

**Université de Montréal**

**Étude génétique et fonctionnelle des gènes de la région 14q31 associée aux  
maladies inflammatoires de l'intestin**

**par Virginie Mercier**

**Département de Sciences biomédicales, Faculté de Médecine**

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de  
Maître en Sciences Biomédicales option Générale

Décembre, 2015

©, Virginie Mercier, 2015



## Résumé

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MIIs) comprennent la colite ulcéreuse (CU) et la maladie de Crohn (MC). Elles résultent en l'inflammation chronique du tractus gastro-intestinal. Des études d'association pan-génomiques ont associé le locus 14q31, incluant les gènes *galactosylceramidase (GALC)* et *G protein-coupled receptor 65 (GPR65)*, à ces pathologies. Nous avons déterminé que le variant le plus associé aux MIIs de cette région (rs8005161;  $p=2,35 \times 10^{-14}$ ) est parfaitement corrélé ( $r^2=1$ ) à un variant codant dans le gène *GPR65* (rs3742704: Ile231Leu). *GPR65* code pour un récepteur couplé à des protéines G (RCPG) senseur de pH. Nous avons observé que *GPR65* est exprimé dans les tissus lymphoïdes et mucoïdes en plus des lignées cellulaires immunitaires et des cellules immunes primaires humaines. Son expression augmente significativement dans les biopsies inflammées de patients atteints de la CU comparativement à des biopsies non-inflammées ou à des biopsies d'individus sains. *GPR65*, lorsqu'activée par un pH acide, stimule l'accumulation d'AMPc, la formation de fibres de stress et l'activation de la voie RhoA. *GPR65* semble donc être un bon candidat pour l'étude de l'étiologie des MIIs. Nos objectifs étaient donc de définir les voies découlant de l'activation de *GPR65* et d'évaluer l'impact de *GPR65\*231Leu* sur ces voies. Nous avons utilisé des HEK293 exprimant de façon stable l'une ou l'autre des deux allèles de *GPR65* et déficientes pour *Gas/olf*, *Gaq/11* ou *Gα12/13* puisqu'il est connu que *Gas/olf* activent l'adénylate cyclase, *Gaq/11* mènent au relâchement de  $Ca^{2+}$  intracellulaire et peuvent activer certaines isoformes de l'adénylate cyclase et *Gα12/13* régulent le remodelage du cytosquelette d'actine. Nous avons démontré que l'accumulation d'AMPc dépendante de l'activation de *GPR65* par un pH acide est causée, au moins en partie, aux voies *Gas/olf* et peu ou pas aux voies *Gaq/11*. Il ne semble pas y avoir un effet du variant *GPR65\*231Leu* sur ces voies. Cependant, nous avons observé que le variant *GPR65\*231Leu* réduit la formation de fibres de stress et inhibe l'accumulation d'actine filamenteuse (F-actine) dépendantes de l'activation de *GPR65* par un pH acide. Des données préliminaires nous montrent que la formation de fibres de stress est causée, au moins en partie, aux voies *Gα12/13*. En conclusion, nous avons démontré que *GPR65* active les voies *Gas/olf* et *Gα12/13* et que le variant codant associé aux MIIs altère le remodelage de l'actine. *GPR65* pourrait donc potentiellement avoir un rôle dans la pathologie des MIIs.

Mots-clés : maladies inflammatoires de l'intestin, génétique, 14q31, GPR65, GALC, récepteur couplé à des protéines G, AMP cyclique, cytosquelette d'actine, pH acide

## Abstract

Inflammatory bowel diseases, mainly comprising of ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), result in the chronic inflammation of the gastrointestinal tract. Genome-wide association studies have associated the 14q31 locus, including the genes *galactosylceramidase (GALC)* and *G protein-coupled receptor 65 (GPR65)*, to those phenotypes. The most associated variant in this region for IBD (rs8005161;  $p=2,35 \times 10^{-14}$ ) is correlated ( $r^2=1$ ) to a missense coding variant of *GPR65* (rs3742704: Ile231Leu). *GPR65* encodes a pH-sensing G protein-coupled receptor (GPCR). We observed that *GPR65* is expressed in lymphoid and mucosal tissues as well as in immune cell lines and human primary immune cells. We also found that its expression is significantly increased in inflamed biopsies from UC patients compared to non-inflamed biopsies and biopsies from healthy controls. Upon activation by low pH, GPR65 stimulates accumulation of cAMP, formation of stress fibers and activation of the RhoA pathway. Thus *GPR65* is a good candidate causal gene for the IBD pathology. Our objective, therefore, was to define pathways downstream of activation of GPR65 and to evaluate the impact *GPR65\*231Leu* on these pathways. We used HEK 293 cells stably expressing one or the other allele of *GPR65* and deficient for either *Gas/olf*, *Gaq/11* or *Gα12/13* as it is known that *Gas/olf* activates adenylyl cyclase, *Gaq/11* leads to the release of intracellular  $Ca^{2+}$ , which can also activate certain isoforms of adenylyl cyclase, and that *Gα12/13* regulates actin cytoskeletal remodeling. We demonstrated that cAMP accumulation upon activation of GPR65 is, at least partly, due to the *Gas/olf* pathway and only slightly or not at all to the *Gaq/11* pathway. The coding variant, however, does not appear to have an effect on that pathway. In contrast, we observed that *GPR65\*231Leu* variant reduces the GPR65-dependent stress fiber formation and inhibits the increase of filamentous actin (F-actin) content versus free globular-actin (G-actin) upon activation by low pH. Also, preliminary data showed that the stress fiber formation in HEK293 cells is due to the *Gα12/13* pathways. In conclusion, we demonstrate that GPR65 activates both *Gas* and *Gα12/13*, the coding variant alters the actin remodeling pathway and that GPR65 potentially has a causal role in IBD.

Keywords: inflammatory bowel disease, genetic, 14q31, GPR65, GALC, G protein-coupled receptor, cyclic AMP, actin cytoskeleton, acidic pH



Table des matières	
Résumé .....	i
Abstract.....	iii
Table des matières .....	v
Liste des tableaux .....	ix
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations .....	xi
Remerciements .....	xv
Introduction	1
1. Le système digestif et son système immunitaire	1
1.1. Le système digestif .....	1
1.2. Immunité innée .....	3
1.2.1. Les barrières physiques et biochimiques de l'intestin .....	4
1.2.2. Interactions entre l'épithélium et l'immunité innée .....	8
1.2.3. Réponse cellulaire de l'immunité innée .....	10
1.3. Immunité adaptative .....	16
1.4. Le microbiome.....	20
1.4.1. Généralités.....	20
1.4.2. Importance du microbiome dans le développement du système immunitaire.....	22
2. Les maladies inflammatoires de l'intestin	25
2.1. Généralités .....	25
2.1.1. Incidence.....	25
2.1.2. Caractéristiques .....	26
2.1.3. Facteurs de risques.....	28
2.1.4. Traitements .....	31

2.2.	Le système immunitaire dans les maladies inflammatoires de l'intestin .....	34
2.3.	Le microbiome.....	39
2.4.	Études génétiques .....	41
2.4.1.	Loci de susceptibilité dans les MIIs .....	43
2.4.2.	14q31 .....	43
2.4.2.1.	<i>GALC</i> .....	44
2.4.2.2.	<i>GPR65</i> .....	45
3.	Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)	46
3.1.	Généralités.....	46
3.1.1.	Rôles de l'AMPc dans les réponses immunitaires.....	49
3.1.2.	L'importance de l'actine dans différents processus cellulaire.....	50
3.2.	Le pH du système gastro-intestinal en santé et dans la maladie.....	53
3.2.1.	Effets du pH au niveau du système immunitaire.....	54
3.2.2.	Les RCPGs senseurs de pH .....	57
3.2.2.1.	GPR132 .....	57
3.2.2.2.	GPR68 .....	57
3.2.2.3.	GPR4 .....	58
3.2.2.4.	GPR65 .....	58
4.	Objectifs	60
5.	Matériel	61
5.1.	Lignées cellulaires .....	61
5.2.	Produits chimiques .....	61
5.3.	Milieu.....	61
5.3.1.	Culture cellulaire .....	61
5.3.2.	HEM-SSP .....	62

6.	Méthodes	62
6.1.	Clonage .....	62
6.1.1.	Séquençage .....	63
6.1.2.	Production de clones stables.....	63
6.2.	Isolation et dosage de l'ARN totaux.....	64
6.3.	Rétro-transcription.....	64
6.4.	PCR quantitatif (qPCR).....	64
6.5.	Puces à ARN.....	65
6.5.1.	Profils d'expression dans les tissus, lignées cellulaires et cellules primaires immunitaires .....	65
6.5.2.	Profils d'expression dans des biopsies de patients CU et contrôles sains .....	66
6.6.	Isolation de protéines.....	67
6.6.1.	Lysats totaux.....	67
6.6.2.	Enrichissement de protéines membranaires et cytoplasmiques.....	67
6.7.	Dosage des protéines .....	67
6.8.	Immunobuvardage.....	67
6.9.	Ratio F-actine/G-actine.....	68
6.10.	Détection de l'AMPC .....	69
6.11.	Immunofluorescence pour le remodelage de l'actine.....	70
6.12.	Immunofluorescence pour la localisation de protéines .....	71
7.	Résultats	72
7.1.	Analyses génétiques .....	72
7.2.	Profil d'expression de <i>GPR65</i> .....	73
7.3.	Définir les voies signalétiques découlant de l'activation de GPR65 et déterminer l'impact du variant codant de GPR65 dans ces voies signalétiques .....	78

8.	Discussion	86
8.1.	Gènes candidats de la région 14q31 .....	86
8.2.	Rôle biologique de GPR65 .....	89
8.2.1.	Voies de l'AMPc .....	90
8.2.2.	Voies du cytosquelette d'actine.....	91
8.3.	Fonctions de GPR65 dans le cadre de la pathologie des MIIs. ....	96
	Bibliographie	98
	Annexe I: Profil d'expression de GALC	i
	Annexe II: Séquence synthétisée de GPR65.	ii
	Annexe III: Expression de GALC dans des biopsies de patients atteints de la CU.	iii
	Annexe IV: Niveaux d'expression endogène de l'ARNm de GALC dans les différentes lignées de cellules lymphoblastoïdes humaines.	iv

Liste des tableaux	
Tableau 1: Liste des amorces pour qPCR.....	65
Liste des figures	
Figure 1: Analyse d'association de la région 14q31.....	44
Figure 2: Structure et voies générales des RCPGs et des protéines G hétérotrimériques.....	47
Figure 3 : GPR65 est un RCPG senseur de pH qui interagit avec plusieurs protéines G hétérotrimériques.....	60
Figure 4: Analyse d'association de la région 14q31.....	72
Figure 5 : Profil d'expression de <i>GPR65</i> .....	74
Figure 6 : Expression de <i>GPR65</i> dans des biopsies humaines .....	75
Figure 7: Expression en ARNm de Flag-GPR65 exprimé de façon stable et transitoire.....	76
Figure 8: Localisation de GPR65 dans des cellules surexprimant de façon transitoire ou stable Flag-GPR65. ....	77
Figure 9: Localisation subcellulaire de GPR65.....	78
Figure 10: Expression en ARNm de <i>GPR65</i> dans les lignées stables.....	79
Figure 11: Essais de détection de l'AMPC dans les lignées stables.....	80
Figure 12: Niveaux d'expression endogène de l'ARNm de GPR65 dans les différentes lignées de cellules lymphoblastoïdes humaines. ....	81
Figure 13: Essais de détection de l'AMPC dans les lignées lymphoblastoïdes.....	81
Figure 14: Essais par immunofluorescence de la formation de fibres de stress dans les lignées parentales stables. ....	83
Figure 15: Détection de la polymérisation de l'actine.....	83
Figure 16: Essais de détection de la formation de fibres de stress dans les lignées déficientes pour les protéines G stables.....	84



## Liste des abréviations

AC, adénylate cyclase

ADN, acide désoxyribonucléique

AGCCs, acide gras à chaînes courtes

AMPc, adénosine 3'-5' monophosphate cyclique

AR, acide rétinoïque

Arf, *ADP-ribosylation factor*

ARN, acide ribonucléique

BSA, *Bovine serum albumin*

Ca, calcium

CD, *cluster of differentiation*

cDs, cellules dendritiques

CEIs, cellules épithéliales intestinales

CHO, *Chinese Hamster Ovary cells*

CLIs, cellules lymphoïdes innées

CMH, complexe majeur d'histocompatibilité

CPAs, cellules présentatrices d'antigènes

CREB, *cAMP-response element binding protein*

CR3, récepteur du complément 3

CU, colite ulcéreuse

CXCL13, *chemokine (C-X-C motif) ligand 13*

CXCR5, *chemokine (C-X-C motif) receptor 5*

C3b, composante du complément 3

DAG, dyglycérol

DL, déséquilibre de liaison

EPAC, protéines d'échange directement activées par l'AMPc

F-actine, actine filamenteuse

FAM, fréquence de l'allèle mineure

FBS, *fœtal bovine serum*

FcγR, *Fraction crystallizable gamma Receptor*

FLIs, follicules lymphoïdes isolés

fMLP, Formylmethionine-leucyl-phenylalanine  
G-actine, actine monomérique  
GALTs, *gut-associated lymphoid tissues*  
GDP, guanosine 5'-diphosphate  
GEF, *Guanine nucleotide exchange factor*  
GI, gastro-intestinal  
GLMs, ganglions lymphatiques mésentériques  
GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*  
GPR, *g protein-coupled receptor*  
GTP, guanosine 5'-triphosphate  
GWAS, *genome-wide association studies*  
G $\alpha$ , sous-unité G alpha  
HEK, *Human Embryonic Kidney*  
HEM, HEPES/EPPS/MES  
HLA, antigènes de leucocytes humains  
HPRT, *hypoxanthine phosphoribosyltransferase*  
HRP, peroxydase de raifort  
I, Isoleucine  
IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine  
IFN, interféron  
IL, interleukine  
Ig, immunoglobulines  
IP, IP<sub>2</sub>, IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5 mono-, di-, tri-phosphate  
kb, kilobase  
kDa, kiloDalton  
L, Leucine  
LIEs, lymphocytes intraépithéliaux  
LP, lamina propria  
LPS, lipopolysaccharides  
M, *microfold*  
MALTs, *mucosal-associated lymphoid tissues*

MC, maladie de Crohn  
MIIs, maladies inflammatoires de l'intestin  
MMAPs, motifs moléculaires associés aux pathogènes  
MUC2, mucine 2  
m $\phi$ , macrophages  
NF- $\kappa$ B, *nuclear factor-kappa B*  
NHE, échangeurs Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>  
NLRs, *nucleotide oligomerization domain-like receptors*  
NLRP3, *Nod-like receptor family pyrin domain containing 3*  
NOD, *nucleotide binding oligomerization domain containing*  
PAMs, peptides antimicrobiens  
PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*  
PGE<sub>2</sub>, prostaglandine E<sub>2</sub>  
PIP<sub>2</sub>, phosphatidylinositol 4,5 biphosphate  
PKA, protéine kinase A  
PKC, protéine kinase C  
PLC $\beta$ , phospholipase C beta  
PMNs, cellules polymorphonucléaires  
PPs, plaques de Peyer  
PRRs, *pattern recognition receptors*  
PS, phosphatidylsérine  
qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*  
Rab, *Ras-related in brain*  
Ran, *Ras-related nuclear*  
Ras, *Rat sarcoma*  
RCBs, récepteurs de cellules B  
RCPG, récepteur couplé à des protéines G  
RCTs, récepteurs des cellules T  
Rho, *Ras homologous*  
REGIII, *regenerating islet-derived protein III*  
RSG, régulateurs de signalisation de protéines G

SDS, dodécylsulfate de sodium  
SI, synapse immune  
SIgA, immunoglobulines A sécrétées  
SNP, *single nucleotide polymorphisms*  
SSP, solution de sels physiologiques  
(T)TBS, (*Tween*) *Tris-Buffered Saline*  
TGF $\beta$ , facteur de croissance transformant beta  
Th, cellules T auxiliaires (*helper*)  
Thf, cellules T auxiliaires folliculaires  
TLRs, *Toll-like receptors*  
TNs, cellules tueuses naturelles  
TNF $\alpha$ , *tumor necrosis factor alpha*  
Treg, cellules T régulatrices  
TSLP, lymphopoïétine stromale thymique  
WGA, *Wheat germ agglutinin*

## **Remerciements**

Je souhaite d'abord remercier mon directeur de recherche, John D Rioux, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour son temps et ses conseils. J'aimerais aussi remercier Terry Hébert et son associé de recherche, Dominic Devost, pour leur précieuse aide tout au long de ce projet. Merci à Sylvain Foisy et Philippe Goyette pour leur disponibilité lorsque j'avais des questions et un merci tout spécial pour Guy Charron qui a passé d'innombrables heures à m'aider tout le long de ces trois années. Merci à Gabrielle Boucher pour son temps et ses nombreuses explications.

Un énorme merci à tous mes collègues du laboratoire de Guillaume Lettre et de John David Rioux, passés ou actuels : Claudine Beauchamp, Azadeh Alikashani, Frederic Latour, Geneviève Lavallée, Hugues Gosselin, Jean Paquette, Louise Thauvette, Marie-Eve Rivard, Mélanie Burnette, Roselle Gélinas, Sarai Mola, Mélissa Beaudoin, Jessica Desjardins, Nicolas Morin et Stevo Radinovic, qui m'ont tous aidé de près ou de loin durant ces trois dernières années. J'ai adoré travailler avec chacun d'entre vous. Merci spécial à Chloé Lévesque, une collègue mais surtout une amie.

Merci à ma petite famille que j'aime plus que tout, Lucie, Denis, Alexandre et Jean-Philippe et merci à Mihai, qui m'ont toujours soutenue et encouragée.



### **1. Le système digestif et son système immunitaire**

#### **1.1. Le système digestif**

Le système digestif permet la digestion des aliments ingérés par l'hôte en nutriments utilisables par le corps pour produire de l'énergie et permettre la croissance et la réparation tissulaire. Il est formé du tractus gastro-intestinal (GI), du foie, du pancréas et de la vésicule biliaire. Il va de la bouche jusqu'à l'anus, en passant par l'œsophage, l'estomac, le petit intestin, le grand intestin et le rectum (1, 2).

Tous les segments du tractus gastro-intestinal sont divisés en quatre couches : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. La muqueuse est la couche la plus intérieure et est l'endroit où des fonctions importantes d'absorption ont lieu. Elle est composée de l'épithélium, une couche de cellules simple, de la lamina propria, composée d'un tissu conjonctif sous-épithélial, et de la muqueuse musculaire, une couche de muscle lisse. La sous-muqueuse est formée de tissus conjonctifs, de vaisseaux sanguins et lymphatiques et de nerfs et comprend des cellules immunes. La musculuse est une bande de muscle lisse qui aide à déplacer les aliments le long du tractus GI par le péristaltisme. Le flot est ainsi régulé par ce mécanisme et par les sphincters situés au haut et dans les parties distales de l'œsophage, de l'estomac, de l'iléon et de l'anus. La plus grande partie des intestins est recouverte de la séreuse, une couche protectrice formée de cellules épithéliales pavimenteuses, du mésothélium, et d'une couche de tissu conjonctif. S'il n'y a pas de couche de cellules épithéliales, on parle d'adventice. En règle générale, les parties du tractus GI où s'effectue le péristaltisme sont entourées de séreuse et les parties plus rigides, par exemple la cavité orale, sont couvertes d'adventice (3).

La digestion commence dans la bouche avec la salive et la mastication qui permettent de ramollir les aliments pour leur permettre de mieux passer dans l'œsophage. La salive permet aussi de garder une bouche plus propre en lavant les bactéries. Puisqu'elle contient des substances telles que des enzymes et des anticorps, elle participe aussi à la destruction des bactéries, levures et virus (4). La digestion se poursuit dans l'estomac grâce aux sucs gastriques qui sont composés d'acides et d'enzymes et qui facilitent la digestion. Les cellules

pariétales de l'estomac sécrètent de l'acide hydrochlorique et le facteur intrinsèque, une glycoprotéine permettant l'absorption de la vitamine B12. Les cellules principales produisent le pepsinogène, précurseur de la pepsine, qui est une enzyme responsable de la digestion des protéines. L'acide hydrochlorique génère un environnement très acide qui permet à la pepsine de digérer les protéines. Cette acidité sert aussi d'alliée contre les infections en tuant la plupart des bactéries. Le mucus recouvre l'intérieur de l'estomac, protégeant les cellules des dommages causés par les enzymes et l'acidité (5, 6).

Lorsque le contenu de l'estomac est suffisamment traité, il porte le nom de chyme et est déversé dans le petit intestin. Celui-ci est composé de trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. L'une des fonctions du duodénum est de neutraliser l'acidité du chyme. Pour ce faire, des glandes sous-muqueuses, les glandes de Brunner, produisent de grandes quantités de mucus. Le nombre de glandes diminue graduellement entre l'estomac et le jéjunum. Le pH passe de 1-2 à 7-8. Les premiers centimètres du duodénum sont lisses mais la partie distale contient des plis, des villosités et des microvillosités, ce qui augmente la surface de cinq et 200 fois respectivement, assurant une meilleure absorption des aliments par le système sanguin (2, 5, 6). Dans le duodénum, la digestion et l'absorption ont lieu grâce au péristaltisme et à la bile produite par le foie et stockée dans la vésicule biliaire. Les enzymes pancréatiques produites par le pancréas participent aussi au processus. Le reste du petit intestin est formé du jéjunum et de l'iléon qui sont principalement responsables de l'absorption des nutriments.

La consistance du contenu intestinal change graduellement. Dans le duodénum, les aliments sont dilués dans les enzymes pancréatiques et la bile. Le contenu devient de plus en plus liquide avec les sécrétions de mucus, d'eau et d'enzymes. Le petit intestin absorbe la plupart des nutriments et en conditions normales, l'absorption est complétée avant que le chyme atteigne la partie distale de l'iléon (5, 6). Le contenu du petit intestin est alors injecté dans le caecum qui est la première partie du gros intestin, aussi appelé colon. La surface du colon consiste en un épithélium présentant quelques plis mais est dépourvue de villi et les cellules épithéliales sont recouvertes de microvillis. Le colon est impliqué dans la sécrétion de mucus, dans l'absorption d'eau et d'électrolytes et la formation, la propulsion et le stockage du matériel non absorbé, i.e. les fèces. Due à l'absorption de l'eau, les selles sont liquides en

atteignant le colon et solides lorsqu'elles atteignent le rectum. Sur environ neuf litres de liquides, soit environ deux litres provenant de l'ingestion orale et sept litres provenant des sécrétions le long du tube, sept litres sont absorbés par le petit intestin et un peu moins de deux litres par le colon. Les fèces quotidiennes contiennent environ 100 mL d'eau (2, 5, 6). La digestion dans le colon est permise grâce à la grande quantité de bactéries qui s'y trouve. Leur digestion des fibres permet le relâchement d'acide gras à chaînes courtes (AGCCs), importante source d'énergie pour l'épithélium (2, 7, 8).

Le tractus GI doit, en plus de ses fonctions principales que sont la digestion et l'absorption de nutriments, gérer l'importante charge antigénique qu'il rencontre. Pour ce faire, il doit maintenir une tolérance du système immunitaire envers le microbiome commensal et les antigènes de la diète tout en gardant une détection et une élimination adéquates des microorganismes pathogènes. Ainsi, le tractus GI est doté d'un mécanisme de défense double soit ; une immunité innée peu spécifique et rapide qui permet de bloquer les pathogènes en plus de maintenir une tolérance envers les bactéries commensales et une immunité adaptative, qui entrainera une réponse inflammatoire spécifique en réponse à une infiltration importante par des pathogènes ou le microbiome au-delà de la barrière intestinale.

## **1.2. Immunité innée**

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense de l'hôte contre les assauts du microbiome. Il est composé d'une barrière physique (épithélium et mucus), biochimique (mucus et peptides antimicrobiens) et d'une réponse cellulaire permettant l'élimination rapide et non spécifique des menaces. Il procure à l'hôte une réponse protectrice immédiate contre les infections et aide à l'initiation d'une réponse du système immunitaire adaptatif. Toutefois, contrairement à ce dernier, il ne permet pas le développement d'une immunité qui perdure (mémoire immunitaire) (9, 10). Le système immunitaire inné repose sur plusieurs types cellulaires qui sont; les cellules épithéliales, les macrophages ( $m\phi$ ), les monocytes, les éosinophiles, les neutrophiles, les cellules dendritiques (cDs), les basophiles et les cellules tueuses naturelles (TNs). Elles agissent ensemble pour initier la réponse immunitaire en sécrétant des cytokines, des chimiokines et des agents antimicrobiens. Cela mène à la

phagocytose des cellules infectées et des microorganismes, à la présentation d'antigènes et à l'activation du système immunitaire adaptatif (9).

### **1.2.1. Les barrières physiques et biochimiques de l'intestin**

La barrière intestinale, en plus de jouer un rôle dans l'absorption des nutriments et l'élimination des déchets (11), permet d'inhiber l'invasion des pathogènes (12). Elle est composée de l'épithélium, des couches de mucus et des peptides antimicrobiens (PAMs) (13).

L'épithélium intestinal est formé d'une simple couche de cellules épithéliales intestinales (CEIs) qui sépare l'hôte du microbiome (10). Le tractus GI constitue la plus grande surface épithéliale, couvrant environ 200-400m<sup>2</sup> chez l'adulte. Il est adapté à la colonisation par les bactéries commensales. Ces dernières aident à la digestion et influencent grandement le développement et la fonction du système immunitaire au niveau des muqueuses (10). L'épithélium du petit intestin est organisé en un grand nombre d'unités crypte-villus, contrairement à l'épithélium du colon qui est dépourvu de villi (13). Les villi sont des protubérances, ressemblant à des doigts, qui se trouvent dans la lumière intestinale afin de maximiser la surface absorbante (14). Sous les villi se trouvent les capillaires et les vaisseaux lymphatiques qui permettent le transport des nutriments dans le corps (14). La base de chaque villus est composée de multiples invaginations, appelées cryptes. À la base ou tout près de la base de chaque crypte se trouvent les cellules souches épithéliales pluripotentes. Elles sont responsables de la production de tous les types matures de cellules épithéliales : les entérocytes absorbatifs, les cellules de goblet, les cellules de Paneth, les cellules entéro-endocrines et les cellules M (10). Les entérocytes absorbatifs, cellules de goblet et cellules entéro-endocrines nouvellement produites migrent vers la lumière intestinale à l'extérieur des cryptes et en 4 à 6 jours vont atteindre le haut du villus, où elles vont desquamer ou être exfoliées dans la lumière intestinale, comparativement aux cellules de Paneth qui vivent environ 60 jours et restent près des cellules souches épithéliales au bas des cryptes (2). Ce processus assure le renouvellement continu de la surface épithéliale (5, 6, 10).

Les cellules entéro-endocrines sécrètent des hormones et font un lien entre les systèmes neuroendocriniens central et entérique par la sécrétion de nombreuses hormones régulatrices de la fonction digestive. Elles sécrètent aussi des hormones peptidiques impliquées dans la

réparation tissulaire, l'angiogénèse, la différenciation des entérocytes et la polarisation le long des unités crypte-villus (13).

Les cellules de goblet produisent le mucus. À la surface épithéliale intestinale, il est majoritairement composé de la mucine 2 (*MUC2*) qui joue un rôle essentiel dans l'organisation des couches de mucus intestinales (10).

Les entérocytes absorbifs sont des cellules hautement polarisées et caractérisées par une membrane apicale en brosse. La fonction de barrière intestinale, dans le petit intestin et le colon, est aussi renforcée par leur sécrétion de PAMs dont la lectine de type C, REGIII $\gamma$  (*regenerating islet-derived protein III gamma*) (10). REGIII $\gamma$ , provenant des entérocytes et des cellules de Paneth, permet l'exclusion des bactéries de la surface épithéliale du petit intestin. Sa production dépend de la reconnaissance des microbes par les CEIs (10).

Les cellules de Paneth contiennent un grand nombre de granules sécrétoires renfermant des facteurs de croissance et des PAMs tels que le lysozyme, REGIII $\alpha$  (aussi connu sous le nom de *HIP/PAP*, *Hepatointestinal pancreatic protein/Pancreatitis-associated protein 1*) et les défensines- $\alpha$ . Ces dernières sont de loin les plus abondantes (2, 13, 14). Contrairement aux entérocytes, les cellules de Paneth sont adaptées pour la sécrétion de plusieurs PAMs additionnels tels que les défensines, les cathélicidines et les lysosymes. Ces derniers ont différentes cibles et modes d'action ; les défensines et les cathélicidines forment des pores dans les membranes bactériennes alors que les lectines de type C se lient aux peptidoglycanes des bactéries Gram positif où elles exercent leur activité bactéricide (10). Ensemble, la sécrétion de mucines par les cellules de goblet et de PAMs par les cellules de Paneth et les entérocytes, établit une barrière physique et biochimique entre le microbiome et l'épithélium et les cellules immunes sous-jacentes. Cela permet la régulation, non spécifique, des bactéries commensales et des pathogènes et limite la résistance des bactéries aux réponses antimicrobiennes (10).

Les cellules souches épithéliales produisent aussi les cellules M (*microfold*). Ces cellules font partie de l'épithélium associé aux structures folliculaires intestinales que sont les plaques de Peyer (PPs) et les follicules lymphoïdes isolés (FLIs). Elles sont responsables de

l'organisation de l'échantillonnage par transport transépithélial des antigènes provenant de la lumière intestinale ainsi que des microorganismes intacts en vue de leur présentation au système immunitaire muqueux (15). Les cellules M sont capables de transcytose spécifique. Il s'agit du transport de macromolécules d'un côté à l'autre d'une cellule. La transcytose est une stratégie utilisée par les organes multicellulaires afin de transporter sélectivement des molécules entre deux environnements sans déranger la composition de ces environnements (16). Les macromolécules sont alors isolées à l'intérieur d'une vésicule pour leur transport. Ce processus repose sur des récepteurs spécifiques aux molécules transportées. Jusqu'à tout récemment, le transport actif d'antigènes semblait être accompli que par les cellules M. Les études de McDole et al. (17) ont démontré que les cellules de goblet du petit intestin contribuent aussi au processus en livrant des antigènes solubles aux cellules dendritiques (cDs) sous-épithéliales CD103+. De plus, les phagocytes mononucléaires résidant sous l'épithélium échantillonnent aussi les antigènes grâce à des dendrites, i.e. des projections, transépithéliales (10).

L'épithélium intestinal agit comme barrière sélective perméable permettant le passage d'eau, d'électrolytes et de nutriments mais prévient l'invasion d'antigènes étrangers, de microorganismes et de leurs toxines. L'intégrité épithéliale est maintenue grâce à des jonctions qui attachent fermement les cellules de l'épithélium entre elles et avec la matrice extracellulaire. Les cellules épithéliales intestinales (CEIs) sont, pour ces raisons, solidement interconnectées grâce à des complexes protéiques d'adhérence : les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées (18). Un quatrième type de jonctions, les jonctions communicantes, ont plutôt pour rôle la communication intercellulaire. Ces connections intercellulaires sont requises pour stabiliser l'intégrité cellulaire et semblent avoir un rôle dans l'établissement de la polarité apico-basale des cellules épithéliales. Toutefois, ces mécanismes sont encore à l'étude (19). Elles sont aussi essentielles pour la régulation de la perméabilité paracellulaire, i.e. le transport de substances au travers de l'épithélium par un espace intercellulaire (13). Les complexes d'adhésion fonctionnent d'une part par des interactions entre les régions extracellulaires de protéines transmembranaires spécifiques et de l'autre par la liaison des régions intracellulaires de ces protéines au cytosquelette grâce à des protéines adaptatrices. Les protéines membranaires composant les jonctions adhérentes sont les

cadhérines. Les jonctions serrées sont des complexes multi-protéiques comprenant des protéines transmembranaires, des protéines de membranes périphériques et des molécules régulatrices telles que les kinases. Les claudines sont les protéines transmembranaires les plus importantes (11). Les desmosomes sont composés de trois familles de protéines principales : les cadhérines transmembranaires, les protéines armadillo et les protéines plakines. Les cadhérines desmosomales de cellules adjacentes forment des liens intercellulaires. Au niveau intracellulaires, ces cadhérines sont liés aux protéines armadillo qui elles sont liées aux protéines plakines, particulièrement les desmoplakines, qui ancrent les desmosomes aux filaments intermédiaires du cytosquelette (20). Les desmosomes et les jonctions adhérentes permettent des liens puissants entre les cellules afin de maintenir la proximité cellulaire. La perte des jonctions adhérentes causent le bris des contacts entre les cellules en plus d'altérer la polarisation et la différenciation et de causer une apoptose prématurée. Les jonctions serrées sont les principaux déterminants de la perméabilité cellulaire par leur sélectivité dans la taille et la charge de ce qui est autorisé à traverser l'épithélium.

Une autre forme de protection contre les microbes invasifs, les blessures mécaniques, les enzymes destructives et les autres menaces de la lumière intestinale est la couche de mucus intestinale (13). Elle recouvre la muqueuse telle un gel très collant. La couche de mucus est formée par la polymérisation des mucines sécrétées par les cellules de goblet. La MUC2 est la protéine principale des mucines intestinales. Elle agit en formant des complexes multimériques ressemblant à un filet moléculaire qui permet aussi la liaison de résidus sulfates et de résidus acides sialiques. Ces résidus offrent aux mucines une protection contre les attaques bactériennes et limitent leur dégradation enzymatique (13, 21). La polymérisation forme des gels qui se gonflent en liant l'eau du chyme. Les cellules de Paneth et les entérocytes sécrètent de nombreux PAMs qui vont lentement diffuser de l'épithélium vers la lumière pour former un gradient. De l'autre côté, les bactéries vont aussi diffuser lentement dans le mucus ce qui va limiter, dans le petit intestin, le nombre de bactéries qui atteignent l'épithélium et les PPs (2, 7, 13, 15). Au contraire, dans le colon, une couche de mucus intérieure ferme et dense ancrée à l'épithélium est normalement stérile alors qu'une couche extérieure semble plus perméable et est habitée par des bactéries commensales qui utilisent les

glycanes des mucines comme nutriments (18, 22). Les mucines produites permettent la lubrification et assure l'hydratation de la muqueuse (13).

### **1.2.2. Interactions entre l'épithélium et l'immunité innée**

Les surfaces mucosales, particulièrement celles des intestins, sont des sites importants dans la surveillance immunitaire du contenu de la lumière intestinale et dans la régulation des réponses innées et adaptatives. Des structures spécialisées appelées tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (*mucosal-associated lymphoid tissues (MALTs)*) facilitent l'interaction entre les cellules épithéliales et les cellules immunitaires le long du tractus GI. Les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (*gut-associated lymphoid tissues (GALTs)*), composés des ganglions lymphatiques mésentériques (GLMs), des follicules lymphoïdes isolées (FLIs) et des follicules lymphoïdes agrégées formant les plaques de Peyer (PPs), sont considérés comme les senseurs immunologiques des intestins (23). Les follicules lymphoïdes sont composés d'un centre germinale de cellules B, une zone marginale où résident des cellules B et des macrophages ( $m\phi$ ) et un dôme sous-épithélial où on peut trouver des cellules B, des cellules T, des  $m\phi$  et des cellules dendritiques (cDs). Les PPs sont formées par plusieurs follicules lymphoïdes séparés par des régions inter-folliculaires comprenant des cellules T et des cDs (12, 15). Les dômes de PPs sont recouverts d'une couche simple de cellules épithéliales, composée d'entérocytes et de cellules M. Ces structures sont des lieux de décision entre l'induction de la tolérance ou l'induction d'une réponse immunitaire. Cette décision s'effectue grâce au mécanisme de communication complexe ayant cours entre les cellules immunitaires contenues dans ces structures et les cellules épithéliales intestinales (CEIs) associées qui sont responsables de reconnaître les signaux du microbiome commensal et produire des réponses immunorégulatoires (10, 24).

Les CEIs et les cellules immunitaires expriment à leurs membranes cellulaires et intracellulaires des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*pattern recognition receptors*, PRRs) qui leurs permettent de jouer un rôle actif dans la direction des réponses immunes. Ces récepteurs assurent la reconnaissance des particules microbiennes telles les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycans, la flagelline (12, 18) et des métabolites tels que les AGCCs (25) ou des molécules endogènes associées à des pathologies, par exemple l'acide

désoxyribonucléique (ADN) de cellules endommagées ou nécrosées (10, 26). Les cellules de l'immunité innée peuvent donc détecter spécifiquement le microbiome intestinal et répondre aux antigènes structuraux se trouvant à la surface des microorganismes tels que les motifs moléculaires associés aux pathogènes (MAMPs). Cela permet une réponse immunitaire initiale rapide et efficace contre l'invasion microbienne. Les PRRs tels que les *Toll-like receptors (TLRs)* qui reconnaissent les microbes pathogènes et commensaux ainsi que les *nucleotide oligomerization domain-like receptors (NLRs)* qui sont des senseurs cytosoliques d'infection et de stress tissulaire, sont très importants pour le maintien de l'homéostasie. Les PRRs régulent la composition bactérienne intestinale (12, 27). L'expression de ces récepteurs est hautement régulée afin d'assurer une réponse immunitaire appropriée et maintenir une surveillance continue (9). Lorsqu'activée, la signalisation découlant des PRRs entraîne l'activation du *nuclear factor-kappa B (NF-κB)*. Ce dernier stimule la transcription et la production de médiateurs pro-inflammatoires qui assurent une réponse innée effective contre les pathogènes.

Bien que les études antérieures sur les voies PRRs portaient principalement sur leurs propriétés pro-inflammatoires, leurs rôles dans la régulation de l'homéostasie, la réparation tissulaire et la tolérance immunitaire dans les cellules épithéliales intestinales (CEIs) sont de plus en plus étudiés (10). Par la nature même du contenu du tube digestif, qui diffère grandement des régions du corps normalement stériles, le système immunitaire muqueux intestinal devrait être en constante stimulation. Hors, contrairement au reste du corps où une intrusion par des microorganismes entraînerait une réaction inflammatoire importante, les CEIs maintiennent une réactivité pondérée. Ce sont les CEIs qui assurent l'essentiel du contrôle de la réponse immune par la production de nombreux signaux immunorégulateurs. Ces signaux reposent sur des mécanismes spécialisés responsables, entre autres, de l'induction de la tolérance chez les cellules immunitaires, de la limitation de l'inflammation et de la direction des réponses immunitaires innées et adaptatives contre les pathogènes et les bactéries commensales. Les CEIs maintiennent leur fonction immunorégulatrice sur les cellules phagocytaires par la production des cytokines interleukine- (IL-) 25, de lymphopoïétine stromale thymique (TSLP), du facteur de croissance transformant beta (TGFβ) et de l'acide rétinoïque (AR) qu'elles secrètent en réponse aux signaux des bactéries commensales (10, 28).

Cela permet le développement des cDs et des m $\phi$  ayant des propriétés tolérogéniques, c'est-à-dire qu'ils produisent de l'IL-10 et de l'AR. La TSLP produit par les CEIs inhibe la production de la sous-unité IL-12p40 (commune aux cytokines IL-12 et IL-23) par les cDs. Cela limite les réponses T auxiliaires (h, *helper*) Th1 et Th17 et priorise une réponse Th2 dépendante (voir section 1.3 sur l'immunité adaptative) (29). Ces réponses sont particulièrement importantes dans les mécanismes de tolérance et le maintien de l'homéostasie.

