



**Étude sur le rôle de SIGIRR chez les cas pédiatriques dans la maladie
de Crohn.**

par Patrick Sagala

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie de l'Université de
Montréal

Pour l'obtention du grade Maître ès Science (M.Sc.)

Québec, Canada

© Patrick Sagala, 2016

Résumé

Il est admis que la maladie de Crohn (MC) résulte de facteurs immunologiques, environnementaux et génétiques. SIGIRR, un récepteur anti-inflammatoire, n'a jamais été étudié dans le contexte de la MC, et de nombreuses découvertes à son sujet ont mené plusieurs à s'intéresser quant à son utilité dans l'atténuation de maladies inflammatoires. Récemment, l'IL-37 a été identifié comme ligand d'un complexe formé de SIGIRR-IL-18R α . SIGIRR et l'IL-37 pourraient alors être des acteurs de la dérégulation de l'inflammation retrouvée chez la MC. Nous les avons étudiés dans le contexte de la MC pédiatrique, afin d'y caractériser leurs effets. Nous avons identifié une diminution de l'expression de SIGIRR sur certains types de cellules immunitaires. De plus, les personnes atteintes de la MC ont des concentrations de protéines altérées, soit SIGIRR soluble, l'IL-37, l'IL-18BP, et l'IL-18, et tendent à revenir à la normale lorsque l'inflammation est contrôlée par médication. De plus, la concentration de l'IL-18 libre suit le même patron. Par analyse de régression linéaire de SIGIRR soluble et l'IL-37, de l'IL-18BP et l'IL-18, ainsi que l'IL-37 et l'IL-18, des tendances divergentes ont été identifiées entre les patients non traités aux contrôles et patients traités. Nos résultats suggèrent que le système IL-37-SIGIRR est compromis chez les patients de la MC. Étant donné que ce système est un facteur crucial dans la régulation négative de l'inflammation, il sera intéressant de déterminer si SIGIRR et l'IL-37 peuvent constituer des cibles thérapeutiques importantes dans l'atténuation et la résolution de l'inflammation chez les patients atteints de la MC.

Mots clés : SIGIRR, SIGIRR soluble, Maladie de Crohn pédiatrique, interleukine-37, interleukine-18, interleukine-18BP, IL-18R α .

Abstract

It is recognized that the Crohn's disease (CD) is the result of immunological, genetic and environmental factors. SIGIRR, an anti-inflammatory receptor, has never been studied in the context of the CD, and many discoveries about it led many to focus on its usefulness in mitigating inflammatory disease. Moreover, IL-37 has been recently identified as a ligand of SIGIRR-IL-18R α complex. Thus, we supposed that SIGIRR and IL-37 might be inflammatory actors deregulated in CD. We have studied them in the context of pediatric CD, in order to characterize their effects. We have identified a decrease in the expression of SIGIRR on certain types of immune cells. In addition, our results showed that CD patients possess an altered protein expression of soluble SIGIRR, IL-37, IL-18BP and IL-18 which tends to return to normal when the inflammation is controlled by medication. In addition, the concentration of free IL-18 follows the same pattern. By linear regression analysis of soluble SIGIRR and IL-37, IL-18BP and IL-18 and IL-37 and IL-18, diverging trends were found between patients non-treated and controls or patients treated. Our results suggest that IL-37-SIGIRR system is compromised in patients with CD. Since this system is a crucial factor in the negative regulation of inflammation, it will be interesting to determine whether SIGIRR and IL-37 may be important therapeutic targets in the attenuation and resolution of inflammation in patients with CD.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste de tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Liste d' Abréviations	xiii
Remerciements	xvii
1. Introduction	1
1.1. Avant-Propos.....	1
1.2. La maladie de Crohn	1
1.2.1. Les maladies inflammatoires chroniques intestinales.....	1
1.2.2. Signes et Symptômes de la maladie de Crohn.....	2
1.2.3. Diagnostique de la maladie de Crohn.....	4
1.2.4. Classification de la maladie de Crohn	6
1.2.5. Traitement de la maladie de Crohn.....	7
1.2.6. Maladie de Crohn en pédiatrie.....	8
1.2.6.1. Fréquence	8
1.2.6.2. Défis	8
1.2.7. Épidémiologie.....	9
1.2.7.1. Tendence temporelle	9
1.2.7.2. Tendence géographique.....	10
1.2.8. Étiopathogenèse de la Maladie de Crohn: Facteurs de risques.....	11
1.2.8.1. Facteurs Génétiques.....	11
1.2.8.2. Facteurs environnementaux.....	13
1.2.8.3. Facteurs Immunologiques	14
1.3. Inflammation	16
1.4. Inflammasome	18
1.4.1. NLR.....	18
1.4.2. NLRP3.....	19
1.5. Interleukine-37	22

