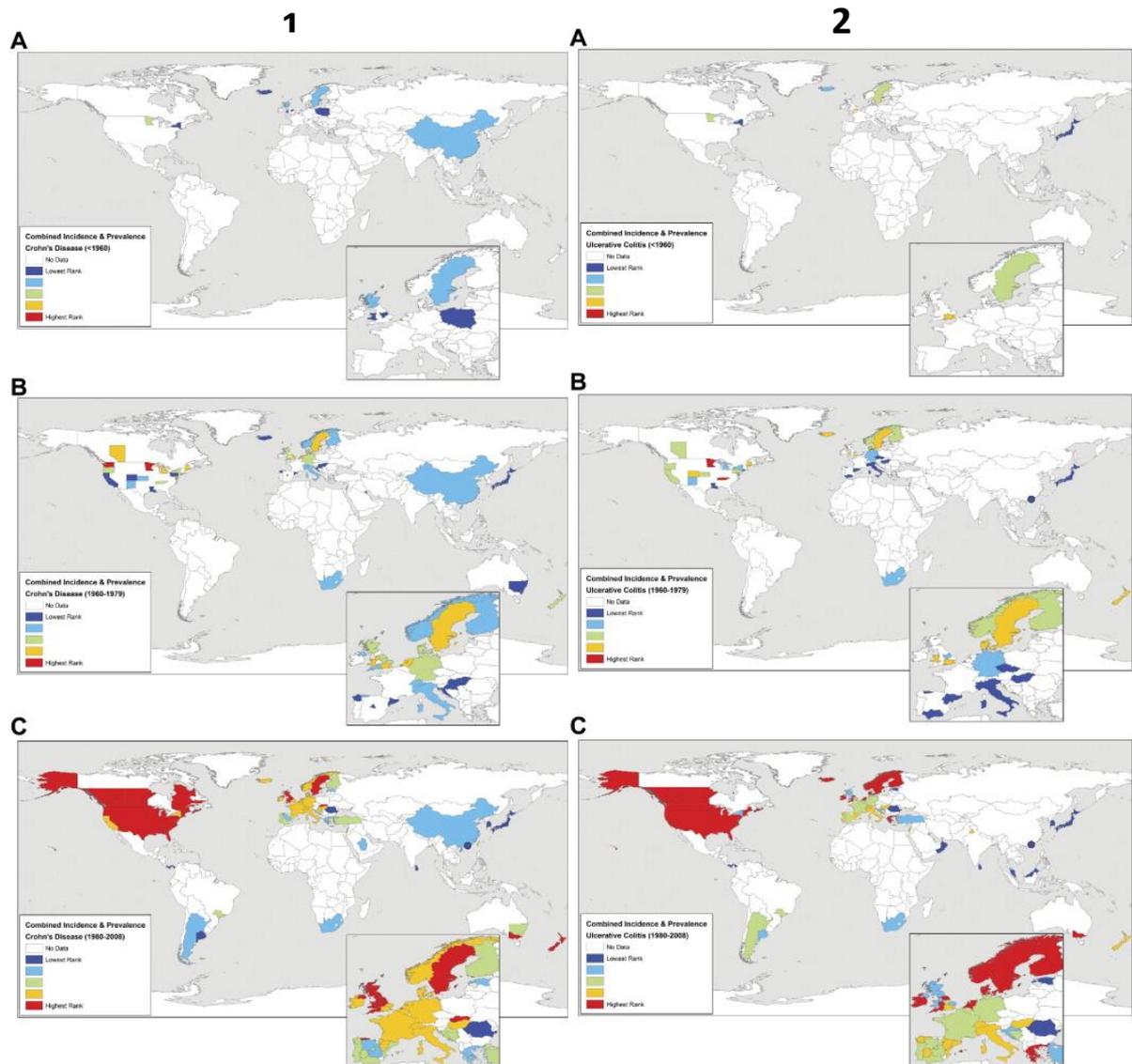


Figure 6 : Incidence et prévalence mondiale de la MC (1) et de la RCH (2) avant 1960 (A) entre 1960 et 1979 (B) et après 1980 (C) (Molodecky et al., 2012).

Les résultats d'incidence et de prévalence sont associés à une couleur correspondant à un quintile.

- La couleur bleu marine correspond à une incidence comprise entre 0 et 0,8 pour la MC et de 0 et 1,85 pour la RCH.
- La couleur bleu clair a été attribuée à des zones où l'incidence de la MC est comprise entre 0,81 et 1,94 et celle de la RCH entre 1,86 et 3,09.
- En vert à des zones où l'incidence de la MC est comprise entre 1,95 et 3,76 et celle de la RCH entre 3,10 et 4,97.
- La couleur jaune correspond à des pays où l'incidence de la MC est comprise entre 3,77 et 6,38 et celle de la RCH entre 4,98 et 7,71.
- En rouge : des zones où l'incidence de la MC est comprise entre 6,39 et 29,3 et pour la RCH entre 7,72 et 19,2.

Introduction

c) Les facteurs de prédispositions des MICI

La physiopathologie de ces maladies est complexe et multifactorielle. Les récents travaux ont permis d'identifier des facteurs génétiques, environnementaux et le microbiote intestinal comme des acteurs cruciaux agissant en synergie dans la genèse des MICI. Cependant, il est important de notifier qu'individuellement ces facteurs n'ont aucun impact sur le déclenchement des MICI mais seulement lorsqu'ils agissent en synergie entre eux.

La **Figure 7** résume les interactions entre les principaux facteurs.

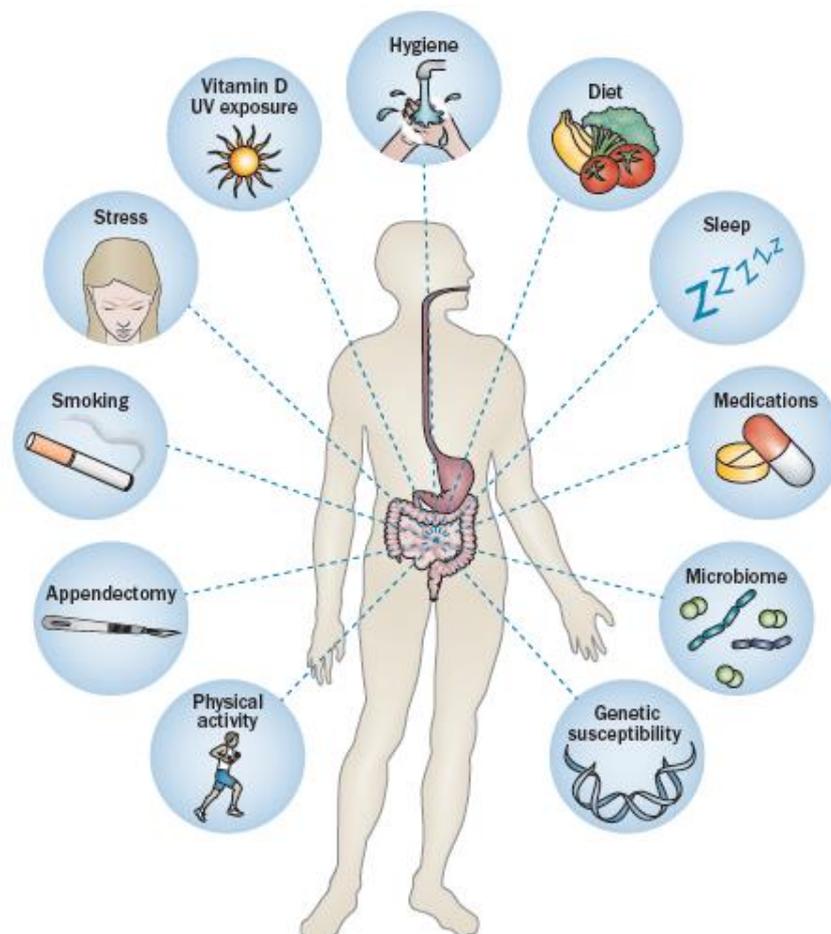


Figure 7 : Interaction entre les principaux facteurs issus trois sphères environnementales, génétiques et microbiote intestinal et impliqués dans le développement des MICI (Ananthakrishnan, 2015)

i. Epidémiologie génétique et génétique

L'impact de la génétique dans l'apparition des MICI a été mis en évidence depuis qu'il a été retracé chez 14% des patients atteints de MICI une histoire familiale de MC ou de RCH. En lien avec leur caractère héréditaire, le risque relatif de développer une MICI chez une personne liée au premier degré d'un patient atteint de MC est estimé autour de 5%. Pour ceux souffrant

Introduction

de RCH, le risque est estimé autour de 1,6% (Yang et al., 1993). Dans le cas où les deux parents sont atteints de MICI, le risque d'être atteint avant l'âge de 30 ans est considérablement augmenté puisque estimé à un tiers (Halme et al., 2006).

L'étude des gènes de susceptibilité a permis d'identifier en 2001, le gène *NOD2* situé sur le chromosome 16 et codant pour une des protéines composant le récepteur NOD2. Ce récepteur de l'immunité innée reconnaît un motif pathogène conservé (PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern) le muramyl dipeptide, un des constituant du peptidoglycane de la paroi des bactéries. Trois polymorphismes de *NOD2*, à l'origine d'une altération de la fonctionnalité du récepteur (reconnaissance et signalisation), ont été décrits et associés à une susceptibilité pour la MC (Hugot et al., 2001 ; Ogura et al., 2001). Ainsi un porteur hétérozygote d'un des trois variants du gène *NOD2* présentera un risque relatif estimé entre 1,75 et 4 de développer une MC. Chez un porteur homozygote le risque, bien plus fort, est évalué entre 11 et 27 (Economou et al., 2004).

Deux autres gènes de susceptibilité : *ATG16L1* (autophagy related 16 like) et *IRGM* (immunity related GTPase M) sont fortement associés à la MC. Ils sont impliqués dans l'autophagie, un mécanisme inné assurant l'élimination de composants intracellulaires.

D'autres polymorphismes comme celui lié au gène codant le récepteur de l'IL-23 sont décrits comme des gènes de susceptibilité prédisposant aux MICI. Récemment, une méta-analyse à grande échelle (75000 recrutements) basée sur l'analyse comparative de l'ensemble du génome de patients atteints de MC ou de RCH versus des patients contrôle, a permis l'identification de 163 loci associés aux MICI (Jostins et al., 2012).

ii. Identification des principaux facteurs de risques environnementaux

Le tabac constitue l'un des principaux facteurs de risque environnemental. En effet, une méta-analyse a conclu à une augmentation du risque par 2 de développer une MC chez les fumeurs tandis que le risque de souffrir de RCH est divisé par 2 (Mahid et al., 2006). L'étude menée par Cosnes a démontré qu'une exposition passive et ce depuis le plus jeune âge prédispose aux mêmes effets néfastes. Chez les patients fumeurs, la MC se présente sous une forme plus agressive nécessitant le recours plus rapidement à un traitement immunosuppresseur ou chirurgical. Par opposition, une exposition tabagique chez les patients souffrant de RCH s'associe à une forme plus atténuée de la maladie (Cosnes, 2004).

Le même effet divergent est observé avec le facteur de risque, l'appendicectomie. En effet, à partir d'une cohorte de 212963 patients ayant été opérés de l'appendicite avant 50 ans, il a

Introduction

été mis en évidence un effet protecteur contre l'apparition de RCH en comparaison à la MC (Andersson et al., 2001, 2003).

Parmi les autres facteurs environnementaux protecteurs nous pouvons noter l'allaitement maternel, la consommation de fibres présentes en quantité importante dans les fruits et légumes et un taux de vitamine D élevé.

A *contrario* d'autres facteurs pourraient jouer un rôle dans la genèse des MICI comme un environnement aseptisé, une exposition à certaines infections, la consommation d'antibiotiques au cours de la première année de vie ou de certains médicaments (aspirine, les anti-inflammatoires non stéroïdiens), un mode de vie soumis à une forte pression ou sédentaire.

iii. Le microbiote intestinal

La multiplication récente des travaux de caractérisation du microbiote intestinal par séquençage a permis des avancées considérables dans la compréhension des mécanismes aboutissant au déclenchement des MICI. L'analyse et la caractérisation de la flore commensale de patients souffrant de MICI ont permis de mettre en évidence une diminution de la diversité bactérienne au sein de leur muqueuse. Ainsi dans une étude publiée en 2004, Ott et al. ont comparé la composition de la flore commensale issue de muqueuse colique de patients atteints de MICI en phase active (n= 57) à celle provenant de muqueuse de témoins sains (n=46) et mis en évidence une réduction de la diversité bactérienne de 50% chez les patients atteints de MC et de 30% chez les patients souffrant de RCH (Ott et al., 2004).

Cet appauvrissement chez les patients atteints de MC pourrait être expliqué par une diminution de la proportion du phylum *Firmicutes*. En effet, l'étude métagénomique ayant analysé les selles de patients atteints de MC versus celles de témoins a dénombré concernant le phylum *Firmicutes* 43 sérotypes différents chez les sujets sains contre seulement 13 chez les patients MC (Manichanh et al., 2006). L'étude similaire réalisée par Sokol a retrouvé cette même tendance avec une diminution en proportion de l'espèce *Clostridium leptum* appartenant au groupe des *Firmicutes* (Sokol et al., 2006). L'espèce *Faecalibacterium prausnitzii* appartenant aussi au phylum des *Firmicutes* est moins présente chez les patients atteints de MC. Pourtant sa distribution est inversement corrélée au risque de récurrence endoscopique après une résection (Sokol et al., 2008). De plus, des propriétés immunomodulatrices lui sont associées puisqu'au cours d'un modèle expérimental de colite

Introduction

sa présence est associée à une augmentation de la sécrétion d'IL-10 et une diminution de la cytokine pro-inflammatoire IL-17.

Chez les patients atteints de RCH, une diminution de la diversité bactérienne a aussi été décrite, cependant l'appauvrissement en un phylum particulier est moins clair.

Le régime alimentaire joue un rôle fondamental dans la composition de la flore commensale et influence ainsi l'incidence des MICI. Ainsi une alimentation journalière soumise à des influences occidentales favorisera une diversité bactérienne vers un cluster *Bacteroides spp.* Tandis qu'un régime riche en fibres favorisera plutôt une colonisation par l'espèce *Prevotella spp.*

d) Mécanismes physiopathologiques.

Une dérégulation de l'équilibre microbiote/hôte peut conduire, chez un individu génétiquement prédisposé et sous l'influence de facteurs environnementaux, à une altération de l'étanchéité de barrière intestinale provoquant le passage des germes commensaux initialement contenus dans la lumière intestinale jusque dans la *lamina propria* (de Souza and Fiocchi, 2016a). Ces translocations bactériennes initient une activation du système immunitaire muqueux (**Figure 8**).

Ainsi, en réponse à l'activation des DCs, de nombreux lymphocytes TCD4⁺ effecteurs pro-inflammatoires infiltreront la muqueuse intestinale (Abraham and Cho, 2009). Cet afflux de cellules Th1 et Th17 provoque une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-23, IL-22, IL-17, TNF, INF γ) (Neurath, 2014) et de chimiokines responsables d'une exacerbation de l'inflammation. En effet, sous l'effet des signaux émis par les chimiokines, les PNN sont recrutés et exercent des effets néfastes sur l'épithélium intestinal. Ils induisent sa destruction via des mécanismes oxydatifs et instaurent un environnement inflammatoire via la sécrétion de médiateurs (Brazil et al., 2013). En parallèle, l'infiltration de la muqueuse par des macrophages sécréteurs d'IL-6, IL-23 et TNF contribue aussi à l'entretien de l'inflammation. De plus, les mécanismes immunorégulateurs mis en place par l'organisme pour contenir l'excès d'inflammation semblent être moins performants au cours des MICI. En effet, un excès de Smad7, une protéine bloquant les voies de signalisation du TGF β , est observé au niveau des muqueuses inflammatoires des patients atteints de MICI. Enfin, bien que l'activité des Treg semble être préservée au cours de ces pathologies, la présence en excès de Th1 et de Th17 tend à saturer leur potentiel régulateur (Neurath, 2014). Cette inflammation

Introduction

devient chronique en cas d'activation non contrôlée du système immunitaire et provoque à terme une destruction des tissus.

Cette hyperperméabilité tissulaire a permis de mettre en avant le rôle fondamental de l'épithélium intestinal dans la physiopathologie des MICI (Neurath, 2014; de Souza and Fiocchi, 2016b). D'autres anomalies propres à la MC comme le défaut d'induction de production de PAMs (hd5, BD3) (Wehkamp et al., 2003a), la diminution du nombre de cellules de Paneth productrices d'HD5 et HD6 (Wehkamp et al., 2005) ou propres à la RCH comme baisse de la production de mucines dues à la déplétion en cellules de goblet (Strugala et al., 2008) contribuent à l'affaiblissement de la barrière intestinale. Il apparaît donc fondamental de la renforcer au cours des MICI.

Introduction

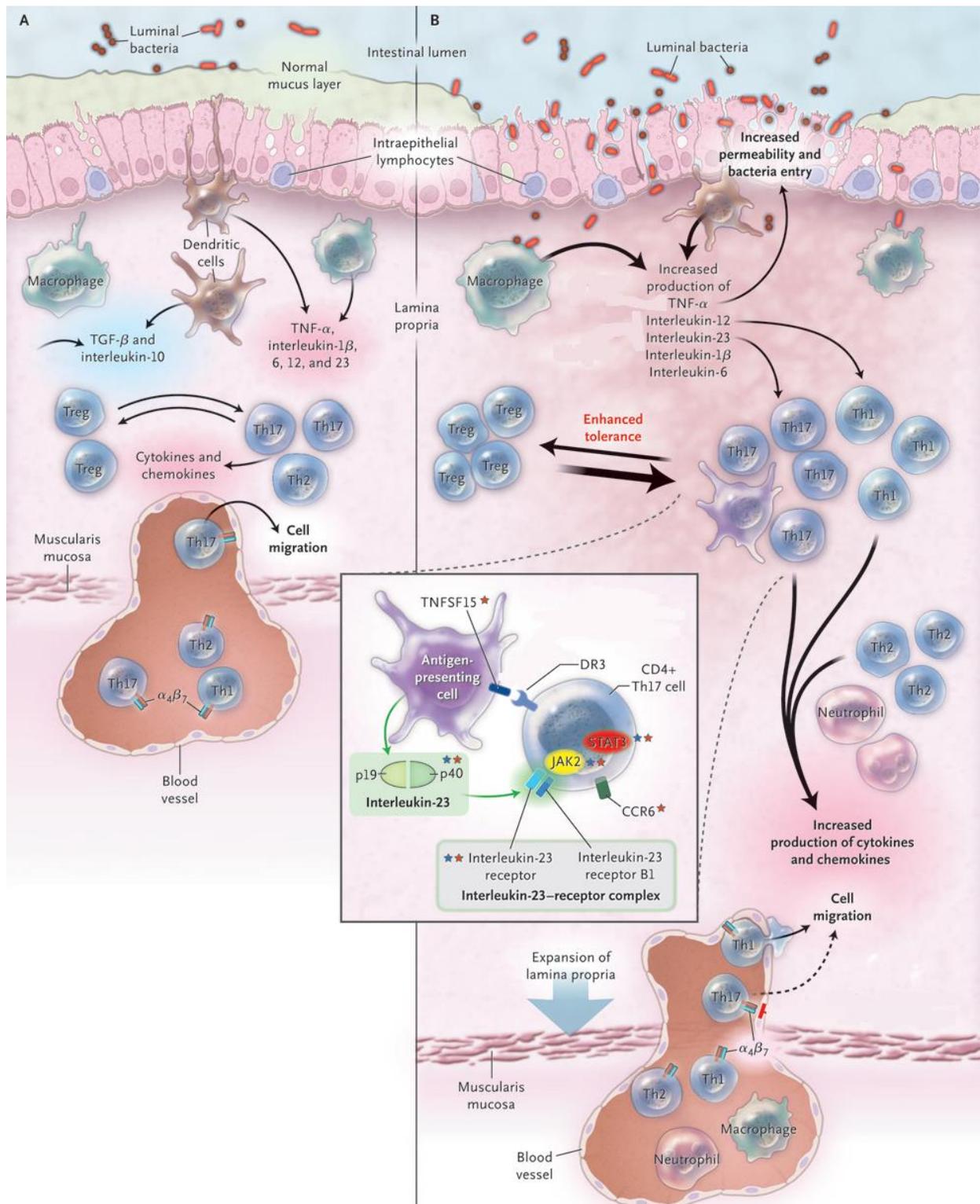


Figure 8 : Mécanisme physiopathologique proposé au cours des MICI (Abraham and Cho, 2009) **A)** Réponse immunitaire contrôlée due à un équilibre entre l'hôte et le microbiote **B)** Réponse du système immunitaire (SI) contre les germes de la flore commensale ayant pénétrés la *lamina propria* suite à une hyperperméabilité de la barrière. L'activation non contrôlée du SI provoque à terme une inflammation chronique expliquée par l'afflux massif de Th17 et de Th1 mais aussi de leucocytes en réponse aux chimiokines présentes au sein de l'environnement intestinal.

Introduction

e) Le tableau clinique observé au cours des MICI

Ces pathologies sont caractérisées par une inflammation chronique responsable des symptômes digestifs et des manifestations extra-intestinales.

L'expression clinique des poussées de MC dépend de la localisation des lésions : les formes coliques sont souvent bruyantes avec des manifestations extra-digestives fréquentes, alors que l'atteinte isolée de l'intestin grêle peut ne donner aucun symptôme pendant des années et évoluer silencieusement vers certaines complications.

i. Les manifestations digestives

Une diarrhée associée à des douleurs abdominales et une altération de l'état général (asthénie, perte de poids et anémie) signent le tableau clinique digestif des MICI. Au cours de la RCH, l'émission de selles peut en plus être accompagnée de sang, de mucus ou de pus ; la qualifiant ainsi de diarrhée glairo-sanglante (Baumgart and Sandborn, 2007).

ii. Les manifestations extra-digestives

Les manifestations périphériques correspondent le plus souvent à des atteintes articulaires, cutanées, ophtalmiques et hépatiques.

Les atteintes ostéo-articulaires, les plus fréquentes, sont soit périphériques avec des arthralgies pouvant toucher toutes les articulations, soit axiales avec la spondylarthrite ankylosante et la sacro-iliite. L'étude, publiée en 2016 par l'ECCO (European Crohn's and Colitis Organisation) a permis d'estimer la prévalence de ces atteintes ostéo-articulaires. Ainsi par ordre croissant nous retrouvons la spondylarthrite ankylosante (3%), la sacro-iliite (10%) puis les arthrites périphériques (13%) (Karreman et al., 2016).

L'érythème noueux se présentant sous la forme d'une éruption douloureuse, bilatérale, constituée de papules et de nodules, constitue la manifestation cutanée la plus fréquente. Ce dernier dont la prévalence est comprise entre 2 et 20%, atteint principalement les femmes. Des cas de *pyoderma gangrenosum*, décrits chez 2% des malades, touchent principalement les malades présentant des atteintes coliques. Il débute par une pustule qui en s'étendant peut conduire à une profonde ulcération entourée d'un bourrelet violacé. Des aphtoses buccales apparaissent simultanément aux poussées mais sont relativement aspécifiques puisque présentes chez 15% de la population générale.

Les atteintes ophtalmiques, plus rares au cours de la RCH, sont retrouvées dans 2 à 29% des cas. Les formes les plus fréquentes sont l'uvéite, l'épisclérite ou la sclérite.

Introduction

Une association est décrite entre MICI et la cholangite sclérosante primitive (CSP) de façon plus forte chez l'homme jeune souffrant de RCH.

Enfin, un patient atteint de MICI présentera un risque trois fois plus élevé de développer un événement thromboembolique (Larsen et al., 2010).

iii. Principales complications observées

Des complications sont décrites : apparition de sténoses, fistules ou d'abcès pouvant se perforer pour la MC ; d'hémorragies sévères ou de mégacôlon toxique pour la RCH. De plus ces pathologies prédisposent de façon importante au développement de cancers colorectaux et de l'intestin grêle (Bernstein et al., 2001).

f) La stratégie diagnostic

Le diagnostic initial repose sur l'association de signes cliniques, endoscopiques, radiologiques et histologiques à partir des biopsies.

i. Aspects endoscopiques

Les images endoscopiques décrivant un aspect typique de RCH correspondent à une atteinte qualifiée de granité, continue sans intervalle de muqueuse saine et saignant au contact. Les formes graves entraînent une atteinte plus en profondeur avec des ulcérations creusantes et un aspect boursouflé de la muqueuse (**Figure 9 B**). Entre les poussées, la muqueuse reprend un aspect subnormal souvent marqué par la visualisation anormale du liseré vasculaire sous-muqueux et il peut persister une fragilité avec un saignement au contact (**Figure 9A**). De plus en cas d'atteinte pancolique, l'iléon est souvent inflammatoire voire ulcéré au niveau de ses derniers centimètres définissant ainsi l'iléite de reflux.