En plus de maintenir une hypo-réactivité, les CEIs doivent différencier les signaux des bactéries commensales de ceux provenant des pathogènes afin d'induire une réponse appropriée. La nature polarisée de l'épithélium intestinal assure la ségrégation subcellulaire des PRRs (10). Les TLRs apicaux et les TLRs basolatéraux semblent démontrés des réactivités différentes. Par exemple, l'exposition basolatérale des CEIs à des ligands de TLR9 cause l'activation canonique et la translocation de NF- $\kappa$ B tandis que l'exposition apicale stabilise I $\kappa$ B, l'inhibiteur de ces voies. La régulation de la barrière épithéliale dépend donc en grande partie de la capacité des CEIs à sentir l'environnement microbien qui les entoure. Les mécanismes par lesquels les CEIs vont briser cette tolérance dans le but de répondre à des signaux microbiens pathogènes sont encore peu connus.

### **1.2.3. Réponse cellulaire de l'immunité innée**

L'immunité innée ne repose pas seulement sur l'établissement et le maintien d'une barrière physique ou biochimique mais aussi sur une réponse immunitaire. Les cellules impliquées dans cette réponse sont principalement les lymphocytes, les cellules tueuses naturelles (TNs), les cellules mononucléaires capables de phagocytose telles que les macrophages (m $\phi$ ) et les cellules dendritiques (cDs) et les cellules polymorphonucléaires (PMNs) telles que les neutrophiles.

#### Les cellules mononucléaires phagocytiques

La phagocytose est un processus par lequel les cellules spécialisées internalisent des particules pour l'élimination et la présentation d'antigènes. Ces particules font plus de 0,5  $\mu$ m soit l'équivalent de la taille des microorganismes, des cellules mortes ou des débris. Ce

processus diffère des autres formes d'endocytose réalisées par la plupart des cellules et servant à internaliser de petites molécules solubles. Les cellules phagocytaires sont importantes pour le maintien de l'homéostasie et le remodelage tissulaire ainsi que dans la réponse immunitaire innée et l'initiation des réponses immunitaires adaptatives (30). Les récepteurs phagocytaires les plus étudiés sont les opsono-récepteurs *Fraction crystallizable gamma Receptor* (FcγR) et les récepteurs du complément 3 (CR3) (aussi nommés intégrine  $\alpha_M\beta_2$ , Mac1, *cluster of differentiation* (CD) 11b/CD18) (31). Ces récepteurs reconnaissent respectivement les particules recouvertes d'immunoglobulines (Ig) G ou de la composante du complément 3b (C3b) (32).

Pour chaque type de cellules phagocytaires, il existe plusieurs sous-types et chacun a une fonction définie dans l'établissement de la réponse immunitaire innée. Au niveau intestinal, les phagocytes mononucléaires sont les cDs et les mφ (28). Ces cellules sont responsables de la présentation d'antigènes aux cellules T et de la production des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires nécessaires à l'induction et au développement d'une immunité adaptative. Elles sont appelées cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) (33). À leur surface, les CPAs expriment les antigènes leucocytaires humains (HLA) ayant une cavité dans laquelle se retrouve un peptide de 8 à 14 acides aminés. Ces peptides, qui proviennent de la dégradation de protéines du soi ou d'antigènes étrangers, seront présentés aux cellules T ou B via les récepteurs des cellules T (RCTs) ou les récepteurs de cellules B (RCBs) respectivement pour initier une réponse immune adaptative (voir section 1.3 sur l'immunité adaptative). Les cDs et les mφ résidents des intestins sont hypo-réactifs (34).

Les cDs sont essentielles à l'initiation et au contrôle de la réponse immunitaire adaptative (35). Elles ont aussi la capacité unique de stimuler la réponse immunitaire innée et de déterminer si ces réponses seront immunogéniques ou tolérogéniques. La réponse des cDs dépend grandement de l'environnement dans lequel elles se trouvent (34). Ces capacités sont nécessaires au niveau intestinal vu la charge microbienne importante. Lors de l'inflammation, les cDs activées stimulent les cellules T et produisent plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, le *tumor necrosis factor alpha* (TNFα), l'IL-12 et l'IL-23 (36). Elles sont composées de trois sous-populations distinctes : les cDs myéloïdes ou classiques, les cDs

plasmacytoïdes et les cellules de Langerhans (37). Cette dernière sous-population se retrouve surtout à la couche épidermique de la peau (38).

Les cDs myéloïdes sont critiques pour le maintien de l'homéostasie de l'intestin et la réponse immunitaire contre des infections. Dans les intestins, à l'état de repos, elles sont hypo-réactives et elles permettent la génération de cellules T régulatrices (Treg) Foxp3+ par la production de TSLP, de TGFβ et d'AR (28, 35). Les cellules Treg Foxp3+ s'accumulent dans les intestins où elles ont un rôle anti-inflammatoire induit par leur sécrétion de TGFβ et de l'IL-10 (28). Elles sont nécessaires pour prévenir une trop forte réponse face aux bactéries commensales et leur développement dépend du microbiome (12). Chez l'humain, l'IL-10 est aussi sécrétée constitutivement par les cDs coloniques, ce qui rajoute à leur fonction tolérogénique (34). Ces propriétés tolérogéniques des cDs intestinaux sont permises grâce au TGFβ et à l'IL-10 produits principalement par les entérocytes (39). Elles expriment constitutivement des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH)-II et plusieurs PRRs (40). Lorsque stimulées, elles vont sécréter des cytokines et chimiokines puis migrer vers les ganglions lymphatiques mésentériques (GLMs). De là, elles vont induire une réponse immune adaptative. Les cDs, conditionnées par l'AR, permettent le « *gut-homing* » des cellules T et B, c'est-à-dire la programmation des cellules activées afin qu'elles retournent à la source de l'antigène, dans la lamina propria des intestins. De là, elles participent à l'induction d'une réponse immune efficace (10).

L'identification des cDs plasmacytoïdes repose sur leur morphologie cellulaire qui est similaire à celle des plasmocytes. Toutefois, contrairement à ces dernières, ce sous-groupe de cDs produit une énorme quantité d'interféron (IFN) de type I ( $\alpha/\beta$ ) suivant un stimulus viral (38). Elles circulent dans le sang et les tissus lymphoïdes et entrent dans les ganglions lymphatiques. Au repos, elles semblent moins efficaces dans la présentation d'antigènes que les cDs myéloïdes. Elles expriment les TLR7 et TLR9 qui reconnaissent les signaux viraux et l'acide nucléique. Elles peuvent aussi se différencier en cDs immunogéniques et induire les cellules T contre les antigènes viraux. Les cDs plasmacytoïdes induites par les TLRs acquièrent la capacité de présenter des antigènes et de sécréter des cytokines telles que de l'IL-12, une cytokine pro-inflammatoire activant plusieurs cellules immunitaires (40). Les cDs

plasmacytoïdes des PPs et de la lamina propria (LP) jouent aussi un rôle dans la production d'IgA par les cellules B et ce indépendamment des cellules T (12).

Les m $\phi$  intestinaux résidents sont capables d'échantillonner le contenu de la lumière intestinale grâce à des dendrites qui ont la propriété de traverser l'épithélium intestinal. Les m $\phi$  intestinaux répondent faiblement aux stimuli inflammatoires. Ils permettent, par contre, l'induction d'une réponse immune tolérogénique active grâce à leur production d'IL-10 et ce même en absence d'inflammation (33). Cela mène à la suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules T colitogéniques et la promotion de la fonction des cellules Treg (10). Les m $\phi$  intestinaux produisent peu de molécules inflammatoires suite à une stimulation bactérienne. Toutefois, elles maintiennent leurs fonctions phagocytaires et bactéricides actives. Elles peuvent donc phagocyter les bactéries de la lumière intestinale qui pénètrent la barrière épithéliale sans pour autant déclencher une réponse immunitaire excessive (41). La population de m $\phi$  intestinaux résidents est maintenue et renouvelée à partir des monocytes circulant qui entrent constamment dans l'intestin («monocyte waterfall») et qui s'y différencient.

### Les neutrophiles

Les neutrophiles font partie de la première ligne de défense de l'hôte contre les invasions et constituent environ la moitié des cellules blanches circulantes (42). Chez l'hôte en santé, les neutrophiles sont généralement au repos. Leur activation suit deux étapes; la reconnaissance et la mobilisation. La reconnaissance se fait par la liaison de cytokines, de produits bactériens via leurs PRRs ou par leurs récepteurs à opsonines des types Fc $\gamma$ R, CRs et RCPGs qui reconnaissent des molécules pathogéniques ou des protéines associées au dommage (43, 44). Les neutrophiles activés sont par la suite mobilisés au site de l'infection ou de l'inflammation où ils reçoivent des signaux qui initient l'attaque (42). Lorsque les neutrophiles ont quitté la circulation et passé au travers de l'endothélium, ils migrent vers les tissus cibles grâce aux gradients de chimiokines qui en émanent. Certaines de ces chimiokines, produites par les cellules épithéliales et les autres cellules immunitaires, induisent une polarisation des cellules et la formation de pseudopodes riches en actine qui permettront la phagocytose des bactéries et leur destruction dans le phagosome. Les neutrophiles activés se

trouvant au site d'infection produisent plusieurs molécules toxiques dont des espèces réactives de l'oxygène. Les granules cytotoxiques, présents dans leur cytoplasme, contiennent des enzymes et des PAMs. La liaison de ces granules au phagosome mène à la destruction des pathogènes ingérés. Les neutrophiles expriment le CMH-II, ce qui fait d'eux des CPAs. Ils ont donc la capacité d'exposer des peptides antigéniques, provenant des pathogènes détruits, pour la présentation aux cellules T (42). Les granules cytotoxiques peuvent aussi fusionner à la membrane cellulaire et relâcher leur contenu à l'extérieur de la cellule causant des dommages à l'hôte. Les neutrophiles produisent aussi des filets extracellulaires. Ce sont des amas de fibres de chromatines sur lesquels se trouvent des granules de PAMs et d'enzymes. Ces filets ont une activité antimicrobienne par l'emprisonnement des pathogènes ce qui les expose à une dose concentrée des PAMs et enzymes (43).

#### Les cellules lymphoïdes innées (CLIs)

En plus des cellules myéloïdes et des populations de granulocytes, des populations plus récemment identifiées, les CLIs, jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie immunitaire intestinale. Les CLIs sont des leucocytes de morphologie lymphoïde mais n'ayant pas de récepteurs réarrangés spécifiques aux antigènes. Elles sont distinctes des lignées myéloïdes (28). Les CLIs sont retrouvées près des barrières épithéliales dans les poumons, la peau et les intestins. Elles y exercent leurs fonctions de régulateurs de l'homéostasie tissulaire, de l'inflammation et de la réponse rapide innée aux infections. Les CLIs ont une hétérogénéité fonctionnelle et phénotypique. Elles sont divisées en trois groupes (10).

Les CLIs du groupe 1 incluent les cellules TNs et le sous-groupe CLI-1 (CLI1). Elles sont caractérisées par la production des cytokines associées aux Th1 telles que l'IFN $\gamma$  et le TNF qu'elles secrètent en réponse à la stimulation par l'IL-12 et/ou l'IL-15. Les cellules TNs peuvent directement tuer les cibles cellulaires grâce à leur activité cytotoxique alors que les CLI1 sont limitées à la production de cytokines en réponse à la stimulation. Ces CLI1 semblent impliquées dans les MIIs. Toutefois, leur fonction est moins bien comprise que celle des cellules TNs.

Les CLIs du groupe 2 (CLI2) produisent les cytokines associées aux Th2 telles que l'IL-5 et l'IL-13. Leur prolifération et leur activation sont supportées surtout par les cytokines

provenant des cellules épithéliales telles que l'IL-25, l'IL-33 et le TSPL. Ces cytokines sont sécrétées après une stimulation par le microbiome, ce qui plaide en faveur d'une fonction de l'épithélium dans la régulation des fonctions immunitaires cellulaires.

Les CLIs du groupe 3 (CLI3) produisent les cytokines associées aux Th17 et Th22 telles que l'IL-17A et l'IL-22 qu'elles sécrètent en réponse à une stimulation par l'IL-23. L'IL-17 provenant des CLI3 aurait un effet pro-inflammatoire chez les patients MIIs (10). Les CLI3 sont la source principale d'IL-22 dans la lamina propria. L'IL-22 permet la production de RegIII $\gamma$ , un PAM sécrété par les CEIs, qui limite la dissémination systémique des bactéries commensales (12). Les CLI3 expriment aussi le CMH-II et elles sont donc des CPAs. Elles sont spécialisées dans le traitement et la présentation des antigènes commensaux aux cellules T CD4<sup>+</sup> ce qui a pour fonction d'inhiber leur activation et supprimer leur réponse immunitaire pathologique (28, 41).

#### Les cellules tueuses naturelles (TNs)

Les cellules TNs ont traditionnellement été considérées en tant que seul précurseur de la lignée lymphoïde du système immunitaire inné. De récents développements ont classé les cellules TNs dans un sous-groupe des CLIs du groupe 1 (9). Les différentes étapes du développement des TNs sont peu connues (45). Toutefois, des évidences suggèrent qu'elles proviendraient à la fois des progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes (46). Leur mode d'action repose sur une cytotoxicité dépendante d'un contact direct cellule-cellule. Elles ont pour cible les cellules tumorales et les cellules du « non-soi », tel que les cellules infectées par des virus. Leur activation est contrôlée par un équilibre dynamique entre des signaux positifs et négatifs provenant de leurs récepteurs. Les cellules TNs utilisent des récepteurs inhibiteurs qui reconnaissent les molécules du soi exprimées de façon constitutive. Elles peuvent donc reconnaître les cellules qui ont une « carence » pour ces molécules. Par exemple, certains de ces récepteurs reconnaissent le CMH-I, exprimé par la plupart des cellules en santé et en absence d'inflammation mais pouvant être perdu lors d'un stress. À l'opposé, les récepteurs activant les cellules TNs détectent les molécules du soi exprimées lors d'un stress. Les cellules TNs restent alors tolérantes au soi en santé tout en étant toxiques envers les cellules stressées comme les cellules tumorales, infectées ou endommagées. Tout comme les autres cellules

immunitaires, leurs fonctions effectrices requièrent le contact direct cellule-cellule. Leur liaison aux cellules cibles est accompagnée de la formation d'une synapse immune précédant la livraison directe de granules lytiques (45). Cette synapse est composée, entre autres, de récepteurs d'adhésion et d'actine filamenteuse (F-actine) qui s'assemblent pour former un anneau par lequel les molécules sont sécrétées. Les molécules sécrétées sont principalement la perforine et la granzyme B (47). Les TNs modulent aussi les réponses immunes par la sécrétion de chimiokines et de cytokines telles que le TNF $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  (45). Les cytokines sont aussi importantes pour la prolifération, la survie, l'activation et la fonction effectrice des TNs (48, 49).

### **1.3. Immunité adaptative**

Le système immunitaire adaptatif procure une ligne de défense additionnelle (50). Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative est hautement spécifique et procure une immunité de longue durée (18). La réponse immunitaire adaptative repose sur les lymphocytes B et T qui, lorsqu'activés, produisent des cytokines et des anticorps (cellules B) (9).

#### Les cellules T

Le développement des cellules T débute dans le thymus sous la forme de progéniteurs lymphoïdes. Bien que ces précurseurs ont le potentiel de se différencier en cellules B, l'entrée dans le thymus bloque ces voies (51). Les cellules T portent à leur surface des RCTs qui reconnaissent le HLA se trouvant à la surface des CPAs (52). Au terme du processus de différenciation, les cellules T matures présenteront soit le marqueur CD4 $^+$  ou le CD8 $^+$ . Les cellules T CD4 $^+$  se lient au CMH de classe deux (CMH-II) et leurs rôles sont surtout régulateurs tandis que les cellules T CD8 $^+$  reconnaissent les CMH-I et sont responsables de tuer les cellules infectées (52). Les cellules T CD4 $^+$  ou CD8 $^+$  dites naïves sortent à ce moment du thymus. Elles représentent environ 1 à 3% des thymocytes ayant entrés dans le thymus au départ (51). En absence de stimulation immune, le réservoir des cellules T naïves périphériques est assez stable en nombre, diversité et fonctions (53).

Lors d'une activation de leurs RCTs, les cellules T CD4<sup>+</sup> peuvent se différencier en cellules Treg qui ont pour fonction d'éviter les réactions autoimmunes et de limiter les dégâts que pourrait causer le système immunitaire sur l'hôte (54). Elles ont une habilité unique pour supprimer l'activation, la prolifération et les fonctions effectrices comme la production de cytokines de plusieurs cellules immunitaires (55). Les cellules T CD4<sup>+</sup> peuvent aussi se différencier en l'une des lignées cellulaires auxiliaires effectrices (*T helper cells* : Th). Ces cellules ont pour fonction de procurer une protection contre les agents étrangers. Les cellules Th sont classifiées selon leurs fonctions immunologiques, supportées par leurs profils de cytokines et de facteurs de transcription et leur expression de certains récepteurs de « homing ». Il existe donc des Th1, Th2, Th17 et plus récemment les Th22, Th9 et les cellules Th folliculaires (Thf). Après une stimulation conjointe par un antigène et certaines cytokines, la cellule T mature se différencie vers l'une ou l'autre de ces lignées ce qui est accompagné par la perte du potentiel de se différencier dans les autres types. Cela est causé par des mécanismes de régulation croisée qui répriment les facteurs de croissance importants pour la détermination d'une lignée. Chaque type de Th possède une fonction bien déterminé dans la réponse adaptative.

Les Th1 produisent de grandes quantités d'IFN $\gamma$  et sont importantes pour la protection contre les pathogènes intracellulaires. Les Th2 sont pour leurs parts responsables de la protection contre les pathogènes extracellulaires et semblent être importants dans le développement des allergies. Les cellules Treg produisent l'IL-10 et sont donc très importantes pour supprimer la pathogénicité potentielle des différentes lignées effectrices afin de limiter leurs fonctions et prévenir des périodes d'inflammation trop longues (56). Elles sont donc primordiales dans le contrôle de la réaction inflammatoire. Le rôle principal des Th17 est la destruction de bactéries et des fonges extracellulaires grâce à leur capacité de recruter et activer les neutrophiles (54). Les Th17 sont une source importante d'IL-22 mais une autre lignée, les Th22, semblent aussi responsable de la production de cette cytokine. L'IL-22 fait partie de la famille de l'IL-10 et a un effet sur les cellules épithéliales chez qui elle induit l'expression de gènes impliqués dans la défense antimicrobienne et de molécules inflammatoires tels que du TNF, des chimiokines, des PAMs et des gènes *MUC* (57). L'IL-22 possède aussi des fonctions de réparation tissulaire par l'induction de la prolifération et de la

survie des cellules épithéliales. Les Th22 produisent très peu d'IL-17 et sont enrichies dans le caecum des humains sains. Elles joueraient un rôle dans le maintien de la barrière mucoale. Les Th9 sont des cellules pro-inflammatoires qui sont impliquées dans plusieurs maladies autoimmunes et dans les allergies (54). Les Thf sont le type cellulaire clé pour la formation des centres germinatifs dans les tissus lymphoïdes secondaires. Elles fonctionnent principalement pour aider les cellules B en induisant et contrôlant la commutation isotypique et l'hypermutation somatique (58). Les Thf expriment le *chemokine (C-X-C motif) receptor 5* (CXCR5), un récepteur répondant à la *chemokine (C-X-C motif) ligand 13* (CXCL13). Suivant la stimulation par CXCL13, les Thf migrent vers les follicules lymphoïdes et permettent la production de centres germinatifs (59). Plusieurs études ont démontré l'importance des cellules T CD4+ dans le développement et le maintien des cellules T cytotoxiques (CD8+), soit par communication directe CD4+/CD8+, soit en induisant les cDs pour la présentation d'antigènes (60). Dans le cas des cellules T CD8+, cette différenciation va causer l'induction de l'expression de molécules comme les perforines et les granzymes. Ces cellules requièrent un contact direct cellule-cellule avec leur cible afin de déverser leur contenu cytotoxique (61, 62).

### Les cellules B

Les cellules B sont produites tout au long de la vie de l'hôte (63). Après la naissance, la production des cellules B est localisée dans la moelle osseuse où les cellules progénitrices se différencient en pro-cellules B puis en pré-cellules B. Par la suite, ces cellules B dites immatures acquièrent une spécificité antigénique grâce à l'expression d'un récepteur de cellules B (RCB) fonctionnel. Un processus de sélection s'active alors pour éviter que des cellules B répondant au « soi » ne soient conservées. Il s'agit du premier point de contrôle dans leur développement. Les cellules B répondant seulement au « non soi » vont migrer vers les organes lymphoïdes systémique tel que la rate, où leur développement se poursuit. Dans ces organes, les follicules lymphoïdes contiennent des cellules B naïves IgM+ et IgD+. En réponse à une stimulation antigénique (infection ou vaccin), des centres germinatifs se forment dans les follicules lymphoïdes. Les cellules B y entreront dans un stade de maturation et de prolifération durant laquelle elles subiront une commutation de classe et une

hypermutation somatique de leurs récepteurs (RCB), résultant en une réponse humorale appropriée et spécifique à l'antigène. Ils acquièrent alors les caractéristiques des cellules B transitionnelles puis celles des cellules B de zones marginales. Suite à une stimulation antigénique, les cellules B vont se développer en plasmocytes sécrétant des anticorps ou en cellules B mémoires. Expriment une vaste diversité de RCB, la capacité du réservoir de cellules B de reconnaître une grande quantité de protéines étrangères différentes est très importante dans l'établissement d'une réponse immunitaire adaptative (63).

Au niveau intestinal, les cellules B se différencient en plasmocytes afin de se spécialiser dans la production d'IgA (64). Cet isotype comprend deux sous-classes, IgA1 et IgA2, dont les régions constantes des chaînes lourdes sont codées par des gènes différents (65). La plupart des tissus lymphoïdes comprennent des cellules produisant des IgA1, sauf les tissus lymphoïdes sécréteurs où les cellules produisant des IgA2 sont prédominantes (66). Dans le même ordre d'idées, le sérum et les sécrétions extérieures contiennent majoritairement la sous-classe IgA1 et IgA2, respectivement. Le ratio des sous-types est relativement neutre dans les plaques de Peyer. Par contre, la proportion du sous-type IgA1 passe de 80% à 52% au niveau de la lamina propria intestinale du duodénum à l'iléon, représentant la réponse adaptative accrue contre la charge antigénique de la partie distale (65). Les cellules B IgA+ sont surtout produites avec l'aide des cellules T dans les centres germinatifs des PPs (67). Il semble que, dans les intestins, la commutation isotypique vers les IgA est le résultat des produits métaboliques et des cytokines produits par les CEIs, les cDs, les mφ, les cellules B et les cellules T. Ce processus dépend du TGFβ produit par la plupart des cellules se trouvant dans les PPs. Des cellules B produisant des IgA peuvent aussi être produites dans les follicules lymphoïdes isolés (FLIs) ou la LP, et ce de façon dépendante ou indépendante des cellules T (67).

Les IgA intestinaux peuvent reconnaître plusieurs épitopes viraux, parasitaires et bactériens. Ils peuvent lier ces antigènes et ainsi ralentir ou empêcher leur capacité d'adhérer et de pénétrer l'épithélium sans pour autant initier une réponse potentiellement dommageable pour l'hôte (27, 68). Le répertoire de d'IgA sécrétées (SIgA) est en constant changement suivant les changements dans l'environnement intestinal. Les fonctions des SIgA sont, entre

autres, de piéger les microorganismes au niveau du mucus et de prévenir l'invasion épithéliale (50). De récentes études proposent aussi que les SIgA auraient des effets directs sur la viabilité et la pathogénicité bactériennes (68). Les SIgA perturberaient la machinerie bioénergétique, la mobilité et les facteurs de virulence impliqués dans l'invasion.

Bien que leur fonction primaire soit la production d'anticorps, les cellules B agissent aussi comme CPAs (64). Cette fonction leur permet d'interagir directement avec les cellules T afin d'induire une polarisation de leurs fonctions effectrices (69). Un sous-groupe de cellules B produit aussi de l'IL-10 et du TGF $\beta$  qui, avec celles produites par les cDs et les m $\phi$ , induisent la génération de cellules Treg.

## **1.4. Le microbiome**

### **1.4.1. Généralités**

La surface luminale intestinale mesure approximativement 200-400 m<sup>2</sup>. Cette surface comprend près de 10<sup>6</sup> cellules immunitaires/gramme de tissus entérique et est en interaction continue avec le microbiome intestinal qui est le plus gros réservoir microbien du corps, avec 10<sup>12</sup> cellules/gramme de contenu de la lumière au niveau le plus élevé (9). Le microbiome comprend des bactéries, des champignons, des parasites et des virus (41). Ensemble, ces microorganismes effectuent plusieurs fonctions utiles à l'hôte telles que la digestion de substrats autrement inaccessibles par les enzymes de l'hôte, la synthèse de vitamines, l'éducation du système immunitaire et la répression de la croissance de microorganismes pathogènes.

Chez un sujet sain, le microbiome intestinal comprend plus de 1000 espèces bactériennes (41). L'abondance et la diversité du microbiome peuvent être reliées à un bon état de santé général tandis que le contraire peut se retrouver chez des patients ayant des troubles au niveau du tube gastro-intestinal. Il semble y avoir une relation directe entre le nombre et la diversité du microbiome ainsi que le nombre de gènes exprimés par celui-ci et l'état de santé du sujet. En ce sens, un plus grand nombre de gènes fonctionnels exprimés est relié à un microbiome plus grand et plus robuste et à un bon état de santé général (70). En 2010, plus de 3,3 millions de gènes microbiens ont été dénombrés par *whole genome shotgun*

*sequencing* dans les fèces d'adultes Européens. 98% de ces gènes étaient bactériens et les autres appartenaient aux archées, levures, virus et protistes (eucaryotes autres que les animaux, plantes et champignons). Il semble que 90% des phylotypes microbiens appartiennent aux *Bacteroidetes* et aux *Firmicutes*. Cette composition semble assez constante sauf pour des changements temporaires lors d'exposition à la nourriture, aux médicaments ou à certains facteurs environnementaux (9). La santé globale, et plus particulièrement au niveau du microbiome intestinal, peut être associée à la présence de certaines classes de microorganismes qui aident au métabolisme, luttent contre les infections et contrôlent l'inflammation (70).

Le microbiome dépend du sexe, de l'ethnicité, de la diète, des habitudes, du vieillissement et bien sûr du génotype. Le microbiome intestinal change beaucoup durant la vie du nouveau-né. Après la naissance, le microbiome du tractus gastro-intestinal évolue très rapidement. Une bonne diète de base initiée dès l'enfance est aussi importante pour la santé du microbiome intestinal (70). Au début, il se développe, entre autres, autour des bactéries métabolisant les oligosaccharides du lait. Par la suite, la diversité augmente, dépendamment de la richesse de la diète et de l'environnement dans lequel l'enfant grandit. Il atteint les caractéristiques du microbiome de l'adulte durant l'enfance (71). Il restera par la suite relativement stable durant l'âge adulte. Chez l'adulte, le microbiome diffère énormément en biodiversité et en quantité entre les différentes parties du corps d'un même individu ayant une santé généralement bonne (72). Il semble que les membres de la même famille ont tendance à avoir un microbiome plus similaire. Cela tend à favoriser la présence d'une composante génétique en plus de l'importance de l'environnement dans la composition du microbiome d'un individu (71).

Le microbiome intestinal humain comprend plusieurs communautés microbiennes dont la répartition varie selon la localisation le long du tractus gastro-intestinal mais aussi entre la lumière et les différentes couches de la muqueuse. La diversité du microbiome de l'estomac est limitée par un pH extrêmement acide. Au niveau du petit intestin, il semble que la complexité et la diversité des communautés bactériennes augmentent de la partie proximale à la partie distale (50, 70). Le microbiome intestinal a plusieurs fonctions; une de protection contre les pathogènes, une seconde de structure principalement dans le développement du

système immunitaire et une troisième dans le métabolisme en ce qui concerne la production de vitamines (73, 74).

#### **1.4.2. Importance du microbiome dans le développement du système immunitaire**

L'équilibre entre l'immunité innée et l'immunité adaptative est très important pour l'homéostasie. Le microbiome a un rôle important dans la promotion de la tolérance immune en évitant une réponse immunitaire spécifique contre l'énorme masse bactérienne (23). Selon l'hypothèse hygiénique, la prédisposition accrue aux allergies et l'incidence de certaines maladies seraient reliées à un manque d'exposition de l'hôte à des agents infectieux, des microorganismes et des parasites pendant le développement juvénile ce qui causerait un affaiblissement du système immunitaire (56). Dès la naissance, le microbiome est très important pour la maturation du système immunitaire. En induisant des réponses immunes chez l'hôte, il participe au renforcement de l'homéostasie hôte-microbiome (27). Cette relation de mutualisme confère à l'hôte des avantages évolutifs. L'hôte est capable de maintenir une homéostasie intestinale qui lui permet une tolérance envers le microbiome et le potentiel de répondre aux pathogènes et le microbiome obtient les ressources énergétiques nécessaires pour vivre (33).

Le microbiome est très important pour le bon développement des GALTs et de la fonction de barrière de l'épithélium (12). La maturation du système immunitaire intestinal dépend grandement de la reconnaissance du « non-soi ». Cette reconnaissance passe par des récepteurs de type *pattern recognition receptors* (PRRs) qui reconnaissent des *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) tels que le LPS et les acides nucléiques (27). Par exemple, chez les souris axéniques (*germ-free*), les PPs sont moins actives et contiennent de plus petites zones germinales. Elles ont des niveaux plus faibles de PAMPs, possèdent moins de lymphocytes intra-épithéliaux (LIEs) et la couche de muqueuse colonique est beaucoup plus mince. Les souris axéniques, lorsque stimulées avec des microbes, restaurent leur système immunitaire intestinal (12). De plus, il a été observé que, chez les souris déficientes pour les PRRs, la maturation des follicules lymphoïdes isolés iléaux et coloniques est incomplète (12). Les bactéries commensales influencent donc le développement des composantes humorales du

système immunitaire muqueux intestinal, modulent les répertoires de cellules T et les profils de cytokines des cellules Th1 et Th2 (74).

Le système immunitaire de tractus gastro-intestinal contient différents mécanismes pour éviter une réponse inadéquate de l'hôte face au microbiome commensal. Par exemple, les cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> sont requises pour la diminution de la prolifération des cellules T répondant aux bactéries commensales et elles permettent ainsi le contrôle de l'inflammation (41). Le microbiome, par le développement des Treg, prévient une réponse inflammatoire inappropriée face aux bactéries commensales ce qui permet au microbiome de survivre sans induire une réaction inflammatoire chronique (12). Les bactéries commensales semblent influencer le développement des cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> par différentes voies dont celles des PRRs et des métabolites bactériens tels que les acides gras à chaînes courtes (AGCCs). Plusieurs cellules épithéliales intestinales et/ou hématopoïétiques expriment des récepteurs couplés à des protéines G (RCPGs) par exemple GPR43 (*Ffar2*) qui reconnaissent les AGCCs et répondent à leur présence. Les AGCCs, et plus particulièrement le butyrate, produisent des altérations épigénétiques telles que l'acétylation du locus *Foxp3*, qui régulent l'expression de Foxp3 chez les cellules T. Ils induisent aussi la production de TGFβ par l'épithélium intestinal. Le TGFβ régule les cellules Treg intestinales via la production de l'AR par les mφ et les cDs de la lamina propria. En plus du développement des cellules Treg, le microbiome intestinal permet leur recrutement au niveau du gros intestin où elles agissent. Certaines espèces commensales, surtout les *Clostridium*, contribuent à la génération *de novo*, au recrutement et à la maturation fonctionnelle des cellules Treg au niveau du colon ce qui contribue au maintien de l'homéostasie du tractus gastro-intestinal (41). Plusieurs autres types cellulaires sont influencés par le microbiome et ce dernier est donc au centre de la régulation de la réponse inflammatoire.

Chez les cellules phagocytaires, le microbiome est nécessaire pour l'expression constitutive de la cytokine pro-IL1β par les mφ résidents et le maintien de leurs fonctions protectrices. L'excrétion de cette cytokine dépend d'un contact avec des microorganismes pathogènes. Cette production d'IL-1β par les mφ, tout comme la production d'IL-23, est essentielle pour l'induction des cellules Th17 (28). Le microbiome intestinal contribue aussi

de façon importante aux fonctions anti-inflammatoires des m $\phi$  en permettant l'expression constitutive d'IL-10, qui est importante pour l'homéostasie du tractus gastro-intestinal (41). Chez les cDs, le microbiome interagit afin d'induire la sécrétion d'IL-10 et de réduire celle d'IL-12 (34).

Lors d'une lésion, les neutrophiles recrutés aux sites de l'inflammation sont influencés par le microbiome. Ils défendent l'hôte contre certains pathogènes et éliminent les bactéries commensales ayant infiltré les tissus intestinaux inflammés. Cette réponse est régulée par l'induction de l'expression de pro-IL1 $\beta$  chez les neutrophiles recrutés. Les peptidoglycanes produites par les bactéries résidentes vont aussi augmenter les fonctions bactéricides des neutrophiles circulant via la voie *nucleotide binding oligomerization domain containing 1* (NOD1) (41). Les neutrophiles, lors d'invasion par des pathogènes, vont migrer dans la lumière intestinale. Il semble que cela est dû à la sécrétion apicale par les cellules épithéliales intestinales (CEIs) de la chimiokine hepoxilin A<sub>3</sub> (HXA<sub>3</sub>) (75, 76). Ils vont y générer des structures intraluminales organisées (accumulation massive de cellules immunitaires) qui encapsulent les bactéries commensales et limitent leur contact avec l'épithélium (translocation), appelées « *intraluminal casts* ». Il n'existe aucune évidence prônant un rôle des neutrophiles en absence d'invasion « *steady state* » (41, 77).

Le microbiome agit sur le développement des cellules B produisant des IgA par la régulation de la commutation isotypique (28). Dans la voie indépendante des cellules T, les bactéries commensales induisent les CEIs et les phagocytes mononucléaires des GALTs à sécréter des cytokines telles que TGF $\beta$ , *B-cell activating factor* (BAFF) et APRIL, un ligand induisant la prolifération et qui permet la commutation isotypique vers les IgA (41). Les cellules dendritiques (cDs) CD103<sup>+</sup> présentant des antigènes de bactéries commensales dans les GLMs permettent aussi cette commutation (28). De plus, les cDs folliculaires, importantes organisatrices de la formation des centres germinatifs des cellules B dans les PPs, sécrètent BAFF et TGF $\beta$  suivant une stimulation par les TLRs.

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

La muqueuse gastro-intestinale est continuellement exposée à des antigènes provenant des aliments que l'hôte ingère et ceux provenant des microorganismes de la flore microbienne de son tube digestif. Cette flore est extrêmement riche et diversifiée. L'hôte bénéficie de la flore commensale intestinale par leur métabolisme des composés alimentaires non-absorbés et la production de vitamines. Par contre, la lumière intestinale est aussi une porte d'entrée pour les microorganismes pathogènes qui peuvent mener à la destruction tissulaire. Le système immunitaire intestinal se retrouve donc devant une délicate tâche : procurer une réponse immune rapide et efficace contre les bactéries pathogènes tout en maintenant une tolérance envers les aliments et les bactéries commensales. Comme nous l'avons décrit plus haut, chez un sujet en santé, cette réponse s'articule grâce à une barrière épithéliale efficace et un système immunitaire intestinal spécifique et complexe. Une perturbation de ce délicat équilibre peut entraîner une réponse inflammatoire incontrôlée pouvant mener à une inflammation intestinale chronique, telle que celle rencontrée dans les MII (18).

### **2.1. Généralités**

#### **2.1.1. Incidence**

Au cours des dix dernières années, les MII sont devenues les pathologies liées au microbiome intestinal les plus étudiées (78). Les MII sont des maladies idiopathiques, chroniques et récurrentes causant l'inflammation du tractus gastro-intestinal (79). Elles comprennent la colite ulcéreuse (CU) et la maladie de Crohn (MC), qui ensemble affectent plus de 1,4 millions de personnes aux États-Unis, 2,2 millions de personnes en Europe et 233 000 personnes au Canada (78, 80, 81). Les taux d'incidence et de prévalence les plus élevés pour la CU et la MC sont rapportés dans le nord de l'Europe, au Royaume-Uni et en Amérique du Nord. En Amérique du Nord, les taux d'incidence pour la CU vont de 2,2 à 14,3 cas/100,000 personnes/année alors que ceux pour la MC sont de 3,1 à 14,6 cas/100,000 personnes/année. La prévalence va de 37 à 246 cas par 100,000 personnes pour la CU et de 26 à 199 cas par 100,000 personnes pour la MC et il n'y a généralement pas de différences de fréquence entre les sexes (79, 80, 82). Au Canada, la prévalence est de 0,7% soit 1 canadiens /150. Même si l'incidence et la prévalence de CU et MC commencent à se stabiliser dans les

pays à haute incidence comme le nord de l'Europe et l'Amérique du Nord, elles continuent d'augmenter dans les pays à plus faible incidence, au sud et au centre de l'Europe, en Asie, en Afrique et en Amérique latine et une grande partie des pays en développement. Cette tendance semble corrélée avec l'industrialisation et l'occidentalisation de ces régions, des changements tels que la diète, le mode de vie et probablement d'autres facteurs environnementaux propre au mode de vie occidental (80). Puisque ces maladies sont des maladies chroniques qui causent peu de mortalité, les taux de prévalence sont affectés par les diagnostics émis plus tôt ainsi que potentiellement par une augmentation de la durée de la maladie. Les données d'épidémiologie sont incomplètes dans les pays sous-développés (82).

### **2.1.2. Caractéristiques**

Les premiers symptômes peuvent se développer à tout moment dans la vie du patient mais débutent généralement durant l'adolescence ou chez le jeune adulte (79, 80). Les MIIs sont diagnostiquées par un historique clinique et un examen physique, en plus de recherches radiologiques, endoscopiques et histologiques. Ces deux derniers sont favorisés (79). Dans 15% des cas, on ne peut différencier la maladie de Crohn (MC) de la colite ulcéreuse (CU) (83, 84). Les MIIs n'ont toujours pas de cure. Les patients passent souvent par des périodes de rémission spontanée ou induite par la médication. La MC et la CU peuvent causer des manifestations extra-intestinales chez 50 à 60% des patients. Les manifestations les plus fréquemment rencontrées sont des douleurs aux articulations causées par des arthropathies, une inflammation des articulations sacro-iliaques, de l'ostéopénie ou de l'ostéoporose, des lésions au niveau de la peau, des uvéites ou des iritis. Toutes ces manifestations sont le plus souvent corrélées avec l'activité de la maladie (79). Les patients MIIs ont donc des répercussions sociales, psychologiques et financières qui contribue à l'altération de leur qualité de vie. De plus, puisque l'incidence mondiale augmente, les impacts économiques et la pression sur les systèmes de santé sont en augmentation. Les MIIs sont associées à une augmentation considérable du risque de développer un cancer colorectal et plus spécifiquement chez les sujets où la maladie est demeurée active durant 8-10 ans (83).