1.6.	Membre de la Famille des Récepteurs de type Toll/Interleukine-1	23
1.6.1.	Les TLR.....	23
1.6.2.	Les IL-1R.....	24
1.7.	Single Immunoglobulin Interleukin-1 Receptor Related molecule	26
1.7.1.	SIGIRR : Découverte	26
1.7.2.	Structure moléculaire de SIGIRR.....	26
1.7.3.	Tolérance microbienne	27
1.7.4.	Évolution Phylogénique	28
1.7.5.	L'expression de SIGIRR	28
1.7.6.	Régulation de l'expression de SIGIRR	29
1.7.6.1.	Régulation de la protéine SIGIRR.....	29
1.7.6.2.	Régulation de l'ARNm de SIGIRR.....	30
1.7.7.	Régulation de la signalisation des IL-1R et TLR par SIGIRR	30
1.7.8.	Régulation d'autres systèmes par SIGIRR.....	32
1.7.9.	Ligand de SIGIRR.....	33
2.	Hypothèse et Objectifs	34
3.	Matériels et Méthodes	36
3.1.	Population étudiée	36
3.2.	Collecte des échantillons	36
3.3.	Cytométrie en flux : marquages des cellules sanguines	36
3.4.	ELISA.....	38
3.5.	Analyses Statistiques.....	39
4.	Résultats	41
4.1.	L'expression de SIGIRR à la surface de cellules sanguines.....	41
4.2.	Concentration de SIGIRR soluble dans la circulation sanguine.....	42
4.3.	Concentration de l'IL-37 dans la circulation sanguine de patients de la MC et de contrôles	43
4.4.	Concentration de l'IL-18BP dans la circulation sanguine de patients de la MC et de contrôles	44
4.5.	Concentration de l'IL-18 dans la circulation sanguine de patients de la MC et de contrôles	45
4.6.	Concentration de l'IL-18 Libre dans la circulation sanguine de patients de la MC et de contrôles	46

4.7.	Les ratios de l'IL-18/l'IL-18BP et de l'IL-18/l'IL-37	47
4.8.	Association de l'expression plasmatique entre l'IL-18 et l'IL-18BP	49
4.9.	Association de l'expression plasmatique entre l'IL-18 et l'IL-37	51
4.10.	Association de l'expression plasmatique entre SIGIRR et l'IL-37	53
5.	Discussion	56
6.	Conclusion.....	64
	Bibliographie	66

Liste de tableaux

Tableau I. Catégorisation de la maladie de Crohn selon la classification de Vienne, Montréal et Paris.....	6
Tableau II. Caractéristiques des différents TLR.....	24
Tableau III. Les récepteurs de la famille des IL-1R.....	25