La présence d'ulcérations est fortement évocatrice de lésions associées aux MC. Elles correspondent à des aspects aphtoïdes, linéaires ou en rails (**Figure 9D**). Au cours de la MC, les atteintes de l'intestin grêle peuvent se compliquer avec l'apparition de sténoses : association d'un épaissement de la paroi avec un rétrécissement du diamètre de l'intestin (**Figure 9C**). L'inflammation discontinue et transmurale est une caractéristique propre aux images endoscopiques décrites au cours de la MC.

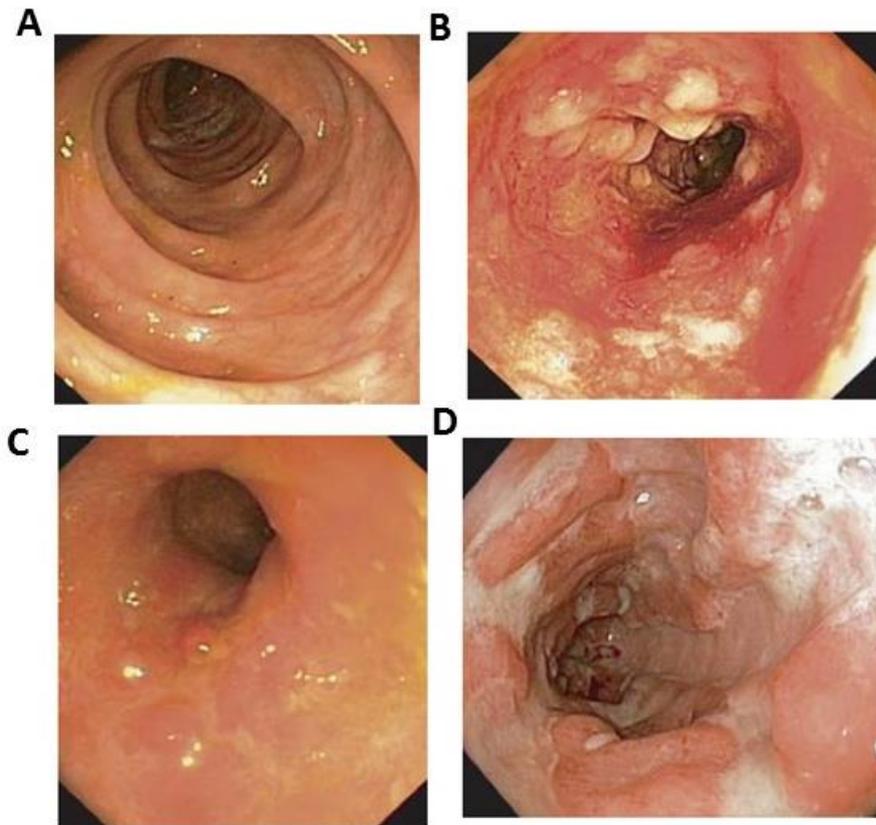


Figure 9 : Principaux aspects endoscopiques décrits au cours des MICI. A et B au cours de la RCH C et D au cours de la MC.

- A)** Aspect typique d'un colon transverse en phase de rémission.
- B)** Colon descendant inflammatoire chez un patient souffrant de pancolite.
- C)** Sténose de l'Iléon terminal d'un patient atteint de MC.
- D)** Ulcérations au niveau d'un colon sigmoïde

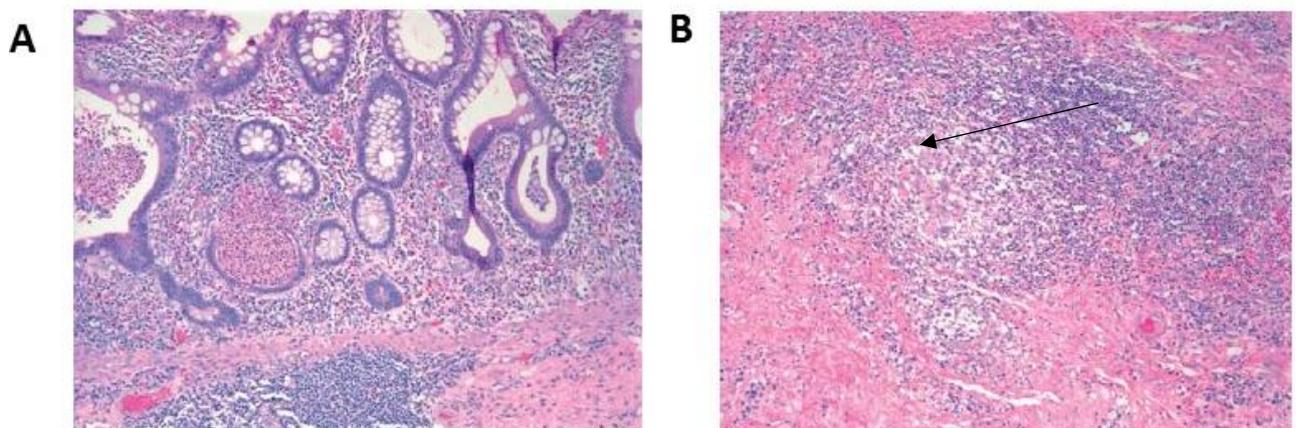


Figure 10 : Principaux aspects histologiques décrits au cours des MICI.

- A)** Lésions histologiques au cours de la RCH
- B)** Granulome épithéloïde observé au cours de la MC

ii. Aspects histologiques

L'examen histologique des biopsies prélevées chez un patient atteint de RCH met en évidence une forte déplétion en mucus, une diminution nette de la densité cryptique ainsi qu'une distorsion sévère des cryptes (**Figure 10A**).

Chez un patient atteint de MC, une infiltration lympho-plasmocytaire se présentant sous forme de nodules lymphoïdes est souvent retrouvée. La présence d'un granulome épithéloïde et giganto-cellulaire, fréquemment présent au sein de la muqueuse saine, est une caractéristique histologique de la MC. Ces granulomes, rarement mis en évidence lors de la première poussée, apparaissent dans 30 à 50% des cas au cours de l'évolution de la maladie. Les fissures « transmurales » décrite au cours de l'examen histologique, sont aussi spécifiques de la MC (**Figure 10 B**).

iii. Aspects radiologiques

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) bénéficie d'une bonne sensibilité et spécificité pour l'identification d'une MC (Horsthuis et al., 2008) alors que son intérêt pour le diagnostic de RCH est limité. Ainsi, ces systèmes d'imagerie sont complémentaires des examens endoscopiques pour identifier des zones inflammatoires.

La vidéo capsule endoscopique (VCE) est réservée aux patients présentant une suspicion élevée de MC malgré des examens endoscopiques et radiologiques négatifs. En effet, la VCE possède une excellente valeur prédictive négative pour le diagnostic de la MC de l'intestin grêle.

L'identification entre MC et RCH demeure dans certain cas complexe et c'est à distance lors d'une récurrence que le diagnostic sera posé. En effet, 10 à 20% des premières poussées de MICI colique pure sont étiquetées colites indéterminées. Dans ce cas, le dosage des anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) ou la mise en évidence d'un aspect périnucléaire en immunofluorescence des anticorps dirigés contre les granulations des polynucléaires neutrophiles (pANCA) permettent d'orienter le diagnostic. En effet à partir des résultats issus du suivi d'une cohorte de patients étiquetés colite indéterminée, il a été mis en évidence qu'un statut ASCA positif/pANCA négatif pouvait prédire une MC dans 80% des cas, celui ASCA négatif/pANCA positif permet de suspecter une évolution vers une RCH dans 64% des cas (Joossens et al., 2002).

Introduction

g) Principales stratégies thérapeutiques

La présence d'une inflammation active, due aux MICI doit être confirmée avant d'initier ou de modifier un traitement médical. Une stratégie thérapeutique ascendante peut être proposée avec une pente d'intensification plus ou moins abrupte selon les critères pronostiques présents lors de la poussée inaugurale, l'évolution clinique et endoscopique (cicatrisation muqueuse ou extension des lésions). Des facteurs prédictifs d'une évolution défavorable des MICI ont été mis en évidence. Ainsi, il pourrait définir une population de malades candidats à un traitement plus agressif, dès la poussée inaugurale et ainsi permettre la mise en place d'une médecine personnalisée.

Si dans un premier temps, les salicylés et les corticoïdes ont représenté la stratégie thérapeutique de choix, ces quinze dernières années ont été marquées par le succès des « anti-TNF ». Ainsi, l'utilisation d'anticorps anti-TNF d'origine chimérique (infliximab), humanisés (adalimumab et golimumab) et humains (certolizumab) permet l'induction et la maintenance d'une phase de rémission dans la MC et la RCH (Hanauer et al., 2006 ; Colombel et al., 2010 ; Evans and Lee, 2012). Cependant, ces traitements sont associés à de nombreux effets secondaires, dans certains cas à une absence de réponse primaire et parfois à des phénomènes d'échappement secondaires dus à l'immunisation du patient contre ces biothérapies.

Ainsi dans leurs rapports respectifs, les auteurs estiment entre 13 et 40% le pourcentage de patients chez qui aucune réponse primaire n'est observée après l'instauration d'un traitement par anti-TNF (Ben-Horin et al., 2014 ; Ding et al., 2016). Pour Ben-Horin, cette réponse ne doit pas être évaluée avant 12 semaines afin de permettre au moins 3 injections d'infliximab ou d'adalimumab. Dans certains cas, bien que la réponse primaire ait permis d'atteindre une phase de rémission, une perte de réponse est ensuite observée chez 23 à 46% des malades et nécessite une modification de la dose d'anti-TNF. Alors que pour 5 à 13 % des malades, la perte de la réponse primaire s'accompagne par la suite d'une résistance à l'ensemble de la classe médicamenteuse des anti-TNF (Ding et al., 2016).

De nombreuses études ont permis d'estimer la concentration sérique en anti-TNF nécessaire à l'obtention d'une rémission de la maladie avec une bonne valeur prédictive. Ainsi des concentrations en infliximab sanguines supérieures à 3µg/mL ou d'adalimumab supérieure à 4,9µg/mL sont en adéquation avec une efficacité thérapeutique (Kopylov and Seidman, 2016). Une diminution de la concentration sérique des anti-TNF est souvent corrélée avec

Introduction

l'apparition d'anticorps spécifiques dirigés contre ces biothérapies (Vermeire et al., 2007 ; Yanai et al., 2015).

Bien que l'épitope soit à ce jour encore méconnu, ces anticorps en se fixant au fragment Fab des anti-TNF forment des complexes immuns éliminés dans la circulation, bloquant ainsi leurs activités biologiques. Dans une étude rétrospective d'une cohorte de patients Israéliens, il a été démontré, qu'en cas de perte de réponse, la prévalence des anticorps dirigés contre l'infliximab était de 47% et égale à 23% pour l'adalimumab (Yanai et al., 2015). La présence de ces anticorps expose à un risque trois fois plus élevé de développer des phénomènes d'échappements secondaires (Kopylov and Seidman, 2016). La perfectibilité des méthodes ELISA ou l'utilisation de méthodes alternatives telles que le dosage radio-immunologique (RIA) ont permis la détection de ces anticorps spécifiques nouvellement formés et précédant de quelques semaines la perte de réponse. Ainsi, un titre égal à 4mcg/mEq d'anticorps dirigés spécifiquement contre l'adalimumab et un titre équivalent à 9mcg/mEq pour l'infliximab sont associés, avec une spécificité de 90%, à une perte de réponse même en cas d'intensification de la dose d'anti-TNF (Yanai et al., 2015). Pour lutter contre l'apparition de ces néo-anticorps, il a été mis en évidence qu'une association l'infliximab avec un immunomodulateur limitait leur production (Vermeire et al., 2007).

C'est pourquoi de nouvelles approches thérapeutiques basées sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les cytokines pro-inflammatoires ou de stratégies visant à favoriser des mécanismes immunorégulateurs ont émergé ces dernières années. Ainsi nous pouvons noter l'apparition du vedolizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, une molécule jouant un rôle clé dans la domiciliation intestinale des lymphocytes T (Loftus et al., 2016 ; Vermeire et al., 2016). Le tofacitinib, un inhibiteur de la voie de signalisation JAK, actif *per os* (Sandborn et al., 2012) et un anticorps dirigé contre le récepteur $\beta 7$: l'étrolizumab (Vermeire et al., 2014) ont fait l'objet d'essais de phase 2 qui ont montré des résultats encourageants au cours de la RCH. L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre des molécules pro-inflammatoires comme le tocilizumab dirigé contre le récepteur de l'interleukine 6 ou encore le briakinumab et ustekinumab dirigés contre la sous unité p40 des interleukines 12 et 23, ont aussi prouvé leur efficacité clinique dans des cohortes de patients souffrant de MC (Neurath, 2014). Les inhibiteurs de Smad7, dont l'expression élevée au cours des MICI provoque une inhibition de l'immunomodulateur TGF β , ont aussi démontré des effets positifs (Monteleone et al., 2012).

h) Evolution et suivi de l'activité des MICI

i. Evolution des lésions de l'épithélium intestinal.

Ces pathologies arborent un comportement alternant entre période de poussées inflammatoires et phases de rémission où l'épithélium intestinal tente de cicatriser.

Ainsi l'amplitude des lésions, décrite au cours de la RCH, existe parfois d'emblée ou évolue progressivement au fur et à mesure des poussées. Une atteinte pancolique, sans intervalle de muqueuse saine, est observée au cours de l'endoscopie chez un tiers des patients, mais après 20 ans d'évolution touche près de la moitié des malades. Ainsi au cours de la RCH, le rectum est la première partie atteinte et la dernière à cicatriser.

La localisation initiale de la MC (iléale ou colique) reste globalement stable dans le temps, avec moins de 15 % d'évolution d'une forme à l'autre au terme de 10 ans de suivi (Louis et al., 2001). L'atteinte anopérinéale, initialement observée chez moins d'un quart des patients peut en toucher plus de 50% au terme de quelques années d'évolution. Les formes iléo-coliques tendent plutôt à se sténoser puis se perforer alors que l'atteinte colique reste plutôt longtemps inflammatoire. Néanmoins, la majorité des patients atteint de MC développe une complication de type sténose et/ou fistule au cours de leur histoire (Cosnes et al., 2002).

ii. Les facteurs pronostics

Il est difficile d'évaluer sur le long-terme le comportement des MICI mais certains facteurs sont connus pour impacter leur évolution.

Les résultats de l'étude de la cohorte IBSEN a permis d'évaluer les facteurs de risque associés à une évolution défavorable de la RCH : colectomie, rechute, extension rapide des lésions, mortalité, maladie présentant un phénotype chronique actif. Ainsi, lors du diagnostic les patients âgés de moins de 40 ans, présentant des lésions étendues et nécessitant l'instauration rapide d'une corticothérapie présentent un risque de colectomie égal à 30 % au bout de dix années d'évolution (Solberg et al., 2009). Des lésions endoscopiques sévères prédisposent à un risque plus élevé de colectomie. De plus, les patients jeunes sont associés à une forme de RCH plus sévère, à un risque de rechute plus élevé ou de présenter une forme active chronique de leur maladie (Reinisch et al., 2015).

Une première poussée de MC chez un malade ayant un âge inférieur à 40 ans, des lésions anopérinéales et nécessitant la mise en place d'un traitement par corticoïdes décriront une

Introduction

forme évolutive plus grave de la maladie. Alors que les malades obtenant rapidement une cicatrisation, vont par la suite décrire une forme de MC plus clémente.

Après dix années d'évolution de la RCH, 24% des malades ont subi une colectomie (Langholz et al., 1994), au cours de la MC le taux de chirurgie après vingt ans est estimé à 20% (Cosnes et al., 2002). Le risque chirurgical paraît plus élevé en cas d'atteinte iléale, car celle-ci expose davantage aux risques de complications sténosantes ou perforantes (Thia et al., 2010). Ce risque est aussi accru chez les malades présentant une imprégnation tabagique, une sérologie ASCA positive ou une mutation du gène *NOD2*.

Contrairement à la RCH où l'espérance de vie est similaire à celle de la population saine, chez les patients atteints de MC, cette dernière est légèrement abaissée (Baumgart and Sandborn, 2007).

iii. Evaluation de l'activité des MICI

Plusieurs scores sont utilisés en pratique pour évaluer l'activité des MICI et ainsi juger de l'efficacité d'une stratégie thérapeutique ou estimer un risque de rechute. Ainsi différents scores d'activités cliniques, endoscopiques, histologiques sont décrits.

✓ Au cours de la RCH

Au cours des essais cliniques, le score MAYO partiel permettant une évaluation clinique est le plus fréquemment utilisé (Walsh et al., 2016). Au cours de l'examen endoscopique, le score UCEIS (Ulcerative Colitis Endoscopic Index) (Travis et al., 2012) ou le sous-score endoscopique du MAYO (Walsh et al., 2016) sont utilisés. Ces index en qualifiant l'aspect de la muqueuse intestinale permettent d'estimer l'activité de la maladie.

L'index d'activité de la RCH d'un point de vue histologique, bien que parfois non corrélé au score d'activité endoscopique (Bryant et al., 2014) nous informent qu'une inflammation persistante est associée à un fort risque de rechute, de colectomie ou de néoplasie (Walsh et al., 2016). En parallèle, un aspect histologiquement sain est associé à un stade de rémission complète. Jusqu'en 2015, le RILEY score (Riley et al., 1991) et le GEBOES score (Geboes et al., 2000) ont été communément employés. Depuis deux nouveaux indices : le Nancy histological index et le RHI (pour Roberts Histological Index) ont été validés, afin de permettre une évaluation simplifiée et reproductible (Walsh et al., 2016).

Introduction

✓ Au cours de la maladie de Crohn

Le score clinique calculé selon le CDAI (pour Crohn Disease Activity Index) correspond à l'indice le plus employé afin de juger de l'efficacité thérapeutique d'un essai clinique (Best et al., 1976). Un score inférieur à 150 signe une maladie en phase de rémission. En pratique clinique, il est préférable d'évaluer la rémission de la MC à l'aide de l'index HBI (Harvey-Brashaw Index <4). En effet ce score, très bien corrélé au CDAI, est d'utilisation plus aisée car il ne nécessite pas un recueil de données cliniques sur 7 jours.

Au cours de l'examen endoscopique, l'activité résiduelle de la maladie peut être estimée via le score calculé selon le CDEIS (Crohn Disease Endoscopic Index) (Mary and Modigliani, 1989). Cet indice, doté d'une bonne reproductibilité est considéré actuellement comme le gold standard malgré sa complexité d'utilisation. C'est pourquoi il est préférable de quantifier cette activité résiduelle selon le SES-CD (Simple Endoscopic Score for Crohn's disease) (Daperno et al., 2004). Enfin l'indice de Rutgeerts permet d'évaluer le risque de récurrence clinique après une résection iléo-colique car doté d'une excellente corrélation entre l'intensité des lésions et le délai de récurrence des signes cliniques (Rutgeerts et al., 1990)

En raison de l'atteinte discontinue de la muqueuse intestinale, il apparaît assez complexe d'évaluer histologiquement l'inflammation de la muqueuse, c'est pourquoi aucun indice n'est encore décrit à ce jour.

Au cours des MICI, plusieurs biomarqueurs ont été décrits pour évaluer de façon non invasive l'activité résiduelle de la maladie. Ainsi le dosage de la calprotectine fécale est un bon outil de dépistage de l'inflammation intestinale permettant de mesurer l'activité de la MC ou de la RCH (van Rheenen et al., 2010). Le dosage de la protéine C réactive (CRP), bien que faiblement corrélé aux scores d'activité endoscopique permet aussi cette évaluation. La détection sanguine d'anticorps anti-TNF assure la mise en évidence un échec thérapeutique et ainsi permet de rapidement effectuer un switch thérapeutique (Nanda et al., 2013). De cette façon, l'escalade conventionnelle de la dose inutile, coûteuse et potentiellement dangereuse est limitée.

✓ Les biomarqueurs à la recherche de la médecine de précision au cours des MICI

Le challenge de ces dernières années, tend de plus en plus à développer une médecine de précision adaptée à une prise en charge personnalisée de sa pathologie chronique. Ainsi dans le cadre des MICI, de nombreux travaux de recherche visent à développer de nouveaux

Introduction

biomarqueurs permettant en autres d'évaluer l'activité et/ou son comportement mais aussi de prédire la réponse médicamenteuse ainsi que les effets indésirables. Ainsi, l'étude EMBARK (EMerging BiomARKers in Inflammatory Bowel Disease) a eu comme objectif, de corrélérer un panel de biomarqueurs aux scores d'activités endoscopiques et radiologiques afin d'identifier de nouveaux marqueurs d'activité. Ainsi chez les patients atteints de RCH, la régression logistique ordinaire utilisant le sous-score endoscopique du MAYO a sélectionné la combinaison de la calprotectine fécale et de la métallo protéinase sérique 9 (MMP9). Dans la cohorte de patients atteints de MC, la combinaison de la calprotectine fécale, de la MMP9 et de l'IL-22 sérique apparait fortement associée à l'alliance des scores endoscopique et radiologiques (Faubion et al., 2013). De même, pour estimer l'effet positif d'une mise sous anti-TNF, l'étude de Arijis et ses collaborateurs ont identifié à partir de biopsies de l'épithélium intestinal, une signature de gènes permettant de séparer les répondeurs des non-répondeurs (Arijis et al., 2009). Quant au groupe de Neurath et ses associés, ils proposent qu'en couplant les anticorps anti TNF à un composé fluorescent cela permettrait d'identifier les cellules intestinales TNF positives (mTNF⁺) et ainsi de prédire la réponse thérapeutique aux anti-TNF chez les patients atteints de MC. En effet, ils ont démontré une corrélation positive entre un pourcentage élevé de cellules mTNF⁺ et une réponse primaire positive après 12 semaines de traitement par anti-TNF. De plus, ils ont mis en évidence au sein de ce groupe de patients présentant un fort taux de cellules mTNF⁺, une muqueuse intestinale cicatricielle après un an de traitement (Atreya et al., 2014).

Ainsi dépit du succès des anti-TNF dans la prise en charge thérapeutique des MICI, la résistance observée chez certains patients souligne l'importance de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Parmi les réponses du système immunitaire observées au cours de ces pathologies inflammatoire, certaines cytokines sécrétées exercent des actions bénéfiques sur la muqueuse intestinale. Il s'agit des cytokines de l'immunité muqueuse : l'interleukine 22 (IL-22) et de l'interleukine 17 (IL-17).

3. *Place des cytokines de l'immunité muqueuse (IL-22) et (IL-17) dans le maintien de l'homéostasie intestinale*

a) L'interleukine 22

i. L'IL-22 : source, récepteur, voies de signalisation

L'interleukine 22 (IL-22) appartient à la famille de l'interleukine 10 regroupant d'autres cytokines comme l'IL-10, l'IL-19, l'IL-20, l'IL-24 et l'IL-26, l'IL-28 α , l'IL-28 β et l'IL-29. Le gène de l'IL-22 (*IL-22*), situé sur le bras long du chromosome 12, code pour une protéine de 146 acides aminés. La structure protéique de l'IL-22 décrit six hélices α (A à F) organisées dans une conformation antiparallèle. La structure primaire de la protéine comprend trois sites de N-glycosylation ainsi que quatre cystéines permettant la formation de ponts disulfures. La forme biologique circulante de l'IL-22 est principalement un monomère bien que pour des fortes concentrations des tétramères ont été observés (Dudakov et al., 2015).

Les sources cellulaires d'IL-22 sont multiples bien qu'uniquement constituées par les cellules du système immunitaire. Chez l'homme, les lymphocytes T CD4⁺ et les membres du groupe 3 de la famille des cellules lymphoïdes innées (ILC3) constituent les sources principales de production d'IL-22 (Sabat et al., 2014).