La CU est caractérisée par une inflammation diffuse de la muqueuse et, à plus petite échelle, la sous-muqueuse. Elle est restreinte au colon mais peut affecter toute sa longueur (du

caecum au rectum) (23, 83). Selon l'étendue de la maladie, on distingue quatre formes de colite ulcéreuse: la rectite ulcéreuse, qui se limite au rectum, la proctosigmoïdite, qui touche le rectum et le côlon sigmoïde, la colite distale, qui touche le côlon descendant (partie du côlon située du côté gauche du corps) et la pancolite, qui touche le côlon en entier (79).

La CU est caractérisée par des ulcérations superficielles, de la granularité et une perte des motifs vasculaires normaux (23). On peut retrouver sur les histologies de patients CU des atrophies et distorsions de cryptes, des glandes ramifiées ou distordues, des micro-abcès neutrophiliques dans le lumen des cryptes et de l'inflammation diffuse de la LP causée par une augmentation du nombre de cellules inflammatoires (79). Les symptômes débutent habituellement par des saignements rectaux plus sévères que chez MC, de la diarrhée et des crampes abdominales (79). Les manifestations cliniques de la CU vont généralement inclure le relâchement de sang et de mucus, des hémorragies pétéchiales - multiples petites hémorragies cutanées -, des granulations des tissus et autres. En temps de rémission, la muqueuse peut avoir une allure saine mais les formes les plus sévères de la maladie peuvent causer une distension de l'intestin (augmentation de la surface ou du volume sous l'effet d'une tension en divers sens), des ulcérations profondes et possiblement des perforations intestinales (23).

La maladie de Crohn (MC) peut affecter toutes les parties du tube gastro-intestinal, de la bouche à l'anus, et est caractérisée par une inflammation discontinue et transmurale, i.e. qu'elle peut impliquer toutes les couches de tissus intestinaux. La MC se caractérise par la formation de rétrécissements, de fistules, d'ulcères et de granulomes dans la muqueuse. Les granulomes sont évidents dans 50% des patients et les fistules dans 25% des patients (83).

Des manifestations cliniques extra-intestinales rares de la MC peuvent comprendre de l'arthropathie ou des problèmes de peau. Faits à noter, les manifestations sur la peau, les muscles ou les os peuvent être des symptômes qui mènent à la découverte de la maladie chez un patient n'ayant pas de symptômes propres à la MC (23). Sur les histologies de patients MC, on peut retrouver de l'inflammation transmurale, segmentée et isolée, formée de cellules d'inflammations chroniques et de cellules polymorphonucléées. Une caractéristique spécifique et importante pour le diagnostic chez les patients MC est la présence de granulomes

épithélioïdes, i.e. un regroupement d'histiocytes (macrophages et cellules dendritiques des tissus), plus particulièrement des macrophages avec une morphologie ressemblant à de grosses cellules épithéliales (79).

Contrairement à la CU, les symptômes chez les patients MC sont très variables et parfois même subtiles : diarrhées, crampes abdominales douloureuses, anémie causée par une déficience en fer, fatigue, perte de poids et fièvre (23, 79). La MC est aussi caractérisée par une malabsorption des acides biliaires, du fer, du calcium, du zinc, des vitamines solubles dans l'eau telles que l'acide folique et les vitamines A, D, E et K , ce qui entraînent certaines déficiences, des diarrhées et d'autres problèmes reliés (79).

En pourcentages: la majorité des patients MC (~80%) ont une atteinte du petit intestin, 20% ont une inflammation limitée au colon, 50% ont leur rectum affecté, 50% ont une iléocolite (iléon et colon), 14-30% ont des lésions à l'iléon distal (iléite), 37% des patients MC ayant des lésions coloniques ont aussi une inflammation périanale et moins de 5% ont la partie supérieure du tractus impliquée (bouche, œsophage, région gastroduodénale et petit intestin proximal) (79).

Finalement, les colites non spécifiques comprennent : la colite microscopique, une infiltration lymphocytaire visible uniquement sur les biopsies alors que le colon semble normal; la colite de diversion, l'inflammation d'une partie du colon qui a été enlevé du flot fécal par chirurgie; la diverticulite, l'inflammation des régions du colon affectées par des diverticules (hernies de muqueuse au travers de la paroi musculaire du colon); et la pouchite, l'inflammation chez les patients ayant subis une anastomose (connexion entre deux structures) iléo-anale après une coloprotectomie (ablation du rectum et du colon) (79).

### **2.1.3. Facteurs de risques**

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MII) sont des maladies très complexes et de très grandes cohortes seront nécessaires afin d'associer un facteur environnemental à la maladie ou même trouver des interactions entre les facteurs de risques génétiques d'un individu et ces facteurs de risques environnementaux, leurs effets sur le développement et le cours de la maladie (82). L'étiologie des MII est toujours inconnue mais une hypothèse

pointe vers une réponse immunitaire anormale contre les microorganismes de la flore commensale chez des patients génétiquement susceptibles (18, 79). Les études effectuées durant les dernières années sur les facteurs environnementaux et génétiques démontrent qu'il s'agit d'une combinaison de ces facteurs qui causent d'abord des altérations dans les fonctions de la barrière épithéliale. Les altérations permettraient la translocation d'antigènes de la lumière intestinale. Il s'en suit une réponse immunitaire excessive et aberrante causant de l'inflammation chez les hôtes présentant une susceptibilité génétique particulière. L'activation incontrôlée du système immunitaire mucosale serait la cause du développement d'une inflammation chronique chez les patients où l'inflammation aiguë est persistante. En particulier, les cellules du système immunitaire mucosale telles que les macrophages, les cellules T et les nouvellement découvertes cellules lymphoïdes innées (CLIs), répondent aux antigènes des bactéries commensales et produisent des cytokines qui provoquent une inflammation chronique du tractus gastro-intestinal (85).

De plus, puisque les MIIs ont des prévalences plus élevées dans les pays développés, il semble que les facteurs de risques environnementaux soient tout aussi importants que les facteurs de risques génétiques. La localisation géographique semble jouer un rôle très important dans le développement des MIIs. Des données d'immigration démontrent que des personnes provenant de régions à faible risque qui se déplacent vers des environnements à haut risque augmentent leur risque personnel de développer les MIIs (82, 86). Cela pourrait être causé par des facteurs tels que la densité de la population, l'éducation, le mode de vie et possiblement l'exposition à certains agents polluants. Il est toutefois incertain si l'augmentation du risque est causée uniquement par l'environnement ou en combinaison avec des prédispositions génétiques (82). L'industrialisation et l'urbanisation des sociétés sont associées à des changements au niveau de l'hygiène, du microbiome, de la diète, du mode de vie, de la médication et des expositions à des agents polluants, tous impliqués comme de potentiels facteurs de risques pour les MIIs (83).

Il existe aussi une hypothèse impliquant l'hygiène selon laquelle les environnements plus « propres » et permettant moins la propagation de maladies contagieuses sont associés à des taux plus élevés de MIIs et donc que des environnements moins hygiéniques auraient un rôle protecteur. Il semblerait que ce rôle protecteur découle d'une plus faible utilisation des

antibiotiques, d'une augmentation du nombre d'animaux domestiques et de ferme, de plus grandes familles et une plus grande exposition aux bactéries entériques. Il y a un taux plus élevé de MIIs dans les pays avec de plus faibles taux de pathogènes entériques et où l'accès à de l'eau chaude et la décontamination sont courants. Au contraire, dans les pays en développement, les jeunes sont plus exposés aux maladies infectieuses et ont moins de troubles allergiques (56, 82). Des expositions très jeunes et récurrentes aux antibiotiques ont été associées à des risques augmentés de développer les MIIs. Il est possible que la prise d'antibiotiques soit associée au développement de la maladie en altérant le microbiome intestinal. Il est aussi possible que les individus ayant des susceptibilités génétiques aux MIIs soient aussi plus susceptibles aux infections et donc doivent prendre plus souvent des antibiotiques. Que ce soit un effet pathologique direct des antibiotiques seuls ou en association avec les réponses immunitaires, il semble que les individus provenant de régions où les antibiotiques sont plus accessibles aient aussi plus de chances de développer la maladie (82). Une carence en vitamine D, causée par un manque d'activités physiques, un manque d'exposition au soleil, une malnutrition, un apport alimentaire inadéquat ou une plus faible biodisponibilité, a été découverte chez des patients précédemment diagnostiqués et des patients ayant nouvellement développés la maladie. Il est aussi possible que cette carence affecte le système immunitaire via les cellules T, les cellules B et les cellules présentatrices d'antigènes (82).

Fumer la cigarette a été associé à une diminution des risques de développer la CU. Par contre, les ex-fumeurs ont 70% plus de chance de développer la CU que ceux qui n'ont jamais fumé. Au contraire de la CU, plusieurs études ont démontré que fumer la cigarette augmente les risques de développer la MC, les anciens fumeurs ayant aussi un risque mais plus faible que ceux qui fumaient au moment des études. La cigarette semble affectée le cours de la maladie, que ce soit pour la MC ou la CU (80). Par contre, il semble que ces effets ne soient pas consistants entre différents groupes ethniques, suggérant une interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux pour influencer l'apparition, le cours et le tableau clinique de la maladie (82).

Une appendicectomie semble conférer une protection contre la CU. Comme pour le tabagisme, l'appendicectomie semble influencer l'incidence mais aussi le cours de la maladie.

Les effets de l'appendicectomie sur la MC sont à l'étude mais il semble qu'elle augmenterait les risques de développer la maladie (80).

Les contraceptifs oraux augmenteraient les risques de développer les MIIs. Selon différentes études cas-contrôles, cette association est faible et il n'est toujours pas établi si la prise de contraceptifs oraux modifie le cours de la maladie (80).

Il est normal que la diète puisse être vue comme un facteur de risque puisque les antigènes présents dans les aliments sont, avec les antigènes bactériens, les plus communs de la lumière intestinale. Les différences de diète pourraient aussi expliquer en partie les différences d'incidence entre les différentes régions du monde. Ces études sont difficiles à interpréter car elles sont limitées sur la capacité des sujets à se remémorer exactement leur diète sur de longues périodes de temps (80, 82). Les mécanismes proposés pour expliquer l'influence de la diète sur le développement de la maladie impliqueraient un effet direct des antigènes de la diète sur la perméabilité intestinale et sur les réponses auto-inflammatoires de la muqueuse suivant des changements dans la composition du microbiome. Les carbohydrates auraient un effet secondaire sur les MIIs alors que les fibres alimentaires sont étudiées pour un effet anti-inflammatoire.

Le stress semble jouer un rôle, non seulement dans le développement de la maladie, mais aussi dans sa gravité. Les connaissances sur ce sujet sont toujours limitées et les études sont particulièrement importantes puisque le traitement de maladies telles que la dépression aurait la capacité d'influencer le cours de la maladie inflammatoire (82).

#### **2.1.4. Traitements**

L'objectif principal visé par les traitements médicaux chez les patients MIIs est de contrôler l'inflammation et réduire les symptômes, permettre une rémission clinique sans utilisation de stéroïdes et si possible favoriser la réparation des muqueuses (79).

Pour la colite ulcéreuse (CU), les différentes thérapies et leur mode d'administration dépendent de la sévérité de la maladie (23, 79). Les patients ayant des manifestations légères sont souvent traités avec des aminosalicylates alors que les corticostéroïdes sont utilisés chez les patients ayant des manifestations modérées à sévères. Ces derniers causent des effets

secondaires importants. Pour les patients démontrant des symptômes plus sévères, les cyclosporines sont favorisées. Toutefois, ils peuvent causer de très sérieux effets secondaires et ne sont donc pas recommandées sur de longue durée. Plus récemment, les médicaments dits biologiques tels que les anti-TNF ont fait leur apparition et peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec les thérapies conventionnelles.

Le choix de la thérapie pour la maladie de Crohn (MC) dépend aussi de la localisation anatomique des lésions et de leur sévérité (79). Les aminosalicylates et les antibiotiques sont généralement favorisés lorsque la maladie se présente avec des manifestations légères touchant la muqueuse. On les emploie principalement pour les iléites, iléocolites et colites de Crohn malgré une efficacité moindre que chez les sujets atteints de la CU. Les antibiotiques sont utilisés comme traitement adjuvant dans les cas de colite de Crohn luminale, de la MC avec fistules péri-anales, d'une iléocolite post-opération, de la CU et de la pouchite. Les glucocorticoïdes sont, quant à eux, utilisés pour des traitements courts et avec des doses décroissantes, sous forme orale ou intraveineuse. Ils sont essentiellement utilisés chez des patients MC modérés ou sévères qui débutent des symptômes ou qui ont une augmentation subite des symptômes. Un traitement stéroïdien est souvent utilisé en combinaison avec un traitement non-stéroïdien. Les glucocorticoïdes non-systémiques peuvent être efficaces pour la maintenance à court terme (6 mois-1 an) de la rémission, dans les cas d'iléites et iléocolites modérées. Les immunomodulateurs sont utilisés dans les cas où les patients MC sévères ne répondent pas aux autres traitements ou chez lesquels les symptômes recommencent malgré les traitements. Ils peuvent amener une rémission et la maintenir. Les thérapies biologiques par anti-TNF sont efficaces pour induire et maintenir la rémission chez la MC actives lumineales et dans les maladies à pénétrance (fistules). Pour les maladies péri-anales incluant les abcès et les fistules, des combinaisons de traitements sont utilisées (79). Des associations de médicaments peuvent être utilisées pour des thérapies de maintenance (23).

Les antibiotiques altèrent la composition microbienne. L'homéostasie microbienne est souvent affectée par une perte de la complexité des espèces, surtout les bactéries ayant des fonctions de protection, ce qui augmente les risques d'infection ou de dysbiose. De plus, les antibiotiques causent la réduction de l'épaisseur de la couche de mucus, réduisant sa fonction de barrière (78). Plutôt que de traiter les patients MII avec des antibiotiques, le repeuplement

de l'habitat de l'intestin par un microbiome sain (probiotiques) gagne en popularité depuis quelques années (23). Des études préliminaires ont démontré l'importance de la complexité et de la composition utilisées pour différents sous-types de la maladie. Certaines études démontrent l'efficacité de la transplantation du microbiome fécal (*fecal microbiota transplantation (FMT)*), particulièrement certaines communautés, contre les infections à *Clostridium difficile* (78). Il y a déjà quelques études faites chez les patients MIIs mais plus d'études sont nécessaires afin de conclure (87).

Une colectomie complète est considérée dans les cas où un patient avec une maladie modérée à sévère subit plusieurs rechutes et ne répond pas aux différents traitements. Il est courant que les patients ayant été opérés développent une pouchite et les anti-TNF aident les patients MC à éviter une rechute post-opérationnelle (79).

Les thérapies biologiques pour le traitement des MIIs visent des cytokines présentes dans la lamina propria des patients et qui sont responsables de la maintenance de l'inflammation chronique de la muqueuse intestinale. Parmi ces thérapies, il y a les anti-TNF $\alpha$  monoclonales. Elles permettent de maintenir la rémission chez des patients MC, même ceux ayant des formes sévères de la maladie. Elles permettent aussi la réparation mucoale, la rémission clinique et réduit les cas d'hospitalisation et les procédures chirurgicales. Ces traitements sont spécifiques et leurs mécanismes d'action sont directs mais les coûts sont très grands. Il s'agit donc, pour l'instant seulement d'une alternative utilisée chez les patients qui ne répondent pas aux traitements de corticostéroïdes et aminosalicylates (23). Aussi, certains traitements inhibent l'adhésion et la migration leucocytaires aux niveaux des tissus inflammés par l'utilisation d'anticorps contre des molécules d'adhésion (88). Parmi ces molécules, on retrouve les intégrines à la surface des leucocytes qui sont impliquées dans leur adhésion, leur migration de la circulation vers les tissus et leur permet d'activer les cellules immunitaires (89). Bien que ces thérapies se montrent intéressantes pour le traitement des patients qui ne répondent pas ou qui sont intolérants aux autres thérapies plus traditionnelles, des recherches plus approfondies seront nécessaires afin d'augmenter leur efficacité (90).

## 2.2. Le système immunitaire dans les maladies inflammatoires de l'intestin

Jusqu'à nos jours, la plupart des études portaient sur le rôle de l'immunité adaptative. La maladie de Crohn (MC) était perçue comme une maladie Th1 dépendante puisque chez ces patients, il y a une augmentation de la sécrétion d'IFN $\gamma$  et d'IL-2 par les cellules T des muqueuses comparativement aux cellules T des patients atteints de la colite ulcéreuse (CU). De son côté, la CU était perçue comme une maladie Th2 dépendante puisque les patients atteints produisent plus d'IL-5 et ont des cellules tueuses naturelles (TNs) atypiques qui sécrètent de plus grandes quantités d'IL-13 comparativement aux patients atteints de la MC. L'IL-13 exercerait des effets importants sur l'épithélium intestinal tels que l'augmentation de la perméabilité et l'induction de la différenciation des entérocytes ainsi que leur apoptose (18). Par contre, ces idées ont changé puisqu'il a été démontré que ces cytokines ont des actions diverses et opposées (23).

### Immunité adaptative chez les patients atteints de MIIs

Outre les réponses classiques Th1 et Th2, l'implication des Th9, des Th17 et des cellules Treg dans les MIIs se confirme (9). Les patients atteints de la CU présentent une augmentation de la sécrétion d'IL-9 par les cellules Th9 effectrices. L'IL-9 bloque la prolifération des cellules épithéliales intestinales (CEIs), régulent l'expression de plusieurs protéines de jonctions serrées et altèrent les mécanismes de réparation tissulaire. Tous ces aspects favorisent le bris de la barrière épithéliale ainsi que la translocation d'espèces bactériennes spécifiques et l'activation subséquentes des cellules immunitaires et de l'immunité mucoale (23, 91, 92).

Les Th17 sont un sous-groupe de cellules T caractérisé par la production d'une grande quantité d'IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22. Des données récentes démontrent que les cellules Th17 et autres cellules produisant de l'IL-17 jouent un rôle crucial dans les manifestations inflammatoires de l'intestin. Elles sont abondantes dans les intestins, surtout dans l'iléon terminal, où elles sont induites par des cytokines, comme l'IL-6 et l'IL-23, qui sont augmentées lors de réactions contre le microbiome normal (85). Il a été observé que chez les patients atteints des MIIs, il y a un plus grand nombre de cellules Th17. De plus, des polymorphismes dans le gène IL23R, qui est important pour la maintenance et la pathogénicité

des cellules Th17, sont associés à la susceptibilité aux MIIs (56, 93, 94). IL-17 et IL-22 sont reliées à l'induction des colites en initiant et amplifiant les signaux d'inflammation locale. Elles causent l'activation des mécanismes de contre-régulation qui ciblent les cellules épithéliales (23). Elles jouent aussi un rôle dans le développement des maladies autoimmunes (12). L'IL-17A produit par les Th17 induit le recrutement des neutrophiles au site d'inflammation, permet la régulation positive de nombreuses molécules pro-inflammatoires comme l'oxyde nitrique synthase (NOS) et l'IL-1 $\beta$  et induit la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (18). Toutes ces manifestations tendent à initier ou amplifier la réaction inflammatoire. En plus du gène *IL23R*, plusieurs autres gènes impliqués dans la différenciation des Th17 sont associés à la maladie de Crohn : *IL12B*, *JAK2*, *TYK2*, *STAT3*, *CCR6*, *IL2/IL21* et *TNFSF15* (95, 96).

Les cellules Treg sont impliquées dans la maintenance de l'homéostasie mucoale intestinale en supprimant les réponses immunes anormales contre le microbiome commensal et les antigènes de la diète. Elles exercent leur fonction en produisant des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF $\beta$  et en prévenant l'activation et la fonction effectrices des cellules T qui auraient échappé aux autres mécanismes de tolérance. La signalisation par le TGF $\beta$  est nécessaire à la fonction des cellules Treg. Il cause l'activation intracellulaire des protéines SMAD2, SMAD3 et SMAD4 chez les cellules T effectrices et les macrophages ce qui contribue à diminuer leurs fonctions effectrices. Dans les muqueuses inflammées des patients MIIs, cette voie est atténuée suite à une surexpression du facteur de transcription SMAD7, qui inhibe la voie du TGF $\beta$ , par les cellules T effectrices (18). Ces cellules peuvent donc devenir résistantes à la suppression par TGF $\beta$  (85). Il semble donc que la diminution de l'activité anti-inflammatoire des cellules Treg dans les MIIs est tout aussi importante que l'augmentation des mécanismes effecteurs dans la participation à la pathologie des MIIs. Fait intéressant, les gènes *SMAD3* et *IL10* ont tous deux été associés aux MIIs (9, 96).

#### Immunité innée chez les patients MIIs

Durant les dernières décennies, les études sur la pathogénèse des MIIs portaient surtout sur l'immunité adaptative et la polarisation des cellules T (97). Les MIIs étaient alors vues

comme des maladies autoimmunes. Des avancées récentes en immunologie et en génétique soutiennent maintenant que l'immunité innée serait toute aussi importante que l'immunité adaptative dans l'inflammation intestinale des patients MIIs. Chez les patients atteints de la colite ulcéreuse, on parle ici de l'altération de la fonction de barrière de l'épithélium. Chez les patients atteints de la maladie de Crohn, il est question de l'altération des réponses immunitaires innées telles que la production de PAMs, la reconnaissance microbienne innée et l'autophagie (18).

L'une des premières étapes de l'inflammation intestinale chez l'humain est le bris de la barrière épithéliale et la pénétration des bactéries de la lumière dans la lamina propria. Une barrière épithéliale défectueuse, causée par des structures de jonctions serrées altérées et une perméabilité intestinale augmentée, sont observées chez les patients atteints des MIIs (18). Ces patients souffrent de malabsorptions et de diarrhées causées par une perte passive d'eau et d'ions de la circulation vers la lumière, conséquence de cette perte de perméabilité. Tel que mentionné, les jonctions serrées sont importantes pour la régulation des mouvements paracellulaires de l'eau et des minéraux. Les jonctions serrées sont des structures très dynamiques. Chez les patients MIIs, on retrouve une perte du nombre de jonctions serrées et une diminution de leur complexité qui sont associés à une diminution de l'expression de certaines occludines et de claudines (98).

Dans le cas des MIIs, la dysfonction des jonctions serrées seule semble suffisante pour l'induction de la maladie (11). Plusieurs cytokines pro-inflammatoires, telles que le  $\text{TNF}\alpha$ , l' $\text{IFN}\gamma$ , l' $\text{IL-1}\beta$ , l' $\text{IL-6}$ , l' $\text{IL-13}$  et l' $\text{IL-17}$ , régulent les jonctions serrées et la fonction de barrière épithéliale par le recrutement de cellules immunitaires, la régulation de l'expression des protéines de jonctions et la redistribution des protéines de ces jonctions dans les cellules épithéliales intestinales (CEIs) (99, 100). Toutes formes d'altérations dans ces fonctions cellulaires présentent donc un potentiel de développement d'une inflammation. De plus, le  $\text{TNF}\alpha$  et l' $\text{IL-13}$  peuvent aussi causer l'apoptose des CEIs et, avec l' $\text{IFN}\gamma$ , augmenter la translocation bactérienne en permettant le bris de la barrière épithéliale et limitant son renouvellement (98). L' $\text{IL-6}$  prévient la mort cellulaire programmée (apoptose) des cellules T muco-sales et active la production de cytokines pro-inflammatoires par ces cellules. L' $\text{IL-6}$  a

aussi des fonctions homéostatiques en stimulant la prolifération et l'expansion des CEIs pour le renouvellement et la réparation tissulaire (85). En plus de l'intégrité de la barrière épithéliale, la détection des microbes, l'autophagie et le mauvais repliement de protéines sont vus comme centraux dans la pathogénèse des MIIs (18).

### Réponse cellulaire de l'immunité innée chez les patients MIIs

Les cellules lymphoïdes innées (CLIs) sont un groupe de cellules récemment découvert qui contrôle l'immunité innée aux surfaces des muqueuses. Ces cellules sont maintenant reconnues comme étant une importante source d'IFN $\gamma$  et de cytokines pro-inflammatoires inductibles par l'IL-23 comme l'IL-17A et l'IL-17F. Chez les patients atteints de la maladie de Crohn (MC), on retrouve dans les muqueuses inflammées une plus grande quantité de CLIs produisant de l'IL-17, ce qui n'est pas observé chez les patients atteints de la colite ulcéreuse (CU). On note aussi chez les patients atteints de la MC une plus grande quantité du sous-groupe de cellules intra-épithélial CLI1. Ce sont des cellules qui produisent de l'IFN $\gamma$  en réponse à une stimulation IL-12 et IL-15.

Les cellules dendritiques (cDs) de la lamina propria et les macrophages (m $\phi$ ) sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) clé retrouvées dans les muqueuses inflammées des patients MIIs. Leur activation en réponse aux composantes des bactéries commensales et à la signalisation TLRs cause une production accrue de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 et TNF (85). Les cDs activées s'accumulent au niveau des tissus inflammés des patients MIIs. Elles expriment plus fortement les TLR2 et TLR4 et certaines molécules de costimulation ce qui contribue à augmenter leurs réponses effectrices (34). Une diminution significative du ratio de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL1RA) sur IL-1 est retrouvée dans la muqueuse intestinale des patients CU et MC ce qui signifie qu'il y a une augmentation de l'activation des voies de l'IL-1 chez ces patients (85). Or, l'IL-1 exerce des effets pro-inflammatoires très puissants. L'IL-1 induit le recrutement des cellules immunitaires au site d'inflammation et la sécrétion de médiateurs inflammatoires comme des cytokines et est aussi impliqué dans la différenciation des Th17 (101).

Le TNF a des effets pléiotropiques comme une augmentation de l'angiogénèse, l'induction de la mort cellulaire des cellules de Paneth, la production de métalloprotéinases matricielles par les myofibroblastes, l'activation des m $\phi$  et des cellules T effectrices et le dommage direct des cellules épithéliales intestinales par l'activation de la *myosin light chain kinase (MLCK)*. Le TNF exerce plusieurs fonctions pro-inflammatoires durant la colite en se liant à ses récepteurs TNFR1 et TNFR2. Ces récepteurs, lorsqu'activés, conduisent à l'activation intracellulaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, un médiateur pro-inflammatoire puissant. Des études cliniques et expérimentales récentes ont démontré que le TNF membranaire, plus que le TNF soluble, aurait un rôle majeur dans l'inflammation intestinale. Des traitements expérimentaux visant l'interaction entre TNF membranaire-TNFR2 sont à l'étude (85). Il a été observé chez les patients MIIs que les cellules mononucléaires de la lamina propria surproduisent autant la forme membranaire que la forme soluble du TNF.

Malgré la quantité énorme d'antigènes intestinaux, les m $\phi$  résidents de la lamina propria démontrent normalement de l'anergie inflammatoire. En absence d'inflammation, les monocytes circulants entrent dans les tissus intestinaux et se différencient en m $\phi$  hypo-répondants aux agonistes des TLRs et sécrètent beaucoup d'IL-10. Par contre, ce processus de différenciation est perturbé dans les cas d'inflammation intestinale. Une fois dans les tissus, grâce à des signaux inflammatoires locaux, les monocytes se différencient et deviennent hyper-répondant aux stimuli bactériens. Ils produisent alors de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-23 et TNF) (102). Ces médiateurs inflammatoires initieront des effets contribuant à l'inflammation et aux dommages à l'intestin par une augmentation de la perméabilité de l'épithélium et du recrutement de cellules mononucléaires et granulocytes, de l'activation des cDs et de la différenciation des Th1 en Th17. Ils causent aussi l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire, causant un accroissement du recrutement de cellules inflammatoires au site d'inflammation (33). Dans le même ordre d'idée, les biopsies intestinales de zones inflammées provenant de patients atteints de la MC présentent une plus grande quantité de m $\phi$  CD14+, provenant du bassin de monocytes circulants.

Puisque les neutrophiles constituent une composante importante de la première ligne de défense contre les invasions en répondant fortement contre celles-ci, l'augmentation de la

perméabilité de la barrière intestinale a une influence directe sur eux (75). Une propriété unique des neutrophiles est l'arrêt de leur prolifération dès qu'ils sortent de la circulation. Ils ont alors une durée de vie de quelques jours. Lors d'une inflammation aiguë, les neutrophiles infiltrés vont entrer en apoptose, tout en gardant leur intégrité membranaire jusqu'à leur phagocytose par un m $\phi$ . Toutefois, lors d'une inflammation soutenue, similaire à celles rencontrées dans les MIIs, les cellules phagocytaires ne parviennent pas à éliminer tous les neutrophiles apoptotiques infiltrés. Ces derniers entrent alors en nécrose, relâchant leur contenu cytotoxique et entraînant des dommages tissulaires. Chez les patients atteints de la CU, on retrouve un délai dans la phagocytose des neutrophiles, une augmentation des niveaux d'IL-1, d'IL-8, de l'IFN $\gamma$  et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)*) ainsi qu'une diminution de l'expression des caspases, qui sont des enzymes clés de la voie de l'apoptose. Ensemble, ces cytokines causent l'inhibition de la phagocytose des neutrophiles apoptotiques. Chez les patients atteints de la MC, certaines études ont démontré une diminution du recrutement, de la production de superoxyde et de la fonction phagocytaire chez les neutrophiles. Cette diminution serait associée à un défaut dans la production de chimiokines par les macrophages et causerait une accumulation pathologique lymphocytaire chez les patients MC (75).

Il est maintenant connu que plusieurs cellules non-immunes comme les cellules épithéliales, les myofibroblastes sous-épithéliales, les adipocytes et les myofibroblastes peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires dans les MIIs. Comme nous venons de le voir, ces cytokines peuvent activer les cellules immunitaires des muqueuses comme les CPAs et les cellules T et donc contribuer à l'inflammation des muqueuses observée chez les patients atteints de MIIs. De plus, ces cellules peuvent répondre aux cytokines produites par les cellules immunitaires et donc contribuer à la destruction tissulaire (85).

### **2.3. Le microbiome**

Le microbiome intestinal contribue aussi à plusieurs niveaux à l'étiologie des maladies inflammatoires de l'intestin (MIIs), tel que démontré par plusieurs études (79). Les études de profilage du microbiome intestinal semblent démontrer un changement de la composition

microbienne entre les patients et les sujets sains. Ces observations appuient l'hypothèse voulant qu'il existe une relation entre le microbiome intestinal et le système immunitaire mucosale. Plusieurs études, réalisées par séquençage de l'ADN, ont permis de trouver une dysbiose chez les patients MIIs et les premières évidences démontrent qu'elle serait due à une réduction de la biodiversité et une altération de la représentation de certains taxons (71, 78). La composition bactérienne est aussi différente entre la CU et la MC (9). Le microbiome intestinal cause une résistance à la colonisation des pathogènes - mais facilite aussi parfois l'infection virale. Il joue donc un rôle dans le développement du système immunitaire intestinal. Certaines des espèces bactériennes ayant des propriétés anti-inflammatoires sont réprimées dans les cas de MIIs. Ces microorganismes constituant le microbiome peuvent contribuer à une diminution de l'expression de gènes de virulence en plus de réguler l'activation de NF- $\kappa$ B. Ceci favorise donc la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et l'atténuation de l'inflammation mucosale par l'induction de la production d'IL-10. Certaines espèces bactériennes fermentent les fibres de la diète, des prébiotiques, et produisent des AGCCs telles que le butyrate qui sont la source d'énergie principale des cellules épithéliales coloniques et qui induisent l'expansion des cellules Treg du colon. Certaines de ces espèces bactériennes sont aussi réprimées (73, 78).

Les membres non-bactériens du microbiome, soit les fonges, les virus, les archées et les phages, pourraient avoir un rôle significatif dans les maladies gastro-intestinales. Il est à noter que les patients MIIs présentent une diversité fongique plus élevée. Une étude a démontré que la susceptibilité génétique ainsi que le microbiome indigène étaient requis dans le développement de l'inflammation chronique. Toutefois, les symptômes dépendent des facteurs environnementaux tels que les virus. Des études d'infections intestinales aiguës ont permis de mieux comprendre le mécanisme par lequel ces facteurs environnementaux contribuent à l'inflammation intestinale. L'hypothèse veut qu'une perturbation de la barrière mucosale, par des agents infectieux ou autres agents environnementaux, exposerait le système immunitaire de l'hôte au microbiome résident. Cette exposition stimulerait la prolifération de cellules T spécifiques aux bactéries commensales et aux pathogènes du microbiome intestinal. Ces cellules vivent très longtemps et ont la capacité de migrer vers d'autres muqueuses. Leur

rencontre avec le microbiome commensal peut donc causer un déséquilibre favorisant le développement d'une inflammation pathologique (86).

Depuis les dix dernières années, les études d'association pan-génomiques ont permis de faire le lien entre les MIIs et une réponse immunitaire incontrôlée face au microbiome intestinal. Des prédispositions génétiques de l'hôte semblent contribuer grandement à l'établissement et la constitution du microbiome intestinal. Ce phénomène a été mis en évidence grâce aux études utilisant des cohortes de jumeaux identiques (monozygotes). Le microbiome des jumeaux identiques est plus similaire que celui de frères et sœurs non-jumeaux. D'ailleurs, un des premiers gènes de susceptibilité associé à la maladie de Crohn, le gène *NOD2*, est impliqué dans la réponse immunitaire contre les bactéries en se liant au muramyl dipeptide. Le muramyl dipeptide est un peptidoglycane de la membrane cellulaire des bactéries Gram positives et négatives. Les patients MIIs ayant des mutations dans le gène *NOD2* ont un plus grand nombre de bactéries adhérentes aux muqueuses et une diminution de la transcription du gène *IL-10*, une cytokine anti-inflammatoire. Les patients MIIs portant les allèles à risque des gènes *NOD2* et *ATG16L1*, impliqués dans l'autophagie, présentent en plus des altérations au niveau du microbiome intestinal (78).

#### **2.4. Études génétiques**

Plusieurs maladies humaines communes ont des étiologies complexes. Ces maladies sont dites à traits complexes puisqu'elles sont causées par la combinaison de facteurs de risques génétiques et environnementaux. Par opposition aux maladies monogéniques dont l'étiologie repose essentiellement sur des mutations affectant un seul gène, dans les maladies à traits complexes, chaque variation d'un gène associé contribue à augmenter le risque de développer la maladie mais ne peut à elle seule la générer. Ces facteurs s'ajoutent à la composante environnementale et au mode de vie afin d'induire la pathologie. D'ailleurs, des études sur les jumeaux identiques démontrent une concordance pour la maladie de Crohn de 50-60%, ce qui veut dire que 40-50% des jumeaux identiques sont discordant pour cette maladie (80). De plus, plusieurs études avec des jumeaux monozygotes ont démontré que les MIIs sont des maladies multifactorielles où le génome, le système immunitaire et surtout l'environnement sont des facteurs importants (78).

Les polymorphismes nucléotidiques simples (*single nucleotide polymorphisms, SNP*) sont les types de variations génétiques les plus communs. Chaque SNP représente une différence nucléotidique de la séquence primaire d'une région du génome. Les SNPs sont des variations qui se produisent spontanément et sont ensuite transférés de génération en génération. Ils sont donc des variations génétiques stables. Ils affectent un nucléotide tous les 300 nucléotides en moyenne. On retrouve donc environ 10 millions de SNPs chez un individu donné. Puisque l'exome, i.e. l'ensemble des régions codantes pour des protéines du génome, représente seulement ~1,5% du génome, la plupart des SNPs sont observés dans des régions intergéniques. Ils n'ont généralement pas d'effet sur la santé ou le développement d'un individu. Toutefois, lorsqu'ils se localisent au niveau des régions régulatrices ou au sein des séquences codantes d'un gène, ils ont le potentiel d'en moduler l'expression ou de modifier la séquence primaire des protéines, ce qui peut entraîner une altération ou une perte de fonction. Puisqu'ils sont des variations stables du génome, ils peuvent servir à suivre la transmission génique entre les individus d'une même famille ou d'une population. Cette caractéristique ouvre la porte aux études génétiques et permet de retracer l'héritage de gènes associés à des maladies, à la réponse d'un individu à certaines drogues, à la susceptibilité à certains facteurs environnementaux et au risque de développer des maladies (103, 104).

Les études d'association pan-génomiques (*Genome-wide association studies, GWAS*) utilisent des centaines de milliers de SNPs répartis sur l'ensemble du génome. Elles comparent les fréquences des allèles entre un groupe d'individus ayant une maladie et un groupe contrôle et servent donc à identifier les gènes enrichis dans une population donnée. En étudiant des SNPs à travers tout le génome, les GWAS permettent l'étude de maladies complexes et communes dans lesquelles plusieurs variants génétiques contribuent au risque de développer la maladie.

### **2.4.1. Loci de susceptibilité dans les MIIs**

Des études d'association pan-génomiques ont permis d'identifier 200 loci de susceptibilité qui sont significativement associés aux MIIs (96, 105). Ces loci peuvent contenir de aucun à plusieurs gènes. Plusieurs de ces loci sont partagés entre la CU et la MC. Ensemble, ils expliquent 13,1% et 8,2% de la proportion de la variance pour les maladies de Crohn et la colite ulcéreuse, respectivement (105).

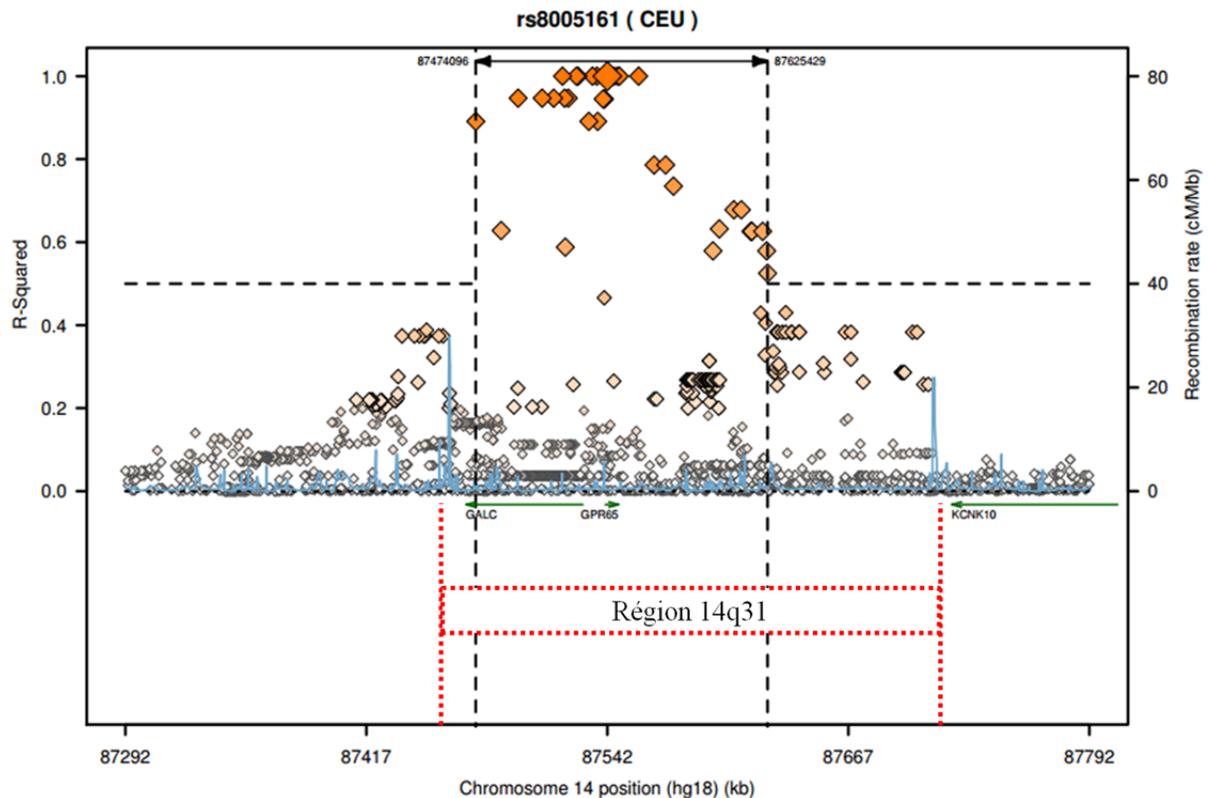
L'analyse des gènes et des loci associés aux MIIs démontrent que plusieurs voies importantes pour l'homéostasie intestinale telles que la fonction de barrière, la défense microbienne, la régulation de l'immunité innée et adaptative, le stress du réticulum endoplasmique et l'autophagie sont au cœur de la pathologie (106, 107).