Liste des figures

Figure 1.1. Apparence de la muqueuse intestinale chez les personnes saines, atteintes de la maladie de Crohn, et de la colite ulcéreuse.....	2
Figure 1.2. Schéma représentant les lésions et complications intestinales dans la maladie de Crohn.....	4
Figure 1.3. Tendances temporelles des taux d'incidence pour les études ayant reportées un minimum de 10 ans de données et avec au moins 3 points dans le temps pour la maladie de Crohn.....	10
Figure 1.4. Taux d'incidence et/ou de prévalence mondiale de la maladie de Crohn pour les pays ayant fournies des données.....	11
Figure 1.5: Représentation schématique de l'immunopathogénèse retrouvée chez la maladie de Crohn.....	16
Figure 1.6. Structure et l'assemblage d'un inflammasome.....	20
Figure 1.7. Mécanisme d'activation des inflammasomes.....	21
Figure 1.8. SIGIRR (IL-1R8) inhibe l'activité biologique des IL-1R par interaction avec son domaine intracellulaire et extracellulaire directe, avec les récepteurs accessoires IL-1AcP (IL-1R3) et IL-18RAP (IL-1R8).....	27
Figure 1.9. Modèles de SIGIRR inhibant la signalisation de MyD88 dépendant de TLR4 ou TLR7.....	32
Figure 3.1. <i>Gating Strategy</i> : exemple de sélection de types cellulaires.....	38
Figure 4.1. Comparaison de l'expression de SIGIRR à la surface de cellules sanguines entre des patients de la maladie de Crohn et des personnes saines.....	42
Figure 4.2. Comparaison des niveaux d'expression de SIGIRR plasmatique entre les contrôles, les patients atteints de la maladie de Crohn non-traités, et traités.....	43
Figure 4.3. Comparaison des niveaux d'expression de l'IL-37 plasmatique entre les contrôles, les patients atteints de la maladie de Crohn non-traités, et traités.....	44
Figure 4.4. Comparaison des niveaux d'expression de l'IL-18BP plasmatique entre les contrôles, les patients atteints de la maladie de Crohn non-traités, et traités.....	45
Figure 4.5. Comparaison des niveaux d'expression de l'IL-18 plasmatique entre les contrôles, les patients atteints de la maladie de Crohn non-traités, et traités.....	46
Figure 4.6. Comparaison des niveaux d'expression de l'IL-18 libre plasmatique entre les contrôles, les patients atteints de la maladie de Crohn non-traités, et traités.	47

Figure 4.7. Rapport et rapport inverse entre les concentrations plasmatique de l'IL-18 et l'IL-18BP (A et B) ainsi que l'IL-18 et l'IL-37 (C et D) chez les contrôles, les patients atteints de la maladie de Crohn sans traitement, et sous traitement.....	49
Figure 4.8. Association du niveau d'expression plasmatique des IL-18 et 18BP chez les contrôles (A), les personnes atteintes de la maladie de Crohn sans traitement (B) et avec traitement (C).....	51
Figure 4.9. Association du niveau d'expression plasmatique de l'IL-18 et l'IL-37 chez les contrôles (A), les patients de la maladie de Crohn sans traitement (B) et avec traitement (C).....	53
Figure 4.10. Association du niveau d'expression plasmatique de SIGIRR soluble et de l'IL-37 des contrôles (A), des patients de la maladie de Crohn sans traitement (B) et avec traitement (C).....	55

Liste d'Abréviations

ADCC :	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity / Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps</i>
ADN :	<i>Acide Désoxyribonucléique</i>
Akt :	<i>A serine/threonine-protein kinase first discovered in the AKT-8 virus; also known as Protein Kinase B (PKB)</i>
ANOVA :	<i>Analysis of Variance / Analyse de la variance</i>
APC :	<i>Allophycocyanin</i>
ARE :	<i>Adenylate-uridylate-Rich Elements</i>
ARN :	<i>Acide Ribonucléique</i>
ARNm ;	<i>Acide Ribonucléique messenger</i>
ASC :	<i>Apoptotic-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain</i>
ATG16L1 :	<i>Autophagy-related protein 16-like 1</i>
CAC :	<i>Cancers associé à la Colite</i>
CARD :	<i>Caspase Activation and Recruitment Domain</i>
CARD15 :	<i>Caspase Activation Recruitment Domain family-15</i>
CDAI :	<i>Crohn's Disease Activity Index / Indice de l'Activité de la Maladie de Crohn</i>
CEI :	<i>Cellules Épithéliales Intestinales</i>
CLR :	<i>C-type Lectin Receptor / Récepteur de type C de lectine</i>
COP :	<i>CARD-Only Protein / Protéine contenant seulement un domaine CARD</i>
CMH :	<i>Complexe Majeur d'Histocompatibilité</i>
CU :	<i>Colite Ulcéreuse</i>
DAMP :	<i>Damage/Danger-Associated Molecular Pattern molecules / Motifs Moléculaires Associés aux Dégâts</i>
DC :	<i>Dendritic cells / Cellules Dendritiques</i>
DIGIRR :	<i>Double Ig IL-1R Related molecule</i>
DLG5 :	<i>Disk Large Homolog 5</i>
DPS :	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DSS :	<i>Dextran Sulfate Sodium / Sulfate de dextrane sodique</i>
ELISA :	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay / Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée</i>
ERK :	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>
FBS :	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FCS :	<i>Forward-scattered light</i>
FITC :	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
GI :	<i>Gastro-intestinale</i>
GWAS :	<i>Genome Wide-Association Study / Étude d'Association Pangénomique</i>
IBD1 :	<i>Inflammatory Bowel Disease protein 1</i>
IBD3 :	<i>Inflammatory Bowel Disease 3</i>
IBD5 :	<i>Inflammatory Bowel Disease 5</i>
IC :	<i>Intervalle de confiance</i>
IFN :	<i>Interféron</i>

