

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

**IMMUNOMODULATION ET THERAPIE EXPERIMENTALE
AU COURS DES MALADIE INFLAMMATOIRES CHRONIQUES
INTESTINALES**

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale CHIMIE BIOLOGIE

Discipline Médecine

Maladies de l'Appareil Digestif

Présentée et soutenue publiquement par

Arnaud BOURREILLE

Le 5 Décembre 2003, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : Professeur Bruno Bonaz

Professeur Frank Zerbib

Examineurs : Professeur Jean Paul Galmiche

Docteur Hervé Blottière

Docteur Jean Pierre Segain

Directeur de thèse : Docteur Hervé Blottière

Co-directeur de thèse : Jean Pierre Segain

Publications :

1. Bourreille A, Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Siavoshian S, Valette G, Galmiche JP, Blottière HM. Lack of interleukin 10 regulation of antigen presentation-associated molecules expressed on colonic epithelial cells. *Eur J Clin Invest* 1999;29:48-55.
2. Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottière HM, Galmiche JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NF-KB inhibition: Implications for Crohn's disease. *Gut*, 2000;47:397-403.
3. Doubremelle M, Bourreille A, Zerbib F, Heresbach D, Metmam EH, Beau P, Gournay J, Galmiche JP. Traitement de la maladie de Crohn par anticorps anti-TNF-alpha : résultats d'une étude multicentrique et rétrospective. *Gastroenterol Clin Biol* 2002;26:973-9.
4. Bourreille A, Doubremelle M, Colombel JF. Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles et anticorps anti-saccharomyces cerevisiae : de nouveaux outils biologiques pour le diagnostic des maladies inflammatoires chroniques intestinales. *Rev Med Int* 2003 ;24 :147-50.
5. Desreumaux P, Bourreille A, Colombel JF. Physiopathology of inflammatory bowel diseases: new biological tools for disease and monitoring? *Gastroenterol Clin Biol* 2003;27:81-6.
6. Bourreille A, Doubremelle M, Raingeard de la Bletiere D, Tocquet C, Buelow R, Galmiche JP, Segain JP. RDP58, a novel immunomodulatory peptide, has anti-inflammatory properties in Crohn's disease and suppresses inflammation in experimental colitis. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:526-32.
7. Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Sauzeau V, Bourreille A, Hilaret G, Pacaud P, Galmiche JP, Loirand G. Blockade of Rho kinase inhibits intestinal inflammation via NF- κ B inhibition : Evidence in Crohn's disease and experimental colitis. *Gastroenterology* 2003 ;124 :1180-7.
8. Barbier M, Vidal H, Desreumaux P, Dubuquoy L, Bourreille A, Colombel JF, Cherbut C, galmiche JP. Overexpression of leptin mRNA in mesenteric adipose tissue in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 2003;27:987-91.
9. Bourreille A, Humbert B, Maugère P, Galmiche JP, Darmaun D. Glutamine metabolism in Crohn's disease : a stable isotope study. 2003 soumis a *Clin Nutr*.
10. Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, gervois N, Doubremelle M, Galmiche JP, Segain JP. Butyrate selectively inhibits Th1-mediated inflammatory response. Soumis à *J Immunol*.

Communications scientifiques :

1. Bourreille A, Segain JP, Blottière HM, Cherbut C, Galmiche JP. Effet de l'interleukine-10 sur l'expression des Ag du CMH de classe I, du HLA-DR, du CD 80 et de l'ICAM-1 sur deux modèles cellulaires épithéliaux digestifs. *Gastroenterol Clin Biol* 1997;21:A206.

2. Bourreille A, Segain JP, Siavoshian S, Galmiche JP, Blottière HM. Expressions by human intestinal cell lines of IL-10 receptor and antigen-associated molecules. *Gut* 1997;41(3):A116.
3. Segain JP, Bourreille A, Galmiche JP, Blottière HM. Butyrate modulates the production of TNF-alpha in Crohn's disease. *Gut* 1997;41(3):A226.
4. Bourreille A, Segain JP, Blottière HM, Siavoshian S, Galmiche JP. Effect of interleukin-10 on major histocompatibility complex class I and class II, CD 80 and intercellular adhesion molecule-1 in intestinal epithelial cell line. *Gastroenterology* 1997;112:A941.
5. Segain JP, Bourreille A, Blottière HM, Galmiche JP. Effet inhibiteur du butyrate sur la production de TNF dans la maladie de Crohn. *Gastroenterol Clin Biol* 1998;22:A62.
6. Raingeard de la Blétière D, Segain JP, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Lehur PA, Blottière HM, Galmiche JP. Modulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires par le butyrate dans la maladie de Crohn. *Gastroenterol Clin Biol* 1999;23:A168.
7. Raingeard de la Blétière D, Segain JP, Bourreille A, Leray V, Rosales C, Gervois N, Lehur PA, Blottière HM, Galmiche JP. Modulation of pro-inflammatory cytokine expression by butyrate in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999;116:G3473.
8. Barbier M, Vidal H, Desreumaux P, Dubuquoy L, Bourreille A, Cherbut C, Colombel JF, Galmiche JP. Surexpression des ARNm de la leptine dans le tissu adipeux mésentérique de patients atteints de maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin. *Gastroenterol Clin Biol* 2000;24:A7.
9. Raingeard de la Blétière D, Segain JP, Gervois N, Bourreille A, Doubremelle M, Galmiche JP. Effects of Butyrate on Th1/Th2 immune responses : implication for Crohn's disease therapy. *Gut* 2000;47:A247.
10. Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Doubremelle M, Bourreille A, Pacaud P, Loirand G, Galmiche JP. RhoA/Rho kinase signaling pathway is involved in inflammatory response : implication for Crohn's disease. *Gut* 2000;47:A6.
11. Bourreille A, Doubremelle M, Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Buelow R, Galmiche JP. Inhibition of pro-inflammatory cytokines production by a novel synthetic immunomodulatory peptide in patients with Crohn's disease. *Gut* 2000;47:A246.
12. Doubremelle M, Bourreille A, Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Toquet C, Buelow R, Galmiche JP. Efficacité d'un nouveau peptide immunomodulateur, le RDP58, dans un modèle de colite expérimentale et sur la production de cytokines pro-inflammatoires dans la maladie de Crohn. *Gastroenterol Clin Biol* 2001;25:A196.
13. Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Doubremelle M, Bourreille A, Pacaud P, Loirand G, Galmiche JP. La voie de signalisation RHOA/RHO kinase : une cible thérapeutique potentielle dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales. *Gastroenterol Clin Biol* 2001;25:A150.

14. Raingeard de la Blétière, Bourreille A, Doubremelle M, Gervois N, Galmiche JP, Segain JP. Effets immunomodulateurs du butyrate sur la balance Th1/Th2 : implications thérapeutiques pour la maladie de Crohn. *Gastroenterol Clin Biol* 2001;25:A196.
15. Bourreille A, Doubremelle M, Raingeard de la Blétière D, Toquet C, Buelow R, Galmiche JP, Segain JP. A novel immunomodulatory peptide, RDP58, with anti-tumor necrosis factor activity in Crohn's disease suppresses inflammation in experimental model of colitis. *Gastroenterology* 2001;5:A685.
16. Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, Doubremelle M, Galmiche J-P, Segain J-P. Butyrate modulates IL-12 and IL-10 effects through the regulation of their receptor expression. Congrès européen de Gastroenterologie 2001, Amsterdam, The Netherlands. *Gut* in press.
17. Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, Doubremelle M, Chapin S, Galmiche JP, Segain JP. Butyrate regulation of the IL-12/IL-10 cytokine balance involves the modulation of NF- κ B and CREB transcription factors. Congrès européen de Gastroenterologie 2001, Amsterdam, The Netherlands. *Gut* in press.
18. Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Doubremelle M, Chapin S, segain JP, Galmiche JP. Vers un décryptage des mécanismes moléculaires de l'action anti-inflammatoire du butyrate. Implications pour la maladie de Crohn. *Gastroenterol Clin Biol* 2002;26:A17.
19. Humbert B, Bourreille A, Galmiche JP, Darmaun D. Glutamine metabolism in Crohn's disease: a stable isotope study. Congrès Européen de Nutrition, Glasgow (UK) 2002. Communication orale.
20. Bourreille A, Humbert B, Galmiche JP, Darmaun D. Etude du métabolisme de la glutamine dans la maladie de Crohn par mesure d'isotopes stables. *Gastroenterol Clin Biol* 2003;27:A153.
21. Bourreille A, Humbert B, Galmiche JP, Darmaun D. Glutamin in Crohn's disease : a stable isotope study. *Gastroenterology* 2003. ID 728. DDW Orlando, Fl, USA.

TABLE DES MATIERES

Abbréviations	3
I. Maladies inflammatoires chroniques intestinales	6
I.1. Définition, épidémiologie	6
I.2. Facteurs génétiques	7
I.3. Facteurs environnementaux	14
I.4. Modèles animaux d'inflammation intestinale	16
II. Physiopathologie de la réponse immunitaire	23
II.1. Réponse immunitaire normale du tube digestif	23
II.2. Cellules épithéliales digestives et présentation antigénique	24
II.3. Sous populations lymphocytaires T	27
III. Réponse immunitaire au cours des MICI	30
III.1. Production de cytokines par les lymphocytes T	30
III.2. Inflammation chronique non spécifique	32
III.3. Lymphocytes régulateurs	33
IV. Thérapie biologique expérimentale	35
IV.1. Introduction, but de la thèse	35
IV.2. Interleukine-10	38

IV.3. Rational Design Peptide 58 (RDP58)	41
IV.3.1. Le RDP58 diminue la sécrétion de TNF-α	42
IV.3.2. Le RDP58 influence l'activité de l'Hème Oxygénase-I	44
IV.3.3. Le RDP58 est efficace pour le traitement des colites chez le primate et chez la souris	45
IV.4. Butyrate	46
IV.4.1. Inhibition et activation des facteurs de transcription	48
IV.4.2. Le butyrate en pratique clinique	49
IV.5. Rho GTPase et inhibiteurs spécifiques	50
V. Travaux scientifiques	55
V.1. Article 1 : «L'interleukine-10 ne régule pas l'expression membranaire des molécules associées à la présentation antigénique sur les cellules épithéliales coliques »	
V.1.1. Résumé	55
IV.1.2. « Eur J Clin Invest 1999;29:48-55. »	55
V.2. Article 2 : « RDP58, un nouveau peptide immunomodulateur : étude pharmacologique dans le modèle de colite induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique et dans la maladie de Crohn »	65
V.2.1. Résumé	65
V.2.2. « Scand J Gastroenterol 2003;38:526-32. »	65
V.3. Article 3 : « Le butyrate inhibe la réponse inflammatoire via l'inhibition de NF-kB : implication pour la maladie de Crohn »	84

V.3.1. Résumé	84
V.3.2. « Gut 2000;47:397-403. »	85
V.4. Article 4 : « Le butyrate inhibe spécifiquement la réponse immunitaire de type Th1 »	94
V.4.1. Résumé	94
V.4.2. Manuscrit soumis à J Immunol.	95
V.5. Article 5 : « L'inhibition de Rho kinase prévient l'inflammation <i>via</i> l'inhibition de NF-kB dans la maladie de Crohn et dans un modèle de colite expérimentale »	126
V.5.1. Résumé	126
V.5.2. « Gastroenterology 2003;124:1180-7. »	127
VI. Discussion générale et perspectives	137
VII. Références	145

Abréviations

AGCC: Acides Gras à Chaîne Courte

AMPC: Adénosine MonoPhosphate cyclique

ARNm: Acide Ribonucléique messenger

ARE: Adenosine –uracil multimer-Rich Elements

CARD: Caspase-Activating and Recruitment Domain

CD: Cluster de Différenciation

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CO : Monoxyde de Carbone

CPA: Cellules Présentatrices d'Antigène

CREB: cAMP Responsive Element Binding protein

DSS: Dextran Sodium Sulfate

HLA: Human Leukocyte Antigen

HO: Hème Oxygénase

ICAM: Intercellular Adhesion Molecule

Ig: Immunoglobuline

I- κ B: Inhibitory protein- κ B

IKK: I- κ B kinase

IFN: Interféron

IL: Interleukine

LIE: Lymphocytes Intra-Epithéiaux

LPL: *lamina propria* lymphocytes

LPMC: Lamina Propria Mononuclear Cells (Cellules mononucléées de la *lamina propria*)

LPS: Lipopolysaccharide

LRR: Leucine Rich Repeat

MAPkinase: Mitogen Activated Protein kinase

MC: Maladie de Crohn

MCT1 : Monocarboxylate transporter de type 1

MICI: Maladie Inflammatoire Chronique Intestinale

NBS : Nucleotide Binding Site

NF- κ B: Nuclear Factor- κ B

NOD: Nucleotide Oligomerisation Domain

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells (Cellules mononucléées du sang périphérique)

PCR: Polymerase Chain Reaction

PKA: Protéine Kinase A

PP: Plaque de Peyer

RCH: Rectocolite Hemorragique

RDP: Rational Design Peptide

RT-PCR: Reverse Transcriptase-PCR

SCID: Severe Combined Immune Deficiency

STAT: Signal Transducer and Activator of transcription

TcR: T cell receptor

Tg: Transgénique

TGF: Transforming Growth Factor

Th: T helper cells

TLR: Toll Like Receptor

TNBS: Acide Trinitrobenzène Sulfonique

TNF: Tumor Necrosis Factor

Tr: T regulatory cells

I. MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES (MICI)

I.1. Définition, épidémiologie

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) regroupent deux affections principales : la maladie de Crohn (MC) et la recto-colite hémorragique (RCH). Ces deux maladies touchent le sujet jeune et évoluent de façon chronique par poussées entrecoupées de rémissions de plus ou moins longues durées. Cette évolution particulière est à l'origine de lésions intestinales d'âges différents que l'on peut distinguer macroscopiquement et histologiquement en lésions aiguës et chroniques (Desreumaux et al., 1997. D'Haens et al. 1998.). Il existe de nombreux arguments, en particulier génétique, pour affirmer qu'il s'agit de maladies distinctes pour lesquelles les stratégies thérapeutiques médicales ou chirurgicales seront différentes (Hugot et al., 2001).

Le diagnostic de MICI, que ce soit de RCH ou de MC, repose sur un faisceau d'arguments anamnestiques, cliniques, endoscopiques et histologiques. Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun marqueur permettant d'affirmer avec certitude le diagnostic de l'une ou de l'autre maladie. Dans la majeure partie des cas, la distinction entre MC et RCH ne pose guère de difficulté. C'est le cas lorsqu'il existe des lésions anopérinéales typiques de MC, quand les lésions macroscopiques sont hétérogènes et entrecoupées d'intervalles de muqueuse saine et lorsqu'il existe des granulomes épithélioïdes et géo-cellulaires à l'examen histologique des prélèvements endoscopiques. En revanche, en cas d'atteinte limitée au rectum et au colon, la distinction entre RCH et MC à localisation colique peut être difficile et le diagnostic peut rester indéterminé pendant de nombreuses années ou de façon définitive (Joossens et al. 2002).

Les MICI constituent un problème majeur et font partie des priorités de santé publique en Gastroentérologie du fait de leur chronicité, de leur fort retentissement socio-professionnel,

de leur retentissement sur la qualité de vie de malades jeunes et de leur coût élevé direct et indirect pour la société. La prévalence des MICI a augmenté en raison d'une incidence croissante jusque dans les années 1980 et reste stable depuis. Sur la base des chiffres d'incidence de 1991 et de la médiane de survie, il est estimé qu'en 2005, 580000 Américains seront atteints de MC et 740000 de RCH. En France, les données épidémiologiques proviennent de deux registres : le registre EPIMAD du Nord-Ouest de la France et le registre ABERMAD des départements bretons. Le registre EPIMAD a montré une incidence des MICI stable depuis 1988 : 5,6 nouveaux cas de MC et 3,5 nouveaux cas de RCH pour 100000 habitants et par an (Gower-Rousseau et al. 1990). L'incidence des MICI dans les départements bretons est comparable à celle du Nord-Ouest de la France (Pagenault et al. 1997). En utilisant les mêmes règles de calcul et les données du registre EPIMAD, 120000 Français seront atteints de MC et 80000 de RCH en 2005.

I.2. Facteurs génétiques

L'influence des facteurs génétiques dans la physiopathologie et la survenue des MICI ont été suggérées depuis de nombreuses années dans des études épidémiologiques. Ces études ont montré une agrégation familiale et une fréquence plus élevée de la maladie chez les jumeaux homozygotes que dizygotes (Bonen et Cho, 2003). Ainsi, 5 à 10 % des patients atteints de MICI rapportent l'existence d'un antécédent familial le plus souvent concordant de MC ou de RCH suggérant que l'existence d'un cas familial de MICI est le facteur de risque prépondérant de survenue de la maladie (Russel et al., 1997). Dans les études de cohorte, le risque relatif chez les apparentés au premier degré d'un patient atteint de MICI est proche de 10 pour la RCH et de 14 pour la MC comparativement à la population générale. Ces études ont également démontré que la maladie, MC ou RCH, était similaire dans une famille dans les

trois quart des cas et que dans seulement 25 % des familles atteintes, il existait à la fois des cas de MC et de RCH (Orholm et al., 1991. Peeters et al., 1996). Ces données épidémiologiques sont renforcées par les résultats des études ayant croisé les registres des jumeaux monozygotes ou dizygotes et les registres des MICI. Ces études ont montré un taux de concordance pour la MC très supérieur chez les jumeaux monozygotes comparativement aux jumeaux dizygotes 44 et 27 % *versus* 4 et 0 %. Pour la RCH, la concordance est, en général, plus faible et n'est pas significativement différente entre les deux groupes de jumeaux (Subhani et al., 1998. Thompson et al. 1996. Tysk et al. 1988). Les résultats de ces études épidémiologiques sont donc en faveur d'un modèle de pathogénie faisant intervenir plusieurs gènes de susceptibilité dont certains seraient spécifiques à la MC ou à la RCH et d'autres gènes communs aux deux maladies.

De nombreuses études, soit par des techniques de génétique inverse, soit par des techniques de recherche du gène-candidat ont permis d'identifier une quinzaine de régions de susceptibilité aux MICI sur les 23 paires de chromosomes. Les principaux loci sont résumés dans le tableau 1 et la figure 1.

Tableau 1 : Principales régions de susceptibilité associée aux MICI.

	Chromosome	Etudes	Diagnostic	Gène Candidat
IBD1	16q12	Hugot et al.	MC	NOD2
IBD2	12q13	Satsangi et al.	RCH	VDR, IFN- γ
IBD3	6p13	Hampe et al.	MC, RCH	MHC I, II, TNF- α
IBD4	14q11	Ma et al.	MC	TCR α/δ
IBD5	5q31-33	Rioux et al.	MC	IL-3 , -4 , -5, -13
IBD6	19p13	Rioux et al.	MC, RCH	ICAM-1, C3, LTB4H
IBD7	1p 36	Cho et al.	MC, RCH	TNF-R, CASP9

VDR : récepteur à la vitamine D, IFN : interféron, TCR : T-cell Receptor, IL : interleukine, ICAM : intercellular adhesion molecule, LTBH : leucotriene B hydroxylase, TNF-R : récepteur du TNF, CASP : caspase.

FIGURE 1 loci mici

Le locus IBD1 sur le chromosome 16 est spécifiquement associé à la MC et a donné lieu à l'identification du premier gène de susceptibilité de la MC (i.e NOD2/CARD15) en 2001 par trois équipes différentes sur trois cohortes distinctes de patients (Hugot et al., 2001. Ogura et al., 2001. Hampe et al., 2001).

Trois mutations principales (3020 insC, Arg702Trp, Gly908Arg) représentant 80 % des mutations et 28 autres mutations secondaires ont été décrites comme associées à la MC dans la population européenne (Lesage et al. 2002). Dix à 30 % des patients atteints de MC sont hétérozygotes pour l'une des trois principales mutations et 3 à 5 % sont homozygotes ou double hétérozygotes composites. En comparaison, seulement 5 à 10 % des sujets contrôles sont hétérozygotes et 0 à 1 % homozygotes ou double hétérozygotes composites. Cette proportion n'est pas différente chez les patients atteints de RCH. Ainsi, le risque relatif de développer une MC sporadique ou familiale est compris entre 1,5 et 3 si le sujet est porteur d'une des trois principales mutations et compris entre 10 et 40 si il a deux mutations identiques ou non. Cependant, les mutations de CARD15/NOD2 n'expliquent pas à elles seules la survenue des MC et il a été démontré que la fréquence des mutations de CARD15/NOD2 dans les populations asiatiques ou afro-américaines était moindre que dans les populations caucasiennes (Tamboli et al., 2003). En plus d'avoir une influence sur le risque de survenue de la MC dans la population générale, il a été suggéré que les mutations de CARD15/NOD2 pouvaient influencer le phénotype de la maladie. Ainsi, il a été démontré dans une population européenne que l'existence d'une ou deux mutations sur les trois mutations principales était associée à une maladie débutant tôt avant l'âge de 15 ans, à une atteinte plus souvent iléale et à une maladie de type sténosant selon la classification de Vienne (Lesage et al., 2002).

Le gène NOD2/CARD15 code pour une protéine intracellulaire exprimée dans le cytoplasme de cellules dont les monocytes/macrophages (Ogura et al., 2001). La protéine possède trois domaines : le domaine CARD (caspase-activating and recruitment domain) a son extrémité N-terminale, un domaine NBS (nucleotide binding site) permettant la dimérisation de la protéine et un domaine LRR (leucine reach repeat) à son extrémité C-terminale. Grâce à son domaine LRR, Nod2 joue le rôle de récepteur à des fragments bactériens intra-cellulaires et permet une activation de signaux de transduction par interaction protéine-protéine grâce a son domaine CARD N-terminal (Chamaillard et al. 2003). Après oligomérisation de Nod2 *via* son domaine NBS, la protéine induit l'activation de NF- κ B par l'intermédiaire de la voie Rip2/IKK (Ogura et al., 2001) et permet l'activation de gènes codant pour la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et immunomodulatrices (figure 2). Alors qu'il était suggéré que Nod2 comme Nod1 étaient des récepteurs aux lipopolysaccharides (LPS) bactériens, il a été récemment démontré que Nod2 reconnaissait un motif spécifique de peptidoglycane : le muramyl dipeptide (MDP) à la fois pour les bactéries Gram- et Gram+ (Girardin et al., 2003. Inohara et al., 2003). De plus, il a été démontré que les mutations de NOD2/CARD15 associées à la MC étaient responsables d'une perte de fonction de la protéine entraînant une diminution de l'activation de NF- κ B en réponse aux MDP (Chamaillard et al., 2003b).

La protéine Nod2 est exprimée dans les monocytes/macrophages circulants et dans les monocytes de la *lamina propria* de la muqueuse intestinale du grêle. Nod2 est également exprimée dans les cellules épithéliales digestives de lignées cancéreuses coliques ou en culture primaire de cellules normales. Cette expression peut être induite et augmentée en situation inflammatoire par le TNF- α et l'IFN- γ (Gutierrez et al. 2002). Cette induction pourrait expliquer la surexpression de Nod2 constatée au cours de la MC dans la muqueuse intestinale à la fois dans les cellules épithéliales digestives, et les cellules mononucléées

adjacentes (Berrebi et al., 2003). De plus, il a été récemment démontré, au cours de la MC, une expression de Nod2 dans les cellules de Paneth situées au fond des cryptes intestinales. Ces cellules ont un rôle particulier dans la lutte anti-bactérienne digestive par leurs propriétés de phagocytose et par la présence de lysosomes à leur pôle apical. Le niveau d'expression de l'ARNm de Nod2 était corrélé à l'inflammation digestive. L'ARNm de Nod2 était également retrouvé dans le colon dans des zones d'inflammation chronique où les cellules de Paneth métaplasiques ont été décrites (Lala et al., 2003, Ogura Y et al., 2003).

Concernant le rôle de Nod2 dans la physiopathologie de la MC, l'ensemble de ces données suggère que Nod2 pourrait être un récepteur bactérien intracellulaire impliqué dans la première ligne de défense de l'immunité innée du tube digestif contre les bactéries. L'existence d'une mutation de NOD2/CARD15 entraînerait une perte de fonction et une diminution de l'immunité innée. Cette inefficacité relative des premières lignes de défense serait à l'origine d'une stimulation anormale de l'immunité acquise antigène spécifique faisant intervenir les lymphocytes effecteurs CD4+.

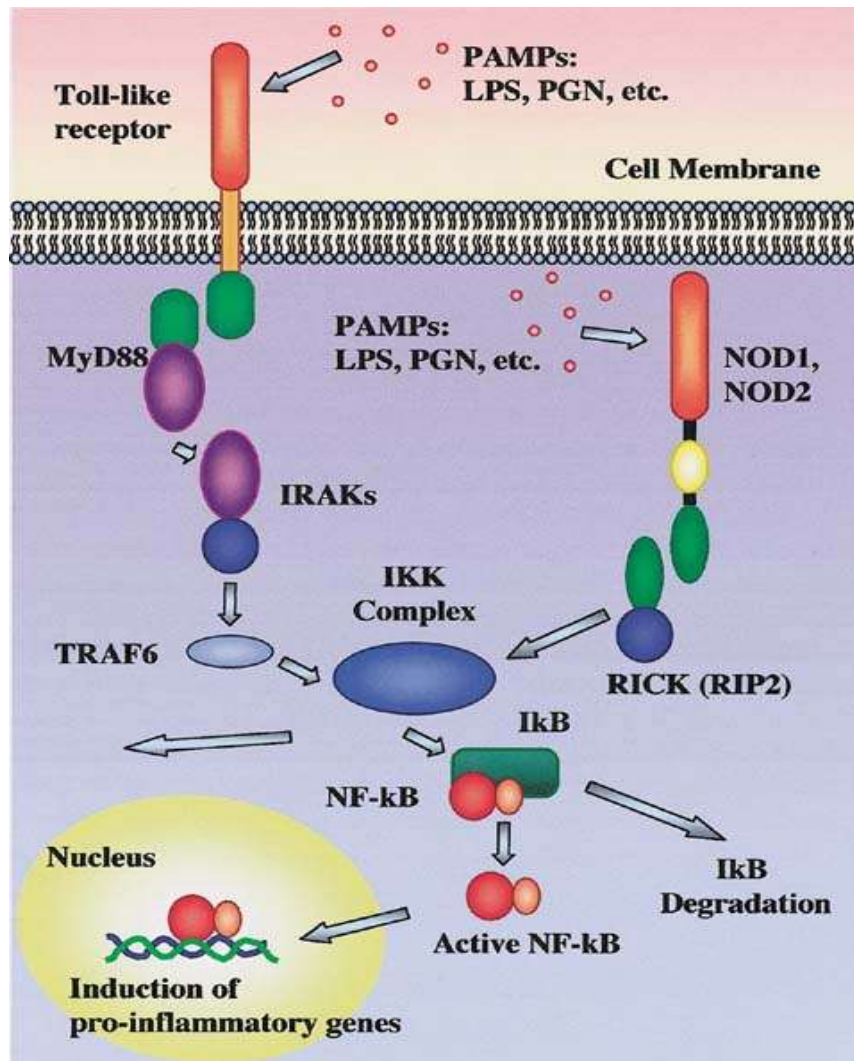


Figure 2 : Reconnaissance intra-cellulaire et extra-cellulaire des fragments bactériens par les récepteurs cellulaires. Les récepteurs Toll reconnaissent des Pathogen-Associated Molecule Pattern (PAMP) et activent la voie de transduction NF-κB. Après l'activation du récepteur Toll par un PAMP, la fraction intra-cytoplasmique du récepteur recrute la protéine Myd88 associée à l'IL-1 Receptor Associated Kinase (IRAK). Le complexe induit la phosphorylation de IRAK puis le recrutement de TRAF6 (TNF Receptor –Associated Factor 6) et permet la phosphorylation de IκB kinase et enfin la dissociation du complexe IκB et NF-κB. NF-κB est transloqué dans le noyau permettant l'activation de nombreux gènes. De façon comparable aux récepteurs Toll, les protéines Nod2 ou Nod1 sont des récepteurs intra cellulaires aux

PAMP et par l'intermédiaire de leur domaine CARD activent la voie de signalisation NF- κ B (Bonen et Cho, 2003).

I.3. Facteurs environnementaux

Plusieurs arguments plaident en faveur de l'implication de facteurs environnementaux dans la survenue et dans la pathogénie des MICI notamment l'absence de concordance complète chez les jumeaux monozygotes dont l'un est atteint de MC ou de RCH. Un deuxième argument est la constatation de variations significatives de l'incidence des MICI en fonction de la zone géographique. Il est admis que les MICI, MC et RCH, sont plus fréquentes dans l'hémisphère nord que dans l'hémisphère sud et que ce gradient Nord-Sud existe également en Europe et en Amérique du Nord (Shivananda et al., 1996. Sonnenberg et al., 1991). Par ailleurs, dans les familles ayant plusieurs membres atteints de MC, la fréquence constatée de MICI chez les conjoints des patients est supérieure à la fréquence attendue (Laharie et al., 2001) et la distribution de la maladie chez les descendants au premier degré n'est pas seulement due au hasard mais aussi influencée par l'ordre des naissances (Hugot et al., 2003).

De nombreux facteurs environnementaux ont été incriminés comme le tabac, le type d'alimentation, l'hygiène au cours de la petite enfance, des agents infectieux viraux ou bactériens ou encore le stress (Fiocchi, 1998. Gent et al. 1994).

Les relations entre phénomènes de stress aigus ou chroniques et poussées de MICI sont en pratique clinique des sujets de controverses. Il n'est pas clairement démontré qu'il existe une relation étroite entre événements heureux ou malheureux et déclenchement d'une première poussée de MICI. En revanche chez l'animal et dans plusieurs modèles de colite expérimentale, il a été démontré que le stress aigu par l'intermédiaire de l'axe hypothalamo-hypophysaire peut induire une modification de la réponse immune et ré-orienter cette réponse

vers une réponse de type Th2. Le stress chronique modifie également l'homéostasie du tube digestif et induit chez l'animal une augmentation de la perméabilité intestinale, une augmentation des translocations bactériennes dépendante des lymphocytes CD4+ et de la production d'IFN- γ (Ferrier et al., 2003). Le profil de sécrétion en cytokines induit par le stress répété est variable d'un organe à l'autre.

Parmi ces facteurs, il a été clairement démontré que le tabac avait une influence sur l'évolution et l'histoire naturelle de la MC et de la RCH. Le tabac a un effet « protecteur » au cours des RCH et aggravant sur la MC. Par ailleurs, il ne s'agit pas d'un facteur environnemental figé puisque la modification des habitudes de consommation tabagique modifie le cours évolutif de la MC de façon bénéfique en diminuant la fréquence des récives et en diminuant le recours aux traitements immunosuppresseurs (Cosnes et al. 1996. Cosnes et al., 2001).

Des agents infectieux viraux ont été incriminés dans la physiopathologie des MICI en particulier le virus de la rougeole qui chez la femme enceinte ou chez le nouveau né augmenteraient le risque de MC (Wakefield et al., 1995). Des bactéries ont été également incriminées comme *Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes* ou une souche adhésive et invasive d'*Escherichia Coli* (Liu et al., 1995, Darfeuille-Michaud et al., 1998). Cependant, la responsabilité d'une bactérie pathogène dans le déclenchement ou la pérenisation des poussées de MICI n'a pas été confirmée.

En dehors des agents pathogènes, il existe des arguments en faveur d'une implication de la flore digestive commensale en tant qu'initiateur et/ou amplificateur de l'inflammation digestive chronique dans les MICI ; en effet, plusieurs études ont montré que la modification de la flore par l'utilisation d'antibiotiques ou inversement de probiotiques avait un impact sur le cours évolutif de la maladie (Rutgeerts et al., 1995. Shanahan, 2000). De plus, les modèles

expérimentaux d'inflammation intestinale sont très souvent dépendants de la présence d'une flore commensale chez l'animal (tableau 2).

I.4. Modèles animaux d'inflammation intestinale (tableau 2)

Quatre groupes de modèles animaux développent des colites inflammatoires. L'utilisation de ces modèles animaux a permis d'étudier les événements précoces de la réponse inflammatoire digestive, d'identifier les différentes populations cellulaires (lymphocytes, macrophages, cellules dendritiques, cellules épithéliales digestives) et les interactions cellulaires à l'origine des lésions ou participant à la pérennisation de l'inflammation chronique.

Tableau 2 : Modèles animaux de lésions inflammatoires intestinales.

	Animal	Localisation	flore
Colites induites par délétion ou surexpression d'un gène			
IL-2 γ -	Souris	Colon	Oui
IL-2R α γ -	Souris	Colon	?
IL-10 γ -	Souris	Colon	Oui
TGF β 1 γ -	Souris	Diffus	?
TCR α, β γ -	Souris	Colon	?
MHC class II γ -	Souris	Colon	?
G α i2 γ -	Souris	Colon	?
IL-4 gène Tft	Souris	Iléon	?
IL-5 Tg	Souris	Colon	?
IL-7 Tg	Souris	Colon	?
N-cadherin Tg	Souris	Colon	?
HLA-B27 Tg	Rat	Estomac, Colon	Oui
CD3 ϵ 26 Tg	Souris	Colon	?
TNF α Knock in	Souris	Iléon	Oui
SAMP1/Yit	Souris	Iléon	Oui
Colites induites par transfert de cellules			
CD45RB SCID	Souris	Colon	Oui
Colites induites par agents chimiques			
Polysaccharides/peptidoglycan	Rat	Iléon, Colon	Oui
TNBS	Rat, Souris	Colon	Oui
Acide Acétique	Rat, Lapin, Souris	Colon	Oui
DSS	Souris	Colon	Oui
Indométacine	Rat, Souris	Grêle	Oui
Oxazolone	Rat, Souris	Colon	Oui
Colites spontanées			
C3H/HejBir	Souris	Colon	Oui
Cynomolgus	Singe	Colon	Oui

De plus, un certain nombre de modèles ont permis de démontrer l'importance de facteurs environnementaux comme la flore digestive dans le déclenchement de la réponse immunitaire et du terrain génétique dans la susceptibilité aux colites.

Le premier groupe est représenté par les modèles de colite dite spontanée survenant chez des animaux génétiquement modifiés. Ces animaux sont soit invalidés pour un gène (animaux knock-out) ou au contraire expriment anormalement un gène dans l'ensemble de l'organisme (animaux knock-in) ou dans un tissu ou un organe particulier (transfert de gène sous contrôle d'un promoteur spécifique d'organe).

La colite peut être également induite par le transfert de cellules immuno-réactives comme dans le modèle de colite induite chez la souris immuno-déficiente SCID. Les souris SCID développent des colites après le transfert de lymphocytes ayant un phénotype et des propriétés particulières : les lymphocytes T $CD45RB^{high}$. *In situ*, en raison de l'immunodéficience des souris et de l'absence de lymphocytes suppresseurs, ils acquièrent un phénotype s'approchant des lymphocytes effecteurs T helper 1. Ces lymphocytes sont isolés par tri sélectif de la rate et séparés des autres splénocytes. La colite induite chez l'animal receveur peut être prévenue ou traitée par le transfert ou le co-transfert d'une autre sous-population de lymphocytes $CD4^+$ de phénotype $CD45RB^{low}$, ayant des propriétés régulatrices.

Dans un troisième groupe d'animaux, les colites sont induites par l'administration d'agents chimiques (acide trinitrobenzene sulfonique, sulfate de dextran sodique, indométacine, oxasolone) ou par des produits bactériens (peptidoglycans) (Elson et al., 1995). Enfin, dans le quatrième groupe de modèle, les animaux développent spontanément des colites inflammatoires sans manipulation génétique ni administration d'agent chimique. Il s'agit des souris C3H/HeJ/Bir ou des singes cynomolgus.

Dans beaucoup de ces modèles, les lésions macroscopiques et histologiques sont associées à une augmentation des concentrations muqueuse en cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , le TNF- α/β ou l'IFN- γ de façon comparable aux lésions digestives chez l'homme au cours des MICI. Cependant, il n'existe pas un profil sécrétoire unique reproductible d'un modèle à l'autre et dans certains cas, l'inflammation intestinale peut survenir aussi bien dans des souches sauvages que chez des animaux invalidés pour la synthèse de cytokines comme le TNF ou l'IFN- γ . Inversement, dans certains modèles, l'hyperexpression de cytokines pro-inflammatoires rendent les animaux d'autant plus susceptibles à l'induction de colites.

Nous avons utilisé au cours de notre travail un modèle d'inflammation digestive chez le rat induit par l'instillation intra rectale d'acide trinitro benzene sulfonique (TNBS) (Article 2, Article 3, Annexe). Ce modèle est comparable chez le rat et la souris. Les signes cliniques sont représentés par une altération de l'état général avec une perte de poids, une diarrhée sanglante et parfois un prolapsus rectal. L'inflammation est quantifiée après sacrifice des animaux et dissection du colon inflammatoire. Après ouverture du colon inflammé, il existe un épaississement de la paroi, des ulcérations recouvertes de fausses membranes pouvant aller jusqu'à des perforations et un érythème prédominant sur le colon distal (figure 3). L'examen histologique des segments coliques inflammatoires montrent un infiltrat mononucléés et à polynucléaires prédominant dans la *lamina propria*, un épaississement et des ulcérations muqueuses (figure 3). De façon comparable à la MC, il a été décrit des granulomes épithélioïdes et giganto-cellulaires. L'intensité de la colite est évaluée par la mesure de scores histologiques et macroscopiques validés (Morris et al., 1989. Wallace et al., 1989). L'instillation par voie intrarectale de TNBS dans le colon de rats génétiquement susceptibles induit une réponse immune à médiation cellulaire caractérisée par une infiltration massive de lymphocytes T et de monocytes/macrophages dans l'ensemble de la paroi digestive. Une

caractéristique de ce modèle est la pérennisation de l'inflammation en l'absence même de ré-administration de TNBS. Ce stade d'inflammation chronique est secondaire au phénotype particulier des lymphocytes T dont le transfert chez des animaux naïfs induit une colite comparable à celle induite par l'instillation de TNBS (Neurath et al. 1996, Neurath et al., 2000). Il existe de plus, une rupture de tolérance vis à vis de la flore et les lymphocytes isolés de la *lamina propria* sont activés et prolifèrent en présence de sonicats de flore autologue (Neurath et al., 2000). Les lymphocytes T isolés de la *lamina propria* du colon et les splénocytes des animaux inflammés par le TNBS sécrètent après stimulation non spécifique par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 préférentiellement de l'IFN- γ et du TNF- α et de faible concentration en IL-4 témoignant d'un phénotype plutôt de type Th1 que Th2. De plus, les concentrations intra-muqueuses d'IL-12, orientant la réponse immunitaire vers un profil de type Th1, dans le colon des animaux inflammés, sont anormalement élevées (Neurath et al., 2000). Dans le modèle colite induite par l'instillation de TNBS, l'activation et la prolifération des lymphocytes de type Th1 nécessitent une interaction entre des cellules présentatrices de l'antigène : les monocytes/macrophages exprimant fortement le CD40 et les lymphocytes exprimant le ligand correspondant (CD40L). Le traitement des animaux par anticorps anti-CD40L prévient l'induction de la colite en bloquant la différenciation des lymphocytes en profil de type T helper 1 (Stuber et al., 1996). L'ensemble de ces données est en faveur d'un modèle animal d'inflammation chronique induit par une dérégulation du système immunitaire muqueux comparable à la MC chez l'homme. Il a été également démontré que le TNF- α jouait un rôle prépondérant dans l'inflammation digestive des animaux inflammés. L'inflammation est considérablement diminuée par l'injection intra-péritonéale d'anticorps anti-TNF- α et inversement l'inflammation ne pouvait être induite chez les souris TNF knock-out (Neurath et al., 1997). Ainsi, le modèle de colite induite par le TNBS semble être un

modèle adapté à l'étude de molécules thérapeutiques inhibitrices de sécrétion du TNF- α dans la MC.

Figure3: TNBS colitis

II. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA REPOSE IMMUNITAIRE

II.1. Réponse immunitaire normale du tube digestif.