### **2.4.2. 14q31**

La définition simple du déséquilibre de liaison (DL) est l'association non-aléatoire d'allèles à un variant (108). Ainsi, un variant associé à une maladie définit une région du génome en DL qui comprend d'autres variants. Cette région est appelée loci de susceptibilité et ces variants peuvent aussi être associés à la maladie. Les études d'association pan-génomique se basent sur la prémisse qu'un variant causal est observé sur un haplotype, un segment à l'intérieur duquel les SNPs communs sont en fort DL. Ainsi, le marqueur associé en DL de ce variant causal devrait être associé à la pathologie étudiée (109, 110). Le Broad Institute of Harvard and MIT offre le service de recherche SNAP (SNP Annotation and Proxy Search) qui permet de trouver des SNPs proxy, i.e. des SNPs couverts par un autre SNP à un  $r^2 > 0.8$ . Le DL est calculé par le logiciel Haploview 4.0, basé sur les données du International HapMap Project et du 1000 Genome Project.

Dans l'étude de Jostins et al. en 2012 (96), la région 14q31 (rs8005161) a été associée aux MIIs avec une valeur  $p = 2,35 \times 10^{-14}$ . La fréquence de l'allèle mineure (FAM) est de 0.253 selon les données du 1000 Genome Project. L'étude portait sur plus de 75,000 cas et contrôles d'ascendance européenne. Les régions de susceptibilité aux MIIs dans cette étude sont définies par une distance de 250 kb de chaque côté du SNP index ou par l'extension du DL, définie par la position des SNPs les plus loin en aval et en amont en  $r^2 > 0,5$  du SNP ayant donné le plus de signal dans une région. Elle dépend aussi des taux de recombinaison. La

région 14q31 s'étend approximativement de la position 87500 kb à 87700 kb sur le chromosome 14 et contient deux gènes : *GALC* et *GPR65* (Figure 1).



**Figure 1: Analyse d'association de la région 14q31.**

Tous les SNPs en amont et en aval par 250 kb de rs8005161 sont représentés sur le graphique. Les barres pointillées représentent la région comprenant les SNPs corrélés avec un  $r^2 > 0.5$  de rs8005161. Les taux de recombinaison sont représentés par le graphique bleu avec l'axe de droite. Les lignes rouges représentent approximativement la région couverte par les SNPs associés de la région 14q31.

#### 2.4.2.1. *GALC*

Le gène *GALC*, codant pour la galactosylceramidase, aussi appelée galactocerebrosidase, est une enzyme impliquée dans le catabolisme des lipides de la myéline telles que la galactosylceramide et la psychosine (111, 112). Cette enzyme est exprimée de façon ubiquitaire (Annexe 1). Des mutations dans ce gène causent la maladie de Krabbe, une maladie autosomale récessive, aussi appelée la leucodystrophie à cellules globoïdes. Il s'agit d'une maladie neurodégénérative caractérisée principalement par une démyélinisation importante, une prolifération accrue des cellules gliales, appelée gliose, et la présence de cellules globoïdes (113). Elle serait causée par l'accumulation de la psychosine, un métabolite toxique dont l'implication a été mise en évidence suite à l'étude de Kanasawa et

al. (114) qui ont traité une lignée monocyttaire à la psychosine et observé la génération de cellules globoïdes similaire à celle rencontrée chez les patients (113).

#### **2.4.2.2. GPR65**

*GPR65* a été identifié pour la première fois chez les cellules T murines où son expression augmente lors de la mort induite par un traitement au dexaméthasone (115-118). *GPR65* est exprimé au niveau du thymus, de la rate et des leucocytes circulants. Il était à ce moment nommé le *T-death cell associated gene 8*. L'analyse de sa séquence semble démontrer qu'il s'agit d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG). *GPR65* a longtemps fait partie d'une librairie de RCPG orphelins jusqu'à ce qu'il soit testé pour sa liaison à la psychosine par le groupe Im et al. qui s'intéressait à la maladie de Krabbe (113). *GPR65*, lorsqu'activée par la psychosine, entraînerait une diminution de la production d'AMPc causée par la forskoline, une mobilisation du  $Ca^{2+}$  et la formation de cellules multinucléées (globoïdes). Toutefois, chez des souris KO pour *GPR65*, le patron d'expression, la maturation et la sélection des thymocytes, ainsi que plusieurs autres fonctions immunitaires importantes, sont normales (119). Les résultats démontrent aussi que *GPR65* n'est pas essentiel à la production de cellules polynucléées (globoïdes) par la psychosine et que les thymocytes avaient une séquence apoptotique normale suivant un traitement *in vivo* ou *in vitro* aux glucocorticoïdes. Ces nouveaux résultats tendent à invalider les résultats obtenus par Im et al. Depuis, plusieurs études sur l'effet de la psychosine sur *GPR65* semblent toutes confirmer que la psychosine n'est pas un ligand de *GPR65* (120-125). Les auteurs de l'article de Shimizu (126) mettent d'ailleurs en évidence ces différences, en plus de souligner que la psychosine a un effet détergent altérant les membranes lorsqu'utilisé à haute concentration (127). Aujourd'hui, l'hypothèse la plus probable serait que *GPR65* est un senseur de pH.

### 3. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)

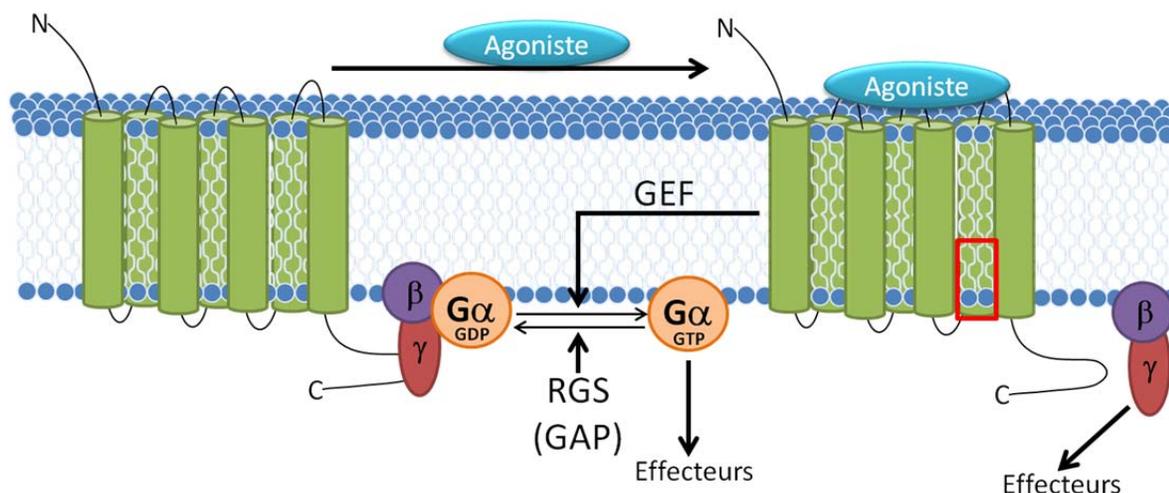
#### 3.1. Généralités

Les RCPGs sont des récepteurs membranaires vitaux pour assurer une physiologie normale. Ils participent aux fonctions du système endocrinien et du système nerveux central en plus d'être responsable de la vision, de l'odorat et du goût (128). Jusqu'à maintenant, plus de 800 RCPGs ont été identifiés dans le génome humain et plusieurs ont été associés à des maladies. Conséquemment, 40% des traitements pharmaceutiques ciblent ces protéines (129). Les RCPGs sont composés de sept régions transmembranaires d'hélices alpha séparées en alternance par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires (Figure 2). Le rôle classique des RCPGs est de faire le pont entre la liaison d'un ligand agoniste vers l'activation des protéines G hétérotrimériques spécifiques afin de moduler l'activité de protéines effectrices (128). Chez les vertébrés, les RCPGs sont divisés en cinq familles selon leurs similarités structurelles et leurs séquences. On retrouve donc les familles de la : rhodopsine, sécrétine, glutamate, adhésion et *Frizzled/Taste2* (128).

Les protéines G hétérotrimériques sont des GTPases composées des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Il existe, chez l'humain, 21 sous-unités  $G\alpha$ , 6 sous-unités  $G\beta$  et 12 sous-unités  $G\gamma$  (130). Le complexe  $G\beta\gamma$  a d'abord été vu comme le régulateur négatif de  $G\alpha$ , prévenant une activation spontanée en absence de stimulation. Il est maintenant connu que ce complexe régule certains canaux voltage-dépendants, des kinases, la phospholipase C et certains isoformes de l'adénylate cyclase (AC) (131). Ensemble, les complexes hétérotrimérique et les RCPGs contribuent à la spécificité des RCPGs et de leurs systèmes effecteurs (129). Les différentes combinaisons possibles créent une multitude de complexes hétérotrimériques distincts.

Les protéines G hétérotrimériques sont divisées traditionnellement selon la similarité de la séquence primaire de la sous-unité  $G\alpha$  et du type d'effecteur qu'ils activent. La sous-unité  $G\alpha_s$  stimule l'AC, ce qui contribue à l'augmentation de la concentration intracellulaire d'adénosine 3'-5' monophosphate cyclique (AMPC).  $G\alpha_i$  inhibe l'AC. La sous-unité  $G\alpha_q$  active la phospholipase  $C\beta$  et favorise la production d'inositol 1,4,5 triphosphate ( $IP_3$ ) et de diacylglycérol (DAG) à partir de la phosphatidylinositol 4,5 biphosphate ( $PIP_2$ ). L' $IP_3$  cause l'augmentation des niveaux de  $Ca^{2+}$  intracellulaire et le DAG est impliqué dans l'activation de

la protéine kinase C (PKC) (132). Les sous-unités  $G\alpha_{12/13}$  sont impliqués dans l'activation des Rho-GTPases (130, 132). Il est maintenant connu que  $G\alpha_q$  et  $G\beta\gamma$  peuvent aussi se lier à certains RhoGEFs (131, 133). Ces GEFs spécifiques pour Rho ont un rôle similaire aux RCPGs dans l'échange GDP-GTP sur les protéines Rho-GTPases.



**Figure 2: Structure et voies générales des RCPGs et des protéines G hétérotrimériques**

Le carré rouge indique l'emplacement approximatif du variant *GPR65\*I231L*.

Lorsqu'un agoniste se lie à la région extracellulaire du RCPG, des changements de conformation dans les régions transmembranaires et intracellulaires du récepteur permettent la liaison et l'activation des protéines G hétérotrimériques (129) (Figure 2). Il agit alors comme un facteur d'échange de nucléotide guanine (*guanine nucleotide exchange factor, GEF*), résultant en l'échange d'un guanosine 5'-diphosphate (GDP) pour un guanosine 5'-triphosphate (GTP) au niveau de la sous-unité  $G\alpha$ . Des changements de conformation de la sous-unité  $G\alpha$  permettent alors la dissociation de  $G\alpha$ -GTP du complexe  $G\beta\gamma$  (134). Les protéines  $G\alpha$  et les complexes  $G\beta\gamma$  interagissent avec plusieurs molécules effectrices, menant à une multitude de réponses cellulaires et physiologiques. Le signal est terminé lorsque l'activité GTPase intrinsèque de  $G\alpha$  hydrolyse la GTP en GDP, changeant  $G\alpha$  vers un état inactif. Cette étape est catalysée par des protéines connues comme des régulateurs de signalisation de protéines G (RSG) qui se lient à la  $G\alpha$  et accélèrent l'hydrolyse de la GTP (135). Les RSGs sont des protéines pouvant induire l'activité GTPase (GTPase-activating

proteins, GAPs) spécifiques pour  $G\alpha$ . Elles peuvent donc accélérer l'activité intrinsèque GTPase de  $G\alpha$  causant la fin de la transduction du signal (130).

Les GTPases sont finement régulées par l'action des GEFs, des GAPs et des inhibiteurs de dissociation du nucléotide guanine (*guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs*). Ces derniers forment des complexes avec les GTPases, contrôlant leur transport cellulaire et leur localisation. La superclasse des protéines G (*GTP-binding*) peut être sous-divisée en deux classes : SIMIBI et TRAFAC (136). La classe SIMIBI (*signal recognition GTPases, MinD et BioD*) comprend la particule de reconnaissance de signal (*SRP*), son récepteur (*SR*) et quelques autres familles. La classe TRAFAC (*translation factor related*) comprend principalement les facteurs de traduction, les protéines G hétérotrimériques, les septines, la superfamille des dynamines et la superfamille Ras. La superfamille Ras (*Rat sarcoma*) de petites protéines G humaines contient plus de 150 membres et est composée de cinq sous-familles majeures : Ras, Rab (*Ras-related in brain*), Arf (*ADP-ribosylation factor*), Ran (*Ras-related nuclear*) et Rho (*Ras homologous*). Les membres de la sous-famille Ras sont des régulateurs clés de la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire. Les sous-familles Rab et Arf sont des régulateurs très importants pour le transport intracellulaire vésiculaire. Les GTPases Ras régulent la formation de la vésicule à la membrane donneuse et la fusion de la vésicule à la membrane accepteuse. Les GTPases Arf régulent aussi les voies de l'endocytose et de la sécrétion. La sous-famille Ran est un régulateur nécessaire au transport nucléaire par les complexes de pores nucléaires et dans l'assemblage du réseau mitotique. Finalement, la sous-famille des RhoGTPases contrôle l'organisation d'actine, la morphologie cellulaire, la polarité et le mouvement en plus des interactions cellule-cellule et cellule-matrice. À l'heure actuelle, les trois RhoGTPases les plus étudiées sur 22 connues sont Rho, Rac et Cdc42 (137).

Au niveau du système immunitaire, certains RCPGs se lient aux récepteurs de chimiokines ce qui permet la localisation, la migration et le recrutement des cellules immunitaires. D'autres sont responsables de reconnaître les signaux provenant de médiateurs affectant des fonctions immunitaires telles que l'histamine, la protéine du complément C5A et plusieurs autres (130). Plusieurs études ont démontré le rôle essentiel de  $G\alpha_i$  dans la migration leucocytaire et le développement et l'activité des cellules T et B.  $G\alpha_q$  aurait un rôle dans le

développement de cellules B et affecterait l'apoptose des lymphocytes sanguins. Il aurait aussi un rôle dans le recrutement, au niveau de la synapse immune, des récepteurs de chimiokines. Ce processus mène à une augmentation de la prolifération des cellules T et de leur production de cytokines. G $\alpha$ 12/13 sont importants pour le développement, la migration et l'activité des cellules T et des cellules B mais les mécanismes sont peu connus (130). La sous-unité G $\alpha$  stimulatrice (G $\alpha$ s) joue un rôle central dans la transduction de signaux par des RCPGs.

### **3.1.1. Rôles de l'AMPc dans les réponses immunitaires**

L'AMPc a d'abord été étudié pour son importance dans divers processus cellulaires tel que le métabolisme énergétique (138). Toutefois, son importance comme modulateur des réponses immunitaires fait l'objet de nombreuses études. L'AMPc interfère autant dans les réponses immunitaires innées qu'adaptatives.

La plus connue des protéines transduisant les signaux de l'AMPc est la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). Lorsqu'activée, la PKA phosphoryle plusieurs protéines dont le facteur de transcription *cAMP-response element binding protein (CREB)*. CREB régule la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. Il induit des signaux de survie anti-apoptotiques dans les monocytes et macrophages et il active la prolifération et la survie des cellules B et T. Il semble aussi réguler la polarisation et la réponse des cellules Th en activant les Th1 et Th17 et en inhibant les Th2. CREB est requis pour la génération et la maintenance des cellules Treg. Il causerait l'inhibition de la transcription par NF-kB, l'un des régulateurs clés de l'expression des gènes inflammatoires mais les mécanismes sont toujours à l'étude (138, 139).

Dans certaines situations, des changements dans les niveaux d'AMPc peuvent aussi se traduire par l'activation de protéines d'échange directement activées par l'AMPc (EPACs) (140). Les EPACs permettent des réponses cellulaires via l'activation de la GTPase Rap1 et sont impliqués dans certaines fonctions chez les monocytes et les macrophages (139). Chez les monocytes, les voies Epac-Rap1 et PKA sont toutes deux activées par une augmentation de l'AMPc. Par contre, l'inhibition des fonctions immunes telles que la sécrétion de TNF $\alpha$  et d'IL-12, la phagocytose et l'expression des molécules d'adhésion, dépend de PKA seulement (141). L'expression d'Epac augmente chez les macrophages. Il semble que l'activation de

cette voie, en plus de la voie PKA, inhibe la phagocytose induite par les FcRs. Tout comme les monocytes, l'inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dépend de PKA seulement.

L'augmentation de la concentration cellulaire en AMPc inhibe l'activation, la prolifération et l'activité cytolytique chez les cellules T (142). Par exemple, la production des cytokines Th1 telles que l'IL-12, l'IFN $\gamma$ , IL-2 et TNF $\alpha$  est diminuée (130). À l'opposé, Li et al. ont observé que la délétion de G $\alpha$ s, spécifiquement dans les cellules T CD4<sup>+</sup> de souris, cause une diminution des niveaux d'AMPc, du flux de Ca<sup>2+</sup>, des réponses Th17 et Th1 sans affecter les réponses Treg et Th2 qui demeurent normales. Ces résultats suggèrent que l'AMPc aurait un effet pro-inflammatoire en altérant la différenciation et l'activation des différents sous-types de cellules Th (143). De plus, Yao et al. ont démontré que l'augmentation de la concentration cellulaire en AMPc induite par la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) stimule l'inflammation par l'expansion des cellules Th17 (144). La PGE<sub>2</sub> supprime les fonctions effectrices des macrophages, des neutrophiles, des cellules Th1, des cellules T cytolytiques et des cellules TNs mais les induit dans les cellules Th2, Th17 et Treg (145)

Même si plusieurs études semblent démontrer qu'une augmentation des niveaux d'AMPc amène une diminution des fonctions pro-inflammatoires chez les cellules immunitaires, d'autres études semblent indiquer un rôle contradictoire. Les conclusions tirées peuvent être très divergentes entre les essais *in vivo* et *in vitro*, ou selon les modèles cellulaires étudiés et les procédés utilisés afin d'activer la production d'AMPc.

### **3.1.2. L'importance de l'actine dans différents processus cellulaire**

L'actine est une protéine du cytosquelette cellulaire capable de former des fibres. Elle est retrouvée chez toutes les cellules eucaryotes et est considérée la protéine la plus abondante du cytosquelette. Elle participe et organise plusieurs fonctions cellulaires comme la mobilité et le transport dans la cellule des complexes protéiques (146). Ces fonctions sont possibles grâce à l'assemblage et au désassemblage, qui existe dans un équilibre dynamique de monomères de G-actine et de polymères de F-actine. Le cytosquelette d'actine cortical, qui tient son nom en référence au cortex, se trouve dans une mince zone juste dessous la membrane plasmique. Cette zone est la plus riche en filaments d'actine et semble très importante dans l'organisation

plasmique. L'actine corticale régule la mobilité des protéines et des lipides de la membrane, facilitant leur ségrégation et influençant leur rassemblement. Cette organisation joue un rôle critique dans les voies signalétiques provenant de protéines transmembranaires tel que les récepteurs immunitaires qui requièrent un rassemblement pour leur activation (147). Les protéines et les lipides ne sont ni statiques, ni uniformément distribués à la membrane cellulaire. Le cytosquelette cortical interagit avec des composantes membranaires afin de restreindre leur diffusion et aider à leur transport. Il participe à la formation, la ségrégation et le transport des nanodomains, tels que ceux des RCTs (147).

Le cytosquelette d'actine influence la mobilité et l'organisation des molécules de la membrane cytoplasmique de deux façons : par l'ancrage et par la compartimentation. Les protéines membranaires peuvent être directement ou indirectement ancrées au cytosquelette cortical. Les protéines sont alors relativement immobiles. Avec ou sans interaction directe, le cytosquelette cortical peut aussi produire des barrières qui bloquent la diffusion normale des protéines dans la membrane. Leur diffusion est donc restreinte à des compartiments de grosseurs variables. Cette compartimentation serait importante pour la régulation de l'activation et de la signalisation des récepteurs immunitaires (147).

Les récepteurs immunitaires, comme les RCBs et RCTs, nécessitent pour leur signalisation un rassemblement (« *clustering* ») (147). Ces rassemblements assurent une réponse robuste et soutenue. L'efficacité et la spécificité de la stimulation peuvent aussi être aidées par le rassemblement de corécepteurs. Les meilleurs exemples de ces rassemblements synergiques sont les structures responsables de la phagocytose et les synapses immunologiques (SI) entre les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigènes (147).

Le réarrangement de l'actine joue un rôle central dans l'adhésion initiale des cellules T, dans la formation et le maintien des SIs et dans la signalisation cellulaire des cellules T (148, 149). Il semblerait que l'actine soit aussi importante dans la régulation de l'activation des cellules B par le contrôle de la mobilité des RCBs (150).

De la même façon, les cellules tueuses naturelles (TNs) et les cellules T cytotoxiques subissent une réorganisation de l'actine, par une accumulation de F-actine, lors de la formation de la synapse lytique (voir section 1.2.3 sur la réponse cellulaire de l'immunité

innée) (48). Le rassemblement des RCTs au niveau de la synapse est aussi une étape importante dans l'induction de la signalisation chez les cellules TNs.

Le cytosquelette d'actine est non seulement important dans la motilité et le regroupement des récepteurs mais aussi dans les processus d'endocytose. L'endocytose est un processus cellulaire de base utilisé pour l'internalisation d'une variété de molécules (151). L'actine joue un rôle très important dans plusieurs processus tels que l'endocytose dépendante ou indépendante de la clathrine (152), la macropinocytose et la phagocytose (153).

Le cytosquelette est assez hétérogène en ce que sa structure dépend des signaux reçus. Même en absence d'une stimulation soutenue, les cellules phagocytaires reçoivent et interprètent des signaux provenant d'agonistes solubles. Il semble que les régions denses en actine retrouvées chez les phagocytes soient associées à l'activation de la voie de RhoA et corrélient avec une faible diffusion des récepteurs (30). Lors de l'activation du phagocyte, le réseau de F-actine cortical subit un désassemblage pour permettre le remodelage nécessaire à la formation de pseudopodes. Cette étape permet la libération de monomères de G-actine et leur réutilisation. Elle permet l'augmentation de la mobilité des récepteurs non-liés à un ligand, afin qu'ils se rassemblent. Par la suite, la polymérisation de l'actine favorise la formation des projections servant à entourer la cible. Finalement, la forte extension des pseudopodes autour de la cible à phagocyter est accompagnée d'un désassemblage de la F-actine. Cette étape semble aussi requise pour sceller le phagosome (30). En plus des processus d'endocytose tels que la phagocytose, l'actine joue un rôle essentiel dans le processus d'autophagie induit par l'activité antimicrobienne (154) ou par la déplétion de nutriments (155).

De la même façon, les neutrophiles, lors de leur activation, nécessitent aussi une réorganisation de l'actine pour leur polarisation vers le gradient de chimiokines (156, 157) et pour l'exocytose de leurs granules (158, 159) (voir section 1.2.3 sur la réponse cellulaire de l'immunité innée).

Il est clair que le cytosquelette d'actine joue un rôle de premier plan dans plusieurs processus cellulaires. Des perturbations dans la dynamique de l'actine sont donc susceptibles d'entraîner des conditions pathologiques. Par exemple, une augmentation de la phagocytose

par les monocytes (160) et une diminution de la voie de l'autophagie (161) sont toutes deux associées à la maladie de Crohn.

### **3.2. Le pH du système gastro-intestinal en santé et dans la maladie**

Chez des individus sains, l'environnement des différentes sections du tractus gastro-intestinal diffère beaucoup. Il dépend, entre autres, de la physiologie, du débit de digestion, des sécrétions de l'hôte telles que des enzymes, de l'eau, du mucus, du niveau d'oxygène, de la nourriture digérée et du pH (162). Le pH intraluminal varie de l'estomac à l'anus. Il est d'environ 1.5 à 3.5 dans l'estomac et passe à 6 dans le duodénum. Par la suite, le pH augmente graduellement dans le petit intestin, passant d'un pH 6 à environ 7.4 dans l'iléon terminal. Le contenu gastrique est tamponné par les sécrétions alcalines du pancréas et les sécrétions mucosales de bicarbonate, ce qui amène le pH de la lumière à 7.4. Le pH subit alors une baisse importante dans le caecum, qui est à un pH 6.4. Cette baisse est causée par les bactéries coloniques qui fermentent les carbohydrates ce qui génère des acides gras à chaînes courtes (AGCCs) tels que des acétates, propionates et butyrates et des ions hydrogènes. Il remonte ensuite progressivement pour atteindre un pH 6.7 dans le rectum (8). Les AGCCs sont absorbés et métabolisés par l'épithélium du colon où ils servent de source principale d'énergie aux cellules épithéliales intestinales. Une baisse de la concentration des AGCCs cause une augmentation du pH le long du colon distale. Une légère diminution du pH peut être détectée au niveau du rectum dû à l'arrêt des selles et de la fermentation des carbohydrates restants par les bactéries coloniques. Dans chaque segment du tractus gastro-intestinal, il y a des groupes distincts de transporteurs d'ions et de canaux qui interagissent entre eux afin de déterminer le volume et le contenu en électrolytes de la lumière intestinale (163).

Lors de diarrhées inflammatoires comme celles rencontrées chez les patients atteints de la CU ou de la MC, le volume des selles augmente à environ 3 L par jour. Les reins sont une composante principale des processus de maintien d'une homéostasie du pH corporel. À plus de 3 L, ces diarrhées causeraient une diminution significative du volume de fluides extracellulaires ce qui limiterait l'habilité des reins à corriger les dérèglements acide-bases (163). L'inflammation des muqueuses associées aux MIIs cause une détérioration de l'absorption et de la sécrétion d'électrolytes ce qui cause un déséquilibre acide-base. Plusieurs

traitements visent à limiter la perte intestinale d'électrolytes. Certaines études suggèrent que les déficiences en électrolytes chez les patients CU seraient dues à une diminution de l'absorption du chlorure et du sodium ce qui causerait une mauvaise absorption de l'eau (164). Puisque le transport d'électrolytes est plus important au niveau du colon, les patients CU qui ont une inflammation localisée à cette région ont souvent des troubles reliés aux électrolytes alors que les patients MC n'en sont pas nécessairement affectés. Dans le même ordre d'idée, les patients CU, chez qui la maladie est plus sévère, démontrent une alcalose métabolique ou mixte tandis que les patients CU, dont l'inflammation est faible ou modérée, ont un pH neutre (164). Il est donc peu surprenant que chez les patients MC dont l'inflammation touche principalement le colon, on note aussi une alcalose métabolique modérée causée par une trop grande concentration de bicarbonate dans le sang. Un lien direct permettant de relier les altérations du pH à la cause des MIIs n'est toujours pas possible car les études de pH intraluminal chez les patients MIIs sont contradictoires (8, 164).

### **3.2.1. Effets du pH au niveau du système immunitaire**

Dans des conditions pathologiques, malgré des mécanismes de contrôle efficaces du pH, il arrive que le pH fluctue. Une acidification locale peut subvenir lors d'inflammation, qu'elle soit chronique ou aiguë. Cette diminution du pH est causée par l'infiltration et l'activation de cellules inflammatoires dans les tissus inflammés. Cela augmente la consommation d'oxygène et d'énergie. Les cellules immunitaires vont augmenter leur consommation de glucose par la glycolyse anaérobie et donc produire plus d'acide lactique (165, 166). La sécrétion d'AGCCs par les bactéries invasives est aussi responsable de la diminution du pH local (167).

Plusieurs études décrivent la régulation de différentes fonctions des cellules immunitaires par une acidification extracellulaire. Chez les neutrophiles, elle stimule la polarisation, la polymérisation des fibres d'actine et l'endocytose (168). Elle inhiberait la chimiotaxie et causerait aussi une diminution de l'apoptose et, par le fait même, une augmentation de la vie active des neutrophiles (169). Chez les cDs, elle induit leur maturation et augmente l'expression des protéines de surface impliquées dans la présentation d'antigènes (170). Elle augmente aussi la production d'IL-12, stimulant la prolifération des cellules T

CD4<sup>+</sup> et leur synthèse d'IFN $\gamma$  (171). L'acidification augmenterait aussi l'activité microbicide des cellules TNs (172).

La diminution du pH extracellulaire stimule la production d'IL-1 $\beta$  par les monocytes de façon dépendante de la caspase-1 (173). L'IL-1 $\beta$  est produite principalement par les monocytes et les macrophages mais la production et la sécrétion diffèrent entre les deux (173). Les monocytes humains expriment constitutivement la caspase-1, l'enzyme responsable de produire la version mature et bioactive de l'IL-1 $\beta$ . Ces cellules relâchent l'IL-1 $\beta$  en réponse à une stimulation par des agonistes de TLR2 ou TLR4. Au contraire, les macrophages ne relâchent pas d'IL-1 $\beta$  en réponse aux agonistes des TLRs. Ils ont besoin d'un second signal menant à l'assemblage de l'inflammasome, à l'activation de la caspase-1 et à la production et la sécrétion subséquente de l'IL-1 $\beta$  active (174). Les inflammasomes sont une machinerie inflammatoire intracellulaire qui répond à différents dangers par une réponse pro-inflammatoire. Parmi les différents types d'inflammasomes, le *Nod-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3)* est bien caractérisé chez les cellules de mammifères et répond à des signaux de danger, de stress et de dommages (175). L'inflammasome NLRP3, lorsqu'activé, permet la production d'IL-1 $\beta$  bioactif grâce à l'activité de la caspase-1 (176). L'acidification extracellulaire agit comme signal de danger sur des macrophages activés au LPS et cause l'activation de l'inflammasome NLRP3 et à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les macrophages (165).

Récemment, une étude de Reimann et al. (177) a démontré que l'acidification extracellulaire cause une diminution de la réponse inflammatoire des lignées cellulaires monocytaires humaines Mono Mac 6 et THP-1. Elle causerait, entre autres, une diminution de l'expression d'IL-6 et de TNF $\alpha$ . La lignée Mono Mac 6 exprime aussi moins d'IL-1 $\beta$ . Par contre, dans les monocytes primaires humains, l'expression de TNF $\alpha$  est réduite et celle d'IL-6 augmente après une acidose. Dans l'étude de Mogi et al. (167), l'acidification extracellulaire de macrophages péritonéaux de souris induits aux LPS cause l'inhibition de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF $\alpha$ . Dans une lignée cellulaire de macrophages murins, l'acidose cause une augmentation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et de l'activité phagocytaire. Comparativement à la lignée de macrophages murins, l'expression de

marqueurs pro-inflammatoires chez les THP-1 semble être causée par leur activation par du PMA et être pratiquement indépendante du pH. Chez les macrophages primaires humains, l'effet dépend non seulement de leur état de différenciation mais aussi de leur polarisation (173, 177). Ils concluent qu'une acidification du milieu extracellulaire cause des effets différents entre les monocytes et les macrophages et entre les différents modèles pouvant être utilisés (177). De plus, Gerry et al. (178) ont démontré qu'une baisse du pH extracellulaire affecte la transcription génique par NF- $\kappa$ B différemment entre les macrophages murins et humains.

Les cellules eucaryotes sont composées de plusieurs compartiments et d'organelles qui sont entourées de membranes et qui dépendent de conditions optimales pour leurs fonctions (179). Les protons ont un rôle important dans ce concept puisque toutes les protéines dépendent du pH pour le maintien de leur structure et de leur fonction. Certaines réactions métaboliques dépendent aussi de la charge des surfaces et des membranes biologiques. C'est le cas de l'affinité d'un ligand pour son récepteur. Cette charge nette varie selon le pH. Il n'est donc pas surprenant que le pH intracellulaire soit finement régulé. En conditions physiologiques, le pH extracellulaire est légèrement alcalin (pH 7.4). Le pH du cytosol est toujours légèrement plus acide que le pH extracellulaire.

Parmi les transporteurs responsables de la régulation du pH intracellulaire (pHi), on retrouve les échangeurs Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHEs). Les NHEs sont une famille de protéines de transport membranaire qui échangent un Na<sup>+</sup> contre un H<sup>+</sup> et qui régulent donc le pHi. L'isoforme NHE-1 se retrouve dans la membrane plasmique de la plupart des cellules mammifères et est impliqué dans plusieurs fonctions physiologiques importantes dont le maintien de la balance cytoplasmique acide-base. Il est maintenant connu que le NHE-1, mais pas ses autres isoformes, est important pour l'extrusion des ions H<sup>+</sup> et la régulation du pHi chez les cellules du système immunitaire (180). L'activité de NHE-1 est importante pour certaines fonction des cellules dendritiques et des neutrophiles telles que la migration en réponse à une infection (180).

### 3.2.2. Les RCPGs senseurs de pH

Plusieurs familles de récepteurs et canaux ioniques sont activés par les changements du pH extracellulaire. Chez les RCPGs, quatre récepteurs ont pour ligand des protons. Il s'agit de GPR4, GPR65 (TDAG8), GPR68 (OGR1) et GPR132 (G2A). Cette famille de RCPGs peuvent être activés à de très faible changement de pH grâce à leurs résidus histidine (181). Ludwig et al. ont démontré que GPR68 et GPR4 sont couplés aux protéines  $G\alpha_q/11$  et  $G\alpha_s$ , menant respectivement à l'activation des voies signalétiques phospholipase C (PLC)/ $Ca^{2+}$  et adénylate cyclase/AMPC. Le récepteur GPR132 est exprimé par plusieurs cellules immunorégulatoires et pourrait jouer un rôle autant dans l'immunité innée qu'adaptative. Okajima et al. ont observé des similarités dans la séquence de GPR65 avec ces trois autres récepteurs. Ils ont démontré que son activation par un pH acide cause l'activation de la voie de l'AMPC. D'autres études ont permis d'établir que ces RCPGs pourraient être impliqués dans plusieurs autres processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose, les processus métastatiques et l'angiogénèse des cellules tumorales (182).

#### 3.2.2.1. GPR132

GPR132 (G2A), pour « G2 accumulation », a d'abord été découvert dans les cellules murines de moelle osseuse transformées avec BCR-ABL, un oncogène associé à différentes formes de leucémie (183). L'expression de ce RCPG occasionne des signaux de prolifération chez les fibroblastes qui perdent leur inhibition de contact et leur dépendance à l'ancrage (184). GPR132 est exprimé dans les macrophages (185) et serait responsable de leur recrutement au niveau des plaques athérosclérotiques (186). L'activation de GPR132 par un pH acide cause l'accumulation d'inositol phosphate (120)

#### 3.2.2.2. GPR68

GPR68 (OGR1), pour *ovarian cancer G protein-coupled receptor*, a d'abord été cloné d'une lignée cellulaire de cancer des ovaires (187). L'activation de GPR68 par un pH acide causerait l'activation de l'adénylate cyclase et de la phospholipase C ce qui entrainerait l'accumulation d'AMPC et la production d'inositol phosphate respectivement (188). L'expression de GPR68 augmente et est nécessaire lors de la différenciation des cellules précurseures hématopoïétiques en ostéoclastes (189, 190). Les ostéoclastes provenant de

souris déficientes pour GPR68 survivent plus longtemps à pH acide, comparativement aux ostéoclastes provenant de souris normales (191). GPR68 aurait aussi un rôle dans la régulation de la sécrétion d'insuline et la fonction des cellules bêta pancréatiques (192). Finalement, il serait impliqué dans l'inflammation intestinale puisque son expression augmente chez les patients atteints de la colite ulcéreuse ou de la maladie de Crohn et chez des monocytes humains traités au TNF. Ces effets sont renversés par des inhibiteurs de NF- $\kappa$ B (193). Les souris doublement déficientes pour IL10 (modèle de colite spontanée) et GPR68 développent moins d'inflammation que les souris déficientes seulement pour IL10.

### **3.2.2.3. GPR4**

GPR4 serait exprimé dans les ovaires, le foie, les poumons, les reins, les ganglions lymphatiques, le placenta et les muscles squelettiques. Certains groupements histidines sont très importants pour l'activation de ce récepteur par une acidification du milieu extracellulaire (194). GPR4 serait en partie responsable de la stimulation de l'angiogénèse en réponse au VEGF (195). La surexpression de GPR4 dans la lignée cellulaire murine NIH3T3 cause une transformation des cellules vers un phénotype de cellules cancéreuses (196). Son expression est augmentée dans certains tissus humains cancéreux. GPR4 est responsable, au moins en partie, de l'accumulation d'AMPc au niveau des tubes collecteurs du rein (197). Elle régule l'activité des protéines de transport acide-base. Chez des souris déficientes pour GPR4, l'excrétion d'acide nette est défectueuse et cause ainsi une acidose métabolique spontanée (198).

### **3.2.2.4. GPR65**

GPR65 possède des similarités structurelles avec GPR68, GPR132 et GPR4. Ces dernières ont toutes été rapportées être activées par une augmentation des concentrations de protons extracellulaires. Plusieurs équipes se sont donc penchées sur la réponse aux changements de pH causée par GPR65. Ils ont découvert que GPR65, lorsqu'activée par un pH neutre à acide, causait une accumulation d'AMPc et l'activation de RhoA favorisant la production de fibres de stress (126). Cette accumulation est réduite chez les lignées cellulaires clonales exprimant un GPR65 dont les résidus histidines sont changés par des phénylalanines (121).