Ig :	Immunoglobuline
IL :	Interleukine
IL-1R :	<i>Interleukin-1 Receptors</i> / Récepteurs de l'Interleukine-1
IL-18Rα :	Chaîne α du récepteur de l'interleukine-18
IL-18BP :	<i>Interleukin-18 Binding Protein</i>
IL-1RAcP :	<i>IL-1R Accesory Protein</i>
IRAK :	<i>IL-1R-associated kinase</i>
IRF3 :	<i>Interferon Regulatory Factor 3</i>
IRGM :	<i>Immunity-related GTPase family M protein</i>
JNK :	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
LPS :	Lipopolysaccharide
LRR :	<i>Leucine-Rich Repeat</i> / Répétitions Riches en Leucine
MAC :	Molécules d'Adhésion Cellulaire
MAPK :	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MC :	Maladie de Crohn
MDP :	Muramyldipeptide
MEC :	Matrice Extracellulaire
MFI :	<i>Mean Fluorescence Intensity</i> / Intensité de Fluorescence Moyenne
MICI :	Maladies inflammatoires chroniques intestinales
MMP :	Métalloprotéinases matricielles (
mTOR :	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i> / cible de la rapamycine chez les mammifères
MyD88 :	<i>Myeloid Differentiation factor 88</i>
NF-κB :	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NK :	<i>Natural Killer</i>
NOD :	<i>Nucleotide-Binding-Oligomerization Domain</i>
NLR :	<i>Nucleotide-binding and Oligomerisation Domain-Like Receptor</i>
OCTN :	<i>Organic Cation/Carnitine Transporter</i>
PAMP :	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> / Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes
PBMC :	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> / Cellules du Sang Périphérique Mononuclées
PCDAI :	<i>Pediatric Crohn's Disease Activity Index</i> / Indice d'Activité de la Maladie de Crohn chez l'Enfant
PE :	<i>Phycoerythrin</i> / Phycoérythrine
PerCP :	<i>Peridinin-Chlorophyll-Protein</i>
POP :	<i>Pyrin-Only Protein</i> / Protéine contenant seulement un domaine PYD
PRR :	<i>Pattern Recognition Receptor</i> / Récepteurs de Reconnaissance de Motifs Moléculaires
PYD :	<i>Pyrin Domain</i> / Domaine Pyrine
Q :	Quartile
qPCR :	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
R² :	Coefficient de détermination
RAMQ :	Régie de l'Assurance-Maladie du Québec

RAR :	Récepteur de l'Acide Rétinoïque
RLR :	<i>Retinoid acid-inducible gene-I-Like Receptors</i>
RORC :	<i>RAR-related orphan receptor C</i>
SEM:	Standard Error of the Mean / Écart-type moyen
SIGIRR :	<i>Single Immunoglobulin Interleukin-1 Receptor Related molecule</i>
SMAD :	<i>Derived from SMA (small body size in worms, and MAD (Mothers Against Decapentaplegic in flies); a name given to their human homologs</i>
Sp1 :	<i>Specificity protein 1</i>
SSC:	<i>Side-scattered light</i>
STAT :	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TACE :	<i>TNF-alpha converting enzyme / Enzyme de conversion de TNF-α</i>
TEM :	Transition Épithélio-Mésenchymateuse
TGF :	<i>Transforming Growth Factor / Facteur de Croissance Transformant</i>
Th :	T helper cells / Lymphocyte T auxiliaire
TIMP:	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
TIR :	<i>Toll/Interleukin-1 Receptor</i>
TIGIRR-2 :	<i>Three Ig domain-containing IL-1R related-2</i>
TLR :	<i>Toll-Like Receptors / Récepteurs de type Toll</i>
TNF-α :	<i>Tumor Necrosis Factor- α</i>
TRAF6 :	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
T-bet :	<i>T-box transcription factor TBX21</i>