Les cellules immunitaires intestinales sont en partie regroupées en nodules lymphoïdes au niveau des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques. Les lymphocytes sont également dispersés dans la *Lamina Propria* (LPL) et dans l'épithélium intestinal (LIE). Les plaques de Peyer sont situées directement au contact de cellules épithéliales M spécialisées dans la capture et le transport d'antigènes vers les macrophages ou les cellules dendritiques. Ces dernières sont des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) qui présentent des peptides antigéniques associés aux molécules du complexe majeur (CMH) de type I à des lymphocytes CD8⁺ ou aux molécules du CMH de type II aux lymphocytes T CD4⁺. Les lymphocytes T activés migrent dans la circulation générale *via* les ganglions mésentériques et la circulation lymphatique. La majorité des LT recoloniseront la *lamina propria* ou l'épithélium grâce à l'expression membranaire d'intégrines ($\alpha4\beta7$, $\alphaE\beta7$) impliquées dans le tropisme vers la muqueuse. La majorité des cellules T de l'épithélium et de la *lamina propria* expriment le récepteur T pour l'antigène (TcR) $\alpha\beta$ et le marqueur CD45RO caractéristique des cellules mémoires. Cependant, il existe des différences entre les LPL et les LIE (tableau3) (Cerf-Bensussan, 2000). Les LPL sont majoritairement CD4⁺ et les LIE CD8⁺. De plus, 5 à 15 % des LIE expriment le TCR $\gamma\delta$.

Tableau 3 : Pourcentage de lymphocytes de la *lamina propria* (LPL) et de lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) exprimant différents types de récepteur T à l'antigène et de molécules de surface dans le tube digestif (d'après Cerf-bensussan, 2000).

	TcR $\alpha\beta$	TcR $\gamma\delta$	CD4	CD8 $\alpha\beta$	CD8 $\alpha\alpha$	α E β 7	CD45RO	Rôle
LPL	95	5	70	30	ND ^a	40	90	Réponse à médiation cellulaire et humorale
LIE	80	15	10	70	5-10	95	> 90	Réponses cytotoxiques

^a Donnée manquante,

II.2. Cellules épithéliales digestives et présentation antigénique

Alors que, les macrophages et les cellules dendritiques sont des CPA professionnelles, les cellules épithéliales digestives sont des CPA non professionnelles de la muqueuse intestinale.

Les trois types cellulaires expriment des récepteurs membranaires appartenant à la famille des récepteurs Toll (Toll like receptor, TLR) 1 à 10 ou cytoplasmiques (Nod1, Nod 2/Card15) leur permettant de détecter des structures moléculaires communes à de nombreux types de microbes : les Pathogen Associated Molecule Pattern (PAMP) (Sakagushi, 2003). Les structures reconnues par ces récepteurs peuvent être soit des lipopolysaccharides (LPS), soit des peptidoglycanes (PGN) ou des fragments plus petit : les muramyl dipeptides (MDP) (Revillard, 2001. Chamailard et al., 2003). La stimulation des TLR, de Nod1 et Nod2, par les PAMP déclenche l'activation du facteur transcriptionnel NF- κ B favorisant la transcription de nombreux gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α), des cytokines de type T helper 1 (Th1) (IL-12, IFN- γ), des chemokines, des molécules associées à la présentation antigénique, des enzymes dont les produits contribuent au processus

inflammatoire comme la forme inductible de la nitric oxyde synthase (iNOS) et la forme inductible de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) et des gènes impliqués dans l'apoptose et la survie (Pahl, 1999. Yamamoto et Gaynor, 2001).

Les cellules dendritiques sont des CPA professionnelles regroupées au niveau des PP et dispersées dans la *lamina propria*. Plusieurs phénotypes de cellules dendritiques ont été décrits avec des profils de sécrétion en cytokines différents. La sécrétion de cytokines va influencer l'activation et la prolifération des lymphocytes. Les antigènes non pathogènes induisent plutôt la sécrétion d'IL-10 par les cellules dendritiques orientant les lymphocytes vers un phénotype régulateurs ne proliférant pas et ainsi n'entraînant pas de réaction inflammatoire, alors que les antigènes pathogènes vont plutôt induire la sécrétion d'IL-12 orientant les lymphocytes vers un phénotype de type Th1 effecteur à l'origine d'une inflammation locale.

Depuis de nombreuses années, les propriétés de présentation antigénique des cellules épithéliales digestives ont été explorées. Par sa situation anatomique, l'épithélium digestif et les cellules épithéliales jouent un rôle primordial dans l'immunomodulation intestinale et les phénomènes de tolérance. En effet, les cellules épithéliales représentent la première porte d'entrée des antigènes nutritionnels ou bactériens vers le compartiment immunitaire de l'organisme. Par ailleurs, il a été démontré que la présentation d'antigène exclusivement par les cellules épithéliales digestives à des LT CD8+ contribuait à leur anergie ce qui implique que les cellules épithéliales digestives ont un rôle effectif de présentation antigénique (Vezys et al., 2000). Cette fonction nécessite que les cellules épithéliales aient les capacités d'internaliser des antigènes, de les dégrader, de les modifier (processing), et de les présenter à des lymphocytes en association à l'expression membranaire de molécules associées à la présentation antigénique pour les activer et les stimuler.

L'internalisation d'antigènes solubles, par pinocytose, par les cellules épithéliales digestives est un phénomène démontré de longue date aboutissant à la dégradation des antigènes dans l'endosome puis à leur présentation, soit à des LT CD4+ en association à des molécules du CMH de classe II, soit à des LT CD8+ en association à des molécules du CMH de classe I ou à des molécules du CMH de classe Ib comme le CD1d et des molécules de co-stimulation comme le gp 180 (Shao L et al., 2001).

De plus, il a été démontré que les cellules épithéliales digestives avaient la capacité de dégrader les antigènes avant de les présenter à des lymphocytes par des voies différentes en fonction de leur internalisation soit au pôle apical, soit au pôle baso-latéral. En réponse, différents sous-types de LT peuvent être activés par un même antigène témoignant de l'existence et de la fonctionnalité de différentes voies de processing dans la cellule épithéliale digestive (Hershberg et al., 1997, 1998, 2000).

A la phase finale, les cellules épithéliales digestives expriment à leur surface les antigènes "procéssés" associés aux molécules du CMH de classe I ou II et à des molécules de co-stimulation comme le CD80 (B7-1) et le CD86 (B7-2) nécessaire à une activation optimale des lymphocytes. En situation normale, les cellules épithéliales expriment faiblement ces molécules et n'entraînent pas de ce fait de réponse lymphocytaire importante. Cependant, au cours d'une inflammation, l'expression membranaire des molécules associées à la présentation antigénique comme les molécules du CMH de classe I et II, ICAM-1, LFA-3, CD80, CD86 sont induites et permettent une plus grande capacité des cellules épithéliales à présenter et à stimuler les LT vis à vis d'un antigène (Hershberg et al., 1997). Nous avons, dans la première partie de cette thèse, évalué l'expression des molécules associées à la présentation antigénique après stimulation inflammatoire et traitement par l'IL-10.

II.3. Sous-populations lymphocytaires T.

Le système immunitaire digestif doit à la fois assurer une défense efficace de l'organisme contre les agents pathogènes tout en maintenant une tolérance vis-à-vis des antigènes alimentaires et de la flore endogène. La régulation de la réponse immunitaire est un élément crucial pour maintenir l'intégrité du tube digestif et de l'organisme.

Deux sous-populations de lymphocytes CD4+, lymphocytes T helper 1 (Th1) et T helper 2 (Th2) ont été mis en évidence pour la première fois dans les années 90 et se différencient notamment par le profil de cytokines produites par l'un et l'autre type (Mosman et al., 1986). Les lymphocytes Th1 produisent majoritairement de l'IFN- γ , du TNF- α/β et de l'IL-2 et sont à l'origine de réponses à médiation cellulaire et des réactions d'hypersensibilité retardée. Les lymphocytes de type Th2, produisent d'avantage d'IL-4, d'IL-5, d'IL-10 et d'IL-13 et sont responsables des réponses à médiation humorale et allergiques en induisant la production d'IgE et d'IgG par les lymphocytes B (Abbas et al., 1996). La différenciation des lymphocytes naïfs CD4+ en sous-population de type Th1 ou Th2 est une étape clé de la réponse immunitaire et fait intervenir entre autres facteurs, l'environnement cytokinique et les facteurs de transcription associés. Parmi ces cytokines, l'IL-12 induit une différenciation de type Th1 par l'intermédiaire de l'induction du facteur de transcription : Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) 4 (O'shea et al., 2002). A l'inverse, la différenciation des lymphocytes en sous-population de type Th2 est induite préférentiellement par la production d'IL-4 *via* l'activation de STAT6 (Zhu et al., 2001). Cependant, STAT4 et STAT6 ne sont pas les seuls facteurs de transcription responsables de la différenciation des lymphocytes en sous-population de type Th1 ou Th2 et d'autres facteurs ont été identifiés tels que T-bet pour les lymphocytes Th1 et GATA-3 pour les lymphocytes de type Th2 (O'Shea et Paul, 2002).

Outre les sous-populations de type Th1 et Th2, de nouvelles populations de lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ ont été identifiées ayant des propriétés régulatrices. Ces lymphocytes participent au contrôle de la réponse immunitaire en diminuant voire en inhibant l'activation et la prolifération des lymphocytes effecteurs Th1 ou Th2. Récemment, des lymphocytes CD4⁺CD25⁺ ont été isolés du sang périphérique et du thymus chez la souris, le rat et l'homme (Takahashi et al., 1998). Ces lymphocytes T régulateurs (Treg) représentent environ 10 % de l'ensemble des lymphocytes T CD4⁺ circulants et sont thymo-dépendants. Il existe d'autres sous-populations régulatrices thymo-indépendantes qui sont induites à partir de LT CD4⁺ naïfs périphériques activés dans un environnement cytokinique favorable : les lymphocytes de type Th3 et Tr1 (Chen et al., 1994, Groux et al., 1996). Il a été démontré que les lymphocytes CD4⁺CD25⁺ Treg pouvaient empêcher le développement de maladies auto-immunes (diabète, gastrite) chez la souris ou chez le rat et diminuer l'immunité anti-tumorale ou l'intensité de colites expérimentales chez la souris (Singh et al., 2001). Les lymphocytes CD4⁺CD25⁺ expriment à leur surface les récepteurs TLR 4, 5, 7 et 8 et leur activité suppressive et immunorégulatrice est augmentée par le LPS en l'absence même d'interaction cellulaire avec des CPA comme les macrophages et les cellules dendritiques (Caramalho et al., 2003. Chandrashekhar et Medzhitov, 2003). Cependant, outre ses effets sur les lymphocytes CD4⁺CD25⁺, le LPS est plutôt connu pour activer la réponse immunitaire effectrice *via* son interaction avec TLR4 sur les cellules dendritiques ou les macrophages. Ceci a pour effet d'augmenter leurs capacités de présentation antigénique, l'expression des molécules du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 et la production de cytokines pro-inflammatoires. Les propriétés *a priori* contradictoires du LPS sur les CPA et les lymphocytes régulateurs CD4⁺CD25⁺ semblent être dépendantes des concentrations en LPS nécessaires. Il semble que de faibles concentrations soient suffisantes pour activer les CPA et permettre une réponse immune effectrice adaptée contre les infections

alors que de fortes concentrations de LPS, comme on peut le voir au cours des chocs septiques, activent les lymphocytes régulateurs évitant la production en excès de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1) par les CPA *via* la production de cytokines immuno-régulatrices (IL-10) (Belkaid et al., 2002. Xu et al., 2003).

Une autre voie de régulation implique les interactions entre les molécules de co-stimulation CD80/86 exprimées sur les CPA et leurs ligands CTLA-4 et CD28 exprimés sur les lymphocytes CD4+CD25+. L'affinité de CTLA-4 pour le CD80 est 100 fois supérieure à celle du CD28. L'interaction de CD80 et de CTLA-4 permet la régulation de la réponse immunitaire alors que l'interaction entre le CD80 et son autre ligand le CD28 inhibe les fonctions suppressives des lymphocytes CD4+CD25+. En l'absence d'infection, les CPA expriment faiblement les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 et les lymphocytes régulateurs CD4+CD25+ interagissent avec les CPA *via* CTLA-4 et non CD28 permettant leur rôle immuno-régulateur. En cas d'infection, les CPA activées expriment fortement CD80/86 et interagissent simultanément avec CTLA-4 et CD28 sur les lymphocytes régulateurs CD4+CD25+. L'interaction avec le CD28 inhibe les capacités suppressives des lymphocytes et permet l'activation des lymphocytes effecteurs de type Th1 ou Th2 (Salomon et Bluestone, 2001).

Concernant les sous-populations Tr1 et Th3, l'environnement cytokinique joue un rôle important pour la différenciation des lymphocytes naïfs CD4+. En présence d'IL-10 et d'IFN- α , la stimulation répétée de lymphocytes T naïfs aboutit à une différenciation en lymphocytes de type Tr1. Les lymphocytes Tr1 se caractérisent par la sécrétion de grandes quantités d'IL-10 et de TGF- β , de faibles quantités d'IFN- γ , d'IL-5 et d'IL-2 et par l'absence de sécrétion d'IL-4. Ils ne prolifèrent quasiment pas après stimulation *via* le TCR et suppriment la réponse immunitaire de lymphocytes T naïfs par l'intermédiaire de leur sécrétion en IL-10 et TGF- β (Groux et al., 1997). Les propriétés immunosuppressives des lymphocytes Tr1 ont été

démontrées *in vivo* dans le modèle de colite induite par le transfert de lymphocytes effecteurs T CD45RB^{high}. La colite est induite par le transfert de ces lymphocytes chez la souris SCID alors que le transfert des lymphocytes CD45RB^{low} ou le co-transfert des deux populations est sans effet. De façon identique aux lymphocytes CD45RB^{low}, la colite pouvait être prévenue par le co-transfert de lymphocytes de type Tr1. Dans ce modèle, les lymphocytes de type Tr1 préalablement sensibilisés à l'ovalbumine pouvaient être réactivés *in vivo* de façon antigène-dépendant par l'administration orale d'ovalbumine chez la souris SCID inflammée.

Les lymphocytes Th3 se caractérisent eux par la sécrétion de grande quantité de TGF- β et de quantité variable d'IL-10 et d'IL-4. Cependant, il apparaît actuellement difficile de différencier les sous-populations Tr1 et Th3 et il a été suggéré que les deux populations correspondaient à un sous-type identique de lymphocytes.

III. REPONSE IMMUNITAIRE AU COURS DES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES

III.1. Production de cytokines par les lymphocytes T

En fonction de la nature et de la concentration antigénique, la réponse immunitaire muqueuse pourra être orientée vers un profil de type Th1 caractérisée par un excès de production d'IFN- γ , d'IL-2 et de TNF ou un profil de type th2 caractérisé par un excès de production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. Les MICI n'échappent pas à cette dichotomie entre réponse de type Th1 et réponse de type Th2.

Il existe de nombreux arguments chez l'homme et chez l'animal pour supporter l'hypothèse d'une réponse de type Th1 au cours de la MC bien qu'il ait été suggéré à la phase précoce de récurrence de la maladie un profil de type Th2 dans l'iléon (Desreumaux et al., 1997). Dans les

lésions ulcéreuses, il existe une production excessive d'IL-12 par les macrophages de la *lamina propria* au cours de la MC comparativement à des témoins et à des patients atteints de RCH (Monteleone et al., 1997) ce qui est cohérent avec l'expression en excès des facteurs de transcription STAT4 et T-bet dans des extraits nucléaires de lymphocytes T et de l'expression membranaire de la chaîne $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12 (IL-12R $\beta 2$) (Neurath et al., 2002. Weigmann et Neurath, 2002). Dans ces conditions, il n'apparaît pas surprenant que les lymphocytes T CD4⁺ isolés de la *lamina propria* spécifiquement de patients atteints de MC produisent préférentiellement de l'IFN- γ plutôt que de l'IL-4 (Fuss et al., 1996). Un argument supplémentaire en faveur d'une réponse de type Th1 au cours de la MC est apporté par l'efficacité thérapeutique d'anticorps monoclonaux anti-IL-12p40 sur la réponse inflammatoire. Ces anticorps agissent en amont de la production de cytokines pro-inflammatoires en empêchant la réponse immune de type Th1 (Schmidt et al., 2003. Bouma G et Stober W, 2003). Une autre cytokine, l'IL-23 a été associée à la réponse de type Th1 dans la MC. L'IL-23, associant la sous-unité p40 de l'IL-12 et la sous-unité p19 de l'IL-23, maintient et pérennise la réponse de type Th1 *via* une induction de STAT4 dans des lymphocytes mémoires CD45RO mais son rôle exact chez l'homme reste à déterminer.

A l'inverse de la MC et de son profil de type Th1, il existe des arguments en faveur d'une réponse immune de type Th2 au cours de la RCH. Cependant, il n'a pas été clairement démontré que les lymphocytes T isolés de la muqueuse digestive de patients atteints de RCH avaient un profil de sécrétion typiquement Th2. En effet, ces lymphocytes ont une production accrue d'IL-5 mais pas d'IL-4 (Fuss et al., 1996) . Cependant, la fréquence élevée des auto-anticorps, la prédominance des anticorps de type IgG1 et IgG4 et l'expression de Epstein-Barr-Virus-induced gene 3 (EBI3) spécifiquement au cours de la RCH, sont des arguments en faveur d'une réponse immune de type Th2. De plus, dans un modèle animal validé de RCH, la colite induite par l'oxazolone (tableau 2), le rôle déterminant de lymphocytes T sécrétant en

IL-13 a été démontré (Heller et al. 2002). Des travaux préliminaires ont également montré que la production d'IL-13 par des lymphocytes extraits de la *lamina propria* de patients atteints de RCH était plus importante que celle de lymphocytes provenant de lésions de MC et de témoins indemnes de MICI (Bouma et Stober, 2003).

D'autres cytokines non typiquement classées dans un profil de sécrétion de type Th1 ou Th2 sont produites en excès par les cellules effectrices de la réponse immunitaire au cours de la MC ou de la RCH comme l'IL-15, l'IL-16 ou l'IL-18. Cependant, à l'inverse de l'IL-12 ou de l'IL-13 dont le rôle respectif a été démontré dans des modèles animaux ou par l'efficacité d'anticorps monoclonaux, il est peu probable que ces cytokines aient un rôle majeur dans la physiopathologie des MICI [Bouma G et Stober W, 2003].

III.2. Inflammation chronique non spécifique

La réponse immunitaire de type Th1 dans la MC ou de type Th2 dans la RCH aboutit à l'activation de macrophages et à la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6 ou le TNF, cytokines responsables de l'inflammation chronique digestive. Parmi ces cytokines, le TNF joue un rôle central dans la MC et de nombreuses études ont confirmé une augmentation de sa concentration dans la muqueuse intestinale, les selles, le sérum, les cellules mononucléées de la *lamina propria* ou du sang périphérique des patients (Plevy et al., 1995. Noguchi et al., 1998. Bouma et al., 1995). De plus, cette augmentation de la production de TNF par les biopsies et les lymphocytes de la *lamina propria* de patients atteints de la MC, était également associée à une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-6 (Reimund et al., 1996, Segain et al., 2000).

III.3. Lymphocytes régulateurs

La réponse inflammatoire intestinale est normalement équilibrée entre les cellules effectrices Th1 et Th2 et les cellules T régulatrices. L'inflammation chronique, qui caractérise les MICI, pourrait être secondaire à un excès des cellules effectrices ou à un défaut des cellules régulatrices ou à l'association des deux.

Le rôle des lymphocytes régulateurs de type Tr1 dans la physiopathologie des MICI a été suggéré dans le modèle de colite chez la souris SCID induite par le transfert de lymphocytes CD45RB^{high} (Groux et al., 1997). Le co-transfert des lymphocytes Tr1 et CD45RB^{high} inhibait l'induction de la colite.

D'autre part, dans les plaques de Peyer, plusieurs phénotypes de cellules dendritiques ont été décrits. En particulier, les cellules dendritiques myéloïdes CD8 α -/CD11b⁺ sécrètent de grande quantité d'IL-10 comparativement à de faible concentration en IL-12, permettant un environnement cytokinique favorable à la différenciation de lymphocytes naïfs en lymphocytes régulateurs Tr1 (Iwasaki et al., 2001). Ainsi, les lymphocytes Tr1 activés en réponse à la présentation d'antigènes par ces cellules dendritiques pourraient, en association aux lymphocytes régulateurs CD4⁺CD25⁺ sécrétant du TGF- β , contrôler la réponse contre des antigènes de la flore digestive. Au cours des MICI, un défaut de régulation pourrait être à l'origine d'une activation anormale de la réponse immunitaire effectrice de type Th1. Cependant, si la présence d'IL-10 est nécessaire pour le contrôle de l'inflammation digestive et pour la sécrétion de TGF- β chez la souris (Kuhn et al., 1993), son rôle lié ou non aux lymphocytes de type Tr1 chez l'homme n'a pas été clairement élucidé.

La régulation de la réponse immunitaire digestive est un phénomène complexe faisant intervenir plusieurs sous-populations de lymphocytes CD4⁺ et il a été récemment mis en évidence chez l'homme une sous-population régulatrice de lymphocytes CD8⁺ (Allez et al.,

2002). Les cellules épithéliales digestives ont la capacité d'activer des lymphocytes intra-épithéliaux ou périphériques majoritairement de type CD8+. Parmi les sous-populations activées, certains lymphocytes CD8+CD28- exprimant le CD101 et l'intégrine $\alpha E\beta 7$ ont des propriétés régulatrices. Ces propriétés nécessitent d'une part un contact cellulaire avec les cellules épithéliales digestives et d'autre part la présentation de l'antigène associée à l'expression de la molécule de co-présentation gp180 et de molécules du CMH de classe Ib : le CD1d [Allez M et al., 2002].

Le rôle des lymphocytes régulateurs CD8+ au cours des MICI est à définir mais il apparaît de plus en plus que les différents sous-types de lymphocytes régulateurs ont une responsabilité dans la physiopathologie des MICI et ouvrent de nouvelles voies thérapeutiques.

IV. THERAPIE BIOLOGIQUE EXPERIMENTALE

IV.1. Introduction, but de la thèse

Les travaux concernant le système immunitaire du tube digestif chez l'animal et chez l'homme ont permis, ces dernières années, d'identifier de nouvelles voies d'activation lymphocytaire, de signalisation et des populations lymphocytaires impliquées dans la physiopathologie des maladies inflammatoires digestives. L'identification des mécanismes de différenciation des lymphocytes naïfs en lymphocytes de type Th1, Th2 ou régulateurs (Trég, Tr1, Th3) et la perspective ouverte par l'identification de nouveaux phénotypes (lymphocytes CD8+CD28-) permettra d'élargir le nombre des cibles thérapeutiques.

De façon générale, les thérapies dites biologiques incluent 1) des molécules ou des préparations isolées de l'organisme comme les produits dérivés du sang, 2) des microorganismes inactivés ou atténués, 3) des peptides ou des protéines recombinantes comme l'hormone de croissance et l'érythropoïétine, 4) des anticorps monoclonaux, 5) des oligonucléotides anti-sens, et 6) finalement des techniques de thérapie cellulaire ou génique.

A l'heure actuelle, concernant les MICI, les thérapies biologiques utilisées en pratique clinique courante ou en cours d'investigation sont principalement représentées par les protéines recombinantes, les anticorps monoclonaux et les oligonucléotides antisens (Sandborn et Targan, 2002) (Tableau 4).

La connaissance des différentes étapes du processus inflammatoire ou des différentes cibles moléculaires au cours des MICI ouvrent le champ d'investigation thérapeutique en permettant, soit un screening des petites molécules déjà connues et gardées en réserve, soit de créer des séquences peptidiques dont les propriétés découlant de leur structure seront spécifiquement ciblées sur une molécule d'intérêt.

Le but de notre travail a été d'explorer les mécanismes d'action et d'évaluer l'efficacité thérapeutique de différents composés (IL-10, RDP58 et Butyrate) dans différents modèles d'inflammation soit *ex vivo* en utilisant les biopsies et les LPMNC de patients atteints de MC et *in vivo* dans un modèle animal de colite induite par l'administration de TNBS (figure 4).

Tableau 4 : Molécules utilisées ou en cours d'évaluation dans les MICI chez l'homme. (d'après Sandborm et Targan, 2002).

Cible thérapeutique	Firme	Indication
Différenciation des lymphocytes CD4+ en lymphocytes de type Th1 ou Th2		
Anticorps anti-IFN- γ	Protein Design Lab	MC
Anticorps anti-IL-2R ^a	Protein Design Lab	RCH
Anticorps anti-IL-12	Genetic Institute	MC
IL-10 (tenovil)	Schering Plough	MC, RCH
Circulation lymphocytaire entéro-lymphatique		
Anticorps anti- α 4 (natalizumab)	Elan pharmaceuticals	MC, RCH
Anticorps anti- α 4 β 7 (LDP-2)	Millenium Pharmaceuticals	MC, RCH
Oligonucléotides antisens ICAM-1 ^b (ISIS 2302)	Isis Pharmaceuuticals	MC, RCH
Inhibiteur de TNF		
Anticorps anti-TNF- α chimérique (infliximab)	Centocor	MC
Anticorps anti-TNF- α humanisé (CDP571)	Celltech	MC
Récepteur de TNF- α (etanercept)	Immunex	MC
Protéine de fusion au TNF- α 55 (onercept)	Serono	MC
Inhibiteur de Map-Kinase (CNI 1493)	Cytokine pharmasciences	MC
Inhibiteur de Map-Kinase (BIRB)	Boehringer	MC
Cibles variables		
Granulocyte macrophage colony stimulating factor	Immunex	MC
Epidermal growth factor	CIBG	RCH
Anticorps anti-CD40 Ligand	IDEC pharamaceuticals	MC

^aIL-2R : récepteur à l'IL-2 ; ^bIntercelular Adhesion Molecule-1

figure 4

IV.2. Interleukine-10.

L'IL-10 est une cytokine produite majoritairement par les lymphocytes de type Th2 et les lymphocytes régulateurs. L'IL-10 inhibe la production d'IFN- γ par les lymphocytes de type Th1 et diminue la production d'IL-12 par les macrophages. Les souris Knock-out pour le gène codant pour l'IL-10 développent des colites inflammatoires prévenues par l'administration d'IL-10 recombinante (rHu IL-10). L'initiation de la colite est dépendante de la flore digestive, et a les caractéristiques immunologiques d'une inflammation de type Th1. Par ailleurs, l'analyse histologique du tube digestif des souris IL-10^{-/-} montre une inflammation comparable aux anomalies constatées au cours de la MC chez l'homme (Kuhn et al., 2000). Ces propriétés ont permis d'identifier l'IL-10 comme étant une cytokine d'intérêt pour la MC. Outre ses capacités à diminuer la production de cytokines de type Th1 (de Waal Malefyt et al., 1991), l'IL-10 réduit également les propriétés de présentation antigénique *via* la diminution de l'expression de molécules associées à la présentation antigénique sur des monocytes humains ou d'autres CPA comme les cellules de Langerhans, les cellules endothéliales et les astrocytes (de Waal Malefyt et al., 1991b. Enk et al., 1993. Vora et al., 1994). Compte tenu 1) du rôle accessoire de présentation antigénique, 2) de l'expression démontrée dans notre laboratoire des molécules du CMH de classe II sur les colonocytes (Siavoshian et al., 1996) et 3) de leur situation anatomique au contact des antigènes bactériens intra-luminaux, les cellules épithéliales digestives représentent des cibles potentielles de l'IL-10 et de ses propriétés immuno-modulatrices. Dans la première partie de notre travail (article 1) nous avons déterminé la présence d'un récepteur à l'IL-10 sur des cellules épithéliales digestives dérivées de lignées cancéreuses coliques et nous avons évalué l'effet de l'IL-10 sur

l'expression de molécules associées à la présentation antigénique : CMH de classe I, HLA-DR, ICAM-1 et CD 80 (Bourreille et al., 1999).

Les propriétés de l'IL-10 ont à cette même période conduit à la réalisation de différents essais thérapeutiques chez l'homme au cours de la MC (van Deventer et al., 1997. Fedorak et al., 2000, 2001. Schreiber et al., 2000. Colombel et al., 2001). Après des premiers résultats encourageants de l'IL-10 administrée par voie intraveineuse (IV) dans un essai ouvert chez des patients atteints de MC, les essais contrôlés réalisés chez des patients ayant des formes cortico-dépendantes ou non, en poussées mineures ou modérées, ou en prévention de récurrences post-opératoires ont été décevants et n'ont pas confirmé les bons résultats initiaux. Il semblait que l'IL-10 recombinante humaine administrée par voie IV ou sous cutanée pouvait être efficace à forte dose mais était associée à des effets secondaires empêchant son utilisation en pratique courante.

Les données préliminaires concernant l'IL-10 ont conduit à l'utilisation de la forme recombinante humaine par voie générale comme traitement au cours de la MC pour empêcher la réponse de type Th1. A cette époque, les propriétés d'induction des lymphocytes régulateurs par l'IL-10 n'étaient pas connues. De plus, les capacités pro-inflammatoires de l'IL-10 dans certaines conditions d'utilisation et à forte concentration n'avaient pas été décrites (Tig et al., 2002). En effet, il a été démontré que l'IL-10 avait des propriétés immunostimulantes notamment en augmentant l'expression membranaire des molécules du CMH de classe II sur les lymphocytes B et en favorisant leur activation et la production d'immunoglobulines IgM, IgG, IgA (Groux et Cottrez, 2003). De plus, l'IL-10 pouvait activer des thymocytes et les lymphocytes CD8+, et en synergie avec l'IL-3 et l'IL-4, permettre la prolifération de mastocytes murins (Thompson-snipes et al., 1991).

Une nouvelle voie d'utilisation de l'IL-10 au cours des MICI a donc été explorée chez l'animal par le transfert de lymphocytes transfectés de façon stable par des rétrovirus

produisant de l'IL-10. Les lymphocytes transfectés par le rétrovirus étaient efficaces en traitement curatif et préventif de colite induite par le transfert de lymphocytes CD45RB^{high} chez la souris SCID et n'étaient détectés que dans le tube digestif et les organes lymphoïdes de drainage. La production directement *in situ* par les lymphocytes transfectés permettrait d'obtenir de forte concentration d'IL-10 et d'induire la différenciation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes T régulateurs sans avoir les effets secondaires systémiques décrits avec les plus hautes doses d'IL-10 recombinante humaine administrée par voie générale (van Montfrans et al., 2002a, 2002b).

En conclusion, l'IL-10 dont les propriétés immuno-régulatrices étaient plutôt favorables pour son utilisation dans la MC n'est pas efficace en traitement classique administrée par voie générale. L'identification récente des lymphocytes régulateurs Tr1 et du rôle de l'IL-10 dans l'induction de ce phénotype *via* l'activation des lymphocytes CD4⁺ naïfs par des cellules spécialisées dans la présentation antigénique oriente d'avantage son utilisation en thérapie locale ou vers des protocoles de thérapie cellulaire. Par ailleurs, si les cellules épithéliales digestives ont un rôle accessoire et certain de présentation antigénique, il n'y a pas encore d'argument en faveur d'un rôle spécifique de l'IL-10 sur les interactions entre les cellules épithéliales digestives et les lymphocytes.

IV.3. Rational Design Peptide 58 (RDP58).

Les stratégies permettant, *a priori*, d'identifier des peptides susceptibles d'avoir une efficacité thérapeutique sont utiles et complètent les stratégies de screening de molécules déjà identifiées. Ces dernières années, plusieurs travaux se sont orientés vers l'étude des séquences peptidiques des molécules du HLA de classe I impliquées directement dans la liaison et dans la présentation des antigènes à des lymphocytes T cytotoxiques. Ainsi, il a été démontré que des peptides dérivés de la région conservée et fonctionnelle située entre les acides aminés (aa) 75-84 de la chaîne $\alpha 1$ de la molécule HLA de classe I possédaient des propriétés immunomodulatrices potentiellement intéressantes en pathologie humaine, particulièrement dans le cadre des transplantations (Clayberger et al., 1987. Parham et al., 1987). Parmi ces peptides, ceux correspondant aux séquences aa 75-84 des molécules HLA-B7 et HLA-B2702 non seulement bloquaient la différenciation *in vitro* des lymphocytes T cytotoxiques mais pouvaient également *in vivo* prolonger la survie de souris et de rats dans des modèles animaux d'allogreffe cardiaque (Gao et al., 1996. Cuturi et al., 1995). Cependant, les effets immunomodulateurs parfois contradictoires *in vitro* et *in vivo* n'ont pas été clairement expliqués. Le peptide RDP58 dérive lui-même des peptides décrits ci-dessus par la substitution d'aa en fonction d'une stratégie de recherche assistée par ordinateur (Rational Design). Cette stratégie combinant à la fois les propriétés biologiques et les propriétés structurales des peptides (volume ellipsoïdal, lipophilie, flexibilité, nombre d'atomes d'oxygène, d'azote, de carbone, d'hydrogène, de groupes éthyls, méthyls, hydroxyls....) a aboutit à la sélection de 5 peptides qui ont été testés *in vivo* dans des modèles animaux d'allogreffe (Iyer et al. 2002). Quatre des cinq peptides ont permis d'améliorer la survie de souris allogreffées et le peptide RDP58 a été sélectionné en raison de son efficacité à la plus faible concentration de 1mg/Kg/jour (Grassy et al., 1998).

Le RDP58 est un decapeptide (NH₂-r-nle-nle-nle-r-nle-nle-nle-g-y-CONH₂) d'un poids moléculaire de 1228 daltons. Les deux isomères (L- et D-) ont une activité similaire *in vitro* et *in vivo*. Les mécanismes d'action du RDP58 ne sont pas complètement élucidés mais peuvent être séparés en deux catégories d'une part l'inhibition de synthèse du TNF et d'autre part l'augmentation de l'activité enzymatique de l'Hème oxygénase de type 1 (HO-1) (Magee et al., 1999).

IV.3.1. Le RDP58 diminue la sécrétion de TNF- α

Le TNF est une cytokine clef de la réponse inflammatoire non spécifique et les stratégies visant à bloquer la synthèse ou l'activité du TNF au cours de la MC ont montré leur efficacité sans que leurs mécanismes d'action soient non plus parfaitement connus. En effet, l'infliximab, anticorps monoclonal chimérique murin-humain dirigé contre le TNF- α a démontré son efficacité pour le traitement des formes graves de MC résistantes aux traitements usuels, fistulisantes ou non. Il se fixe sur le TNF- α circulant et transmembranaire et son efficacité semble être très supérieure à d'autres anticorps anti-TNF- α humanisés (CDP571 et CDP870). Il a été suggéré que l'infliximab non seulement bloquait le TNF- α avant qu'il ne puisse interagir avec son récepteur mais qu'il induisait également l'apoptose des lymphocytes de type Th1 exprimant le pro-TNF- α transmembranaire (van den Brande et al., 2003). L'infliximab est utilisé en traitement d'attaque de la MC permettant d'obtenir environ 60 % de rémission entre la 8^{ième} et la 10^{ième} semaine après la première perfusion et peut être également utilisé en perfusions répétées toutes les huit semaines pour le traitement des formes sévères récidivantes permettant de maintenir une rémission chez environ 35 % des patients à un an (Targan et al. 1997. Present et al. 1999 Hanauer et al., 2002). L'efficacité (Doubremelle et al., 2003) et la tolérance (Baert et al., 2003) de l'infliximab sont améliorées

par l'utilisation concomitante d'immunosuppresseurs classiques comme l'azathioprine et le méthotrexate qui diminuent la fréquence de survenue des anticorps anti-infliximab dont les concentrations sont corrélées aux nombres de rechutes et aux effets secondaires. L'immunogénicité de l'infliximab est à l'origine non seulement d'échec du traitement mais aussi d'effets secondaires parfois graves : intolérance dans 15 % des cas, choc anaphylactique, hypersensibilité retardée chez 25 % des patients traités à nouveau après un délai de 2 à 4 ans, survenue d'anticorps anti-nucléaires chez 34 % des patients et d'anticorps anti-DNA chez 9 % des patients (Sandborn et Targan, 2002).

In vitro, le RDP58 diminue la production de TNF- α induite par le LPS seul ou en association à l'IFN- γ , de façon dose dépendante sur des lignées de macrophages murins et humains, les cellules RAW 264.7 et THP1 (Iyer et al., 2000). En revanche, le RDP58 ne modifiait pas le niveau d'expression de l'ARNm du TNF- α traduisant un mécanisme d'action traductionnel. La régulation de la traduction de l'ARNm du TNF- α implique l'extrémité 3'-UTR de l'ARNm et en particulier les éléments Au-Rich Element (ARE) (Caput et al., 1986). Il a été démontré que l'inhibition de synthèse du TNF- α par le RDP58 dépendait de la région 3'-UTR de l'ARNm mais indépendamment des éléments ARE (Iyer et al., 2000). Les éléments responsables de la régulation de la production de TNF- α par le RDP58 ne sont actuellement pas connus. *In vivo*, le RDP58 diminue également la synthèse de TNF- α dans plusieurs modèles animaux d'inflammation. Le premier modèle dans lequel, le TNF- α joue un rôle essentiel est un modèle de choc septique léthal chez la souris induit par l'injection intra-péritonéale de LPS et de D-galactosamine. L'administration intra-péritonéale de RDP58 à la dose de 10 mg/kg inhibait la sécrétion de TNF- α et diminuait la mortalité dans 90 % des cas (Iyer et al., 2002). Le RDP58 semble avoir une action spécifique sur la synthèse de TNF- α et il a été démontré qu'il ne modulait pas la sécrétion d'IL-1, d'IL-2, d'IL-4, d'IL-6 et d'IL-10 ni

par les cellules THP1 et RAW 264.7, ni *in vivo* dans le modèle d'inflammation aigue induit chez la souris par l'administration de concavaline A (Iyer et al., 2000).

IV.3.2. Le RDP58 régule l'Hème Oxygénase-I.

Outre ses propriétés sur la synthèse de TNF- α , il a été démontré que le RDP58 modulait l'activité enzymatique de l'hème-oxygénase de type 1 (HO-1). HO-1 est la forme inducible des trois isoformes de l'hème oxygénase. HO-1 est l'enzyme limitant du processus de dégradation de l'hème en biliverdine, monoxyde de carbone (CO) et en fer. La biliverdine est alors métabolisée en bilirubine par la bilirubine réductase et le fer est utilisé pour le métabolisme intracellulaire ou stocké en fer de réserve (Maines, 1997). HO-1 est impliquée dans la réponse oxydative au stress en ayant un effet protecteur notamment en inhibant l'apoptose induite par le TNF- α via la production de CO. (Brouard et al., 2000). L'implication de HO-1 dans l'inflammation digestive a été étudiée dans le modèle de colite au TNBS chez le rat. Dans ce modèle, il existait dans la *lamina propria* du colon une corrélation entre l'intensité de l'inflammation jugée macroscopiquement, histologiquement et par le dosage de myéloperoxydase et l'expression de HO-1. L'inhibition de l'activité enzymatique de HO-1 par la mésoporphyrine aggravait significativement la colite suggérant un rôle protecteur de HO-1 dans les colites inflammatoires (Wang et al., 2001).

In vitro, il a été démontré que le RDP58 inhibait de façon dose dépendante l'activité enzymatique de HO-1. Inversement et de façon comparable à d'autres inhibiteurs de HO, *in vivo*, le RDP58 augmentait précocement le niveau d'expression de l'ARNm puis la sécrétion et finalement l'activité enzymatique de HO-1 (Iyer et al. 1998).

IV.3.3. Le RDP58 est efficace pour le traitement des colites chez le primate et chez la souris.