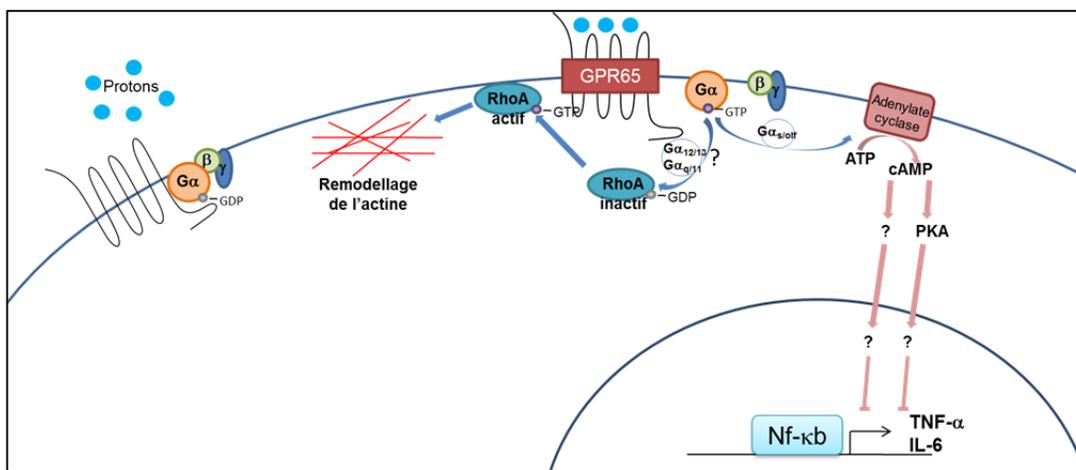
Des études subséquentes ont regardé les fonctions pro-oncogéniques/anti-apoptotiques et anti-inflammatoires de GPR65. D'abord, la surexpression de GPR65 dans la lignée cellulaire murine NIH3T3 cause une transformation des cellules vers un phénotype de cellules cancéreuses (196). De plus, son expression est augmentée dans certains tissus humains cancéreux. GPR65 serait responsable, en milieu acide, de l'augmentation de l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL, deux molécules ayant des effets anti-apoptotiques (199). Finalement, les éosinophiles murins et humains répondent à une diminution du pH par une accumulation d'AMPc, une diminution de l'apoptose et une augmentation de la viabilité dépendantes de l'expression de GPR65 (200, 201).

Parmi les fonctions anti-inflammatoires de GPR65, son activation par une acidification du milieu extracellulaire est, au moins en partie, responsable d'une inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF $\alpha$  par des macrophages murins péritonéaux stimulés au LPS (167, 202). En utilisant des inhibiteurs des voies de signalisation G $\alpha$ s et PKA (H89), il a été démontré que cette inhibition passe par ces voies. L'acidification du milieu extracellulaire serait aussi reliée à une baisse de la production d'anions superoxide par des neutrophiles humains. Ces neutrophiles expriment fortement GPR65 et à des moindre mesures GPR68, GPR132 et GPR4 (203). Cette inhibition passerait aussi par la PKA. Toutefois, cette étude n'a pas permis de mettre en évidence un lien direct avec l'un ou l'autre des RCPGs senseurs de pH. De plus, GPR65, activé par un pH acide, inhiberait la production d'IL-1 $\beta$  par les microglies murines en activant la voie AMPc/PKA (204).

#### 4. Objectifs

Des études d'association pangénomiques ont identifié la région 14q31 en tant que région associée aux MIIs. Elle contient deux gènes : *GALC* qui code pour la galactosylcéramidase et *GPR65* qui code pour le récepteur couplé à des protéines G 65, aussi appelé le *T death-cell associated gene 8 (TDAG8)*. Ces études ne permettent toutefois pas de déterminer lequel de ces gènes est impliqué dans l'étiologie des MIIs

L'activation par un pH acide de GPR65 mène à l'activation de la voie *Gαs*/adénylate cyclase pour la production d'AMPc. Cette production d'AMPc cause l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires chez des macrophages péritonéaux murins activés au LPS (167, 202). L'activation de GPR65 par un pH acide cause aussi la formation de fibres de stress et l'activation de RhoA (126) (Figure 3).



**Figure 3 : GPR65 est un RCPG senseur de pH qui interagit avec plusieurs protéines G hétérotrimériques.**

Il est connu qu'une diminution du pH joue sur la fonction des cellules immunitaires, que l'AMPc est un second messager important et que l'actine est au centre de plusieurs processus biologiques impliqués dans l'étiologie des MIIs. De plus, le pH local au niveau des tissus intestinaux inflammés est diminué. Pour ces raisons, nous avons cherché à élucider le rôle de GPR65 dans le cadre de la pathologie des MIIs.

Mon projet de maîtrise consiste donc à ;

- établir les profils d'expression tissulaire et cellulaire du gène *GPR65*.
- définir les voies signalétiques découlant de GPR65 lors d'une activation par un pH acide.
- déterminer l'impact du variant codant de *GPR65* dans ces voie signalétiques.

## **5. Matériel**

### **5.1. Lignées cellulaires**

Les cellules utilisées proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC, Virginie, ÉU). Les cellules HEK293 parentales ou déficientes pour différentes protéines G nous ont été généreusement fournies par le Dr Asuka Inoue (Tohoku University, Japon). Les cellules lymphoblastoïdes proviennent du National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK).

### **5.2. Produits chimiques**

Toutes les enzymes de restriction provenaient de chez New England Biolab (NEB). Les ARN provenant des différents tissus humains ont été achetés de Clontech Laboratories. Les produits suivant provenaient de chez Invitrogen : les milieux DMEM et RPMI1640, le sérum de veau fœtal (FBS), le plasmide pcDNA3.1/zéo. Le DMEM sans rouge phénol provenait de chez Wisent. Tous les plaques et Pétri pour la culture cellulaire provenaient de Corning. Les produits suivant provenaient de chez Life Technologies : antibiotiques Penicilline-streptavidine et zéocine, lipofectamine 2000. Les produits suivants provenaient de chez Fisher : NaCl, glycérol, TRIS, glycine, méthanol. Les produits suivants provenaient de chez J.T. Baker : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, bleu de bromophénol. Les produits suivants provenaient de chez Sigma : MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, glucose, HEPES, MES, EPPS, DABCO, PFA, DAPI, IBMX, EDTA, Triton-x-100, NaF, sodium pyrophosphate, sodium orthovanadate, iodoacétamide, inhibiteurs de protéases, SDS, DTT, Tween-20, BSA pour la culture cellulaire. Les produits pour l'immunobuvardage provenaient de BIORAD.

### **5.3. Milieu**

#### **5.3.1. Culture cellulaire**

Les cellules HEK293T clone 17 et HEK293 ont été cultivées dans un milieu DMEM, additionné de 10% de sérum de veau fœtal et 100 U/mL de pénicilline/ 100 µg/mL de streptomycine. Elles ont été maintenues en culture jusqu'à une confluence de 90% avant d'être utilisées pour l'ensemble des expériences présentées à l'exception des essais de formation de fibres de stress et de la quantification de la F-actine où une confluence maximale de 75% a été

préférée. Les cellules lymphoblastoïdes ont été maintenues à une densité cellulaire de  $1 \times 10^5$  à  $1 \times 10^6$  cellules/mL dans un milieu RPMI1640, additionné de 15% de FBS, 100 U/mL de pénicilline et de 100 µg/mL de streptomycine.

### 5.3.2. HEM-SSP

La solution de sels physiologiques (SSP) contient : 130 mM NaCl, 0.9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM glucose (126, 205). Le pH des solutions concentrées HEM (HEPES/EPPS/MES; 8 mM chacun) a été ajusté avec un pH-mètre PB-11 (Sartorius®). Les solutions HEM-SSP ont été préparées en diluant à 1X une solution 25X de SSP et 20X de HEM à différents pH auxquelles ont été ajoutés de l'albumine sérique bovine (BSA) à une concentration finale de 0,1%. Le pH des solutions a été vérifié avec du papier pH (Sigma®) puis filtré sur filtre de porosité de 0,22 µm et utilisée la journée même.

## 6. Méthodes

### 6.1. Clonage

La région codante du gène *GPR65* (MIM : 604620, ID : 8477), avec l'une ou l'autre des deux allèles de *GPR65* (ATC→CTC, position 1249), ont été produites par GeneArt® Gene Synthesis (Life Technologies) avec un site de restriction EcoRI en 5' et un site XbaI en 3' ainsi qu'une séquence Kozak placée en 5' du codon de départ (ATG). Pour les clones contenant le FLAG-tag, une séquence de 24 nucléotides (GACTACAAAGACGATGACGACAAG : DYKDDDDK) a été ajoutée après le codon de départ (Annexe 2).

Ces fragments ont été introduits dans le plasmide d'expression pcDNA3.1 contenant le gène de résistance contre la zéocine (Invitrogen). Le plasmide et les fragments synthétiques contenant les variants du gène *GPR65* ont été digérés avec les enzymes de restriction EcoRI-HF et XbaI, avant d'être déposés sur gel d'agarose *low melting* puis isolés avec le kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen). Les ligations ont été produites avec la ligase T4 (Invitrogen) à 16°C pour 18 heures.

Des bactéries *High Efficiency Escherichia coli* 5-alpha (NEB) ont été transformées en mélangeant 1 µL de produit de la ligation à 45 µL de bactéries. Le mélange a été placé sur glace pendant 20 minutes, avant de subir un choc thermique de 30 secondes à 42°C puis remis

sur glace pendant 5 minutes. 900 µL de bouillon SOC (Super Optimal Broth, NEB) a été ajouté au mélange et le tout a été placé 60 minutes à 37°C avec agitation. À la suite de cette incubation, le tube a été centrifugé 1 minute à 1000 rpm et le surnageant a été retiré. Le tube a été vortexé et la totalité du contenu a été étendu en trois cadrans, afin de s'assurer d'avoir des colonies isolées, sur des Pétri 55 cm<sup>2</sup> contenant de la gélose imMedia™ Growth Medium avec 100 ug/ml d'ampicilline (Invitrogen). Après une incubation de 18 heures à 37°C, une colonie isolée a été utilisée afin d'inoculer 200 mL de bouillon Luria (LB) contenant 100 ug/ml d'ampicilline (Invitrogen). Après une incubation de 18hrs à 37°C avec agitation à 250 rpm, 1.5 mL du bouillon de culture a été utilisé afin d'en extraire l'ADN plasmidique avec la trousse PureYield Plasmid Miniprep System (Promega) en suivant les recommandations du fabricant. Le reste du bouillon a été centrifugé à 5000 xg durant 20 minutes et congelé. Les préparations de plasmide ont été dosées au NanoDrop (Thermo Fisher) puis vérifiées par digestion enzymatique EcoRI et XbaI ainsi que par séquençage. Les clones présentant la séquence attendue ont alors été produits en plus grande quantité avec la trousse GenElute HP Plasmid Maxiprep (Sigma) à partir des culots bactériens congelés. Les éluats d'ADN plasmidiques ont été précipités à l'éthanol et resuspendus dans 300 uL d'eau exempte de nucléase.

### **6.1.1. Séquençage**

Toutes les constructions ont été séquencées par la méthode de Sanger au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill et les séquences ont été analysées avec le logiciel CLC main Workbench 6 (CLC Bio).

### **6.1.2. Production de clones stables**

Afin de générer les lignées cellulaires stables exprimant les différentes constructions, les préparations de plasmides ont été digérées avec les enzymes PvuI ou BglII, mis sur gel d'agarose et la bande de la grosseur attendue a été isolée en utilisant la trousse *GeneJet Gel Extraction* (Thermo Scientific). Les éluats d'ADN ont été précipités à l'éthanol et resuspendus dans de l'eau stérile et exempte de nucléase. Leur concentration et leur pureté ont été évaluées avec le NanoDrop (Thermo Fisher). 500 ng de fragment linéaire ont été utilisés pour les transfections.

Les lignées cellulaires HEK293T et HEK293 déficientes pour différentes protéines G ont été utilisées afin d'y introduire, en stable, les séquences codantes pour *GPR65*. Les cellules ont été cultivées jusqu'à une confluence de 60-70%. À ce moment, les cellules ont été mise en présence d'un mélange d'ADN linéarisé et de Lipofectamine 2000 (Life Technologies) dilué dans du Opti-MEM (Life Technologies). Après 6 heures, le milieu a été changé pour du milieu complet (DMEM additionné de 10% de sérum de veau fœtal, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine) et les cellules ont été incubées 24 heures à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> avant que le milieu soit à nouveau changer pour le milieu de sélection contenant 400 µg/mL de zéocine. Après environ 7 à 10 jours de sélection, le milieu a été changé pour du milieu complet additionné d'une concentration de zéocine de maintien à 150 µg/mL

## **6.2. Isolation et dosage de l'ARN totaux**

Les cellules ont été lavées avec du DPBS puis traitées selon les indications du fabricant de la trousse RNeasy Mini+ (Qiagen). Les préparations d'ARNs ont été traités avec la trousse RNase Free Dnase (Qiagen) pour en diminuer, voir éliminer, toute contamination par de l'ADN génomique. Toutes les préparations d'ARN ont été quantifiées et leur intégrité déterminée sur un Bioanalyser 2100 (Agilent) en utilisant la trousse RNA 6000 Nano Kit II (Agilent). Les ARNs ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

## **6.3. Rétro-transcription**

Les préparations d'ARNs totaux ont été rétro-transcrits (1 µg) avec la trousse High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) selon les indications du fabricant avec ajout d'inhibiteurs de nucléases (Invitrogen). Les préparations d'ADNs complémentaires (ADNc) ont été conservées à -20°C.

## **6.4. PCR quantitatif (qPCR)**

Deux nanogrammes d'ADNc (en équivalent d'ARN total rétro transcript) ont été utilisés pour chaque réaction de qPCR. La trousse Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) a été utilisée en diminuant le volume final de réaction à 20 µL. Le tout a été placé dans un cycleur Mx3005P avec le programme Comparative Quantitation (Calibrator) de

MxPro. Les données d'expression ont été normalisées sur le gène *hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT)* en utilisant le logiciel MxPro V4.1 (Stratagene).

Les paires d'amorces employées pour les analyses de PCR quantitatif ont été élaborées avec le logiciel Beacon Designer v6.0 (Tableau 1), synthétisées par IDT et validées afin de s'assurer que leur efficacité soit supérieure à 90%. Un mélange des deux amorces a été fait de façon à avoir chacune des amorces à une concentration de 10µM. Elles ont été utilisées à une concentration finale de 0,5 µM.

Gène	Espèce	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce
GPR65	<i>Homo sapiens</i>	HUM-GPR65-001-01-sens	CTCCTCAGTCAACAAACACATCAC
		HUM-GPR65-001-01-anti	CAAACAGCCCACAAGCATCAAC
GPR65	<i>Homo sapiens</i>	HUM-GPR65-001-02-sens	TTACAGCAGCACAGCATTC
		HUM-GPR65-001-02-anti	TCTCTAAAGGGTATTTGTCATAGC
HPRT	<i>Homo sapiens</i>	hum-HPRT-01-sens	TGGCGTCGTGATTAGTGATG
		hum-HPRT-01-anti	CAGAGGGCTACAATGTGATGG

**Tableau 1: Liste des amorces pour qPCR**

## 6.5. Puces à ARN

### 6.5.1. Profils d'expression dans les tissus, lignées cellulaires et cellules primaires immunitaires

L'expression génique a été évaluée avec une puce d'expression faite sur mesure (Agilent). Elle comporte une sonde par exon pour 2982 gènes associés à différentes maladies inflammatoires ou autoimmunes, sauf pour ~40 gènes de référence (*housekeeping genes*), ~150 gènes de marqueurs de différenciation et ~150 gènes pour des maladies cardiovasculaires. Chaque sonde était dupliquée sur chaque puce. Pour des raisons de contrôle de la qualité, 308 sondes servant de contrôles négatifs et 67 sondes servant de contrôles positifs ont été incluses en plusieurs copies.

Toutes les préparations d'ARN ont été quantifiées et leur intégrité évaluée en utilisant la trousse RNA 6000 Nano Kit (Agilent) par analyse sur un Bioanalyser 2100 (Agilent) afin de s'assurer que seules les préparations possédant des RIN  $\geq 8$  ne soient analysées. 50 ng de chacun des échantillons d'ARN a été marqué en utilisant la trousse Low Input Quick Amp WT labeling kit (Agilent Technologies) selon les recommandations du fabricant L'ARNc synthétisé a été quantifié et leur qualité a été vérifiée par spectrophotométrie UV-VIS

(Nanodrop, Thermo scientific). L'hybridation des échantillons a été faite selon le protocole standard du fabricant et les puces d'expression ont été scannées en utilisant le Sure Scan Microarray Scanner (Agilent technologies). Les données d'expression ont été traitées avec le logiciel GeneSpring (version 12.5). L'intensité de la fluorescence des sondes a été corrigée pour éliminer les bruits de fond et une valeur d'expression a été obtenue pour chaque gène dans chaque réplica en calculant la moyenne géométrique de toutes les sondes d'un gène, suivi par une normalisation médiane au travers de tous les gènes de la puce. Une moyenne géométrique et un écart type géométrique ont été calculés à partir d'au moins trois mesures indépendantes pour chaque tissu, lignées cellulaires ou modèles cellulaires. Des réplicas techniques ont été utilisés pour les tissus puisqu'un seul échantillon d'ARN par tissus était disponible. Un échantillon d'ARN référence a aussi été inclus et consistait en un mélange égal de dix tissus différents : glande adrénale, cervelet, cerveau complet, cœur, foie, prostate, rate, thymus, colon et moelle osseuse.

### **6.5.2. Profils d'expression dans des biopsies de patients CU et contrôles sains**

Tous les sujets avaient au-dessus de 18 ans et étaient diagnostiqués depuis plus de 5 ans avec la maladie CU. Les patients sous traitements biologiques étaient exclus. Les biopsies ont été collectées aux Hôpitaux Royal Victoria et Maisonneuve-Rosemont durant des examens de routines pour les patients et, pour les contrôles, durant des examens de dépistage du cancer. Pour les patients, les biopsies ont été prélevées dans les régions inflammées, près d'ulcérations, et dans les régions non-inflammées. Les biopsies provenaient du rectum (contrôles et la plupart des patients) et du colon (quelques patients) et ont été gardées dans le RNAlater (Qiagen) jusqu'à l'extraction de l'ARN total. L'ARN a été extrait à l'intérieur de 24 heures suivant le prélèvement avec la trousse RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. L'ARN a été quantifié en utilisant la trousse RNA 6000 Nano Kit (Agilent) et le Bioanalyzer 2100 (Agilent). Les RIN étaient tous au-dessus de 8. 1 µg d'ARN a été envoyé à Genome Quebec Innovation Center (Montreal, QC, Canada) où l'expression pan-génomique a été évaluée par analyse de la puce Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix).

## **6.6. Isolation de protéines**

### **6.6.1. Lysats totaux**

Les cellules transfectées en transitoires ont été obtenues par transfection d'un mélange de 1,5 µg de plasmide et de lipofectamine 2000 dans du Opti-MEM. Après six heures d'incubation à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, le milieu a été changé pour du milieu complet et les cellules remises en incubation pour 18 heures. Les cellules adhérentes ont été lavées 1 fois avec du DPBS froid puis lysées dans un tampon contenant 25 mM HEPES pH 7,4, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10% glycérol, 1% Triton-X-100, 50 mM NaF, 30mM sodium pyrophosphate fraîchement additionné de 1mM de sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), 10 mM d'iodoacétamide et des inhibiteurs de protéases (206). Les lysats ont été agités à 4°C pendant 30 minutes puis passés dans une seringue 25G et centrifugés à 14,000 *xg* pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant a été aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à leur utilisation. Un aliquot a été utilisé pour en quantifier la concentration en protéines.

### **6.6.2. Enrichissement de protéines membranaires et cytoplasmiques**

La trousse d'extraction des protéines membranaires et cytosoliques Mem-PER Plus (Thermo Scientific) a été utilisée selon les indications du fabricant. Les fractions ont été rapidement aliquotées et mis à -80°C et un petit volume a été gardé pour le dosage en protéines.

## **6.7. Dosage des protéines**

Toutes les préparations de protéines ont été quantifiées avec la trousse Pierce BCA Protein (Thermo Scientific) en suivant les indications du fabricant puis analysées en utilisant un lecteur de plaques Synergy 2 (Biotek).

## **6.8. Immunobuvardage**

Tous les protocoles pour les solutions d'immunobuvardage proviennent du Current Protocol in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc). Les échantillons de protéines ont été préparées en ajoutant, aux lysats protéiques, 1/6 du volume initial d'un tampon de chargement 6X composé de: 0.35 M Tris·Cl/0.28% SDS, pH 6.8, 30% glycérol, 10% SDS, 0.6 M DTT, 0,012% bleu de bromophénol. Les échantillons ont été laissés 30 minutes à 24°C

avant de les charger sur le gel dénaturant de polyacrylamide 10% /dodécylsulfate de sodium (SDS). L'échelle de poids moléculaire utilisé est le Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope (BIORAD). L'électrophorèse des protéines a été réalisée à 25 milliampères dans un tampon d'électrophorèse 0.025 M Tris, 0.192 M glycine et 0.1% SDS. Le transfert sur membrane de nitrocellulose (BIORAD) a été fait à 100 V pendant 2 heures ou à 25 V 18 heures à 4°C dans un tampon 20% méthanol, 0.0125 M Tris et 0.096 M glycine. La membrane sur laquelle se trouvent les protéines a été incubée avec un tampon de blocage (*Tris-Buffered Saline* (TBS), 0,1% de Tween20 avec 3% de lait écrémé en poudre) pendant 30 minutes à 24°C. Ensuite, la membrane a été incubée avec une solution d'anticorps primaire anti-Flag M2 (Sigma) dilué 1/1000 dans le tampon de blocage pendant 30 minutes à 24°C. L'excès d'anticorps a été éliminé par trois lavage de cinq minutes avec agitation dans du TBS, 0,1% de Tween20 (TTBS). La membrane a ensuite été incubée une heure à 24°C dans une solution d'anticorps secondaire anti-souris lié à la peroxydase de raifort (HRP) (Abcam) dilué dans le tampon de blocage. Après trois lavages de cinq minutes dans du TTBS et un lavage dans du TBS, les membranes ont été traitées pour la détection des signaux avec le *Western Blot Lightning Plus-ECL* en suivant le protocole du fabricant (Perkin Elmer). Les films Carestream Kodak BioMax light (Sigma) ont été exposés aux membranes puis révélés dans un développeur automatique.

## **6.9. Ratio F-actine/G-actine**

100,000 cellules ont été mises en culture dans un puits de 9,5 cm<sup>2</sup>. Après 24 heures de culture à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, le milieu complet a été changé pour du milieu DMEM sans rouge phénol et additionné de 1% de BSA et les cellules ont été incubées 24 heures. Après ce temps, le milieu minimal a été changé pour du HEM-SSP 0,1% de BSA à différents pH et les cellules ont été incubées entre 30 minutes et 1 heure, afin de tester deux différents temps. Elles ont ensuite été lysées afin de séparer la F-actine de la G-actine avec la trousse G-actin / F-actin In Vivo Assay Kit (Cytoskeleton) selon les recommandations du fabricant. Les lysats ont été utilisés pour un immunobuvardage. La densité des bandes a été dosée avec le logiciel ImageJ et les calculs ont été effectués sur Microsoft Office Excel.

## 6.10. Détection de l'AMPC

Les cellules sous-confluentes ont été détachées de Pétri 55cm<sup>2</sup> puis comptées (MoxiZ, Orflo®). 6,25x10<sup>5</sup> cellules (adhérentes, HEK293) ou 1,25x10<sup>6</sup> cellules (en suspension, lignées lymphoblastoïdes) par conditions ont été mises dans des tubes séparés puis centrifugées à 300 xg 5 minutes dans une centrifugeuse 5424 (Eppendorf). Les cellules ont été lavées avec du DPBS puis centrifugées avant d'être traitées pendant 30 minutes avec du HEM-SSP 1X à pH 6,5, pH 7,0, pH 7,5 ou pH 8,0 auxquelles a été ajoutés 0,5 mM d' 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) (Sigma), du DPBS 1X ou du HEM-SSP 1X pH 8,0 avec 0,5 mM IBMX et 50 µM forskoline (Sigma). Après ce temps, les cellules ont été centrifugées à 300 xg 5 minutes à 24°C, le surnageant retiré et les cellules lysées dans 300 µL d'éthanol 65% froid. Les tubes ont été incubés sur glace durant 10 minutes pour favoriser la séparation du surnageant qui a été transféré dans un autre tube sur glace. Le culot a été resuspendu dans un autre 300 µL d'éthanol 65% froid afin de le laver. Les tubes ont été alors centrifugés à 2000 xg 15 minutes à 4°C. Les surnageants provenant des deux tubes de la même condition ont été combinés puis lyophilisés dans un speedvac, jusqu'à ce que tout le liquide ait évaporé. Les tubes ont été immédiatement mis au -80°C jusqu'à leur utilisation.

La détection de l'AMPC, dans les extraits ainsi obtenus, a été réalisée par l'essai compétitif Alphascreen cAMP (Perkin Elmer) selon les recommandations du fabricant. Toutefois, nous avons utilisé des lysats de cellules pour faire la détection afin de diminuer grandement la variabilité entre les lectures. Le protocole utilise des cellules vivantes. L'AMPC-biotine a été reconstitué avec 10 mL de PBS 1X. Cette solution a été conservée à 4°C en absence de lumière pour favoriser sa stabilité. Les solutions suivantes ont été faites fraîches : la solution utilisée pour la dilution des lysats, la dilution des billes acceptuses et pour la production de la courbe standard est constituée de 1X HEM pH 7,5, 1X SSP, 0,1% de BSA (Solution 1) et la solution pour la dilution des billes donneuses-streptavidine est constituée de 1X HEM pH 7,5, 0,1% BSA, 0,3% Tween-20 (Solution 2). La courbe standard est une courbe de 12 points avec un facteur de dilution de 0,4 par point. Les lysats ont été dissous dans 78 µL ou 156 µL de la solution 1 selon le nombre de cellules de départ soit 6,25x10<sup>5</sup> cellules et 1,25x10<sup>6</sup> cellules respectivement. 5 µL de chaque échantillon a été déposé dans les puits d'une plaque 96 puits blanche (1/2 AreaPlate de Perkin Elmer) ainsi que 5 µL

de chacun des points de la courbe standard. 10  $\mu$ L de la dilution de billes acceptueuses dans la solution 1 a été déposé par puits et la plaque a été centrifugée 10 secondes à 1000xg à 24°C avant d'être incubée pendant 30 minutes à 24°C à une faible agitation en absence de lumière. 10  $\mu$ L de la dilution de billes donneuses-streptavidine et AMPc-biotine a été déposée dans chaque puits. La plaque a été centrifugée 10 secondes et mise à incuber pendant 40 minutes à 24°C protégé de la lumière sous une faible agitation. La température de la plaque a été équilibrée dans le lecteur de plaques Infinite M1000 (Tecan) durant 20 minutes avant d'être lue à un temps d'excitation de 100 ms et un temps d'intégration de 300 ms. Les données ont été analysées avec le logiciel Prism 5 (GraphPad). Une courbe standard sigmoïde des comptes Alphascreen en fonction du log de la concentration en nanomolaire d'AMPc a été produite et les données brutes ont été interpolées sur celle-ci afin de déterminer la concentration d'AMPc. L'erreur standard a été calculée pour chacun des triplicatas.

#### **6.11. Immunofluorescence pour le remodelage de l'actine**

150,000 cellules ont été mises en culture sur des lamelles de 22x22 mm traitées à la laminine 15  $\mu$ g/mL (Life Tech). Après 24 heures de culture à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, le milieu complet a été changé pour du milieu DMEM sans rouge phénol additionné de 1% de BSA et les cellules ont été remises en culture. 24 heures plus tard, le milieu minimal a été changé pour du HEM-SSP 0,1% de BSA à différents pH et les cellules ont été incubées pour 30 minutes ou 1 heure. Les deux temps ont été testés afin d'obtenir la meilleure réponse cellulaire. Les cellules ont alors été fixées avec une solution fraîche de paraformaldéhyde 2% pH 7,2 pendant 20 minutes à 24°C, lavées avec du PBS 1X puis perméabilisées et bloquées pendant 30 minutes à 24°C avec une solution 0,2% Triton-X-100 et 2% de BSA. Les lamelles ont alors été mises dans une chambre humide à 24°C et 300  $\mu$ L d'une solution PBS contenant 1/200 de AlexaFluor555-Phalloïdin (Invitrogen), 0,1  $\mu$ g/mL de DAPI (Sigma), 1% de BSA et 0,05% de Triton-X-100 a été appliquée sur celles-ci. Après une incubation d'une heure à 24°C, les lamelles ont été lavées avec du PBS 1X, déposées sur des lames de verre avec une solution de DABCO 0,04% dans du glycérol et scellées.

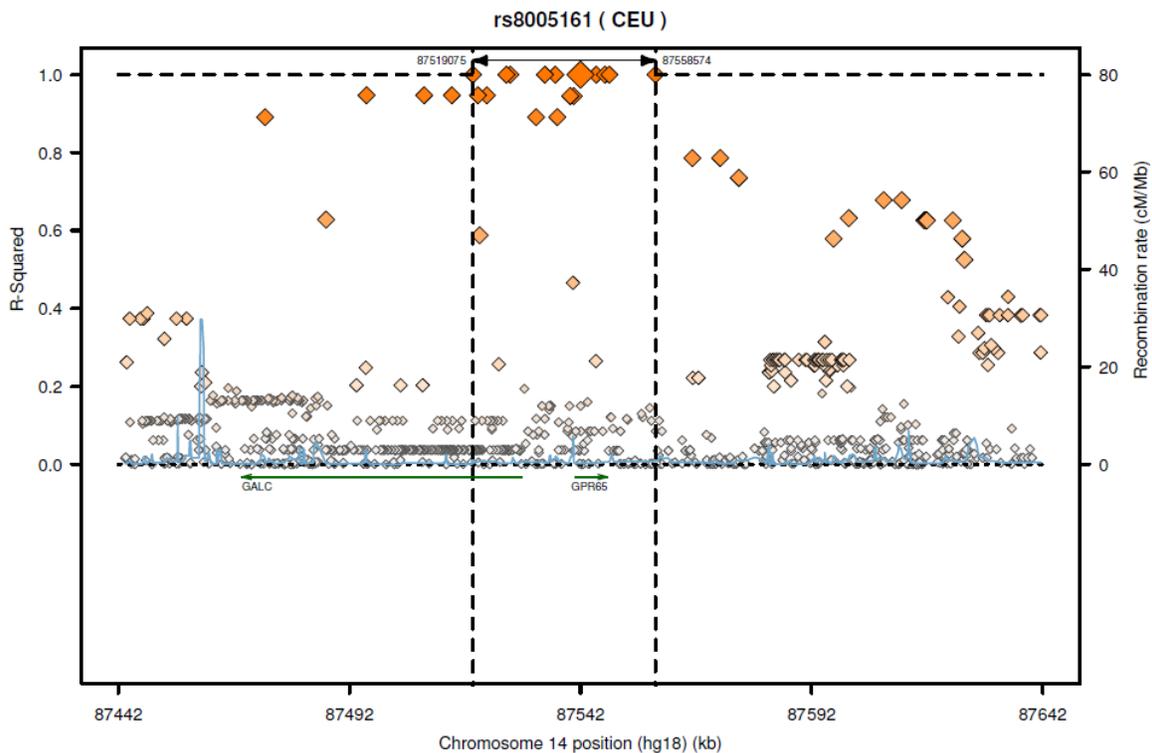
## **6.12. Immunofluorescence pour la localisation de protéines**

500,000 cellules ont été mises en culture sur des lamelles de 22x22 mm traitées à la laminine 15 µg/mL (Life Tech). Les cellules exprimant GPR65 de façon transitoire ont été obtenues tel que décrit plus haut. Après 24 heures de culture à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, les cellules ont été incubées dans une solution de Wheat germ agglutinin (WGA) 647 (1/200; Invitrogen) dans du DMEM sans rouge phénol pour 10 minutes. Les cellules ont été fixées avec une solution fraîche de paraformaldéhyde 2% pH 7,2 pendant 20 minutes à 24°C, lavées avec du PBS 1X puis perméabilisées et bloquées pendant 30 minutes à 24°C avec une solution de PBS additionnée de 0,2% de Triton-X-100 et 2% de BSA. Les lamelles ont alors été mises dans une chambre humide à 4°C et 300 µL d'une solution d'anticorps primaire 1% de BSA a été appliquée sur celles-ci et elles ont été incubées ainsi 18 heures. Les lamelles ont été lavées avec du PBS 1X puis remises dans la chambre humide avec 300 µL d'une solution d'anticorps secondaires, 0,1 µg/mL de DAPI et 1% de BSA. Après une incubation d'une heure à 24°C, les lamelles ont été lavées avec du PBS 1X, déposées sur des lames de verre avec une solution de DABCO 0,04% dilué dans du glycérol et scellées.

## 7. Résultats

### 7.1. Analyses génétiques

Les études d'association pan-génomiques trouvent des SNPs index, soit les SNPs ayant le plus de signal dans une région. Afin de déterminer les SNPs corrélés, appelés SNP proxy, avec le variant associé aux MIIs (rs8005161, (96)), les logiciels « Plots » et « SNAP proxy search » du site internet du Broad Institute (<https://www.broadinstitute.org/mpg/snap/>) ont été utilisés avec les données de génotypage provenant des individus de descendance européenne (CEU) de la banque de données 1000 Genome Pilot 1. Les études de corrélation entre le variant associé (rs8005161) de la région 14q31 illustrent que neuf SNPs sont parfaitement corrélés ( $r^2=1$ ) avec le variant rs8005161 (Figure 4). Parmi ces variants, rs3742704 (FAM=0.1967) est localisé dans la région codante de *GPR65*. Ce variant cause le changement d'une isoleucine pour une leucine à la position d'acide aminée 231 (Ile231Leu), qui se trouve dans la sixième région transmembranaire de GPR65 (Figure 2).

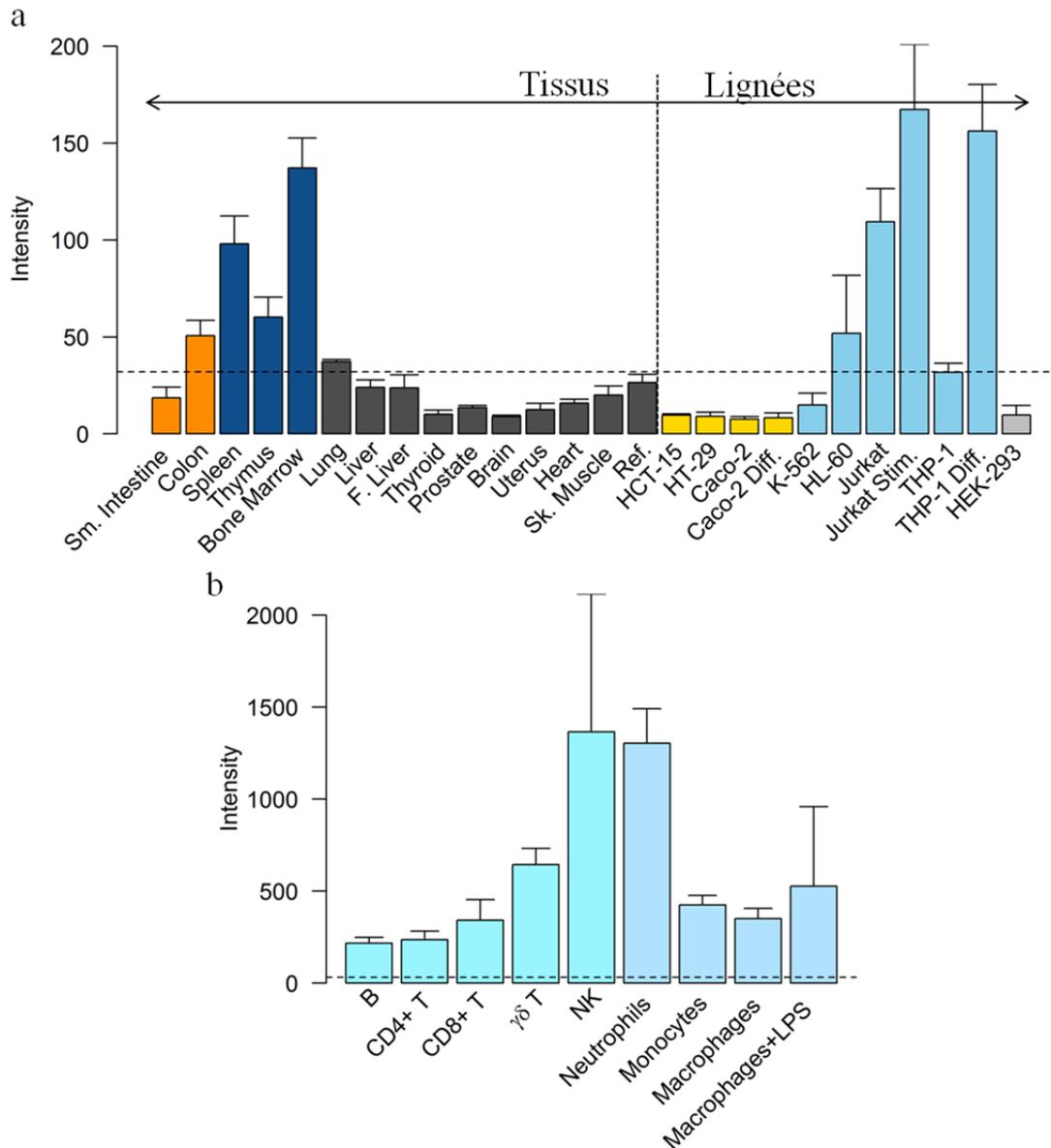


**Figure 4: Analyse d'association de la région 14q31.**

Tous les SNPs à l'intérieur de 50 kb se trouvent sur le graphique et les lignes pointillées représentent la région couverte par les variants corrélés avec un  $r^2=1$  au SNP rs8005161.

## 7.2. Profil d'expression de *GPR65*

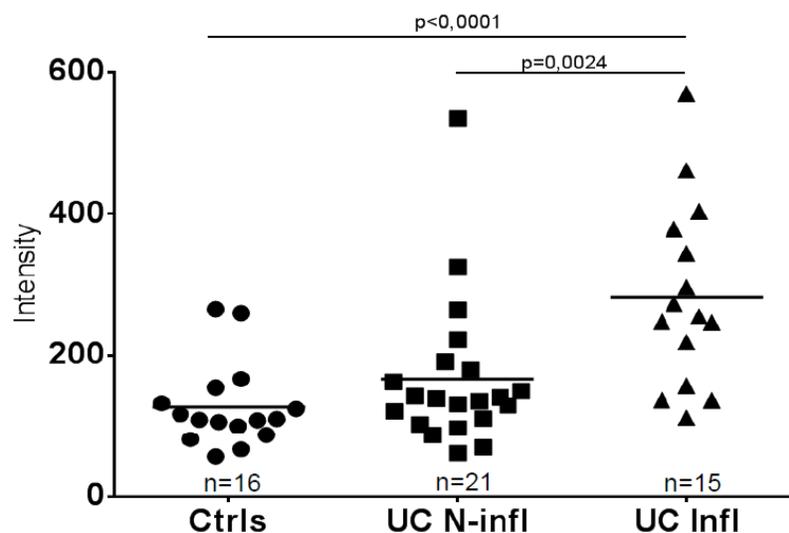
Afin d'établir le profil d'expression cellulaire et tissulaire de *GPR65*, l'approche par puces à ARN a été utilisée. Une puce spécifique a été développée (Agilent). Les résultats indiquent que l'expression de *GPR65* est limitée aux différents tissus lymphoïdes et mucoïdes (Figure 5a). Dans les lignées cellulaires, il n'est exprimé que dans les lignées de cellules leucocytaires où son expression y est fortement induite lors de la stimulation des cellules Jurkat par un traitement au PMA/ionomycine (Jurkat stim) ou par la différenciation en macrophage des cellules THP1 induite par le traitement au  $\text{TNF}\alpha/\text{IFN}\gamma$  (THP-1 diff). L'analyse des données d'expression de *GPR65* dans différents types cellulaires immunitaires primaires provenant d'individus sains (n=6) démontrent qu'il est exprimé dans tous les types cellulaires testés et plus fortement dans les cellules TNs et les neutrophiles (Figure 5b).