Remerciements

Je veux prendre ces quelques lignes afin de remercier tous ceux et celles qui m'ont encouragé à persévérer, et m'ont aidé à développer mes aptitudes en tant que scientifique tout au long de ces deux années. Ce diplôme, bien que j'en sois l'unique bénéficiaire, est la réalisation d'un travail d'équipe, et c'est à ce groupe de gens que je désire m'adresser. Mes études de deuxième cycle m'ont permis de rencontrer et de côtoyer des gens formidables et, par la même occasion, m'ont donné la chance de partager, avec vous, ma passion. Une ambiance des plus motivantes, et ce, dans un décor pittoresque qu'est le CHUM de Sainte-Justine.

À tout seigneur tout honneur, je dois tout d'abord remercier Dr Ali Ahmad qui fut tout au long une vraie fontaine du savoir infini. Merci du fond du cœur de m'avoir donné ma chance. Je veux également remercier le Dr Devendra Amre ainsi que l'organisme Crohn et Colite Canada pour le soutien financier; ce fut enrichissant de m'imprégner dans ce domaine qui, même si elle touche durement notre pays, reste peu connu. Une pensée spéciale à Dre Carolina Alfieri pour son encadrement lors de ma rédaction et de ces conseils pour la suite des choses. Je ne peux passer sous silence l'apport de ma famille, spécialement mes parents, où leur seule présence rassurante m'a aidé à garder les pieds sur terre lors des moments plus difficiles. À mes amis, mille mercis, vous m'avez laissé utiliser sans ménagement un puissant pouvoir libérateur, qu'est la catharsis. Sans leurs oreilles attentives, je n'aurais pas pu décrocher, m'offrir une pause à mes neurones, et me relancer avec encore plus d'acharnement. Merci à tous les anciens étudiants : les stagiaires pour leur entraînement, Ossama pour son professionnalisme, et sans oublier Claire, Carl-Frédéric et Mallory avec lesquels j'ai travaillé lors d'une collaboration. Bonne chance à Zainab et aux nouveaux étudiants, Ayoub et Sarah, dans la continuation de leurs études. Finalement, je ne peux oublier l'énorme contribution apportée par Suzanne Samarani afin d'approfondir et d'aiguiser mes connaissances.

Je vous ai côtoyé, je vous côtoie toujours, à l'heure où j'écris ces mots, et... vous allez me manquer. L'entraide mutuelle que nous nous sommes apportée fut très importante pour moi. J'ai appris beaucoup sur ma personne et je n'oublierais jamais cette expérience. Ce fut un plaisir et un honneur, qui je l'espère, fut partagé par mes comparses de travail. Merci.

Chapitre 1

1. Introduction

1.1. Avant-Propos

Les études présentées dans ce mémoire visaient à comprendre le rôle de *Single Immunoglobulin Interleukin-1 Receptor Related molecule* (SIGIRR), précédemment connu sous le nom de *Toll/Interleukin-1 Receptor* (TIR)-8, dans le développement de la maladie de Crohn (MC), une forme sévère des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI). Au moment où ces études ont commencées, SIGIRR était connu comme un récepteur orphelin appartenant à la famille des récepteurs de l'interleukine(IL)-1 (IL-1R). Il est connu que le récepteur exerce des effets anti-inflammatoires, puisque des souris et des cellules déficientes en SIGIRR présentent une hypersensibilité au lipopolysaccharide (LPS). Plus récemment, il a été constaté qu'il agit comme corécepteur de l'IL-37, une cytokine anti-inflammatoire appartenant à la famille des IL-1. Elle est structurellement homologue à l'IL-18 et les deux cytokines partagent la chaîne α du récepteur IL-18 (IL-18R α) comme élément commun de leurs récepteurs respectifs. Les deux cytokines se lient également à l'IL-18 *Binding Protein* (IL-18BP). Dans cette introduction, la littérature actuelle en rapport avec la MC, SIGIRR, son ligand (l'IL-37) et des sujets connexes seront présentés.