Ainsi, parmi les lymphocytes T CD4⁺, nous retrouvons ceux polarisés vers les voies Th1, Th22 et Th17. Les lymphocytes Th22 sont caractérisés par une production exclusive d'IL-22. Ces cellules, de phénotype mémoire, sont retrouvées dans le sang périphérique et ont un tropisme préférentiellement cutané du fait de l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR10, CCR6 et CCR4 ainsi que du ligand de sélectine CLA (Cutaneous Ligand Antigen). Elles expriment fortement le facteur de transcription AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) mais très peu ROR γ t (Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor γ t). Les DC plasmacytoïdes (pDC) activées sécrètent de l'IL-6 et du TNF, induisant ainsi une polarisation Th22 (Duhon et al., 2009). Les lymphocytes Th17 exprimant le facteur de transcription ROR γ T sont capables de produire de l'IL-22 en plus de l'IL17A. La différenciation en Th17 nécessite la présence d'un environnement cytokinique contenant l'IL-6, le TGF β , l'IL-1 β et l'IL-23 (Wolk et al., 2002).

Les ILC3, exprimant le facteur de transcription ROR γ t et subdivisés en deux groupes en fonction de l'expression du récepteur de cytotoxicité Nkp46 (lymphocytes tissus inductibles LTi NCR- et les ILC3 NCR+), représentent la deuxième source de production d'IL-22. Une sécrétion accrue d'IL-22 est observée en réponse à une stimulation des ILC3 par l'IL-23 (Geremia et al., 2011).

Introduction

Enfin les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes T de l'immunité innée (NKT) et les lymphocytes gamma delta sont aussi capables de sécréter de l'IL-22 (Dudakov et al., 2015).

Son récepteur est un hétérodimère composé de deux sous unités : IL-10R2 ubiquitaire et IL-22RA1 dont l'expression est restreinte aux cellules épithéliales de divers organes notamment la peau, le rein, les organes des systèmes digestif (intestin grêle, colon, pancréas, foie) et respiratoire (poumon, trachée) (Li et al., 2014b). La formation du complexe IL-22-IL-22RA1-IL-10R2 induit principalement la voie de signalisation Janus-kinase (JAK-STAT) aboutissant à la phosphorylation de STAT3, à sa dimérisation puis son passage dans le noyau où il va induire la transcription de gènes. D'autres voies de signalisation incluant trois principales voies des MAP kinases (p38, JNK, ERK1/2) ont aussi été décrites en aval de la fixation de l'IL-22 sur son récepteur. Ainsi l'IL-22 se place ainsi comme une cytokine clé assurant le dialogue entre les cellules du système immunitaire et les épithélia.

ii. Actions de l'IL-22 sur l'épithélium intestinal

L'IL-22 joue un rôle primordial sur l'épithélium intestinal puisqu'elle contribue fortement au renforcement des propriétés de barrière de la muqueuse (Sonnenberg et al., 2011). En effet, cette cytokine possède la propriété d'induire la production de PAMs tels que la lipocaline 2, les bêta-défensines, les lectines de type C appartenant à la famille des REG ainsi que les protéines S100 (Zheng et al., 2008 ; Raffatellu et al., 2009 ; Kolls et al., 2008). Ainsi dans son modèle d'infection digestive par l'entérobactérie *Citrobacter rodentium*, Zheng et al ont pu mettre en avant le rôle fonctionnel de l'IL-22 dans les défenses anti-infectieuses. En effet l'absence d'IL-22 ou sa neutralisation conduisait à la diffusion systémique de la bactérie et à une mort précoce des animaux (Zheng et al., 2008). De plus, l'IL-22 contribue au renforcement de la barrière intestinale en stimulant l'expression de protéines des jonctions serrées tels que claudine-1 (Dudakov et al., 2015). L'IL-22, en induisant la production de mucines (MUC 1,-2,-10,-13) par les cellules de goblet, participe au recouvrement de la muqueuse intestinale par une couche épaisse de mucus (Sugimoto et al., 2008). Cette cytokine induit également le transfert de fucose sur des protéines exprimées au pôle apical via l'induction d'expression de l'enzyme galactoside 2 α L fucosyl-transferase2 (FUT2) par les cellules épithéliales (Pickard and Chervonsky, 2015). Cette glycosylation favorise la croissance de bactéries commensales au détriment de pathogènes contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie intestinale (Goto et al., 2014). Goto et ses collaborateurs ont ainsi démontré qu'au cours d'un modèle d'infection par *Salmonella typhimurium* les souris déficientes pour le gène *Fut2*, étaient plus susceptibles

Introduction

à l'inflammation. L'IL-22 exerce également des actions cicatrisantes importantes sur les tissus lésés en stimulant la régénération des cellules épithéliales (Radaeva et al., 2004). L'IL-22 apparaît donc comme un acteur crucial de l'homéostasie intestinale et protecteur en cas d'inflammation. L'absence d'IL-22 chez la souris (souris Knock Out (KO)) s'accompagne d'une plus grande susceptibilité à l'inflammation ainsi qu'aux dommages intestinaux dans des modèles expérimentaux de colites (dextran sulfate sodium (DSS) ; transfert Ly T naïf chez des souris immunodéficientes ou modèle de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)) (Sugimoto et al., 2008 ; Zenewicz et al., 2008 ; Lindemans et al., 2015). En effet dans ces différentes expériences, il a été mis en évidence que l'absence d'IL-22 au cours de la colite s'associe fortement à une augmentation de la perte de poids et de la mortalité des rongeurs ainsi qu'une atteinte tissulaire plus sévère de la muqueuse digestive. Tandis que l'administration d'IL-22 permettait de reverser les effets observés.

Par ses propriétés inflammatoires via la production de chimiokines (CXCL8, CXCL5) de cytokines pro-inflammatoires (IL1- β , IL-6) et sa capacité à induire des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl), l'IL-22, en cas d'action prolongée, peut être délétère et à l'origine de pathologies comme le psoriasis ou les cancers colorectaux (Sabat et al., 2014). En effet, l'induction d'un modèle de carcinome hépatocellulaire chez des souris sur-exprimant l'IL-22 s'associe à une prolifération et une survie prolongée des hépatocytes (Park et al., 2011). Au niveau de l'intestin, la suppression des actions prolifératives de l'IL-22 s'est avérée bénéfique uniquement au cours du modèle génétique d'induction de tumeurs (souris *Apc^{min/+}* ; mutation dans la protéine Apc Adenomatous Polyposis Coli provoquant son inactivation et un développement tissulaire excessif provoquant l'apparition de polype évoluant potentiellement en cellules tumorales). Tandis que la suppression des actions de l'IL-22 au cours d'un modèle de cancer colorectal dépendant de l'inflammation, a contribué à l'accélération du processus malin. En effet c'est la présence d'une inflammation chronique insuffisamment contrôlée au cours des MICI qui est à l'origine de l'apparition de cancers colorectaux (Bernstein et al., 2001). Ainsi au niveau du colon, il apparaît intéressant de permettre, dans un premier temps à l'IL-22 d'exercer ses actions protectrices puis son contrôle, dans un second temps, limiterait son action exacerbée sur les cellules épithéliales aux conséquences potentiellement délétères.

Introduction

Cette dualité des actions de l'IL-22 dépendante de son contexte de production suggère la nécessité d'une régulation de l'axe IL-22/IL-22R, d'autant plus que ses effets peuvent être potentialisés par synergie avec une autre cytokine pro-inflammatoire : l'interleukine 17A (IL-17A) (Liang et al., 2006 ; Raffatellu et al., 2009).

La **Figure 11** résume les sources cellulaires de l'IL-22 ainsi que ses principales actions au niveau des cellules épithéliales intestinales.

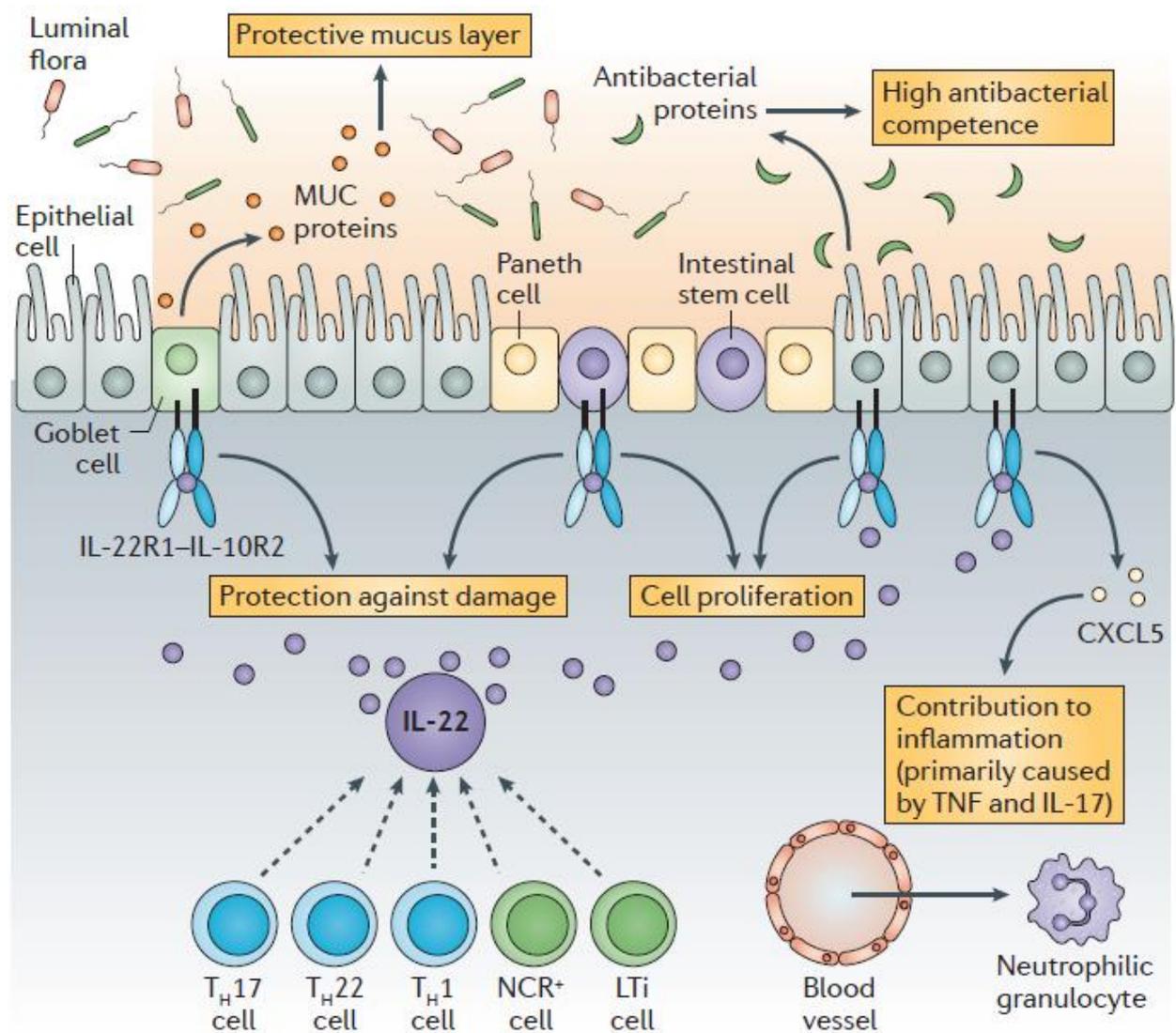


Figure 11 : Sources cellulaires et actions protectrices de l'IL-22 sur les cellules épithéliales intestinales (Sabat et al., 2014)

- 1) Renforcement des propriétés de barrière
- 2) Régénération et cicatrisation de la muqueuse
- 3) Propriétés pro-inflammatoires

Introduction

b) L'interleukine 17A

i. L'IL-17A : source, récepteur, voies de signalisation

L'IL-17A appartient à la famille de l'interleukine 17, regroupant six membres (A-F) ayant une forte homologie entre eux. Le gène de l'IL-17A code pour une protéine de 155 acides aminés, sécrétée sous forme d'un dimère de 40kDa. Les Ly Th17 ainsi que les ILC3 représentent ses sources majoritaires de production (Cording et al., 2016). Les actions de l'IL-17 sont induites par sa fixation sur son récepteur IL-17R composé de deux sous-unités transmembranaires : IL-17RA exprimée de façon ubiquitaire et IL-17RC retrouvée essentiellement au niveau des cellules épithéliales et des fibroblastes (Toy et al., 2006). Ainsi la formation du complexe entraîne l'activation de voies de signalisation des MAP kinases et du NFκB.

ii. Actions de l'IL-17A sur l'épithélium intestinal

L'IL-17A exerce aussi des actions bénéfiques sur la muqueuse intestinale, notamment en induisant l'expression de PAM comme les bêta-défensines ou les protéines de la famille S100 (Kolls et al., 2008a). Ainsi, l'association synergique de l'IL-17A et l'IL-22 est à l'origine d'une induction potentialisée de l'expression de BD2 (Liang et al., 2006) ou encore de la LCN2 au cours d'un modèle d'infection à *Klebsiella pneumonia* (Aujla et al., 2008). Le mécanisme expliquant cet effet synergique semble être imputé à la similitude des voies de signalisation impliquées en aval des récepteurs de l'IL-22 et de l'IL-17. L'IL-17A entraîne des effets pro-inflammatoires en induisant la sécrétion de chimiokines comme CCL20 provoquant le recrutement des DCs sur le site de l'infection et/ou la sécrétion de CXCL2 un ligand indispensable au chimiotactisme des PNNs (Kolls et al., 2008a). Ainsi ses propriétés pro-inflammatoires et antibactériennes ont conféré à l'IL-17A un rôle bénéfique dans des modèles d'infections fongiques (Huang et al., 2004) et bactériennes (Happel et al., 2003).

Compte tenu de sa surexpression dans les MICI et de son rôle pro inflammatoire, sa neutralisation par l'anticorps monoclonal (Secukinumab) a été proposée comme une stratégie bénéfique dans le traitement des poussées de MC. Cet essai clinique s'est avéré inefficace puisque des effets secondaires ainsi qu'une aggravation de l'inflammation ont en fait été rapportés chez le groupe ayant reçu l'anticorps par rapport au groupe contrôle (Hueber et al., 2012). Plus récemment, une étude a démontré l'action protectrice de l'IL-17 au cours des colites, par sa capacité à maintenir l'intégrité de la muqueuse intestinale via l'induction de l'expression de protéines des jonctions serrées épithéliales (Lee et al., 2015).

Introduction

L'IL-22 et l'IL-17 ayant des actions combinées sur l'épithélium, apparaissent donc jouer un rôle clef dans le renforcement des propriétés de barrière de la muqueuse intestinale, limitant ainsi les potentielles translocations bactériennes à l'origine d'une activation du système immunitaire muqueux (**Figure 12**).

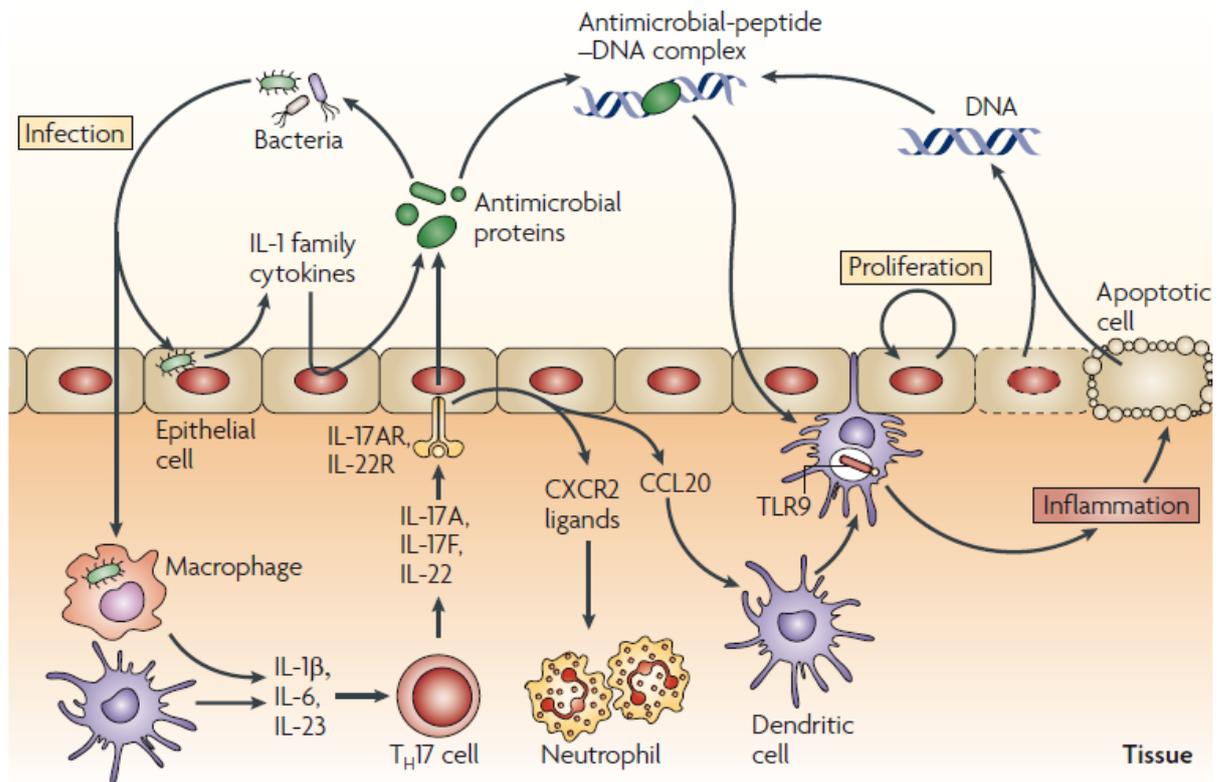


Figure 12 : Actions synergiques et protectrices de l'IL-22 et de l'IL-17 sur la muqueuse intestinale (Kolls et al., 2008a).

En réponse à une infection, la production d'IL-1 β ou d'IL-23 par les DCs activée aboutit à l'activation des lymphocytes en Th17 sécrétant d'IL-22 et d'IL-17. L'effet synergique de ces deux cytokines potentialise la production de peptides antimicrobiens. De plus l'IL-17A exerce des actions pro-inflammatoires via la sécrétion de la chimiokine CCL20 provoquant le recrutement de DCs et/ou de PNN sur le site de l'infection. Ainsi ces actions combinées exercent un rôle protecteur sur la barrière épithéliale.

4. *L'interleukine 22 binding protein (IL-22BP)*

a) Caractérisation de l'IL-22BP

La particularité de l'IL-22 est de posséder un inhibiteur soluble et spécifique : l'interleukine 22 *binding protein* (IL-22BP) (Dumoutier et al., 2001 ; Xu et al., 2001). Le gène codant pour l'IL-22BP (*IL-22RA2*) est présent sur le chromosome 6. Il encode la formation d'une protéine monomérique et sécrétée, comprenant 210 acides aminés (AA). L'expression de son ARN messager (ARNm) est retrouvée au niveau des organes lymphoïdes (thymus, rate, ganglions lymphatiques, appendice), digestifs (estomac, intestin grêle, colon), de la peau, des poumons, du placenta et des seins (Dumoutier et al., 2001). De par son caractère beaucoup plus affiné (jusqu'à 1000 fois) pour l'IL-22 et son analogie de structure (34%) avec le récepteur transmembranaire de l'IL-22 (IL-22R) (Wolk et al., 2007), l'IL-22BP bloque les actions de l'IL-22.

b) Les sources de production de l'IL-22BP

i. Chez le rongeur

Avant que l'équipe du Professeur Régis Josien ne s'y intéresse, les cellules productrices de cette protéine étaient mal caractérisées. Leurs travaux ont démontré que la source majeure d'IL-22BP dans l'intestin de rongeur est représentée par une sous-population de cellules dendritiques conventionnelles immatures CD103⁺ CD11b⁺ (Martin et al., 2014). L'acide rétinoïque, issu du métabolisme de la vitamine A, est un puissant inducteur de la production d'IL-22BP par les DCs tandis que leur maturation est associée à une baisse de l'expression (Martin et al., 2014). Pour l'équipe de Flavell, il semble que l'IL-18 représente l'un des signaux à l'origine d'une sous expression d'IL-22BP par les DCs (Huber et al., 2012).

ii. Chez l'homme

Chez l'homme, bien que l'expression de l'IL-22BP par les DCs soit conservée, les polynucléaires éosinophiles (PNE) normalement présent dans la *lamina propria* représentent une source majoritaire majeure d'IL-22BP dans l'intestin (Martin et al., 2016) (**Figure 13 A et B**). Ces sources de production ont ensuite été confirmés par un autre groupe (Pelczar et al., 2016). Ce même groupe a également proposé que des lymphocytes T CD4⁺ mémoires produisent cet inhibiteur soluble, bien que ces résultats méritent d'être confirmés.

Introduction

c) L'IL-22BP, un puissant régulateur des actions biologiques de l'IL-22

Les fonctions inhibitrices de l'IL-22BP sont très bien caractérisées *in vitro* (Dumoutier et al., 2001). D'autre part, les récents travaux de l'équipe de Flavell ont pour la première fois mis en évidence le caractère inhibiteur de l'IL-22BP *in vivo* suggérant qu'il permet de limiter une action trop prolongée de l'IL-22 sur l'épithélium intestinal suite à un épisode inflammatoire, limitant ainsi le risque de développement tumoral (Huber et al., 2012). En effet ils ont démontré que les souris déficientes pour le gène de l'IL-22BP (*Il22ra2^{-/-}*) ont un développement tumoral plus important en regard des souris sauvages au cours d'un modèle de cancer colorectal dépendant de l'inflammation.

Dans notre équipe, J. Martin a voulu évaluer l'impact de l'action inhibitrice de l'IL-22BP sur les effets protecteurs de l'IL-22 au niveau de l'épithélium intestinal. Pour cela, un modèle de colite expérimentale au dextran sulfate sodium (DSS provoquant la rupture de l'intégrité de l'épithélium intestinal) a été réalisé chez des rats déficients pour le gène de l'IL-22BP (*Il22ra2^{-/-}*) générés dans le laboratoire. L'ensemble des résultats obtenus soulignent que l'absence de l'inhibiteur s'associe à une meilleure tolérance de la colite (Martin et al., 2016). En effet les rats déficients pour le gène de l'IL-22BP (*Il22ra2^{-/-}*) semblent être protégés au cours de la colite puisqu'aucune perte de poids n'a été enregistrée (**Figure 13C**) et le score histologique quantifiant l'atteinte de la muqueuse à J10 de la colite est significativement diminué en comparaison aux rats sauvages (*Il22ra2^{+/+}*) (**Figure 13D**). De plus, en l'absence de l'IL-22BP, les actions protectrices de l'IL-22 sont potentialisées : induction de l'expression des gènes codants les PAMs (lipocaline2 et bêta-défensine2 de rat) (**Figure 13E**), augmentation de la production de mucus visualisée par un marquage plus prononcé au bleu alcyan des cellules de goblet des rats déficients pour le gène de l'IL-22BP (**Figure 13F**).

Enfin, l'équipe a montré que contrairement aux modèles animaux de colite où l'IL-22BP et IL-22 sont régulés de façon contraire, les MICI s'associent à une surexpression de l'IL-22BP dans la muqueuse intestinale en dépit de l'augmentation de l'IL-22 (Martin et al., 2016).

Il apparaît important à la suite de ces observations, de restaurer au cours des MICI l'intégrité de l'épithélium intestinal afin de rétablir l'équilibre établi entre hôte et microbiote et indispensable à l'homéostasie intestinale. A cette fin, les cytokines IL-22 et IL-17, exercent des actions protectrices sur ces muqueuses intestinales, cependant la présence excessive de l'IL-22BP pourrait réguler négativement ces effets bénéfiques.