Les singes, cynomolgus et macaques maintenus en captivité, développent de façon spontanée des colites inflammatoires chroniques récidivantes caractérisées par une diarrhée glairo-sanglante et une altération de l'état général. Aucun agent infectieux bactérien, parasitaire ou viral n'a été identifié et les traitements antibiotiques sont pour la plupart inefficaces. La corticothérapie par voie générale a une efficacité variable mais souvent de courte durée avec des récurrences précoces à l'arrêt du traitement (Ribbons et al., 1995). Macroscopiquement et histologiquement, les lésions sont comparables à celles décrites dans la RCH avec une atteinte continue du rectum et du colon, sans intervalle de muqueuse saine et un infiltrat inflammatoire polymorphe associé à une désorganisation architecturale. Il a été montré que le RDP58 administré par voie orale ou par voie IV à des doses variables et répétées de 0,1 mg/Kg à 5mg/Kg quatre fois par semaine était efficace sur les symptômes sans effet secondaire notable (Ganesan et al., 2002). Il n'y a pas eu d'analyse histologique ni endoscopique des animaux au cours des traitements par RDP58. Il n'y a pas eu d'effet toxique constaté.

Le RDP58 a été également testé sur un modèle de colite induite par l'administration orale continue de Sulfate de Dextran Sodique (DSS). Le DSS est administré par voie orale dans l'eau de boisson donnée *ad libitum* aux souris à une concentration de 2,5 % pendant 6 jours. Les souris étaient traitées par RDP58, soit en gavage oral à la dose de 5 mg/Kg/j, soit par injection intra péritonéale à la même dose (Boismenu et al., 2002, Murthy et al., 2002). L'administration de RDP58 diminuait significativement l'intensité de l'inflammation jugée par la mesure des scores macroscopiques et histologiques et diminuait l'infiltration à

polynucléaires neutrophiles jugée par la mesure de la myéloperoxydase comparativement aux animaux non traités.

L'ensemble des propriétés du RDP58, tant sur les modèles *in vitro* que *in vivo* nous ont conduit à tester son efficacité sur le modèle de colite induite par le TNBS et à évaluer son action sur la production de cytokines par les biopsies et les LPMNC isolées de la muqueuse colique inflammatoire de patients atteints de MC active (Article 2).

IV.4. Butyrate.

Le butyrate est un acide gras à chaîne courte (AGCC) produit par la fermentation bactérienne colique de fibres alimentaires riches en amidon résistant et en polysaccharides non-amylacés. La fermentation des hydrates de carbone est effectuée par les bactéries anaérobies. Elle aboutit à la formation d'acétate, de propionate, de butyrate, de dioxyde de carbone, d'hydrogène et de méthane. Le butyrate représente la principale source d'énergie pour le colonocyte. En effet, l'oxydation du butyrate fournit à elle seule 70% de l'énergie utilisée par le colonocyte (Roediger, 1982). La production d'AGCC est dépendante de la flore bactérienne et du substrat (Mortensen et Clausen, 1996). Les bactéries responsables de sa production font partie de la famille des *Clostridium sp.*, *Eubacterium sp.*, *Fusobacterium sp.*, *Peptostreptococcus sp.*, et *Butyrivibrio sp.* Dans des conditions physiologiques, les concentrations en AGCC produites restent relativement constantes avec 75 mM d'acétate, 25 mM de propionate et 15 mM de butyrate (Cummings, 1993). Le butyrate est transporté à travers la paroi cellulaire par un transporteur : l'isoforme 1 du monocarboxylate transporter (MCT1). MCT1 appartient à une famille de neuf transporteurs exprimés à la surface de nombreux types cellulaires et MCT1 est spécifiquement exprimé sur les colonocytes (Garcia et al., 1994. Cuff et al., 2002). Le butyrate, contrairement aux autres AGCC (propionate et

acétate) augmente l'expression membranaire de MCT1 et le niveau d'expression de son ARNm et entraîne une augmentation significative de son transport. Il a été également démontré que MCT1 pouvait être régulé par une hormone digestive : la leptine dont les concentrations intra-coliques au cours de l'inflammation digestive sont considérablement augmentées. La leptine, outre ses propriétés sur la régulation de la prise alimentaire, régule certaines fonctions d'absorption et de sécrétion digestive et pourrait jouer un rôle dans l'inflammation digestive (Guimeau et al. 2002. Barbier et al. 2001). De plus, la leptine augmente l'expression membranaire de MCT1 sur les cellules épithéliales coliques Caco-2 et pourrait ainsi participer à la régulation de l'inflammation *via* le butyrate (Buyse et al., 2002).

Le métabolisme du butyrate de sodium a été étudié chez l'animal et chez l'homme en utilisant des dérivés radio-marqués (1-¹⁴C-butyrate) et des techniques de chromatographie. L'administration orale ou intra-péritonéale de 1-¹⁴C-butyrate chez la souris est suivie 30 minutes après d'un pic de radio-activité dans le foie et le plasma, suivi d'une décroissance progressive à partir de la deuxième heure. Quarante pourcent de la radio-activité est encore présente à 24 h. Le pic de concentration plasmatique du butyrate non marqué est atteint en 5 min et 57% du butyrate est éliminé dans les 10 min. Chez l'homme, après une perfusion de 500 ml à 5 % de butyrate d'arginine pendant 90 min, la demi-vie immédiate est de 30 secondes puis elle augmente à 13 min (Daniel et al., 1989). Pendant la perfusion, l'élimination urinaire était quasi-nulle ce qui suggère que le butyrate de sodium était rapidement métabolisé.

Le butyrate joue un rôle prépondérant dans la physiologie gastro-intestinale en régulant la motricité ou encore la trophicité de la muqueuse et l'absorption d'eau et d'électrolytes. Cependant, le butyrate possède également des propriétés immunomodulatrices suggérant un rôle important dans la régulation de l'immunité intestinale.

IV.1. Inhibition et activation des facteurs de transcription

Plusieurs études ont démontré que le butyrate modulait des facteurs de transcription dans différentes lignées cellulaires cancéreuses et les macrophages. Notre équipe a montré que l'inhibition de l'activation du facteur NF- κ B par le butyrate dans des cellules mononucléées traitées au LPS impliquait l'inhibition de la dégradation de l'inhibiteur cytoplasmique de NF- κ B, I- κ B (Segain et al., 2000).

NF- κ B régule les réponses inflammatoires et la réponse immune en augmentant de façon spécifique dans différentes cellules dont les cellules épithéliales digestives, les macrophages ou les lymphocytes, la transcription d'une trentaine de gènes codant pour des cytokines proinflammatoires (TNF- α , IL-1 β) ou des chémokines (Yamamoto et Gaynor, 2001. gerondakis S et al., 1998). NF- κ B est activée de façon plus importante dans les lésions actives qu'en zone non inflammatoire dans la muqueuse de patients atteints de MC et de RCH. D'autre part, les différents traitements dont la prednisone entraînent une diminution de l'activation de NF- κ B suggérant son implication dans les mécanismes de régulation de la réponse inflammatoire. L'activation et la translocation du cytoplasme au noyau de NF- κ B est l'aboutissement de plusieurs étapes enzymatiques impliquant de nombreuses protéines. En l'absence de stimulus, les protéines de la famille NF- κ B sont localisées dans le cytoplasme des cellules associées à des facteurs inhibiteurs I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ). Après stimulation inflammatoire, les protéines NF- κ B sont libérées. Les protéines de la famille I κ B possèdent plusieurs domaines dont un domaine NH2 terminal permettant la phosphorylation de la protéine puis son ubiquitination par l'ubiquitine ligase E3 et enfin sa dégradation dans le protéasome (Zandi et Karin, 1999). Après dégradation de I κ B, NF- κ B peut être transloquée dans le noyau et transactiver différents gènes. La phosphorylation des protéines I κ B est sous la dépendance d'autres protéines enzymatiques appelées I κ B kinases (IKK) existant sous la

forme de complexe protéique impliquant $IKK\alpha$, $IKK\beta$ et une sous-unité régulatrice $I\kappa\gamma$ ou NEMO.

L'inhibition de l'activation de NF- κ B peut, au cours de l'inflammation, diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires comme cela a été décrit avec la dexaméthasone ou la sulphasalazine (Scheinmann et al., 1995. Wahl et al., 1997).

Il existe peu d'études concernant les effets du butyrate sur le facteur de transcription CREB (cAMP responsive element binding protein). Cependant, Souleimani et Asselin avaient rapporté que le traitement de cellules Caco-2 par le butyrate entraînait une augmentation CREB-dépendante de la transcription du gène codant pour le proto-oncogène c-fos induite par CREB (Souleimani et Asselin, 1993). L'effet du butyrate sur ce facteur est d'autant plus intéressant qu'il est responsable de la transcription des gènes codant pour l'IL-10. Nous avons pu observer que dans des PBMC, le butyrate activait CREB et par conséquent l'expression d'IL-10 (Article 4).

IV.4.2. Le butyrate en pratique clinique

Au cours des MICI, le butyrate a été essentiellement évalué dans la RCH étant donné ses propriétés énergétiques sur les colonocytes et l'incapacité supposée du colonocyte à oxyder et métaboliser les AGCC au cours de la RCH (Roediger, 1980). Plusieurs essais cliniques ont été publiés et ne permettent pas d'avoir un avis définitif sur son efficacité. Breuer et al. ont publié en 1997 les résultats d'un essai comparant chez des patients atteints de RCH distale l'efficacité d'un mélange d'AGCC en lavement (acétate, propionate, butyrate) à un placebo. Après des résultats intermédiaires encourageants, il n'a pas été montré de supériorité significative des AGCC sauf chez les patients ayant une poussée évoluant depuis moins de six mois (Breuer et al., 1997). Scheppach et al. ont publié les résultats de deux études comparant

le butyrate de sodium ou un mélange d'AGCC en lavement à un placebo. Dans le premier essai où chaque patient était son propre témoin, il existait un avantage significatif en faveur du butyrate mais qui n'a pas été confirmé dans la seconde étude randomisée et contrôlée (Scheppach et al., 1992, 1996). Deux autres essais ouverts concernant 9 et 10 patients ont été publiés et ont montré un bénéfice à l'utilisation du butyrate (Steinhart et al., 1994. Vernia et al., 1995a et b). Plus récemment, la même équipe italienne a rapporté les résultats d'un essai comparant le butyrate par voie orale en association à du 5-ASA à du 5-ASA seul. S'il n'y avait pas d'effet significatif de l'un ou de l'autre traitement, en revanche, les auteurs ont montré que l'administration orale de 4g de butyrate était bien tolérée sans effet secondaire. Il s'agissait de comprimés de 800 mg entouré d'un copolymère d'Eudragit S (Vernia et al., 2000).

Nous avons émis l'hypothèse que les résultats mitigés du butyrate au cours de la RCH étaient dus, en partie, à ces propriétés immunomodulatrices plus orientée vers une inflammation de type Th1 comme dans la MC. Les propriétés du butyrate et ses mécanismes d'action ont donc été étudiés *in vitro* et *in vivo* en tant qu'agent pharmacologique.

IV.5. Rho GTPases et inhibiteur spécifique

Les protéines Rho-GTPases appartiennent à un sous-groupe de la superfamille des protéines Ras qui se lient au GTP et dont le poids moléculaire est compris entre 20 et 30 kD. Ce groupe comprend chez les mammifères une dizaine de protéines distinctes dont RhoA, B, C, D, E, Rac1 et 2 et Cdc42 (Etienne-Manneville et Hall, 2002). Elles existent dans la cellule soit, sous forme inactive liée au GDP ou sous forme active liée au GTP et participe à l'organisation du cytosquelette, au trafic membranaire et à d'autres fonctions biologiques par l'intermédiaire de l'activation de différents facteurs de transcription. Le passage de la forme

active liée au GTP à la forme inactive liée au GDP et inversement est sous la dépendance de trois groupes de protéines (figure).

Les enzymes du groupe des Guanine nucleotide Exchange Factors (GEF) permettent le passage de la forme inactive Rho-GDP à la forme active Rho-GTP en libérant le GDP et en permettant la fixation du GTP. Inversement, les enzymes du groupe GTPase-activating Proteins (GAP) catalysent l'hydrolyse du GTP en GDP et le passage à une forme inactive de Rho. Rho-GDP inactive peut être complexée avec la Guanine nucleotide exchange Inhibitor (GDI) empêchant son interaction et sa fixation à la membrane cytoplasmique. Dans les cellules au repos, les protéines Rho sont sous forme inactives liées au GDP et complexées à la GDI. Certains facteurs extracellulaires, comme l'acide lysophosphatidique, entraînent la libération de Rho de GDI et activent GEF permettant l'élimination du GDP, la fixation du GTP et l'activation de Rho. Rho-GTP peut alors agir sur un de ses effecteurs, la sérine/thréonine Rho-associated kinase (Rho-kinase) ROK (Ridley, 2001). D'autres effecteurs ont été décrits comme la Citron kinase dont l'activation par Rho régule les contractions de l'actomyosine et la PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphonate) jouant un rôle important dans la régulation des protéines liées à l'actine. Plusieurs molécules dont le Y-27632 et l'hydroxyfasudil inhibent spécifiquement l'activité enzymatique de ROK par l'intermédiaire du site de fixation de l'ATP sur le domaine catalytique de Rho-kinase. L'utilisation de ces inhibiteurs a permis d'identifier plusieurs propriétés de Rho-kinase (Amano et al. 2000). Rho-kinase permet la phosphorylation de plusieurs composants du cytosquelette comme la MBS (myosin-binding subunit of the myosin phosphatase), la MLC (myosin light chain) ou la GFAP (glial fibrillary acidic protein) et la vimentine sur le résidu serine71 (Apenström, 1999).

Initialement, il a été démontré que les protéines Rho, Rac et Cdc42 étaient impliquées dans le contrôle de l'organisation du cytosquelette dans les cellules eukaryotes. L'activation

de Rho modifie l'agencement des filaments d'actine et de myosine en fibre de stress interagissant avec des intégrines pour former des complexes d'adhésion. L'activation de Rac et de Cdc42 entraîne la réorganisation et la polymérisation de l'actine sous membranaire permettant l'émission par la cellule de prolongements cytoplasmiques. Ces protéines sont impliquées dans la polarisation et les mouvements cellulaires. La polarisation des cellules épithéliales digestives dépend des jonctions adhérentes, des jonctions serrées et des interactions avec la lame basale *via* l'expression membranaire d'intégrine. La formation de ces jonctions se fait en association avec une réorganisation du cytosquelette. Cdc42 est impliquée dans la formation des jonctions serrées inter-cellulaires empêchant la migration des protéines et des phospholipides membranaires du pôle apical au pôle baso-latéral ou inversement et Rac est impliquée dans le contrôle de l'assemblage de la laminine extracellulaire dans la lame basale jouant également un rôle important dans le contrôle de la polarité cellulaire (Mackay et Hall, 1998).

De façon plus récente, plusieurs travaux ont démontré l'implication des protéines de la famille Rho dans l'activation et la régulation des voies de signalisation et des facteurs de transcription de différents gènes. Il a été montré que Rac et Cdc42 activaient la voie de signalisation c-Jun kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) et p38 dans différents modèles cellulaires par l'intermédiaire de MEKK (mitogen-activated protein kinase kinase) qui entraîne la phosphorylation de JNKK (mitogen-activated protein kinase kinase). JNKK phosphoryle et active JNK. Il a été également démontré que Rho, Rac et Cdc42 pouvaient activer NF- κ B par des voies différentes incomplètement connues mais indépendante de MEKK pouvant impliquer les protéines de la famille Rho dans la régulation de gènes de l'inflammation (Cammarano et Minden, 2001). Rac entraînait la phosphorylation de NIK (NF- κ B inhibitory-kinase) entraînant la phosphorylation du complexe IKK α et β permettant la phosphorylation et la dégradation de I κ B et enfin la transmigration de NF- κ B

dans le noyau (Cammarano et Minden, 2001). Il a été également démontré que Rho et Cdc42 pouvait activer la voie de signalisation NF- κ B impliquant de façon moins certaine le complexe IKK α et β et I κ -B (Cammarano et Minden, 2001. Li et Karin, 1998, Montaner S et al., 1998).

Compte tenu des premiers travaux impliquant les protéines de la famille Rho dans le contrôle de différentes voies de signalisation et dans la transcription de gènes eux-mêmes impliqués dans la réponse inflammatoire, nous avons émis l'hypothèse d'une implication de la voie RhoA/ROK dans l'inflammation digestive au cours de la MC. Nous avons montré que RhoA était préférentiellement sous sa forme active liée au GTP dans la muqueuse inflammatoire des patients atteints de MC et dans le modèle de colite induite par le TNBS. Y-27632 inhibait de façon dose dépendante la production de TNF- α et d'IL-1 β par les LPMC et les PBMC activés. Y-27632 inhibait la transmigration intranucléaire de NF- κ B et empêchait la phosphorylation et l'activation de I- κ B et l'activation de IKK α suggérant un bénéfice anti-inflammatoire à l'utilisation d'inhibiteur de ROK dans la MC (Segain et al., 2003). Ces résultats obtenus *in vitro* ont été confirmés *in vivo* dans le modèle de colite au TNBS. L'administration orale de Y-27632 diminuait l'inflammation colique macroscopique et histologique.

V. TRAVAUX SCIENTIFIQUES

V.1. « L'Interleukine-10 ne régule pas l'expression membranaire des molécules associées à la présentation antigénique sur les cellules épithéliales coliques. »

V.1.1. Résumé

Les cellules épithéliales coliques ont un rôle accessoire de présentation antigénique. L'interleukine-10 (IL-10) a des propriétés immunomodulatrices dans le système immunitaire digestif. Cependant, il reste à établir si les cellules épithéliales digestives ont un récepteur fonctionnel à l'IL-10 et si cette cytokine peut moduler l'expression membranaire de molécules associées à la présentation antigénique.

Méthode : La fixation de l'IL-10 biotinylée a été étudiée par cytométrie en flux sur les cellules SW1116, HT-29 et T84. Le niveau d'expression de l'ARNm du récepteur à l'IL-10 a été évaluée par reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) dans les mêmes cellules. L'effet de l'IL-10 sur l'expression membranaire des molécules associées à la présentation antigénique a été étudié par cytométrie en flux.

L'IL-10 biotinylée se fixe sur les cellules SW1116, HT-29 et T84. L'ARNm du récepteur à l'IL-10 a été détecté dans les cellules SW1116. Les cellules SW1116 et HT-29 exprimaient les molécules du CMH de classe I et ICAM-1 mais n'exprimaient pas le CD80 et les cellules SW1116 exprimaient le HLA-DR. L'IFN- γ augmentait l'expression du HLA-DR et de ICAM-1 sur les deux lignées cellulaires et le LPS augmentait l'expression de ICAM-1 sur les cellules SW1116.

La présence du récepteur à l'IL-10 sur les cellules épithéliales digestives suggère un rôle potentiel qui cependant reste à déterminer.

V.1.2. Publication 1 : « Eur J Clin Invest 1999 ;29 :48-55 »

Lack of interleukin 10 regulation of antigen presentation-associated molecules expressed on colonic epithelial cells

A. Bourreille, J. P. Segain, D. Raingeard de la Blétière, S. Siavoshian, G. Vallette, J. P. Galmiche and H. M. Blottière

Centre de Recherche en Nutrition Humaine, Nantes, France

Abstract

Background Colonic epithelial cells may behave as antigen-presenting cells. Interleukin 10 (IL-10) is known to play a major role in the intestinal immune system; however, it remains to be determined whether human intestinal epithelial cells express IL-10 receptor, and whether this cytokine modulates their expression of antigen presentation-associated molecules

Methods The binding of biotinylated IL-10 was studied in SW 1116, HT-29 and T84 human colonic epithelial cell lines and freshly isolated normal colonic epithelial cells. Reverse transcription-polymerase chain reaction was also performed to detect IL-10 receptor mRNA. The effect of IL-10 on antigen presentation associated molecules was assessed by flow cytometry.

Results Biotinylated IL-10 bound to SW 1116, HT-29, T84, and normal colonic epithelial cells. IL-10 receptor mRNA was detected in SW 1116 and normal epithelial cells. SW 1116 and HT-29 cells expressed MHC class I and ICAM-1, but not CD80, and SW 1116 constitutively expressed HLA-DR. Interferon- γ up-regulated HLA-DR and ICAM-1 expression on both cells, whereas lipopolysaccharide increased ICAM-1 expression only on SW 1116. IL-10 failed to modulate these antigens, even after stimulation by lipopolysaccharide or interferon- γ . Moreover, these molecules decreased IL-10 binding in both lines.

Conclusion The presence of IL-10 receptor on intestinal epithelial cells suggest that IL-10 may play a role in mucosal physiology, however its effect on the immune response remains to be determined.

Keywords Epithelial cells, human colon, HLA-DR, ICAM-1, interleukin-10 receptor.
Eur J Clin Invest 1999; 29 (1): 48–55

Introduction

It has recently been determined that chronic inflammation of intestinal mucosa is associated with an imbalance of proinflammatory cytokines such as interleukin (IL) 1, IL-6, tumour necrosis factor (TNF)- α or interferon (IFN) γ as well as anti-inflammatory cytokines, including IL-4 and IL-10. Among anti-inflammatory cytokines, the crucial role of IL-10 in the digestive tract has been illustrated in IL-10-deficient mice [1], which develop enterocolitis and undergo

profound alterations in the digestive tract, although other major organs appear to be normal. In this context, IL-10 has been proposed as a potential therapeutic agent in inflammatory bowel disease (IBD) and was first used as an enema in steroid-refractory patients with ulcerative colitis [2]. Exogenous IL-10 has also been effective in the treatment of experimental granulomatous enterocolitis in an animal model [3]. More recently, recombinant human IL-10 has been successfully used for treatment of patients with active steroid-resistant Crohn's disease [4].

Like most cytokines, IL-10 is pleiotropic and acts on both antigen-specific and antigen non-specific immune responses [5]. It decreases the production of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α by activated monocytes *in vitro* [6] and inhibits the antigen-specific proliferative response of T cells when several antigen-presenting cells (APCs) are used, including monocytes [7], Langerhans cells [8] and others [9]. The mechanisms by which IL-10 inhibits antigen-specific T-cell proliferative response are not well defined and seem to differ between APCs. These mechanisms

CRI INSERM 95-08 (A. Bourreille, J. P. Segain, D. Raingeard de la Blétière, S. Siavoshian, J. P. Galmiche, H. M. Blottière), CJF INSERM 94-04 (G. Vallette), LFDNH INRA, (H. M. Blottière), Nantes, France.

Correspondence to: H. M. Blottière, Centre de Recherche en Nutrition Humaine, CRI-INSERM 95-08, C.H.U. Hôtel-Dieu, place A. Ricordeau, 44035 Nantes Cedex 01, France. E-mail: Herve.Blottiere@sante.univ-nantes.fr

Received 9 March 1998; accepted 4 August 1998

involve modulation of the expression of several antigen presentation-associated molecules such as major histocompatibility complex (MHC) class II [7,10], intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) [11] and CD 80/B7-1 [12,13].

Intestinal epithelial cells (IECs) have extensive contact with T lymphocytes, within both the epithelium and the lamina propria. Moreover, IECs may express MHC class II antigens, and their expression is strongly up-regulated in inflammatory bowel disease (IBD) (for review see Ref. 14). Several reports have demonstrated that IECs can function as APCs both in rodents [15,16] and in humans [17,18]. Recently, Hershberg *et al.* [18] showed that the presentation capacities of IECs were greatly enhanced in inflammatory conditions. Data obtained in animal models [3] and humans [2,4] suggest that IL-10 may be a candidate for the treatment of IBD. However, it is still unknown whether IECs, as antigen-presenting cells, may be a cellular target for this cytokine. The purpose of our study was to determine whether IL-10 receptor exists on IECs and to assess its possible effects on antigen presentation through modulation of cell surface molecules such as MHC class I, HLA-DR, ICAM-1 and CD 80.

Materials and methods

Human cell lines

HT-29 colonic adenocarcinoma cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mmol L⁻¹ L-glutamine, 50 U ml⁻¹ penicillin and 50 mg mL⁻¹ streptomycin. SW 1116 colon adenocarcinoma cells and THP-1 and Jurkat lymphoma cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with the same reagents. T84 colon adenocarcinoma cells were cultured in F12/DMEM (v/v) supplemented similarly. The cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). All cell culture reagents were from Gibco-BRL (Cergy-Pontoise, France).

Human normal colonic epithelial cells were isolated from macroscopically normal mucosa obtained after large bowel resection from three patients with colon cancer as described previously [19].

Exponential growth phase cells were treated with IL-10 (20 ng mL⁻¹) for 24, 48 or 72 h and harvested for flow cytometry analysis.

In some experiments, SW 1116 cells were stimulated by LPS (1 µg mL⁻¹) for 24, 48 or 72 h together with IL-10 before being harvested for flow cytometric analysis.

In other experiments, SW 1116 and HT-29 cells were stimulated by IFN-γ (1000 U mL⁻¹). Interferon γ was added to growing cells 72 h before harvesting and IL-10 was added 48 h before harvesting to determine its effect on IFN-γ-stimulated cells. Interleukin 10 and IFN-γ were from Peprotech (Le Perray en Yveline, France) and LPS (from *Salmonella typhosa*) was from Sigma (L'Isle Dabeau Chesne, France).

Flow cytometry analysis

After two washes in phosphate-buffered saline (PBS) without Ca²⁺ and Mg²⁺, 5 × 10⁵ cells were incubated with primary antibodies at 4°C for 30 min. Two other washes in PBS preceded incubation with FITC-conjugated anti-mouse IgG diluted 1:1000 at 4°C for 30 min (Bioatlantic, Nantes, France). After two additional washes, analysis of stained cells was performed on a FACScan (Becton Dickinson) or an EPICS XL (Coultronics, France). The cell population was gated according to its forward and wide-angle light scattering. Data were expressed as mean relative fluorescence intensity (MFI) of 3000 cells.

The binding of biotinylated IL-10 was studied using an IL-10 fluorokine kit (R & D Systems, Abingdon, UK) according to the manufacturer's instructions. Soybean trypsin inhibitor (SBTI) biotinylated to the same degree was provided in the kit and used as negative control.

Mouse anti-HLA-DR (IgG2b), anti-HLA class I (IgG2a), anti-CD 54/ICAM-1 (IgG1) and anti-CD 80 (IgG1) were purchased from Immunotech (Marseille, France) and used according to the manufacturer's instructions (2 µg/5 × 10⁵) in PBS plus gelatin 0.1%. Isotype-matched controls (Caltag, Burlingame, CA, USA) were used at the same concentration. Each experiment was performed at least three times, and the means of the mean relative fluorescence intensity was compared using a two-tailed paired Student's *t*-test.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA were isolated from several cell lines by the guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction method [20]. RNA were spectrophotometrically quantified. First-strand cDNA synthesis was performed with 1 µg of total RNA in a 20 µL reverse transcription reaction volume using random primers and murine Moloney leukaemia virus reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Gibco). One microlitre of the reverse transcription reaction was used in 35-cycle PCR in a total volume of 50 µL containing 50 pmol of each sense and antisense primer, 1 µL of 10 mmol L⁻¹ dNTPs, 3 µL of 25 mmol L⁻¹ MgCl₂, 5 µL of 10× Goldstar DNA polymerase buffer and 0.5 units of Goldstar DNA polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium). Each PCR cycle consisted of 30 s at 92°C, 30 s at 55°C and 1 min at 72°C. An IL-10 receptor fragment of 504 bp was amplified with the following primers: sense 5'-GAGAGTTCTGTGTCCAGG-3' and antisense 5'-CTATTGCTGCTGCCACTACTGC-3' (Genosys, Cambridge, UK). β-Actin was amplified with sense 5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3' and antisense 5'-GCTGGAAGGTGGACAGCGA-3'. HLA-A, B, C was amplified with sense 5'-TGGAGAGGAGCAGAGATACACC-3' and antisense 5'-AACAACTCTTGCCCTC TCAGTCC-3'. CD 80 was amplified with sense 5'-CATCACGGAGGGTCTTCTAC-3' and antisense 5'-AGGATCTTTGGGAA ACTGTTGT-3'. HLA-DR was amplified

with sense 5'-CCGGATCCTTCGTGTCCCACAG-CACG-3' and antisense 5'-TCGCCGC TGCCTGTGAAG-3'. ICAM-1 was amplified with sense 5'-GTAGCAGCCGCA GTCATAATGG-3' and antisense 5'-ATGCTGTTGTATCTGACTGAGG-3'. The amplified cDNA fragments were electrophoresed in a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide under ultraviolet light.

Results

IL-10 receptor expression on human colonic epithelial cell lines

The binding of biotinylated IL-10 fluorokine was tested by

flow cytometry to detect the presence of IL-10 receptor on human colonic epithelial cell lines. Soybean trypsin inhibitor biotinylated to the same degree as IL-10 was used as a negative control. As shown in Fig. 1, HT-29, SW 1116 and T84 epithelial cells bound biotinylated IL-10. Jurkat and THP-1 lymphoma cell lines used as a positive control [21] displayed similar binding. Moreover, freshly isolated normal colonic epithelial cells also displayed biotinylated IL-10 binding (Fig. 1). Around 55% of the cells were able to bind IL-10; the remaining cells showed similar fluorescence intensity than the negative control. The epithelial cell population was negative for CD3, CD4, CD8 and CD64 expression (data not shown). To determine the specificity of biotinylated IL-10 binding on colonic epithelial cell lines, the same experiments were performed in the presence of blocking antibody to human IL-10 or of unlabeled IL-10. As illustrated in Fig. 2 for HT-29, the binding of

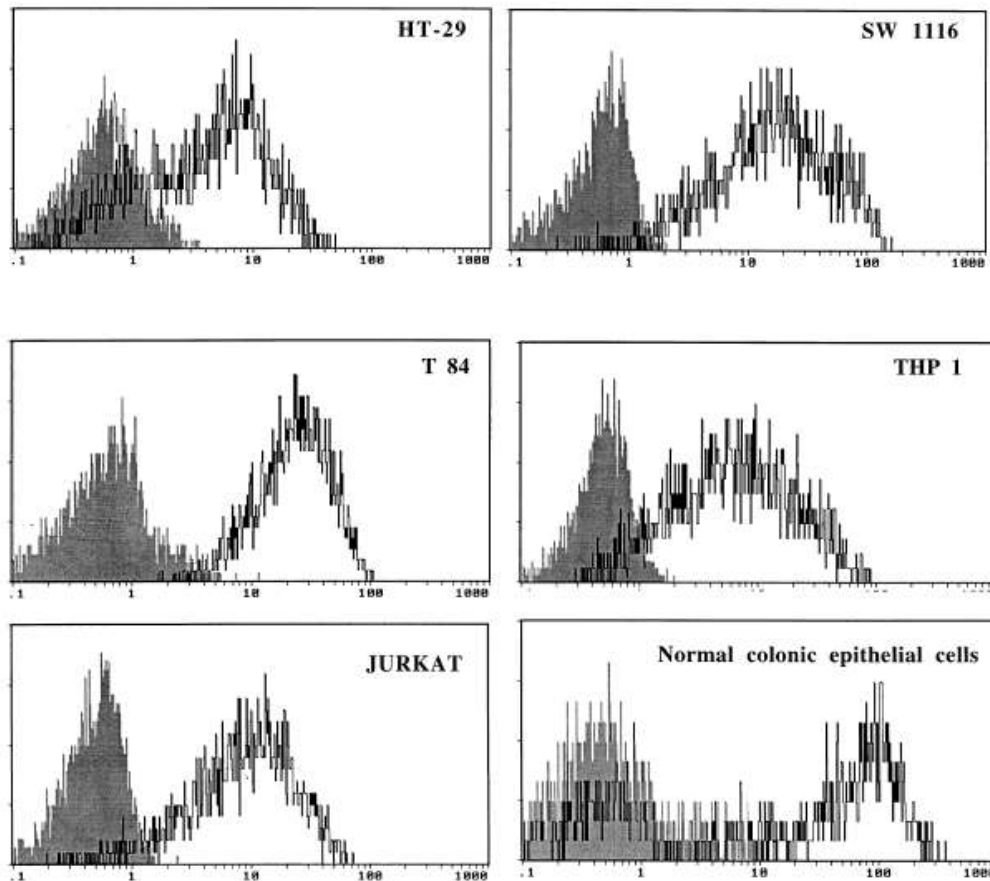


Figure 1 Binding of biotinylated IL-10 on HT-29, SW 1116, T84, THP 1, Jurkat and freshly isolated normal colonic epithelial cells as analysed by flow cytometry using the IL-10 fluorokine kit. Soybean trypsin inhibitor biotinylated to the same degree was used as a negative control (shaded area). This figure shows the graphs obtained in one experiment representative of three experiments performed.

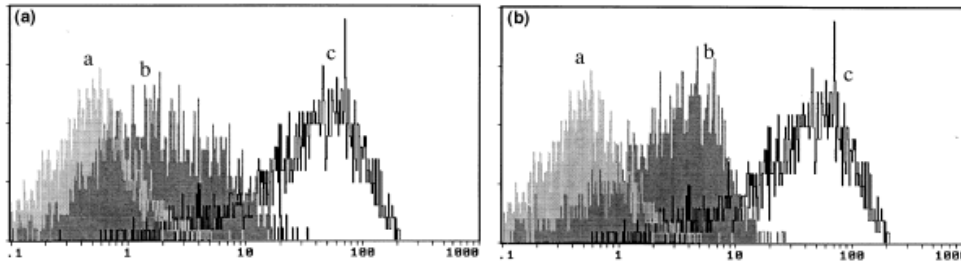


Figure 2 Specificity of the binding of biotinylated IL-10 on HT-29 cells as analysed by flow cytometry using the IL-10 fluorokine kit. Fluorescence intensity histograms were obtained with soybean trypsin inhibitor (a), biotinylated IL-10 alone (c), or in the presence (b) of either anti-human IL-10 blocking antibody (a) or unconjugated IL-10 (b). The figure shows the graphs obtained in one experiment representative of three experiments performed.

biotinylated IL-10 was diminished in both conditions. RT-PCR was performed to confirm the presence of IL-10 receptor in colonic epithelial cells. IL-10 receptor mRNA was detected in SW 1116 cells and in freshly isolated normal colonic epithelial cells (Fig. 3). Jurkat and THP-1 cells used as a positive control [21] also expressed IL-10 receptor mRNA. However, mRNA for IL-10 receptor could not be amplified in HT-29 or T84 cells

Expression of antigen presentation-associated molecules on HT-29 and SW 1116 cells

SW 1116 and HT-29 cells constitutively expressed MHC class I and ICAM-1 molecules (Fig. 4). However, SW 1116 cells strongly expressed these antigens, whereas HT-29 displayed low expression. Moreover, SW 1116 cells presented low HLA-DR expression, whereas HT-29 cells were negative. Regardless of the conditions used, CD80 was never expressed on both cell lines. Daudi cells, a human Burkitt lymphoma line used as a positive control, strongly expressed CD80 (data not shown). Moreover, by RT-PCR, we were not able to detect any mRNA for CD80 in SW 1116 and HT-29, whereas CD80 mRNA was detected in peripheral blood mononuclear cells used as positive control (data not shown). The effect of LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) was then analysed on MHC class I, HLA-DR and ICAM-1 surface

expression in SW 1116 and HT-29 cells (Fig. 4). LPS significantly up-regulated ICAM-1 cell-surface expression in SW 1116 ($P < 0.05$) but not in HT-29 cells (Fig. 4). No significant modulation was noted on HLA class I and HLA-DR expression in either cell line. When cells were cultured with IFN- γ (1000 U mL^{-1}) for 48 h, a strong up-regulation of HLA-DR, class I and ICAM-1 antigen expression was observed on both cell lines (Table 1). It is noteworthy that HLA-DR, which was not expressed on HT-29 cells, was induced by IFN- γ .

IL-10 did not modulate MHC class I, HLA-DR and ICAM-1 expression on colonic epithelial cells

The effect of IL-10 on antigen presentation-associated molecule expression was analysed in SW 1116 and HT-29 cells. Interleukin 10 used at 10 ng mL^{-1} (data not shown) or at 20 ng mL^{-1} (Fig. 5) did not significantly modulate HLA-DR, class I or ICAM-1 antigen basal expression in SW 1116 cells. Similar results were obtained in HT-29 cells (data not shown). Moreover, when cells were stimulated with LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) together with IL-10, no modulation of these antigens was noted (Fig. 5). Finally, IL-10 was still unable to modulate the cell surface expression of these molecules even when greatly enhanced by IFN- γ (Table 1). The biological activity of IL-10 was controlled by analysis of the modulation of HLA-DR expression on peripheral blood monocytes (data not shown). We also performed RT-PCR on SW 1116 and HT-29. Whatever the conditions were, IL-10 did not down-regulate HLA-DR, ICAM-1 or HLA class I mRNA expression (data not shown).

LPS and IFN- γ down-regulate biotinylated IL-10 binding

The effect of IFN- γ (1000 U mL^{-1}) and LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) on IL-10 binding to its receptor was analysed using the IL-10 fluorokine kit. SW 1116 (Fig. 6) and HT-29 (data not shown) were cultured in the absence or presence of IFN- γ

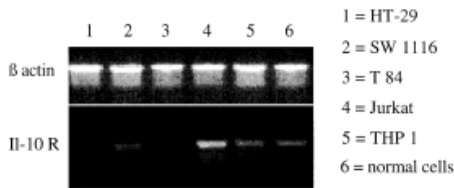


Figure 3 Agarose gel stained with ethidium bromide showing RT-PCR product for IL-10 receptor or β -actin mRNA in colon adenocarcinoma cell lines HT-29, SW 1116 and T84, in Jurkat and THP1 lymphoma cell lines, and in freshly isolated normal colonic epithelial cells.

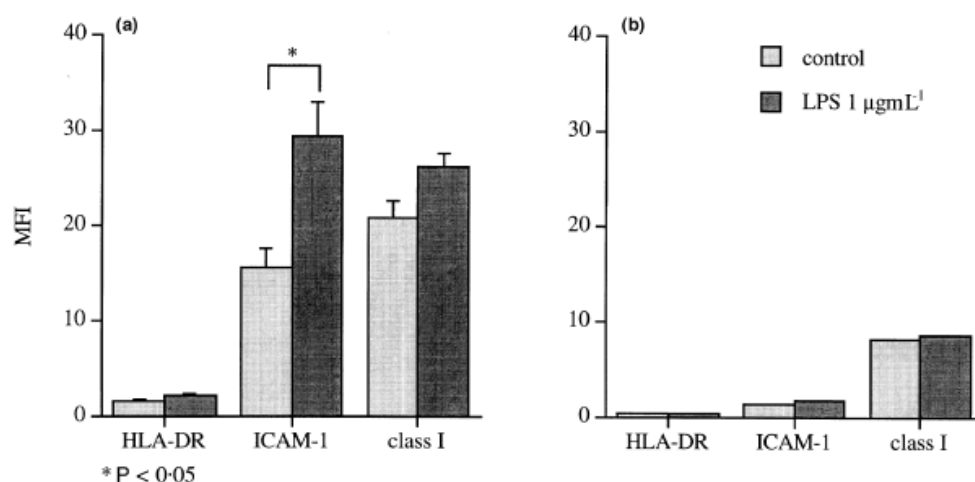


Figure 4 Flow cytometry analysis of HLA-DR, ICAM-1 and MHC class I expression by SW 1116 (a) and HT-29 (b) cells stimulated or not by LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 72 h. Results are expressed as means \pm SEM of the MFI obtained in three separate experiments.

and LPS for 48 h. As illustrated in Fig. 6, IFN- γ and LPS decreased the binding of biotinylated IL-10 on both cell lines.

Discussion

The present study shows that freshly isolated normal colonic epithelial cells and different human colon adenocarcinoma cell lines bound biotinylated IL-10 similarly to THP1 or Jurkat lymphomas. Moreover, IL-10 receptor mRNA was detected by RT-PCR in SW 1116 cells and normal colonic epithelial cells, but not in HT-29 and T84 cells. These cell lines expressed antigen presentation-associated molecules, but IL-10 failed to regulate their basal or stimulated (LPS or IFN- γ) expression.