1.2. La maladie de Crohn

1.2.1. Les maladies inflammatoires chroniques intestinales

La MC tout comme la colite ulcéreuse (CU) font partie de la famille des MICI. Ces affections constituent les deux formes majeures des désordres inflammatoires chroniques du système digestif (Burisch et Munkholm 2013) lesquelles sont marquées par des épisodes d'inactivités, dites de rémission, et de recrudescence des symptômes.

Toutefois, elles diffèrent de par les régions atteintes et le comportement. En fait, la CU se caractérise par des lésions en motif continu au niveau du rectum et d'une partie ou de la totalité du côlon, tandis que la MC présente principalement des lésions à l'iléon et au côlon, ou tout autre région du tractus gastro-intestinal (GI) de façon discontinue, soit de la bouche à l'anus. Généralement, l'inflammation de la CU est généralement limitée à la muqueuse alors que, chez les malades de Crohn, l'inflammation est souvent transmurale. De plus, la MC peut être associée

à des granulomes, des sténoses intestinales, et des fistules ce qui est atypique de la CU (**Figure 1.1**) (Abraham et Cho 2009).

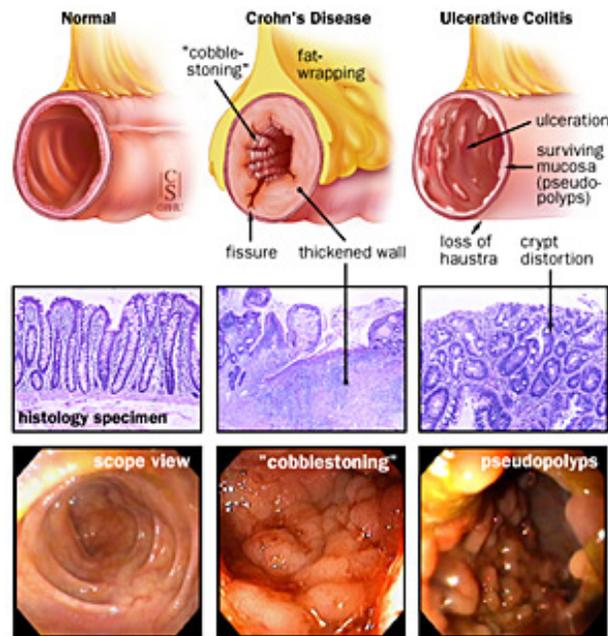


Figure 1.1. Apparence de la muqueuse intestinale chez les personnes saines, atteintes de la maladie de Crohn, et de la colite ulcéreuse. Vue transversale Schématisé du tractus GI (haut), coupe histologique (milieu), vue endoscopique (bas). (Référence : Johns Hopkins Medicine Gastroenterology & Hepatology. 2015)

Ces différences permettent le diagnostic de la MC et de la CU basé sur une suspicion clinique ainsi que des tests radiologiques, endoscopiques, histologiques et des tests en laboratoire (Geboes *et al.* 2008). Malgré cela, souvent ces deux maladies restent difficiles à distinguer biochimiquement l'une de l'autre au point d'être impossible, à l'aide des outils de diagnostics disponibles, de les discriminer. Dans cette situation, le terme MICI non classées est alors attribué à ces patients de MICI, qui représente plus de 10% à 15% des cas de MICI diagnostiqués (Geboes *et al.* 2008). Cette difficulté de classification entraîne des délais dans les diagnostics ainsi qu'une sous-estimation de la prévalence des MICI à travers le monde (Jan Irvine *et al.* 2001, Benchimol *et al.* 2011). Bien qu'il soit largement admis que les MICI résultent d'une dérégulation de la réponse immunitaire de la muqueuse et à des facteurs environnementaux chez les patients susceptibles génétiquement, la cause précise des MICI, dont la MC, n'a pas encore été élucidée (Corridoni *et al.* 2014).