Introduction

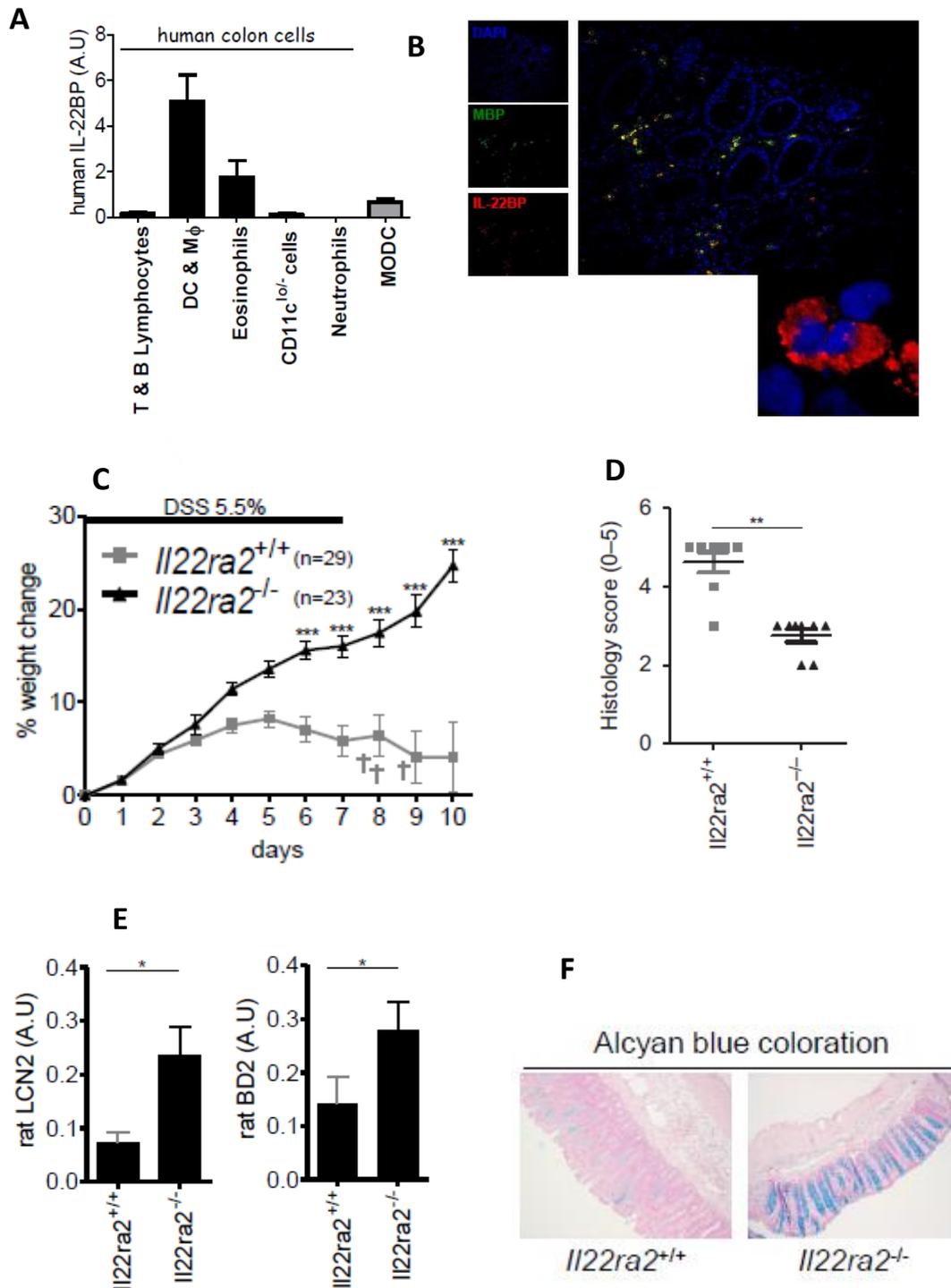


Figure 13 : L'IL-22BP produit par les PNE au niveau de la muqueuse intestinale humaine pourrait bloquer les actions protectrices de l'IL-22(Martin et al., 2016) **A-B** Sources de production de l'IL-22BP au niveau de la muqueuse intestinale humaine **A**) Expression du gène codant l'IL-22BP par RT-qPCR au sein du colon humain. **B**) Double marquage en IFI de coupe de colons humains à l'aide d'anticorps anti IL-22BP (rouge) anti MBP (vert). **C-D** Les rats déficients pour l'IL-22BP semblent mieux tolérer la colite induite au DSS. Des rats sauvages (*Il22ra2*^{+/+}) et déficients pour l'IL-22BP (*Il22ra2*^{-/-}) ont reçu pendant 7 jours du DSS dans leur eau de boisson avant d'être sacrifiés à J10. Au cours de l'expérience un suivi clinique et du poids ont été réalisés tous les jours. Le pourcentage de la perte de poids est représenté en **C**). **D**) Score histologique de la colite évalué en aveugle à J10. **E-F** Les actions protectrices de l'IL-22 sont renforcées chez les rats déficients pour l'IL-22BP **E**) Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes induits par l'IL-22 et protecteurs au cours des colites : lipocaline 2 et rat- β -défensine2 **F**) Marquage au bleu alcyan des cellules de goblet productrices de mucus à J10 de la colite.

II. Hypothèse

L'hypothèse de travail justifiant ce projet est ainsi qu'au cours des MICI, l'IL-22BP pourrait avoir un effet bloquant sur les actions protectrices de l'IL-22 au niveau de la muqueuse intestinale notamment en inhibant son action synergique avec l'IL-17.

III. Objectifs de l'étude

L'objectif de ce travail a été d'approfondir chez l'homme le rôle joué par les cytokines de l'immunité muqueuse (IL-22 et IL-17) au cours des MICI.

- 1) Pour cela nous avons analysé la régulation de leurs expressions ainsi que celle de leurs gènes cibles, impliqués dans le maintien et le renforcement de la barrière épithéliale, dans des biopsies coliques d'une cohorte de patients souffrant de MICI.
- 2) Dans un second temps nous avons également évalué la possibilité de renforcer leurs actions spécifiquement dans la muqueuse inflammatoire de patients atteints de MC dans une perspective éventuelle d'application thérapeutique basée sur l'inhibition de l'IL-22BP.
- 3) Enfin, nous nous sommes attachés à étudier la régulation de l'expression de l'IL-22BP au niveau des muqueuses des patients atteints de MICI et son potentiel impact sur les actions induites par le duo synergique de cytokines : IL-22+IL-17.

IV. Matériels et méthodes

1. *Patients*

Les patients inclus dans l'étude font partie de la cohorte suivie par les médecins du service de Gastroentérologie de l'Institut des Maladies de l'Appareil Digestif (IMAD, CHU Nantes ; collaboration Dr. A. Bourreille). Des examens endoscopiques réguliers sous anesthésie générale font partie de leur prise en charge habituelle afin d'évaluer la progression de l'atteinte muqueuse digestive et de dépister précocement l'apparition de cancers colorectaux ou de dysplasies. Les prélèvements biopsiques sont issus de la biocollection de l'IMAD déclarée auprès du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche. Le numéro d'agrément est le DC-2008-402. La biocollection a été intégrée dans le CRB de Nantes. Les patients sont invités à participer à cette biocollection et en cas d'accord signent une lettre d'information et de consentement. L'ensemble des documents est conservé au CIC.

Dans le cadre de cette collaboration les ARNm de 17 patients atteints de MC et de 21 souffrant de RCH ont été analysés de façon rétrospective (**Tableau I**). Pour ces échantillons, la biocollection de l'IMAD disposait de biopsies de muqueuses appariées en zone saine et inflammatoire. Différents critères notamment l'âge, le sexe, la durée d'évolution de la maladie, la localisation ainsi que le traitement de fond ont été utilisés afin de former deux groupes comparables d'un point de vue statistique. La grossesse, un âge inférieur à 18 ans ou les patients sous tutelle ont par ailleurs constitué des critères d'exclusion à ce recrutement.

Les mêmes critères ont été mis en œuvre pour une étude prospective de patients atteints de MC uniquement, pour lesquels nous avons pu disposer à chaque fois de six biopsies fraîches prélevées de préférence en zone inflammatoire. Ainsi nous avons pu recruter 29 patients pour lesquels nous avons pu disposer de biopsies prélevées, au niveau du colon pour 23 d'entre eux et au niveau de l'iléon pour les 6 autres (**Tableau I**).

	Etude rétrospective		Etude prospective	
	MC	RCH	MC	
Localisation des biopsies fraîches			Colon	Iléon
N	17	21	23	6
Age (années) ^a	31,7 ± 9,1	39,4 ± 10,6	37,2 ± 11,8	33,7 ± 9,0
Genre (H/F)	8/9	11/10	13/10	4/2
Durée d'évolution (années) ^a	9,6 ± 6,7	6,8 ± 4,8	10,3 ± 9,8	15,6 ± 12,7
Localisation de l'atteinte				
<i>Iléon</i>	—	—	2	3
<i>Iléon + Colon</i>	10	—	17	2
<i>Colon</i>	7	17	4	1
<i>Rectum</i>	—	4	—	—
Traitements				
<i>Corticostéroïdes</i>	1	3	2	—
<i>Acide 5-aminosalicylique</i>	4	14	1	—
<i>Immunosuppresseurs</i>	8	4	8	3
<i>Anti-TNF</i>	8	8	14	4

Tableau I : Résumé des principales caractéristiques cliniques des patients inclus dans notre étude. Abréviations : H, Homme ; F, Femme ; TNF, facteur de nécrose tumorale ; a, moyenne ± écart type.

2. RT-PCR quantitative en temps réel

a) Transcription inverse

La transcription inverse a été réalisée en utilisant la Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Invitrogen) concentrée à 10U/μL, avec 25μg/mL d'oligodT pdT24 (Invitrogen), selon les instructions du fabricant.

b) PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Un volume de 4μL d'ADN complémentaire (ADNc), dilué au 1/5, a été amplifié dans 16μL de mix PCR contenant 1μL de sondes 20X et 10μL de tampon TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems). La PCR est ensuite réalisée dans le thermocycleur StepOne Plus (Applied Biosystems). Après 20 secondes à 95°C, suivaient 40 cycles comprenant 1s à 95°C : étape de dénaturation puis 20s à 60°C : étape d'hybridation et de polymérisation. Suite à l'activité 5' exonucléasique de l'ADN polymérase Ampli Taq Gold[®], le reporter de la sonde TaqMan,

Matériels et méthodes

séparé de son quencher, émet un signal fluorescent proportionnel au nombre d'amplicons formés. Les différentes sondes TaqMan utilisées pour la réalisation des qPCR sont présentées dans le **Tableau II**. Afin d'éviter l'amplification de l'ADN génomique potentiellement présent, ces sondes sont spécifiques d'une jonction de deux exons du gène étudié.

L'analyse directe des produits de PCR a été effectuée en mesurant l'augmentation de la fluorescence. Pour chaque gène étudié un cycle seuil (Ct) a été déterminé, puis la méthode de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a été employée pour évaluer l'expression relative des gènes en unités arbitraires (u.a). Dans un premier temps le ΔCt , correspondant à la soustraction du Ct moyen obtenu pour le gène d'intérêt au Ct moyen obtenu pour un gène endogène codant pour l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1 (*HPRT1*) est calculé. De cette façon les variations liées à la quantité et à la qualité des échantillons sont corrigées. Puis dans un second temps le $\Delta\Delta Ct$, correspondant au ratio du ΔCt du gène d'intérêt sur le ΔCt du calibrateur, est obtenu. Cette étape de normalisation à un calibrateur permet de corriger les variations de technique.

Cible	Gène	Référence	Fournisseur
BD2	<i>DEFB4 A/B</i>	Hs00175474_m1	Applied Biosystems
BD3	<i>DEFB103A/B</i>	Hs00218678_m1	Applied Biosystems
CLDN4	<i>CLDN4</i>	Hs00976831_s1	Applied Biosystems
EPCAM	<i>EPCAM</i>	Hs00158980_m1	Applied Biosystems
FUT2	<i>FUT2</i>	Hs00382834_m1	Applied Biosystems
HPRT	<i>HPRT1</i>	Hs99999909_m1	Applied Biosystems
IL-17A	<i>IL17A</i>	Hs00174383_m1	Applied Biosystems
IL-18	<i>IL18</i>	Hs01038788_m1	Applied Biosystems
IL-22	<i>IL22</i>	Hs01574154_m1	Applied Biosystems
IL-22RA1	<i>IL22RA1</i>	Hs00222035_m1	Applied Biosystems
IL-22BP	<i>IL22RA2</i>	Hs000364814_m1	Applied Biosystems
LCN2	<i>LCN2</i>	Hs01008571_m1	Applied Biosystems
MUC1	<i>MUC1</i>	Hs00159357_m1	Applied Biosystems
MUC2	<i>MUC2</i>	Hs00894024_g1	Applied Biosystems
REG3G	<i>REG3G</i>	Hs01595406_g1	Applied Biosystems
TNF	<i>TNF</i>	Hs01113624_g1	Applied Biosystems

Tableau II : Liste des différentes sondes TaqMan utilisées lors des qPCR

3. *Stimulation cytokinique ex vivo de biopsies fraîches prélevées chez des patients atteints de MC*

La mise en culture des biopsies coliques a été possible grâce au protocole mis au point et validé par notre collaboratrice Dr Anne Jarry (Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers CRCINA, U892) (Jarry et al., 2015).

a) Protocole de stimulation des biopsies fraîches

La stratégie mise en place pour le protocole de stimulation est résumée par la **Figure 14** :

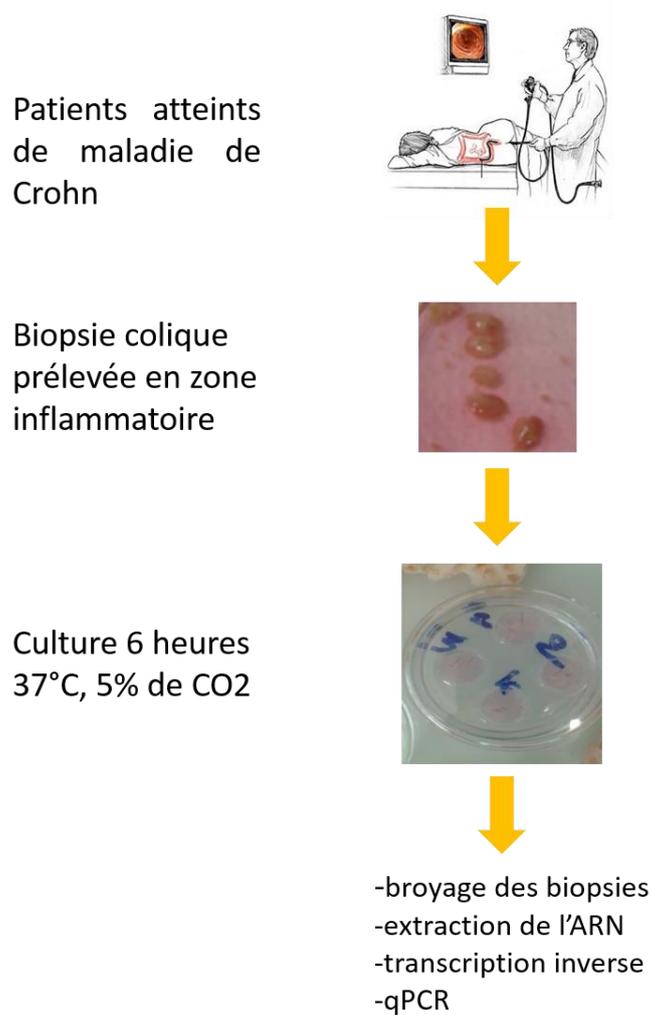


Figure 14 : Schéma synthétique de la procédure mise en œuvre pour la stimulation *ex vivo* des biopsies coliques fraîches prélevées chez des patients atteints de MC

Matériels et méthodes

- *Support* : Les biopsies sont mises en culture dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre (D. Dutscher®) recouvertes de Sylgard (VWR®) et dans lesquelles 4 puits ont été creusés (**Figure 15A**). Sous une lampe binoculaire, les biopsies sont étalées dans les puits (la phase apicale de l'épithélium sur le dessus) puis épinglées à chaque extrémité à l'aide d'épingles en inox (0,2mm diamètre, Fine Science Tools, Heidelberg, Germany). Ces dernières sont positionnées de façon à ce qu'il reste entre 1 et 2 mm entre la biopsie et le Sylgard afin que le milieu puisse circuler sous une agitation douce.
- *Milieu* : Il s'agit d'un milieu de culture sans sérum contenant du Ham/RPMI glutamax (1:1, vol/vol), de la BSA 0.01%, des antibiotiques : la pénicilline et la streptomycine concentrées à 200µg/mL (Gibco ref 15140-122) et un antifongique : la fungizone à une concentration égale à 0,25ug/ml (Gibco ref 15290-026). Ce milieu se conserve à 4°C pendant 15 jours. Au cours de chaque expérience un volume égal à 500µL de milieu seul ou contenant les cytokines diluées, a été déposé dans chacun des puits.
- *Cytokines* : Différentes combinaisons de stimulation ont été testées : milieu seul, IL-22, IL-22+IL-17, IL-22+IL-17+IL-22BP (**Tableau III**). Les concentrations des cytokines ainsi que de l'IL-22BP ont été calculées de telle sorte que ces dernières soient en conditions saturantes. Nous nous sommes inspirés d'une étude ayant stimulé des biopsies iléales de patients atteints de MC avec de l'IL-22 dont la concentration était comprise entre 10 et 100ng/mL (Begue et al., 2011). Les cytokines ont toutes été conservées à -20°C avant leur utilisation.

<i>Cytokines</i>	<i>Fournisseurs</i>	<i>Référence</i>	<i>[C] stock</i>	<i>[C] de travail</i>
IL-17	Miltenyi	130-093-959	20 µg/mL	100 ng/mL
IL-22	Miltenyi	130-096-295	20 µg/mL	100 ng/mL
TNF	Miltenyi	130-094-014	20 µg/mL	100 ng/mL
IL-22BP	R&D Systems	8498-BP-025	250 µg/mL	331 ng/mL

Tableau III : Principales caractéristiques des cytokines utilisées lors des stimulations *ex vivo* des biopsies coliques fraîches

Matériels et méthodes

- *Conditions de culture* : Les biopsies sont stimulées pendant 6 heures à 37°C sous une agitation douce (40 rotations par minute) et dans une atmosphère humide contenant 5% de dioxyde de carbone. Afin d'incuber dans ces conditions, les boîtes de Pétri sont placées dans une enceinte étanche contenant des morceaux d'éponge humide (**Figure 15B**). Puis à l'aide d'une bouteille de carbogène (95% O₂ – 5% de CO₂), de l'air est insufflé pendant deux minutes dans l'enceinte.

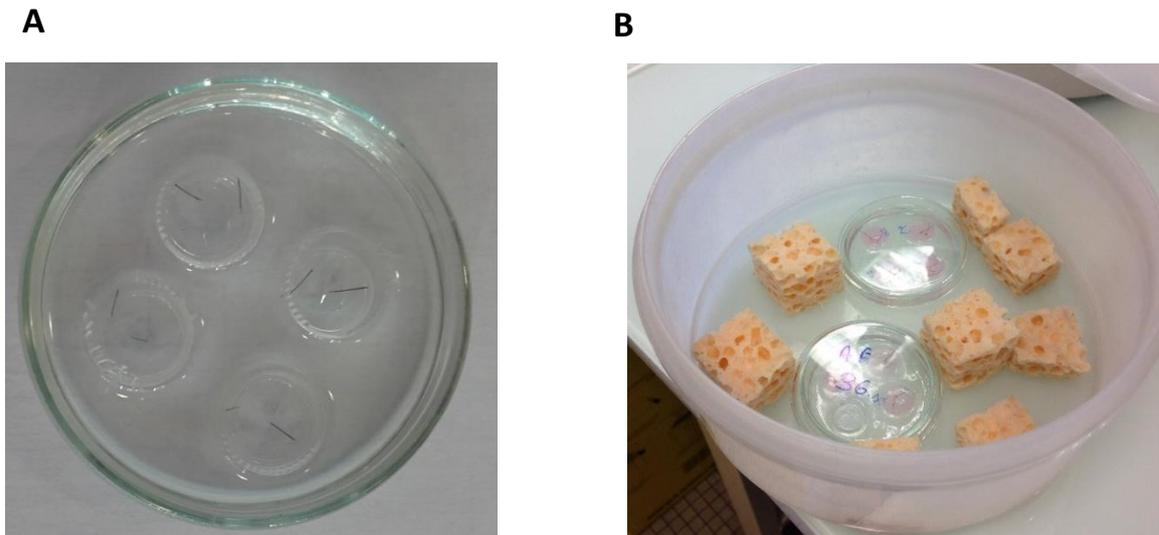


Figure 15 : Dispositifs utilisés au cours des protocoles de stimulations

A) Boîte de Pétri 4 puits **B)** Dispositif mis en place pour la stimulation

b) Broyage des biopsies

Après 6h de culture, les biopsies ont été récupérées dans des tubes FastPrep®-24(MP-BIOMEDICALS) contenant 1mL de TRIzol, puis conservées à -80°C en attendant leur utilisation. Les biopsies sont broyées à l'aide de l'automate Precellys® au sein de l'unité INSERM 913. En effet, grâce à un système d'agitation puissant, les échantillons biologiques sont rapidement lysés entre les billes contenues dans les tubes FastPrep®.

c) Extraction de l'ARN

L'ARN total a été récupéré par extraction liquide/liquide en ajoutant du chloroforme. Après centrifugation à 12000g à 4°C pendant 15 minutes, la phase aqueuse a été récupérée. L'ARN a été précipité par ajout d'isopropanol et laissé une nuit à -20°C. Après centrifugation à 12000g pendant 20 minutes, le culot a été lavé deux fois avec 1mL d'éthanol et centrifugé à 7400g pendant 5 minutes. Après avoir été mis à sécher pendant 20 minutes à température ambiante, le culot a été repris dans de l'eau *ppi*. La concentration en ARN extrait est ensuite mesurée par technique spectrophotométrique sur le NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer).

4. *Marquage en immunohistochimie de l'IL-22BP sur des coupes de colons de patients souffrant de MICI*

Les coupes de colon ont été marquées à l'aide d'un anticorps monoclonal IgG1 de souris anti hIL-22BP (clone 214518 provenant de chez R & D Systems.). La réaction a été révélée grâce à l'ajout du chromogène 3,3 diaminobenzide et détectée grâce au système Envision (Dako. Les Ulis France). L'intensité de marquage des cellules IL-22BP⁺ a été évaluée en aveugle par un anatomopathologiste qualifié (Dr. Céline Bossard) et quantifiée par un score s'échelonnant de 0 à 3.

5. *Mise au point d'une technique de dosage de l'IL-22BP : ELISA hIL-22BP*

L'objectif de cette tâche est de quantifier la protéine IL-22BP sur des lysats protéiques de biopsies de patients atteints de MICI. Il s'agit de la même cohorte de patients que celle décrite précédemment. Pour réaliser cette étape et basé sur le fait qu'il n'existe pas de kit commercial ELISA IL-22BP fiable, nous avons mis au point un « ELISA maison IL-22BP ».

Une première stratégie a reposé sur un coating avec un anti hIL-22BP monoclonal (clone 214518 de chez R&D System), un standard d'IL-22BP humaine recombinante (référence 1087-BP de chez R&D System) et deux anticorps de détection : un monoclonal (clone AH22BP5 fourni par J.C. Renaud, Bruxelles) et un polyclonal (BAF-1087 de chez R&D).

Dans un second temps, nous nous sommes rapprochés de l'équipe Du Pasquier connue pour avoir mis au point un ELISA hIL-22BP pour doser cette dernière dans le sérum et le LCR de patients atteints de sclérose en plaque (Perriard et al., 2015).

<i>Réactifs</i>	<i>Fournisseurs</i>	<i>Type</i>	<i>Référence</i>	<i>[C] Stock</i>	<i>[C] travail</i>
Anti hIL-22BP	R&D Systems	Polyclonal chèvre	AF-1087	200µg/mL -20°C	5µg/mL
hIL-22BP	R&D Systems	Recombinante non FC	8498-BP-025	250µg/mL -20°C	0,156- 40ng/mL
Anti hIL-22BP	R&D Systems	Polyclonal lapin	sc-134974	20µg/mL +4°C	Dilution 1/200
Anti-lapin	R&D Systems	Biotinylé	711-066-152	1mg/mL +4°C	1µg/mL

Tableau IV : Caractéristiques des anticorps utilisés pour la réalisation de l'ELISA IL-22BP

Matériels et méthodes

Différents tampons ont été préparés : un tampon de coating en diluant une gélule de carbonate de sodium dans 50mL d'eau distillée, de lavage : PBS/Tween 0,05% et un tampon de saturation : PBS/Tween 0.05%, BSA 0.1%.