**Figure 5 : Profil d'expression de *GPR65***

Analyse sur puce des échantillons d'ARN totaux obtenus de différents tissus et lignées cellulaires (a) et de cellules immunitaires primaires de sang périphériques d'individus sains (b). Données représentées sous forme de moyenne géométrique et d'écart type géométrique. La ligne pointillée représente une valeur arbitraire et les signaux se trouvant sous cette ligne sont vus comme non-quantifiables car trop peu détectés. (a) Les modèles de différenciation d'épithélium colonique Caco-2 différenciés ont été obtenus suivant 21 jours de culture à une confluence de 100% (Caco-2 diff.). Les cellules Jurkat ont été stimulées avec du PMA (40 ng/mL) et de l'ionomycine (1  $\mu$ g/mL) pour 6 heures (Jurkat Stim.), et les THP-1 différenciés ont été traités durant 24 heures avec du TNF $\alpha$  (10 ng/mL) et IFN $\gamma$  (400 U/mL) (THP-1 diff.). (b) Résultats obtenus à partir de préparations d'ARN totaux provenant de cellules immunitaires primaires isolées du sang périphérique de donneurs sains (n=6). Les monocytes ont été utilisés pour la génération *in vitro* de macrophages par un traitement au M-CSF; 50 ng/mL pendant six jours et les macrophages ont été activés avec l'ajout de LPS (1  $\mu$ g/mL; Macrophages + LPS) pour une incubation totale de huit jours.

En utilisant la puce pan-génomique à ARN Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix), nous avons détecté l'expression de *GPR65* dans des biopsies de 16 sujets sains et de 36 sujets atteints de la colite ulcéreuse. 11 sujets se retrouvent dans les deux groupes (biopsies de régions non-inflammées et inflammées) (Figure 6). Pour les patients, les biopsies ont été prélevées dans les régions inflammées, près d'ulcérations, et dans les régions non-inflammées. Nos résultats indiquent que l'expression de *GPR65* augmente significativement dans les biopsies de tissus inflammées provenant des patients atteints de la colite ulcéreuse, comparativement aux tissus des biopsies provenant de tissus non-inflammés ou de sujets contrôles.

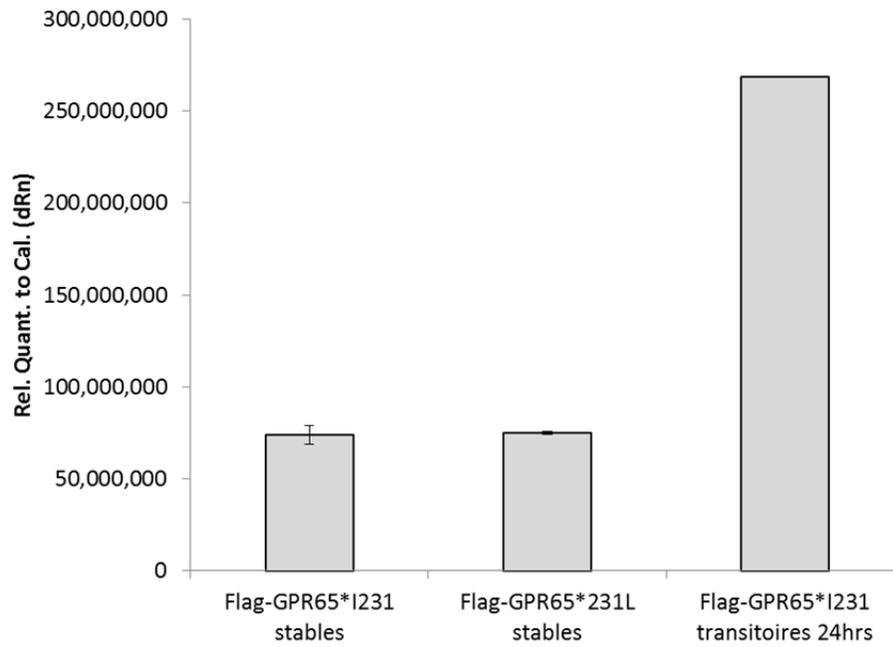


**Figure 6 : Expression de *GPR65* dans des biopsies humaines**

Données d'expression obtenues de biopsies; de sujets sains (cercle), de sujets atteints de la CU dans une région non-inflammée (carré) ou inflammée (triangle). Les lignes pleines représentent la moyenne des données de chaque groupe. Valeurs p calculées avec un test de Student.

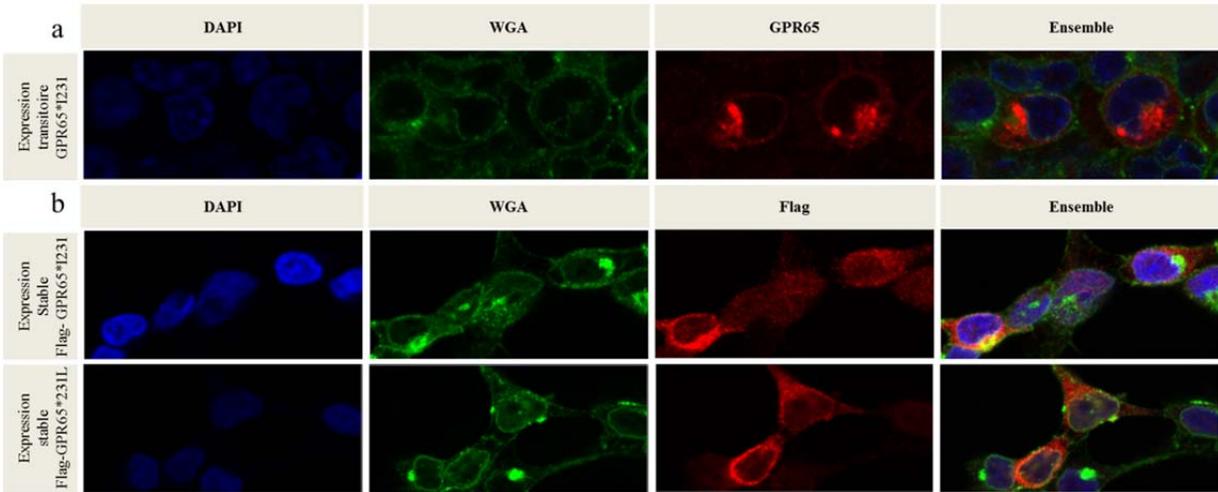
Afin d'établir la localisation cellulaire de *GPR65*, nous avons procédé à une analyse par immunofluorescence en utilisant un anticorps anti-*GPR65*. La localisation sub-cellulaire de *GPR65* sur des cellules HEK293T/ 17 surexprimant *GPR65\*1231* de façon transitoire a révélé que la protéine *GPR65* n'est retrouvée que dans les régions périnucléaires et cytoplasmiques (Figure 8a). La faiblesse de l'expression de *GPR65* dans des cellules exprimant de façon stable *GPR65\*1231* a rendu la détection difficile (résultats non montrés). Nous avons donc généré des cellules HEK293T/ 17 exprimant de façon stable l'une ou l'autre des deux allèles de *GPR65* fusionnée à un épitope unique Flag placé en N-terminal. Les niveaux d'expression de *GPR65* en ARNm dans les populations cellulaires *Flag-GPR65\*1231* et *Flag-GPR65\*231L*

sont de 28% ceux obtenus avec les transitoires (Figure 7) et la localisation de la protéine GPR65 demeure dans les même régions que dans les clones obtenus après transformation en transitoire (Figure 8b).



**Figure 7: Expression en ARNm de Flag-GPR65 exprimé de façon stable et transitoire**

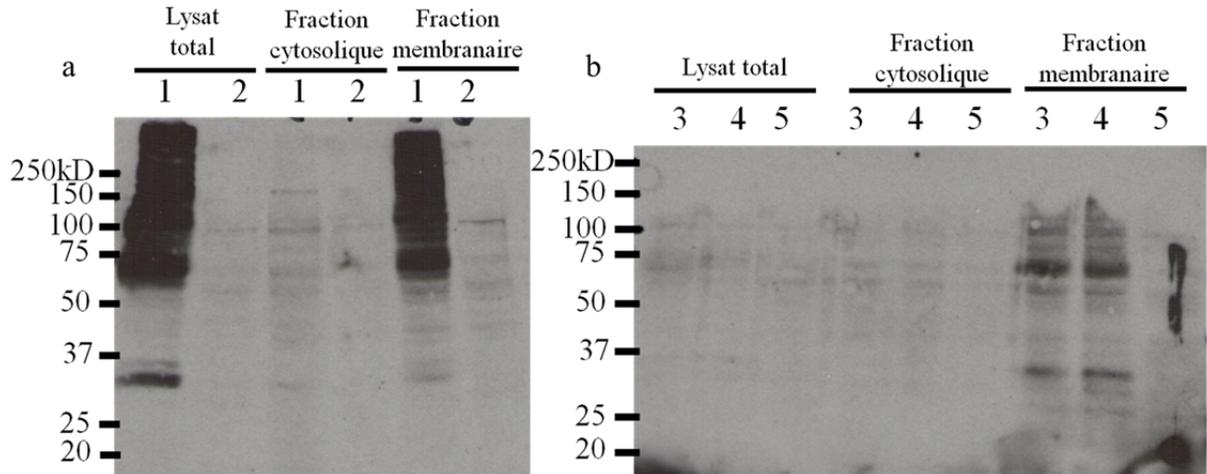
Analyses par qPCR avec les amorces HUM-GPR65-001-02. Les amorces de la paire 02 se lient dans la région codante et étaient utilisées lors de la surexpression de *GPR65*.



**Figure 8: Localisation de GPR65 dans des cellules surexprimant de façon transitoire ou stable Flag-GPR65.**

Les mélanges d'anticorps primaires anti-GPR65 de lapin (Abcam) (a) et anti-Flag M2 de souris (Sigma) (b) ont été utilisés à des concentrations de 1 µg/mL. Les mélanges d'anticorps secondaires anti-lapin ou anti-souris d'âne (Invitrogen) ont été utilisés à une dilution 1/600. Les images ont été prises avec le microscope confocale Zeiss LSM Duo, une combinaison de deux systèmes confocaux : LSM 710 et le LSM 5 LIVE (2 détecteurs).

Une localisation de GPR65 à la membranaire cytoplasmique était attendue. La présence de GPR65 dans le cytoplasme et l'absence de marquage clair à la membrane cytoplasmique semble indiquer que le Flag placé en amino-terminal de GPR65 pourrait affecter sa localisation. Nous avons voulu vérifier si les lignées stables *Flag-GPR65\*1231* et *Flag-GPR65\*231L* produisent un récepteur transmembranaire. Nous avons utilisé un protocole de fractionnement cellulaire pour quantifier les protéines Flag-GPR65 dans les préparations enrichies de protéines cytoplasmiques ou de protéines membranaires totales. La trousse employée ne permet pas d'établir la distinction entre les types de membranes. Que ce soit en transitoire ou en stable, Flag-GPR65\*1231 et Flag-GPR65\*231L sont enrichis dans la fraction membranaire et sont exprimées à des niveaux très similaires (Figure 9a-b).

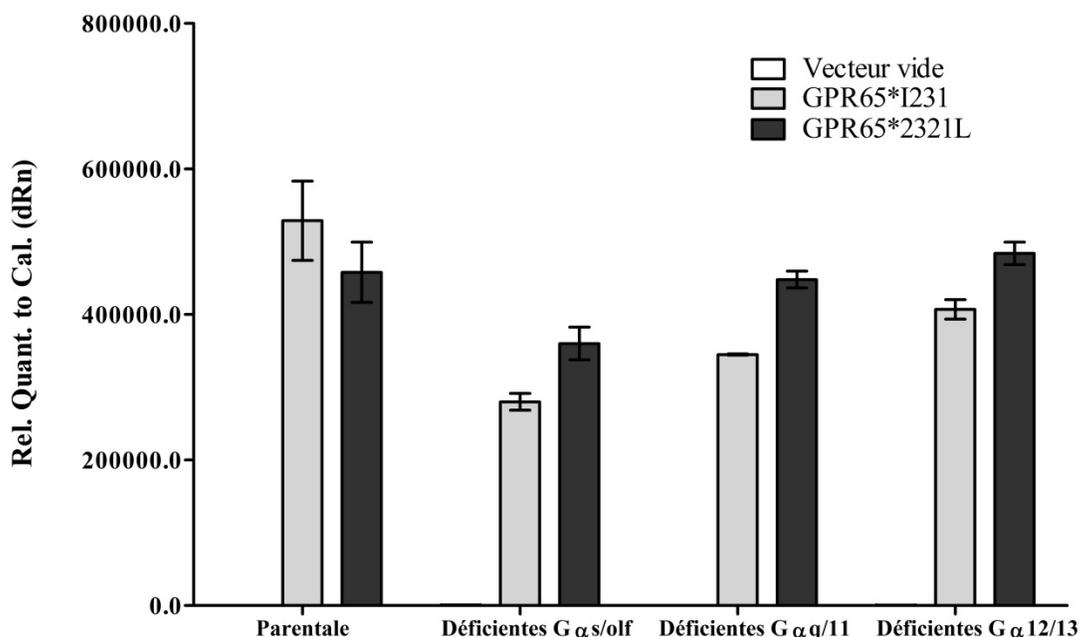


**Figure 9: Localisation subcellulaire de GPR65**

Analyse par immunobuvardage de type Western de lysats protéiques provenant de la fraction membranaire ou cytosolique de cellules HEK293T/17 surexprimant de façon transitoire la protéine Flag-GPR65\*I231 (1) ou non transfectées (2). (B) Analyse réalisée sur les lysats provenant de cellules HEK293T/17 surexprimant de façon stable les protéines de fusion Flag-GPR65\*I231 (3), Flag-GPR65\*231L (4) ou transfectées de façon stable avec le vecteur vide (5).

### 7.3. Définir les voies signalétiques découlant de l'activation de GPR65 et déterminer l'impact du variant codant de GPR65 dans ces voies signalétiques

Pour déterminer quelles voies signalétiques sont activées suite à une stimulation par le pH de GPR65, des lignées de cellules HEK293 parentales ou déficientes pour différentes protéines G exprimant de façon stable l'une ou l'autre des deux allèles de *GPR65* ont été produites. Des analyses par qPCR ont été réalisées pour s'assurer que les ARNm pour les deux allèles de *GPR65* sont exprimées à des niveaux comparables dans chacune des lignées produites (Figure 10) et que leurs niveaux, bien que faibles, soient facilement détectables. Ces clones ont été utilisés pour les analyses subséquentes.



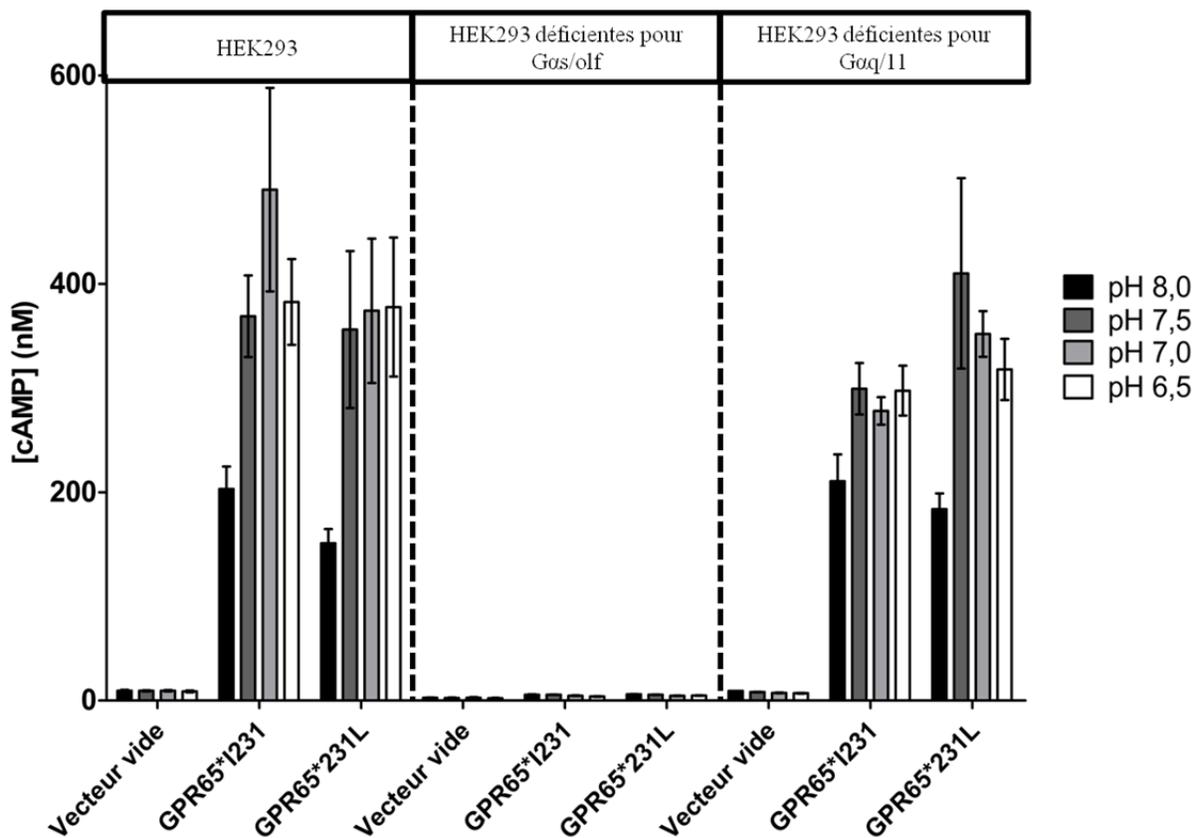
**Figure 10: Expression en ARNm de *GPR65* dans les lignées stables.**

Analyses par qPCR avec les amorces HUM-GPR65-001-02. Les amorces de la paire 02 se lient dans la région codante et étaient utilisées lors de la surexpression de *GPR65*.

Puisque *GPR65* a été préalablement reliée à la voie  $G_{\alpha s}$  et à la production subséquente d'AMPC (Figure 3), un essai de détection de l'accumulation d'AMPC a été réalisé avec les cellules HEK293 parentales ou déficientes pour  $G_{\alpha s/olf}$  ou  $G_{\alpha q/11}$  dans lesquelles *GPR65\*I231* et *GPR65\*231L* ont été introduits de façon stable (Figure 11). L'activation par un pH acide cause une accumulation d'AMPC dépendante de *GPR65* (Figure 11, colonne HEK293). Cette accumulation passe, au moins en partie, par la voie  $G_{\alpha s/olf}$  (Figure 11, HEK293 déficiente pour  $G_{\alpha s/olf}$ ) et peu ou pas par les voies  $G_{\alpha q/11}$  (Figure 11, HEK293 déficiente pour  $G_{\alpha q/11}$ ). Aucune différence significative entre la réponse de *GPR65\*I231* et le variant *GPR65\*231L* n'a été détectée (Figure 11, HEK293).

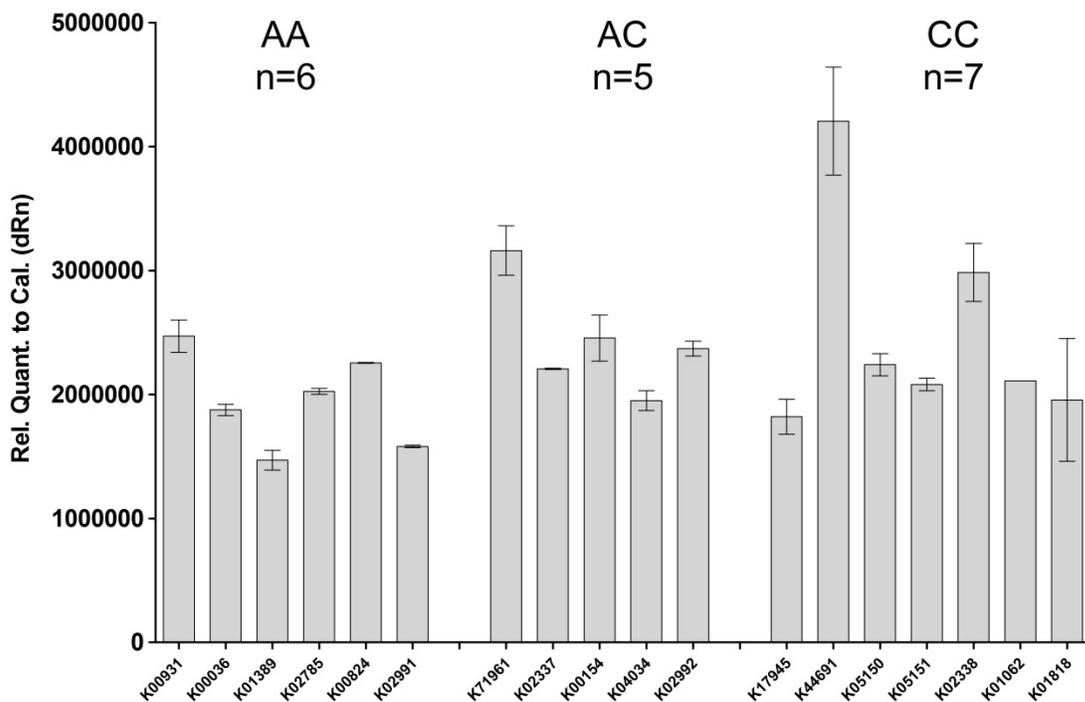
L'absence d'une différence significative dans la production d'AMPC par les deux variants laisse présumer que l'impact de l'haplotype pourrait être transcriptionnel plutôt que par une altération de la protéine *GPR65*. 10 SNPs sont corrélés ( $r^2=1$ ) et associés aux MIIs dans la région 14q31. Seul le SNP rs3742704 se trouve dans une région codante. Tous les autres ont donc le potentiel d'altérer la régulation transcriptionnelle de *GPR65*. Nous avons voulu évaluer l'impact sur la transcription de l'haplotype associé aux MIIs en utilisant des

cellules lymphoblastoïdes humaines provenant de patients atteints de la CU, de la MC ou de sujets contrôles. Six de ces lignées portent un génotype AA (*GPR65\*1231*), sept ont un génotype CC (*GPR65\*231L*) et cinq sont hétérozygotes pour l'haplotype. Les ARN totaux ont été isolés et quantifiés par qPCR. Les résultats démontrent que les niveaux sont inchangés par le génotype (Figure 12). En utilisant les mêmes lignées, nous avons cherché à évaluer l'accumulation de l'AMPc dans un cadre où les cellules expriment des niveaux de GPR65 plus physiologiques. Un essai de détection de l'accumulation de l'AMPc a été produit avec ces lignées (Figure 13). Cet essai nous a permis d'établir qu'aucune différence significative n'est observée entre les différents génotypes pour la production d'AMPc suite à l'activation par un pH acide.



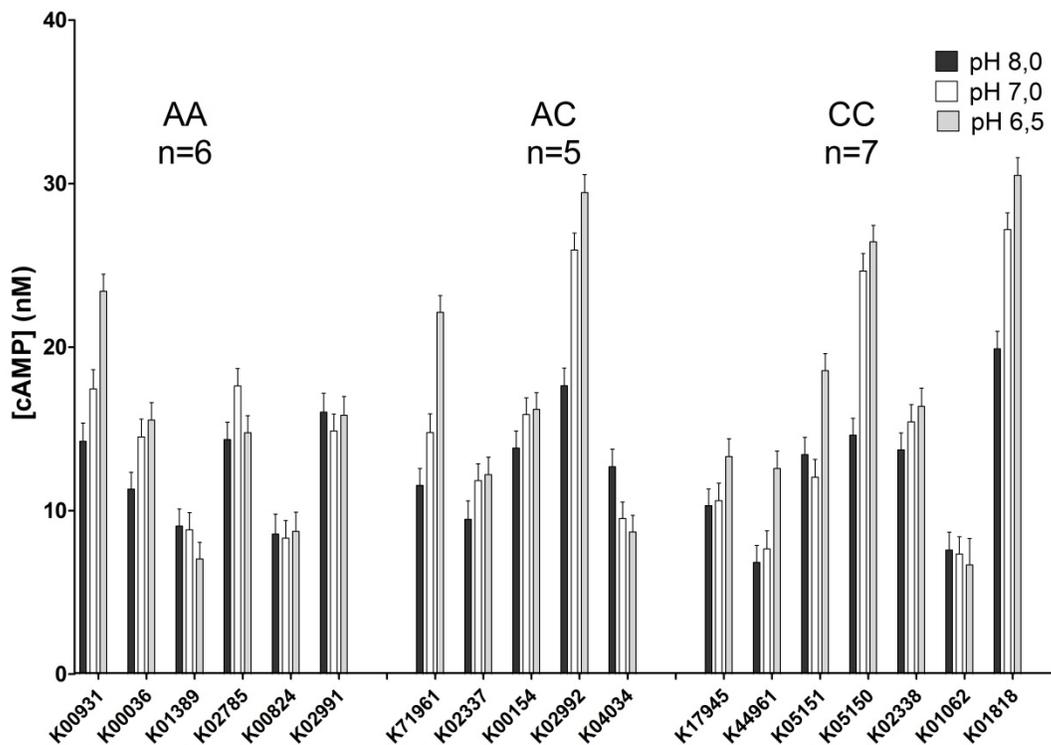
**Figure 11: Essais de détection de l'AMPc dans les lignées stables.**

Détection de l'accumulation d'AMPc par Alphascreen (Perkin Elmer) (n=2 biologiques, n=3 techniques).



**Figure 12: Niveaux d'expression endogène de l'ARNm de GPR65 dans les différentes lignées de cellules lymphoblastoïdes humaines.**

Analyse par qPCR (n=2 techniques).



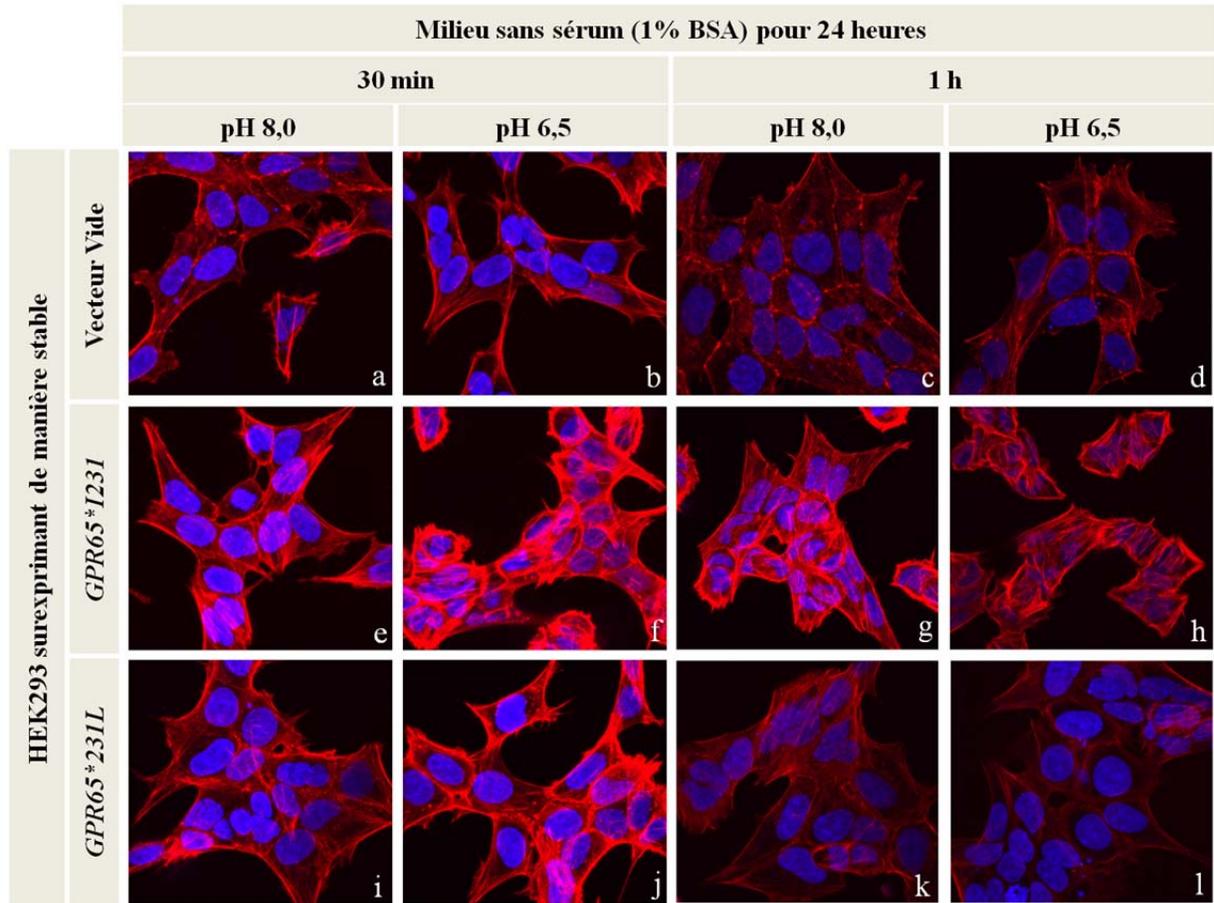
**Figure 13: Essais de détection de l'AMPC dans les lignées lymphoblastoïdes.**

Détection de l'accumulation d'AMPC par Alphascreen (Perkin Elmer), n=3 techniques).

Il est connu que des régions différentes d'un récepteur sont susceptibles d'être utilisées par différentes voies de signalisation. Il est donc possible que le variant altère la fonction de GPR65 dans une autre de ces voies signalétiques. GPR65 est impliquée dans la formation de fibres de stress. D'ailleurs, le groupe de Ishii et al. a établi, par la surexpression de *GPR65* dans des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*), que l'activation par un pH acide de GPR65 cause la formation de fibres de stress via l'activation de la voie RhoA (126) (Figure 3). Afin d'observer si ce processus biologique est affecté par le variant codant de *GPR65*, des analyses par immunofluorescence avec un marquage à la phalloïdine ont été réalisées sur les cellules HEK293 parentales exprimant de façon stable *GPR65\*1231* ou *GPR65\*231L* (Figure 14). La stimulation des cellules par un pH acide cause la formation de fibres de stress dépendante de la présence de GPR65 (Figures 14f, 14h). Le variant codant *GPR65\*231L* semble affecter négativement ce processus (Figures 14j, 14l). Ces essais, basés sur la microscopie, ne nous permettent pas de quantifier de manière précise la formation de fibres de stress.

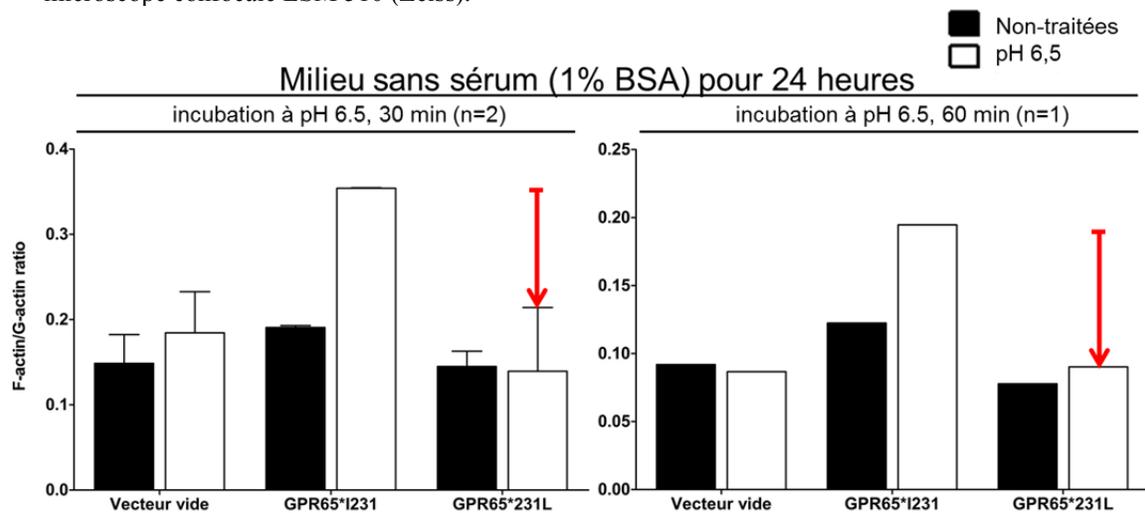
Des essais de quantification de l'actine filamenteuse (F-actine) comparativement à l'actine monomérique (G-actine) ont donc été réalisés en utilisant les mêmes lignées cellulaires stables (Figure 15). Elles ont révélé que *GPR65\*231L* inhibe l'augmentation de F-actine dépendante de l'activation de GPR65 par un pH acide.

De façon à établir quelle protéine G est impliquée dans la formation de fibres de stress dépendante de l'activation de GPR65 par un pH acide, un essai préliminaire par marquage à la phalloïdine a été effectué avec les cellules HEK293 stables pour l'une ou l'autre des allèles de *GPR65* et déficientes pour différentes protéines G (Figure 16). Nos résultats, qui devront être reproduits, indiquent que l'induction de fibres de stress suivant une stimulation par le pH passe, au moins en partie, par les voies  $G\alpha_{12/13}$  (Figure 16t) et peu ou pas par les voies  $G\alpha_s/olf$  (Figure 16r) et  $G\alpha_q/11$  (Figure 16h). De plus, on note que l'intensité des signaux obtenus pour le variant *GPR65\*231L* sont plus faibles que ceux obtenus pour le variant *GPR65\*1231* (Figures 16j, 16l, 16v) confirmant que *GPR65\*231L* entraîne une baisse dans la formation de fibre de stress.



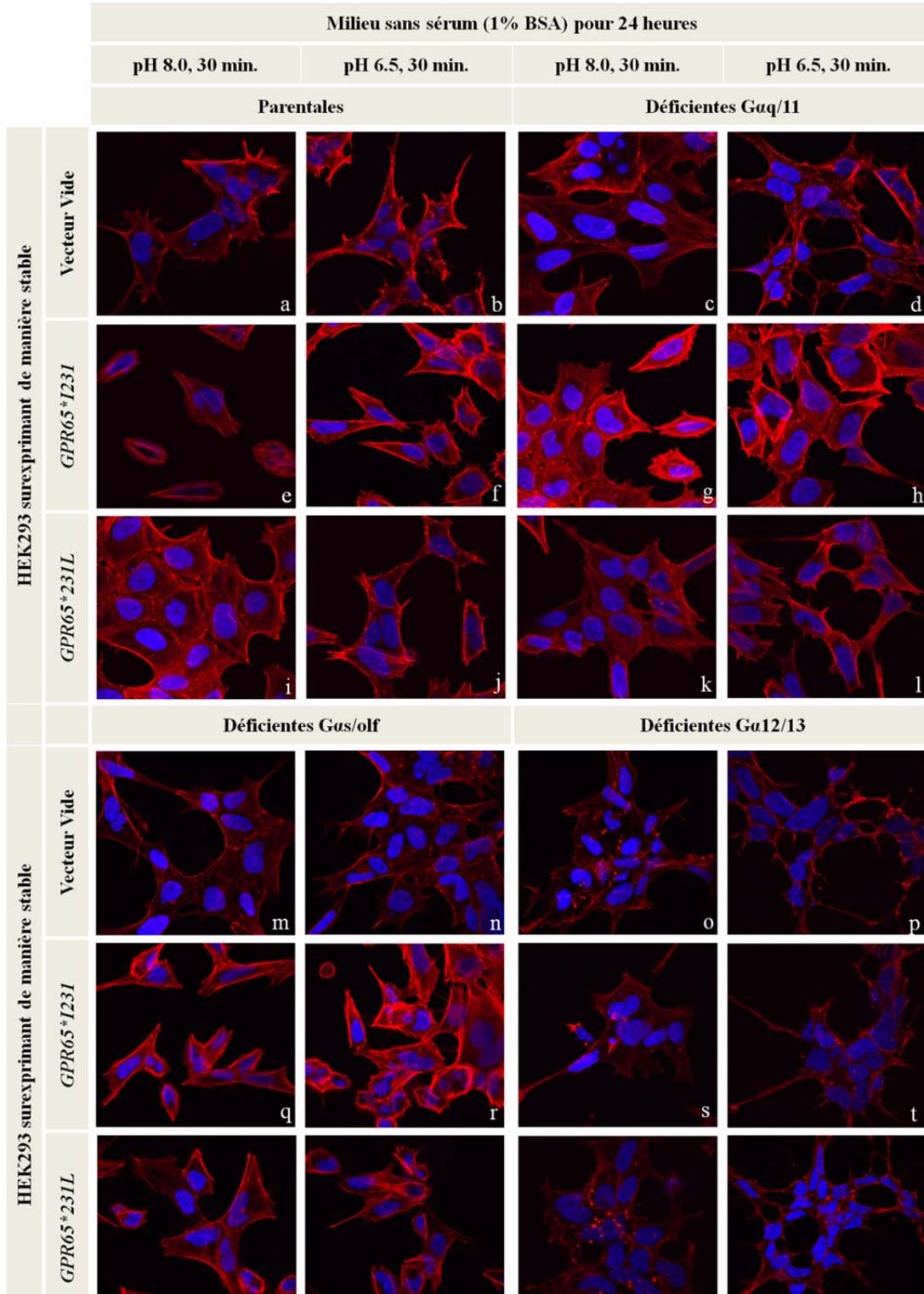
**Figure 14: Essais par immunofluorescence de la formation de fibres de stress dans les lignées parentales stables.**

Marquage à la phalloïdine et au DAPI. Photos représentatives de n=4. Les images ont été prises avec le microscope confocale LSM 510 (Zeiss).



**Figure 15: Détection de la polymérisation de l'actine**

Quantification de la polymérisation de l'actine (F-actine) avec la trousse G-actin / F-actin In Vivo Assay Kit (Cytoskeleton).



**Figure 16: essais de détection de la formation de fibres de stress dans les lignées déficientes pour les protéines G stables.**

Marquage à la phalloïdine et au DAPI (n=1). Les images ont été prises avec le microscope confocale LSM 510 (Zeiss).