1.2.2. Signes et Symptômes de la maladie de Crohn

Comme mentionnés ci-haut, les signes typiques de la MC alternent entre des périodes d'activités et des périodes de rémissions. La MC compte de nombreux symptômes : douleurs

abdominales, ballonnements, fièvre, et signes cliniques d'obstruction intestinale ou de diarrhée avec ou sans de trace sang. De plus, un retard de croissance chez les enfants est également observé chez plus de 30% des cas pédiatriques. En fait, la plupart des enfants obtiennent leur diagnostic suite à l'observation de leur incapacité de maintenir une croissance normale (Beatties *et al.* 2006). Chez les patients plus âgés, une perte de poids peut être observée, puisqu'ils perdent leur appétit et éprouvent moins de malaise à jeun (Beatties *et al.* 2006).

Les premiers stades se caractérisent par une infiltration abondante de neutrophiles dans les muqueuses induisant le recrutement de monocytes et de lymphocytes (Fournier et Parkos 2012). Par la suite, les lésions se manifestent typiquement par des abcès cryptiques et des ulcères. La chronicité de l'inflammation conduit à l'apparition de granulomes non caséux. Cette caractéristique histologique de la MC est présente dans moins de 50% des biopsies endoscopiques et dans 70% des prélèvements chirurgicaux, puisqu'ils sont davantage abondants au niveau de la sous-muqueuse que la muqueuse. D'autres signes communs à la pathologie sont l'infiltration abondante de lymphocytes et de monocytes dans la lamina propria et la formation de fissures de la muqueuse qui deviennent éventuellement des fistules traversant la paroi intestinale. Initialement petits et superficiels, les ulcères formés convergent et entourent les zones non affectées, donnant ainsi à la muqueuse intestinale l'aspect typique de pavé. La présentation de ses symptômes entraîne plusieurs complications possibles, dont des abcès intra-abdominaux et intrapariétal/périanal, des fistules liant une cavité de l'intestin à une autre ou à un autre organe contigu (vessie, uretère, et le vagin) ou encore à la peau, et finalement des rétrécissements (sténoses) causés par la fibrose intestinale qui mène à l'élaboration ultérieure de dilatations pré-sténotiques (**Figure 1.2**) (Di Sabatino *et al.* 2013). Il y a également un risque associé de développement de cancers du petit intestin et de l'anus (Barral *et al.* 2015).

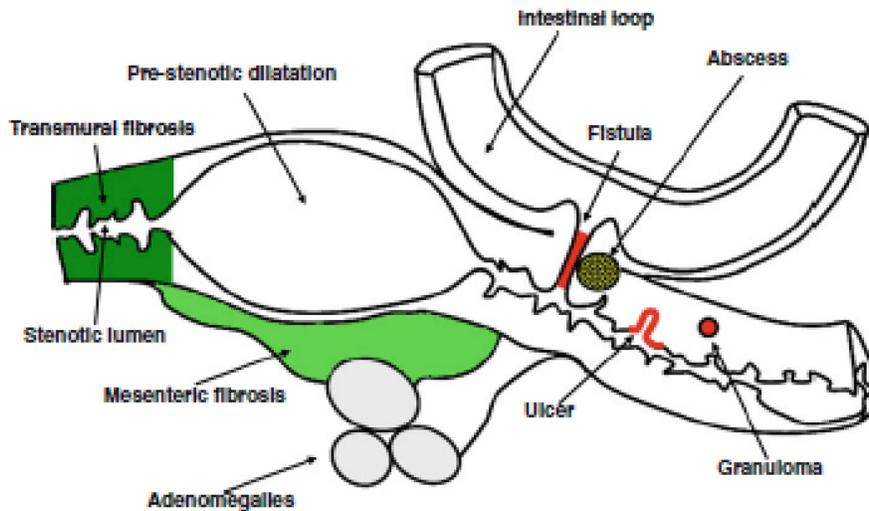


Figure 1.2. Schéma représentant les lésions et complications intestinales dans la maladie de Crohn. La MC peut présenter de la fibrose transmurale (*Transmural fibrosis*), de la fibrose mésentérique (*Mesenteric fibrosis*), des dilatations pré-sténose (*Pre-stenotic dilatation*), de la sténose intestinale (*Stenotic lumen*), des fistules (*Fistula*), des anses intestinales (*Intestinal loop*), des adénomégalies (*Adenomégallies*), des ulcères (*Ulcer*), des granulomes (*Granuloma*), et des abcès (*Abscess*). (Référence : Di Sabatino *et al.* 2013).