Cette technique ELISA sandwich se déroule sur 3 jours. A J1, la plaque ELISA est coatée avec l'anticorps anti hIL-22BP et mise à incuber à 4°C toute la nuit. A J2, après une étape de saturation de 2 heures à 37°C, 100µL de standard ou d'échantillons dilués au 1,5 dans le tampon PBS/Tween 0.05%, BSA 0.1% sont distribués et mis à incuber à 4°C. Le J3 correspond à la phase de détection comprenant 2 étapes de 1 heure à 37°C : ajout d'un anticorps de lapin anti IL-22BP humaine, puis dans un second temps d'un anticorps anti-anticorps de lapin biotinylé. La plaque est ensuite révélée par ajout successif de streptavidine diluée au 1/1000^{ième} puis du substrat de l'enzyme : le TMB de chez Sigma®. La lecture est faite sur l'automate Tecan® à la longueur d'onde de 450 nm avec une correction celle de référence égale à 630 nm.

6. *Analyses statistiques*

Toutes les analyses ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism Software® (GraphPad Software, San Diego, CA). Le test non paramétrique de Mann-Whitney nous a permis de comparer deux échantillons indépendants de petite taille. Pour plus de 2 échantillons, le test de Kruskal-Wallis a été employé. Pour des échantillons appariés, nous avons utilisé le test non paramétrique de Wilcoxon. Le seuil de significativité a été fixé à 0.05.

V. Résultats

1. Augmentation de l'expression des cytokines pro inflammatoires au niveau de la muqueuse lésionnelle des patients atteints de MC et RCH

Dans la cohorte de patients MICI sélectionnés, l'analyse de l'expression des cytokines IL-22, IL-17 et TNF sur les biopsies appariées a d'abord été effectuée. Afin d'apprécier la régulation d'expression de ces cytokines au cours des MICI, les résultats ont été exprimés en induction, ou « Fold Change » (FC), en divisant le niveau d'expression mesuré en unités arbitraires (u. a) dans la muqueuse inflammatoire par celui mesuré dans la muqueuse saine appariée. Les **Figure 16 A** et **B** montrent une augmentation significative de l'expression de l'IL-22, IL-17 et du TNF dans la muqueuse inflammatoire des patients atteints de MC et de RCH, respectivement.

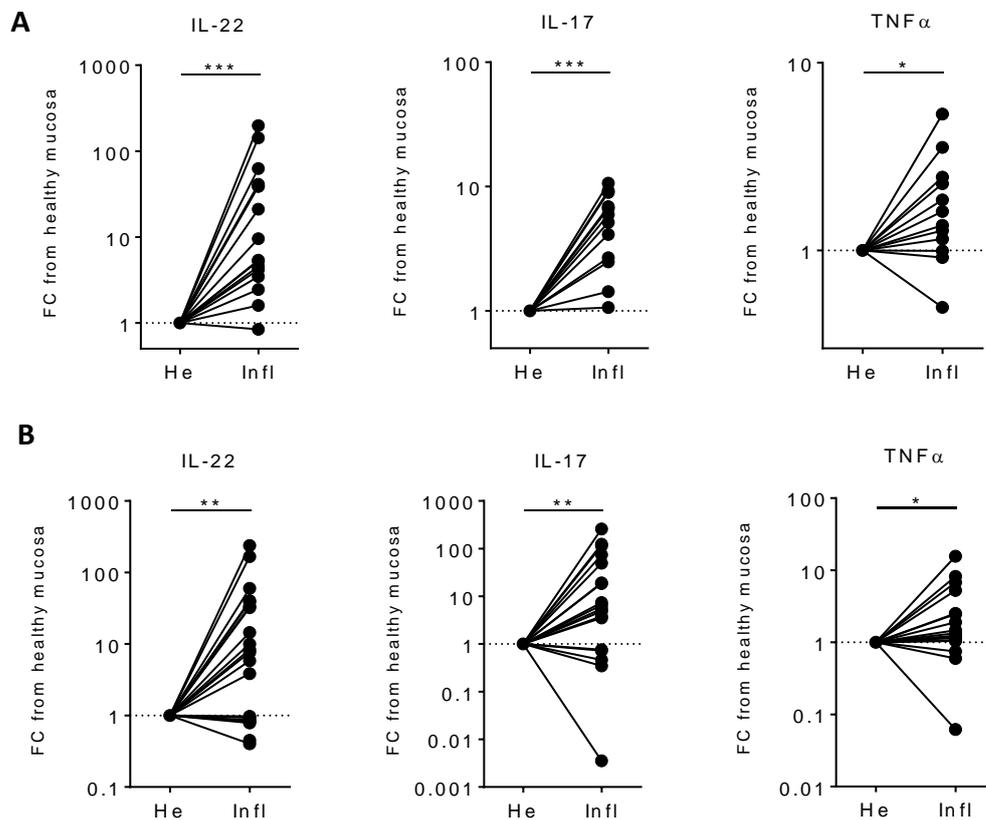


Figure 16 : Fold Change (FC) des gènes de l'IL-22, IL-17 et TNF au cours des MICI. Le FC est obtenu en divisant le niveau d'expression mesuré en unités arbitraires dans la muqueuse inflammatoire (Infl) par celui mesuré dans la muqueuse saine appariée (He). (***) $P < 0.001$; (**) $P < 0.01$; (*) $P < 0.05$)

- A. Fold Change dans la cohorte de patients atteints de maladie de Crohn (n=17)
- B. Fold Change dans la cohorte de patients atteints de Rectocolite Hémorragique (n=21)

Résultats

Les cellules épithéliales intestinales (IEC) représentent une cible majeure de ces cytokines, l'augmentation de leur expression dans la muqueuse inflammatoire est donc prédite pour avoir un impact sur leurs fonctions. Le TNF exerce des effets néfastes sur la muqueuse intestinale en induisant la rupture des jonctions serrées ainsi que l'apoptose des IEC (Su et al., 2013). La stratégie ayant consisté à neutraliser les excès de TNF s'est avérée bénéfique (Hanauer et al., 2006b; Colombel et al., 2010b). *A contrario*, ainsi que discuté plus haut, les deux autres cytokines (IL-22 et IL-17) semblent favoriser le renforcement de la barrière épithéliale.

2. Etude de la régulation de l'expression des gènes cibles de l'IL-22 et IL-17

La **Figure 17** illustre la régulation chez les MC (**Figure 17A**) et les RCH (**Figure 17B**) de l'expression de gènes candidats prédits pour être induits par l'IL-22 et/ou l'IL-17 en zone inflammatoire par rapport à celle en zone saine.

a) Analyse dans la cohorte de patients atteints de MC

Les graphiques de la **Figure 17A** mettent en évidence une augmentation significative de l'expression des gènes *LCN2* et *BD2*. Seule une tendance à la hausse est observée pour *BD3* et *REG3G* codants les deux autres peptides antimicrobiens (PAMs) analysés. Le niveau d'expression des gènes (*MUC1* et *MUC2*) codants les mucines ne change pas au sein de la zone lésée. L'expression de *FUT2* stimulée par la fixation de l'IL-22 sur son récepteur chez la souris (Pham et al., 2014) n'est pas induite chez les patients MC. Enfin l'expression d'*IL-18* au niveau de la muqueuse lésionnelle apparaît significativement diminuée de moitié.

b) Analyse dans la cohorte de patients atteints de RCH

La **Figure 17B** s'intéresse à la régulation de ces mêmes gènes chez les patients souffrant de RCH. Les gènes codants les mucines ainsi que les PAMs étudiés sont tous, excepté *REG3G*, significativement induits au sein de la muqueuse inflammatoire. L'expression de *FUT2* est inchangée. Enfin, contrairement aux patients atteints de MC, nous pouvons observer une élévation de l'expression d'*IL-18*. Le gène *Reg3g* est considéré comme un bon gène de réponse de l'IL-22 dans les modèles murins (Zheng et al., 2008). Chez l'homme, *REG3G* apparaît faiblement induit puisque son expression n'est pas significativement augmentée en zone inflammatoire. De plus nos résultats mettent en évidence une faible expression du gène au niveau des muqueuses de patients souffrant de MICI en raison du faible nombre de points représentés ainsi qu'une grande variabilité de son expression.

Résultats

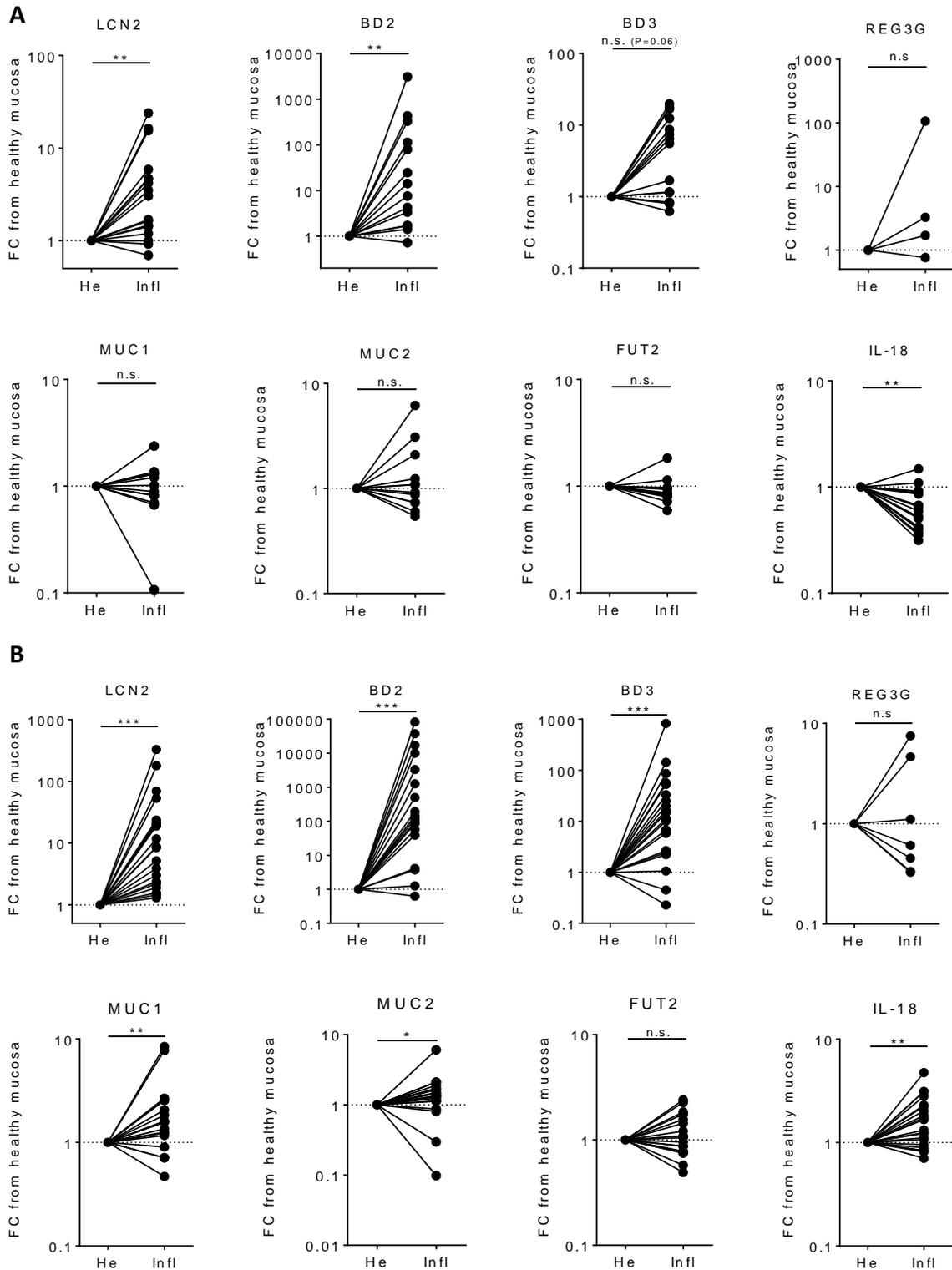


Figure 17 : Fold Change (FC) des gènes cibles de l'IL-22 et IL-17 dans la cohorte de patients souffrant de MICI. Le FC est obtenu en divisant le niveau d'expression mesuré en unités arbitraires dans la muqueuse inflammatoire (Infl) par celui mesuré dans la muqueuse saine appariée (He). (***) $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; n.s = non significatif)

A. Fold Change dans la cohorte de patients atteints de maladie de Crohn (n=17)

B. Fold Change dans la cohorte de patients atteints de Rectocolite Hémorragique (n=21)

Résultats

La **Figure 17** semble illustrer le fait qu'au sein de la muqueuse lésée des patients souffrant de MICI, une réponse se met en place et aboutit à une induction importante des gènes prédits pour être régulés par l'IL-22 et IL-17 et jouant des rôles importants dans le renforcement de la barrière épithéliale intestinale.

3. Analyse différentielle entre MC et RCH de la régulation de l'expression des gènes de réponse de l'IL-22 et IL-17

La MC et la RCH sont deux pathologies sensiblement proches bien qu'elles se distinguent sur certains points comme l'atteinte histologique. C'est pourquoi nous avons voulu comparer entre MC et RCH le niveau d'induction en zone inflammatoire des gènes prédits pour être régulés par l'IL-22 et l'IL17, afin d'évaluer si la capacité de réponse de l'épithélium à la présence de ces cytokines est similaire entre les deux maladies ou non. Cette comparaison a été jugée possible puisque la **Figure 18A** met en évidence un niveau d'expression basal de ces gènes non différent dans la muqueuse saine des deux maladies. Par ailleurs, la **Figure 18B** montre que le gène *EPCAM*, exprimé essentiellement par l'épithélium et codant pour une glycoprotéine transmembranaire jouant un rôle dans l'adhérence entre deux cellules épithéliales, présente un niveau d'expression similaire, suggérant un nombre égal de cellules épithéliales entre biopsies de MC et RCH (**Figure 18B 1 et 2**). De cette façon, cela nous a permis d'éliminer l'hypothèse que les différences d'expression, entre MC et RCH, pourraient être aussi liées à des différences sur le nombre de cellules cibles exprimant les gènes d'intérêt étudiés. La **Figure 18C**, comparant les FC de chaque gène entre MC et RCH, met en évidence des différences notables. En effet chez les RCH, le gène *LCN2* est induit 7 fois plus en zone inflammatoire, le gène *BD2*, 240 fois plus, le gène *BD3*, 10 fois plus, le gène *MUC1*, 2 fois plus et le gène *IL-18*, 3 fois plus. L'expression du gène *REG3G* n'est pas différente, cependant une tendance à la hausse chez les RCH est observable.

L'induction des gènes cibles, bien qu'existante chez les MC et RCH, semble être moins prononcée chez les MC. Un défaut d'induction des β -défensines au niveau des colons des MC a été rapporté par d'autres (Wehkamp et al., 2003b). Lorsque l'on sait la place primordiale que tient la barrière muqueuse intestinale dans la physiopathologie et l'évolution des MICI, il paraît intéressant de chercher à la renforcer. Cependant est-il possible de renforcer au sein de la muqueuse inflammatoire des MC les gènes prédits pour être régulés par l'IL-22 et l'IL-17 ? Nous pouvons aussi poser l'hypothèse que ce défaut d'induction pourrait être dû à un terrain génétique propre à la MC.

Résultats

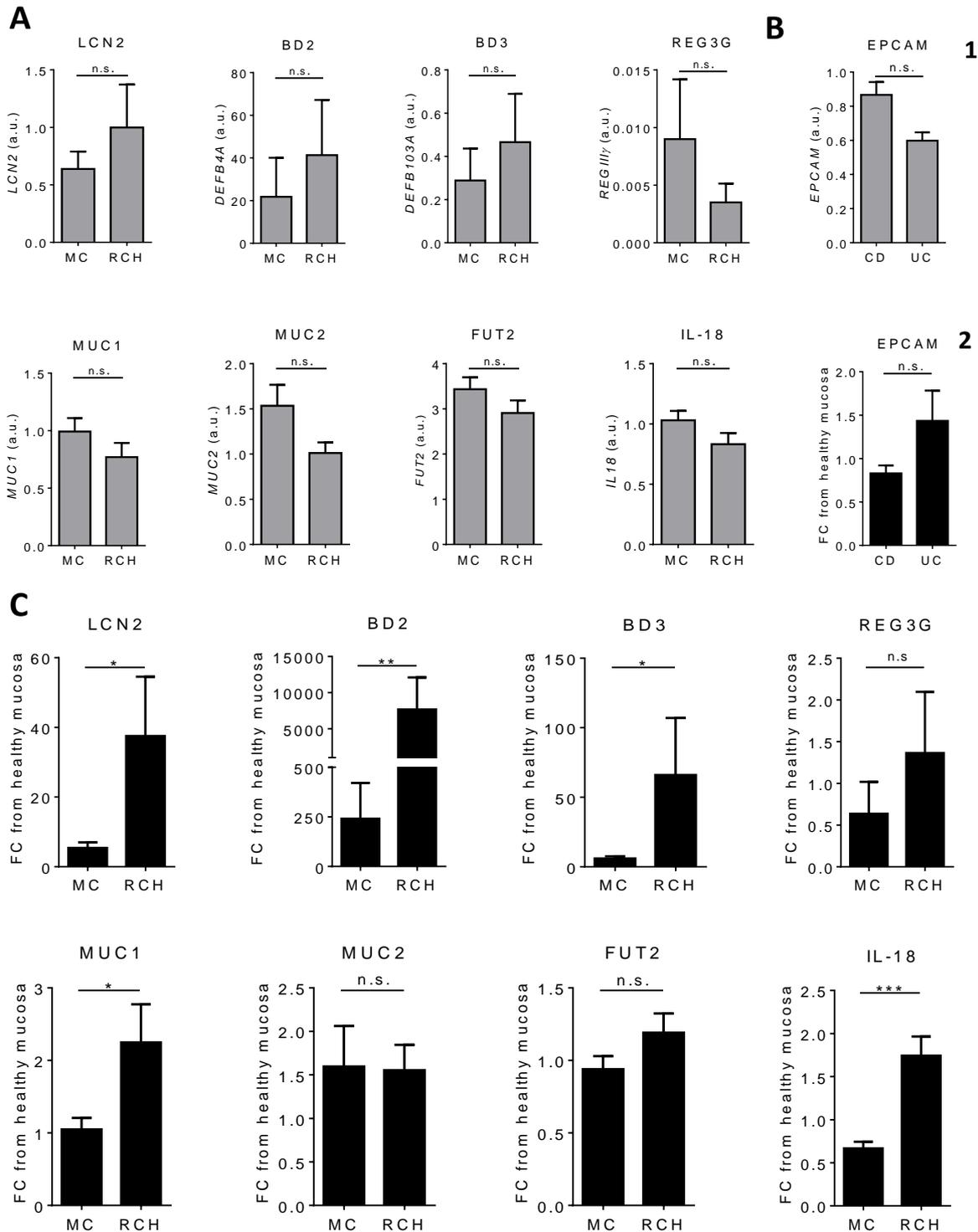


Figure 18 : Analyse comparative entre MC et RCH

- Niveau d'expression en unités arbitraires (a.u) des gènes cibles de l'IL-22 et/ou IL-17 dans la muqueuse saine des MC (n=17) et des RCH (n=21)
- Comparaison de l'expression en unités arbitraires (a.u) du gène *EPCAM* en zone saine (He) (1) et du FC en zone inflammatoire (Inf) (2)
- Fold Change (FC) des différents gènes de réponse de l'IL-22 et de l'IL-17. Analyse des FC dans la cohorte de patients atteints de MICI. (***) $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; n.s = non significatif).

4. *Stimulation ex vivo de biopsies fraîches de patients souffrant de MC*

1. Etude du renforcement des propriétés de barrière des cellules épithéliales

i. Au sein de l'iléon

Pour attester de la possibilité de renforcer l'expression de ces gènes candidats, nous avons stimulé pendant 6 heures, 6 biopsies fraîches prélevées au niveau de l'iléon avec un excès d'IL-22 et d'IL-17. Afin d'évaluer la possible induction de ces gènes cibles, les résultats sont exprimés en « Fold Change » correspondant au ratio du niveau d'expression mesuré en unités arbitraires dans la muqueuse avec le cocktail cytokinique par celui mesuré dans la muqueuse avec le milieu de culture seul.

Nous pouvons constater sur la **Figure 19A** une tendance à une induction de certains gènes après stimulation cytokinique puisque les FC sont égaux à 30 pour *BD2* et à 4 pour *BD3*. Pour ces biopsies iléales nous avons aussi étudié l'effet d'une stimulation cytokinique sur l'expression des alpha-défensines (*HD5* et *HD6*) sécrétées spécifiquement par les cellules de Paneth. Les résultats présentés sur la **Figure 19A** ne soulignent pas d'effet majeur d'une stimulation de l'IL-22 et IL-17 sur l'expression de *DEFA5* et *DEFA6* codant respectivement *HD5* et *HD6*. Enfin cette stimulation des biopsies iléales ne tend pas à induire *LCN2* ni les gènes (*MUC1* et *MUC2*) codant les mucines ainsi que l'enzyme responsable de la fucosylation (*FUT2*).

ii. Au sein du colon

Afin d'évaluer l'effet au niveau du colon, nous avons stimulé pendant 6 heures, 21 biopsies coliques fraîches prélevées en zone inflammatoire avec un excès d'IL-22 et d'IL-17. Le niveau d'expression des gènes a été évalué sur les 21 ARNm extraits des biopsies stimulées, hormis *MUC1*, *MUC2* et *IL22R* où nous avons seulement étudié 8 ARNm.

Nous pouvons remarquer sur la **Figure 19B** une induction significative de certains gènes après stimulation cytokinique puisque les FC sont égaux à 6 pour *LCN2*, 124 pour *BD2*, 3 pour *BD3* et 1,5 pour *FUT2*. Le gène codant l'IL-18 est inhibé suite à une stimulation par l'IL-22 et l'IL-17 : le FC égal à 0,7. Une tendance à la hausse est observée pour le gène *REG3G* mais l'absence de significativité peut être expliquée par la grande variabilité de son expression. Les FC des gènes *MUC1*, *MUC2* et *CLDN4* (codant la claudine 4 : une protéine des jonctions serrées) sont sensiblement proches de 1. De même aucun changement d'expression n'est à noter concernant les gènes codants pour l'IL-22, son récepteur ainsi que son inhibiteur soluble.