## 8. Discussion

### 8.1. Gènes candidats de la région 14q31

Les études d'association pan-génomiques servent à identifier les régions de susceptibilité. Selon la définition utilisée, ces régions peuvent comprendre plus d'un gène. De plus, l'association d'une région ne contribue pas à en identifier le gène impliqué dans l'étiologie de la pathologie analysée. Des études plus élaborées sont donc nécessaires pour identifier le gène causal. Plus de 200 loci de susceptibilité ont été identifiés pour les MIIs (105). La région de susceptibilité aux MIIs se trouvant à la position 14q31 a été associée (rs8005161) avec une valeur  $p=2,35 \times 10^{-14}$  dans une étude comprenant plus de 75 000 cas et contrôles (96). Cette région comprend deux gènes; *GALC* et *GPR65* (Figure 1). Les analyses de corrélation ont identifié 9 SNPs parfaitement corrélés ( $r^2=1$ ) avec ce SNP index, dont un SNP codant dans le gène *GPR65* (rs3742704). L'association de ces SNPs avec les MIIs a été confirmée par des données récentes de génotypage à haute densité des régions associées aux MIIs rendues publiques par Huang et al. (207). Cette étude comprend plus de 67 000 cas et contrôles et inclut tous les SNPs connus du 1000 Genome Project dans 186 régions associées à des maladies immunes, dont 97 avec les MIIs. Le premier objectif de cette étude était de générer, pour chaque signal d'association indépendant, une liste de SNPs qui pourraient potentiellement être causaux. Des approches statistiques sont utilisées afin de déterminer la probabilité de chacun de ces SNPs d'être causal dans une région. Ces données mettent en évidence que parmi les SNPs ayant le plus de potentiel d'être le variant causal de la région 14q31, tous fortement corrélés au SNP index ( $0,843 \leq r^2 \leq 1$ ), rs3742704 est le seul variant codant. Ce dernier entraîne le changement de l'isoleucine 231 par une leucine, *GPR65\*1231L*. Par une prédiction de l'effet qu'une telle modification pourrait avoir sur l'activité ou la fonction de la protéine, ce changement d'acide aminé peut être considéré bénin. Par contre, des changements similaires dans d'autres protéines ont un impact important. Par exemple, le changement de l'isoleucine 359 pour une leucine dans l'isoforme CYP2C9 de la protéine cytochrome-P450, une enzyme impliquée dans le métabolisme d'approximativement 15% des drogues utilisées cliniquement, cause une diminution de son activité enzymatique (208). Aujourd'hui, le génotype qui lui est associé permet d'évaluer la meilleure dose à administrer aux patients recevant des traitements à la Warfarin, une molécule utilisée pour la prévention et

le traitement de la thrombose (209). D'autres études portant sur le récepteur  $\mu$ -opioïde, un RCPG étudié pour son activité lors de la prise d'analgésiques, ont démontrées que le changement de la leucine 85 par une isoleucine affecte la réponse des porteurs de ce génotype à la morphine (210, 211). Ces variants dans les protéines GPR65, CYP2C9 et  $\mu$ -opioïde sont prédits bénins selon le logiciel PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2). Ce logiciel utilise des considérations évolutives structurelles et comparatives afin de prédire l'impact possible d'une substitution d'un acide aminé sur la structure et la fonction d'une protéine.

Les gènes *GPR65* et *GALC* sont en orientation inversée. Ils partagent donc des séquences promotrices (Figure 4). Il y a donc un potentiel pour qu'un des variants non-codants corrélés de la région 14q31 et localisés dans ces régions régulatrices altère leur expression. Cependant, des analyses d'expression réalisées par PCR quantitatif avec les ARNs provenant de cellules lymphoblastoïdes hétérozygotes ou homozygotes pour l'haplotype majeur ou mineur démontrent que les niveaux d'expression, autant pour *GPR65* (Figure 12) que pour *GALC* (Annexe 4), ne sont pas affectés par ce génotype. Puisqu'il s'agit de cellules transformées par le virus Epstein-Barr, il est possible que l'expression de plusieurs gènes soit affectée dans ces cellules. De plus, il ne s'agit que d'une ligné cellulaire. Les analyses d'eQTL (*expression quantitative trait loci*) vont typiquement étudier plusieurs types cellulaires pertinents avant de conclure en un impact. Des analyses d'expression plus élaborées seront nécessaires afin de confirmer ou infirmer que ces différents SNPs n'ont aucun impact sur l'expression de ces deux gènes. Même s'il nous est impossible d'exclure que ces autres variants puissent avoir un impact dans les MIIs, l'étude de l'effet du variant *GPR65\*231Leu* dans le cadre de la pathologie nous semble pertinente. Ce variant codant présente l'avantage d'altérer la structure primaire de GPR65. La présence d'un variant codant associé dans GPR65 est certes intéressante mais ne suffit pas à confirmer GPR65 en tant que gène causal de la région 14q31. Deux gènes sont retrouvés dans cette région : *GALC* et *GPR65*.

*GALC* code pour la galactosylcéramidase, responsable de la dégradation de certains lipides du métabolisme de la myéline, dont la psychosine, un métabolite cytotoxique pour les oligodendrocytes (112). Il s'agit d'une protéine qui a beaucoup été étudiée dans le cadre de la maladie de Krabbe, une maladie neurodégénérative autosomale récessive liée à plusieurs

variants qui diminuent l'activité enzymatique de la protéine GALC (212). *GALC* est exprimé par tous les tissus testés dans nos analyses (Annexe 1). Son expression est observée dans certaines lignées épithéliales ou immunitaires, ne semble pas répondre aux stimulations testées et ne varie pas dans les biopsies provenant de patients atteints de la colite ulcéreuse par rapport aux individus contrôles (Annexe 3). *GALC* est impliquée dans le métabolisme de certains lipides tels que le galactosylceramide (un sphingolipide contenant une sphingosine, un galactose et des acides gras), la galactosylsphingosine ou psychosine, le monogalactosyldiglycéride et le précurseur de la seminolipide (1-alkyl, 2-acyl-3-galactosyl glycerol). Hors, les sphingolipides et phospholipides jouent des rôles important dans la modulation de l'immunité et de l'inflammation, certains même dans la maladie de Crohn (213, 214). Bien que son profil d'expression spécifique maximal ne se trouve pas dans les tissus et cellules qui semblent impliqués dans la pathologie des MIIs, il y existe tout de même des niveaux de base qui pourraient justifier une analyse plus approfondie.

*GPR65* est un RCPG senseur de pH étudié pour ses effets pro-oncogéniques (196), anti-apoptotiques (199) et anti-inflammatoires (167). Toutes les études à son sujet, autant chez l'humain que chez la souris, s'entendent sur une implication dans la production d'AMPC dépendante de son activation par un pH acide. De plus, l'équipe de Ishii et al. ont aussi noté, par la surexpression de *GPR65* dans des cellules CHO, l'activation de RhoA et la formation de fibres de stress découlant de cette activation (126). *GPR65* est exprimé spécifiquement dans les différents tissus lymphoïdes et mucoïdes testés (Figure 5a). Son profil d'expression dans les lignées cellulaires immortalisées (Figure 5a) et dans les cellules primaires immunitaires (Figure 5b) est compatible avec les données actuelles qui tendent à impliquer, entre autres, les cellules leucocytaires dans l'étiologie des MIIs. Deux modèles cellulaires ont été évalués; le modèle cellulaire Jurkat, une lignée lymphoblastique T qui peut être activé par un traitement au PMA/ionomycine (215) et le modèle THP1 qui sont des cellules monocytaires capables de se différencier en macrophages suivant un stimulus à l'IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  (216). Nous avons observé une forte induction de l'expression de *GPR65* dans ces deux modèles (Figure 5a, section lignées, barres bleues) et plus spécifiquement pour les THP1 différenciées. Ces résultats sont appuyés par l'augmentation significative de l'expression de *GPR65* dans les biopsies de tissus inflammés de patients atteints de la CU, comparativement aux biopsies provenant soit de

tissus non-inflammés ou d'individus contrôles (Figure 6). Cette augmentation pourrait être associée au recrutement de cellules immunitaires au niveau des tissus inflammés (217). Il est connu que plusieurs types cellulaires de l'immunité innée, telles que les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les cellules tueuses naturelles et de l'immunité adaptative telles que les Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 et Treg ont tous été impliqués de près ou de loin dans les pathologies de la CU et de la MC (voir section 2.2). Les données génétiques et les profils d'expression observés pour *GPR65*, plus que pour *GALC*, tendent à impliquer *GPR65* dans l'étiologie des MIIs. L'étude de *GPR65* et de l'effet de son variant *231L* sur sa fonction permettra de déterminer si *GPR65* est le gène causal de la région 14q31.

## 8.2. Rôle biologique de GPR65

Nos essais d'immunofluorescences, réalisés par surexpression d'une protéine de fusion Flag-GPR65 dans les cellules HEK293 ont permis de localiser GPR65 au niveau des régions périmoléculaire et cytoplasmique (Figure 8). Nous attendions une localisation essentiellement à la membrane cytoplasmique. Il se pourrait que la présence du Flag affecte la localisation de la protéine. Par contre, les publications analysant la localisation des RCPGs senseurs de pH utilisent toutes la surexpression de protéines de fusion, que ce soit avec la « *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) » ou l'épitope « Myc ». Ces études présentent parfois des profils d'expression cytoplasmique et membranaire (218-220). Le Flag n'affecte donc pas la localisation de GPR65. Nos analyses de localisation par fractionnement cellulaire ont confirmé que GPR65 est présent presque exclusivement dans la fraction membranaire (Figure 9).

Typiquement, les RCPGs sont amenés à la membrane cytoplasmique pour accomplir leurs fonctions (221). Suite à une stimulation par un agoniste, la grande majorité des RCPGs, liés à leur agoniste, sont internalisés dans les endosomes puis sont soit ciblés pour la dégradation par les lysosomes ou recyclés vers la membrane plasmique. Des études indiquent que les RCPGs peuvent continuer de transduire les signaux nécessaires à la production de l'AMPc suite à leur internalisation dans les endosomes (222, 223). Ces découvertes sont assez récentes mais il semble que l'activation des protéines G, au niveau des endosomes, permet une régulation temporelle et spatiale du signal (224) et active des voies distinctes des récepteurs à

la membrane cytoplasmique (225). De plus en plus de RCPGs et leurs voies signalétiques respectives sont retrouvés au niveau des endomembranes, participant possiblement à la communication intracrine entre les organelles par des protéines G hétérotrimériques (226). Le nombre croissant de RCPGs localisés au niveau de la membrane nucléaire en est un autre exemple. Un large nombre de protéines de signalisation, normalement associées aux RCPGs à la surface cellulaire, ont été détectées dans le noyau ou à la membrane nucléaire telles que des protéines G hétérotrimériques, des adénylate cyclases, des phospholipases et plusieurs autres. De plus, Lan et al. ont observé que l'internalisation de GPR132, un RCPG senseur de pH, est inhibée transitoirement par un pH acide (227). Le récepteur est relocalisé à la surface cellulaire lorsque le pH passe de 8.5 à 6.5. Il est donc possible que GPR65 se retrouve dans des endosomes et soit relocalisé à la membrane plasmique lors d'une activation par un pH acide.

### 8.2.1. Voies de l'AMPc

L'un de rôle les plus étudiés de GPR65 est l'activation de la voie de l'adénylate cyclase (AC) et l'accumulation subséquente d'AMPc intracellulaire (126, 167, 200, 202-204, 220, 228). Nos résultats de surexpression de *GPR65* dans les HEK293 démontrent une production d'AMPc dépendante de l'activation de GPR65 par un pH acide (Figure 11, HEK293). Nos analyses illustrent aussi que la production d'AMPc dépendante de l'activation de GPR65 découle de l'activation de la voie  $G\alpha s/olf$  (Figure 11, HEK293 déficientes pour  $G\alpha s/olf$ ) et peu ou pas par la voie  $G\alpha q/11$  (Figure 11, HEK293 déficientes pour  $G\alpha q/11$ ). Il est maintenant connu que l'activation de l'AC n'est pas seulement due à l'activation de la voie  $G\alpha s$ . À ce jour, 10 isoformes d'AC sont connus : neuf isoformes transmembranaires et un isoforme soluble (229). Chacun de ces isoformes peut être activé soit par l'activation de la sous-unité  $G\alpha s$ , du complexe  $G\beta\gamma$  ou par une accumulation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Hors, l'activation de la sous-unité  $G\alpha q$  est le principal processus responsable de la mobilisation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Les membres de la famille  $G\alpha q$  activent les phospholipases  $C\beta$  qui hydrolysent la  $PIP_2$  en DAG et en  $IP_3$ , menant à l'activation de la protéine PKC et à la mobilisation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire, respectivement (230). D'ailleurs, l'équipe de Wang et al. (121) n'ont pas observé d'accumulation d'inositol phosphate totaux ( $IP$ ,  $IP_2$  et  $IP_3$ ) lors de

l'activation de GPR65 par un pH acide, ce qui appuie nos résultats que les voies  $G\alpha q/11$  ne sont pas activées par GPR65.

Finalement, nous n'avons noté aucune différence significative dans l'accumulation d'AMPc chez les cellules surexprimant de façon stable l'une ou l'autre des deux allèles de *GPR65* étudiées (Figure 11, HEK293). Le changement d'une isoleucine pour une leucine à la position 231 de la protéine GPR65 ne semble donc pas affecter la signalisation de GPR65 menant à la production d'AMPc.

### **8.2.2. Voies du cytosquelette d'actine**

Le groupe de Ishii et al. ont établi que l'activation par un pH acide de GPR65 surexprimée dans des cellules CHO entraîne la formation de fibres de stress via l'activation de la voie RhoA (126). Nous avons aussi observé une polymérisation de l'actine dépendante de l'activation de GPR65 par un pH acide (Figures 14f et 14h), un processus affecté lorsque le variant *GPR65\*231L* est utilisé (Figures 14j et 14l). Nous avons donc comparé les ratios de F-actine/G-actine dans ces cellules et confirmé l'inhibition de la polymérisation de l'actine chez le variant *GPR65\*231L* (Figure 15). L'actine est importante dans de nombreux processus biologiques dont plusieurs ont été impliqués dans le MII. En combinant les données d'expression de *GPR65* obtenues pour chaque type cellulaire (Figure 5) avec les fonctions biologiques qui reposent, du moins en partie, sur le cytosquelette d'actine et qui sont altérées dans les MII, on constate que GPR65 pourrait jouer un rôle chez les neutrophiles, les macrophages et les cellules tueuses naturelles. Plus spécifiquement, la chimiotaxie, l'apoptose, le processus de phagocytose et la dégranulation pourraient être altérés puisqu'ils sont dépendants de la réorganisation de l'actine et sont influencés par le pH extracellulaire.

#### Les neutrophiles

Le groupe de Cao et al. ont démontré qu'une acidification extracellulaire inhibe la production de superoxide, augmente la polarisation induite par la chimiokine N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine (fMLP) et l'endocytose mais diminue les capacités de détruire les bactéries par des neutrophiles humains de sang périphérique et retarde leur apoptose (168).

Lorsqu'activés, les neutrophiles vont d'abord migrer vers le site d'infection par un gradient de chimiokines, détruire les pathogènes et cellules anormales par un stress oxydatif (« *respiratory burst* ») et par la phagocytose et finalement mobiliser leurs granules et relâcher des médiateurs inflammatoires (231). Les chimiokines interagissent avec des RCPGs à la surface et cause la réorganisation de la F-actine pour la formation de lamellipodes, signes de polarisation (231). Différentes RhoGTPases, Rac1 et RhoA, créent les formations d'actine nécessaires à ce processus (231). Les neutrophiles en milieu acide sont plus sensibles à la chimiokine fMLP, se polarisent et forment plus de plis (« *ruffles* »), signes de migration cellulaire (168). Ce qui place le pH, et possiblement GPR65, au cœur des processus de polarisation et de chimiotaxie. L'hypothèse n'est pas que les protons agissent en chimiokines, mais plutôt qu'ils altèrent positivement ces fonctions chez les neutrophiles par la réorganisation de l'actine.

L'apoptose des neutrophiles et leur élimination subséquente par les autres phagocytes sont des étapes importantes dans la résolution de l'inflammation (232). L'apoptose des neutrophiles est aussi altérée par le pH. Le groupe de Xu et al. ont observé que l'inhibition de la polymérisation de l'actine par un traitement à la latrunculine, qui séquestre la G-actine et prévient l'assemblage de la F-actine, aggrave la désactivation de la protéine Akt, une protéine importante pour la survie des neutrophiles, et accélère la mort spontanée des neutrophiles (233). Cao et al. ont d'ailleurs observé plus de F-actine dans les neutrophiles activés par un pH 6.0, comparativement au pH 7.4, et une augmentation de la phosphorylation de Akt (168). Il est connu que la durée de vie des neutrophiles est augmentée lors d'inflammation, tel que chez les patients MIIs. C'est un processus probablement nécessaire afin d'éradiquer toute infiltration bactérienne au niveau des tissus. Chez les patients MIIs, on note une accumulation de neutrophiles dans les tissus inflammés (234). Cette accumulation nuit aux phagocytes qui n'ont plus la capacité de les détruire. Hors, le variant 231L, en bloquant ce processus par l'inhibition de la polymérisation de l'actine, pourrait contribuer à l'accumulation de neutrophiles apoptotiques. Les neutrophiles apoptotiques n'ayant pas été éliminés entrent en nécrose et libèrent leur contenu cytotolytique ce qui participe aux dommages. L'élimination des neutrophiles apoptotiques est donc importante pour le retour à l'homéostasie. Chez les patients MIIs, en plus d'une possible apoptose prématurée des neutrophiles, une autre hypothèse

pouvant causer cette accumulation de neutrophiles apoptotiques est une défaillance de la fonction des macrophages (75).

### Les macrophages

Chez les patients MIIs, de plus grands nombres de macrophages sont observés dans les muqueuses. Ils expriment de plus grande quantité de molécules co-stimulatrices et produisent plus de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, l'IL-23 et du TNF (235). Par contre, leur habileté à détruire les microbes invasifs par la phagocytose et la production d'espèces réactives de l'oxygène est altérée (236). Les macrophages phagocytent les cellules apoptotiques par la reconnaissance de la phosphatidylsérine (PS) à la surface de ces cellules, ce qui enclenche la production de cytokines anti-inflammatoires par les macrophages (237). La diminution du pH extracellulaire induit l'expression de la stabilin-1 par les macrophages et par le fait même augmente leur capacité phagocytaire. La stabilin-1, exprimée par les cellules responsables de la destruction des cellules anormales, est un récepteur de PS permettant la phagocytose par les macrophages de cellules apoptotiques ou âgées. La polymérisation de l'actine est essentielle dans le processus de phagocytose puisque le traitement par la latrunculine inhibe ce processus (238). Le processus de phagocytose se fait en deux étapes (239). D'abord, il y a l'extension rapide des pseudopodes assuré par la polymérisation de l'actine. Ce mécanisme pousse la membrane cytoplasmique vers la cible. Par la suite, lorsque la membrane atteint sa limite d'extension, une tension se crée. Le groupe de Masters et al. propose que cette tension active les voies subséquentes pour l'internalisation de la cible telles que l'exocytose de vésicules, processus qui semble aussi dépendant de la réorganisation de l'actine. Cela augmente l'aire des membranes et permet l'internalisation de plus grosse cibles, telles que des cellules apoptotiques (240). L'inhibition de la polymérisation de l'actine par le variant *231L* pourrait donc inhiber la phagocytose par les macrophages de microbes mais aussi de neutrophiles apoptotiques, contribuant à l'établissement d'une inflammation chronique et à des dommages tissulaires.

### Les cellules tueuses naturelles (TNs)

L'accumulation de F-actine à la synapse immune est la première étape dans la réorganisation du cytosquelette. Elle est critique dans les étapes subséquentes, assurant le bon

fonctionnement de la synapse (241-243). En altérant par différentes drogues les dynamiques de polymérisation ou de dépolymérisation de l'actine, on note une inhibition de la cytotoxicité des cellules TNs (244). La formation d'une synapse immunologique et la polarisation des granules cytolytiques vers les cellules cibles sont essentielles dans la fonction des cellules TNs. Ce n'est qu'après la polarisation que les granules traversent la synapse en se frayant un chemin à travers le réseau d'actine et peuvent déverser leur contenu toxique. L'intégrité du réseau d'actine est essentielle pour la persistance de la fonction cytolytique des cellules TNs (245). Une acidification du pH extracellulaire au niveau des tumeurs est responsable de la diminution de l'activité cytotoxique des cellules TNs. Par contre, cette même acidification augmente l'activité cytotoxique lors d'une réponse contre les cellules fongiques *Cryptococcus* (172). Plusieurs raisons peuvent expliquer ces différences. Toutefois, on note que l'acidification du milieu contribue à moduler la réponse des TNs et que cette réponse dépend du réseau d'actine. Le rôle des cellules TNs dans la pathologie des MIIs est très peu compris (246). Par contre, il semble clair qu'un blocage de la formation de F-actine pourrait grandement altérer leurs fonctions en limitant leur capacité cytotoxique, ce qui aurait comme impact de maintenir des bactéries infiltrées et des cellules immunitaires au site de l'inflammation.

Les neutrophiles, en plus des cellules TNs, ont aussi des fonctions importantes lors d'une réponse immune par l'exocytose de granules cytotoxiques préformées. Les étapes de l'exocytose sont dépendantes de l'adhésion à la cellule cible et de l'activation de récepteurs immuns. Elles impliquent la translocation des granules vers la membrane de la cible, un processus dépendant du remodelage de l'actine (231).

Parmi les autres types cellulaires impliqués dans la pathologie des MIIs, on retrouve les cellules B et T. Elles ont toutes deux des fonctions dépendantes du remodelage de l'actine. L'impact d'une acidification du milieu extracellulaire sur ces fonctions n'a pas été testé. Il est connu que la dépolymérisation du cytosquelette d'actine par des traitements à la latrunculine augmente la mobilité latérale des RCBs. Cela mène au rassemblement, lent mais spontané, de ces récepteurs et à l'induction des voies d'activation des cellules B, et ce même en absence d'antigène (247-249). Contrairement aux cellules B, la polymérisation de l'actine semble nécessaire au rassemblement des RCTs. Par contre, la stabilité de ces rassemblements et des

interactions entre les RCTs des cellules T et les CMH présentant des antigènes sur les CPAs est indépendante de la F-actine (250). Il apparaît donc que l'inhibition de la polymérisation de l'actine, par exemple par le traitement à la latrunculine, prévient la formation de ces agrégats de récepteurs (251). Cela inhibe par le fait même l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices et des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (252). En supposant que ces voies soient sensibles au pH, l'absence de polymérisation d'actine causée par le variant codant de GPR65 pourrait affecter l'activation des cellules T. Cela pourrait avoir comme effet de diminuer l'efficacité de leurs réponses et donc participer à l'établissement d'une inflammation chronique. Nous avons noté une induction de l'expression de GPR65 suivant le traitement des cellules Jurkat avec le mélange PMA/ionomycine. C'est un traitement qui vise à simuler leur activation. Ce résultat semble indiquer que GPR65, et donc la capacité de sentir le pH, est important dans la fonction des lymphocytes T activés puisque ces cellules en induisent l'expression.

Finalement, des résultats préliminaires indiquent que l'induction de fibres de stress suivant une stimulation par le pH passe, au moins en partie, par la voie G $\alpha$ 12/13 (Figure 16t) et peu ou pas par les voies G $\alpha$ s/olf (Figure 16r) et G $\alpha$ q/11 (Figure 16h). Les sous-unités G $\alpha$ 12/13 sont impliqués dans l'activation des Rho-GTPases (130, 132) mais il est maintenant connu que G $\alpha$ q et G $\beta$  $\gamma$  peuvent aussi se lier à certains RhoGEFs, contrôlant l'organisation d'actine, la morphologie cellulaire, la polarité et le mouvement en plus des interactions cellules-cellules et cellules-matrices (131, 133). Il est intéressant de constater qu'un autre gène associé aux MIIs, *GNAI2*, code pour la sous-unité G $\alpha$ 12 (79). *GNAI2* est identifié comme l'un des deux gènes candidats, avec *CARD11*, dans le locus 7p22, un locus associé à la colite ulcéreuse (rs798502, p=6.09x10<sup>-17</sup>) (96). Le variant causal et le gène causal de cette région ne sont toujours pas connus. Par contre, des études fonctionnelles d'inactivation de G $\alpha$ 12 et G $\alpha$ 13 suggèrent que ces protéines contribuent à causer une dérégulation des fonctions de l'immunité adaptative (130, 253-256) en plus de jouer un rôle dans la barrière épithéliale. Plus d'études seront nécessaires afin de déterminer les gènes causaux des régions 14q31 et 7p22 et l'effet de leurs variants. En revanche, la polymérisation de l'actine dépendante de l'activation de GPR65\*1231, et altérée par GPR65\*231L, passe, au moins en partie, par les voies G $\alpha$ 12/13. Il semble donc que les gènes *GPR65* et *GNAI2* pourraient être au centre de voies biologiques impliquées dans la pathologie.

### 8.3. Fonctions de GPR65 dans le cadre de la pathologie des MIIs.

Toutes les données présentées proviennent d'expériences réalisées dans les cellules HEK293, des cellules épithéliales. Hors, les données d'expression démontrent que *GPR65* est exprimé essentiellement dans les cellules immunitaires bien plus que dans les cellules épithéliales (Figures 5). Seules les biopsies provenant de tissus inflammés présentent une augmentation de *GPR65* et nous avons émis l'hypothèse que cette augmentation serait causée par le recrutement actif de cellules immunitaires au site de l'inflammation (Figure 6). L'utilisation de modèles plus pertinents tels que des lignées cellulaires immunitaires ou des cellules primaires immunes seraient donc très intéressante pour l'étude des fonctions de *GPR65* et des effets de son allèle mineur. Ces modèles nous permettraient d'étudier les mécanismes propres aux cellules immunitaires qui dépendent à la fois du pH et du réseau d'actine. Plusieurs fonctions associées aux MIIs et accomplies par ces cellules peuvent être affectées par des altérations à la polymérisation de l'actine.

Il est peu probable que *GPR65* puisse expliquer, à lui seul, l'étiologie des MIIs, des maladies complexes, même si la proportion d'individus homozygotes pour son allèle mineur *231L* est relativement grande dans la population. Il est possible de considérer que *GNAI2* et ses variants pourraient aussi avoir un impact important sur le cytosquelette d'actine, par exemple sur des fonctions comme l'autophagie, la phagocytose, la migration cellulaire, l'activation des lymphocytes et la dégranulation, qui sont aussi dépendantes de l'actine. Plusieurs autres gènes se trouvant dans les régions de susceptibilité mais dont la fonction est encore inconnue pourraient s'ajouter à *GNAI2* et *GPR65* dans les voies menant à la régulation du cytosquelette d'actine. Il semble donc que le cytosquelette d'actine est en voie de devenir un point de mire dans l'étude des maladies inflammatoires de l'intestin. D'ailleurs, le processus d'autophagie est modulé par une acidification du pH extracellulaire (257, 258) en plus de nécessiter le remodelage du cytosquelette (154, 155). L'autophagie a été associée à la maladie de Crohn (161). Les études d'association pan-génomiques ont associé les gènes *ATG16L1*, *NOD2* et *IRGM* à la maladie de Crohn. Des mutations dans ces gènes sont liées à des dysfonctions de l'autophagie telles que: le mauvais transport des bactéries, la mauvaise présentation des bactéries aux cellules immunitaires et l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (33).

En conclusion, la région 14q31 contient deux gènes candidats. On ne peut exclure un rôle de *GALC* dans la pathologie des maladies inflammatoires de l'intestin. Toutefois, nos résultats permettent d'affirmer que *GPR65* et son variant codant participent aux processus menant au développement des maladies inflammatoires de l'intestin et sont donc les plus probables d'être impliqués.

## Bibliographie

1. (NDDIC) NDDIC. The Digestive System and How It Works  
<http://www.niddk.nih.gov/>: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK); 2013.
2. Mills JC, Stappenbeck TS, Bunnett N. Gastrointestinal Disease. In: J. MS, D. HG, editors. Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine. 6e. Sixth Edition ed2010.
3. Rao J, Wang J. Intestinal Architecture and Development. 2010. In: Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth [Internet]. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences.
4. Dawes C, Pedersen AM, Villa A, Ekstrom J, Proctor GB, Vissink A, et al. The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. Arch Oral Biol. 2015;60(6):863-74.
5. Lamb PJ, Griffin SM, Daniels IR, Allum WH, Gourevitch D. Upper Gastrointestinal Surgery. Lumley J, editor: Springer; 2005. 395 p.
6. Atenodoro R. Ruiz J, MD. Biology of the Digestive System  
<http://www.merckmanuals.com/home/digestive-disorders/biology-of-the-digestive-system/overview-of-the-digestive-system>: Merck & co; 2015 [cited 2015].
7. Corazziari ES. Intestinal Mucus Barrier in Normal and Inflamed Colon. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 2009;48 (Suppl 2):S54–S5.
8. Nugent SG, Kumar D, Rampton DS, Evans DF. Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosalicylates and other drugs. Gut. 2001;48(4):571-7.
9. Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ. Immunopathology of inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2014;20(1):6-21.

10. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(3):141-53.
11. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(11):799-809.
12. Min YW, Rhee PL. The Role of Microbiota on the Gut Immunology. *Clinical therapeutics.* 2015;37(5):968-75.
13. Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(5):1165-79.
14. Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell.* 2013;154(2):274-84.
15. Ermund A, Gustafsson JK, Hansson GC, Keita AV. Mucus properties and goblet cell quantification in mouse, rat and human ileal Peyer's patches. *PloS one.* 2013;8(12):e83688.
16. Tuma PL, Hubbard AL. Transcytosis: Crossing Cellular Barriers. *Physiological Reviews* 2003;83(3):871-932.
17. McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, Wang B, Konjufca V, Knoop KA, et al. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature.* 2012;483(7389):345-9.
18. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev.* 2014;13(1):3-10.
19. Rodriguez-Boulan E, Macara IG. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(4):225-42.
20. Broussard JA, Getsios S, Green KJ. Desmosome regulation and signaling in disease. *Cell and tissue research.* 2015;360(3):501-12.

21. Shirazi T, Longman R, Corfield A, Probert C. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J*. 2000;76(898):473–8.
22. Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schütte A, et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological Reviews* 2014;260:8-20.
23. de Mattos BR, Garcia MP, Nogueira JB, Paiatto LN, Albuquerque CG, Souza CL, et al. Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:493012.
24. Jung C, Hugot JP, Barreau F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *Int J Inflamm*. 2010;2010:823710.
25. Arpaia N, Rudensky AY. Microbial metabolites control gut inflammatory responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(6):2058-9.
26. Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:168.
27. Palm NW, de Zoete MR, Flavell RA. Immune-microbiota interactions in health and disease. *Clinical immunology*. 2015.
28. Kabat AM, Srinivasan N, Maloy KJ. Modulation of immune development and function by intestinal microbiota. *Trends Immunol*. 2014;35(11):507-17.
29. Taylor BC, Zaph C, Troy AE, Du Y, Guild KJ, Comeau MR, et al. TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J Exp Med*. 2009;206(3):655-67.
30. Freeman SA, Grinstein S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunological Reviews*. 2014;262(1):193-215.

31. Rougerie P, Miskolci V, Cox D. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton. *Immunol Rev.* 2013;256(1):222-39.
32. Groves E, Dart AE, Covarelli V, Caron E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(13):1957-76.
33. Flannigan KL, Geem D, Harusato A, Denning TL. Intestinal Antigen-Presenting Cells: Key Regulators of Immune Homeostasis and Inflammation. *Am J Pathol.* 2015;185(7):1809-19.
34. Mann ER, Landy JD, Bernardo D, Peake ST, Hart AL, Al-Hassi HO, et al. Intestinal dendritic cells: their role in intestinal inflammation, manipulation by the gut microbiota and differences between mice and men. *Immunol Lett.* 2013;150(1-2):30-40.
35. Farache J, Zigmond E, Shakhar G, Jung S. Contributions of dendritic cells and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense. *Immunol Cell Biol.* 2013;91(3):232-9.
36. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology.* 2013;140(1):22-30.
37. Naik SH, Sathe P, Park HY, Metcalf D, Proietto AI, Dakic A, et al. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol.* 2007;8(11):1217-26.
38. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:563-604.
39. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Kozarov E, Sobenin IA, Orekhov AN. Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance. *Front Microbiol.* 2014;5:781.

40. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:163-83.
41. Kamada N, Nunez G. Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. *Gastroenterology.* 2014;146(6):1477-88.
42. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49(9):1618-31.
43. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181-218.
44. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159-75.
45. Yoon SR, Kim TD, Choi I. Understanding of molecular mechanisms in natural killer cell therapy. *Exp Mol Med.* 2015;47:e141.
46. Chen Q, Ye W, Jian Tan W, Mei Yong KS, Liu M, Qi Tan S, et al. Delineation of Natural Killer Cell Differentiation from Myeloid Progenitors in Human. *Sci Rep.* 2015;5:15118.
47. Horowitz A, Stegmann KA, Riley EM. Activation of natural killer cells during microbial infections. *Frontiers in immunology.* 2011;2:88.
48. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9):713-25.
49. Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(7):520-31.
50. Brown EM, Sadarangani M, Finlay BB. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat Immunol.* 2013;14(7):660-7.

51. Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(2):127-35.
52. Alarcón B, van Santen HM. Two receptors, two kinases, and T cell lineage determination. *Sci Signal* 2010;3(114):pe11.
53. Takada K, Jameson SC. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(12):823-32.
54. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A.* 2014;85(1):36-42.
55. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490-500.
56. Jain N, Walker WA. Diet and host-microbial crosstalk in postnatal intestinal immune homeostasis. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology.* 2015;12(1):14-25.
57. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol.* 2011;12(5):383-90.
58. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89.
59. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol.* 2011;29:621-63.
60. Kumamoto Y, Mattei LM, Sellers S, Payne GW, Iwasaki A. CD4<sup>+</sup> T cells support cytotoxic T lymphocyte priming by controlling lymph node input. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108(21):8749-54.
61. Weninger W, Manjunath N, von Andrian UH. Migration and differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunol Rev.* 2002; 186:221-33.

62. Sinai P, Nguyen C, Schatzle JD, Wülfing C. Transience in polarization of cytolytic effectors is required for efficient killing and controlled by Cdc42. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(26):11912-7.
63. Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol*. 2007;7(8):633-43.
64. Mann ER, Li X. Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells. *World J Gastroenterol*. 2014;20(29):9653-64.
65. Lin M, Du L, Brandtzaeg P, Pan-Hammarstrom Q. IgA subclass switch recombination in human mucosal and systemic immune compartments. *Mucosal Immunol*. 2014;7(3):511-20.
66. Simell B, Kilpi T, Kayhty H. Subclass distribution of natural salivary IgA antibodies against pneumococcal capsular polysaccharide of type 14 and pneumococcal surface adhesin A (PsaA) in children. *Clin Exp Immunol*. 2006;143(3):543-9.
67. Suzuki K, Fagarasan S. Diverse regulatory pathways for IgA synthesis in the gut. *Mucosal Immunol*. 2009;2(6):468-71.
68. Corthesy B. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Frontiers in immunology*. 2013;4:185.
69. Yuseff MI, Pierobon P, Reversat A, Lennon-Dumenil AM. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(7):475-86.
70. Owyang C, Wu GD. The gut microbiome in health and disease. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1433-6.
71. Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(4):279-90.
72. . !!! INVALID CITATION !!! {Owyang, 2014 #258}.

73. Ursell LK, Haiser HJ, Van Treuren W, Garg N, Reddivari L, Vanamala J, et al. The intestinal metabolome: an intersection between microbiota and host. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1470-6.
74. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. 2006;7(7):688-93.
75. Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*. 2012;5(4):354-66.
76. Mumy KL, McCormick BA. The role of neutrophils in the event of intestinal inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(6):697-701.
77. Molloy MJ, Grainger JR, Bouladoux N, Hand TW, Koo LY, Naik S, et al. Intraluminal containment of commensal outgrowth in the gut during infection-induced dysbiosis. *Cell Host Microbe*. 2013;14(3):318-28.
78. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1489-99.
79. *Molecular Genetics of Inflammatory Bowel Disease*. New York: Springer Science+Business Media; 2013. 339 p.
80. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504-17.
81. Rocchi A, Benchimol EI, Bernstein CN, Bitton A, Feagan B, Panaccione R, et al. Inflammatory bowel disease: a Canadian burden of illness review. *Can J Gastroenterol* 2012;26(11):811-7.
82. Ponder A, Long MD. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clin Epidemiol*. 2013;5:237-47.
83. M'Koma AE. Inflammatory bowel disease: an expanding global health problem. *Clin Med Insights Gastroenterol*. 2013;6:33-47.

84. (CFFA) TCsCFoA. Diagnosing and Managing IBD  
<http://www.ccfa.org/resources/diagnosing-and-managing-ibd.html>,  
<http://www.ccfa.org/frequently-asked-ibd.pdf2013>.
85. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(5):329-42.
86. Shanahan F, Quigley EM. Manipulation of the microbiota for treatment of IBS and IBD-challenges and controversies. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1554-63.
87. Anderson JL, Edney RJ, Whelan K. Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;36(6):503-16.
88. Reenaers C, Louis E, J. B. Current directions of biologic therapies in inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol* 2010;3(2):99-106.
89. Beniwal-Patel P, Saha S. The role of integrin antagonists in the treatment of inflammatory bowel disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2014;14(12):1815-23.
90. Lin L, Liu X, Wang D, Zheng C. Efficacy and safety of antiintegrin antibody for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(10):e556.
91. Gerlach K, Hwang Y, Nikolaev A, Atreya R, Dornhoff H, Steiner S, et al. TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nat Immunol*. 2014;15(7):676-86.
92. Hufford MM, Kaplan MH. A gut reaction to IL-9. *Nat Immunol*. 2014;15(7):599-600.
93. Quiniou C, Dominguez-Punaro M, Cloutier F, Erfani A, Ennaciri J, Sivanesan D, et al. Specific targeting of the IL-23 receptor, using a novel small peptide noncompetitive antagonist, decreases the inflammatory response. *American journal*

of physiology *Regulatory, integrative and comparative physiology*.  
2014;307(10):R1216-30.

94. Chognard G, Bellemare L, Pelletier AN, Dominguez-Punaro MC, Beauchamp C, Guyon MJ, et al. The dichotomous pattern of IL-12r and IL-23R expression elucidates the role of IL-12 and IL-23 in inflammation. *PloS one*. 2014;9(2):e89092.
95. Glas J, Seiderer J, Wagner J, Olszak T, Fries C, Tillack C, et al. Analysis of IL12B gene variants in inflammatory bowel disease. *PloS one*. 2012;7(3):e34349.
96. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012;491(7422):119-24.
97. Jager S, Stange EF, Wehkamp J. Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbecks Arch Surg*. 2013;398(1):1-12.
98. Hering NA, Fromm M, Schulzke JD. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J Physiol*. 2012;590(Pt 5):1035-44.
99. Laukoetter M-G. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14(3):401.
100. Lee SH. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest Res*. 2015;13(1):11-8.
101. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(4):232-41.
102. Bain CC, Scott CL, Uronen-Hansson H, Gudjonsson S, Jansson O, Grip O, et al. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol*. 2013;6(3):498-510.

103. What are single nucleotide polymorphisms (SNPs)?  
<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/genomicresearch/snp>: U.S. National Library of Medicine; 2015.
104. Nunes T, Fiorino G, Danese S, Sans M. Familial aggregation in inflammatory bowel disease: is it genes or environment? *World J Gastroenterol.* 2011;17(22):2715-22.
105. Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet.* 2015;47(9):979-86.
106. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2011;474(7351):307-17.
107. Knights D, Lassen KG, Xavier RJ. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut.* 2013;62(10):1505-10.
108. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. *The Lancet.* 2005;366(9491):1121-31.
109. Stranger BE, Stahl EA, Raj T. Progress and promise of genome-wide association studies for human complex trait genetics. *Genetics.* 2011;187(2):367-83.
110. Weiss KM, Clark AG. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. *Trends Genet* 2002;18(1):19-24.
111. Tappino B, Biancheri R, Mort M, Regis S, Corsolini F, Rossi A, et al. Identification and characterization of 15 novel GALC gene mutations causing Krabbe disease. *Hum Mutat.* 2010;31(12):E1894-914.
112. Graziano AC, Cardile V. History, genetic, and recent advances on Krabbe disease. *Gene.* 2015;555(1):2-13.
113. Im DS, Heise CE, Nguyen T, O'Dowd BF, Lynch KR. Identification of a molecular target of psychosine and its role in globoid cell formation. *J Cell Biol.* 2001;153(2):429-34.