The use of a biotinylated cytokine showed that IL-10 bound to normal colonic epithelial cells and HT-29, T84 and SW 1116 human colonic epithelial cells, which is in agreement with observations reported in abstract form [22–24]. In a previous study, we showed that SW 1116 displayed features of differentiated cells, i.e. polarization, high alkaline phosphatase or dipeptidyl aminopeptidase IV

enzyme activities, whereas HT-29 cells were for the most part poorly differentiated [25]. A similar IL-10 binding was detected on undifferentiated HT-29 cells and differentiated SW 1116 cells. Moreover, butyrate-treated HT-29 cells bound biotinylated IL-10 similarly to untreated cells (data not shown). Thus, no relationship was observed between colonic carcinoma differentiation and IL-10 binding. However, when normal colonic epithelial cells were screened for IL-10 binding, around 45% of the prepared isolated cells displayed no IL-10 binding. The nature of these cells remains to be characterized. The absence of IL-10 receptor mRNA in T84 and HT-29 cells that bound specifically biotinylated IL-10 raised two hypothesis. Either the receptor expressed on these cells is truncated or mutated in the fragment amplified using the selected primers, or IECs express a new IL-10 receptor, yet unidentified.

The expression of antigen presentation-associated molecules on human colorectal carcinoma cells is well documented [26,27]. Our study showed that class I or ICAM-1 antigen expression was low for HT-29 cells but high for SW 1116 cells, which in fact exhibited a low level of HLA-DR expression. Proinflammatory molecules such as IFN- γ modulated these expressions. Moreover, LPS up-regulated

Table 1 Effect of IFN- γ and IL-10 on expression of cell surface antigen by SW 1116 and HT-29 cells.

	SW 1116			HT-29		
	Control	IFN- γ	IFN- γ + IL-10	Control	IFN- γ	IFN- γ + IL-10
HLA-DR	3.8 ± 0.1	10.4 ± 0.3	10.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	3.4 ± 3.0	3.0 ± 2.8
ICAM-1	21.9 ± 1.5	65.9 ± 13.2	61.2 ± 9.5	1.0 ± 0.4	8.1 ± 6.5	10.7 ± 9.9
Class I	75.4 ± 15.8	106.4 ± 26.3	96.4 ± 11.8	1.0 ± 0.2	4.9 ± 3.6	4.4 ± 3.8

Results correspond to the mean relative fluorescence intensity (MFI) of 3000 cells determined by flow cytometry. In the table, the mean \pm SEM of the MFI obtained in three separate experiments are provided. IFN- γ was used at 1000 U mL^{-1} and IL-10 at 20 ng mL^{-1} .

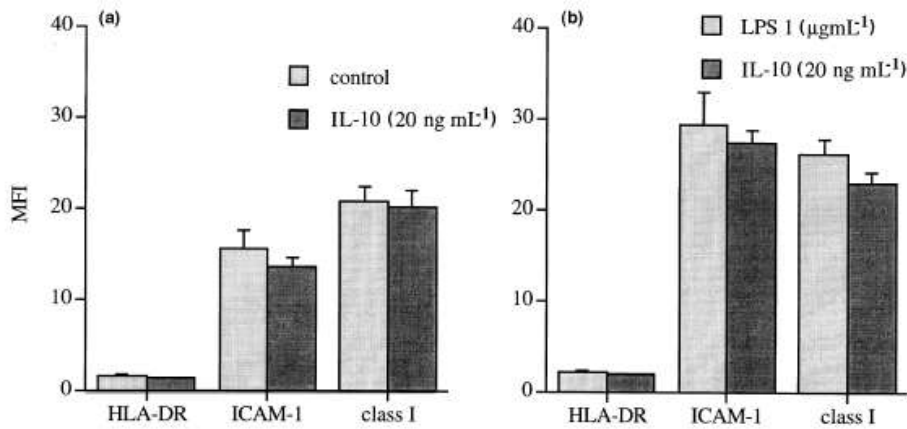


Figure 5 Effect of IL-10 (20 ng mL⁻¹) on HLA-DR, ICAM-1 and MHC class I expression by SW 1116 stimulated (b) or not (a) with LPS (1 µg mL⁻¹). Results are expressed as means ± SEM of the MFI obtained in three separate experiments.

ICAM-1 cell-surface antigens on SW 1116 but had no effect on HT-29 cells. A lack of LPS effect has already been reported for HT-29 and T84 cells [28]. However, an effect of LPS on a colon carcinoma cell line (SW 620) was also reported in another study [29]. Nevertheless, it has been reported that the expression of ICAM-1 on epithelial cells, both *in vivo* and *in vitro*, is limited to the apical side, and that its regulation depends largely on the nature of the pathogenic bacteria used [28]. Our results for SW 1116 cells indicate that bacterial LPS may also be involved in ICAM-1 regulation in epithelial cells, thereby contributing to the inflammatory process and attracting neutrophils to the epithelial surface.

The expression of antigen presentation-associated molecules by IECs and the potential regulation by proinflammatory molecules indicate the potential role of IECs in antigen presentation. Several studies have shown the capacity of IECs to present antigens [15–18]. A recent study reported two pathways of class II antigen processing by

IECs and found that IECs behaved like professional APCs after IFN-γ stimulation [18]. In this context, IL-10 plays a major role in the regulation of antigen presentation by several APCs [7–9]. As IECs can behave like APCs, it is conceivable that IL-10 regulates IEC expression of antigen presentation-associated molecules, especially HLA-DR. However, our study showed that IL-10 was unable to regulate the expression of antigen presentation-associated molecules, even after stimulation with LPS or IFN-γ. IL-10 has been shown to regulate MHC class II antigens on several APCs, including monocytes [7] and microglial cells [10], resulting in a reduction in their ability to present antigens. However, IL-10 inhibited antigen presentation by astrocytes and dermal microvascular endothelial cells through another pathway than down-regulation of MHC class II antigens [11–13]. In fact, several studies have shown that IL-10 affects antigen presentation through modulation of CD80/B7 [11–13] or ICAM-1 [11] expression. Yet we found that B7/CD80 was not expressed by the

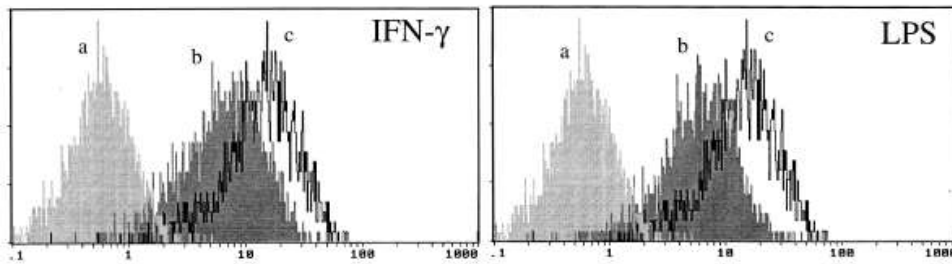


Figure 6 Effect of IFN-γ (1000 U mL⁻¹) and LPS (1 µg mL⁻¹) on the binding of biotinylated IL-10 on SW 1116 cells as analysed by flow cytometry using the IL-10 fluorokine kit. Soybean trypsin inhibitor was used as a negative control (a). Histograms represent the relative fluorescence intensity obtained with biotinylated IL-10 in control cells (c) or in cells treated by IFN-γ or LPS (b). Negative control of IFN-γ and LPS-treated cells (not shown) were similar to that of untreated cells. The figure shows the graphs obtained in one experiment representative of three experiments performed.

human colonic epithelial cell lines tested, even after stimulation with IFN- γ or LPS. Moreover, ICAM-1 was not modulated by IL-10. IECs can regulate T-cell activation through interaction with a non-conventional class I antigen (CD1d [30]) or with a gp180 molecule [31], and IFN- γ modulates CD1d surface expression on epithelial cells [32]. The potential regulation of CD1d expression by IL-10 has not been studied. It is noteworthy that a down-regulation of IL-10 receptor expression was observed in our study under stimulation with IFN- γ or LPS, as described elsewhere for HT-29 and T84 cells [22].

Although our results show that IECs expressed IL-10 receptor, the potential role of IL-10 on IECs is still unknown. Interleukin-10 may be able to modulate cell proliferation because Panja *et al.* [22] noted twofold enhancement of cell growth after addition of IL-10 to culture medium. Conversely, a 40% inhibition of HT-29 cell growth was reported in the presence of IL-10 [24]. Our tests of the effect of IL-10 on the proliferation of HT-29 and SW1116 revealed no modulation of cell proliferation and no modification of cell cycle progression analysed by flow cytometry after DNA staining with propidium iodide (data not shown). Finally, Madsen *et al.* [33] found that IL-10 prevented cytokine-induced disruption of T84 monolayer barrier integrity and limited chloride secretion. This effect may contribute to the potentially beneficial role of IL-10 in IBD, in addition to modulation of the immune system. Nevertheless, it is still uncertain whether IL-10 is involved in the regulation of antigen presentation by IECs.

Acknowledgement

This work was supported in part by a grant from IRMAD (Laboratoire ASTRA, France).

References

- Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263–74.
- Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 1995;108:1434–44.
- Herfarth HH, Mohanty SP, Rath HC, Tonkonogy S, Sartor RB. Interleukin-10 suppresses experimental chronic granulomatous inflammation induced by bacterial cell wall polymers. *Gut* 1996;39:836–45.
- Van Deventer SJH, Elson CO, Fedorak RN, for the Crohn's disease study group. Multiple doses of intravenous interleukin-10 in steroid-refractory Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997;113:383–89.
- De Vries JE. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin-10. *Ann Med* 1995;27:537–41.
- De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor C, De Vries JE. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:S1209–20.
- De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, *et al.* Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991;174:915–24.
- Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol* 1993;151:2390–98.
- Vora M, Yssel H, de Vries JE, Karasek MA. Antigen presentation by human dermal microvascular endothelial cells. Immunoregulatory effect of IFN- γ and IL-10. *J Immunol* 1994;152:5734–41.
- Frei K, Lins H, Schwerdel C, Fontana A. Antigen presentation in the central nervous system. The inhibitory effect of IL-10 on MHC Class II expression and production of cytokines depends on the inducing signals and the type of cell analyzed. *J Immunol* 1994;152:2720–28.
- Willems F, Marchant A, Delville JP, Gerard C, Delvaux A, Velu T, De Boer M, Goldman M. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol* 1994;24:1007–9.
- Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 1993;151:1224–34.
- Ozawa H, Aiba S, Nakagawa S, Tagami H. Interferon- γ and interleukin-10 inhibit antigen presentation by Langerhans cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B-1) expression. *Eur J Immunol* 1996;26:648–52.
- Brandtzaeg P, Halstensen TS, Huitfeldt HS, Krajci P, Kvale D, Scott H, Thrane PS. Epithelial expression of HLA, secretory component (poly-Ig receptor) and adhesion molecules in the human alimentary tract. *Ann N Y Acad Sci* 1992;664:157–79.
- Kaiserlian D, Vidal K, Revillard JP. Murine enterocytes can present soluble antigen to specific class II-restricted CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1989;19:1513–16.
- Bland PW, Warren LG. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine I. Kinetics, antigen specificity and blocking by anti-Ia antisera. *Immunology* 1986;58:1–7.
- Mayer L, Shlien R. Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *J Exp Med* 1987;166:1471–83.
- Hershberg RM, Framson PE, Cho DH, *et al.* Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing. *J Clin Invest* 1997;100:204–15.
- Branka JE, Vallette G, Jarry A, Bou-Hanna C, Lemare P, Van PN, Laboisse CL. Early functional effects of *Clostridium difficile* toxin A on human colonocytes. *Gastroenterology* 1997;112:1887–94.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–59.
- Tan JC, Indelicato SR, Narula SK, Zavodny PJ, Chou CC. Characterization of interleukin-10 receptors on human and mouse cells. *J Biol Chem* 1993;268:21053–9.
- Panja A, Krishen P, Mayer L. Expression of IL-10 receptors on human intestinal epithelial cells and its functional consequences. *Gastroenterology* 1996;110:A986.
- Campbell N, Song F, Klimpel G, *et al.* IL-10 receptor expression on a murine small intestinal epithelial cell line and the effect of IL-10 on epithelial cell function. *Gastroenterology* 1996;110:A876.

- 24 Napolitano LM, Buzdon MM, Shi HJ, Bass BL. Interleukin-10 (IL-10) receptor expression is downregulated with enterocyte differentiation. *Gastroenterology* 1997;112:A1462.
- 25 Blottière HM, Zennadi R, Grégoire M, *et al.* Analysis of the relationship between stage of differentiation and NK/LAK susceptibility of colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 1993;53:409–17.
- 26 Kvale D, Brandtzaeg P. Constitutive and cytokine induced expression of HLA molecules secretory component and intercellular adhesion molecule-1 is modulated by butyrate in the colonic epithelial cell line HT-29. *Gut* 1995;36:737–42.
- 27 Siavoshian S, Blottière HM, Bentouïmou N, Cherbut C, Galmiche JP. Butyrate enhances major histocompatibility complex class I and HLA-DR antigen expression on differentiated human intestinal epithelial cells. *Eur J Clin Invest* 1996;26:803–10.
- 28 Huang GT, Eckmann L, Savidge TC, Kagnoff MF. Infection of human intestinal epithelial cells with invasive bacteria upregulates apical intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 1996;98:572–83.
- 29 Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 1998;101:1163–74.
- 30 Panja A, Blumberg RS, Balk SP, Mayer L. CD1d is involved in T cell-intestinal epithelial cell interactions. *J Exp Med* 1993;178:1115–9.
- 31 Toy LS, Yio XY, Lin A, Honig S, Mayer L. Defective expression of gp180, a novel CD8 ligand on intestinal epithelial cells, in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1997;100:2062–71.
- 32 Colgan SP, Morales VM, Madara JL, Polischuk JE, Balk SP, Blumberg RS. IFN- γ modulates CD1d surface expression on intestinal epithelia. *Am J Physiol* 1996;271:S276–83.
- 33 Madsen KL, Lewis SA, Tavernini MM, Hibbard J, Fedorak RN. Interleukin 10 prevents cytokine-induced disruption of T84 monolayer barrier integrity and limits chloride secretion. *Gastroenterology* 1997;113:151–9.

V.2. « RDP58, un nouveau peptide immunomodulateur : étude pharmacologique dans le modèle de colite induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique et dans la maladie de Crohn. »

V.2.1. Résumé

Le TNF joue un rôle clef dans la physiopathologie de la MC. Le RDP58 est un nouveau peptide ayant des propriétés immunomodulatrices. Récemment, il a été démontré que la RDP58 inhibait la synthèse de TNF à un niveau traductionnel. Le but de cette étude était d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires du RDP58 dans un modèle de culture *ex vivo* de muqueuse de patients atteints de MC et dans un modèle *in vivo* de colite induite par le TNBS chez le rat.

Les biopsies coliques et les cellules mononucléées isolées de la lamina propria de 18 patients atteints de MC active ont été cultivées pendant 24 h en présence ou en absence de RDP58. La sécrétion de TNF a été quantifiée par bio-essai, celle d'IFN- γ et d'IL-1 β par ELISA. La colite a été induite par l'instillation intrarectale d'acide 2, 4, 6 Trinitrobenzene Sulfonic (TNBS) chez le rat. L'inflammation a été évaluée après 7 jours de traitement oral par RDP58 ou un placebo.

Le RDP58 entraînait une diminution de la production de TNF et d'IFN- γ mais pas d'IL-1 β par les biopsies et par les cellules mononucléées isolées de la *lamina propria* des patients atteints de MC. Le traitement oral par RDP58 a diminué l'intensité des signes cliniques, la perte de poids et amélioré significativement les scores histologiques et macroscopiques d'inflammation colique chez les rats.

Nos résultats suggèrent que le RDP58 pourrait devenir un traitement oral efficace de la MC chez l'homme.

V.2.2. Publication 2 : « Scand J Gastroenterol 2003;38:526-32 »

RDP58, a novel immunomodulatory peptide, with anti-inflammatory effects. A pharmacological study in TNBS colitis and Crohn's disease.

Arnaud Bourreille*[§], Marie Doubremelle*[§], Diane Raingeard de la Blétière[§], Jean-Pierre Segain[§], Claire Toquet[¶], Roland Buelow[#], and Jean-Paul Galmiche[§]

*These authors contributed equally to this work

[§]Department of Gastroenterology, INSERM U 539 and CIC/INSERM; [¶]Department of Pathology, Hôtel Dieu, Nantes, France; [#]SangStat, Fremont, California, U.S.A.

Short title: RDP58 in inflammatory bowel disease

Abbreviations: CD, Crohn's Disease; IFN, interferon; IL, interleukin; LPMNC, lamina propria mononuclear cells; TNF, tumour necrosis factor.

Summary

Background: Tumour Necrosis Factor (TNF) plays a key role in the pathogenesis of Crohn's disease (CD). RDP58 is a novel anti-inflammatory decapeptide which was developed using a novel rational design strategy. Recently, RDP58 has proved to be a potent inhibitor of TNF production at a post-transcriptional step. The aims of this study were to investigate the anti-inflammatory properties of RDP58 *ex vivo* in human CD and *in vivo* in an experimental model colitis.

Methods: Biopsies and *lamina propria* mononuclear cells from inflamed colonic mucosa of 18 CD patients were cultured for 24 h in the presence or absence of RDP58. TNF was quantified in a bioassay; interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-1 β levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assays. Colitis was induced by intra-rectal administration of 2, 4, 6 Trinitrobenzene Sulphonic acid (TNBS) in rats. Inflammation was assessed following 7 days of oral therapy with RDP58 or vehicle alone.

Results: RDP58 led to decreased TNF and IFN- γ (but not IL-1 β) production by biopsies and *lamina propria* mononuclear cells from CD patients. In rats with TNBS-induced colitis, oral RDP58 therapy reduced weight loss and diarrhoea and improved macroscopic and histological inflammation scores.

Conclusions: Our results suggest that RDP58 may be an effective therapy for CD with the clinical advantage of an oral administration.

Key words: Crohn's disease; Inflammation; Inflammatory Bowel Disease; TNF; RDP58.

Corresponding author: Pr. J.P. Galmiche, M.D., F.R.C.P.,

Hôtel Dieu, Place A. Ricordeau, 44093 Nantes cedex 01, France.

Tel: 33 (0)2-40-08-75-05, Fax: 33 (0)2-40-08-75-06, e-mail: galmiche@easynet.fr

Introduction

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory bowel disease (IBD) associated with significant morbidity and substantial economic costs (1-3). Pro-inflammatory and type-1 cytokines [e.g. interleukin (IL)-1, tumour necrosis factor (TNF) and interferon (IFN)- γ] are implicated in CD pathogenesis and are thus obvious targets for new attempts at therapy (4). There is abundant evidence that TNF plays a pivotal role in the pathophysiology of CD. TNF levels are elevated in intestinal mucosa, stool, serum, *lamina propria* mononuclear cells (LPMNC) and peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) in CD patients (5-9). TNF also modulates other pro-inflammatory molecules, making it an attractive target for intervention (10). The most compelling evidence that TNF plays a major role in CD comes from studies employing TNF antibodies. Several therapeutic trials have demonstrated the efficacy of anti-TNF monoclonal antibody (mAb) therapy in patients with moderate to severe CD who failed to respond to conventional therapies (11,12). However, the mechanism by which anti-TNF mAb mitigates CD symptoms, has not been fully elucidated. It has been suggested that the beneficial effect results from neutralisation of soluble and membrane-associated TNF as well as from lysis of TNF-expressing cells by antibody-dependent cytotoxicity and T Lymphocytes apoptosis (13,14). Unfortunately, mAb-therapy may result in a host anti-mAb antibody response with subsequent immediate infusion reactions, serum-sickness and delayed hypersensitivity reactions (15). Therefore, it seems relevant to search for other therapeutic strategies to reduce TNF-mediated inflammation. TNF inhibition or blockade may be achieved using a variety of agents including: (i) prostanoids or TGF- β which inhibit TNF protein synthesis; (ii) Inhibitors of the TNF alpha converting enzyme (TACE) which is involved in the process and release of TNF; (iii), Recombinant soluble TNF receptors which bind and neutralise TNF.

Down-regulation of TNF may also be effected *via* a novel anti-inflammatory peptide, RDP58. This peptide was developed using a computer-assisted, rational design approach based on peptides derived from the heavy chain of the HLA Class I molecules (16-21). *In vitro*, such peptides, particularly those derived from HLA-B2702 and HLA-B07 can inhibit the cytotoxicity and differentiation of cytotoxic T cells. *In vivo*, they were shown to prolong allograft survival in rodents (16-19). A second generation of immunomodulatory peptides has been developed (22) including RDP1258 and its D-isomer RDP58, which have shown enhanced efficacy both *in vivo*, in rodent allograft models, and *in vitro*, in inhibiting cytotoxicity in human and mouse T lymphocytes (23,24). Despite the effectiveness of RDP 1258 and RDP58 in these models, their mechanism of action is not fully elucidated. Early observations indicated that the peptides did not interact directly with T cell receptors or NK cell inhibitory receptors (16,17). More recently, it was shown that RDP58 inhibited TNF synthesis without altering TNF mRNA expression, which suggests that the peptide acts at a post-transcriptional step (25).

This potent inhibition of TNF prompted us to investigate the effect of RDP58 on the production of pro-inflammatory cytokines by biopsies and LPMNC obtained from patients with CD. In addition, the therapeutic effect of orally administered RDP58 was studied in the TNBS-induced colitis model in rats.

Materials and Methods

Patients

Eighteen patients with CD involving the colon (with or without associated ileitis) were prospectively enrolled in the study after informed consent was obtained. Fifteen of these 18 patients (7 males, 11 females; 18-72 years old) had active disease as shown by a CDAI higher than 150. The demographic characteristics of the 18 patients are summarised in table 1. At the time of the study, four patients were on steroids, four aminosalicylates and steroids, four azathioprine and one aminosalicylates, whereas five patients were receiving no medication. Colonoscopy was performed under general sedation, and approximately 10 biopsies per patient were taken in inflammatory segments, usually close to ulcerations.

Tissue and cell culture conditions

All tissue culture products were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Immediately after colonoscopy, biopsies were washed twice in 0.9 % NaCl, weighed and cultured in 24 well-plates for 24 h in RPMI-1640 supplemented with 10% Foetal Calf Serum (FCS), L-glutamine, penicillin, streptomycin and gentamycin (complete medium). Each biopsy specimen was cultured in one ml of complete medium. Based on preliminary experiments (25), RDP58 (SangStat Medical Corporation, Fremont, CA) was added in complete medium to a final concentration of 0, 5, 10 or 50 μ M. Supernatants were recovered for cytokine measurement.

LPMNC were isolated from colonic biopsies immediately after colonoscopy by the method of Bull and Bookman (26). Briefly, biopsies were incubated in FCS-free medium supplemented with 1 mM EGTA and 0.1% bovine serum albumin (BSA) at 37°C for 30 min,

and then with 100 U/ml of type VIII collagenase (Sigma, France) for another 30 min. After Ficoll density gradient centrifugation, LPMNC were seeded in 24 well-plates and cultured for 24 h in complete medium in the absence or presence of RDP58 (5, 10 or 50 μ M). LPMNC were cultured at a concentration of 10^6 cells/ml of complete medium. Supernatants and cells were recovered separately, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C prior to cytokine quantification or RNA isolation.

Measurement of cytokine production

Biologically active total TNF was measured using the WEHI 164 clone 13-cell killing assay (27). WEHI 164 cells (30,000) were cultured in 96 well-plates in complete medium supplemented with Actinomycin D ($2\mu\text{g/ml}$), LiCl_2 (40 mM), and LPMNC or biopsies culture supernatants for 18 h. The TNF concentration was determined by measuring the cytotoxicity of the culture supernatants on highly sensitive WEHI 164 clone 13 in a MTT (Sigma, France) colorimetric assay. Results were normalised to a standard curve obtained by successive dilution of human recombinant TNF (Peprotech) from 1000 to 0.03 pg/ml. Concentrations of total TNF are expressed as pg/ml for LPMNC and pg/mg for biopsies. IFN- γ and IL-1 β concentrations were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercially available recombinant cytokines and antibodies, according to manufacturer's instructions (PharMingen, San Diego, California).

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction and densitometry

One microgram of total RNA was reverse transcribed in a reaction volume of 20 μ l using random primers (Pharmacia, Saclay, France) and the Superscript II murine moloney leukemia virus reverse transcriptase, according to the instructions of the manufacturer (Life

Technologies, Cergy Pontoise, France). PCR was performed in the linear range of amplification (determined for each primer pair-cDNA combination). Standard PCR reactions were performed in a 50 µl volume containing 1 µl of the RT reaction, 1 µl of each primer solution (50 µM), 1 µl of dNTP solution (10 mM each), 3 µl of MgCl₂ (25 mM), 5 µl of 10X Goldstar DNA polymerase reaction buffer, and 0.1 µl (0.5 U) of Goldstar DNA polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium). Each PCR cycle consisted of 1 min at 92°C, 1 min at 58°C and 1 min at 72°C. The following sense/antisense primers (Genosys, Pampisford, UK) were used for amplification:

TNF: 5'-AAGCCTGTAGCCCATGTTGT-3' and 5'-CAGATAGATGGGCTCATACC-3';

IL-1β: 5'-TGCCCGTCTTCCTGGGAGGG-3' and 5'-GGCTGGGGATTGGCCCTGAA-3';

IFN-γ: 5'-TCGTTTTGGGTTCTCTTGGC-3' and 5'-GCAGGCAGGACAACCATTAC-3'

GAPDH: 5'TTCATTGACCTCAACTACAT-3' and 5'-GTGGCAGTGATGGCATGGAC-3'

Ten µl of the PCR reaction were electrophoresed in 1.5% agarose gel, and amplified cDNA fragments were stained with ethidium bromide. Signals were then quantified by a laser densitometer. Data were normalized based on the detected amounts of GAPDH mRNA levels.

2, 4, 6-Trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis in rats

Animal experiments were performed in accordance with governmental guidelines (No. 87/848). The TNBS-colitis model has already been described in detail (28-30). Twenty Male Sprague Dawley rats (250 g; Janvier Laboratories, Le Genest, St Isle, France) were fasted for 24 h, anaesthetised with pentobarbital, and treated with a single intra-colonic administration of 2,4,6-TNBS acid (25 mg in 30% ethanol). Groups of 10 rats were used in each experiment.

For each experiment, TNBS-treated rats were randomly divided into two groups and treated with an oral dose of RDP58 (5 mg/kg) or water (control) once daily for 7 days. Treatment by RDP58 or water was started 8 hours after induction of the colitis. Rats were

housed individually, weighed daily and sacrificed on day 8. Occurrence of diarrhoea was assessed by the presence of soft stools. An independent observer quantified macroscopic damage. As describe by Wallace et al. (31), the following parameters were taken into consideration and scored: hyperaemia without ulcer, hyperaemia and thickening of the bowel wall without ulcer, number and extent of sites of ulceration (31). For histological analysis, segments of 0.5 cm from the most inflamed part of the distal colon were removed, fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Sections were stained with haematoxylin-eosin and an independent pathologist quantified histological damage. As described previously (28,30) the following parameters were analysed: extent of ulceration, sub-mucosal infiltrate, crypt abscesses and colonic wall thickness (table 2).

Statistical analysis

Comparisons between multiple groups were done using ANOVA with Bonferroni correction (normal distribution) or Kruskal-Wallis analysis of variance (non-normally-distributed data). Significance for differences between values was analysed by unpaired Student's *t*-test (normal distribution) or the U Mann-Withney test (non-normally-distributed data). P values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Effect of RDP58 on TNF production by biopsies from CD patients

Addition of RDP58 resulted in a reduction of TNF levels, which was statistically significant at a dose of 50 μ M RDP58 ($n = 7$, $p=0.03$). Median TNF concentrations (quartile ranges) were 23 (9.2-63.7) pg/mg for untreated biopsies and 6 (2.7-14.7) pg/mg in the presence of 50 μ M RDP58 (Fig. 1). The reduction of TNF production by RDP58 was independent of the presence or absence of immunosuppressive therapy prior to colonoscopy.

Effect of RDP58 on cytokine production by LPMNC from CD patients.

RDP58 did not affect LPMNC viability assessed by trypan blue exclusion (data not shown). As expected, LPMNC produced high levels of TNF ($n = 11$ patients), IL-1 β and IFN- γ ($n = 7$ patients) in culture supernatants.

Addition of RDP58 significantly and dose dependently reduced TNF and INF- γ levels (ANOVA, $p<0.05$), but had no effect on IL-1 β production (Fig 2). TNF concentrations (mean \pm SEM) were 276 ± 63 pg/ml for untreated LPMNC, 184 ± 44 pg/ml in the presence of 10 μ M RDP58 and 120 ± 30 pg/ml in the presence of 50 μ M RDP58 (Fig. 2A). Similarly, mean IFN- γ concentration fell from 19 ± 7 pg/ml in control conditions to 13 ± 6 and 7 ± 3 pg/ml in the presence of 10 and 50 μ M RDP58, respectively (Fig. 2B).

Effect of RDP58 on cytokine mRNA steady-state levels

The effect of RDP58 on cytokine production prompted us to analyze cytokine mRNA expression in LPMNC isolated from numerous biopsies of three CD patients cultured with or without RDP58 for 24 h. Following RT-PCR and gel separation of amplification products, cytokine and GAPDH mRNA levels were quantified by densitometry. No significant effect of RDP58 on TNF- α , IL-1 β or IFN- γ mRNA levels was observed (Fig. 3).

Effect of RDP58 on TNBS colitis

As compared with control animals (TNBS colitis not treated by RDP58), those receiving RDP58 orally showed less diarrhoea (soft stools) and improved weight gain (ANOVA, $p < 0.05$) (Fig. 4).

In TNBS-treated control animals, macroscopic analysis on day 8 revealed a severely inflamed, dilated segment of the distal colon adherent to adjacent organs, whereas few signs of colonic inflammation were seen in RDP58-treated animals (Fig. 5A). The colonic lumen of all TNBS-treated rats displayed severely inflamed mucosa with ulceration, often involving the entire circumference of the bowel (fig. 5B). These signs of inflammation were less frequent in TNBS-treated animals undergoing RDP58 therapy (Fig. 5B), as reflected by a reduction of the macroscopic score (Fig. 5C). Histopathological studies of colonic sections confirmed that RDP58 treatment reduced mucosal ulcerations, inflammatory infiltrates and bowel wall thickness (Fig. 6A), resulting in a significant decrease of the global score (Fig. 6B).

Discussion

Our results in *ex vivo* conditions, as determined by biopsies and LPMNC isolated from inflamed colonic mucosa of CD patients, indicate that RDP58 decreased human TNF and IFN- γ production, but had no effect on IL-1 β production. These findings are consistent with the *in vivo* improvement observed in TNBS colitis after a week's administration of oral RDP58.

Our study in CD patients was not a therapeutic trial but rather a pharmacological approach using a validated *ex vivo* culture technique (28,32). Indeed, we and others have shown that this model is able to detect a significant reduction of so-called inflammatory cytokines, notably TNF, after administration of substances as different as butyrate, oxpentifylline or IL-10 (28,33,34). In the present study, biopsies were taken in the most inflammatory segments in order to ensure high baseline production of inflammatory cytokines. The dose found to be effective (50 μ M) is in agreement with previous *in vitro* data for human monocytic THP-1 cells (25). The results obtained with LPMNC strongly support the data obtained on biopsies and show a significant dose-dependent effect of RDP58 on TNF production (fig 2A). With respect to the other inflammatory cytokines, the same response pattern has already been reported in previous work (i.e. a reduction of IFN- γ production and a lack of effect on IL-1 β). The reasons for this differential effect on cytokines are not well known but illustrate the relative specificity of RDP58, which is more specifically TNF-targeted (25).

The *in vivo* effect of the peptide was also studied in TNBS-induced colitis, a well-documented experimental model of intestinal inflammation that mimics several features of human CD (35). In fact, administration of TNBS induces immune responses associated with increased production of IFN- γ and TNF- α (35–37). The predominant role of TNF in TNBS-induced colitis has been further emphasised by a dramatic reduction of inflammation after intra-peritoneal injection of anti-TNF antibodies (37). In contrast, TNF knock-out mice are resistant to TNBS colitis (37). In the present study, TNBS-inflamed rats receiving RDP58 gained more weight and had less diarrhoea than vehicle-treated control animals. This clinical benefit was associated with a significant decrease of both macroscopic and histological scores

of inflammation. These findings are consistent with recent observations showing that RDP58 can reduce inflammation in the mouse DSS-colitis model (38), and induce prolonged remission in primate model of colitis (39).

It has been demonstrated that the anti-TNF activity of RDP58 occurs at a translational level and depends on control elements located in the 3'UTR of TNF mRNA (25). Accordingly, experiments conducted in our laboratory did not reveal any change in the TNF mRNA levels after incubation of LPMNC from CD patients with RDP58. In addition to inhibition of TNF, RDP58 administration is associated with an up-regulation of HO-1 (21,23), the protective rate-limiting enzyme involved in oxidative degradation of heme into biliverdin, iron and carbon monoxide (CO). Modulation of HO activity is associated with the inhibition of immune-effector functions including cytokine production. Several studies have found a protective role for induced HO-1 in tissue injury and inflammation, particularly in the TNBS-induced colitis model (40-42). It was recently demonstrated that some anti-inflammatory effects of HO-1 might be mediated by CO. In particular, CO can act as a potent anti-inflammatory molecule inhibiting TNF expression at a post-transcriptional level (41). Therefore, additional studies are needed to clarify the contribution of HO-1 modulation by RDP58 to the anti-inflammatory effects of RDP58 therapy.

Our results show that RDP58 therapy inhibits inflammatory cytokine production in human tissue specimens from CD patients and is effective in mitigating the TNBS-induced colitis model in rats. Taken together, these data indicate that RDP58 as a very promising therapy for CD with the clear advantage of oral administration relative to current anti-TNF antibodies. In the perspective of therapy in human diseases, the safety and tolerance of this drug were recently evaluated in a Phase I trial. The safe dose of orally administered RDP58 reported in this trial (up to 300 mg daily) was well-tolerated for 28 days (39).

References

- 1 Riley R. Crohn's disease and ulcerative colitis: morbidity and mortality. *Health Rep* 1990;2:343-59.
- 2 Silverstein MD, Loftus EV, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Feagan BG, Nietert PJ et al. Clinical course and costs of care for Crohn's disease: Markov model analysis of a population-based cohort. *Gastroenterology* 1999;117:49-57.
- 3 Feagan BG, Vreeland MG, Larson LR, Bala MV. Annual cost of care for Crohn's disease: a payer perspective. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1955-60.
- 4 Fiocchi C. Inflammatory Bowel Disease: Etiology and Pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205.
- 5 Plevy SE, Targan SR, Deem RL, Toyoda H. Increased mucosal TNF- α levels and numbers of TNF- α producing cells are unique to Crohn's disease mucosal inflammation. *Gastroenterology* 1995;106:A754.
- 6 Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephen S, MacDonald TT. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992;339:89-91.
- 7 Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1991;32:913-7.
- 8 Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio P et al. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994;106:1455-66.
- 9 Bouma G, Oudkerk Pool M, Scharenberg JG, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Scheper RJ et al. Differences in the intrinsic capacity of peripheral blood mononuclear cells to

- produce tumor necrosis factor alpha and beta in patients with inflammatory bowel disease and healthy controls. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:1095-100.
- 10 Brennan FM, Feldmann M. Cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:872-7.
 - 11 Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJH, Mayer L, Present DH, Braakman T et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor- α for Crohn's disease. *N Engl J Med* 1997;337:1029-35.
 - 12 Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999;340:1398-405.
 - 13 Scallon BJ, Moore MA, Trinh H, Knight DM, Ghayeb J. Chimeric anti-TNF- α monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF- α and activates immune effector functions. *Cytokine* 1995;7:251-9.
 - 14 ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T Lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 2002; 50:206-11.
 - 15 Hanauer SB, Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S, Kam L, Present DH et al. Delayed hypersensitivity to infliximab (Remicade®) re-infusion after a 2-4 year interval without treatment. *Gastroenterology* 1999;116:A731.
 - 16 Woo J, Gao L, Cornejo MC, Buelow R. A synthetic dimeric HLA class I peptide inhibits T cell activity in vitro and prolongs allogeneic heart graft survival in a mouse model. *Transplantation* 1995;60:1156-63.
 - 17 Gao L, Woo J, Buelow R. Both L- and D-isomers of allotrap 2702 prolong cardiac allograft survival in mice. *J Heart Lung Transplant* 1996;15:78-87.

- 18 Hanaway MJ, Geissler EK, Wang J, Fechner JH Jr, Buelow R, Knechtle SJ. Immunosuppressive effects of an HLA class I-derived peptide in a rat cardiac allograft model. *Transplantation* 1996;61:1222-8.
- 19 Murphy B, Kim KS, Buelow R, Sayegh MH, Hancock WW. Synthetic MHC class I peptide prolongs cardiac survival and attenuates transplant arteriosclerosis in the Lewis-->Fischer 344 model of chronic allograft rejection. *Transplantation* 1997;64:14-9.
- 20 Woo J, Iyer S, Cornejo MC, Gao L, Cuturi C, Souillou JP et al. Immunosuppression by D-isomers of HLA class I heavy chain (amino acid 75 to 84)-derived peptides is independent of binding to HSC70. *Transplantation* 1997;64:1460-7.
- 21 Iyer S, Woo J, Cornejo MC, Gao L, Mc Coubrey W, Maines M et al. Characterization and biological significance of immunosuppressive peptide D2702.75-84 (E --> V) binding protein. Isolation of heme oxygenase-1. *J Biol Chem* 1998;273:2692-7.
- 22 Grassy G, Calas B, Yasri A, Lahana R, Woo J, Iyer S et al. Computer-assisted rational design of immunosuppressive compounds. *Nat Biotechnol* 1998;16:748-52.
- 23 Cuturi MC, Christoph F, Woo J, Iyer S, Brouard S, Heslan JM et al. RDP1258, a new rationally designed immunosuppressive peptide, prolongs allograft survival in rats: analysis of its mechanism of action. *Mol Med* 1999;5:820-32.
- 24 Magee CC, Azuma H, Knoflach A, Denton MD, Chandraker A, Iyer S et al. In vitro and in vivo immunomodulatory effects of RDP1258, a novel synthetic peptide. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1997-2005.
- 25 Iyer S, Kontoyiannis D, Chevrier D, Woo J, Mori N, Cornejo M et al. Inhibition of tumor necrosis factor mRNA translation by a rationally designed immunomodulatory peptide. *J Biol Chem* 2000;275:17051-7.
- 26 Bull DM, Bookman MA. Isolation and functional characterization of human intestinal mucosal lymphoid cells. *J Clin Invest* 1977;59:966-74.

- 27 Espevik T, Nissen-Meyer J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 1986;95:99-105.
- 28 Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000;47:397-403.
- 29 Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96:795-803.
- 30 Barbier M, Cherbut C, Aube AC, Blottiere HM, Galmiche JP. Elevated plasma leptin concentrations in early stages of experimental intestinal inflammation in rats. *Gut* 1998;43:783-90.
- 31 Wallace JL, MacNaughton WK, Morris GP, Beck PL. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammation bowel disease. *Gastroenterology* 1989;96:29-36.
- 32 Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP et al. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993;94:174-81.
- 33 Reimund JM, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Kedinger M, Baumann R et al. In vitro effects of oxpentifylline on inflammatory cytokine release in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40:475-80.
- 34 Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;108:1434-44.
- 35 Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. *Intern Rev Immunol* 2000;19:51-62.

- 36 Neurath M, Fuss I, Kelsall B, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995;182:1281-90.
- 37 Neurath M, Fuss I, Pasparakis M, Alexopoulou L, Haralambous S, Meyer zum Buschenfelde KH et al. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol* 1997;27:1743-50.
- 38 Murthy S, Flanigan A, Buelow R. The efficacy of RDP58 in the dextran sulfate (DSS) model of chronic colitis. *Gastroenterology* 2002 ;122:A397.
- 39 Ganesan S, Iyer S, Travis S, Roberts J, Buelow R, Jazrawi R et al. RDP58, a new oral inhibitor of TNF effectively treats primate models of colitis and is safe in man. *Gastroenterology* 2002;122:A6.
- 40 Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 1996;2:87-90.
- 41 Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000;6:422-8.
- 42 Wang WP, Guo X, Koo MW, Wong BC, Lam SK, Ye YN et al. Protective role of heme-oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver physiol* 2001;28:586-94.