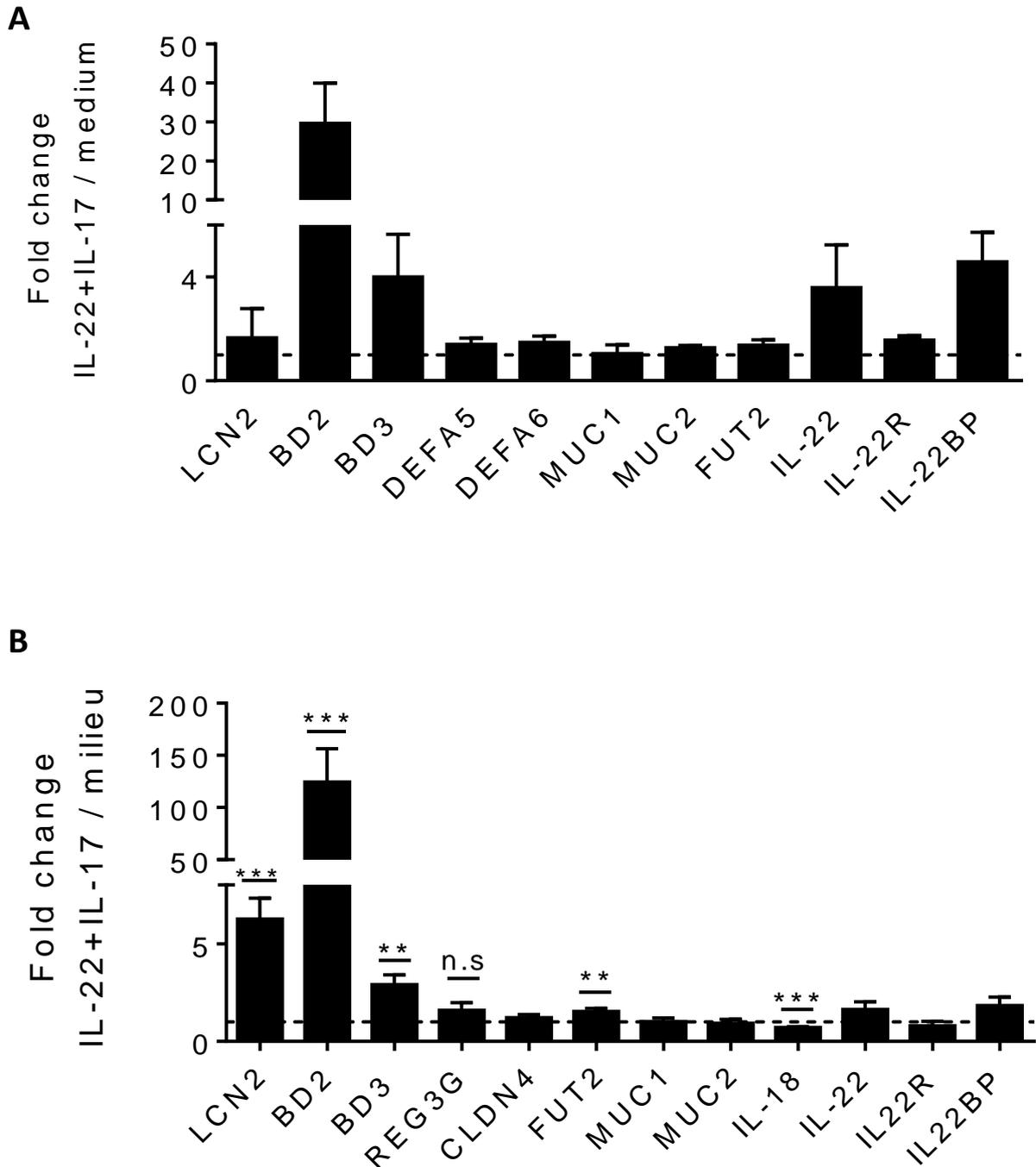


Figure 19 : Fold Change (FC) des différents gènes de réponse de l'IL-22 et IL-17 après stimulation cytokinique. Le FC correspond au ratio du niveau d'expression mesuré en unités arbitraires dans la muqueuse avec le cocktail cytokinique par celui mesuré dans la muqueuse avec le milieu de culture uniquement. Stimulation pendant 6 heures, à 37°C, sous 5% de CO₂ avec de l'IL-22 et de l'IL-17 de **A**) n=6 biopsies iléales et de **B**) n=21 biopsies coliques de patients MC (***P<0.001 ; **p<0,01 ; *P<0.05 ; n.s = non significatif).

Résultats

Ces résultats suggèrent la possibilité de renforcer, *ex vivo* au sein de la muqueuse des patients MC, l'expression des gènes décrits comme de réponse à l'IL-22 et à l'IL-17 et impliqués dans le renforcement de la barrière épithéliale. L'induction moindre des gènes cibles au sein de la muqueuse inflammatoire des MC ne semble ainsi pas être constitutive et irréversible.

Puisque l'expression de ces gènes cibles peut être modulée suite à une stimulation cytokinique, il s'agit d'identifier le cocktail cytokinique idéal permettant de potentialiser au mieux leur induction. Les actions de l'IL-22 sont augmentées lorsqu'elle agit en synergie avec l'IL-17 (Liang et al., 2006). Afin de confirmer cette alliance bénéfique et de l'opposer à celle de l'IL-17 et du TNF (vérifiant ainsi la dépendance à l'IL-22) nous avons comparé différentes combinaisons de stimulation cytokinique.

2. Comparaison des profils cytokiniques sur la modulation des gènes de réponse de l'IL-22 et IL-17

Plusieurs cocktails cytokiniques ont été utilisés pour stimuler *ex vivo* les biopsies fraîches de patients MC afin de les comparer entre eux. La **Figure 20** compare entre eux les Fold Change (FC) des gènes cibles en fonction de la combinaison utilisée : IL-22 seule, IL-22+IL-17, TNF+IL-17. Seuls les gènes dont l'expression avait été modulée de manière significative par le cocktail IL-22+IL-17 sont représentés. De plus pour chaque combinaison, seules 16 biopsies ont pu être stimulées en raison de la variabilité du nombre de prélèvements par patient.

L'expression du gène *LCN2* est induite par 10 lors d'une stimulation par TNF+IL-17, par 6 en présence d'IL-22+IL-17 et seulement de 2 avec de l'IL-22 seule. L'expression de *BD2* est multipliée par 10 sous la condition IL-22, par 100 sous la condition IL-22+IL17 et par 190 sous TNF+IL-17. Il s'agit du PAM le plus inductible. Les gènes *BD3* et *REG3G* ont sensiblement le même comportement face aux différentes conditions. La plus forte induction est observée lors d'une stimulation par IL-22 seule : FC de moyenne égale à 4 pour *BD3* et de 2,6 pour *REG3G*. Aucun changement du FC de ces gènes n'est à noter en présence de TNF dans le milieu de culture. Quant au gène codant pour l'IL-18 il tend à être inhibé : la moyenne du FC égale à 0,7 après culture avec de l'IL-22+IL-17 et égale à 0,5 après stimulation avec du TNF. Enfin le gène *FUT2* est le plus induit en présence du cocktail contenant du TNF : moyenne du FC égale à 2,5. L'étude de l'axe IL-22/IL-22R et de l'IL-22BP après stimulation par ces 3 cocktails cytokiniques ne met pas en évidence de changement de l'expression des gènes codants pour

Résultats

IL-22R ainsi qu'IL-22BP. Étonnamment, lors d'une stimulation par TNF+IL-17 l'expression du gène *IL22* est multipliée par 12.

La synergie existante entre l'IL-22 et l'IL-17 est assez bien illustrée. En comparaison à la condition de stimulation contenant uniquement de l'IL-22, en présence du cocktail IL-22+IL-17, le FC du gène *LCN2* est 3 fois plus important, celui de *BD2* est 10 fois plus.

La comparaison des trois cocktails cytokiniques nous a permis d'étudier les mécanismes de régulation de l'expression des gènes codant pour 4 PAM (*LCN2*, *BD2*, *BD3*, *REG3G*), l'IL-18 (*IL18*) et l'enzyme de la fucosylation (*FUT2*). Certains semblent exclusivement dépendants de l'IL-22, d'autres ont besoin de la synergie IL-22+IL-17, ou sont complètement indépendants de l'IL-22. Ainsi les gènes *LCN2*, *BD2* semblent avoir le même profil : l'induction la plus forte est observée en présence de TNF+IL-17 même si elle n'est pas significativement différente de celle en présence d'IL-22+IL-17. Le gène codant pour l'IL-18 suit ce même profil cytokinique de régulation cependant après stimulation *ex-vivo* nous avons observé une inhibition de son expression. Ce rétrocontrôle négatif de l'expression du gène *IL18* est conforme à la tendance observée lors de l'analyse des FC d'induction entre muqueuse saine et inflammatoire dans la cohorte de patients MC (**Figure 17**). L'expression des deux autres PAMs étudiés : *BD3* et *REG3G*, tend à être exclusivement dépendante de l'IL-22 dans les conditions testées. L'expression de *FUT2* est induite de façon significative seulement en présence de TNF et d'IL-17 en comparaison à la condition IL-22 seule, soulignant une régulation essentiellement sous la dépendance du TNF.

Puisque l'induction de ces gènes est moins prononcée chez les MC, on peut envisager qu'au sein de leur muqueuse un des protagonistes clé est absent ou inhibé.

Résultats

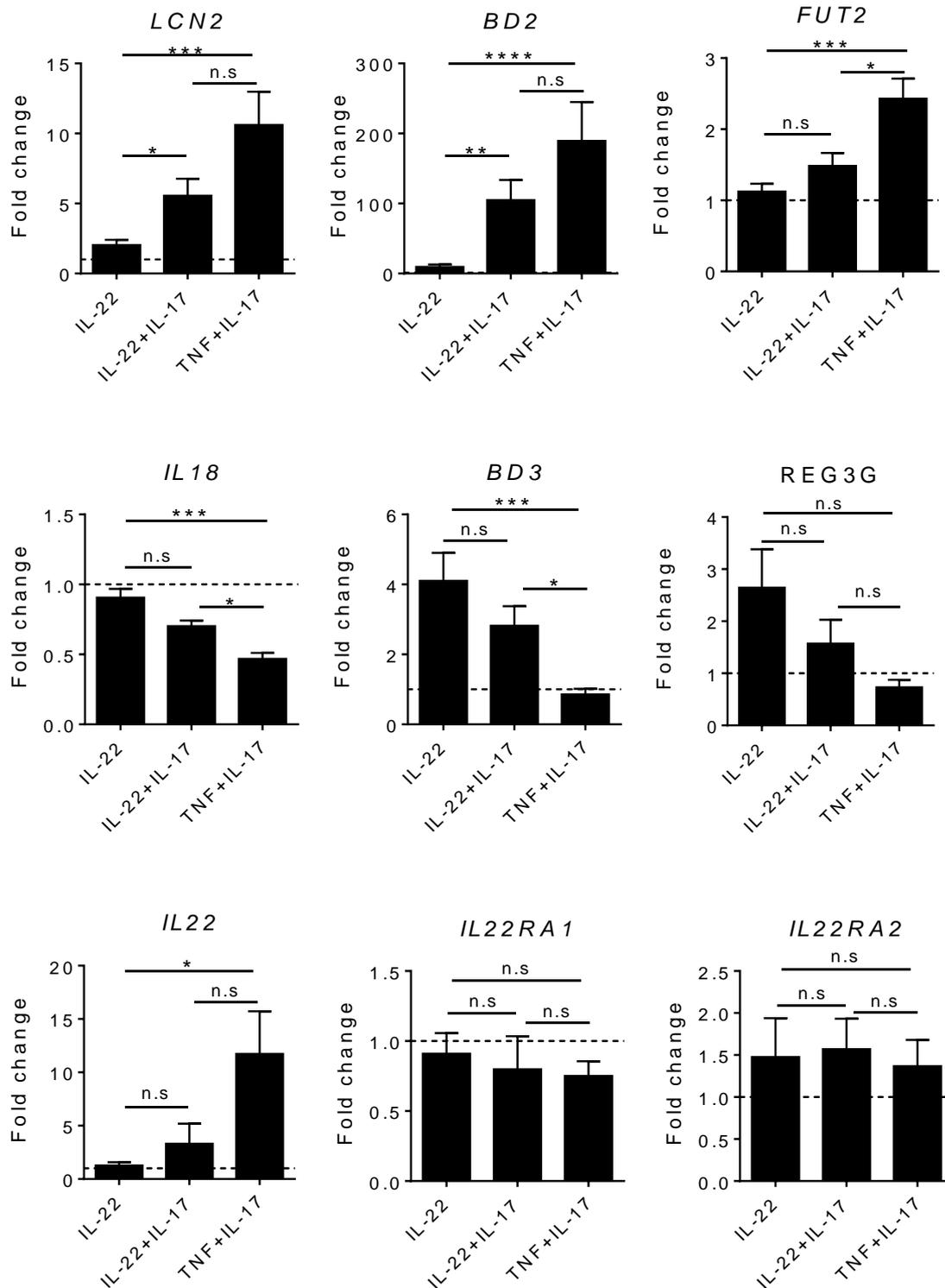


Figure 20 : Analyse comparative des Fold Change (FC) des gènes de réponse de l'IL-22 et IL-17 en fonction du cocktail cytokinique choisi. Stimulation pendant 6 heures, à 37°C, sous 5% de CO₂. Pour chaque condition n= 16 biopsies coliques de patients atteints de MC. (***)P<0.001 ; **)p<0,01 ; *)P<0.05 ; n.s = non significatif)

Résultats

3. Analyse de l'effet, sur les stimulations *ex-vivo*, de l'ajout de l'IL-22BP dans le milieu de culture.

Nous savons que la particularité de l'IL-22 est de posséder un inhibiteur soluble et spécifique : l'IL-22BP (Dumoutier et al., 2001). Les résultats présentés dans les **Figure 19** et **Figure 20** soulignent une induction de l'expression des gènes candidats après stimulation en présence d'IL-22 et d'IL-17. En ajoutant de l'IL-22BP dans le milieu de culture, nous avons voulu vérifier, au niveau de la muqueuse inflammatoire humaine, notre hypothèse d'un effet bloquant de ce dernier sur les actions induites par l'IL-22. Il s'agissait aussi de vérifier que l'IL-22BP n'induit pas d'autres effets chez l'homme non encore décrits.

Dans cette expérience, les biopsies coliques ont toutes été stimulées par de l'IL-22+IL-17 puis avec une condition contenant de l'IL-22BP en excès afin de comparer IL-22+IL-17 versus IL-22+IL-17+IL-22BP. La **Figure 21** compare les FC des gènes de réponse en fonction de l'ajout d'IL-22BP dans le milieu de culture. Concernant l'expression de *BD2*, la même induction que celle décrite précédemment (**Figure 20**) est retrouvée lors d'une stimulation avec de l'IL-22+IL-17 : la moyenne du FC est égale à 140. Après ajout de l'IL-22BP, la moyenne du FC est divisée par 2,5 suggérant une possible inhibition de l'IL-22 par l'IL-22BP. Sur la **Figure 20**, les gènes *BD3* et *REG3G* apparaissaient comme étant les plus induits en présence d'IL-22, indiquant une forte dépendance à cette cytokine. Après stimulation avec de l'IL-22BP, la moyenne du FC de *BD3* est divisée par 2,7 et celle de *REG3G* par 3,8, soulignant donc une annulation de l'induction en présence de l'inhibiteur. Pour les gènes *FUT2*, *IL18*, *LCN2* il ressortait une induction maximale essentiellement sous la dépendance du TNF. Nous pouvons constater que l'ajout d'IL-22BP à la condition de culture IL-22+IL-17 n'a eu aucun effet puisque les moyennes des FC ne sont pas significativement modifiées.

Les résultats de stimulation *ex-vivo* des biopsies fraîches semblent démontrer un effet bloquant de l'IL-22BP sur les gènes prédits pour être induits par l'IL-22 présente dans notre milieu de culture. Notre analyse comparative entre MC et RCH a mis en évidence une induction des gènes de réponse induits par l'IL-22 moins prononcée chez les MC. Ces données suggèrent l'hypothèse que des niveaux d'expression d'IL-22BP différents entre MC et RCH pourraient expliquer les différences d'induction observées.

Résultats

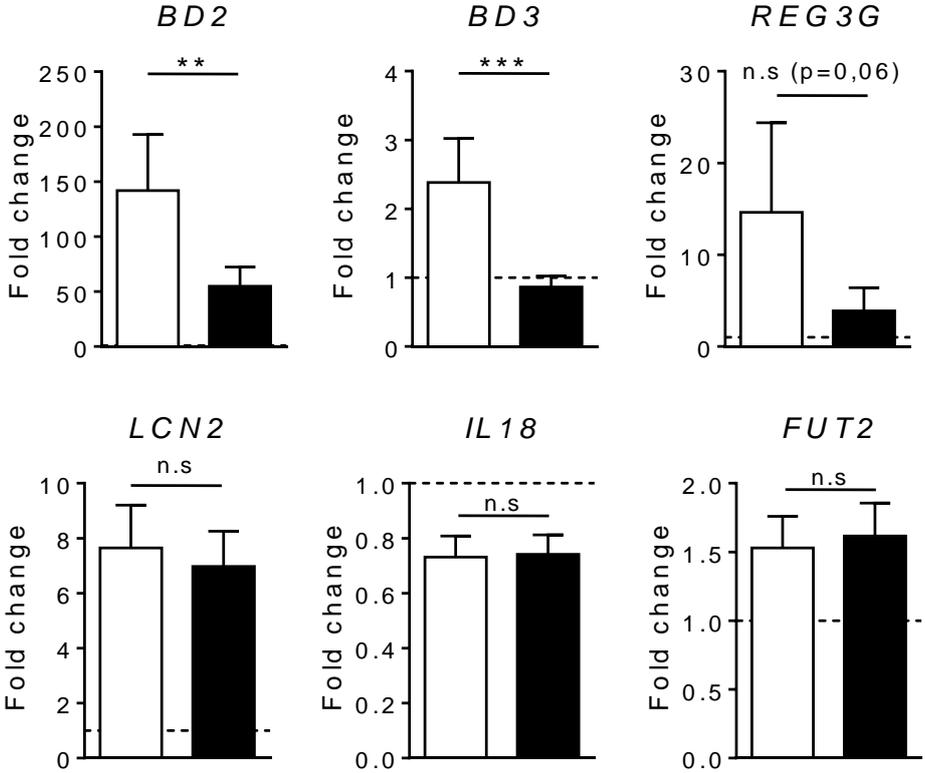


Figure 21 : Comparaison des FC des gènes de réponse en fonction de l'ajout d'IL-22BP dans les conditions de stimulation. Stimulation pendant 6 heures, à 37°C sous 5% de CO₂ avec le cocktail cytokinique IL-22+IL-17 de n=12 biopsies coliques. (***P<0.001 ; **p<0,01 ; *P<0.05 ; n.s = non significatif)

5. *Evaluation de l'expression d'IL-22BP au cours des MICI*

a) Augmentation de l'expression de l'IL-22BP au sein des muqueuses lésionnelles MC et RCH

L'expression d'IL-22 est augmentée au niveau de la muqueuse inflammatoire (**Figure 16**) (Andoh et al., 2005 ; Martin et al., 2016). Avant 2016, celle de l'IL-22BP au cours des MICI n'a jamais été évaluée par une autre équipe. Les résultats exposés sur la **Figure 22** complètent, sur un plus grand nombre de patients, l'analyse des expressions des gènes codants l'IL-22BP ainsi que la chaîne spécifique du récepteur de l'IL-22 au sein des muqueuses inflammatoires des patients atteints de MICI (Martin et al., 2016).

Leurs FC d'induction en zone inflammatoire par rapport à la muqueuse saine sont représentés chez les MC (**Figure 22A**) et chez les RCH (**Figure 22B**). L'expression du gène codant IL22R1 n'est pas modifiée au sein de la muqueuse lésionnelle des MICI. Tandis que celle du gène codant pour l'IL-22BP est significativement induite chez les RCH et tend à être plus forte chez les MC.

b) Analyse différentielle de l'expression d'IL-22BP entre MC et RCH

La **Figure 22C** compare, entre MC et RCH, les FC d'induction en zone inflammatoire du gène codant l'IL-22BP. La moyenne du FC est égale à 2,8 pour les MC et à 4,6 pour les RCH. L'analyse statistique n'a pas montré de différence significative entre les deux FC.

Cependant il ne s'agit que de l'expression en ARNm, nous ne pouvons pas omettre l'hypothèse qu'une modification post transcriptionnelle ait eu lieu. De plus, le dosage protéique de l'IL-22BP s'avère compliqué. Une des alternatives a été de réaliser un marquage de la protéine en immunohistochimie sur des coupes de colon. De cette manière l'expression protéique de l'IL-22BP au sein de la muqueuse inflammatoire a pu être comparée entre MC et RCH (**Figure 22D**). L'analyse différentielle de l'intensité de marquage des cellules IL-22BP⁺ met en évidence une augmentation significative chez les patients MC en comparaison aux RCH.

Ces données laissent suggérer l'hypothèse que la surexpression d'IL-22BP, observée au niveau des muqueuses inflammatoires, plus importante chez les MC en comparaison aux RCH pourrait gêner les actions protectrices de l'IL-22 et constituer une des explications du défaut d'induction des gènes impliqués dans le renforcement de la barrière épithéliale. Malheureusement, il ne s'agit que d'une évaluation semi-quantitative de l'expression protéique d'IL-22BP. L'objectif suivant a été de mettre au point une méthode de dosage plus robuste de cette dernière afin d'attester de la tendance observée en immunohistochimie.

Résultats

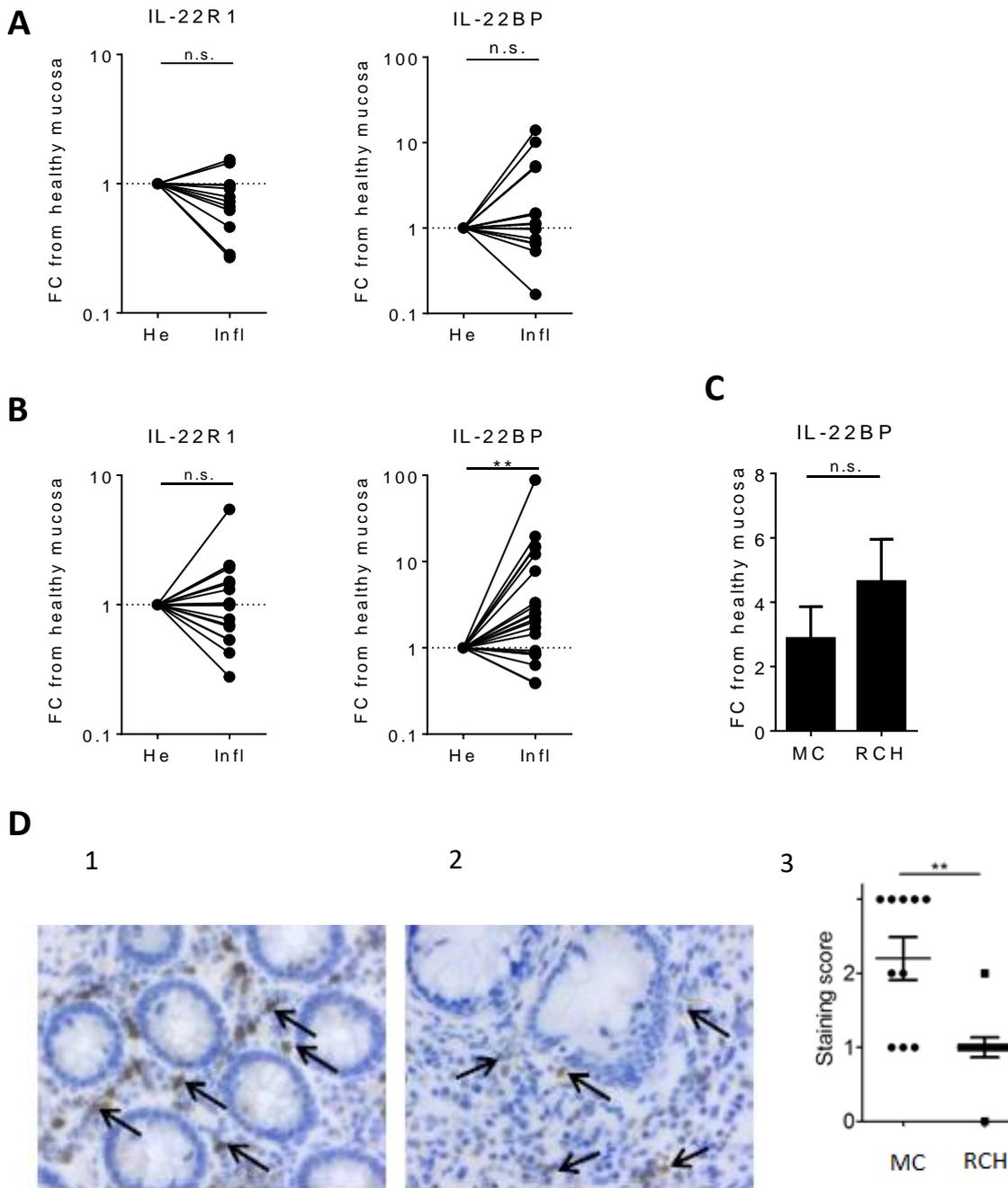


Figure 22 : Etude de la régulation de l'expression de l'IL-22BP au cours des MICI

- A) Fold Change de l'expression des gènes codant pour IL-22R et IL-22BP dans une cohorte de patients atteints de MC (n=17)
- B) Fold Change de l'expression des gènes codant pour IL-22R et IL-22BP dans une cohorte de patients atteints de RCH (n=21)
- C) Comparaison des FC du gène de l'IL-22BP entre MC et RCH
- D) Marquage en immunohistochimie de la protéine IL-22BP. Coupes de colon de MC (1) et de RCH (2). Comparaison du score d'intensité du marquage des cellules IL-22BP⁺ entre MC et RCH (3)

Résultats

c) Mise au point d'une méthode de dosage de l'IL-22BP protéique

Il s'agit de mettre au point une méthode de dosage sensible et spécifique de l'IL-22BP protéique afin de quantifier la protéine sur des lysats protéiques issus de biopsies de la même cohorte de l'IMAD que celle décrite précédemment. Le but étant de corroborer l'analyse semi-quantitative du marquage en immunohistochimie des cellules IL-22BP⁺, à savoir une intensité plus forte chez les patients MC. Pour réaliser cette étape et basé sur le fait qu'il n'existe pas de kit commercial fiable entre nos mains, nous avons mis au point un ELISA maison IL-22BP. Notre première stratégie s'est avérée non fructueuse en raison d'un bruit de fond de notre témoin négatif assez conséquent.