114. Kanazawa T, Nakamura S, Momoi M, Yamaji T, Takematsu H, Yano H, et al. Inhibition of cytokinesis by a lipid metabolite, psychosine. *J Cell Biol* 2000;149(4):943-50.
115. Choi JW, Lee SY, Choi Y. Identification of a putative G protein-coupled receptor induced during activation-induced apoptosis of T cells. *Cell Immunol*. 1996;168(1):78-84.
116. Tosa N, Murakami M, Jia WY, Yokoyama M, Masunaga T, Iwabuchi C, et al. Critical function of T cell death-associated gene 8 in glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. *Int Immunol*. 2003;15(6):741-9.
117. Malone MH, Wang Z, Distelhorst CW. The glucocorticoid-induced gene tdag8 encodes a pro-apoptotic G protein-coupled receptor whose activation promotes glucocorticoid-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(51):52850-9.
118. Li Z, Dong L, Dean E, Yang LV. Acidosis decreases c-Myc oncogene expression in human lymphoma cells: a role for the proton-sensing G protein-coupled receptor TDAG8. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(10):20236-55.
119. Radu CG, Cheng D, Nijagal A, Riedinger M, McLaughlin J, Yang LV, et al. Normal immune development and glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in mice deficient for the T-cell death-associated gene 8 receptor. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(2):668-77.
120. Murakami N, Yokomizo T, Okuno T, Shimizu T. G2A is a proton-sensing G-protein-coupled receptor antagonized by lysophosphatidylcholine. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(41):42484-91.
121. Wang JQ, Kon J, Mogi C, Tobo M, Damirin A, Sato K, et al. TDAG8 is a proton-sensing and psychosine-sensitive G-protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(44):45626-33.

122. Im DS. Two ligands for a GPCR, proton vs lysolipid. *Acta pharmacologica Sinica*. 2005;26(12):1435-41.
123. Tomura H, Mogi C, Sato K, Okajima F. Proton-sensing and lysolipid-sensitive G-protein-coupled receptors: a novel type of multi-functional receptors. *Cellular signalling*. 2005;17(12):1466-76.
124. Seuwen K, Ludwig MG, Wolf RM. Receptors for protons or lipid messengers or both? *Journal of receptor and signal transduction research*. 2006;26(5-6):599-610.
125. Ahn SH, Lee SY, Baek JE, Lee SY, Park SY, Lee YS, et al. Psychosine inhibits osteoclastogenesis and bone resorption via G protein-coupled receptor 65. *Journal of endocrinological investigation*. 2015.
126. Ishii S, Kihara Y, Shimizu T. Identification of T cell death-associated gene 8 (TDAG8) as a novel acid sensing G-protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(10):9083-7.
127. Hawkins-Salsbury JA, Parameswar AR, Jiang X, Schlesinger PH, Bongarzone E, Ory DS, et al. Psychosine, the cytotoxic sphingolipid that accumulates in globoid cell leukodystrophy, alters membrane architecture. *J Lipid Res*. 2013;54(12):3303-11.
128. Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2009;459(7245):356-63.
129. Duc NM, Kim HR, Chung KY. Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *Eur J Pharmacol*. 2015;763(Pt B):214-22.
130. Boullaran C, Kehrl JH. Implications of non-canonical G-protein signaling for the immune system. *Cellular signalling*. 2014;26(6):1269-82.
131. Khan SM, Sleno R, Gora S, Zylbergold P, Laverdure JP, Labbe JC, et al. The expanding roles of Gbetagamma subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacol Rev*. 2013;65(2):545-77.

132. Kozasa T, Hajicek N, Chow CR, Suzuki N. Signalling mechanisms of RhoGTPase regulation by the heterotrimeric G proteins G12 and G13. *J Biochem.* 2011;150(4):357-69.
133. Yu OM, Brown JH. G Protein-Coupled Receptor and RhoA-Stimulated Transcriptional Responses: Links to Inflammation, Differentiation, and Cell Proliferation. *Mol Pharmacol.* 2015;88(1):171-80.
134. Kimple AJ, Bosch DE, Giguere PM, Siderovski DP. Regulators of G-protein signaling and their Galpha substrates: promises and challenges in their use as drug discovery targets. *Pharmacol Rev.* 2011;63(3):728-49.
135. Baltoumas FA, Theodoropoulou MC, Hamodrakas SJ. Interactions of the alpha-subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: a critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *J Struct Biol.* 2013;182(3):209-18.
136. Wittinghofer A, Vetter IR. Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annu Rev Biochem.* 2011;80:943-71.
137. Cromm PM, Spiegel J, Grossmann TN, Waldmann H. Direct Modulation of Small GTPase Activity and Function. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2015;54(46):13516-37.
138. Gerlo S, Kooijman R, Beck IM, Kolmus K, Spooren A, Haegeman G. Cyclic AMP: a selective modulator of NF-kappaB action. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(23):3823-41.
139. Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The role of the transcription factor CREB in immune function. *Journal of immunology.* 2010;185(11):6413-9.
140. Sands WA, Palmer TM. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cellular signalling.* 2008;20(3):460-6.
141. Bryn T, Mahic M, Enserink JM, Schwede F, Aandahl EM, Tasken K. The cyclic AMP-Epac1-Rap1 pathway is dissociated from regulation of effector functions in

- monocytes but acquires immunoregulatory function in mature macrophages. *Journal of immunology*. 2006;176(12):7361-70.
142. Mosenden R, Tasken K. Cyclic AMP-mediated immune regulation--overview of mechanisms of action in T cells. *Cellular signalling*. 2011;23(6):1009-16.
  143. Li X, Murray F, Koide N, Goldstone J, Dann SM, Chen J, et al. Divergent requirement for Galphas and cAMP in the differentiation and inflammatory profile of distinct mouse Th subsets. *J Clin Invest*. 2012;122(3):963-73.
  144. Yao C, Sakata D, Esaki Y, Li Y, Matsuoka T, Kuroiwa K, et al. Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med*. 2009;15(6):633-40.
  145. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *Journal of immunology*. 2012;188(1):21-8.
  146. Oda T, Iwasa M, Aihara T, Maeda Y, Narita A. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature*. 2009;457(7228):441-5.
  147. Jaqaman K, Grinstein S. Regulation from within: the cytoskeleton in transmembrane signaling. *Trends Cell Biol*. 2012;22(10):515-26.
  148. Dustin ML, Cooper JA. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* 2000;1(1):23-9.
  149. Dinic J, Riehl A, Adler J, Parmryd I. The T cell receptor resides in ordered plasma membrane nanodomains that aggregate upon patching of the receptor. *Sci Rep*. 2015;5:10082.
  150. Freeman SA, Jaumouille V, Choi K, Hsu BE, Wong HS, Abraham L, et al. Toll-like receptor ligands sensitize B-cell receptor signalling by reducing actin-dependent spatial confinement of the receptor. *Nat Commun*. 2015;6:6168.
  151. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(8):603-12.

152. Mooren OL, Galletta BJ, Cooper JA. Roles for actin assembly in endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:661-86.
153. Jaumouille V, Grinstein S. Receptor mobility, the cytoskeleton, and particle binding during phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2011;23(1):22-9.
154. Mostowy S. Multiple roles of the cytoskeleton in bacterial autophagy. *PLoS Pathog.* 2014;10(11):e1004409.
155. Aguilera MO, Beron W, Colombo MI. The actin cytoskeleton participates in the early events of autophagosome formation upon starvation induced autophagy. *Autophagy.* 2012;8(11):1590-603.
156. Kutsuna H, Suzuki K, Kamata N, Kato T, Hato F, Mizuno K, et al. Actin reorganization and morphological changes in human neutrophils stimulated by TNF, GM-CSF, and G-CSF: the role of MAP kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286(1):C55-64.
157. Servant G, Weiner OD, Herzmark P, Balla T, Sedat JW, Bourne HR. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science.* 2000;287(5455):1037-40.
158. Mitchell T, Lo A, Logan MR, Lacy P, Eitzen G. Primary granule exocytosis in human neutrophils is regulated by Rac-dependent actin remodeling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;295(5):C1354-65.
159. Jog NR, Rane MJ, Lominadze G, Luerman GC, Ward RA, McLeish KR. The actin cytoskeleton regulates exocytosis of all neutrophil granule subsets. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(5):C1690-700.
160. Wolfkamp SC, Verseyden C, Vogels EW, Meisner S, Boonstra K, Peters CP, et al. ATG16L1 and NOD2 polymorphisms enhance phagocytosis in monocytes of Crohn's disease patients. *World J Gastroenterol.* 2014;20(10):2664-72.

161. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet.* 2007;39(5):596-604.
162. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology.* 2012;9(10):577-89.
163. Gennari FJ, Weise WJ. Acid-base disturbances in gastrointestinal disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(6):1861-8.
164. Barkas F, Liberopoulos E, Kei A, Elisaf M. Electrolyte and acid-base disorders in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol.* 2013;26(1):23-8.
165. Rajamaki K, Nordstrom T, Nurmi K, Akerman KE, Kovanen PT, Oorni K, et al. Extracellular acidosis is a novel danger signal alerting innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *The Journal of biological chemistry.* 2013;288(19):13410-9.
166. Lardner A. The effects of extracellular pH on immune function. *Journal of leukocyte biology.* 2001;69(4):522-30.
167. Mogi C, Tobo M, Tomura H, Murata N, He XD, Sato K, et al. Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of proinflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. *Journal of immunology.* 2009;182(5):3243-51.
168. Cao S, Liu P, Zhu H, Gong H, Yao J, Sun Y, et al. Extracellular Acidification Acts as a Key Modulator of Neutrophil Apoptosis and Functions. *PloS one.* 2015;10(9):e0137221.
169. Trevani AS, Andonegui G, Giordano M, Lopez DH, Gamberale R, Minucci F, et al. Extracellular acidification induces human neutrophil activation. *Journal of immunology.* 1999;162(8):4849-57.

170. Tong J, Wu WN, Kong X, Wu PF, Tian L, Du W, et al. Acid-sensing ion channels contribute to the effect of acidosis on the function of dendritic cells. *Journal of immunology*. 2011;186(6):3686-92.
171. Martinez D, Vermeulen M, von Euw E, Sabatte J, Maggini J, Ceballos A, et al. Extracellular Acidosis Triggers the Maturation of Human Dendritic Cells and the Production of IL-12. *The Journal of Immunology*. 2007;179(3):1950-9.
172. Islam A, Li SS, Oykman P, Timm-McCann M, Huston SM, Stack D, et al. An acidic microenvironment increases NK cell killing of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by enhancing perforin degranulation. *PLoS Pathog*. 2013;9(7):e1003439.
173. Jancic CC, Cabrini M, Gabelloni ML, Rodriguez Rodrigues C, Salamone G, Trevani AS, et al. Low extracellular pH stimulates the production of IL-1beta by human monocytes. *Cytokine*. 2012;57(2):258-68.
174. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood*. 2009;113(10):2324-35.
175. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *Journal of immunology*. 2009;183(2):787-91.
176. Li X, Zhang Y, Xia M, Gulbins E, Boini KM, Li PL. Activation of Nlrp3 inflammasomes enhances macrophage lipid-deposition and migration: implication of a novel role of inflammasome in atherogenesis. *PloS one*. 2014;9(1):e87552.
177. Riemann A, Wussling H, Loppnow H, Fu H, Reime S, Thews O. Acidosis differently modulates the inflammatory program in monocytes and macrophages. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1862(1):72-81.

178. Gerry AB, Leake DS. Effect of low extracellular pH on NF-kappaB activation in macrophages. *Atherosclerosis*. 2014;233(2):537-44.
179. Casey JR, Grinstein S, Orłowski J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(1):50-61.
180. Shi Y, Kim D, Caldwell M, Sun D. The role of Na(+)/h (+) exchanger isoform 1 in inflammatory responses: maintaining H(+) homeostasis of immune cells. *Adv Exp Med Biol*. 2013;961:411-8.
181. Okajima F. Regulation of inflammation by extracellular acidification and proton-sensing GPCRs. *Cellular signalling*. 2013;25(11):2263-71.
182. Justus CR, Dong L, Yang LV. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Front Physiol*. 2013;4:354.
183. Weng Z, Fluckiger AC, Nisitani S, Wahl MI, Le LQ, Hunter CA, et al. A DNA damage and stress inducible G protein-coupled receptor blocks cells in G2/M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(21):12334-9.
184. Zohn IE, Klinger M, Karp X, Kirk H, Symons M, Chrzanowska-Wodnicka M, et al. G2A is an oncogenic G protein-coupled receptor. *Oncogene*. 2000;19(34):3866-77.
185. Rikitake Y, Hirata K, Yamashita T, Iwai K, Kobayashi S, Itoh H, et al. Expression of G2A, a receptor for lysophosphatidylcholine, by macrophages in murine, rabbit, and human atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(12):2049-53.
186. Yang LV, Radu CG, Wang L, Riedinger M, Witte ON. Gi-independent macrophage chemotaxis to lysophosphatidylcholine via the immunoregulatory GPCR G2A. *Blood*. 2005;105(3):1127-34.
187. Xu Y, Casey G. Identification of human OGR1, a novel G protein-coupled receptor that maps to chromosome 14. *Genomics*. 1996;35(2):397-402.

188. Tomura H, Wang JQ, Komachi M, Damirin A, Mogi C, Tobo M, et al. Prostaglandin I(2) production and cAMP accumulation in response to acidic extracellular pH through OGR1 in human aortic smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(41):34458-64.
189. Yang M, Mailhot G, Birnbaum MJ, MacKay CA, Mason-Savas A, Odgren PR. Expression of and role for ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1) during osteoclastogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(33):23598-605.
190. Iwai K, Koike M, Ohshima S, Miyatake K, Uchiyama Y, Saeki Y, et al. RGS18 acts as a negative regulator of osteoclastogenesis by modulating the acid-sensing OGR1/NFAT signaling pathway. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2007;22(10):1612-20.
191. Li H, Wang D, Singh LS, Berk M, Tan H, Zhao Z, et al. Abnormalities in osteoclastogenesis and decreased tumorigenesis in mice deficient for ovarian cancer G protein-coupled receptor 1. *PloS one*. 2009;4(5):e5705.
192. Mogi C, Nakakura T, Okajima F. Role of extracellular proton-sensing OGR1 in regulation of insulin secretion and pancreatic beta-cell functions. *Endocrine journal*. 2014;61(2):101-10.
193. de Valliere C, Wang Y, Eloranta JJ, Vidal S, Clay I, Spalinger MR, et al. G Protein-coupled pH-sensing Receptor OGR1 Is a Regulator of Intestinal Inflammation. *Inflammatory bowel diseases*. 2015;21(6):1269-81.
194. Liu JP, Nakakura T, Tomura H, Tobo M, Mogi C, Wang JQ, et al. Each one of certain histidine residues in G-protein-coupled receptor GPR4 is critical for extracellular proton-induced stimulation of multiple G-protein-signaling pathways. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2010;61(6):499-505.

195. Wyder L, Suply T, Ricoux B, Billy E, Schnell C, Baumgarten BU, et al. Reduced pathological angiogenesis and tumor growth in mice lacking GPR4, a proton sensing receptor. *Angiogenesis*. 2011;14(4):533-44.
196. Sin WC, Zhang Y, Zhong W, Adhikarakunnathu S, Powers S, Hoey T, et al. G protein-coupled receptors GPR4 and TDAG8 are oncogenic and overexpressed in human cancers. *Oncogene*. 2004;23(37):6299-303.
197. Sun X, Yang LV, Tiegs BC, Arend LJ, McGraw DW, Penn RB, et al. Deletion of the pH sensor GPR4 decreases renal acid excretion. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(10):1745-55.
198. Sun X, Stephens L, DuBose TD, Jr., Petrovic S. Adaptation by the collecting duct to an exogenous acid load is blunted by deletion of the proton-sensing receptor GPR4. *American journal of physiology Renal physiology*. 2015:ajprenal 00507 2014.
199. Ryder C, McColl K, Zhong F, Distelhorst CW. Acidosis promotes Bcl-2 family-mediated evasion of apoptosis: involvement of acid-sensing G protein-coupled receptor Gpr65 signaling to Mek/Erk. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(33):27863-75.
200. Kottyan LC, Collier AR, Cao KH, Niese KA, Hedgebeth M, Radu CG, et al. Eosinophil viability is increased by acidic pH in a cAMP- and GPR65-dependent manner. *Blood*. 2009;114(13):2774-82.
201. Zhu X, Mose E, Hogan SP, Zimmermann N. Differential eosinophil and mast cell regulation: mast cell viability and accumulation in inflammatory tissue are independent of proton-sensing receptor GPR65. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;306(11):G974-82.
202. Onozawa Y, Fujita Y, Kuwabara H, Nagasaki M, Komai T, Oda T. Activation of T cell death-associated gene 8 regulates the cytokine production of T cells and macrophages in vitro. *Eur J Pharmacol*. 2012;683(1-3):325-31.

203. Murata N, Mogi C, Tobo M, Nakakura T, Sato K, Tomura H, et al. Inhibition of superoxide anion production by extracellular acidification in neutrophils. *Cell Immunol.* 2009;259(1):21-6.
204. Jin Y, Sato K, Tobo A, Mogi C, Tobo M, Murata N, et al. Inhibition of interleukin-1beta production by extracellular acidification through the TDAG8/cAMP pathway in mouse microglia. *J Neurochem.* 2014;129(4):683-95.
205. Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, et al. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature.* 2003;425(6953):93-8.
206. Devost D, Zingg HH. Homo- and hetero-dimeric complex formations of the human oxytocin receptor. *J Neuroendocrinol.* 2004 16(4):372-7.
207. Huang H, Fang M, Jostins L, Mirkov MU, Boucher G, Anderson CA, et al. Association mapping of inflammatory bowel disease loci to single variant resolution. *bioRxiv.* 2015.
208. Vogl S, Lutz RW, Schonfelder G, Lutz WK. CYP2C9 genotype vs. metabolic phenotype for individual drug dosing--a correlation analysis using flurbiprofen as probe drug. *PloS one.* 2015;10(3):e0120403.
209. Dean L. Warfarin Therapy and the Genotypes CYP2C9 and VKORC1. In: Bethesda, editor. *Medical Genetics Summaries: National Center for Biotechnology Information* 2013.
210. Ravindranathan A, Joslyn G, Robertson M, Schuckit MA, Whistler JL, White RL. Functional characterization of human variants of the mu-opioid receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;106(26):10811-6.
211. Cooke AE, Oldfield S, Krasel C, Mundell SJ, Henderson G, Kelly E. Morphine-induced internalization of the L83I mutant of the rat  $\mu$ -opioid receptor. *British journal of pharmacology.* 2015;172(2):593-605.

212. Giri S, Khan M, Rattan R, Singh I, Singh AK. Krabbe disease: psychosine-mediated activation of phospholipase A2 in oligodendrocyte cell death. *J Lipid Res.* 2006;47(7):1478-92.
213. Sewell GW, Hannun YA, Han X, Koster G, Bielawski J, Goss V, et al. Lipidomic profiling in Crohn's disease: abnormalities in phosphatidylinositols, with preservation of ceramide, phosphatidylcholine and phosphatidylserine composition. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(11):1839-46.
214. Maceyka M, Spiegel S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature.* 2014;510(7503):58-67.
215. Smeets RL, Fleuren WW, He X, Vink PM, Wijnands F, Gorecka M, et al. Molecular pathway profiling of T lymphocyte signal transduction pathways; Th1 and Th2 genomic fingerprints are defined by TCR and CD28-mediated signaling. *BMC Immunol.* 2012;13:12.
216. Almeida AC, Rehder J, Severino SD, Martins-Filho J, Newburger PE, Condino-Neto A. The effect of IFN-gamma and TNF-alpha on the NADPH oxidase system of human colostrum macrophages, blood monocytes, and THP-1 cells. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25(9):540-6.
217. Hart AL, Ng SC, Mann E, Al-Hassi HO, Bernardo D, Knight SC. Homing of immune cells: role in homeostasis and intestinal inflammation. *Inflammatory bowel diseases.* 2010;16(11):1969-77.
218. Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F, et al. Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature.* 2003;425(6953):90-3.
219. Russell JL, Goetsch SC, Aguilar HR, Coe H, Luo X, Liu N, et al. Regulated expression of pH sensing G Protein-coupled receptor-68 identified through chemical biology defines a new drug target for ischemic heart disease. *ACS Chem Biol.* 2012;7(6):1077-83.

220. Radu CG, Nijagal A, McLaughlin J, Wang L, Witte ON. Differential proton sensitivity of related G protein-coupled receptors T cell death-associated gene 8 and G2A expressed in immune cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(5):1632-7.
221. Ritter SL, Hall RA. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(12):819-30.
222. Calebiro D, Nikolaev VO, Persani L, Lohse MJ. Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31(5):221-8.
223. Vilardaga JP, Jean-Alphonse FG, Gardella TJ. Endosomal generation of cAMP in GPCR signaling. *Nat Chem Biol* 2014;10(9):700-6.
224. Tsvetanova NG, Irannejad R, von Zastrow M. G protein-coupled receptor (GPCR) signaling via heterotrimeric G proteins from endosomes. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(11):6689-96.
225. West C, Hanyaloglu AC. Minireview: Spatial Programming of G Protein-Coupled Receptor Activity: Decoding Signaling in Health and Disease. *Mol Endocrinol*. 2015;29(8):1095-106.
226. Campden R, Audet N, Hébert TE. Nuclear G protein signaling: new tricks for old dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015 65(2):110-22.
227. Lan W, Yamaguchi S, Yamamoto T, Yamahira S, Tan M, Murakami N, et al. Visualization of the pH-dependent dynamic distribution of G2A in living cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014;28(9):3965-74.
228. Onozawa Y, Komai T, Oda T. Activation of T cell death-associated gene 8 attenuates inflammation by negatively regulating the function of inflammatory cells. *Eur J Pharmacol*. 2011;654(3):315-9.

229. Sabbatini ME, Gorelick F, Glaser S. Adenylyl cyclases in the digestive system. *Cellular signalling*. 2014;26(6):1173-81.
230. Mizuno N, Itoh H. Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. *Neurosignals*. 2009;17(1):42-54.
231. Sheshachalam A, Srivastava N, Mitchell T, Lacy P, Eitzen G. Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Frontiers in immunology*. 2014;5:448.
232. Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of leukocyte biology*. 2011;90(2):271-84.
233. Xu Y, Loison F, Luo HR. Neutrophil spontaneous death is mediated by down-regulation of autocrine signaling through GPCR, PI3Kgamma, ROS, and actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(7):2950-5.
234. Brazil JC, Louis NA, Parkos CA. The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19(7):1556-65.
235. Sheikh SZ, Plevy SE. The role of the macrophage in sentinel responses in intestinal immunity. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26(6):578-82.
236. Steinbach EC, Plevy SE. The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD. *Inflammatory bowel diseases*. 2014;20(1):166-75.
237. Park SY, Bae DJ, Kim MJ, Piao ML, Kim IS. Extracellular low pH modulates phosphatidylserine-dependent phagocytosis in macrophages by increasing stabilin-1 expression. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(14):11261-71.
238. Karavitis J, Kovacs EJ. Macrophage phagocytosis: effects of environmental pollutants, alcohol, cigarette smoke, and other external factors. *Journal of leukocyte biology*. 2011;90(6):1065-78.

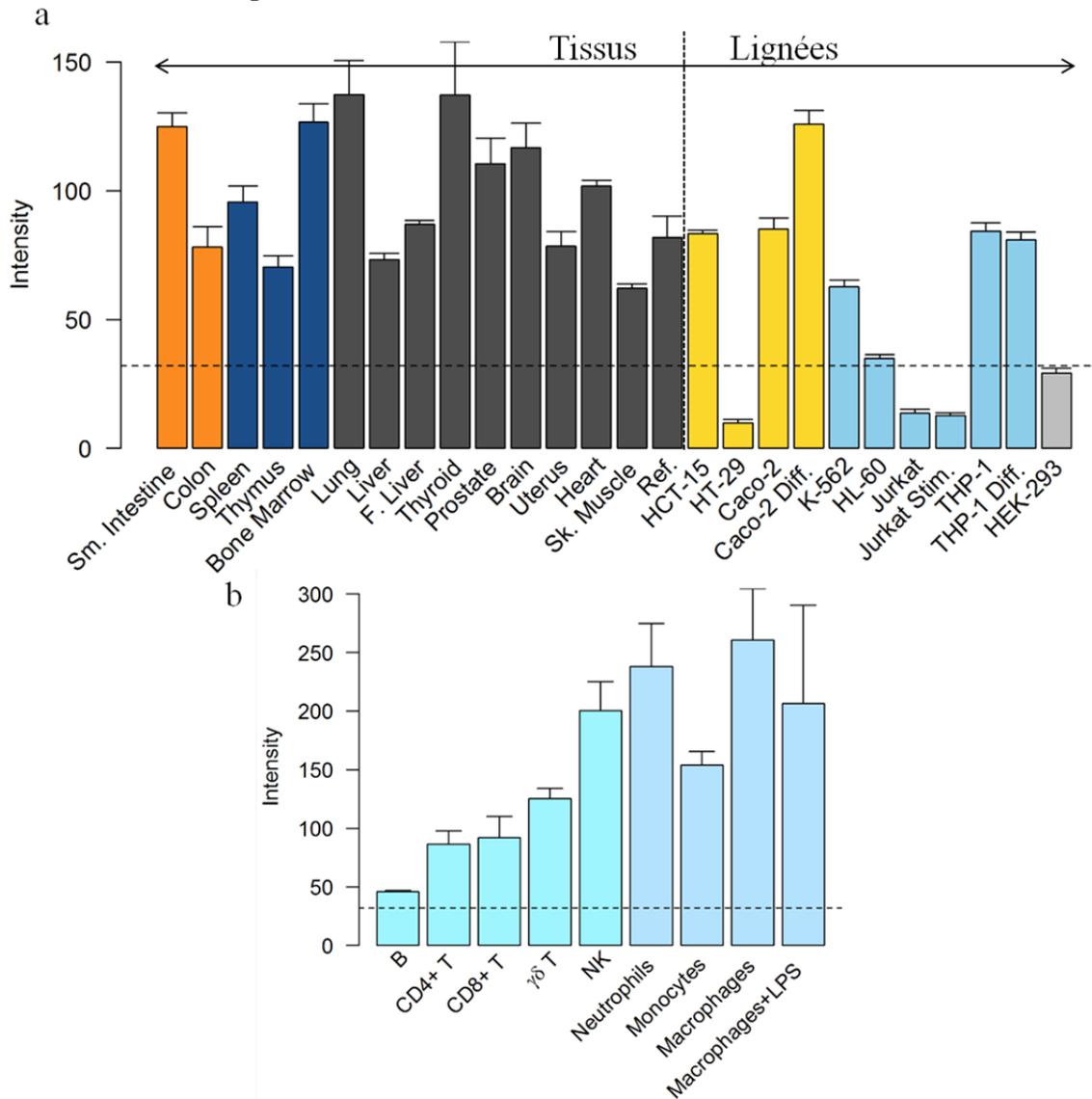
239. Flannagan RS, Harrison RE, Yip CM, Jaqaman K, Grinstein S. Dynamic macrophage "probing" is required for the efficient capture of phagocytic targets. *J Cell Biol.* 2010;191(6):1205-18.
240. Masters TA, Pontes B, Viasnoff V, Li Y, Gauthier NC. Plasma membrane tension orchestrates membrane trafficking, cytoskeletal remodeling, and biochemical signaling during phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(29):11875-80.
241. Rak GD, Mace EM, Banerjee PP, Svitkina T, Orange JS. Natural killer cell lytic granule secretion occurs through a pervasive actin network at the immune synapse. *PLoS Biol.* 2011;9(9):e1001151.
242. Brown AC, Oddos S, Dobbie IM, Alakoskela JM, Parton RM, Eissmann P, et al. Remodelling of cortical actin where lytic granules dock at natural killer cell immune synapses revealed by super-resolution microscopy. *PLoS Biol.* 2011;9(9):e1001152.
243. Lagrue K, Carisey A, Oszmiana A, Kennedy PR, Williamson DJ, Cartwright A, et al. The central role of the cytoskeleton in mechanisms and functions of the NK cell immune synapse. *Immunol Rev* 2013;256(1):203-21.
244. Mace EM, Orange JS. Lytic immune synapse function requires filamentous actin deconstruction by Coronin 1A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(18):6708-13.
245. Mace EM, Wu WW, Ho T, Mann SS, Hsu HT, Orange JS. NK cell lytic granules are highly motile at the immunological synapse and require F-actin for post-degranulation persistence. *Journal of immunology.* 2012;189(10):4870-80.
246. Steel AW, Mela CM, Lindsay JO, Gazzard BG, Goodier MR. Increased proportion of CD16(+) NK cells in the colonic lamina propria of inflammatory bowel disease patients, but not after azathioprine treatment. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33(1):115-26.

247. Song W, Liu C, Upadhyaya A. The pivotal position of the actin cytoskeleton in the initiation and regulation of B cell receptor activation. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1838(2):569-78.
248. Liu C, Miller H, Sharma S, Beaven A, Upadhyaya A, Song W. Analyzing actin dynamics during the activation of the B cell receptor in live B cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;427(1):202-6.
249. Liu C, Miller H, Orłowski G, Hang H, Upadhyaya A, Song W. Actin reorganization is required for the formation of polarized B cell receptor signalosomes in response to both soluble and membrane-associated antigens. *Journal of immunology*. 2012;188(7):3237-46.
250. Varma R, Campi G, Yokosuka T, Saito T, Dustin ML. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity*. 2006;25(1):117-27.
251. Beemiller P, Krummel MF. Mediation of T-cell activation by actin meshworks. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(9):a002444.
252. Billadeau DD, Nolz JC, Gomez TS. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):131-43.
253. McCole DF. IBD candidate genes and intestinal barrier regulation. *Inflammatory bowel diseases*. 2014;20(10):1829-49.
254. Lee SJ, Lee WH, Lee CH, Kim SG. Regulation of thymus-dependent and thymus-independent production of immunoglobulin G subclasses by Galpha12 and Galpha13. *Journal of molecular signaling*. 2008;3:12.
255. Rieken S, Sassmann A, Herroeder S, Wallenwein B, Moers A, Offermanns S, et al. G12/G13 Family G Proteins Regulate Marginal Zone B Cell Maturation, Migration, and Polarization. *The Journal of Immunology*. 2006;177(5):2985-93.

256. Herroeder S, Reichardt P, Sassmann A, Zimmermann B, Jaeneke D, Hoeckner J, et al. Guanine nucleotide-binding proteins of the G12 family shape immune functions by controlling CD4+ T cell adhesiveness and motility. *Immunity*. 2009;30(5):708-20.
257. Xu T, Su H, Ganapathy S, Yuan ZM. Modulation of autophagic activity by extracellular pH. *Autophagy*. 2011;7(11):1316-22.
258. Pellegrini P, Strambi A, Zipoli C, Hagg-Olofsson M, Buoncervello M, Linder S, et al. Acidic extracellular pH neutralizes the autophagy-inhibiting activity of chloroquine: implications for cancer therapies. *Autophagy*. 2014;10(4):562-71.



## Annexe I: Profil d'expression de GALC

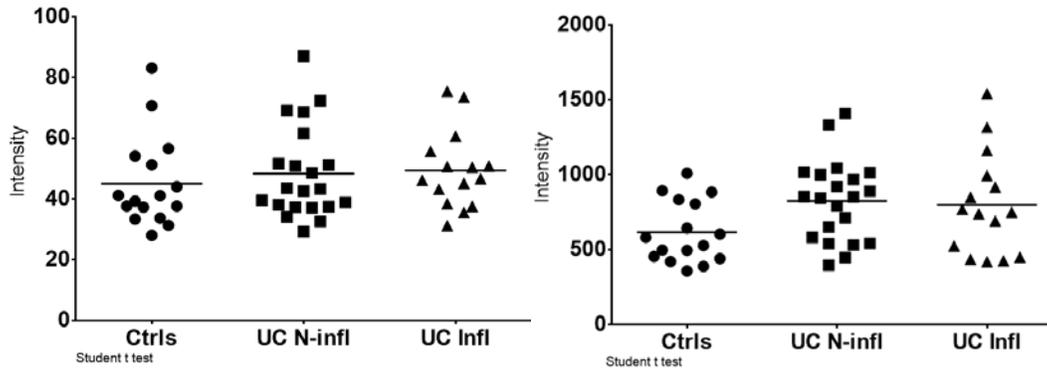


Analyse sur puce des échantillons d'ARN totaux obtenus de différents tissus et lignées cellulaires (a) et de cellules immunitaires primaires de sang périphérique d'individus sains (b). Données représentées sous forme de moyenne géométrique et d'écart type géométrique. La ligne pointillée représente une valeur arbitraire et les signaux se trouvant sous cette ligne sont vus comme non-quantifiables car trop peu détectés. (a) Les modèles de différenciation d'épithélium colanique Caco-2 différenciés ont été obtenus suivant 21 jours de culture à une confluence de 100% (Caco-2 diff.). Les cellules Jurkat ont été stimulées avec du PMA (40 ng/mL) et de l'ionomycine (1 µg/mL) pour 6 heures (Jurkat Stim.), et les THP-1 différenciés ont été traités durant 24 heures avec du TNF $\alpha$  (10 ng/mL) et IFN $\gamma$  (400 U/mL) (THP-1 diff.). (b) Résultats obtenus à partir de préparations d'ARN totaux provenant de cellules immunitaires primaires isolées du sang périphérique de donneurs sains (n=6). Les monocytes ont été utilisés pour la génération *in vitro* de macrophages par un traitement au M-CSF; 50 ng/mL pendant six jours et les macrophages ont été activés avec l'ajout de LPS (1 µg/mL; Macrophages + LPS) pour une incubation totale de huit jours.

## Annexe II: Séquence synthétisée de GPR65.

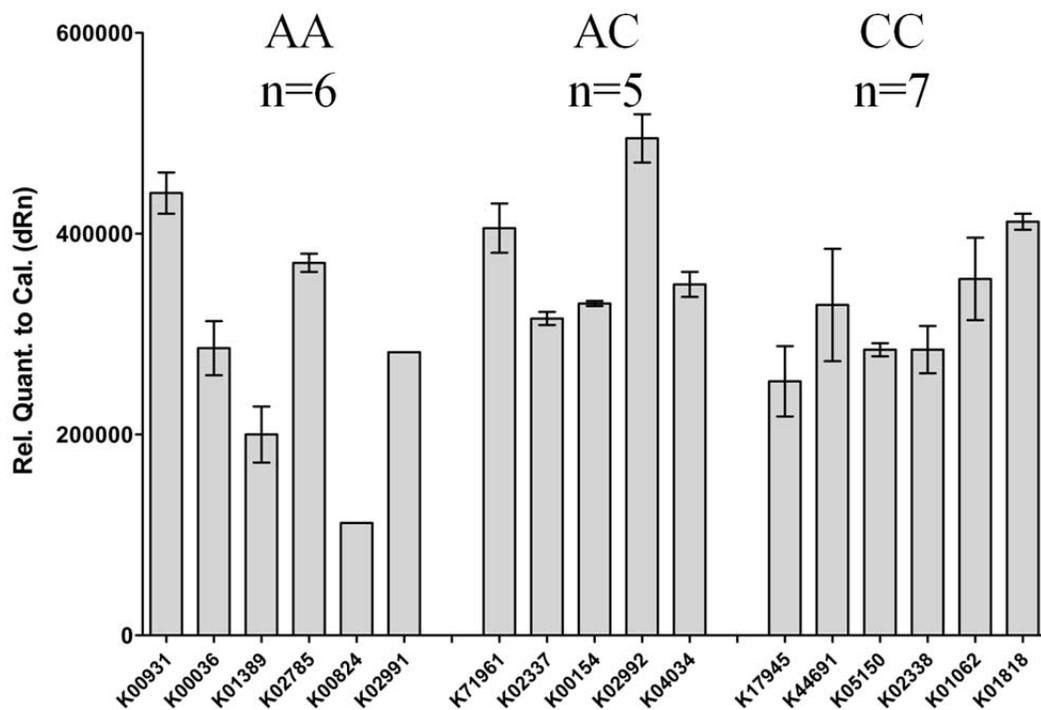
EcoRV EcoRI XhoI Kozak  
GACTCTACTAGAGGAGATATCGAATTCCTCGAGGCCACCATG(GACTACAAAGACGATGACGACAAG)A  
ACAGCACATGTATTGAAGAACAGCATGACCTGGATCACTATTTGTTTCCCATGTTTACATCTTTGTGATT  
ATAGTCAGCATTCCAGCCAATATTGGATCTCTGTGTGTGTCTTTCCTGCAAGCAAAGAAGGAAAGTGAA  
CTAGGAATTTACCTCTTCAGTTTGTCACTATCAGATTTACTCTATGCATTAAGCTCCCTTTATGGATTGAT  
TATACCTGGAATAAAGACAAGCTGGACTTTCTCTCCTGCCTTGTGCAAAGGGAGTGCTTTTCTCATGTACA  
TGAATTTTACAGCAGCACAGCATTCTCACCTGCATTGCCGTTGATCGGTATTTGGCTGTTGTCTACCC  
TTTGAAGTTTTTTTCCTAAGGACAAGAAGATTGCACTCATGTCAGCCTGTCCATCTGGATATTGGA  
AACCATCTCAATGCTGTCTGTGGGAAGATGAAACAGTTGTTGAATATGCGATGCCGAAAAGTC  
TAATTTACTTTATGCTATGACAAATACCTTTAGAGAAATGGCAAATCAACCTCAACTGTTTCAGGACG  
TGACAGGCTATGCAATACCTTTGGTCACCATCCTGATCTGCAACCGGAAAGTCTACCAAGCTGTGCGG  
CACAATAAAGCCACGGAAAACAAGGAAAAGAAGAATCATAAACTACTTGTGAGC(A/C)TCACAG  
TTACTTTTGTCTTATGCTTTACTCCCTTTCATGTGATGTTGCTGATTGCTGCTGATTTTAGAGCATGCTGTG  
AACTTCGAAGACCACAGCAATTCGGAAGCGAACTTACACAATGTATAGAATCACGGTTGCATTAACA  
AGTTTAAATTGTTGCTGATCCAATCTGTACTGTTTTGTAACCGAAACAGGAAGATATGATATGTGGA  
ATATATAAAATTCTGCACCTGGAGGTGTAATACATCAAAAGACAAAGAAAACGCATACTTTCTGTGTC  
TACAAAAGATACTATGGAATTAGAGGTCTTGAGTAGGACTAGTCTAGAGCGGCCGCGGATCCCGCC  
CCTCTCCCTCATC SpeI XbaI NotI BamHI

### Annexe III: Expression de GALC dans des biopsies de patients atteints de la CU.



Deux amorces différentes ont été utilisées pour le gène *GALC*. Données d'expression obtenues de biopsies; de sujets sains (cercle), de sujets atteints de la CU dans une région non-inflammée (carré) ou inflammée (triangle). Les lignes pleines représentent la moyenne des données de chaque groupe. Valeurs p calculées avec un test de Student.

**Annexe IV: Niveaux d'expression endogène de l'ARNm de GALC dans les différentes lignées de cellules lymphoblastoïdes humaines.**



Analyse par qPCR (n=2 techniques).