V.3. « Le butyrate inhibe la réponse inflammatoire *via* l'inhibition de NF- κ B: implication pour la Maladie de Crohn. »

V.3.1. Résumé

Les cytokines pro-inflammatoires sont produites en excès au cours de la MC. L'activation du facteur nucléaire (NF)- κ B, responsable de la transcription de leurs gènes, est augmentée dans la muqueuse intestinale de ces mêmes patients. Compte tenu du bénéfice clinique des lavements de butyrate pour le traitement des colites, nous avons évalué les capacités du butyrate à prévenir l'inflammation au cours de la MC et ses effets sur la production de cytokines pro-inflammatoires.

Méthodes : Des biopsies intestinales, de patients atteints de MC ainsi que des cellules mononucléées isolées de la *lamina propria* (LPMC) ou du sang périphérique (PBMC) ont été cultivées 24 heures en présence ou absence de butyrate. Les effets du butyrate sur la production du TNF et l'expression des ARN messagers (ARNm) de l'IL-1 β , l'IL-6 et du TNF ont été analysés par dosage dans les surnageants de culture et par RT-PCR. L'activation du facteur NF- κ B en présence ou non de butyrate, a été déterminée par immunofluorescence et des expériences de gènes rapporteurs. De plus, les taux de la protéine I- κ B α , inhibiteur cytoplasmique du facteur NF- κ B, ont été analysés par western-blot. Finalement, l'efficacité du butyrate à traiter une colite inflammatoire *in vivo*, a été déterminée chez le rat dans un modèle expérimental de colite inflammatoire induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique.

Résultats : Le butyrate diminuait la production de TNF et l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires, par des biopsies intestinales et des LPMC de patients atteints de MC. De plus, le butyrate inhibait l'expression des cytokines pro-inflammatoires induites

par le lipopolysaccharide (LPS) par des PBMC, en association avec une inhibition de la translocation nucléaire de NF- κ B. Alors que l'activité transcriptionnelle de NF- κ B, induite par le LPS, était diminuée en présence de butyrate, les quantités de I- κ B α étaient augmentées. Finalement, des lavements au butyrate amélioraient la colite induite expérimentalement chez le rat.

Conclusion Le butyrate diminue la production de cytokines pro-inflammatoires *via* une inhibition de l'activation de NF- κ B et de la dégradation de I- κ B. Ces propriétés apportent des bases rationnelles à son utilisation dans le traitement de la MC.

V.3.2. Publication 3 : « Gut 2000;47:397-403. »

Butyrate inhibits inflammatory responses through NF κ B inhibition: implications for Crohn's disease

J-P Segain, D Raingeard de la Blétière, A Bourreille, V Leray, N Gervois, C Rosales, L Ferrier, C Bonnet, H M Blottiere, J-P Galmiche

Abstract

Background/aim—Proinflammatory cytokines are key factors in the pathogenesis of Crohn's disease (CD). Activation of nuclear factor kappa B (NF κ B), which is involved in their gene transcription, is increased in the intestinal mucosa of CD patients. As butyrate enemas may be beneficial in treating colonic inflammation, we investigated if butyrate promotes this effect by acting on proinflammatory cytokine expression.

Methods—Intestinal biopsy specimens, isolated lamina propria cells (LPMC), and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were cultured with or without butyrate for assessment of secretion of tumour necrosis factor (TNF) and mRNA levels. NF κ B p65 activation was determined by immunofluorescence and gene reporter experiments. Levels of NF κ B inhibitory protein (I κ B α) were analysed by western blotting. The *in vivo* efficacy of butyrate was assessed in rats with trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) induced colitis.

Results—Butyrate decreased TNF production and proinflammatory cytokine mRNA expression by intestinal biopsies and LPMC from CD patients. Butyrate abolished lipopolysaccharide (LPS) induced expression of cytokines by PBMC and transmigration of NF κ B from the cytoplasm to the nucleus. LPS induced NF κ B transcriptional activity was decreased by butyrate while I κ B α levels were stable. Butyrate treatment also improved TNBS induced colitis.

Conclusions—Butyrate decreases proinflammatory cytokine expression via inhibition of NF κ B activation and I κ B α degradation. These anti-inflammatory properties provide a rationale for assessing butyrate in the treatment of CD.

(Gut 2000;47:397-403)

Keywords: inflammation; butyrate; Crohn's disease; nuclear factor kappa B; cytokines

It is well established that proinflammatory cytokines (for example, interleukin (IL) 1, IL-6, and tumour necrosis factor (TNF)) play a key role in the pathogenesis of Crohn's disease (CD), a major inflammatory bowel disease (IBD).^{1,2} Several studies have shown that increased TNF- α and TNF- β levels in intestinal mucosa, stool, serum, lamina propria mononuclear cells (LPMC), and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are particu-

lar features of CD.³⁻⁸ Steroid treatments disrupt the cytokine cascade of the inflammatory process but their systemic action and side effects can be harmful, particularly during long term treatment. The same is true for other drugs such as aminosalicylates which are of limited or marginal benefit, especially when used as a prophylactic against relapse.⁹ New therapeutic approaches are being developed to limit or neutralise the action of agents involved in the inflammatory process. In many inflammatory disorders TNF- α is considered a good target for therapy as its neutralisation can lead to a reduction in the levels of other proinflammatory mediators.¹⁰ The pivotal role of TNF- α in inflammatory responses has been demonstrated by the efficacy of antibodies directed against TNF- α in CD and rheumatoid arthritis.¹¹⁻¹³

Recent studies have shown that the transcription factor nuclear factor kappa B (NF κ B) may also be a good target for therapy.¹⁴⁻¹⁶ NF κ B is known to play a central role in immune and inflammatory responses and is involved in transcriptional regulation of many cytokine genes, including TNF.¹⁷ The primary form of NF κ B consists of a heterodimer of NF κ B1 (p50) and RelA (p65) which is sequestered in the cytoplasm by tightly bound inhibitory proteins of the inhibitor protein kappa B (I κ B) family. NF κ B can be activated by several stimuli, including proinflammatory cytokines or bacterial lipopolysaccharide (LPS). In response to stimuli, I κ B is phosphorylated, ubiquitinated, and degraded, thus allowing NF κ B to translocate to the nucleus where it can induce gene transcription by binding to specific promoter elements.¹⁷ Increased activation of NF κ B p65 has been reported in colonic biopsy specimens from patients with CD.^{14,15} Furthermore, administration of an antisense oligonucleotide against NF κ B p65 gave impressive results in two mice models of experimental colitis by inhibiting intestinal inflammation.¹⁶

Despite these promising new therapies, at present CD treatments are limited to aminosalicylates, corticosteroids, and immunosuppressants. Butyrate, which is produced by bacterial fermentation of dietary fibre, plays an

Abbreviations used in this paper: CD, Crohn's disease; IBD, inflammatory bowel disease; TNF, tumour necrosis factor; IL, interleukin; TNBS, trinitrobenzene sulphonic acid; LPS, lipopolysaccharide; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; LPMC, lamina propria mononuclear cells; NF κ B, nuclear factor kappa B; I κ B, inhibitor protein kappa B; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; TSA, trichostatin A.

Centre de Recherche en Nutrition Humaine, INSERM U539, CHU, Hôtel Dieu, and INRA, 44035 Nantes, France
J-P Segain†
D Raingeard de la Blétière†
A Bourreille
V Leray
L Ferrier
C Bonnet
H M Blottiere
J-P Galmiche

INSERM U 463, 9 quai Moncoussu, 44035 Nantes, France
N Gervois

Immunology Department, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Mexico DF, 04510, Mexico
C Rosales

†These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Professor J P Galmiche, Centre de Recherche en Nutrition Humaine, CRI INSERM 95-08, CHU, Hôtel Dieu, Place A Ricordeau, 44035 Nantes cedex 01, France. Email: galmiche@easynet.fr

Accepted for publication 4 April 2000

important physiological role in maintaining the health and integrity of the colonic mucosa.¹⁸ It provides the primary energy source for the colonic epithelium and also regulates epithelial cell proliferation and differentiation. Butyrate has been shown to reduce inflammation in experimental colitis induced in rats by trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)¹⁹ but no mechanism of action was proposed. In ulcerative colitis this effect was attributed to restoration of energy metabolism in colonocytes.²⁰ However, recent studies do not support this concept, at least regarding the primary nature of the deficiency.²¹ Conversely, other studies have demonstrated that butyrate exerts immunomodulatory effects, for example downregulation of T cell responses, induction of Th1 cell energy, and modulation of antigen presentation associated molecules.²²⁻²⁴

In this study we investigated if butyrate reduces inflammation in CD through an inhibitory effect on proinflammatory cytokine expression and the transcription factor NFκB.

Materials and methods

PATIENTS AND BIOPSIES

Seventeen patients with CD (nine males, eight females; aged 18–75 years) and six healthy controls (three males, three females; aged 27–65 years) were prospectively included. At the time of the study, four patients were receiving steroids, six 5-aminosalicylic acid, and one azathioprine. Six CD patients and all controls were not receiving any medication. All patients underwent endoscopy for medical reasons. Colonic biopsy specimens were obtained from inflamed and/or non-inflamed mucosa of patients with active or inactive CD. Mucosal biopsies were taken from control patients free of organic intestinal disease who underwent sigmoidoscopy or colonoscopy as part of a gastroenterological work up. All patients gave informed consent to take part in the study.

TISSUE CULTURE

Biopsies were cultured for 24 hours with or without butyrate (2 and 10 mM; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, L-glutamine, penicillin, streptomycin, and gentamycin. All tissue culture products were from Life Technologies (Cergy Pontoise, France). Supernatants and biopsies were recovered separately, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at –80°C for TNF assay or RNA isolation, respectively.

ISOLATION AND CULTURE CONDITIONS FOR LAMINA PROPRIA MONONUCLEAR CELLS

LPMC were isolated using the method of Bull and Bookman.²⁵ Biopsies were incubated in fetal calf serum free medium supplemented with 1 mM EGTA and 0.1% bovine serum albumin at 37°C for 30 minutes, and then with 100 U/ml of type VIII collagenase (Sigma) for another 30 minutes. After Ficoll density gradient, LPMC were cultured with or without 2 mM butyrate at 37°C for 24 hours. Supernatants and cells were recovered separately for cytokine assay and RNA isolation, respectively.

ISOLATION AND CULTURE CONDITIONS FOR PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

PBMC were isolated from heparinised blood by Ficoll density gradient. Cells (5×10^6) were cultured with or without 2.5 µg/ml of LPS (*Salmonella typhosa*, Sigma) for 24 hours. The medium was replaced by medium alone or supplemented with either LPS (2.5 µg/ml), butyrate (2 mM), or both, and incubated for another 20 hours. Trichostatin A (TSA 0.5 µM), a histone deacetylase inhibitor (kindly provided by Professor M Yoshida, Tokyo, Japan) was tested under the same conditions. Supernatants and cells were recovered for cytokine assay and RNA isolation, respectively.

IMMUNOFLUORESCENCE STAINING OF NFκB p65

In parallel experiments, PBMC or LPMC were cultured on coverglasses under the same conditions as described above. Cells were fixed for five minutes in –20°C methanol, air dried, and permeabilised for five minutes with phosphate buffered saline/0.3% Triton X-100. After saturation of non-specific binding sites with normal goat serum at 10 µg/ml in phosphate buffered saline, cells were incubated with anti-NFκB p65 (Rel A) polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) or normal rabbit IgG for one hour at room temperature followed by incubation with a fluorescein isothiocyanate conjugated goat antirabbit antibody (Caltag Laboratories) for one hour. After washes, the slides were mounted for fluorescence microscopy.

TNF ACTIVITY ASSAY

Biologically active total TNF-α/β was measured using the WEHI 164 clone 13 cell killing assay.²⁶ Concentrations of total TNF are expressed as pg/ml.

REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

Total RNA from biopsies, LPMC, and PBMC was isolated using TRIzol Reagent (Life Technologies). cDNA was generated on 1 µg of total RNA in a reaction volume of 20 µl, using M-MLV reverse transcriptase (RT; Life Technologies). PCR was performed in the linear range of amplification (determined for each primer pair-cDNA combination). Standard PCR reactions were performed with 1 µl of the cDNA solution, 50 µM of each primer solution, 10 mM of each dNTP, 25 mM MgCl₂, 10X Goldstar DNA polymerase reaction buffer, and 0.5 units of Goldstar DNA polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium). Each PCR cycle consisted of one minute at 92°C, one minute at 58°C, and one minute at 72°C.

The following sense/antisense primers (Genosys, Pampisford, UK) were designed to amplify cDNA fragments that span at least one intron of the corresponding gene: TNF-α: 5'-AAGCC TGTAGCCCATGTTGT-3' and 5'-CAGAT AGATGGGCTCATACC-3'; TNF-β: 5'-AAA CCTGCTGCTCACCTCATT-3' and 5'-TGG ATACACCATCTTCTGGG-3'; IL-1β: 5'-TG CCCGTCTTCCTGGGAGGG-3' and 5'-GG CTGGGGATTGGCCCTGAA-3'; IL-6: 5'-TA

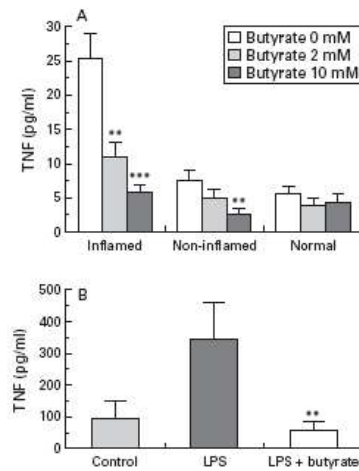


Figure 1 Effect of butyrate on tumour necrosis factor (TNF). Colonic biopsies (A) from inflamed ($n=14$) or non-inflamed ($n=15$) mucosa of patients with Crohn's disease or from normal ($n=6$) mucosa of healthy controls were cultured for 24 hours with or without 2 or 10 mM butyrate. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ v 0 mM. (B) Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ($n=7$) were cultured for 24 hours alone or in the presence of 2.5 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS) followed by 20 hours under the same conditions with or without 2 mM butyrate. Supernatant concentrations of total TNF were assessed by WEHI cell bioassay, and results are expressed as mean (SEM). ** $p<0.01$ v LPS.

GCCGCCACACAGACAG-3' and 5'-GGCTGGCATTGTGGTTGGG-3'; β -actin: 5'-GGCATCGTGTGGACTCCG-3' and 5'GC TGAAGGTGGACAGCGA-3'.

THP-1 TRANSFECTION

The plasmid 3XMHG-luc (a generous gift from Drs J Westwick and D A Brenner, University of North Carolina, Chapel Hill, USA) contained three copies of NF- κ B responsive elements from the MHC class I locus, placed upstream of the luciferase gene. Human monocytic THP-1 cells were transiently transfected as previously described²⁷ and cultured for four hours alone or with 2.5 μ g/ml LPS, 2 mM butyrate, or both. Luciferase activity was determined using a luminometer (Monolight 2010 Luminometer, Ann Arbor, Michigan, USA).

WESTERN BLOT ANALYSIS

THP-1 cells were stimulated for various periods of time with 2.5 μ g/ml LPS in the presence or absence of 2 mM butyrate. Cells were pelleted, washed, and homogenised in lysis buffer (10 mM Hepes, pH 7.9, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.6% NP-40, 0.5 mM PMSF, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 1 μ g/ml pepstatin) on ice. Homogenates were sonicated and centrifuged at 5000 rpm to remove cellular debris. Protein concentrations were determined by DC protein assay (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Samples (15 μ g of total protein)

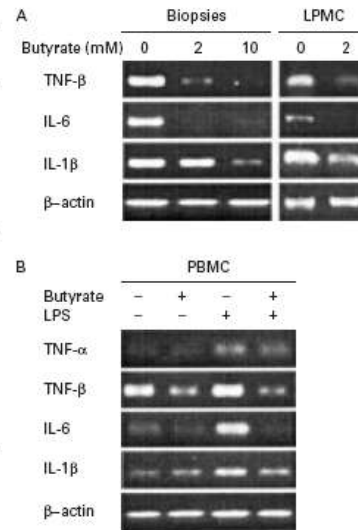


Figure 2 Effect of butyrate on proinflammatory cytokine mRNA. Biopsies and isolated lamina propria mononuclear cells (LPMC) (A) from inflamed mucosa of patients with Crohn's disease were cultured for 24 hours with or without 2 or 10 mM butyrate. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (B) were cultured for 24 hours alone or in the presence of 2.5 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS) and then for another 20 hour period under the same conditions with or without 2 mM butyrate. RNA was extracted and RT-PCR was performed using primers designed for interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumour necrosis factor (TNF)- β , TNF- α , and control β -actin.

were separated on a denaturing 12% polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane. IkB α protein was detected by chemiluminescence using a rabbit polyclonal antibody according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs, Hitchin, UK).

INDUCTION AND EVALUATION OF INFLAMMATION

Colitis was induced in Wistar rats ($n=20$) by infusing 30 mg of TNBS/40% ethanol into the distal colon. From the third day after TNBS instillation, rats were randomised to one of two groups ($n=10$ each) and treated daily with isotonic saline or 100 mM butyrate enemas for two weeks. Colonic damage was scored morphologically and histologically using semi-quantitative methods, as described previously.^{28, 29} Principles of laboratory animal care and guidelines according to the declaration of Helsinki were followed.

IMMUNOHISTOLOGY

The colon was removed from TNBS treated rats, and paraffin sections were prepared and stained with haematoxylin and eosin. Immunostaining for colon paraffin sections was performed using a monoclonal antibody to the p65 subunit specific to the activated form of NF- κ B, according to the manufacturer's instructions (Boehringer Mannheim).

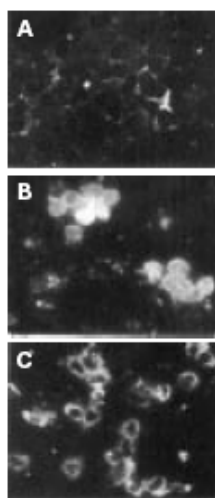


Figure 3 Effect of butyrate on nuclear translocation of nuclear factor kappa B (NFκB). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (A) unstimulated, (B) lipopolysaccharide (LPS) stimulated, or (C) LPS stimulated and treated with 2 mM butyrate. The intracellular location of NFκB p65 (RelA) was determined by immunofluorescence using an anti-NFκB p65 polyclonal antibody. Magnification, $\times 400$.

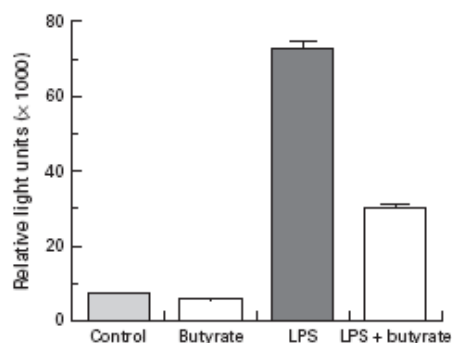


Figure 4 Effect of butyrate on nuclear factor kappa B (NFκB) transcriptional activity. THP-1 cells were transiently transfected with the NFκB reporter plasmid 3XMHC-luc and cultured alone or in the presence of 2.5 μg/ml lipopolysaccharide (LPS), with or without 2 mM butyrate for four hours. Luciferase activity was then determined. Data are mean (SEM) of four experiments.

STATISTICAL ANALYSIS

TNF concentrations are expressed as mean (SEM) and were compared using the Student's *t* test (normal distribution) or Wilcoxon's test for paired samples. One way ANOVA was used to analyse the dose effect of butyrate on TNF concentrations.

Results

EFFECT OF BUTYRATE ON CYTOKINE PRODUCTION
Biopsies from inflamed mucosa produced higher levels of TNF (as well as IL-1β and IL-6, data not shown) than those from non-inflamed or normal mucosa (fig 1A). In the presence of butyrate, TNF levels decreased dose dependently in both inflamed ($p=0.0001$) and non-inflamed ($p=0.0153$) biopsies. With 10 mM butyrate, TNF levels (as well as IL-6 and, less consistently, IL-1β) returned to control values. Similarly, 2 mM butyrate strongly inhibited LPS induced TNF production by PBMC in both CD patients and control subjects (fig 1B). No significant toxicity or apoptosis (Annexin V/propidium iodide cytometric analysis) was noted in PBMC treated with butyrate concentrations up to 6 mM (data not shown).

EFFECT OF BUTYRATE ON CYTOKINE mRNA EXPRESSION

RT-PCR analysis revealed increased mRNA levels for TNF-β, IL-1β, and IL-6 in biopsies from inflamed areas and isolated LPMC (fig 2A). As reported by Isaacs and colleagues,³⁰ TNF-α was scarcely or not detected in ethidium bromide stained gels. Butyrate reduced mRNA cytokine expression dose dependently in both biopsies and isolated LPMC (fig 2A). Subsequent studies of the effect of butyrate on the LPS induced inflammatory response of PBMC showed that LPS stimulated TNF-α, TNF-β, IL-1β, and IL-6 mRNA expression (fig 2B). Butyrate treatment resulted in reduction or inhibition of LPS stimulated expression of cytokine mRNAs.

EFFECT OF BUTYRATE ON NFκB ACTIVATION

In unstimulated cells, NFκB p65 was detected mainly in the cytoplasm (fig 3A). Stimulation of PBMC with LPS induced translocation of

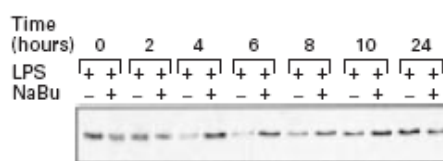


Figure 5 Effect of butyrate on inhibitor protein kappa Bα (IκBα) expression. THP-1 cells were stimulated for various periods of time with 2.5 μg/ml lipopolysaccharide (LPS), in the presence or absence of 2 mM butyrate. Cell lysates were subjected to western blot analysis of IκBα.

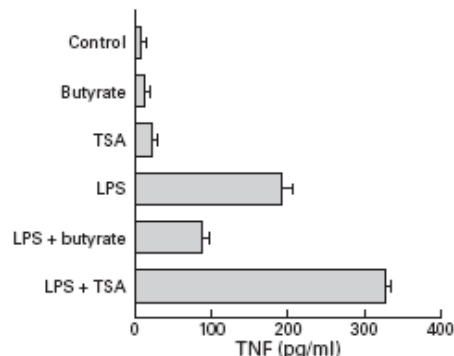


Figure 6 Comparison of the effects of butyrate and trichostatin A (TSA) on production of tumour necrosis factor (TNF). Peripheral blood mononuclear cells were cultured for 24 hours alone or in the presence of 2.5 μg/ml lipopolysaccharide (LPS) followed by 20 hours under the same conditions with or without 2 mM butyrate or 0.5 μM/ml of the histone deacetylase inhibitor TSA. Supernatant concentrations of total TNF were assessed by WEHI cell bioassay, and the results are expressed as mean (SEM) of three experiments.

NFκB p65 from the cytoplasm to the nucleus (fig 3B), which was inhibited by butyrate (fig 3C). Similar results were obtained when immunofluorescence was performed on LPMC and frozen sections of cultured CD biopsies (data not shown). In THP-1 monocytes transfected with an NFκB/luciferase reporter plasmid, butyrate inhibited LPS induced luciferase activity and thus NFκB driven reporter gene transcription (fig 4).

EFFECT OF BUTYRATE ON IκBα PROTEIN LEVELS

As butyrate inhibited LPS induced NFκB activation, we wished to determine if this effect was mediated by inhibition of IκBα degradation, the NFκB inhibitory protein. Western blot analysis of total THP-1 cell protein extracts showed a decrease in IκBα levels only four hours after stimulation with LPS (fig 5). In the presence of butyrate, this effect was abolished and IκBα levels were stable throughout the period of stimulation with LPS.

Similar results were obtained with PBMC and LPMC of CD patients (data not shown).

COMPARISON OF BUTYRATE AND TRICHOSTATIN A EFFECTS ON TNF PRODUCTION

Butyrate may affect gene expression by inhibiting histone deacetylase.^{31, 32} Thus the effect of butyrate on TNF production by LPS stimulated PBMC was compared with that of the histone deacetylase inhibitor TSA. Contrary to the inhibitory effect observed with butyrate,

TSA treatment of unstimulated or LPS stimulated PBMC increased TNF production (fig 6).

IN VIVO EFFICACY OF BUTYRATE

As reported by our group³³ and others,¹⁹ butyrate enemas in rats with experimental colitis induced by rectal instillation of TNBS decreased inflammation (MPO activity, data not shown) and stimulated mucosal repair (fig 7A, B). In organ cultures, colonic segments from TNBS inflamed rats produced high levels of TNF which were decreased by butyrate treatment (data not shown). We then explored the efficacy of butyrate enemas by monitoring the effect on NFκB activation in the colonic mucosa of rats with TNBS induced colitis. A monoclonal antibody specific for the activated form of NFκB p65 was used for immunofluorescence staining of colonic sections. Numerous infiltrates of intensely labelled immune cells were detected in rats receiving saline

enemas (fig 7C), and activated NFκB p65 was also detected in epithelial cells (fig 7C). Conversely, a marked reduction in both infiltrating cells and activated NFκB p65 staining was observed in rats receiving butyrate enemas (fig 7D).

Discussion

We have demonstrated for the first time that butyrate inhibits inflammatory responses in CD by inhibition of NFκB activation in immune cells.

High levels of circulating and mucosal proinflammatory cytokines are a characteristic feature of CD.^{1,2} We confirmed that intestinal biopsies as well as isolated LPMC obtained from inflamed mucosa of CD patients secrete significantly more IL-1β, IL-6, and TNF than normal controls.^{7,34,35} Our main finding was that butyrate had a dose dependent effect in decreasing TNF secretion in both inflamed and non-inflamed tissues. Interestingly, with 10 mM butyrate, TNF levels returned to control values. Similar results were observed for IL-6 and, although less consistently, for IL-1β (data not shown). Although intestinal epithelial cells can secrete proinflammatory cytokines, we focussed on immune cells which are the main effectors of the inflammatory response in CD. We then determined that butyrate decreased proinflammatory cytokine production by downregulating mRNA expression in both intestinal biopsies and LPMC.

To elucidate the mechanism of action of butyrate, we designed experiments mimicking the inflammatory states of biopsies or isolated LPMC from CD patients. Circulating bacterial LPS may contribute to monocyte activation in patients with CD³⁶ and it is well established that monocytes secrete a host of cytokines in response to LPS, including TNF, IL-1β, and IL-6. As expected, LPS stimulation resulted in increased TNF secretion by PBMC, an effect abolished by butyrate. Similarly, butyrate decreased mRNA expression of proinflammatory cytokines by PBMC in response to LPS.

The decrease in cytokine mRNA expression prompted us to examine the effect of butyrate on the key transcription factor NFκB, which is implicated in the regulation of a variety of genes during immune and inflammatory responses,¹⁷ including those encoding TNF, IL-1, and IL-6. Moreover, it has been shown that NFκB activation is increased in the colonic mucosa of CD patients. The active form of NFκB is present in the cytoplasm of resting cells bound to inhibitory protein of the IκB family. Activation of NFκB by inflammatory cytokines or LPS requires IκB degradation thus allowing NFκB to translocate to the nucleus. In PBMC and LPMC of CD patients, butyrate inhibited nuclear translocation of NFκB, an effect associated with an increase in IκB levels observed in western blot experiments. We further investigated the effect of butyrate on NFκB transcriptional activity using monocytic THP-1 cells transfected with an NFκB/luciferase reporter plasmid. In this system, luciferase gene expression was exclusively controlled by NFκB, and it was also

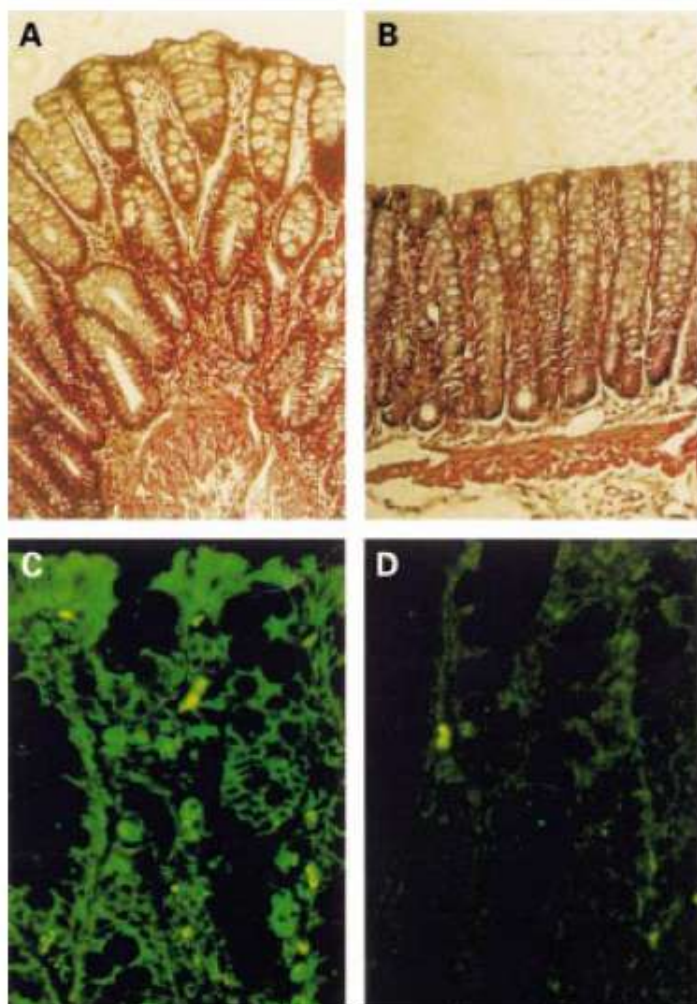


Figure 7 Effects of butyrate treatment on established colitis. Haematoxylin and eosin stained (A, B) paraffin sections of colon of rats with trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) induced colitis receiving isotonic saline (A) or 100 mM butyrate (B) enemas for two weeks. Magnification, $\times 200$. Immunofluorescence staining (C, D) of paraffin sections of colon of rats with TNBS induced colitis receiving isotonic saline (C) or 100 mM butyrate (D) with a monoclonal antibody specific to the activated form of nuclear factor kappa B. Magnification, $\times 300$.

determined that butyrate inhibited NF κ B driven luciferase gene transcription. Moreover, in parallel experiments, western blots of THP-1 cell extracts showed that this effect was mediated through stabilisation of I κ B α levels, probably by inhibiting its degradation. Taken together, these results provide convincing evidence that butyrate downregulates inflammatory responses through inhibition of NF κ B. The mitogen activated protein kinase family is involved in activation of I κ B kinases (IKK- α and - β), which in turn can activate NF κ B by phosphorylating I κ B.³⁷ It would be interesting to determine if butyrate interferes with the LPS induced I κ B phosphorylation pathway. Butyrate may also regulate gene expression through inhibition of histone deacetylase.^{31,32} However, this seems unlikely as TSA, a histone deacetylase inhibitor, did not block TNF production or affect NF κ B translocation to the nucleus. It has recently been reported that butyrate also inhibits NF κ B activation³⁸ and increases I κ B β levels^{38,39} in vitro in intestinal epithelial cell lines.

The relevance of NF κ B inhibition in IBD was further demonstrated by treatment of TNBS induced colitis with a NF κ B antisense oligonucleotide which produced a marked reduction in inflammation and downregulation of proinflammatory cytokine expression.¹⁶ In our experimental model of colitis, butyrate treatment also improved inflammation and markedly reduced NF κ B activation. Using a specific monoclonal antibody, the active form of NF κ B was localised in immune cells as well as intestinal epithelial cells. With the same antibody, Rogler and colleagues¹⁵ also reported NF κ B activation in macrophages and epithelial cells in biopsy specimens from inflamed mucosa of patients with CD. Although it is difficult to extrapolate from in vitro to in vivo conditions, NF κ B has also been identified as a major target for several active drugs known to be effective in CD and other inflammatory disorders.^{40,41}

At present, treatment of CD is limited to aminosalicylates, corticosteroids, and immunosuppressants. The anti-inflammatory properties of butyrate described in the present study offer an interesting alternative approach for the treatment of CD. Indeed, downregulation of TNF is of major therapeutic interest in CD, as demonstrated by the marked improvement following administration of monoclonal antibodies to TNF in CD patients resistant to steroids.¹¹ Furthermore, Schreiber *et al* recently reported that secretion of TNF- α may be predictive of relapses in CD.⁴² In contrast, the importance of TNF- β in IBD has also been emphasised recently in experimental murine models of colitis.⁴³ Another interesting aspect of TNF- α and TNF- β modulation is that these cytokines not only have an inflammatory role but are also involved in Th1 immune responses.⁴⁴ Neutralisation of TNF- α by antibody therapy caused inhibition of Th1 responses in CD patients.⁴⁵ The capacity of butyrate to downregulate TNF- α /- β expression indicates that it may also regulate Th1 immune responses in CD. Interestingly, butyrate is

reported to induce anergy in Th1 cells.²³ Finally, we have found that butyrate also stimulates anti-inflammatory/type 2 cytokines (for example, IL-10) and downregulates type 1 cytokines (for example, interferon γ) (unpublished data). As it now seems well established that a Th1 driven immune process is involved in CD whereas a Th2-like process is involved in ulcerative colitis, butyrate therapy may be indicated more in CD than in ulcerative colitis.

In conclusion, the benefit of butyrate has already been reported in diseases such as haemoglobinopathies or urea cycle disorders, giving few or no side effects.^{46,47} In both disorders, butyrate was administered intravenously. In contrast, in ulcerative colitis, butyrate enemas have not always provided convincing results. Its effect on immune cells by this method may not be optimal. Further studies should also be conducted to determine how butyrate can best be administered in IBD, particularly in CD.

- 1 Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997;92:5-118.
- 2 Brynskov J, Nielsen OH, Ahnfelt-Ronne I, *et al*. Cytokines (immunoinflammatory hormones) and their natural regulation in inflammatory bowel disease (Crohn's disease and ulcerative colitis): a review. *Dig Dis* 1994;12:290-304.
- 3 Plevy SE, Targan SR, Deem RL, *et al*. Increased mucosal TNF- α levels and numbers of TNF- α producing cells are unique to Crohn's disease mucosal inflammation. *Gastroenterology* 1995;106:A754.
- 4 Brøgger CP, Nicholls S, Murch SH, *et al*. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992;339:89-91.
- 5 Murch SH, Lamkin VA, Savage MC, *et al*. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1991;32:913-17.
- 6 Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, *et al*. Tumour necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994;106:1455-66.
- 7 Noguchi M, Hiwatashi N, Liu Z, *et al*. Secretion imbalance between tumour necrosis factor and its inhibitor in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;43:203-9.
- 8 Bouma G, Oudkerk Pool M, Scharenberg JG, *et al*. Differences in the intrinsic capacity of peripheral blood mononuclear cells to produce tumour necrosis factor alpha and beta in patients with inflammatory bowel disease and healthy controls. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:1095-100.
- 9 Camma C, Giunta M, Rosselli M, *et al*. Mesalazine in the maintenance treatment of Crohn's disease: a meta-analysis adjusted for confounding variables. *Gastroenterology* 1997;113:1465-73.
- 10 Brennan FM, Feldmann M. Cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:872-7.
- 11 Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, *et al*. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997;337:1029-35.
- 12 Stack WA, Mann SD, Roy AJ, *et al*. Randomised controlled trial of CDP571 antibody to tumour necrosis factor-alpha in Crohn's disease. *Lancet* 1997;349:521-4.
- 13 Elliot MJ, Maini RN, Feldmann M, *et al*. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994;344:1105-10.
- 14 Schreiber S, Nikolaus S, Harpe J. Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42:477-84.
- 15 Rogler G, Brand K, Vogl D, *et al*. Nuclear factor kappa B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998;115:357-69.
- 16 Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH, *et al*. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 1996;2:998-1004.
- 17 Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-83.
- 18 Scheppach W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut* 1994;35(suppl 1):S35-8.
- 19 Butzner JD, Parmar R, Bell CJ, *et al*. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. *Gut* 1996;38:568-73.
- 20 Roediger WEW. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease. *Lancet* 1980;2:712-15.

- 21 Den Hond E, Hiele M, Evenepoel P, *et al.* In vivo butyrate metabolism and colonic permeability in extensive ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1998;115:584-90.
- 22 Böhmig GA, Krieger PM, Saemann MD, *et al.* n-butyrate downregulates the stimulatory function of peripheral blood-derived antigen-presenting cells: a potential mechanism for modulating T-cell responses by short-chain fatty acids. *Immunology* 1997;92:234-43.
- 23 Gilbert KM, Weigle WO. Th1 cell anergy and blockade in G1a phase of the cell cycle. *J Immunol* 1993;151:1245-54.
- 24 Siowshian S, Blottiere HM, Bentoumou N, *et al.* Butyrate enhances major histocompatibility complex class I, HLA-DR and ICAM-1 antigen expression on differentiated human intestinal epithelial cells. *Eur J Clin Invest* 1996;26:803-10.
- 25 Bull DM, Bookman MA. Isolation and functional characterization of human intestinal mucosal lymphoid cells. *J Clin Invest* 1977;59:966-74.
- 26 Espevik T, Nissen-Meyer J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 1986;95:99-105.
- 27 Rosales C, Juliano R. Integrin signaling to NF- κ B in monocytic leukemia cells is blocked by activated oncogenes. *Cancer Res* 1996;56:2302-5.
- 28 Morris GP, Beck PL, Herridge MS, *et al.* Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96:795-803.
- 29 Barbier M, Cherbut C, Aube AC, *et al.* Elevated plasma leptin concentrations in early stages of experimental intestinal inflammation in rats. *Gut* 1998;43:783-90.
- 30 Isaacs KL, Sartor RB, Haskill S. Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology* 1992;103:1587-95.
- 31 Kruh J, Tichonicky L, Defer N. Effect of butyrate on gene expression. In: Binder HJ, Cummings J, Soergel KH, eds. *Short chain fatty acids*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994: 135-47.
- 32 Ohno Y, Lee J, Fusunyan RD, *et al.* Macrophage inflammatory protein-2: chromosomal regulation in rat small intestinal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10279-84.
- 33 Xing JH, Cherbut C, Joubert M, *et al.* Short chain fatty acid propionate and the role of β -oxidation of butyrate in rat experimental colitis. *Gastroenterology* 1998;114:A1118.
- 34 Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, *et al.* Increased production of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut* 1996;39:684-9.
- 35 Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, *et al.* Enhanced secretion of tumour necrosis factor- α , IL-6, and IL-1 β by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993;94:174-81.
- 36 Balclassano RN, Schreiber S, Johnston RB Jr, *et al.* Crohn's disease monocytes are primed for accentuated release of toxic oxygen metabolites. *Gastroenterology* 1993;105:60-6.
- 37 May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF- κ B. *Immunol Today* 1998;19:80-8.
- 38 Wu GD, Huang N, Wen X, *et al.* High-level expression of I κ B α in the surface epithelium of the colon: in vitro evidence for an immunomodulatory role. *J Leukoc Biol* 1999;66:1049-56.
- 39 Andoh A, Fujiyama Y, Hata K, *et al.* Counter-regulatory effect of sodium butyrate on tumour necrosis factor- α (TNF- α)-induced complement C3 and factor B biosynthesis in human intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 1999;118:23-9.
- 40 Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994;265:956-9.
- 41 Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, *et al.* Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 1995;270:286-90.
- 42 Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J, *et al.* Tumour necrosis factor α and interleukin-1 β in relapse of Crohn's disease. *Lancet* 1999;353:459-61.
- 43 Mackay F, Browning JL, Lawton P, *et al.* Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis. *Gastroenterology* 1998;115:1464-75.
- 44 Ruddle NH. Tumor necrosis factor (TNF- α) and lymphotoxin (TNF- β). *Curr Opin Immunol* 1992;4:327-32.
- 45 Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, *et al.* A role for TNF- α and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* 1997;159:6276-82.
- 46 Perrine SP, Ginder GD, Faller DV, *et al.* A short-term trial of butyrate to stimulate fetal-globin-gene expression in the beta-globin disorders. *N Engl J Med* 1993;328:81-6.
- 47 Maestri NE, Brusilow SW, Clissold DB, *et al.* Long-term treatment of girls with ornithine transcarbamylase deficiency. *N Engl J Med* 1996;335:855-9.