Par la suite nous nous sommes inspirés du protocole ELISA IL-22BP mis au point par l'équipe de Du Pasquier (Perriard et al., 2015) et ayant une sensibilité de détection égale à 0,5 ng/mL. Après plusieurs essais de concentration de l'anticorps de coating nous sommes parvenus à la mise au point d'un ELISA sandwich permettant un dosage quantitatif de l'IL-22BP avec une sensibilité de détection égale 0,75ng/mL (**Figure 23**). L'étape suivante consistera en l'analyse du dosage de l'IL-22BP au sein des lysats protéiques issus de biopsies MC et RCH

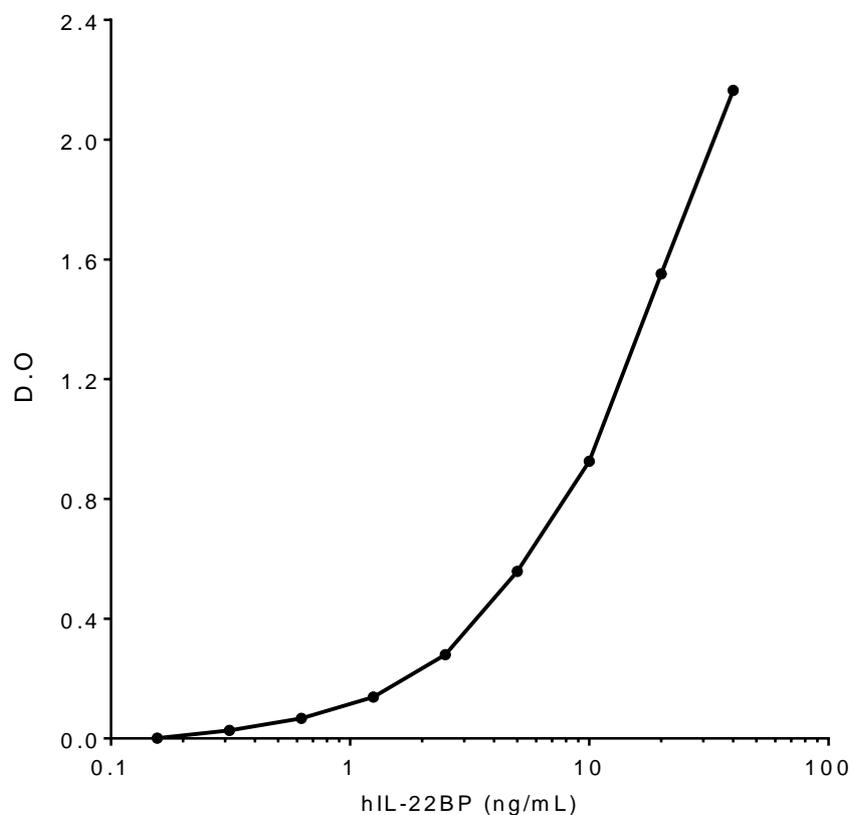


Figure 23 : Courbe étalon du standard hIL-22BP dosé par méthode ELISA. Gamme comprise entre 0.156 à 40 ng/mL.

VI. Discussion

Avec ce projet, nous avons approfondi l'étude, chez l'homme au cours des MICI, du comportement biologique de l'IL-22 lorsqu'elle agit en synergie avec l'IL-17 ainsi que celui de l'IL-22BP, son inhibiteur spécifique. Nous avons mis en évidence une induction moins prononcée au niveau de la muqueuse inflammatoire des patients MC en regard des RCH, des gènes de réponse de l'IL-22 et de l'IL-17 impliqués dans le renforcement des propriétés de barrière de la muqueuse intestinale. Nous avons aussi démontré, pour la première fois, que cette réponse pouvait être renforcée en stimulant *ex vivo*, avec un excès d'IL-22 et IL-17, des biopsies fraîches coliques et/ou iléales prélevées chez des patients atteints de MC et que l'ajout d'IL-22BP dans le milieu de culture bloque les effets de l'IL-22. Enfin, l'analyse de l'IL-22BP sur la cohorte de patients souffrant de MICI a montré une augmentation de son ARNm au sein de leurs muqueuses inflammatoires et que la forme protéique tend à être plus exprimée chez les MC.

L'IL-22 et l'IL-17 sont connues pour avoir des actions bénéfiques dans de nombreux modèles murins de colite. En effet, ces cytokines permettent le renforcement des propriétés de barrière de l'épithélium intestinal, en induisant la production de peptides antimicrobiens (PAMs) (Kolls et al., 2008b ; Zheng et al., 2008 ; Raffatellu et al., 2009), des mucines (Sugimoto et al., 2008), de l'IL-18 (Muñoz et al., 2015), la mise en place des jonctions serrées (Lee et al., 2015) ainsi que la fucosylation des cellules épithéliales (Pham et al., 2014). Récemment, Moyat et ses collègues ont confirmé le rôle protecteur de l'IL-22 contre l'invasion par des pathogènes tels que *H.pylori* décrit pour coloniser la muqueuse gastrique (Moyat et al., 2017). En effet dans leur modèle, les souris vaccinées puis infectées sont protégées de l'invasion microbienne grâce à la production de PAMs appartenant à la famille REG. L'induction de l'expression de ces PAMs est sous la dépendance de l'IL-22 puisque l'ajout d'un anticorps anti-IL-22 s'accompagne d'une chute de leur production. De même, chez les souris déficientes pour le gène *Il22*, une baisse similaire est constatée. Alors que l'adjonction d'IL-22 recombinante permet de restaurer le niveau d'expression de ces PAMs au cours d'infections.

Ainsi, il nous est apparu important de les étudier chez l'homme dans un contexte d'inflammation chronique : les MICI où leurs expressions sont significativement augmentées (Andoh et al., 2005 ; Rovedatti et al., 2009). Notre analyse rétrospective sur la cohorte de patients atteints de MC et RCH, confirme l'induction de l'expression de l'IL-22 et IL-17 au sein

Discussion

des muqueuses inflammatoires (**Figure 16**). Lors de l'étude des gènes de réponse à ces cytokines, nos résultats ont mis en évidence une induction significative des gènes codant les PAMs : *LCN2*, *BD2* et *BD3* au niveau des muqueuses inflammatoires des MC et RCH (**Figure 17**). Leur augmentation en zone lésée, importante pour stimuler les propriétés de barrière grâce à leur capacité de neutralisation des micro-organismes pathogènes et commensaux, a déjà été démontré pour les β -défensines lors d'étude sur des cohortes de patients MC (Wehkamp et al., 2002) et RCH (Fahlgren et al., 2003). Récemment, Moschen et ses collaborateurs ont souligné le rôle primordial de la lipocaline 2 dans la protection de la muqueuse intestinale contre les processus inflammatoires. En effet, ils ont mis en évidence chez le rongeur que les absences combinées de son activité bactériostatique et des propriétés immunorégulatrice de l'IL-10, donnent l'opportunité à des germes (*Alistipes spp*) de coloniser la muqueuse intestinale conduisant au développement d'un environnement inflammatoire intestinal (Moschen et al., 2016).

De plus, chez les patients atteints de RCH, les gènes *MUC1*, *MUC2* et *IL18* sont induits significativement en zone inflammatoire. Le rôle exercé au niveau de la muqueuse intestinale par l'IL-18 qui est secrétée suite à une activation de l'inflammasome, semble controversé. En effet, il a été démontré qu'un défaut de production d'IL-18 s'associait à une rupture de l'homéostasie intestinale à l'origine d'une inflammation non contrôlée. De plus pour certains auteurs, l'IL-18 aurait un rôle protecteur au cours des modèles de colites expérimentales (Gonçalves and Di Santo, 2016). Par opposition, dans leurs expériences Nowarski et ses collègues mettent en avant son caractère inflammatoire en partie lié à sa capacité à inhiber la maturation des cellules de goblet conduisant ainsi à un affaiblissement de la barrière intestinale. En effet chez des souris déficientes en inhibiteur physiologique de l'IL-18 : l'IL-18 *binding protein*, il a été observé un marquage en immunohistochimie de la mucine MUC2 diminué allant de pair avec une diminution de la maturation de ces cellules (Nowarski et al., 2015).

Nous avons donc au niveau de la muqueuse inflammatoire des patients MICI, une augmentation des cytokines de l'immunité muqueuse permettant ainsi une induction de leurs actions sur les cellules épithéliales intestinales afin de potentialiser les propriétés de barrière de la muqueuse intestinale indispensable pour maintenir l'homéostasie.

Discussion

L'analyse comparative a mis évidence une induction des gènes prédits pour être régulés par l'IL-22 et IL-17 moins prononcée chez les MC en comparaison aux RCH. En effet, les FC des gènes codants les PAMs sont significativement plus bas chez les MC signant un défaut d'induction déjà démontré pour les β -défensines par une autre équipe (Wehkamp et al., 2002), mais aussi ceux de l'IL-18 et de *MUC1* (**Figure 18**). Nous avons réussi à démontrer pour la première fois que ce défaut d'induction observé pouvait être corrigé au sein de la muqueuse inflammatoire des MC. En effet, en stimulant pendant 6 heures *ex vivo* des biopsies fraîches de colon prélevées en zone lésée avec un excès d'IL-22 et d'IL-17, nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'expression des gènes *LCN2*, *BD2*, *BD3* et *FUT2* (**Figure 19B**). Le protocole de stimulation adapté sur des biopsies iléales ne s'est pas accompagné d'une induction significative des gènes codants les PAMs (**Figure 19A**). Cette observation est en lien avec le fait que l'induction des PAMs est présente essentiellement au niveau de la muqueuse colique (Gallo and Hooper, 2012). Quant à la production des α -défensines par les cellules de Paneth, l'induction de leurs expressions ne semble pas être sous l'influence des signaux émis par l'IL-22 et l'IL-17.

De plus, nos travaux nous ont permis de définir les combinaisons cytokiniques de choix pour renforcer au mieux ces gènes impliqués dans le renforcement des propriétés de barrière. Ainsi le gène *LCN2* est le plus induit lors d'une stimulation avec du TNF et de l'IL-17 (**Figure 20**). Une autre équipe a analysé la stimulation de lignées de cellules épithéliales de colon avec divers cocktails cytokiniques et retrouvait une induction maximale de *LCN2* avec la condition TNF+IL-17 : FC après 6 heures de culture égal à 3,9 (Stallhofer et al., 2015). Nos résultats corroborent ces derniers, et indiquent que la lipocaline 2 est un peptide antimicrobien dépendant essentiellement de l'IL-17 et du TNF. Les gènes *LCN2* et de *BD2* sont significativement plus exprimés lors de l'ajout de l'IL-17 à la condition de culture IL-22 seule (**Figure 20**). Ceci a déjà été décrit en stimulant des kératinocytes par de l'IL-22, de l'IL-17 ou les deux ensembles, entraînant une forte augmentation de l'expression de *BD2* (x 36) en présence de la combinaison de cytokines versus l'IL-22 seule (Liang et al., 2006). Ces résultats permettent de conforter l'idée que l'action de l'IL-22 ne doit pas être dissociée de celle de l'IL-17 afin de conserver l'effet synergique. Il est important de souligner qu'à chaque protocole de stimulation nous étions limités en nombre de biopsies fraîches. C'est pourquoi il serait intéressant de comparer en parallèle aux conditions IL-22 et IL-22+IL-17, une condition

Discussion

contenant uniquement de l'IL-17 afin d'attester de l'importance de combiner les effets de l'IL-22 et de l'IL-17. Enfin nos expériences soulignent le fait qu'au sein d'une même famille de PAMs : les bêta-défensines, chaque gène possède son propre mécanisme de régulation. En effet le gène *BD2* est induit par l'IL-22, IL-17 et TNF tandis que le gène *BD3* semble dépendre uniquement de l'IL-22.

La mise en culture des biopsies de MC nous a aussi permis d'identifier des réponses encore inconnues chez l'homme comme l'induction de l'expression du gène codant l'IL-22 après stimulation en présence de TNF (**Figure 20**). Il sera nécessaire d'affiner les mécanismes à l'origine de cette induction, les potentielles répercussions sur les gènes de réponses de l'IL-22, la corrélation avec la prise de traitement par anti-TNF ou l'évaluation de leur efficacité thérapeutique. Par opposition avec nos résultats, dans leurs travaux le groupe de Huber émet l'hypothèse qu'un traitement par anti-TNF bloquerait l'IL-22BP et permettrait ainsi les actions bénéfiques de l'IL-22 (Pelczar et al., 2016). Ainsi ils ont observé une corrélation positive entre les patients bon répondeurs aux anti-TNF et une baisse d'IL-22BP (parallèle à une hausse de l'IL-22).

Ce travail a également permis de clarifier chez l'homme le rôle potentiel de l'IL-22BP sur la régulation des actions induites par l'IL-22 au cours des MICI ainsi que la régulation de son expression. Chez le rongeur, plusieurs études de colites expérimentales ont montré une diminution de son expression allant de pair avec une augmentation de l'IL-22 (Huber et al., 2012) et une meilleure tolérance de la colite (Martin et al., 2016). Récemment, contrairement aux modèles animaux de colite, l'équipe a pu démontrer que les MICI s'associent à une surexpression de l'IL-22BP dans la muqueuse intestinale, expliquée par l'infiltration des polynucléaires éosinophiles dans la *lamina propria* (Martin et al., 2016). Notre analyse sur un plus grand nombre de patients MC et RCH conforte ce résultat (**Figure 22**). L'étude de la protéine par marquage en immunohistochimie des cellules IL22BP⁺ tend à montrer une surexpression chez les MC en comparaison aux RCH. L'ensemble de ces données laisse fortement suggérer que l'amplification plus importante de l'IL-22BP chez les MC que chez les RCH, pourrait représenter un des mécanismes physiopathologiques à l'origine de la réponse défectueuse observée chez les MC. Afin de confirmer notre hypothèse nous avons mis au point un test ELISA fiable et spécifique de dosage de l'IL-22BP permettant par la suite de quantifier la protéine dans des lysats protéiques issus de biopsies coliques de la biocollection

Discussion

de l'IMAD. Le pouvoir bloquant de l'IL-22BP sur les actions de l'IL-22 a déjà été démontré *in vivo* mais seulement à l'aide de modèles murins (Huber et al., 2012 ; Martin et al., 2016). Lors des expériences de stimulation *ex vivo* l'ajout d'IL-22BP dans le milieu de culture a diminué de façon significative l'induction des gènes de réponses sous l'influence de l'IL-22 : *BD2*, *BD3* (**Figure 21**). De cette façon, nous avons donc démontré son action bloquante sur les gènes induits essentiellement par l'IL-22 au niveau de la muqueuse intestinale humaine.

Cependant, l'interprétation de nos résultats issus de nos stimulations nécessite quelques précautions. En effet, nous avons travaillé sur des prélèvements humains impliquant une variabilité concernant le nombre, le poids ainsi que l'état inflammatoire des biopsies. Ainsi pour chaque stimulation toutes les conditions cytokiniques n'ont pas pu être testées simultanément. L'existence d'une variabilité interhumaine a certainement pu influencer le niveau basal d'expression de nos gènes de réponse étudiés ; c'est pourquoi l'ensemble des résultats est présenté en Fold Change. Enfin bien que prélevées sur des critères endoscopiques, l'état inflammatoire des biopsies n'était pas strictement identique entre elles pouvant ainsi modifier les niveaux endogènes d'IL-22, d'IL-17 ainsi que d'IL-22BP. L'analyse de l'expression du gène codant pour l'IL-8 sur ces prélèvements mis en culture uniquement avec du milieu seul a montré un niveau similaire à celui retrouvé au sein de la muqueuse inflammatoire des patients MC appartenant à la biocollection de l'IMAD. De plus l'ensemble de ces données, bien qu'apparaissant encourageante sur la possibilité de renforcer ces propriétés antibactériennes décrites comme défectueuses chez les MC, ne sont que le reflet de l'expression des gènes et non de la protéine qui peut dépendre de modifications post transcriptionnelles. C'est pourquoi il nous semble indispensable dans le futur d'associer l'induction des ARNm après mise en culture, à des marquages en immunohistochimie de la protéine. Cependant le protocole de stimulation comporte quelques limites, en effet au-delà de six heures de mise en culture nous avons observé une dégradation accrue de l'ARN. C'est pourquoi nous envisageons de développer un système plus physiologique : les organoïdes de colon générés à partir des cellules souches intestinales (Sato et al., 2009).

Pour étudier les gènes de réponse de l'IL-22 et l'IL-17 nous nous sommes appuyés sur les données de la littérature et notamment des modèles murins où au cours colites, il a été observé en réponse à l'IL-22 une induction de la production des mucines (Sugimoto et al., 2008), la fucosylation des cellules épithéliales intestinales (Goto et al., 2014), l'expression d'IL-

18 par les cellules épithéliales intestinales (Muñoz et al., 2015) ainsi que du gène *Reg3g* (Zheng et al., 2008). L'étude rétrospective de ces gènes prédits pour être induits par l'IL-22 et l'IL-17, sur la cohorte de patients atteints de MICI, n'a pas démontré une augmentation significative de *FUT2* et de *REG3G* (**Figure 17**). De plus, nos données de stimulations des biopsies MC confirment ces résultats : absence d'induction significative des gènes codant les mucines et *REG3G* tandis que celle de *FUT2* est apparue comme essentiellement sous la dépendance du TNF (**Figure 20**). A l'inverse de l'effet observé chez les RCH, nous avons montré un rétrocontrôle négatif du gène *IL18* à la fois en zone inflammatoire et après mise en culture. L'hypothèse avancée chez la souris que l'IL-18, provoque une diminution de la production d'IL-22BP par des cellules dendritiques, augmentant ainsi l'IL-22 disponible (Huber et al., 2012), n'est donc pas vérifiée chez l'homme et ceci d'autant plus que nous avons montré que la source majeure d'IL-22BP durant les MICI étaient les éosinophiles (Martin et al., 2016). Ainsi nos résultats démontrent qu'il existe des différences majeures entre les modèles animaux de colites et les MICI en ce qui concerne les gènes prédits pour être induits par l'IL-22 et l'IL-17 et leur régulation.

Pour conclure, notre travail suggère fortement que la surexpression d'IL-22BP plus importante au sein de la muqueuse inflammatoire des MC en comparaison aux RCH pourrait bloquer les actions protectrices induites par le duo synergique IL-22 et IL-17 et ainsi expliquer les différences d'induction observées. De plus notre étude nous a permis d'attester de la possibilité de renforcer ces effets bénéfiques au niveau de l'épithélium intestinal de MC.

VII. Perspectives

Nous proposons donc qu'un blocage sélectif et transitoire de l'IL-22BP pourrait représenter une stratégie thérapeutique intéressante pour le traitement des poussées inflammatoires de MC. Ce blocage permettrait une augmentation de l'IL-22 intestinale disponible qui pourrait alors agir en synergie avec l'IL-17 et ainsi stimuler les gènes de réponse et donc préserver l'intégrité de la barrière épithéliale. Cette stratégie est d'autant plus intéressante que la majoration de l'IL-22 intestinale ne serait pas consécutive à son administration par voie IV qui pourrait alors provoquer une augmentation générale d'IL-22 au sein de l'organisme. De cette façon les potentiels effets indésirables : risque de développement tumoral, risque d'accumulation de kératinocytes indifférenciés caractéristiques du psoriasis (Wolk et al., 2009) dus à une action exacerbée d'IL-22 seront limités.

Discussion

Dans ce but, un anticorps monoclonal anti-IL-22BP neutralisant fourni par notre collaborateur JC Renaud (Ludwig Institute for Cancer Research, Bruxelles) et déjà validé par notre équipe *in vivo* au cours d'un autre modèle d'inflammation localisée au niveau de la peau sera ajouté au milieu de culture lors des futurs protocoles de stimulation. L'objectif étant de vérifier la capacité de cet anticorps à renforcer l'action synergique des cytokines endogènes (IL-22 et IL-17) via le blocage transitoire de l'IL-22BP. De plus nous envisagerons de tester l'effet protecteur *in vivo* d'un blocage de l'IL-22BP dans un modèle de colite expérimentale par transfert de lymphocytes T naïfs chez la souris *Rag1^{-/-}*.

Dans une perspective de vérifier l'induction au niveau protéique des PAMs mais aussi de confirmer *in vitro* les actions protectrices et synergiques de l'IL-22 et l'IL-17, des organoïdes de colon seront générés à partir de cellules souches intestinales. Un organoïde est défini comme une structure 3D développée à partir de cellules souches et comprenant différents types de cellules qui en s'auto-organisant dans l'espace sont spécifiques d'un organe. De cette façon, les organoïdes sont le reflet à la fois de la structure et des propriétés fonctionnelles d'un organe. Cette technique présente les avantages de permettre l'obtention d'un système plus physiologique et bien plus stable dans le temps.

Afin de confirmer notre hypothèse d'une surexpression plus importante d'IL-22BP au sein des MC, une analyse comparative entre les deux maladies concernant l'expression protéique de l'IL-22BP au sein des lysats protéique de biopsies sera effectuée suite à la mise au point de l'ELISA hIL-22BP. De plus, les signaux à l'origine de cette surexpression par les polynucléaires éosinophiles sont inconnus et seront à identifier.

Enfin dans une perspective de développement thérapeutique passant par le blocage de l'IL-22BP, un tableau plus complet de l'ensemble des gènes régulés par ces cytokines est nécessaire. Cette analyse a aussi pour objectif d'évaluer si des gènes potentiellement dangereux pourraient eux aussi être modulés lors du blocage de l'IL-22BP. Pour cela nous réaliserons, sur les ARNm extraits des biopsies coliques stimulées et conservés à -80°C, une analyse par RNA séquençage.

Ainsi à terme l'ensemble de ces axes de recherche, nous permettront de valider l'intérêt d'un blocage thérapeutique de l'IL-22BP, nous permettant par la suite de développer des inhibiteurs spécifiques de l'IL-22BP pour le traitement des poussées de MC.

VIII. Références bibliographiques

- Abraham, C., and Cho, J.H. (2009). Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* *361*, 2066–2078.
- Ananthakrishnan, A.N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 205–217.
- Andersson, R.E., Olaison, G., Tysk, C., and Ekblom, A. (2001). Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* *344*, 808–814.
- Andersson, R.E., Olaison, G., Tysk, C., and Ekblom, A. (2003). Appendectomy is followed by increased risk of Crohn’s disease. *Gastroenterology* *124*, 40–46.
- Andoh, A., Zhang, Z., Inatomi, O., Fujino, S., Deguchi, Y., Araki, Y., Tsujikawa, T., Kitoh, K., Kim-Mitsuyama, S., Takayanagi, A., et al. (2005). Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* *129*, 969–984.
- Arijs, I., Li, K., Toedter, G., Quintens, R., Van Lommel, L., Van Steen, K., Leemans, P., De Hertogh, G., Lemaire, K., Ferrante, M., et al. (2009). Mucosal gene signatures to predict response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Gut* *58*, 1612–1619.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* *473*, 174–180.
- Atreya, R., Neumann, H., Neufert, C., Waldner, M.J., Billmeier, U., Zopf, Y., Willma, M., App, C., Münster, T., Kessler, H., et al. (2014). In vivo imaging using fluorescent antibodies to tumor necrosis factor predicts therapeutic response in Crohn’s disease. *Nat. Med.* *20*, 313–318.
- Aujla, S.J., Chan, Y.R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D.J., Pociask, D.A., Reinhart, T.A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., et al. (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat. Med.* *14*, 275–281.
- Baumgart, D.C., and Sandborn, W.J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet Lond. Engl.* *369*, 1641–1657.
- Begue, B., Verdier, J., Rieux-Laucat, F., Goulet, O., Morali, A., Canioni, D., Hugot, J.-P., Daussy, C., Verkarre, V., Pigneur, B., et al. (2011). Defective IL10 signaling defining a subgroup of patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* *106*, 1544–1555.
- Belkaid, Y., and Hand, T.W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* *157*, 121–141.
- Ben-Horin, S., Kopylov, U., and Chowers, Y. (2014). Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease. *Autoimmun. Rev.* *13*, 24–30.
- Bernstein, C.N., Blanchard, J.F., Kliewer, E., and Wajda, A. (2001). Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* *91*, 854–862.