V.4. “ Le butyrate inhibe spécifiquement la réponse immune de type Th1”

V.4.1. Résumé

La réponse inflammatoire chronique dans la maladie de Crohn est associée au dérèglement de la balance des cytokines pro-inflammatoires/Th1 et anti-inflammatoires/Th2 en faveur d'un phénotype Th1. Compte tenu des propriétés anti-inflammatoires du butyrate, nous avons voulu évaluer ses propriétés immunomodulatrices sur la réponse à médiation Th1.

Méthodes: Les effets du butyrate ont été déterminés sur des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) stimulés au LPS ainsi que sur des lignées Th1 et Th2 obtenues à partir de PBMC ou de cellules mononucléées isolées à partir de la *lamina propria* (LPMC). Le profil des cytokines obtenues en présence ou non de butyrate, a été évalué par ELISA, cytométrie en flux, et RT-PCR. Les effets du butyrate sur les facteurs de transcription NF- κ B ou cAMP responsive element-binding protein (CREB) ont été analysés par immunofluorescence.

Résultats: Dans les PBMC stimulés par le LPS, le butyrate diminuait l'expression de l'IL-12 via une inhibition du facteur NF- κ B, alors qu'il augmentait l'expression de l'IL-10 via une activation de CREB. De plus, la présence de butyrate dans des conditions de culture conduisant à une différenciation Th1, empêchait le développement vers un phénotype de type Th1 (producteur d'IFN- γ), mais induisait un phénotype producteur d'IL-10. De manière intéressante, le traitement par le butyrate de cellules CD4⁺ différenciées en un phénotype Th1 ou Th2 affectait sélectivement les cellules Th1 en inhibant leur production d'IFN- γ et stimulant leur production d'IL-10. La présence de butyrate pendant la culture de lignées cellulaires Th1 obtenues à partir de LPMC de patients atteints de la MC, induisait un

changement de leur phénotype vers un phénotype Th2. Finalement, le butyrate augmentait l'expression du récepteur à l'IL-10 à la surface de PBMC stimulés au LPS, potentialisant ainsi les effets inhibiteurs de l'IL-10 sur la production de TNF.

Conclusions: Nos résultats montrent que le butyrate inhibe de manière sélective l'inflammation à médiation Th1, montrant ainsi qu'il serait tout particulièrement adapté pour le traitement de la MC.

V.4.2. Manuscrit : en cours.

Butyrate selectively inhibits Th1-mediated inflammatory response.

Short Title: Butyrate inhibits Th1-mediated inflammation.

Diane Raingeard de la Blétière, Arnaud Bourreille, Nadine Gervois ¹, Marie Doubremelle, Jean-Paul Galmiche and Jean-Pierre Segain.

INSERM U539, CHU, Hôtel Dieu, Place A Ricordeau, 44035 Nantes cedex 01, France.

¹ INSERM U463, 9 quai Moncoussu, 44035 Nantes, France.

Abbreviations: CD, Crohn's disease; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; LPMC, lamina propria mononuclear cells; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; CREB, cAMP responsive element-binding protein.

Corresponding author: Dr. Jean-Pierre Segain,

INSERM U539, CHU, Hôtel Dieu, 1 Place Alexis Ricordeau, 44035 Nantes cedex 01, France.

Tel. 33 (0) 2-40-08-75-05 Fax: 33 (0) 2-40-08-75-06

e-mail: Jean-Pierre.Segain@sante.univ-nantes.fr

Abstract

Background & Aims: In Crohn's disease, intestinal inflammation is characterized by a Th1 immune response. It has been demonstrated that butyrate displays important immunoregulatory properties. The aim of the study was to investigate whether butyrate could regulate Th1-mediated inflammation.

Methods: The effect of butyrate was assessed using lipopolysaccharide (LPS)-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and Th1 and Th2 cell lines derived from PBMC or lamina propria mononuclear cells (LPMC). Cytokine profiles were evaluated by ELISA, flow cytometry, and RT-PCR. The effect of butyrate on NF- κ B and CREB transcription factors was examined by immunofluorescence.

Results: In LPS-stimulated PBMC, butyrate downregulated IL-12 expression by inhibiting NF- κ B whereas it upregulated IL-10 expression by activating CREB. Moreover, the presence of butyrate during Th1-driving culture conditions skewed IFN- γ -producing cells toward IL-10 production. Interestingly, butyrate treatment of Th1/Th2-polarized cells affected Th1 cells selectively by inhibiting IFN- γ -producing cells and stimulating IL-10-producing cells. Butyrate treatment of Th1 cell lines derived from LPMC of CD patients resulted in a switch toward a Th2 phenotype. Finally, upregulation of the IL-10 receptor by butyrate potentiated the inhibitory effect of IL-10 on TNF production by LPS-stimulated PBMC.

Conclusion: Our results, which show that butyrate selectively inhibits Th1-mediated inflammation, provide a rationale for butyrate treatment in CD.

Introduction

The immune system is controlled essentially by a balance among cytokines. The presence of distinct cytokine combinations during T-cell activation leads to T-helper (Th) 1 or Th2 immune responses¹. Thus, interleukin (IL)-12 drives Th1 differentiation characterized by T-cell secretion of interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α/β , whereas Th2 response takes place in the presence of IL-4, leading to the release of large amounts of IL-4, IL-5 and IL-10. A shift in the balance of these two cytokines appears to be an important element in the generation or correction of immune responses. However, in the intestinal immune system, Th1 responses seem to be controlled by two regulatory subpopulations that produce high levels of transforming growth factor (TGF)- β (Th3 T cells) or IL-10 (Tr1 T cells) rather than IL-4^{2,3}.

An imbalance in Th1 and Th2 subsets and in their derived cytokines seems to be involved in the pathogenesis of Crohn's disease (CD), a major inflammatory bowel disease (IBD). Immunological observations and histopathological data support the concept that Th1 response, characterized by high mucosal production of IFN- γ , TNF and IL-12, is responsible for chronic intestinal inflammation in CD⁴⁻⁶. Animal models of intestinal inflammation have provided insight into the pathogenesis of CD, leading to new therapeutic approaches for this disease. An interesting alternative approach would be to control the Th1 immune response, as already reported in many immunopathological situations such as autoimmune diseases in which manipulation of Th1/Th2 reactions is currently an area of active research⁷.

Butyrate, a short-chain fatty acid produced by bacterial fermentation of dietary fibers, plays an important physiological role in maintaining the health and integrity of the colonic mucosa⁸. Our group and others have reported that butyrate displays immunoregulatory properties, including modulation of antigen presentation, induction of Th1 cell clone anergy

and regulation of cytokine production⁹⁻¹¹. Our recent work showed that butyrate has important anti-inflammatory properties¹². It strongly reduced pro-inflammatory cytokine expression by lamina propria mononuclear cells (LPMC) from CD patients, mainly by inhibiting the transcription factor NF- κ B. Our experiments also showed that butyrate is able to reduce intestinal inflammation and NF- κ B activation in rats with trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis, an experimental model of CD also characterized by a Th1-mediated inflammation.

The present study investigated whether butyrate regulates Th1-type mediated inflammation. Our results indicate that butyrate modulates IL-12/IL-10 balance by regulating activation of two transcription factors, NF- κ B and cAMP responsive element-binding protein (CREB). In addition, it selectively switches the phenotype of Th1-polarized cells to an IL-10 producing phenotype. Of therapeutic interest, treatment of Th1 cell lines derived from inflamed intestinal mucosa of CD patients resulted in a switch toward a Th2 phenotype.

Materials and Methods

Isolation and culture conditions for peripheral blood mononuclear cells.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized blood of healthy volunteers by Ficoll (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) density gradient and cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. All tissue culture products were from Life Technologies (Cergy Pontoise, France).

Cells (5×10^6) were cultured in 6-well plates with or without 2.5 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) (*Salmonella typhosa*; Sigma) for 24 h. The medium was then replaced by medium alone or supplemented with LPS (2.5 µg/ml), or butyrate (0.5 mM; Sigma), or both. Cells were incubated for another 20 h period, and supernatants were recovered for IL-10 and IL-12 detection using an ELISA kit (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France) according to the manufacturer's instructions. At the same time, RNA was isolated from cells for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis.

In other experiments, PBMC (5×10^6) were cultured in 6-well plates with or without 0.5 mM butyrate under the following Th1-type polarizing conditions: PHA (1 µg/ml; Sigma), IL-12 (2.5 ng/ml) and neutralizing anti-IL-4 antibody (200 ng/ml; R&D Systems, Abingdon, Oxon, UK) for 3 days. The cytokine expression pattern was analyzed by RT-PCR and ELISA.

The effect of butyrate on IL-10 receptor (IL-10R) expression was analyzed by RT-PCR using RNA isolated from PBMC treated for 24 h with butyrate (0, 0.125, 0.25 and 0.5 mM). Butyrate-treated cells were then pre-incubated for 1 h in the presence of 5 µg/ml anti-human IL-10 receptor mouse monoclonal antibody (R&D systems) or isotype control mouse IgG (5 µg/ml), before addition of LPS (2.5 µg/ml) and IL-10 (5 ng/ml) (PeproTech

Inc., Tebu, Le Perray en Yvelines, France), for another 24 h period. TNF was measured in supernatants using the WEHI 164 clone 13-cell killing assay¹³.

Isolation and Th1/Th2 differentiation of CD4⁺ T cells.

PBMC (10^8) were incubated for 1 h at 4°C with an anti-CD4 mAb (Bioatlantic, Nantes, France) diluted in PBS/0.1% BSA to a final concentration of 10 µg/ml. After two washes in PBS/0.1% BSA, cells were incubated with goat anti-mouse IgG-coupled dynabeads (4×10^8 Dynabeads/ml) (Dynal, Oslo, Norway) for 4 h at 4°C under gentle rotation. CD4⁺ T cells were then isolated from the bead/cell mixture by exposure to a magnetic field using a magnetic particle concentrator (Dynal). By this technique, CD4⁺ T cells preparations were 90 to 95% pure. Cells were then cultured under Th1-polarizing conditions with PHA (1 µg/ml), IL-12 (2.5 ng/ml) and anti-IL-4 neutralizing Ab (200 ng/ml), or under Th2-polarizing conditions with PHA (1 µg/ml), IL-4 (5 ng/ml) and anti-IL-12 neutralizing Ab (200 ng/ml) for 4 days. Cells were then expanded in medium containing IL-2 (40 U/ml) (PeproTech Inc., Tebu) with or without 0.5 mM butyrate for 4 more days. The cytokine expression pattern was analyzed by flow cytometry, RT-PCR and ELISA.

Isolation and culture conditions for lamina propria mononuclear cell lines.

Six patients with active CD gave their informed consent to take part in the study. All underwent endoscopy in the department for medical reasons, and none were receiving medication at the time of the study. Colonic biopsy specimens were obtained from inflamed mucosa. LPMC were isolated by the method of Bull and Bookman¹⁴, as previously described¹². Briefly, biopsies were incubated in FCS-free medium supplemented with 1 mM EGTA and 0.1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma) at 37°C for 30 min, followed by 100 U/ml of type VIII collagenase (Sigma) for another hour. After Percoll density gradient,

LPMC (10^5 /well in a 96-well plate) were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 8% human AB serum (Institut Jacques Boy, Reims, France), 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 1.1 μ g/ml amphotericin and 10 μ g/ml gentamycin supplemented with IL-2 (150 U/ml), ConA (1 μ g/ml) and PHA (1 μ g/ml) in the presence or absence of 0.5 mM butyrate at 37°C for one week. Cell lines were then expanded (3×10^4) in complete medium in the presence of 10^5 irradiated allogeneic PBMC (3,500 rad) and 10^4 irradiated EBV-transformed-B-LAZ cell line (7,000 rad) as previously described¹⁵. The cytokine expression pattern was analyzed by flow cytometry and RT-PCR.

Cytokine immunoassay.

For ELISA, cells (except LPS-stimulated PBMC) were stimulated (10^5 /well in a 96-well plate) with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (1 μ g/ml; Sigma) for 24 h. Supernatants were recovered for IL-10 and IFN- γ dosage using an ELISA kit (BD Pharmingen) according to the manufacturers' instructions.

Immunofluorescence staining of NF- κ B p65 and phospho-CREB.

PBMC were cultured on cover glasses in the presence of LPS (2.5 μ g/ml) and/or butyrate (0.5 mM) for 30 min and Immunofluorescence staining was performed as previously described¹², but with slight modifications. Cells were fixed for 5 min in -20°C methanol, air-dried and permeabilized for 5 min with TBS (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl)/0.1% Triton X-100 (TBST). After saturation of non-specific binding sites with normal goat serum at 10 μ g/ml in TBST/5% BSA, cells were incubated with anti-NF- κ B p65 (Rel A) monoclonal antibody (Roche, Mannheim, Germany) or anti-phospho-CREB polyclonal antibody (New England Biolabs, OZYME, Saint Quentin en Yvelines, France), or control IgG overnight at 4°C. NF- κ B staining was revealed by 1 h incubation with a biotin-conjugated goat anti-mouse

antibody (Santa Cruz, Tebu, Le Perray en Yvelines, France) followed by FITC-conjugated streptavidin (Chemicon, Temecula, CA) for another hour. CREB staining was revealed by 1 h incubation with Cy3-conjugated donkey anti-rabbit antibody (Beckman Coulter, Villepinte, France). After washes with TBST, slides were mounted for fluorescence microscopy.

Flow cytometry.

Cells were collected and restimulated with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (1 µg/ml) for 4 h. Brefeldin A (10 µg/ml; Sigma) was added during the last 2 h. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and permeabilized with phosphate-buffered saline/0.1% BSA/0.1% saponin (Sigma). Permeabilized cells were then stained with FITC-labeled anti-IFN-γ mAb and PE-labeled anti-IL-4 mAb (BD Pharmingen). After 1 h incubation, cells were washed twice and analyzed on a FACScan[®] flow cytometer using the Cell Quest software (Becton Dickinson).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RT-PCR analyses were performed as previously described¹². Briefly, total RNA was isolated using TRIzol Reagent[™] (Life Technologies). One microgram of total RNA was reverse transcribed in a reaction volume of 20 µl using random primers (Pharmacia, France) and the Superscript II murine Moloney leukemia virus reverse transcriptase, according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). PCR was done in the linear range of amplification (determined for each primer pair-cDNA combination). PCR cycles were: 35 for IFN-γ, IL-12 and IL-10R; 28 for IL-10; and 21 for β-actin. Standard PCR reactions were performed in a 50 µl volume containing 1 µl of the cDNA solution, 1 µl of each primer solution (50 µM), 1 µl of dNTP solution (10 mM each), 3 µl of MgCl₂ (25 mM), 5 µl of 10X Goldstar DNA polymerase reaction buffer, and 0.1 µl (0.5 units) of Goldstar DNA

polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium). Each PCR cycle consisted of 1 min at 92 °C, 1 min at 58 °C and 1 min at 72 °C. The following sense/antisense primers (Genosys, Pampisford, UK) were designed to amplify cDNA fragments:

IFN- γ : 5'-TCGTTTTGGGTTCTCTTGGC-3' and 5'-GCAGGCAGGACAACCATTAC-3';

IL-10: 5'-CTGAGAACCAAGACCCAGACATCAAGG-3' and 5'-CAATAAGGTTTCTCAAGGGGCTGG-3';

IL-12p40: 5'-CATTCGCTCCTGCTGCTTCAC-3' and 5'-ATGAGGAACAACAGGGGAGAC-3';

IL-10R: 5'-GAGAGTTCTGTGTCCAGG-3' and 5'-CTATTGCTGCTGCCACTACTGC-3';

β -actin: 5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3' and 5'-GCTGGAAGGTGGACAGCGA-3'.

Statistical analysis

Differences between groups were compared by using either the Wilcoxon signed rank test (non-normally distributed data) or the Student *t* test. One way ANOVA was used for comparison between multiple groups.

Results

Butyrate inhibits LPS-induced Th1-type response through NF- κ B inhibition.

As LPS is a potent inducer of Th1-type response, the effect of butyrate was analyzed on LPS-stimulated PBMC. As expected, LPS stimulation increased production of the Th1-driven cytokine, IL-12 (Figure 1a), which was then decreased by butyrate treatment of PBMC. RT-PCR analysis also showed that butyrate downregulated LPS-stimulated IL-12 mRNA expression (Figure 1b). As IL-12 gene promoter contains binding sites for NF- κ B transcription factor¹⁶, it seemed likely that butyrate blockade of IL-12 expression was correlated with an inhibitory effect of NF- κ B activation. The cellular localization and activation of NF- κ B were studied by immunofluorescence staining using an antibody directed to the active form of NF- κ B^{12,17}. Very weak staining was detected in unstimulated PBMC, indicating that the epitope recognized by the antibody was masked by binding of the inhibitory protein I- κ B (I- κ B) to NF- κ B (Figure 1c). Butyrate treatment did not affect this staining. LPS-stimulation of PBMC resulted in highly increased staining of the activated form of NF- κ B in the nucleus, indicating its dissociation from I- κ B and thus its nuclear translocation. Butyrate prevented this LPS-induced activation of NF- κ B, as shown by a decrease in immunofluorescence staining both in the nucleus and the cytoplasm.

Butyrate induces expression of IL-10 through CREB activation.

However, LPS can also induce the production of the regulatory cytokine IL-10, which in turn inhibits IL-12 production and activity. Thus, it seemed important to analyze the effect of butyrate on IL-10 expression by LPS-stimulated PBMC. We found that, concomitantly to the downregulation of IL-12 expression, butyrate treatment of LPS-stimulated PBMC enhanced IL-10 production (Figure 2a) and mRNA expression (Figure 2b). Dose effects

studies showed that the maximal production of IL-10 was obtained for a dose of 0.25 mM butyrate (data not shown). However, the optimal concentration of butyrate in term of IL-12 inhibition and IL-10 stimulation was 0.5 mM. In contrast to IL-12, the promoter region of IL-10 contains crucial cAMP responsive elements (CRE), but no NF- κ B binding sites¹⁸. Phosphorylation of the cAMP responsive element binding protein (CREB) at Ser133 regulates the ability of CREB to activate transcription. Therefore, the effect of butyrate on CREB phosphorylation was investigated by immunofluorescence staining with an anti-phospho-CREB (Ser133) antibody. Immunofluorescence analysis of unstimulated PBMC showed no detectable phosphorylated CREB in the cell nucleus (Figure 2c). In the presence of butyrate, strong nuclear activation of CREB was observed. Nuclear staining also occurred in the presence of LPS, indicating CREB activation. Finally, the addition of butyrate did not affect CREB LPS-stimulated phosphorylation. Thus, these data suggest that butyrate regulates IL-12/IL-10 balance at the transcriptional level by controlling NF- κ B/CREB activation status.

Butyrate prevents IFN- γ expression induced by IL-12.

PBMC were cultured under Th1 conditions for 3 days in the presence or absence of 0.5 mM butyrate. As expected, higher production and mRNA expression of IFN- γ were observed in cells cultured under Th1-type polarizing conditions as compared to unstimulated control cells (Figure 3, a and b). The presence of butyrate decreased both the production and mRNA expression of IFN- γ , but stimulated IL-10 production and mRNA expression.

Butyrate selectively switches Th1-polarized cells toward IL-10 producing cells.

As butyrate was able to inhibit the induction of a Th1-type response, we next wanted to analyze its effect on Th1/Th2-polarized cells. Flow cytometry analysis showed that butyrate lowered the percentage of IFN- γ -producing cells in Th1-polarized cells from 60% to

40%, whereas the percentage of IL-4-positive cells (2% to 3%) remained unchanged (Figure 4a). Furthermore, butyrate did not significantly affect the percentage of IL-4 producing cells in Th2-differentiated cells (40% vs. 38%) or of IFN- γ -producing cells (16% vs. 16%) (Figure 4b). Thus, butyrate affected Th1 cells selectively. In Th1 cells, butyrate not only downregulated IFN- γ expression, but also stimulated both the production and mRNA expression of IL-10 (Figure 5, a and b).

Butyrate switches the Th1 phenotype of T-cell lines derived from LPMC of CD patients toward a Th2 phenotype.

We first verified by RT-PCR that freshly isolated LPMC, from inflamed mucosa of CD patients, had a Th1 phenotype, expressing high levels of IFN- γ mRNA, low levels of IL-10 mRNA and no detectable levels of IL-4 mRNA. After 24 h culture in the presence of butyrate (0.5 mM), the expression of IFN- γ mRNA decreased, whereas that of IL-10 mRNA was enhanced (Figure 6a). T-cell lines expanded with IL-2 for three weeks conserved a Th1-type phenotype (37% IFN- γ positive cells vs. 22% IL-4-producing cells) (Figure 6b). However, expansion in the presence of 0.5 mM butyrate switched the Th1 phenotype to a Th2 one (24% IFN- γ -positive cells vs. 36% IL-4-producing cells).

Butyrate potentiates IL-10 inhibition of TNF production through upregulation of IL-10 receptor.

Finally, as butyrate stimulated IL-10 production and IL-10 displayed immunomodulatory properties, studies were performed to determine whether butyrate affected the inhibitory action of IL-10 on LPS-induced pro-inflammatory response. Experiments were designed in which PBMC were pretreated with increasing concentrations of butyrate and then stimulated with LPS in the presence of IL-10 (5 ng/ml). It was found that butyrate treatment potentiated the inhibitory effect of IL-10 on LPS-induced production of TNF by PBMC (Figure 7a). Moreover, pre-incubation of cells with an anti-IL-10 receptor

antibody, before addition of IL-10 and LPS, abolished the inhibitory effect of IL-10 on TNF production. In accordance with this data, RT-PCR analysis showed that the potentiating effect of butyrate treatment was associated with dose-dependent increase in IL-10 receptor mRNA expression (Figure 7b).

Discussion

Our study shows that butyrate 1) inhibits LPS- or IL-12 induced Th1 type response, 2) specifically switches the phenotype of Th1-polarized cells to an “IL-10 regulatory phenotype” and 3) inhibits the Th1 response in CD. An interesting immunoregulatory property of butyrate is to control the balance between IL-12 and IL-10 by modulating NF- κ B/CREB activation. Such a circuit involving IL-12/IL-10 cytokine balance has been described as an important regulatory mechanism in Th1-mediated disease¹⁹.

With respect to LPS-induction of Th1 response, butyrate decreased the production and mRNA expression of IL-12 by LPS-stimulated PBMC. LPS is a potent inducer of Th1-type response, contributing to enhanced activation of CD14⁺ macrophages recruited from peripheral blood in CD patients^{20,21}. The binding of LPS to the CD14 receptor triggers activation of the NF- κ B transcription factor, which in turn activates IL-12 gene transcription^{16,22}. A previous study by our group showed that butyrate blockade of NF- κ B activation involves inhibition of I- κ B degradation¹². Accordingly, butyrate blockade of IL-12 expression is associated with inhibition of NF- κ B activation.

In contrast with IL-12 inhibition, butyrate stimulated IL-10 production and mRNA expression, which is particularly relevant as IL-10 regulates IL-12 expression negatively²³, thus amplifying the inhibitory effect of butyrate. Moreover, butyrate stimulation of IL-10 mRNA expression correlates with activation of the transcription factor CREB, which plays an important role in IL-10 gene transcription¹⁸. Our study shows that butyrate induced CREB phosphorylation, probably involving the cAMP/protein kinase A pathway (unpublished results). In fact, these findings are consistent with previous reports showing that cAMP-elevating drugs upregulate IL-10 expression through PKA-dependent CREB activation²⁴ and downregulate IL-12 expression²⁵. Our results showing a downregulation of IL-12 expression and the upregulation of IL-10 by butyrate are in agreement with the results obtained by

Säeman et al.¹¹ with *Staphylococcus aureus*-stimulated PBMC. In addition, our study suggests that butyrate regulates IL-12/IL-10 balance by modulating the activation status of NF- κ B and CREB. As it is known, the immunosuppressive effects of IL-10 are mediated by NF- κ B inhibition²⁶ and thus stimulation of IL-10 production by butyrate may also constitute a feedback loop amplifying the inhibitory effect of butyrate on NF- κ B.

Stimulation of cells of the innate immune system (e.g. monocytes and dendritic cells) by microbial products results in the secretion of cytokines that can guide maturing Th cells along an appropriate lineage. Hence, LPS stimulates IL-12 production, which in turn drives the differentiation of IFN- γ -producing Th1 cells. Our results indicate that butyrate prevents the production and mRNA expression of IFN- γ induced by IL-12 on PBMC. Furthermore, addition of butyrate during IL-12-stimulation skewed IFN- γ producing cells toward the IL-10-producing phenotype.

Our finding that butyrate inhibits Th1 cells selectively without affecting Th2 cells may be of particular therapeutic interest for Th1-mediated inflammation. In Th1-differentiated cells, butyrate decreased the percentage of IFN- γ -positive CD4⁺ T cells. Further studies are needed to explain this selective effect of butyrate on Th1 cells. However, several factors seem to play a preferential role in Th1 as compared to Th2 cells. For example, NF- κ B is preferentially involved in type 1 immune response since its inhibition in transgenic mice impaired type 1, but not type 2, immune reactions²⁷. Moreover, elevation of intracellular cAMP impaired Th1, but not Th2 cell function.^{25,28}

Interestingly, butyrate treatment of Th1-differentiated CD4⁺ T cells led to the production and mRNA expression of IL-10. This is important since regulatory T cells producing IL-10 play a major role in the control of intestinal inflammatory responses²⁹. Because of the lack of a suitable antibody for intracellular cytokine staining, IL-10 cell production could not be analyzed at the single-cell level. However, butyrate inhibition of Th1

cells, associated with the stimulation of IL-10 production, may constitute an important regulatory mechanism in Th1-mediated inflammation. Several studies have reported that antigen-dependent or -independent IL-10 production by regulatory CD4⁺ T cells may influence neighboring immune responses through a bystander effect^{3,19}.

Altogether, the above results suggest that butyrate, which selectively inhibits Th1 response, could be effective in the treatment of Th1-mediated diseases such as CD. RT-PCR analysis of the cytokine expression pattern of LPMC isolated from inflamed mucosa of CD patients confirmed a Th1 phenotype. In agreement with results obtained by other groups^{30,31}, our experiments found high levels of IFN- γ mRNA, low levels of IL-10 mRNA and no detectable IL-4 mRNA expression. After 24 h culture in the presence of butyrate, IFN- γ mRNA expression decreased, whereas that of IL-10 increased. T cells expanded for three weeks in the presence of butyrate showed a switch from a Th1 to a Th2 phenotype.

The therapeutic advantage of controlling IL-12/IL-10 balance has been demonstrated in experimental models of IBD with regard to the efficacy of neutralizing anti-IL-12 antibodies or recombinant IL-10 for the treatment of colitis^{32,33}. However, IBD clinical trials in humans only found marginal and/or non-significant benefit of rhIL-10 for the induction of remission in patients with chronic, active and steroid-refractory CD³⁴. The inefficacy of IL-10 may be related at least in part to a downregulation of IL-10 receptors, leading to decreased responsiveness to this cytokine. Moreover, the IL-10 doses used in some studies may not be sufficient to counterbalance the effects of higher levels of IL-12 production. Our finding that butyrate potentiates IL-10 anti-inflammatory effects through upregulation of IL-10 receptor may represent an interesting adjuvant therapeutic property. This compound could be administered either alone or as an adjuvant with other pharmacologically active drugs, especially IL-10. Such a combined approach has recently been tested in an experimental colitis model by Herfarth et al., who reported that a combination of IL-10 and dexamethasone

allowed the effective dosages of both drugs to be reduced³⁵. In patients with ulcerative colitis (UC), another IBD, combined oral butyrate and mesalazine treatment proved to be safe and more efficient than mesalazine alone³⁶. Oral administration of butyrate has also been shown to be a safe and well-tolerated in other diseases, such as hemoglobinopathies and urea cycle disorders^{37,38}. To date, butyrate has only been tested in UC, but our results, together with those of other researchers^{10,39}, suggest that it is more appropriate for Th1-mediated inflammatory diseases such as CD rather than UC in which inflammation is more related to Th2 response⁴.

Acknowledgments: We are grateful to Drs. P. Panina-Bordignon and M. Bonneville for their helpful discussion and review of this manuscript.

References

22. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of Helper T Lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-793.
23. Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman R.L. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 1996;183:2669-2674.
24. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-742.
25. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115 :182-205.
26. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J. Immunol.* 1996;157:1261-1270.
27. Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Luzzza F, Pallone F. Interleukin-12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 1997;112:1169-1178.
28. Nicholson LB, Kuchroo VK. Manipulation of the Th1/Th2 balance in auto-immune disease. *Cur. Opinion Immunology* 1996;8:837-842.
29. Scheppach W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut* 1994;35(Suppl I):S35-S38.
30. Segain JP, Gervois N, Raingeard de la Blétière D, Galmiche JP, Blottière HM. Butyrate modulates antigen presentation by colonic epithelial cells. *Gut* 1999;45(Suppl V):51a.

31. Gilbert KM, Weigle WO. Th1 cell anergy and blockade in G1a phase of the cell cycle. *J. Immunol.* 1993;151:1245-1254.
32. Säemann MD, Böhmig GA, Österreicher CH, Burtscher H, Parolini O, Diakos C, Stöckl J, Hörl WH, Zlabinger GJ. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB J.* 2000;14:2380-2392.
33. Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottièrè HM, Galmiche JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NF- κ B inhibition: Implications for Crohn's disease. *Gut* 2000;47:397-403.
34. Espevik T, Nissen-Meyer J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J. Immunol. Methods* 1986;95:99-105.
35. Bull DM, Bookman MA. Isolation and functional characterization of human intestinal mucosal lymphoid cells. *J. Clin. Invest.* 1977;59:966-974.
36. Gervois N, Guilloux Y, Diez E, and Jotereau F. Suboptimal activation of melanoma infiltrating lymphocytes (TIL) due to low avidity of TCR/MHC-tumor peptide interactions. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 2403-2407.
37. Murphy TL, Cleveland MG, Kulesza P, Magram J, Murphy KM. Regulation of Interleukin 12p40 expression through a NF-kappa half-site. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15:5258-5267.
38. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Scholmerich J, Gross V. Nuclear factor kappa B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998;115:357-369.

39. Platzer C, Fritsch E, Elsner T, Lehmann MH, Volk HD, Prösch S. Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur. J. Immunol.* 1999;29:3098-3104.
40. Segal BM, Dwyer BK, Shevac EM. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 1998;187:537-546.
41. Mahida YR. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2000;6:21-33.
42. Baldassano RN, Schreiber S, Johnston RB Jr, Fu RD, Muraki T, MacDermott RP. Crohn's disease monocytes are primed for accentuated release of toxic oxygen metabolites. *Gastroenterology* 1993;105:60-66.
43. Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Ann. Rev. Immunol.* 1996;14: 649-683.
44. Ma X, Aste-Amezaga M, Gri G, Gerosa F, Trinchieri G. Immunomodulatory functions and molecular regulation of IL-12. *Chem. Immunol.* 1997;68:1-22.
45. Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhanced IL-10 production by murine macrophages: In vitro and in vivo studies. *J. Immunol.* 1999;162:1707-1716.
46. Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Di Lucia P, D'Ambrosio D, Lang R, Fabbri L, Self C, Sinigaglia F. β 2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of Interleukin-12. *J. Clin. Invest.* 1997;100:1513-1519.
47. Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS Jr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB binding. *J. Biol. Chem.* 1999;274:31868-31874.

48. Aronica MA, Mora AL, Mitchell DB, Finn PW, Johnson JE, Sheller JR, Boothby MR. Preferential role for NF-kappaB/Rel signaling in the type 1 but not type 2 T cell-dependent immune response in vivo. *J. Immunol.* 1999;163:5116-5124.
49. Chen CH, Zhang DH, LaPorte JM, Ray A. Cyclic AMP activates p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Th2 cells: Phosphorylation of GATA-3 and stimulation of Th2 cytokine gene expression. *J. Immunol.* 2000;165:5597-5605.
50. Groux H, Powrie F. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunol. Today.* 1999;20:442-446.
51. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* 1997;150:823-832.
52. Nielsen OH, Koppen T, Rudiger N, Horn T, Eriksen J, Kirman I. Involvement of interleukin-4 and -10 in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* 1996;41:1786-1793.
53. Fuss IJ, Marth T, Neurath MF, Pearlstein GR, Jain A, Strober W. Anti-interleukin-12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice. *Gastroenterology.* 1999;117:1078-1088.
54. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 1999;190:995-1003.
55. Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, Wild G, Williams CN, Nikolaus S, Jacyna M, Lashner BA, Gangl A, Rutgeerts P, et al. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000;119: 1461-1472.

56. Herfarth HH, Böcker U, Janardhanam R, Sartor RB. Subtherapeutic corticosteroids potentiate the ability of interleukin-10 to prevent chronic inflammation in rats. *Gastroenterology* 1998;115:856-865.
36. Vernia P, Monteleone G, Grandinetti G, Villotti G, Di Giulio E, Frieri G, Marcheggiano A, Pallone F, Caprilli R, Torsoli A. Combined oral Sodium Butyrate and Mesalazine treatment compared to oral Mesalazine alone in ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 2000;45:976-981.
37. Perrine SP, Ginder GD, Faller DV, Dover GH, Ikuta T, Witkowska HE, Cai SP, Vichinsky EP, Olivieri NF. A short-term trial of butyrate to stimulate fetal-globin-gene expression in the beta-globin disorders. *N. Engl. J. Med.* 1993;328:129-131.
38. Maestri NE, Brusilow SW, Clissold DB, Bassett SS. Long-term treatment of girls with ornithine transcarbamylase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 1996;335:855–859.
39. Gilbert KM, Wahid R, Fecher NP, Freeman JP, Fifer EK. Potential clinical use of butyric acid derivatives to induce antigen-specific T cell inactivation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000;294:1146-1153.

V.5. « L'inhibition de Rho kinase prévient l'inflammation *via* l'inhibition de NF- κ B dans la maladie de Crohn et dans un modèle de colite expérimentale »

V.5.1. Résumé

Les protéines G de la famille Rho sont impliquées dans la régulation de nombreux mécanismes cellulaires, en particulier RhoA, dans la réponse inflammatoire. Nous avons évalué le rôle de RhoA et de son effecteur Rho kinase dans l'inflammation intestinale.

Méthodes : l'activation de RhoA a été évaluée par des techniques de pull-down. L'implication de Rho kinase dans l'inflammation a été évaluée à l'aide d'un inhibiteur spécifique : le Y-27632 par des techniques de biologie moléculaire, d'immuno-marquage et d'immuno-précipitation.

Résultats : La fraction activée de RhoA liée à la GTP était plus élevée dans la muqueuse inflammée des patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique que dans les zones non inflammées et que dans la muqueuse de témoins sains et ceci de façon corrélée à la production de TNF. Les mêmes constatations étaient faites dans le colon de rats inflammés par l'instillation d'acide trinitrobenzene sulphonique acide comparativement à des rats non inflammés. L'inhibiteur spécifique de Rho kinase, Y-27632 diminuait la production de TNF et d'IL-1 β par les cellules mononucléées de la *lamina propria* isolées de la muqueuse colique de patients atteints de maladie de Crohn et par des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) activées par du Lipopolysaccharides (LPS). Y-27632 inhibait la translocation de NF- κ B activé (p65) dans le noyau et empêchait la dégradation du facteur I- κ B α dans le cytoplasme induit par le LPS sur les PBMC. L'inhibition de la phosphorylation de I- κ B α par Y-27632 dépendait de l'inhibition de I κ -B kinase.

Conclusions : Rho kinase active le complexe Ik-B kinase et induit l'activation et la translocation dans le noyau de NF-kB suggérant son rôle actif dans l'inflammation. L'inhibition spécifique de Rho kinase pourrait devenir une approche thérapeutique dans la maladie de Crohn.

V.5.2. Publication 5 : « Gastroenterology 2003;124:1180-7. »

RAPID COMMUNICATIONS

Rho Kinase Blockade Prevents Inflammation Via Nuclear Factor κ B Inhibition: Evidence in Crohn's Disease and Experimental Colitis

JEAN-PIERRE SEGAIN,* DIANE RAINGEARD DE LA BLÉTIÈRE,* VINCENT SAUZEAU,† ARNAUD BOURREILLE,* GRÉGORIE HILARET,* CHRYSTELLE CARIO-TOUMANIANTZ,† PIERRE PACAUD,† JEAN-PAUL GALMICHE,* and GERVAISE LOIRAND†

*INSERM U-539, Department of Gastroenterology, and Centre d'Investigation Clinique, Centre Hospitalier Universitaire, Hotel Dieu, Nantes; and †INSERM U-533, Faculté des Sciences, Nantes, France

Background & Aims: Rho proteins are involved in the regulation of several cellular functions. Data from in vitro studies suggest that RhoA could be involved in the inflammatory response. We investigated the role of RhoA and its downstream effector Rho kinase in intestinal inflammation. **Methods:** Activation of RhoA was assessed by pull-down assays. A specific inhibitor of Rho kinase, Y-27632, was used to examine the role of Rho kinase in inflammatory response in vivo and in vitro by molecular biology and by immunological and biochemical approaches. **Results:** Increased activation of RhoA was found in inflamed intestinal mucosa of patients with Crohn's disease and of rats with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. Oral administration of Y-27632 in rats significantly reduced the colonic inflammation. In vitro, activation of RhoA alone was sufficient to induce tumor necrosis factor production. Y-27632 inhibited production of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β by lamina propria and peripheral blood mononuclear cells. Rho kinase inhibition prevented nuclear factor κ B activation and I- κ B phosphorylation and degradation. We showed that Rho kinase associates with and activates I- κ B kinase α and that Y-27632 prevents I- κ B kinase activation. **Conclusions:** Our study provides the first evidence that Rho kinase activates I- κ B kinase and, thus, nuclear factor κ B, suggesting a key role of Rho kinase in inflammatory responses and intestinal inflammation. Specific inhibition of Rho kinase may be a promising approach for the treatment of patients with Crohn's disease.

Crohn's disease (CD) is a major inflammatory bowel disease characterized by a dysregulated immune response of unknown origin.¹ Enteric flora or bacterial products such as lipopolysaccharide (LPS) contribute to the recruitment and enhanced activation of lamina propria macrophages and T cells.² The high amount of

proinflammatory cytokines, particularly tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β , produced by these cells plays a major role in the initiation and perpetuation of intestinal inflammation in CD.¹ Nuclear factor κ B (NF- κ B), the key regulator of inflammatory cytokine gene transcription, seems to be a central mediator of immune and inflammatory responses.³ In resting cells, NF- κ B is sequestered in the cytoplasm by tightly bound inhibitory proteins of the I- κ B family. On activation by various stimuli, such as proinflammatory cytokines or LPS, I- κ B is phosphorylated by a complex of I- κ B kinases (IKK α and β) and rapidly degraded, allowing NF- κ B to translocate within the nucleus and induce gene transcription by binding to specific promoter elements. In this respect, increased activation of the p65 subunit of NF- κ B was detected in macrophages of patients with CD,⁴ and administration of antisense oligonucleotides to p65 abrogated experimental colitis induced in mice by trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS).⁵ NF- κ B is the target of several anti-inflammatory compounds (in relation to its essential role in inflammation), and attempts are currently being made to develop safe NF- κ B inhibitors for the treatment of chronic inflammatory diseases.⁶

The small G proteins of the Rho family (Rho, Rac, and Cdc42) are known to regulate actin-based cytoskeletal structures and control monocyte/macrophage chemo-

Abbreviations used in this paper: Ab, antibody; CNF-1, cytotoxic necrotizing factor 1; GTP, guanosine triphosphate; IKK, I- κ B kinase; IL, interleukin; LPMC, lamina propria mononuclear cells; LPS, lipopolysaccharide; NF- κ B, nuclear factor κ B; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; ROCK, Rho Kinase; TNBS, trinitrobenzene sulfonic acid; TNF, tumor necrosis factor.