- Bessman, N.J., and Sonnenberg, G.F. (2016). Emerging roles for antigen presentation in establishing host-microbiome symbiosis. *Immunol. Rev.* 272, 139–150.
- Best, W.R., Bechtel, J.M., Singleton, J.W., and Kern, F. (1976). Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 70, 439–444.
- Brazil, J.C., Louis, N.A., and Parkos, C.A. (2013). The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 1556–1565.
- Bryant, R.V., Winer, S., Travis, S.P.L., and Riddell, R.H. (2014). Systematic review: histological remission in inflammatory bowel disease. Is "complete" remission the new treatment paradigm? An IOIBD initiative. *J. Crohns Colitis* 8, 1582–1597.
- Cerf-Bensussan, N., and Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 735–744.
- Colombel, J.F., Sandborn, W.J., Reinisch, W., Mantzaris, G.J., Kornbluth, A., Rachmilewitz, D., Lichtiger, S., D'Haens, G., Diamond, R.H., Broussard, D.L., et al. (2010a). Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 1383–1395.
- Colombel, J.F., Sandborn, W.J., Reinisch, W., Mantzaris, G.J., Kornbluth, A., Rachmilewitz, D., Lichtiger, S., D'Haens, G., Diamond, R.H., Broussard, D.L., et al. (2010b). Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 1383–1395.
- Coombes, J.L., and Powrie, F. (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 435–446.
- Cording, S., Medvedovic, J., Aychek, T., and Eberl, G. (2016). Innate lymphoid cells in defense, immunopathology and immunotherapy. *Nat. Immunol.* 17, 755–757.
- Cosnes, J. (2004). Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18, 481–496.
- Cosnes, J., Cattan, S., Blain, A., Beaugerie, L., Carbonnel, F., Parc, R., and Gendre, J.-P. (2002). Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 8, 244–250.
- Daperno, M., D'Haens, G., Van Assche, G., Baert, F., Bulois, P., Maunoury, V., Sostegni, R., Rocca, R., Pera, A., Gevers, A., et al. (2004). Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest. Endosc.* 60, 505–512.
- Ding, N.S., Hart, A., and De Cruz, P. (2016). Systematic review: predicting and optimising response to anti-TNF therapy in Crohn's disease - algorithm for practical management. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 43, 30–51.
- Dudakov, J.A., Hanash, A.M., and van den Brink, M.R.M. (2015). Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 747–785.

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* *10*, 857–863.

Dumoutier, L., Lejeune, D., Colau, D., and Renauld, J.C. (2001). Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 7090–7095.

Economou, M., Trikalinos, T.A., Loizou, K.T., Tsianos, E.V., and Ioannidis, J.P.A. (2004). Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am. J. Gastroenterol.* *99*, 2393–2404.

Evans, A.T., and Lee, S.D. (2012). A review and expert opinion of the use of certolizumab for Crohn's disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* *12*, 363–370.

Fahlgren, A., Hammarström, S., Danielsson, A., and Hammarström, M.-L. (2003). Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* *131*, 90–101.

Faubion, W.A., Fletcher, J.G., O'Byrne, S., Feagan, B.G., de Villiers, W.J., Salzberg, B., Plevy, S., Proctor, D.D., Valentine, J.F., Higgins, P.D., et al. (2013). EMerging BiomARKers in Inflammatory Bowel Disease (EMBARK) study identifies fecal calprotectin, serum MMP9, and serum IL-22 as a novel combination of biomarkers for Crohn's disease activity: role of cross-sectional imaging. *Am. J. Gastroenterol.* *108*, 1891–1900.

Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M.A., Strong, R.K., Akira, S., and Aderem, A. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* *432*, 917–921.

Gallo, R.L., and Hooper, L.V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 503–516.

Geboes, K., Riddell, R., Ost, A., Jensfelt, B., Persson, T., and Löfberg, R. (2000). A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut* *47*, 404–409.

Geremia, A., Arancibia-Cárcamo, C.V., Fleming, M.P.P., Rust, N., Singh, B., Mortensen, N.J., Travis, S.P.L., and Powrie, F. (2011). IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* *208*, 1127–1133.

Gonçalves, P., and Di Santo, J.P. (2016). An Intestinal Inflammasome - The ILC3-Cytokine Tango. *Trends Mol. Med.* *22*, 269–271.

Goto, Y., Obata, T., Kunisawa, J., Sato, S., Ivanov, I.I., Lamichhane, A., Takeyama, N., Kamioka, M., Sakamoto, M., Matsuki, T., et al. (2014). Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science* *345*, 1254009.

- Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Farkkila, M., and Kontula, K. (2006). Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* *12*, 3668–3672.
- Hanauer, S.B., Sandborn, W.J., Rutgeerts, P., Fedorak, R.N., Lukas, M., MacIntosh, D., Panaccione, R., Wolf, D., and Pollack, P. (2006a). Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology* *130*, 323–333; quiz 591.
- Hanauer, S.B., Sandborn, W.J., Rutgeerts, P., Fedorak, R.N., Lukas, M., MacIntosh, D., Panaccione, R., Wolf, D., and Pollack, P. (2006b). Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology* *130*, 323–333; quiz 591.
- Hancock, R.E.W., Haney, E.F., and Gill, E.E. (2016). The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 321–334.
- Happel, K.I., Zheng, M., Young, E., Quinton, L.J., Lockhart, E., Ramsay, A.J., Shellito, J.E., Schurr, J.R., Bagby, G.J., Nelson, S., et al. (2003). Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 4432–4436.
- Hazlett, L., and Wu, M. (2011). Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res.* *343*, 175–188.
- Horsthuis, K., Bipat, S., Bennink, R.J., and Stoker, J. (2008). Inflammatory bowel disease diagnosed with US, MR, scintigraphy, and CT: meta-analysis of prospective studies. *Radiology* *247*, 64–79.
- Huang, W., Na, L., Fidel, P.L., and Schwarzenberger, P. (2004). Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J. Infect. Dis.* *190*, 624–631.
- Huber, S., Gagliani, N., Zenewicz, L.A., Huber, F.J., Bosurgi, L., Hu, B., Hedl, M., Zhang, W., O'Connor, W., Murphy, A.J., et al. (2012). IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* *491*, 259–263.
- Hueber, W., Sands, B.E., Lewitzky, S., Vandemeulebroecke, M., Reinisch, W., Higgins, P.D.R., Wehkamp, J., Feagan, B.G., Yao, M.D., Karczewski, M., et al. (2012). Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* *61*, 1693–1700.
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* *411*, 599–603.
- Jarry, A., Bossard, C., Droy-Dupré, L., Volteau, C., Bourreille, A., Meurette, G., Mosnier, J.-F., and Laboisse, C.L. (2015). Heterogeneity of subordination of the IL-18/IFN- γ axis to caspase-1 among patients with Crohn's disease. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *95*, 1207–1217.

- Johansson, M.E.V., and Hansson, G.C. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 639–649.
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Schumm, L.P., Sharma, Y., Anderson, C.A., et al. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* *491*, 119–124.
- Karreman, M.C., Luime, J.J., Hazes, J.M.W., and Weel, A.E.A.M. (2016). The Prevalence and Incidence of Axial and Peripheral Spondyloarthritis in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *J. Crohns Colitis*.
- Kolls, J.K., McCray, P.B., and Chan, Y.R. (2008a). Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 829–835.
- Kolls, J.K., McCray, P.B., and Chan, Y.R. (2008b). Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 829–835.
- Kopylov, U., and Seidman, E. (2016). Predicting durable response or resistance to antitumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease. *Ther. Adv. Gastroenterol.* *9*, 513–526.
- Larsen, S., Bendtzen, K., and Nielsen, O.H. (2010). Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: epidemiology, diagnosis, and management. *Ann. Med.* *42*, 97–114.
- Lee, J.S., Tato, C.M., Joyce-Shaikh, B., Gulen, M.F., Gulan, F., Cayatte, C., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Judo, M., Ayanoglu, G., et al. (2015). Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity* *43*, 727–738.
- Levy, M., Kolodziejczyk, A.A., Thaiss, C.A., and Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 219–232.
- Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J.R., Prifti, E., Nielsen, T., et al. (2014a). An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* *32*, 834–841.
- Li, L.-J., Gong, C., Zhao, M.-H., and Feng, B.-S. (2014b). Role of interleukin-22 in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* *20*, 18177–18188.
- Liang, S.C., Tan, X.-Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* *203*, 2271–2279.
- Lindemans, C.A., Calafiore, M., Mertelsmann, A.M., O'Connor, M.H., Dudakov, J.A., Jenq, R.R., Velardi, E., Young, L.F., Smith, O.M., Lawrence, G., et al. (2015). Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* *528*, 560–564.
- Loftus, E.V., Colombel, J.-F., Feagan, B.G., Vermeire, S., Sandborn, W.J., Sands, B.E., Danese, S., D'Haens, G.R., Kaser, A., Panaccione, R., et al. (2016). Long-term Efficacy of Vedolizumab for Ulcerative Colitis. *J. Crohns Colitis*.

Louis, E., Collard, A., Oger, A.F., Degroote, E., Aboul Nasr El Yafi, F.A., and Belaiche, J. (2001). Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* 49, 777–782.

Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K., and Lamarre, A. (2001). IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect.* 3, 1021–1035.

Mahid, S.S., Minor, K.S., Soto, R.E., Hornung, C.A., and Galandiuk, S. (2006). Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.* 81, 1462–1471.

Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., et al. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55, 205–211.

Martin, J.C., Bériou, G., Heslan, M., Bossard, C., Jarry, A., Abidi, A., Hulin, P., Ménoret, S., Thinard, R., Anegon, I., et al. (2016). IL-22BP is produced by eosinophils in human gut and blocks IL-22 protective actions during colitis. *Mucosal Immunol.* 9, 539–549.

Martin, J.C.J., Bériou, G., Heslan, M., Chauvin, C., Utraiainen, L., Aumeunier, A., Scott, C.L., Mowat, A., Cerovic, V., Houston, S.A., et al. (2014). Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal Immunol.* 7, 101–113.

Mary, J.Y., and Modigliani, R. (1989). Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). *Gut* 30, 983–989.

Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., et al. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 142, 46–54.e42; quiz e30.

Monteleone, G., Fantini, M.C., Onali, S., Zorzi, F., Sancesario, G., Bernardini, S., Calabrese, E., Viti, F., Monteleone, I., Biancone, L., et al. (2012). Phase I clinical trial of Smad7 knockdown using antisense oligonucleotide in patients with active Crohn's disease. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 870–876.

Moschen, A.R., Gerner, R.R., Wang, J., Klepsch, V., Adolph, T.E., Reider, S.J., Hackl, H., Pfister, A., Schilling, J., Moser, P.L., et al. (2016). Lipocalin 2 Protects from Inflammation and Tumorigenesis Associated with Gut Microbiota Alterations. *Cell Host Microbe* 19, 455–469.

Moyat, M., Bouzourene, H., Ouyang, W., Iovanna, J., Renaud, J.-C., and Velin, D. (2017). IL-22-induced antimicrobial peptides are key determinants of mucosal vaccine-induced protection against *H. pylori* in mice. *Mucosal Immunol.* 10, 271–281.

Muñoz, M., Eidenschenk, C., Ota, N., Wong, K., Lohmann, U., Kühn, A.A., Wang, X., Manzanillo, P., Li, Y., Rutz, S., et al. (2015). Interleukin-22 induces interleukin-18 expression from epithelial cells during intestinal infection. *Immunity* 42, 321–331.

Nanda, K.S., Cheifetz, A.S., and Moss, A.C. (2013). Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* *108*, 40–47; quiz 48.

Neurath, M.F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 329–342.

Nowarski, R., Jackson, R., Gagliani, N., de Zoete, M.R., Palm, N.W., Bailis, W., Low, J.S., Harman, C.C.D., Graham, M., Elinav, E., et al. (2015). Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. *Cell* *163*, 1444–1456.

Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., et al. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* *411*, 603–606.

Ott, S.J., Musfeldt, M., Wenderoth, D.F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U.R., Timmis, K.N., and Schreiber, S. (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* *53*, 685–693.

Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W.M., and Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *2*, 104.

Park, O., Wang, H., Weng, H., Feigenbaum, L., Li, H., Yin, S., Ki, S.H., Yoo, S.H., Dooley, S., Wang, F.-S., et al. (2011). In vivo consequences of liver-specific interleukin-22 expression in mice: Implications for human liver disease progression. *Hepatology* *54*, 252–261.

Pelczar, P., Witkowski, M., Perez, L.G., Kempski, J., Hammel, A.G., Brockmann, L., Kleinschmidt, D., Wende, S., Haueis, C., Bedke, T., et al. (2016). A pathogenic role for T cell-derived IL-22BP in inflammatory bowel disease. *Science* *354*, 358–362.

Perriard, G., Mathias, A., Enz, L., Canales, M., Schlupe, M., Gentner, M., Schaeren-Wiemers, N., and Du Pasquier, R.A. (2015). Interleukin-22 is increased in multiple sclerosis patients and targets astrocytes. *J. Neuroinflammation* *12*, 119.

Pham, T.A.N., Clare, S., Goulding, D., Arasteh, J.M., Stares, M.D., Browne, H.P., Keane, J.A., Page, A.J., Kumasaka, N., Kane, L., et al. (2014). Epithelial IL-22RA1-mediated fucosylation promotes intestinal colonization resistance to an opportunistic pathogen. *Cell Host Microbe* *16*, 504–516.

Pickard, J.M., and Chervonsky, A.V. (2015). Intestinal fucose as a mediator of host-microbe symbiosis. *J. Immunol.* *194*, 5588–5593.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* *464*, 59–65.

Radaeva, S., Sun, R., Pan, H.-N., Hong, F., and Gao, B. (2004). Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* *39*, 1332–1342.

Raffatellu, M., George, M.D., Akiyama, Y., Hornsby, M.J., Nuccio, S.-P., Paixao, T.A., Butler, B.P., Chu, H., Santos, R.L., Berger, T., et al. (2009). Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell Host Microbe* 5, 476–486.

Reinisch, W., Reinink, A.R., and Higgins, P.D.R. (2015). Factors associated with poor outcomes in adults with newly diagnosed ulcerative colitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 13, 635–642.

van Rheenen, P.F., Van de Vijver, E., and Fidler, V. (2010). Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ* 341, c3369.

Riley, S.A., Mani, V., Goodman, M.J., Dutt, S., and Herd, M.E. (1991). Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* 32, 174–178.

Rutgeerts, P., Geboes, K., Vantrappen, G., Beyls, J., Kerremans, R., and Hiele, M. (1990). Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 99, 956–963.

Sabat, R., Ouyang, W., and Wolk, K. (2014). Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 21–38.

Salzman, N.H., Ghosh, D., Huttner, K.M., Paterson, Y., and Bevins, C.L. (2003). Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 422, 522–526.

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265.

Silverberg, M.S., Satsangi, J., Ahmad, T., Arnott, I.D.R., Bernstein, C.N., Brant, S.R., Caprilli, R., Colombel, J.-F., Gasche, C., Geboes, K., et al. (2005). Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can. J. Gastroenterol. J. Can. Gastroenterol.* 19 Suppl A, 5A–36A.

Sokol, H., Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Lay, C., Lepage, P., Podglajen, I., Marteau, P., and Doré, J. (2006). Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 12, 106–111.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., et al. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16731–16736.

Solberg, I.C., Lygren, I., Jahnsen, J., Aadland, E., Høie, O., Cvancarova, M., Bernklev, T., Henriksen, M., Sauar, J., Vatn, M.H., et al. (2009). Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study). *Scand. J. Gastroenterol.* 44, 431–440.

Sonnenberg, G.F., Fouser, L.A., and Artis, D. (2011). Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat. Immunol.* *12*, 383–390.

de Souza, H.S.P., and Fiocchi, C. (2016a). Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *13*, 13–27.

de Souza, H.S.P., and Fiocchi, C. (2016b). Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *13*, 13–27.

Stallhofer, J., Friedrich, M., Konrad-Zerna, A., Wetzke, M., Lohse, P., Glas, J., Tillack-Schreiber, C., Schnitzler, F., Beigel, F., and Brand, S. (2015). Lipocalin-2 Is a Disease Activity Marker in Inflammatory Bowel Disease Regulated by IL-17A, IL-22, and TNF- α and Modulated by IL23R Genotype Status. *Inflamm. Bowel Dis.* *21*, 2327–2340.

Strugala, V., Dettmar, P.W., and Pearson, J.P. (2008). Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int. J. Clin. Pract.* *62*, 762–769.

Su, L., Nalle, S.C., Shen, L., Turner, E.S., Singh, G., Breskin, L.A., Khramtsova, E.A., Khramtsova, G., Tsai, P.-Y., Fu, Y.-X., et al. (2013). TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology* *145*, 407–415.

Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A.K., Blumberg, R.S., Xavier, R.J., and Mizoguchi, A. (2008). IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* *118*, 534–544.

Thia, K.T., Sandborn, W.J., Harmsen, W.S., Zinsmeister, A.R., and Loftus, E.V. (2010). Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology* *139*, 1147–1155.

Toy, D., Kugler, D., Wolfson, M., Vanden Bos, T., Gurgel, J., Derry, J., Tocker, J., and Peschon, J. (2006). Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 36–39.

Travis, S.P.L., Schnell, D., Krzeski, P., Abreu, M.T., Altman, D.G., Colombel, J.-F., Feagan, B.G., Hanauer, S.B., Lémann, M., Lichtenstein, G.R., et al. (2012). Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut* *61*, 535–542.

Vaishnava, S., Yamamoto, M., Severson, K.M., Ruhn, K.A., Yu, X., Koren, O., Ley, R., Wakeland, E.K., and Hooper, L.V. (2011). The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* *334*, 255–258.

Vermeire, S., Noman, M., Van Assche, G., Baert, F., D'Haens, G., and Rutgeerts, P. (2007). Effectiveness of concomitant immunosuppressive therapy in suppressing the formation of antibodies to infliximab in Crohn's disease. *Gut* *56*, 1226–1231.

Vermeire, S., O'Byrne, S., Keir, M., Williams, M., Lu, T.T., Mansfield, J.C., Lamb, C.A., Feagan, B.G., Panes, J., Salas, A., et al. (2014). Etrolizumab as induction therapy for ulcerative colitis: a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Lond. Engl.* *384*, 309–318.

Vermeire, S., Loftus, E.V., Colombel, J.-F., Feagan, B.G., Sandborn, W.J., Sands, B.E., Danese, S., D'Haens, G.R., Kaser, A., Panaccione, R., et al. (2016). Long-term Efficacy of Vedolizumab for Crohn's Disease. *J. Crohns Colitis*.

Walsh, A.J., Bryant, R.V., and Travis, S.P.L. (2016). Current best practice for disease activity assessment in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *13*, 567–579.

Wehkamp, J., Fellermann, K., Herrlinger, K.R., Baxmann, S., Schmidt, K., Schwind, B., Duchrow, M., Wohlschläger, C., Feller, A.C., and Stange, E.F. (2002). Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *14*, 745–752.

Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Mueller, O., Herrlinger, K.R., Fellermann, K., Schroeder, J.M., and Stange, E.F. (2003a). Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *9*, 215–223.

Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Mueller, O., Herrlinger, K.R., Fellermann, K., Schroeder, J.M., and Stange, E.F. (2003b). Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *9*, 215–223.

Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R.E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., et al. (2005). Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18129–18134.

Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K., and Sabat, R. (2002). Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 5397–5402.

Wolk, K., Witte, E., Hoffmann, U., Doecke, W.-D., Endesfelder, S., Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H.-D., Wittig, B.M., and Sabat, R. (2007). IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 5973–5981.

Wolk, K., Haugen, H.S., Xu, W., Witte, E., Waggie, K., Anderson, M., Vom Baur, E., Witte, K., Warszawska, K., Philipp, S., et al. (2009). IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *87*, 523–536.

Xu, W., Presnell, S.R., Parrish-Novak, J., Kindsvogel, W., Jaspers, S., Chen, Z., Dillon, S.R., Gao, Z., Gilbert, T., Madden, K., et al. (2001). A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 9511–9516.

Yanai, H., Lichtenstein, L., Assa, A., Mazor, Y., Weiss, B., Levine, A., Ron, Y., Kopylov, U., Bujanover, Y., Rosenbach, Y., et al. (2015). Levels of drug and antidrug antibodies are

associated with outcome of interventions after loss of response to infliximab or adalimumab. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *13*, 522–530.e2.

Yang, H., McElree, C., Roth, M.P., Shanahan, F., Targan, S.R., and Rotter, J.I. (1993). Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* *34*, 517–524.

Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Stevens, S., and Flavell, R.A. (2008). Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* *29*, 947–957.

Zheng, Y., Valdez, P.A., Danilenko, D.M., Hu, Y., Sa, S.M., Gong, Q., Abbas, A.R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F.J., et al. (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* *14*, 282–289.

Vu, le Président du jury,

Berthe-Marie IMBERT

Vu, le Directeur de thèse,

Régis Josien

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom – Prénoms : FANTOU-Aurélie-Marie-Gabrielle

Titre de la thèse : Evaluation de l'intérêt du blocage thérapeutique de l'IL-22BP au cours de la maladie de Crohn

La maladie de Crohn (MC) et la Rectocolite Hémorragique (RCH) sont les deux pathologies regroupées sous le terme de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Les MICI se caractérisent par une inflammation chronique consécutive à une activation chronique du système immunitaire muqueux intestinal contre le microbiote. L'IL-22 et l'IL-17 sont deux cytokines produites au cours de ces réponses et ayant démontré des actions protectrices dans plusieurs modèles murins de colite. Les actions de l'IL-22 sont régulées par son inhibiteur physiologique l'interleukine 22 *binding protein* dont l'expression est augmentée au niveau de la muqueuse inflammatoire des patients atteints de MICI et pourrait donc bloquer les actions protectrices synergiques entre l'IL-22 et l'IL-17. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la régulation de l'expression de gènes candidats prédits pour être induits dans l'épithélium intestinal en réponse aux actions de l'IL-22 et de l'IL-17 dans une cohorte de patients souffrant de MICI. Nous avons montré un défaut d'induction de ces gènes dans la MC en regard de la RCH. Dans un second temps, nous avons prouvé la possibilité de renforcer les actions protectrices de ces cytokines spécifiquement dans la muqueuse inflammatoire de patients atteints de MC en stimulant *ex vivo* des biopsies fraîches coliques avec un excès d'IL-22 et d'IL-17. Enfin nous avons montré que l'ajout d'IL-22BP au milieu de culture empêche l'induction d'expression d'un certain nombre de ces gènes protecteurs. En conclusion, nous proposons donc qu'un blocage spécifique et transitoire de l'IL-22BP au cours des poussées inflammatoires de MC pourrait représenter une stratégie thérapeutique efficace pour majorer l'IL-22 intestinale et ainsi renforcer les effets bénéfiques de l'IL-22 et IL-17 endogènes sur la muqueuse intestinale lésées.

MOTS CLÉS : MALADIE DE CROHN-IMMUNITE MUQUEUSE-INTERLEUKINES 22 et 17-INTERLEUKINE 22 *BINDING PROTEIN*

**Président du jury : Mme Berthe-Marie IMBERT,
Professeur de Virologie-Pharmacie-Nantes**

**Directeur de thèse : M. Régis JOSIEN,
Professeur d'Immunologie-Médecine-Nantes**

**Membres du jury : Mme Tamara MATYSIAK-BUDNIK,
Professeur d'Hépto-Gastro-Entérologie-Médecine-Nantes
Mme Caroline HEMONT,
Praticien Hospitalier Immunologie-Pharmacie-Nantes**

Adresse de l'auteur : 51, Boulevard Victor Hugo, 44000, Nantes