© 2003 by the American Gastroenterological Association

0016-5085/03/\$30.00

doi:10.1016/S0016-5085(03)00283-X

taxis, adhesion, transmigration, phagocytosis, and proliferation.⁷ Modulation of these cellular functions by RhoA is largely dependent on the activation of its downstream effector, Rho kinase (ROCK).^{7,8} Rho proteins also regulate the signal transduction pathways that control the activities of different transcription factors. In vitro studies using transfected cells have shown that RhoA can activate NF- κ B, suggesting a potential role in inflammation.^{9,10} However, the molecular mechanisms responsible for the activation of NF- κ B by RhoA remain unknown.

This study analyzed the involvement of RhoA and the ROCK-dependent signaling cascade in the inflammatory response, both in vitro and in vivo, by using physiologically relevant primary human cells (i.e., immune cells) and inflammatory diseased tissues from CD patients and rats with TNBS-induced colitis.

Materials and Methods

Patients

Eighteen patients with CD (8 men and 10 women, aged 18–72 years) and 6 healthy controls (3 men and 3 women, aged 22–67 years) were prospectively included. At the time of the study, 6 patients were receiving steroids, and 6 were receiving azathioprine alone or with steroids. Six CD patients and all controls were not receiving any medication. All patients underwent endoscopy for medical reasons. Colonic biopsy specimens were obtained from inflamed and/or noninflamed mucosa. All patients gave informed consent to take part in the study.

Induction and Evaluation of Inflammation

Animal experiments were performed in accordance with the governmental guidelines (N°87/848). TNBS colitis¹¹ was induced in male Sprague–Dawley rats (250 g) by intracolonic administration of TNBS solution (25 mg in 30% ethanol). Two groups (n = 10 each) were then treated once daily by oral gavage with either water (vehicle) or the ROCK inhibitor Y-27632¹² (30 mg · kg⁻¹ · day⁻¹) for 7 days. Rats were weighed daily and killed on day 8 for assessment of colitis.^{13,14}

Tissue and Cell Culture

Peripheral blood and lamina propria mononuclear cells (PBMC and LPMC, respectively) were isolated as previously described.^{15,16} LPMC or colon samples (CD patients or rats) were cultured in complete medium (RPMI with 10% fetal calf serum, L-glutamine, and antibiotics; Invitrogen, Carlsbad, CA) containing or not containing Y-27632 (10 μ mol/L) for 16 hours at 37°C. PBMC were stimulated with cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF-1; 1–1000 pmol/L)¹⁷ or LPS (*Salmonella typhosa*; 2 μ g/mL) for 6 hours in the absence or presence of Y-27632 (0.01–100 μ mol/L). Immunofluorescence staining of NF- κ B p65 was performed as previously described.¹⁵

Cytokine Assays

Biologically active total TNF was measured with the WEHI 164 clone 13 cell-killing assay.¹⁸ IL-1 β and IL-10 were quantified with enzyme-linked immunosorbent assay kits (BD Pharmingen, Le pont de Claix, France).

Western Blot Analysis

Human monocytic THP-1 cells (starved for 16 hours in 0.2% fetal calf serum medium) were pretreated or not with Y-27632 (10 μ mol/L) for 10 minutes at 37°C before stimulation with IL-1 β (10 ng/mL) for 15 minutes. Cells were then lysed for 30 minutes at 4°C in a lysis buffer containing 10 mmol/L of Tris-HCl (pH 7.5), 100 mmol/L of NaCl, 1 mmol/L of ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 20 mmol/L of β -glycerophosphate, 0.5% Nonidet P-40, 1 mmol/L of sodium orthovanadate, and protease inhibitors. Cell lysates were analyzed by Western blot with rabbit polyclonal antibodies (Ab) against I- κ B α and phosphorylated I- κ B α (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). Immunoreactive bands were visualized with horseradish peroxidase-conjugated secondary Ab and subsequent enhanced chemiluminescence detection (Amersham Biosciences, Orsay, France).

Immunoprecipitation

Cell lysates (1 mL/500 μ g of total protein) were incubated at 4°C with 2 μ g of control mouse immunoglobulin G or anti-IKK α mouse monoclonal Ab (BD Biosciences) for 1 hour and then with a biotin-conjugated rabbit anti-mouse Ab (Santa Cruz Biochemicals, Santa Cruz, CA) for 16 hours. After the addition of avidin-agarose beads (Sigma, St. Louis, MO), immunoprecipitates were recovered by centrifugation and washed 3 times with lysis buffer and twice with kinase buffer [20 mmol/L of Tris-HCl (pH 7.5), 20 mmol/L of MgCl₂, 1 mmol/L of adenosine triphosphate, 1 mmol/L of ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 1 mmol/L of dithiothreitol, 1 mmol/L of sodium orthovanadate, and 25 mmol/L of β -glycerophosphate]. Immunoprecipitates were analyzed by Western blot for the presence of IKK α and ROCK proteins (goat polyclonal Ab; Santa Cruz).

I- κ B Kinase Assay

IKK activity of immunoprecipitates or of recombinant ROCK (α isoform, 20 mU; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) was assayed in kinase buffer containing 1 μ g of recombinant glutathione S-transferase I κ B (1-317; Santa Cruz) and 10 μ Ci of [γ -³²P]adenosine triphosphate for 30 minutes at 30°C.^{19,20} Reaction products were separated by 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and visualized with a phosphorimager.

Rho Kinase Assay

ROCK activity in the IKK immune complex was assayed by using S6 kinase substrate peptide²¹ according to the instructions of the manufacturer (Upstate Biotechnology). Recombinant ROCK (α isoform; 20 mU) was used as positive control.

Transfection and Reporter Assays

THP-1 cells were transfected with 400 ng of pNF- κ B-luc plasmid (Ozyme) by using Lipofectamine-Plus reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours later, cells were starved overnight in 0.2% fetal calf serum medium and then collected, counted, and seeded in 96-well plates (10^5 cells per 100 μ L per well). Cells were then pretreated or not with Y-27632 (10 μ M) for 10 minutes at 37°C before stimulation with IL-1 β (10 ng/mL) for 4 hours. Luciferase activity was determined with a Luciferase Reporter Gene Assay (Roche Diagnostics, Meylan, France).

Measurement of RhoA Activity

Tissues or cells were homogenized in lysis buffer, as previously described.²² RhoA activity was assessed by a pull-down assay with the Rho-binding domain of the Rho effector protein rhotekin, as described previously.²³ Precipitated guanosine triphosphate (GTP)-bound RhoA and total RhoA were then analyzed by Western blot by using a mouse monoclonal anti-RhoA Ab (Santa Cruz). Immunoreactive bands were quantified with ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Statistical Analysis

The significance of differences was determined with the Student *t* test (for normally distributed data) or the Mann-Whitney *U* test (for nonnormally distributed data).

Results

Activation of the RhoA/Rho Kinase Pathway in Intestinal Inflammation

Activation of small GTPase RhoA in intestinal mucosa was assessed by a pull-down assay.²³ The level of active GTP-bound RhoA was higher in biopsy specimens taken from inflamed mucosa of patients with CD as compared with noninflamed regions and with the mucosa of control patients (Figure 1A). Total RhoA amounts were equivalent between samples as assessed by Western blot of protein extracts. We also observed a similar increase in RhoA activation in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis (352% \pm 28% of control; *n* = 6). The level of RhoA activation correlated with the level of TNF produced by intestinal biopsies (Figure 1B). Similar to the precedent observations with CD patients, the level of activated GTP-bound RhoA was increased in inflamed colons of rats with TNBS-induced colitis in comparison to normal colons of control rats (Figure 1C) and was associated with higher TNF levels in inflamed mucosa (Figure 1D). We next investigated the involvement of the RhoA effector ROCK in TNF production by inflamed mucosa. Because LPMC represent the major source of TNF, we analyzed the effect of the specific

ROCK inhibitor Y-27632¹² on TNF production by isolated LPMC from inflamed colonic mucosa of patients with CD and of rats with TNBS colitis. Y-27632 (10 μ M) treatment led to a dramatic reduction of TNF production by LPMC from both CD patients and rats (Figure 1E and F). These data indicate that activation of the RhoA/ROCK pathway is involved in increased TNF production in intestinal inflammation.

Rho Kinase Is Involved in Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis

The role of ROCK in intestinal inflammation in vivo was assessed in rats with TNBS-induced colitis by using the specific inhibitor Y-27632. Y-27632 was originally tested in rat hypertension models, in which oral administration of 30 mg \cdot kg⁻¹ \cdot day⁻¹ proved safe and efficient.¹² Oral administration of Y-27632 (30 mg \cdot kg⁻¹ \cdot day⁻¹) reduced the occurrence of TNBS-induced diarrhea and improved weight gain as compared with untreated animals (Figure 2A). Untreated rats displayed severely inflamed mucosa, with ulcerations often involving the entire bowel circumference. These signs of inflammation were decreased in Y-27632-treated animals, and the macroscopic score was reduced accordingly (Figure 2B). As compared with untreated rats, bowel wall thickness was also reduced significantly (with no mucosal ulceration; Figure 2C), and there was significant improvement in the histological score for inflammatory activity (Figure 2D–F). In addition, LPMC isolated from the colon of Y-27632-treated rats produced lower levels of TNF than LPMC from untreated rats (not shown). The beneficial action of Y-27632 on colitis suggests that ROCK is involved in intestinal inflammation in vivo.

ROCK Inhibition Selectively Prevents Proinflammatory Cytokine Production

CNF-1, a toxin derived from pathogenic strains of *Escherichia coli*, produces selective deamidation of the glutamine 63 of RhoA, inducing its constitutive activation.¹⁷ Stimulation of PBMC with CNF-1 induced a time- and dose-dependent production of TNF (Figure 3A and B), which was inhibited (53%) by 10 μ M of Y-27632 (Figure 3B). This indicated that activation of RhoA alone was sufficient to induce ROCK-dependent production of TNF. We next used LPS-stimulated PBMC to investigate the inhibitory action of Y-27632 on cytokine production. LPS stimulation induced the activation of RhoA, as attested by the increase in the amount of GTP-bound RhoA obtained in pull-down assay. Western blot analysis of unstimulated or LPS-stimulated PBMC lysates showed that total RhoA levels were equivalent (Figure 3C). Moreover, LPS-induced

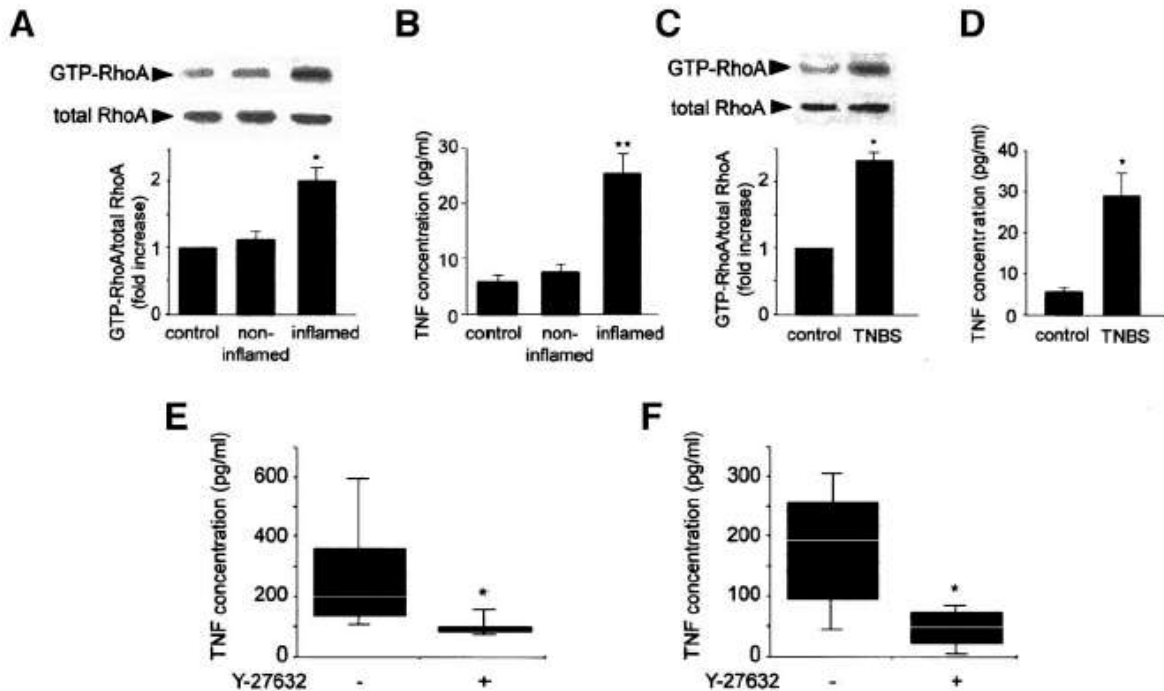


Figure 1. Activation of the RhoA/ROCK pathway in intestinal inflammation. (A–D) RhoA activity (A and C) and TNF concentration (B and D) in intestinal mucosa from (A and B) CD (inflamed and noninflamed; $n = 12$) and control patients ($n = 6$) and from (C and D) rats with TNBS-induced colitis and control rats, respectively ($n = 5$ each). (A and C) Pull-down assay (upper panel) and densitometrical quantification (mean \pm SEM, lower panel) of active GTP-bound RhoA. Total RhoA amounts were equivalent between samples as assessed by Western blot of colon protein extracts. (B and D) Biopsies were cultured for 24 hours, and TNF concentration (mean \pm SEM) in the culture supernatant was determined by bioassay. (E and F) Effect of the ROCK inhibitor Y-27632 on TNF production by LPMC isolated from inflamed mucosa (E) of CD patients ($n = 6$) and (F) of rats with TNBS colitis. Boxes represent the median and interquartile range of TNF concentration in 24-hour culture supernatants. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

activation of RhoA was associated with TNF and IL-1 β production (Figure 3D), which was reduced dose-dependently by Y-27632 (0.01–100 μ mol/L; not shown). Maximal inhibitory action was obtained from 10 μ mol/L Y-27632. ROCK inhibition did not decrease the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Figure 3D). Similar results were obtained with fasudil (data not shown), another inhibitor of ROCK²⁴ that is nonstructurally related to Y-27632; this is consistent with the involvement of ROCK in the inflammatory response. In addition, Y-27632 inhibited inflammatory responses induced by TNF- α or IL-1 β (not shown), suggesting that ROCK is a convergence point for multiple signals.

Rho Kinase Associates With I- κ B Kinase In Vivo and Induces I- κ B Kinase Activation

We next investigated the role of ROCK in the activation of NF- κ B, a key regulator of inflammatory cytokine gene transcription. The cellular localization and activation of NF- κ B were determined by immunofluo-

rescence with an Ab directed against the active form of NF- κ B (p65). In nonstimulated PBMC, only very weak cytoplasmic staining was observed (Figure 4A, upper panel). Western blot analysis confirmed the presence of high amounts of I- κ B α in cellular extracts (Figure 4A, lower panel). Treatment of cells with Y-27632 had no effect on NF- κ B staining or I- κ B α level. Stimulation of PBMC with LPS or TNF led to a marked increase of NF- κ B staining in the nucleus, indicating its dissociation from I- κ B α and subsequent translocation from the cytoplasm to the nucleus. Activation of NF- κ B was correlated with I- κ B α degradation (Figure 4A, lower panel). Y-27632 prevented the I- κ B α degradation and subsequent NF- κ B activation induced by LPS and TNF (Figure 4A). Using THP-1 monocytic cells transfected with an NF- κ B-dependent luciferase gene reporter plasmid, we found that ROCK inhibition with Y-27632 significantly decreased NF- κ B transcriptional activity stimulated by IL-1 β (Figure 4B). Western blot analysis of THP-1 cell extracts showed that Y-27632 also pre-

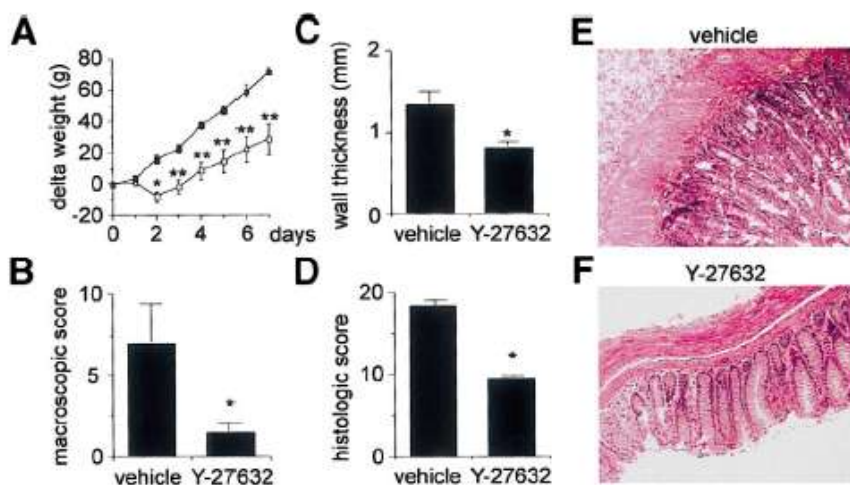


Figure 2. TNBS-induced colitis is improved by oral treatment with the ROCK inhibitor Y-27632. (A) Weight changes (mean \pm SEM; $n = 10$ per group) in rats with TNBS-induced colitis treated with vehicle (empty squares) or Y-27632 (filled squares). Y-27632 significantly improved intestinal inflammation evaluated in rats (mean \pm SEM; $n = 10$ per group) at day 7 of treatment by macroscopic score (B), colon wall thickness (C), and histological score (D). Colon sections (magnification, 200 \times) from rats with TNBS-induced colitis after treatment with vehicle (E) or Y-27632 (F) were stained with H&E. Y-27632 treatment significantly reduced the inflammatory infiltrate in the lamina propria and the submucosa. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

vented IL-1 β -induced phosphorylation and degradation of I- κ B α (Figure 4C). The initial step of I- κ B degradation induced by IL-1 β is the activation of the IKK complex and the subsequent phosphorylation of I- κ B.³ To determine whether ROCK is involved in the activa-

tion of the IKK complex in vivo, we immunoprecipitated endogenous IKK from THP-1 cells, stimulated or not with IL-1 β , in the absence or presence of Y-27632. The IKK activity of immunoprecipitates was then analyzed by measuring ³²P incorporation into recombinant

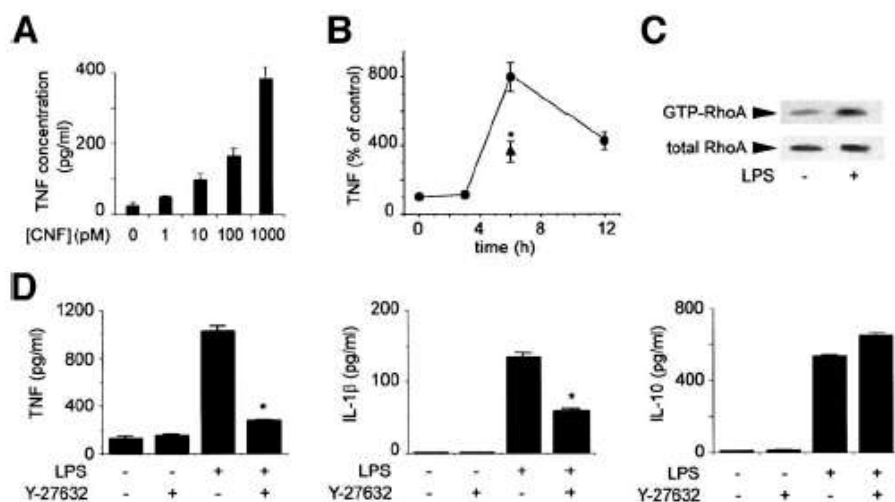


Figure 3. Role of the RhoA/ROCK pathway in proinflammatory cytokine expression. (A and B) PBMC were stimulated with the RhoA-activating CNF-1 toxin for 6 hours, and supernatants were analyzed by bioassay. (A) CNF-1 dose-dependently stimulated TNF production. (B) Kinetic of TNF production by PBMC stimulated with CNF-1 (1 nmol/L). The inhibitory effect of Y-27632 on CNF-induced TNF production is shown at 6 hours (triangle). (C) PBMC were cultured without or with LPS for 6 hours and lysed for the evaluation of the level of active GTP-RhoA by pull-down assay (upper bands). Total RhoA in unstimulated or LPS-stimulated cell lysates was equivalent as assessed by Western blot (lower bands). LPS stimulation increased the level of active GTP-RhoA. (D) PBMC were stimulated with LPS in the absence or presence of Y-27632 for 6 hours. TNF- α , IL-1 β , and IL-10 production was evaluated by bioassay (for TNF) and enzyme-linked immunosorbent assay. Data are mean \pm SEM of at least 4 independent experiments. * $P < 0.05$.

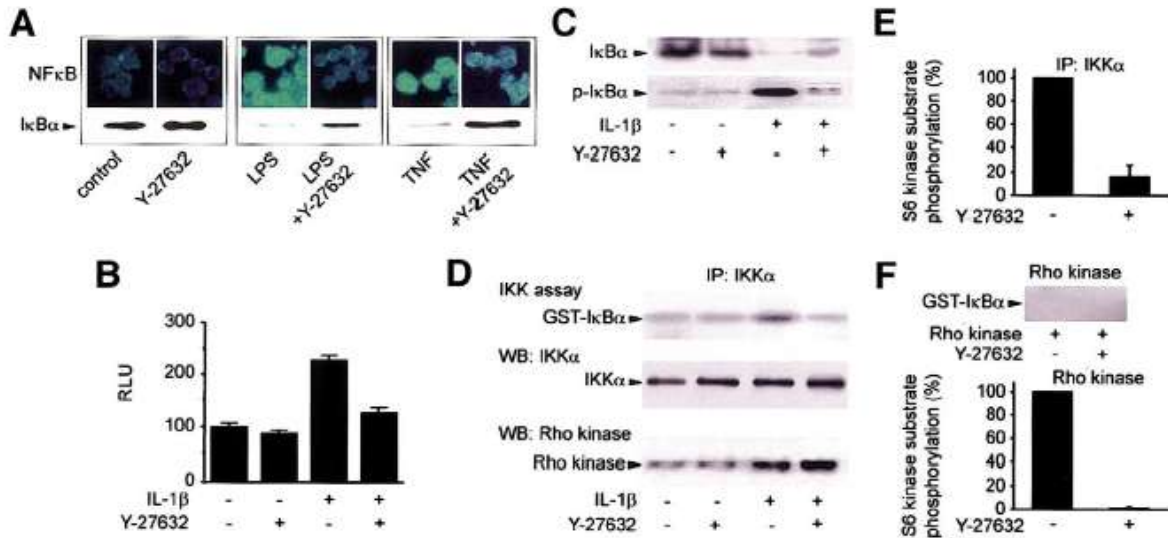


Figure 4. ROCK associates with IKK in vivo and induces IKK activation (A). Y-27632 prevents NF-κB activation and I-κBα degradation in PBMC stimulated with LPS or TNF-α. Immunofluorescence staining (upper panel) of the activated form of the NF-κB p65 subunit in control PBMC and in PBMC stimulated with LPS or TNF-α in the absence or presence of Y-27632 (10 μmol/L) for 30 minutes. I-κBα levels, determined in each condition by Western blot analysis (lower panel), are shown below the corresponding photomicrograph. (B) ROCK inhibition decreased NF-κB transcriptional activity. THP-1 cells were transfected with an NF-κB-dependent luciferase gene reporter plasmid, pretreated 10 minutes with or without Y-27632 (10 μmol/L), and stimulated with IL-1β for 4 hours. Cells were then lysed for measurement of luciferase activity (RLU, relative light unit; mean ± SEM; n = 4). (C, D, and E) THP-1 cells were pretreated for 10 minutes without or with Y-27632 (10 μmol/L) and stimulated with IL-1β (10 ng/mL) for 15 minutes. Cell lysates were then prepared for Western blot, immunoprecipitation, and I-κBα kinase assay as described in Materials and Methods. (C) ROCK inhibition prevents I-κBα phosphorylation and degradation induced by IL-1β. I-κBα and phosphorylated I-κBα levels were determined by Western blot analysis (D) ROCK associates with and activates IKK. The IKKα immune complex was assayed for I-κBα kinase activity (upper panel). The IKKα immune complex was analyzed by Western blot (WB) by using IKKα (middle panel) and ROCK (lower panel) Ab. Neither IKK activity nor the presence of ROCK was detected with control immunoglobulin G immunoprecipitates (not shown). (E) Active ROCK is present in the IKKα immune complex. Y-27632-sensitive kinase activity in the IL-1β-activated IKKα immune complex has been detected by in vitro S6 kinase substrate phosphorylation assay, in the absence and presence of Y-27632 (10 μmol/L). (F) In vitro phosphorylation experiment on glutathione S-transferase-I-κBα showing that recombinant ROCK, in the absence or presence of Y-27632, did not phosphorylate I-κBα (upper panel), whereas it induced S6 kinase substrate peptide phosphorylation that was inhibited by Y-27632 (lower panel). S6 kinase substrate peptide phosphorylation in the absence of Y-27632 was designated as 100%. Results are representative of at least 3 independent experiments.

I-κBα. IL-1β induced a 1.9 ± 0.2 -fold increase in IKK activity (n = 4) that was inhibited by Y-27632, although the amount of IKKα detected by Western blot was similar in each immunoprecipitate (Figure 4D). The increase in IKK activity correlated with the presence of ROCK in the IKK immune complex from IL-1β-stimulated cells (Figure 4D). The association of ROCK with the IKK complex was not affected by Y-27632. Neither IKK activity nor ROCK was detected with control immunoglobulin G immunoprecipitates (not shown). The presence of active ROCK in the IKK complex from IL-1β-stimulated cells was further confirmed by the detection of Y-27632-sensitive kinase activity with the S6 kinase peptide as substrate (Figure 4E). Y-27632 decreased S6 kinase activity to the level of the IKK complex from unstimulated control cells (not shown). In vitro phosphorylation experiments showed that recombinant ROCK was not able to directly phosphorylate

I-κBα (Figure 4F, upper panel), whereas it produced S6 kinase peptide phosphorylation, which was inhibited by Y-27632 (Figure 4F, lower panel). Therefore, the inhibition of I-κBα phosphorylation by Y-27632 in IL-1β-stimulated cells resulted from the inhibition of IKK activity. Together, our data indicate that ROCK associates with and activates the IKK complex.

Discussion

This study provides the first in vivo evidence for a role of a RhoA-dependent signaling pathway in inflammatory diseases and defines a new therapeutic target for the treatment of CD. Results reported here show that (1) RhoA and its effector ROCK are activated in CD and TNBS-induced colitis and that (2) blockade of ROCK inhibits proinflammatory cytokine production via inhibition of IKK and NF-κB activation and markedly re-

duces intestinal inflammation in rats with TNBS-induced colitis.

In vitro studies have reported that Rho family GTPases and some of their exchange factors, including Dbl, are involved in activation of the NF- κ B pathway.^{10,25–30} However, the mechanisms of this activation remain controversial or, concerning RhoA, elusive. The discrepancy between different studies could be due to the cell type or the enforced gene expression system used. In this study, we decided to use physiologically relevant primary human cells (LPMC and PBMC) and inflammatory diseased tissues from CD patients and rats with TNBS-induced colitis. Our results show that ROCK is involved in RhoA-dependent NF- κ B activation during inflammation and that use of the specific inhibitor Y-27632 to block ROCK can prevent an inflammatory response both in vitro and in vivo. Direct activation of the RhoA/ROCK pathway with CNF-1 was sufficient to induce TNF production by PBMC.

The involvement of RhoA in IL-1 β signal transduction has been suggested by the finding that IL-1 β stimulated the association of RhoA with the IL-1 β receptor.³⁰ Here we show for the first time that IL-1 β induces the association of ROCK with the IKK complex in vivo, which in turn contributes to IKK activation. The inhibitory effect of Y-27632 on NF- κ B activation thus involves inhibition of IKK activation, which is consistent with the observed inhibition of I- κ B α phosphorylation and degradation.

Our results show enhanced activation of RhoA in the inflamed mucosa of CD patients and of rats with TNBS-induced colitis. Although there could be many causes for this activation, it is clear that intestinal bacteria play a role in the pathogenesis of CD. Notably, pathogenic strains of *E. coli*, which are capable of producing Rho-activating toxins such as CNF-1,¹⁷ could be involved. LPS activation of RhoA is also a relevant factor for CD. Increased LPS levels occur in CD patients and may contribute to monocyte activation.² Thus, RhoA could act as a cellular sensor for bacterial products, thereby inducing NF- κ B activation and inflammatory response.

On the whole, our data indicate that ROCK plays an important role in inflammatory response and that ROCK inhibitors may be a new means of treating CD. A direct consequence of the inhibitory effect of Y-27632 on NF- κ B activation is the reduction of proinflammatory cytokine production. IL-10 production was not inhibited by Y-27632 and thus could contribute to the anti-inflammatory action of long-term treatment with Y-27632. The in vivo efficacy of ROCK blockade was shown in the well-validated model of experimental coli-

tis.¹¹ Chronic intestinal inflammation induced by TNBS mimics some characteristics of CD in humans. Oral administration of Y-27632 markedly reduced intestinal inflammation without inducing any apparent toxicity.

Because the role of NF- κ B activation in CD and TNBS colitis is well documented,^{4,5,15} inhibition of individual cytoplasmic components of the NF- κ B signaling pathway, such as ROCK, could be an effective strategy for blocking the inflammatory process. Our data suggest that specific inhibition of ROCK may be a promising novel approach for the treatment of patients with CD.

References

1. Focchia C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182–205.
2. Mahida YR. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6:21–33.
3. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621–663.
4. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42:477–484.
5. Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 1996;2:998–1004.
6. Baldwin AS. The transcription factor NF- κ B and human disease. *J Clin Invest* 2001;107:3–6.
7. Ridley AJ. Rho proteins, PI 3-kinases, and monocyte/macrophage motility. *FEBS Lett* 2001;498:168–171.
8. Fukuta Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-rho kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:32–39.
9. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997;11:2295–2322.
10. Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* 1997;11:463–475.
11. Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. *Int Rev Immunol* 2000;19:51–62.
12. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Nanamiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997;389: 990–994.
13. Wallace JL, MacNaughton WK, Morris GP, Beck PL. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989; 96:29–36.
14. Ameho CK, Adjei AA, Harrison EK, Takeshita K, Morioka T, Arakaki Y, Ito E, Suzuki I, Kulkarni AD, Kawajiri A, Yamamoto S. Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut* 1997;41:487–493.
15. Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Bourmeille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottière HM, Galmiche JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NF- κ B inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000;47:397–403.
16. Bull DM, Bookman MA. Isolation and functional characterization

- of human intestinal mucosal lymphoid cells. *J Clin Invest* 1977; 59:966–974.
17. Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, Chardin P, Paris S, Fiorentini C, Boquet P. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* 1997;387:729–733.
 18. Espevik T, Nissen-Meyer J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 1986;95:99–105.
 19. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science* 1997;278:860–866.
 20. Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M. Identification and characterization of an I κ B kinase. *Cell* 1997;90:373–383.
 21. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for the small GTP binding protein Rho. *EMBO J* 1996;15:2208–2216.
 22. Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 2000;275:21722–21729.
 23. Ren XD, Kiosses WB, Schwartz M. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* 1999;18:578–585.
 24. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 2000;351:95–105.
 25. Montaner S, Perona R, Saniger L, Lacal JC. Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases. *J Biol Chem* 1998;273:12779–12785.
 26. Knaus UG. Rho GTPase signaling in inflammation and transformation. *Immunol Res* 2000;21:103–109.
 27. Frost JA, Swantek JL, Stippes S, Yin MJ, Gaynor R, Cobb MH. Stimulation of NF κ B activity by multiple signaling pathways requires PAK1. *J Biol Chem* 2000;275:19693–19699.
 28. Hippenstiel S, Soeth S, Kellas B, Fuhrmann O, Seybold J, Krull M, Eichel-Streiber C, Goebeler M, Ludwig S, Sutorp N. Rho proteins and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells. *Blood* 2000;95:3044–3051.
 29. Cammarano MS, Minden A. I κ B and the Rho GTPases activate NF κ B by I κ B kinase (IKK)-dependent and IKK-independent pathways. *J Biol Chem* 2001;276:25876–25882.
 30. Singh R, Wang B, Shirvaikar A, Khan S, Kamat S, Schelling JR, Konieczkowski M, Sedor JR. The IL-1 receptor and Rho directly associate to drive cell activation in inflammation. *J Clin Invest* 1999;103:1561–1570.

Received June 7, 2002. Accepted January 27, 2003.

Address requests for reprints to: Gervaise Loirand, Ph.D., INSERM U-533, Faculté des Sciences, 2 Rue de la Houssinière, BP 92208, 44322, Nantes, France. e-mail: gervaise.loirand@nantes.inserm.fr or Jean-Pierre.Segain@sante.univ-nantes.fr; fax: (33) 2-51-12-56-14.

Supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Y-27632 was a gift from the Institut International de Recherche Servier.

The authors thank Dr. P. Boquet for the gift of cytotoxic necrotizing factor 1. The authors are grateful to Dr. C. H. Régnier for her helpful discussion and review of the manuscript.

J.-P. Segain and D. Raingeard de la Blétière contributed equally to this work.

VI. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La MC est une maladie invalidante du sujet jeune pour laquelle les stratégies thérapeutiques courantes étaient limitées à l'utilisation d'anti-inflammatoires stéroïdiens en traitement d'attaque et d'immunosuppresseurs non spécifiques (azathioprine et méthotrexate) en traitement d'entretien. L'irruption récente des anticorps monoclonaux anti-TNF- α (infliximab) pour le traitement des formes sévères de MC a confirmé que les thérapies biologiques prenaient une part concrète dans le traitement des MICI. Les thérapies biologiques sont directement issues des recherches en physiopathologie et en biologie cellulaire qui ont permis d'identifier des messages moléculaires et des cibles cellulaires dont l'inactivation ou au contraire l'amplification a un impact thérapeutique. Dans ce travail, nous avons évalué les propriétés immunorégulatrices et anti-inflammatoires de produits biologiques à l'aide d'une approche intégrée utilisant des modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*.

Dans la première partie, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'IL-10 sur les fonctions de présentation antigénique des cellules épithéliales digestives. Au début de ce travail, il semblait que l'IL-10 était une cytokine de type Th2 pouvant être, dans un modèle d'inflammation de type Th1 comme la MC, une cytokine anti-inflammatoire ouvrant de nombreuses perspectives thérapeutiques. Par ailleurs, il avait été démontré que l'IL-10 pouvait modifier les fonctions de présentation antigénique de plusieurs CPA et diminuer voir inhiber l'activation et la prolifération de lymphocytes effecteurs CD4⁺ et CD8⁺. Ces propriétés étaient en partie secondaires à la diminution de l'expression membranaire des molécules associées à la présentation antigénique et de co-stimulation nécessaires à une activation optimale des lymphocytes effecteurs. Compte tenu du rôle accessoire de CPA des cellules épithéliales digestives, il était cohérent d'évaluer l'effet de l'IL-10 sur cette fonction. Nous avons dans

cette étude, montré que les cellules épithéliales digestives de lignées cancéreuses coliques différenciées ou non comme les cellules SW1116, HT-29 et T84 fixaient au même titre que les cellules lymphocytaires THP1 et Jurkat, l'IL-10 biotinylée témoignant de la présence d'un récepteur à l'IL-10. De plus, plus de la moitié des cellules épithéliales coliques (CD3-, CD4-, CD8-, CD64-) fraîchement isolées de la muqueuse colique fixaient également l'IL-10 biotinylée. De façon plus surprenante, l'expression de l'ARNm du récepteur de l'IL-10 n'était retrouvée que dans les cellules SW1116 et les cellules coliques non cancéreuses, ceci pouvant témoigner de la présence d'un récepteur tronqué ou muté dans la région amplifiée sur les autres lignées cellulaires ou d'un second type de récepteur non identifié. Le caractère fonctionnel d'un récepteur à l'IL-10 exprimé sur les cellules épithéliales digestives a été retrouvé par d'autres équipes avec des effets sur la prolifération cellulaire que nous n'avions pas constaté (Panja et al., 1996).

Les cellules coliques exprimaient spontanément, ou après stimulation par le LPS et l'IFN- γ , les molécules associées à la présentation antigénique du CMH de classe I et II (HLA-DR) témoignant de leur rôle potentiel de CPA déjà connu (Brantzaeg et al., 1992. Kaiserlian et al., 1989. Hershberg et al., 1997). Contrairement à d'autres CPA, l'IL-10 ne modifiait pas l'expression du HLA-DR et des molécules de co-stimulation ICAM-1 et CD80 sur nos lignées cellulaires. Cependant, nous n'avons pas évalué l'effet de l'IL-10 sur d'autres lignées coliques ni sur d'autres molécules de co-stimulation en particulier le CD1d. Il avait été démontré que les cellules épithéliales digestives pouvaient réguler l'activation de lymphocytes T par l'intermédiaire de cette molécule (Panja et al., 1993).

L'absence d'effet de l'IL-10 sur les modèles cellulaires et les fonctions que nous avons choisi d'étudier n'est pas incompatible avec un effet de l'IL-10 plutôt orienté vers des CPA professionnelles comme les macrophages ou les cellules dendritiques. A la même période, plusieurs essais thérapeutiques utilisant de l'IL-10 recombinante humaine ont montré

des résultats décevants au cours de la MC et ont surtout confirmé que l'action de l'IL-10 n'était pas uniquement anti-inflammatoire mais pléiotropique avec des effets à la fois anti- et pro-inflammatoires.

Depuis, il a été montré que l'IL-10 pouvait induire la différenciation des lymphocytes vers un phénotype régulateur et que ces lymphocytes sécrétaient eux mêmes de fortes concentrations d'IL-10 à l'origine d'une inactivation des lymphocytes effecteurs. Les études dans le modèle de souris SCID ont montré que la ré-injection de ces lymphocytes régulateurs chez la souris inflammée pouvait inhiber ou empêcher la colite (Groux et al. 1997). Une autre équipe a démontré dans le même modèle, que l'injection de lymphocytes transfectés par des rétrovirus produisant de l'IL-10 à forte concentration pouvait diminuer l'intensité de l'inflammation (van Montfrans et al., 2002). Dans les années à venir, l'IL-10 pourrait être utilisée en thérapie cellulaire en mettant à profit ses propriétés régulatrices. Les lymphocytes circulants de patients atteints de MC pourraient être isolés du sang total, cultivés et activés en présence de CPA, d'un antigène spécifique et d'IL-10. Après clonage et prolifération de lymphocytes régulateurs, ils pourraient être ré-injectés aux patients donneurs.

En aval des mécanismes de présentation antigénique, nous avons évalué les propriétés du RDP58 dans un modèle de colite au TNBS et sur la production de cytokines par des biopsies coliques et des LPMNC de patients atteints de MC active. Nous avons montré que le RDP58 inhibait la production de TNF par les biopsies et les LPMNC et qu'il était efficace pour le traitement oral d'un modèle de colite expérimentale chez le rat.

Le rôle central du TNF- α au cours de l'inflammation dans la MC a été illustré par différentes études *in vitro*, chez l'animal et chez l'homme et par l'efficacité des anticorps monoclonaux anti-TNF- α . Ceci a abouti au développement de plusieurs stratégies d'inhibition du TNF- α à différents niveaux : traduction, maturation du pro-TNF en protéine

mature par l'enzyme de conversion TACE (TNF- α converting enzyme) et enfin inactivation du TNF mature et actif par anticorps ou par des récepteurs solubles (etanercept, Sandborn WJ et al., 2001, onercept, Rutgeerts P et al., 2001). De façon inattendue, les différentes stratégies anti-TNF se sont révélées moins efficaces que l'infliximab sans que l'on ait d'explication certaine. Il a été suggéré que l'infliximab pourrait, outre empêcher le TNF circulant d'interagir avec son récepteur, induire l'apoptose de lymphocytes de type Th1 en se fixant sur le pro-TNF- α transmembranaire (van den Brande et al., 2003). Récemment, il a été démontré, dans la polyarthrite rhumatoïde, que les patients répondeurs à l'infliximab avaient une proportion plus importante de lymphocytes circulants régulateurs CD4+CD25+ que les patients non répondeurs (Ehrenstein et al., 2003).

Le RDP58 diminue la production de TNF par les biopsies et les LPMNC isolés de la muqueuse de patients atteints de MC à un niveau post traductionnel. Cette inhibition n'est pas suffisante pour envisager une efficacité thérapeutique chez l'homme. Cependant, nous avons montré que le traitement oral des rats inflammés par le RDP58 diminuait de façon significative les scores d'inflammation macroscopiques et histologiques chez les animaux traités. Cette amélioration allait de pair avec celle de l'état général des animaux prouvée par la prise de poids significativement plus importante que chez les animaux non traités. Bien que le décryptage des mécanismes du RDP58 nécessitent des études plus poussées, les résultats du RDP58 dans un autre modèle de colite induite par le DSS et correspondant plutôt à un modèle de RCH est en faveur d'une action non spécifique du RDP58 sur la réponse inflammatoire Th1 ou Th2 (Boismenu et al., 2002). Un des mécanismes d'action hypothétique du RDP58 est la modulation de l'activité enzymatique de HO-1. Cependant, malgré le rôle protecteur suggéré de HO-1 dans le modèle de colite au TNBS, il n'y a pas de preuve de son implication directe au cours des MICI chez l'homme. De plus la modulation de HO-1 par le RDP58 dans les modèles animaux de colite n'a pas été étudiée.

Le RDP58, en dépit de l'absence de mécanisme identifié, a fait l'objet de deux études de phase I et de phase II chez l'homme. Ces études ont confirmé la bonne tolérance clinique et biologique d'une administration orale répétée du peptide (Iyer et al., 2002) et suggèrent son efficacité dans la RCH (Travis et al., 2003).

La deuxième stratégie de thérapie logique pour la MC que nous avons évalué dans cette thèse est basée sur une approche de pharmacologie nutritionnelle. Le butyrate est une molécule dont les propriétés énergétiques spécifique du colonocyte ont orienté son utilisation gastroentérologique vers des pathologies limitées au colon comme la RCH. Nous avons montré que le butyrate agit sur la réponse immunitaire en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires TNf- α/β , Il-1 β et IL-6 par des LPMNC isolés de la muqueuse colique de patients atteints de MC. Cette diminution de production intéressait également le niveau d'expression des ARNm et pouvait être expliqué par une inhibition de NF- κ B *via* une inhibition de la dégradation d'I- κ B α . Cet effet stabilise le complexe I- κ B/NF- κ B et empêche la translocation de NF- κ B dans le noyau des cellules (Segain et al., 2000). Les propriétés anti-inflammatoires du butyrate ont été évaluées *in vivo* dans le modèle de colite au TNBS et il a été démontré que les lavements de butyrate étaient efficaces et diminuaient l'intensité de l'inflammation colique (Xing et al., 1998. Butzner et al., 1999. Segain et al. 2000). L'efficacité du butyrate dans un modèle animal d'inflammation Th1 a conduit à évaluer ses effets sur la balance Th1/Th2.

Dans des PBMC stimulés par le LPS, le butyrate diminuait la production d'IL-12 et inhibait l'activation de son facteur de transcription NF- κ B et inversement augmentait la production d'IL-10 et activait le facteur de transcription CREB suggérant son efficacité plus spécifique pour une inflammation de type Th1. De plus, le butyrate modifiait le phénotype de lymphocytes de type Th1 vers un phénotype de type régulateur produisant des concentrations

importantes d'IL-10 sans pouvoir modifier le phénotype de lymphocytes déjà orientés vers un phénotype de type Th2.

Le butyrate potentialisait l'effet anti-TNF de l'IL-10 de façon dose dépendante en induisant une sur-expression du récepteur à l'IL-10 sur les PBMC. Le butyrate pourrait être utilisé en co-traitement de l'IL-10 au cours de la MC permettant de potentialiser ses effets *in situ* comme cela a été démontré avec la dexaméthasone (Herfarth et al., 1998).

Les différentes propriétés du butyrate apportent des arguments à son utilisation au cours des MICI. Cependant, contrairement à ce qui a été réalisé au cours des essais cliniques, les effets du butyrate sur la réponse immunitaire oriente plutôt son utilisation dans la MC que dans la RCH. L'administration du butyrate chez l'homme peut se faire soit par voie locale en lavements, soit par voie orale ou IV. L'administration en lavement ne permet pas de contrôler le temps de contact, les concentrations du produit et le niveau d'atteinte dans le colon diminuant probablement son efficacité et empêchant une évaluation correcte. Par ailleurs, il s'agit d'une voie d'administration inadaptée au cours de la MC. Le butyrate peut être administré par voie orale (Vernia et al. 2000) ou par voie IV seul ou en association à de l'IL-10 afin de potentialiser ses propriétés anti-TNF.

Une alternative thérapeutique serait également une approche par thérapie cellulaire comparable à la stratégie utilisant l'IL-10. Cette approche serait de traiter *ex vivo* au butyrate des PBMC de patients, de façon à transformer leur phénotype Th1 en un phénotype "régulateur" sécrétant de l'IL-10 (Tr1 ou Th2), puis de les réinjecter. Une telle approche a montré des résultats positifs dans un modèle animal de sclérose en plaque, l'encéphalite auto-immune expérimentale (Dasgupta et al., 2003).

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons montré que la protéine RhoA et son effecteur ROK pourrait devenir une cible potentielle thérapeutique au cours de l'inflammation

digestive et particulièrement dans la MC. En effet, nous avons montré 1) que RhoA était activé dans la muqueuse digestive de patients atteints de MC et dans la muqueuse colique des rats inflammés au TNBS, 2) que l'inhibition de ROK par un Y-27632 inhibait la production de cytokines pro-inflammatoires via l'inhibition de la dégradation de I- κ B et de l'activation de NF- κ B et 3) L'inhibition de ROK par l'administration orale de Y-27632 diminuait l'inflammation colique chez les rats traités au TNBS.

Les protéines de la famille Rho sont essentiellement connues pour leurs propriétés sur le cytosquelette et sur la polarisation des cellules. Leurs propriétés de régulation des facteurs de transcription de différents gènes dont ceux impliqués dans la réponse inflammatoire sont moins connues et les mécanismes impliqués sont controversés. Cependant d'autres études ont montré que RhoA pouvait activer la voie de signalisation NF- κ B (Montaner et al. 1998) *via* la phosphorylation et la dégradation de I- κ B permettant la transmigration de NF- κ B dans le noyau. Un argument supplémentaire mais indirect apporté par notre travail est la production de TNF par des PBMC traités par le CNF-1 (Cytotoxic Necrotizing factor-1). Le CNF-1 aboutit à l'activation continue de RhoA et induisait de façon dose et temps dépendante la production de TNF pour lequel NF- κ B permet la transcription du gène. Cette production était inhibée par le Y-27632. RhoA pourrait également activer NF- κ B via l'IL-1 β . L'IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans de nombreux processus infectieux ou non. L'IL-1 interagit avec son récepteur l'IL-1R qui forme un complexe de plusieurs sous-unités présent sur tous les types cellulaires. Les voies de signalisation activées par l'IL-1 sont multiples et incomplètement connues et impliquent de nombreuses kinases permettant l'activation entre autres voies de NF- κ B. Il a été montré que RhoA se liait physiquement à l'IL-1R et était activé par l'interaction de l'IL-1 sur son récepteur (Singh et al., 1999). De façon concordante, nous avons montré que l'IL-1 β entraînait la formation d'un complexe RhoA- IKK permettant

l'activation de IKK qui en réponse induisait la phosphorylation et la dégradation du facteur inhibiteur I- κ B et permettait ainsi le passage de NF- κ B dans le noyau.

RhoA est activée dans la muqueuse de patients atteints de MC et dans la muqueuse des rats inflammés par le TNBS. Il est connu de longue date que des toxines bactériennes peuvent réguler l'activation des protéines Rho comme la toxine B du clostridium difficile (inhibitrice) ou le CNF-1 (activateur). L'activation de RhoA peut être secondaire à d'autres stimuli. Compte tenu du rôle important de la flore digestive dans l'induction et la poursuite de l'inflammation, il est concevable de supposer que le LPS ou des fragments de plus petite taille (MDP) pourraient activer RhoA ce qui a été suggéré dans d'autres études (Monick et al., 2003). Quoiqu'il en soit, notre étude suggère que ROK joue un rôle dans la réponse inflammatoire digestive et que les inhibiteurs de ROK pourraient grossir les possibilités thérapeutiques. De nouveaux travaux sont nécessaires pour confirmer les résultats obtenus et pour étudier les mécanismes et les voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

En conclusion, l'amélioration des connaissances dans la physiopathologie des MICI a permis et permettra dans un avenir proche de modifier et d'améliorer la prise en charge thérapeutique de nos patients. Le décryptage des mécanismes de régulation de l'inflammation digestive permet d'identifier des cibles moléculaires et des cibles cellulaires et d'envisager des stratégies thérapeutiques non conventionnelles.

VII. REFERENCES

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-93.
- Allez M, Brimmes J, Dotan I, Mayer L. Expansion of CD8+ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2002 ;123 :1516-26.
- Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res* 2000;261:44-51.
- Aspenström P. Effectors for the Rho GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:95-102.
- Baert F, Noman M, Vermeire S, van Assche G, d'Haens G, Carbonnez A, Rutgeerts P. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003;348:601-8.
- Barbier M, Attoub S, Joubert M, Bado A, Laboisse C, Cherbut C, Galmiche JP. Proinflammatory role of leptin in experimental colitis in rats benefit of cholecystokinin-B antagonist and beta-3 agonist. *Life Sci* 2001;69:567-80.
- Belkaid Y, Piccirilo CA, Mendez S, Shevach EM, Saks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002;420:502-7.
- Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, de Lagausie P. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 2003;52:840-6.

- Boismenu R, Chen Y, Chou K, El-Sheikh A, Buelow R. Orally administered RDP58 reduces the severity of dextran sodium sulphate induced colitis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:19-24.
- Bonen DK and Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:521-36.
- Bouma G, Oudkerk Pool M, Scharenberg JG, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Scheper RJ, Meuwissen SG, Pena AS. Differences in the intrinsic capacity of peripheral blood mononuclear cells to produce tumor necrosis factor alpha and beta in patients with inflammatory bowel disease and healthy controls. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:1095–100.
- Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3:521-33.
- Bourreille A, Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Siavoshian S, Valette G, Galmiche JP, Blottièrè HM. Lack of interleukin 10 regulation of antigen presentation-associated molecules expressed on colonic epithelial cells. *Eur J Clin Invest* 1999;29:48-55.
- Bourreille A, Doubremelle M, Raingeard de la Blétière D, Segain JP, Toquet C, Buelow R, Galmiche JP. RDP58, a novel immunomodulatory peptide with anti-inflammatory effects. A pharmacological study in trinitrobenzene sulphonic acid colitis and in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:526-32.
- Brandtzaeg P, Halstensen TS, Huitfeldt HS, Krajci P, Kvale D, Scott H, Thrane PS. Epithelial expression of HLA secretory component (poly-Ig receptor) and adhesion molecules in the human alimentary tract. *Ann NY Acad Sci* 1992;664:157-79.
- Breuer RI, Soergel KH, Laschner BA, Christ ML, Hanauer SB, Vanagunas A, Harig JM, Keshavarzian A, Robinson M, Sellin JH, Weinberg D, Vidican DE, Flemal KL,

Rademaker AW. Short chain fatty acid rectal irrigation for left-sided ulcerative colitis: a randomised, placebo controlled trial. *Gut* 1997;40:485-91.

- Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AMK, Soares MP. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000;192:1015-25.
- Butzner JD, Parmar R, Bell CJ, Dalal V. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. *Gut* 1996;38:568-73.
- Buyse M, Sitaraman SV, Liu X, Bado A, Merlin D. Luminal leptin enhances CD147/MCT1-mediated uptake of butyrate in the human intestinal cell line Caco-2BBE. *J Biol Chem* 2002;277:28182-90.
- Cammarano MS, Minden A. Db1 and the Rho GTPases activate NF κ B by I κ B kinase (IKK)-dependent and IKK-independent pathways. *J Biol Chem* 2001;276:25876-82.
- Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express Toll-like Receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 2003;197:403-11.
- Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1670-4.
- Cerf-Bensussan N. Système lymphoïde associé à l'intestin : rôle en situation normale et au cours de l'inflammation. In : *Traité de gastroentérologie*. Ed. Rambaud JC. Paris : Flammarion sciences, 2000. Chap 4 :55-73.
- Chamillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cellular Microbiol* 2003;5:581-92.

- Chamainard M, Philpott DJ, Girardin SE, Zouali H, Lesage S, Chareyre F, Sansonetti PJ. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3455-60.
- Chandrashekhar P, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T-cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003;299:1033-36.
- Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance : suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994;265:1237-40.
- Cho J, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, Pickles MR, Qin L, Fu Y, Mann JS, Kirschner BS, Jabs EW, Weber J, Hanauer SB, Bayless TM, Brant SR. Identification of a novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosome 1p, 3q and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7502-7.
- Clayberger C, Parham P, Rothbard J, Ludwig DS, Schoolnik G, Krensky AM. HLA-A2 peptides can regulate cytotoxicity by human allogeneic T lymphocytes. *Nature* 1987;330:763-5.
- Colombel JF, Rutgeerts P, Malchow H, Jacyna M, Nielsen OH, Rask-Madsen J, van Deventer SJH, Ferguson A, Desreumaux P, Forbes A, Goebes K, Melani L, Cohard M. Interleukin 10 (tenovil) in the prevention of postoperative recurrence of Crohn's disease. *Gut* 2001;49:42-6.
- Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Le Quintrec Y, Gendre JP. Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1996;110:424-31.
- Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP. Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology* 2001;120:1093-9.

- Cuff MA, Lambert DW, Shirazi-Beechey SP. Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol* 2002;539:361-71.]
- Cummings JH. Quantitating short chain fatty acid production in human. In Binder HJ, Cummings J, Soergel KH (eds). *Short chain fatty acids. Falk symposium* 1993:11-20.
- Cuturi MC, Josien R, Douillard P, Pannetier C, Cantarovitch D, Smit H, Menoret S, Pouletty P, Clayberger C, Soullillou JP. Prolongation of allogenic heart graft survival in rats by administration of a peptide (aa 75-84) from the alpha 1 helix of the first domain of HLA-B701. *Transplantation* 1995;59:661-9.
- Daniel P, Brazier M, Cerutti I, Pieri F, Tardivel I, Desmet G, Baillet J, Chany C. Pharmacokinetic study of butyric acid administered in vivo as sodium and arginine butyrate salts. *Clin Chim Acta* 1989;181:255-63.
- Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF. Presence of adherent *Escherichia Coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;115:1405-13.
- Dasgupta S, Zhou Y, Jana M, Banik NL, Pahan K. Sodium phenylacetate inhibits adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice at multiple steps. *J Immunol* 2003;170:3874-82.
- Desreumaux P, Brandt E, Gambier L, Emilie D, Geboes K, Ectors N, Cortot A, Capron M, Colombel JF. Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997;113:118-26.
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukine 10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-20.

- de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor CG, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of Class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991;174:915-24.
- D'Haens GR , Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 1998;114:262-7.
- Doubremelle M, Bourreille A, Zerbib F, Heresbach D, Metmam EH, Beau P, Gournay J, Galmiche JP. Traitement de la maladie de Crohn par anticorps anti-TNF-alpha : résultats d'une étude multicentrique et rétrospective. *Gastroenterol Clin Biol* 2002;26:973-9.
- Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Isenberg DA, Mauri C. Expansion of regulatory (CD4+CD25hi) T lymphocytes in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis who respond to anti-TNF therapy. *ACR* 2003:S240.
- Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;109:1344-67.
- Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. Inhibition of langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol* 1993;151:2390-98.
- Etienne-manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002;420:629-35.
- Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, Rutgeerts P, Schreiber S, Wild G, Hanauer SB, Kilian A, Cohard M, Lebeaut A, Feagan B. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000;119:1473-82.

- Fedorak RN, Nielsen OH, Williams CN, Malchow H, Forbes A, Stein B, Wild G, Lashner BA, Renner E, Buchman A, Hardi R. human recombinant interleukin 10 is safe and well tolerated but does not induce remission in steroid dependent Crohn's disease. *Gastroenterology* 2001;120:A127.
- Ferrier L, Mazelin L, Cenac N, Desreumaux P, Janin A, Dominique E, Colombel JF, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L. Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon- γ and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology* 2003;125:795-804.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease : etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205.
- Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996;157:1261-70.
- Ganesan S, Iyer S, Travis S, Roberts J, Buelow R, Jazrawi R. RDP58, a new oral inhibitor of TNF effectively treats primate models of colitis and is safe in man. *Gastroenterology* 2002;122:A6.
- Gao L, Woo J, Buelow R. Both L- and D-isomers of allotrap 2702 prolong cardiac allograft survival in mice. *J Heart Lung Transplant* 1996;15:78-87.
- Garcia CK, Goldstein JL, Pathak RK, Anderson RG, Brown MS. Molecular characterisation of a membrane transporter for lactate, pyruvate and other monocarboxylates : implication for the Cori cycle. *Cell* 1994;76:865-73.
- Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 1994;343:766-7.

- Gerondakis S, Grumont R, Rourke I, Grossmann M. The regulation and roles of Rel/NF-kB transcription factors during lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 1998;10:353-9.
- Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003;278:8869-72.
- Gower-Rousseau C, Salomez JL, Dupas JL, Marti R, Nuttens MC, Votte A, Lemahieu M, Lemaire B, Colombel JF, Cortot A. Incidence of inflammatory bowel disease in northern France (1988-1990). *Gut* 1994;35:1433-8.
- Grassy G, Calas B, Yasri A, Lahana R, Woo J, Iyer S et al. Computer-assisted rational design of immunosuppressive compounds. *Nat Biotechnol* 1998;16:748-52.
- Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996;184:19-29.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-42.
- Groux H, Cottrez F. The complex role of interleukin-10 in autoimmunity. *J Autoimmun* 2003;20:281-5.
- Guilmeau S, Nagain-Domaine C, Buyse M, Tsocas A, Roze C, Bado A. Modulation of exocrine pancreatic secretion by leptin through CCK(1)-receptors and afferent vagal fibres in the rat. *Eur J Pharmacol* 2002;447:99-107.
- Gutteriez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via Nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 2002 ; 277 :41701-5.

- Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Buckler A, Hall J, Stokkers P, van Deventer SJH, Numberg P, Mirza MM, Lee JC, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME. A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet* 1999;64:808-16.
- Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British population. *Lancet* 2001;357:1925-8.
- Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P;ACCENT1 study group. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002;359:1541-9.
- Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13 producing NK-Tcells. *Immunity* 2002;17:629-38.
- Herfarth HH, Böcker U, Janardhanam R, Sartor RB. Subtherapeutic corticosteroids potentiate the ability of interleukin-10 to prevent chronic inflammation in rats. *Gastroenterology* 1998;115:856-65.
- Hershberg RM, Framson PE, Cho DH, Lee LY, Kovats S, Beitz J, Blum JS, Nepom GT. Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing. *J Clin Invest* 1997;100:204-15.
- Hershberg RM, Cho DH, Youakim A, Bradley MB, Lee JS, Framson PE, Nepom GT. Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 1998;102:792-803.
- Hershberg RM, Mayer L. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells-polarity and complexity. *Immunol Today* 2000;21:123-8.

- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassul M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
- Hugot JP, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, Montague S, Gassul M, Christensen S, Finkel Y, Gower-Rousseau C, Modigliani R, Zouali H, Lesage S, Chamaillard M, Macry J, Thomas G, Victor JM. Clustering of Crohn's disease within affected sibships. *Eur J Hum Genet* 2003;11:179-84.
- Inohara N, Ogura Y, fontalba A, Guttierrez O, Pons F, Crespo J, Nunez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2: implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 278:5509-12.
- Iwasaki A, Kelsall BL. Unique functions of CD11b+, CD8a+ and double negative peyer's patch dendritic cells. *J Immunol* 2001;166:4884-90.
- Iyer S, Woo J, Cornejo MC, Gao L, Mc Coubrey W, Maines M et al. Characterization and biological significance of immunosuppressive peptide D2702.75-84 (E --> V) binding protein. Isolation of heme oxygenase-1. *J Biol Chem* 1998;273:2692-7.
- Iyer S, Kontoyiannis D, Chevrier D, Woo J, Mori N, Cornejo M, Kollias G, Buelow R. Inhibition of tumor necrosis factor mRNA translation by a rationally designed immunomodulatory peptide. *J Biol Chem* 2000;275:17051-7.
- Iyer S, Lahana R, Buelow R. Rational design and development of RDP58. *Cur Pharm Des* 2002;8:2217-29.
- Joossens S, Reinisch W, Vermeire S, Sendid B, Poulain D, Peeters M, Geboes K, Bossuyt X, Vandewalle P, Oberhuber G, Vogelsang H, Rutgeerts P, Colombel JF. The

value of serologic markers in indeterminate colitis: a prospective follow-up study. *Gastroenterology* 2002;122:1242-7.

- Kaiserlian D, Vidal K, Revillard JP. Murine enterocytes can present soluble antigen to specific class II-restricted CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1989;19:1513-6.
- Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewski K, Muller W. Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-74.
- Khun R, Rennick DM, Fort MM. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10 deficient mice and intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:828-33.
- Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G. Crohn's disease and the NOD2 gene : a role for Paneth cells. *Gastroenterology* 2003;125:47-57.
- Laharie D, Debeugny S, Peeters M, van Gossum A, Gower-Rousseau C, Belaiche J, Fiasse R, Dupas JL, Lerebours E, Piotte S, Cortot A, Vermeire S, Grandbastien B, Colombel JF. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology* 2001;120:816-9.
- Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassul M, Binder V, Finkel Y, Modiglianni R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002;70:845-57.
- Li N, Karin M. Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms. *Proc Natl Sci USA* 1998;95:13012-7.

- Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF. Immunocytochemical evidence of listeria, escherichia coli and streptococcus antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995;108:1396-404.
- Ma Y, Ohmen JD, Li Z, Bentley LG, McElree C, Pressman S, Targan SR, Fischel-Ghodsian N, Rotter JI, Yang H. A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:271-8.
- Mackay D, Hall A. Rho GTPases. *J Biol Chem* 1998;273:20685-88.
- Magee CC, Azuma H, Knoflach A, Denton MD, Chandraker A, Iyer S, Buelow R, Sayegh M. In vitro and in vivo immunomodulatory effects of RDP1258, a novel synthetic peptide. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1997-2005.
- Maines MD. The heme oxygenase system : a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-54.
- Monick MM, Powers LS, Butler NS, Hunninghake GW. Inhibition of Rho family GTPases results in increased TNF-alpha production after lipopolysaccharide exposure. *J Immunol* 2003;171:2625-30.
- Montaner S, Perona R, Saniger L, Lacal JC. Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kB by the Rho family of GTPases. *J Biol Chem* 1998;273:12779-85.
- Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Luzzza F, Pallone F. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 1997;112:1169-78.
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96:795-803.

- Mortensen RB, Clausen MR. Short-chain fatty acids in the human colon : relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol* 1996;216:132-48.
- Mosman TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.
- Murthy S, Flanigan A, Coppola D, Buelow R. RDP58, a locally active TNF inhibitor, is effective in the dextran sulphate mouse model of chronic colitis. *Inflamm Res* 2002;51:522-31.
- Neurath M, Fuss I, Kelsall D, Waegall W, Strober W. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF- β -mediated oral tolerance. *J Exp Med* 1996;183:2605-16.
- Neurath M, Fuss I, Pasparakis M, Alexopoulou L, Haralambous S, Meyer zum Buschenfelde KH. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol* 1997;27:1743-50.
- Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. *Intern Rev Immunol* 2000;19:51-62.
- Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, Glickman J, Nieuwenhuis E, Lijima H, Mizoguchi E, Mudter J, Galle PR, Bhan A, Autschbach F, Sullivan BM, Szabo SJ, Glimcher LH, Blumberg RS. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med* 2002;195:1129-43.
- Noguchi M, Hiwatashi N, Liu Z, Toyota T. Secretion imbalance between tumour necrosis factor and its inhibitor in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;43:203-09.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.

- Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, Zimmermann E, Tretiakova M, Cho JH, Hart J, Greenson JK, Keshav S, Nuñez G. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003;52:1591-7.
- Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;324:84-8.
- O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002 : new surprises in the Jack/Stat pathway. *Cell* 2002;109:121-31.
- O'Shea JJ and Paul WE. Regulation of Th1 differentiation-controlling the controllers. *Nature Immunol* 2002;6:506-8.
- Pagenault M, Tron I, Alexandre JL, Cruchant E, Dabadie A, Chaperon J, Robaszkiewicz M, Bretagne JF. Incidence of inflammatory bowel diseases in Bretagne (1994-1995). ABERMAD. Association Bretonne d'Etude et de Recherche des maladies de l'Appareil Digestif. *Gastroenterol Clin Biol* 1997;21:483-90.
- Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853-66.
- Panja A, Blumberg RS, Balk SP, Mayer L. CD1d is involved in T cell-intestinal epithelial cell interactions. *J Exp Med* 1993;178:1115-9.
- Panja A, Krishen P, Mayer L. Expression of IL-10 receptors on human intestinal epithelial cells and its functional consequences. *Gastroenterology* 1996;110:A986.
- Parham P, Clayberger C, Zom SL, Ludwig DS, Schoolnik GK, Krensky AM. Inhibition of alloreactive cytotoxic T lymphocytes by peptides from the alpha2 domain of HLA-A2. *Nature* 1987;325:625-8.

- Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer AM, Vlietinck P, Rutgeerts P. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology* 1996;111:597-603.
- Plevy SE, Targan SR, Deem RL. Increased mucosal TNF- α levels and numbers of TNF- α producing cells are unique to Crohn's disease mucosal inflammation. *Gastroenterology* 1995;106:A754.
- Present DH, Rutgeerts P, Targan SR, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, deWoody KL, Schaible TF, van Deventer SJH. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999;340:1398-05.
- Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Baumann R, Poindron P, Duclos B. Increased production of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut* 1996;39:684-9.
- Revillard JP. L'immunité innée. *Médecine thérapeutique*. 2001;7:313-7.
- Ribbons KA, Zhang XJ, Thompson JH, Greenberg SS, Moore WM, Kornmeier CM, Currie MG, Lerche N, Blanchard J, Clark DA. Potential role of nitric oxide in a model of chronic colitis in rhesus macaques. *Gastroenterology* 1995;108:705-11.
- Ridley AJ. Rho proteins, PI 3-kinases and monocytes/macrophage motility. *FEBS letter* 2001;498:168-71.
- Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB, Bitton A, Williams CN, Greenberg GR, Cohen Z, Lander ES, Hudson TJ, Siminovitch KA. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2000;66:1863-70.

- Roediger W. The colonic epithelium in ulcerative colitis : an energy-deficiency disease ? *Lancet* 1980;2:712-5.
- Roediger WE. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 1982;83:424-9.
- Rutgeerts P, Lemmens L, van Assche G, Noman M, Berghini-Fuhrer I, Goedkoop R. recombinant soluble p55 receptor induces remission, is non immunogenic and well tolerated in active Crohn's disease: results of a randomized pilot trial. *Gastroenterology* 2001;120:A452.
- Rutgeerts P, Hiele M, Geboes K, Peeters M, Penninckx F, Aerts R, Kerremans R. Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's disease recurrence after ileal resection. *Gastroenterology* 1995;108:1617-21.
- Russel MG, Pastoor CJ, Janssen KM, van Deursen CT, Muris JW, van Wijlick EH, Stockbrugger RW. Familial aggregation of inflammatory bowel disease: a population-based study in South Limburg, The Netherlands. The South Limburg IBD study group. *Scand J Gastroenterol* 1997;223:88-91.
- Sakagushi S. Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells that express Toll-like Receptors. *J Exp Med* 2003;197:397-401.
- Salomon B, Bluestone JA. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 2001;19:225-52.
- Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S Safdi M, Wolf DG, Baerg RD, Tremaine WJ, Johnson T, Diehl NN, Zinsmeister AR. Etanercept for active Crohn's disease:a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2001;121:1088-94.
- Sandborn WJ, Targan SR. Biologic therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:1592-608.

- Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Tewilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996;14:199-202.
- Scheppach W, Sommer H, Kirchner T, Paganelli GM, Bartram P, Christl S, Richter F, Dusel G, Kasper H. Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1992;103:51-56.
- Scheppach W. Treatment of distal ulcerative colitis with short chain fatty acid enemas. A placebo-controlled trial. German-Austria SCFA Study Group. *Dig Dis Sci* 1996;41:2254-9.
- Schmidt C, Marth T, Wittig BM, Hombach A, Abken H, Stallmach A. Interleukin-12 antagonists as new therapeutic agents in inflammatory bowel disease. *Pathobiology*. 2002-2003;70:177-83.
- Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, Wild G, Williams CN, Nikolaus S, Jacyna M, Lashner BA, Gangl A, Rutgeerts P, Isaacs K, van Deventer SJH, Koningsberger JC, Cohard M, Lebeaut A Hanauer SB. Safety and efficacy of human recombinant interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000; 119:1461-72.
- Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000;47:397-403.
- Shanahan F. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:107-15.
- Shao L, Serrano D, Mayer L. The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. *Semin Immunol* 2001;13:163-76.

- Scheinmann RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS. Role of transcription activation of I κ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995;270:283-6.
- Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe : is there a difference between North and South ? *Gut* 1996;39:690-7.
- Siavoshian S, Blottière HM, Bentouimou N, Cherbut C, Galmiche JP. Butyrate enhances major histocompatibility complex class I and HLA-DR antigen expression on differentiated human intestinal epithelial cells. *Eur J Clin Invest* 1996;26:803-10.
- Singh B, Read S, Asseman C, Malmström V, Mottet C, Stephens LA, Stepankova R, Tlaskalova H, Powrie F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev* 2001;182:190-200.
- Singh R, Waang B, Shirvaikar A, Khan S, Kamat S, Schelling JR, Konieczkowski M, Sedor JR. The IL-1 receptor and Rho directly associate to drive cell activation in inflammation. *J Clin Invest* 1999;103:1561-70.
- Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* 1991;100:143-9.
- Souleimani A, Asselin C. Regulation of C-fos expression by sodium butyrate in the human colon carcinoma cell line Caco-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:330-6.
- Steinhart AH, Brzezinski A, Baker JP. Treatment of refractory ulcerative proctosigmoiditis with butyrate enemas. *Am J Gastroenterol* 1994;89:179-83.

- Stuber E, Strober W, Neurath M. Blocking the CD40-CD40L interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of Interleukin 12 secretion. *J Exp Med* 1996;183:693-8.
- Subhani J, Montgomery SM, Ounder RE, Wakefield AJ. Concordance rates of twins and siblings in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42:A40.
- Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD4+CD25+ naturally anergic and suppressive T-cells : induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10:1969-80.
- Tamboli CP, Cortot A, Colombel JF. What are the major arguments in favour of the genetic susceptibility for inflammatory bowel disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:587-92.
- Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJH, Mayer L, Present DH, Braakman T, deWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts P. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. *N Engl J Med* 1997;337:1029-35.
- Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a british twins study. *BMJ* 1996;312:95-6.
- Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick D. Interleukin-10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J Exp Med* 1991;173:507-10.
- Tig H, van Montfrans C, van den Ende A, Kaser A, van Deventer SJH, Schreiber S, Gregor M, Ludwiczek O, Rutgeerts P, Gasche C, Koningsberger JC, Abreu L, Kuhn I, Cohard M, Lebeaut A, Grint P, Weiss G. Treatment of Crohn's disease with recombinant human IL-10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. *Gut* 2002;50:191-5.

- Travis SPL, Yap L, Hawkey CJ, Lazarov M, Fong T, Warren BF, Tesi RJ. RDP58, a novel and effective oral therapy for ulcerative colitis: results of parallel, prospective, multicentre, placebo-controlled trials. United European Gastroenterology Week, Madrid, Espagne 2003;G21.
- Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29:990-6.
- van den Brande JM, Braat H, van den Brinck GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hoedemaeker I, van Montfrans C, Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJH. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003;124:1774-85.
- van Deventer SJH, Elson CO, Fedorak RN. Multiple doses of intravenous interleukin-10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's disease study group. *Gastroenterology* 1997;113:383-89.
- van Montfrans C, Hooijberg E, Rodriguez Pena M, de Jong E, Spits H, te Velde A, van Deventer SJH. Generation of regulatory gut-homing human T lymphocytes using ex vivo interleukin 10 gene transfer. *Gastroenterology* 2002;123:1877-88.
- van Montfrans C, Rodriguez Pena M, Pronk I, ten Kate FJW, te Velde A, van Deventer SJH. Prevention of colitis by interleukin-10 transduced T lymphocytes in the transfer model. *Gastroenterology* 2002;123:1865-76.
- Vernia P, Cittadini M, Caprilli R, Torsoli A. Topical treatment of refractory distal ulcerative colitis with 5-ASA and sodium butyrate. *Dig Dis Sci* 1995;40:305-7.
- Vernia P, Marcheggiano A, Caprilli R, Frieri G, Corrao G, Valpiani D, di Paolo MC, Paoluzi P, Torsoli A. Short-chain fatty acid topical treatment in distal ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1995;27:117-21.

- Vernia P, Monteleone G, Grandinetti G, Villotti G, di Giulio F, Frieri G, Marcheggiano A, Pallone F, Caprilli R, Torsoli A. Combined oral sodium butyrate and mesalazine treatment compared to oral mesalazine alone in ulcerative colitis :a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Dig Dis Sci* 2000;45:976-81.
- Vezys V, Olson S, Lefrancois L. Expression of Intestine-specific antigen reveals novel pathways of CD8 T cell tolerance induction. *Immunity* 2000;12:505-14.
- Vora M, Yssel H, de Vries JE, Karasek MA. Antigen presentation by human dermal microvascular endothelial cells. Immunoregulatory effect of IFN- γ and IL-10. *J Immunol* 1994;152:5734-41.
- Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM. Sulfasalazine : a potent and specific inhibitor of NF-kB. *J Clin Invest* 1997;101:1163-74.
- Wakefield AJ, Ekobom A, Dhillon AP, Pitillo RM, Pounder RE. Crohn's disease : pathogenesis and persistent measles virus infection. *Gastroenterology* 1995;108:911-6.
- Wallace JL, MacNaughton WK, Morris GP, Beck PL. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammation bowel disease. *Gastroenterology* 1989;96:29-36.
- Wang WP, Guo X, Koo MWL, Wong BCY, Lam SK, Ye YN, Cho CH. Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:586-94.
- Weigmann B, Neurath MF. T-bet and mucosal Th1 responses in the gastrointestinal tract. *Gut* 2002;51:301-3.

- Xing JH, Cherbut C, Joubert M, Blottière HM, Galmiche JP. Short chain fatty acid propionate and the role of beta-oxidation of butyrate in rat experimental colitis. *Gastroenterology* 1998;114:A1118.
- Xu D, Liu LH, Komai-Koma M, Campbell C, Mc Sharry C, Alexander J, Liew FY. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania major* infection and colitis in mice. *J Immunol* 2003;170:394-9.
- Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001;107:135-42.
- Zandi E and Karin M. Bridging the gap : composition, regulation and physiological function of I κ B kinase complex. *Mol Cell Biol* 1999;19:4547-51.
- Zhu J, Guo L, Watson CJ, Hu-Li J, Paul WE. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol* 2001;166:7276-81.

**TITRE DE LA THESE : IMMUNOMODULATION ET THERAPIE
EXPERIMENTALE AU COURS DES MALADIES INFLAMMATOIRES
CHRONIQUES INTESTINALES.**

RESUME DE LA THESE : La maladie de Crohn (MC) est caractérisée par une réponse de type Th1. Le TNF et l'IL-10 ont été identifiées comme des cibles thérapeutiques. Le but de cette thèse était d'identifier les mécanismes d'action d'agents pharmaco-nutritionnels.

Le butyrate est la principale source d'énergie du colonocyte. Nous avons démontré que le butyrate chez des patients atteints de MC, diminuait la production de TNF en inhibant la transcription de NF- κ B. Le butyrate agissait négativement sur l'induction d'une réponse de type Th1 en bloquant la production d'IL-12 et en stimulant la production d'IL-10 via une inhibition et une activation de NF- κ B et CREB respectivement.

Le RDP58 est un peptide dérivé de la chaîne lourde de la molécule HLA de classe I. Il a été démontré que ces peptides pouvaient moduler la réponse immunitaire *in vivo* et *in vitro*. Nous avons démontré que le RDP58 diminuait la production de TNF- α et d'Interferon- γ chez des patients atteints de MC. La diminution de la production de cytokines par les biopsies coliques inflammées intervenait à un niveau post transcriptionnel. Par ailleurs, le RDP58 était efficace en traitement oral dans un modèle de colite chez le rat. Nous avons montré que l'IL-10 ne modifiait pas l'expression des molécules associées à la présentation antigénique à la surface des cellules épithéliales digestives. RhoA-kinase est impliquée dans l'inflammation digestive et son inhibition spécifique diminue l'intensité de la colite expérimentale induite par le TNBS chez le rat.

En conclusion, les propriétés et les mécanismes d'action du butyrate, du RDP58 suggèrent leur efficacité potentielle dans le traitement de la MC.

MOTS CLES :

CROHN, RECTO-COLITE HEMORRAGIQUE, MALADIE INFLAMMATOIRE CHRONIQUE INTESTINALE, REponse IMMUNITAIRE TH1, BUTYRATE, RDP58.

IMMUNOMODULATION AND EXPERIMENTAL THERAPY IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

ABSTRACT : Crohn's disease (CD) is an inflammatory bowel disease characterized by a Th1 immune response. Modulation of production of TNF and IL-10 were identified as potential therapeutic option. The aims of this study were to identify the immunomodulation properties of several pharmaconutritional compounds. Butyrate is the most abundant source of energy of colonocytes and moreover, it was suggested that butyrate could have immunomodulatory properties. In this study, it was demonstrated that butyrate decreased TNF production and pro-inflammatory cytokine mRNA expression in CD patients abolishing LPS-induced transmigration of NF-kB. Moreover, Butyrate down regulated IL-12 expression and up regulated IL-10 expression in LPS-stimulated peripheral blood mononuclear cells.

RDP58, a novel immunomodulatory peptide, is derived from the heavy chain of the HLA Class I molecule. We have demonstrated that RDP58 led to decreased TNF and IFN-g but not IL-1beta production in CD patients. Moreover, in rats with Trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis, oral RDP58 therapy improved macroscopic and histological inflammation scores.

IL-10 inhibits the antigen specific proliferative response of T cells when several antigen presenting cells are used in decreasing antigen presentation associated molecules. Colonic epithelial cells may behave as antigen-presenting cells. We have demonstrated that intestinal epithelial cells expressed IL-10 receptor but IL-10 failed to modulate antigen presentation associated molecules. RhoA-kinase is involved in the inflammatory process of CD and specific inhibition of ROK decreased inflammation in TNBS experimental colitis in rats.

Our results suggested that Butyrate, RDP58 and ROK inhibition may be effective therapy for CD.

KEYWORDS :

CROHN'S DESEASE, ULCERATIVE COLITIS, INFLAMMATORY BOWEL DISEASE, Th1 IMMUNE RESPONSE, BUTYRATE, RDP58, RHOA-KINASE.