Ces symptômes sont causés par une inflammation chronique qui est elle-même provoquée par une perméabilité anormale de l'intestin, favorisant le passage d'antigènes et leur reconnaissance par le système immunitaire. En fait, une inflammation récurrente et importante à travers toute l'épaisseur de la paroi intestinale s'étendant jusqu'à la graisse du mésentère (synonyme, viscérale, abdominale) et aux ganglions lymphatiques est observée lors de la MC. Cette inflammation chronique du tractus GI occasionne notamment des lésions à la paroi, et induit les symptômes soulignés ci-haut (Cosnes *et al.* 2011). Outre l'inflammation chronique, l'altération de la diversité et/ou de la distribution du microbiome de l'intestin a été observée chez les malades de Crohn ce qui corrèle généralement avec l'inflammation (Baumgart et Sandborn 2012). Cependant, à l'heure actuelle, la communauté scientifique n'a toujours pas déterminé si ce changement du microbiome provoque l'inflammation, ou est causée par celle-ci (Wright *et al.* 2015). D'autre part, aucune évidence claire n'a, pour l'instant, été montrée sur la relation entre la sévérité des symptômes et le degré des lésions du tractus gastro-intestinal (Cosnes *et al.* 2011).

1.2.3. Diagnostique de la maladie de Crohn

Par sa nature complexe, la MC ne peut être diagnostiqué par un seul test, mais plutôt par une combinaison des caractéristiques décrites précédemment, en plus d'un examen physique consciencieux, de tests sanguins et de selles, et l'observation des changements aux niveaux

endoscopiques, histologiques et radiologiques (Ferkolj *et al.* 2008). L'indice de l'activité de la MC (CDAI) est un outil important dans l'évaluation des patients et pour la détermination et la modulation des thérapies. Un patient ayant un score plus bas que 150 est considéré en rémission, alors qu'un score plus haut que 450 est considéré comme un malade de Crohn avancé et sévère (Best *et al.* 1976). Il existe également une échelle de points semblable pour les cas pédiatriques de la MC, nommée indice d'activité de la MC chez l'enfant (PCDAI) (Tumer *et al.* 2010).

Il n'existe pas de test sanguin spécifique pour la MC, toutefois une gamme de tests biochimiques peut être utilisée pour détecter une inflammation, telle que le dépistage du marqueur d'inflammation, la protéine C réactive. Cette molécule est un bon indicateur, puisqu'elle est augmentée dans la MC chez plus de 95% des patients diagnostiqués et que sa mesure possède une sensibilité et une spécificité près de 100% (Baumgart et Sandborn 2012, Morrison *et al.* 2009, Di Sabatino *et al.* 2013).

L'endoscopie, plus spécifiquement l'iléocolonoscopie, est une technique plus invasive, quoique cruciale dans le diagnostic de la maladie. Elle permet la visualisation de lésions de la muqueuse, d'abcès et de fistules dans le tractus gastro-entérologique. L'endoscopie combinée aux biopsies est présentement le standard pour dépister la MC (Baumgarth et Sandborn 2012, Morrison *et al.* 2009). Au niveau de l'endoscopie, les profonds ulcères qui alternent avec des régions non affectées, donnant l'apparence de pavé caractéristique de la MC, peuvent être observés. À un niveau macroscopique, le degré de l'inflammation est estimé sur la base de la présence d'érythème muqueux, de saignement, et la présence d'ulcères et/ou de pseudo-polypes inflammatoires. Puis, au niveau microscopique on peut observer la présence de granulomes, un nombre conservé de cellules caliciformes, l'architecture conservée des cryptes ou une infiltration anormale de lymphocytes T, de macrophages et de neutrophiles dans la lamina propria (Naser *et al.* 2011). Ces caractéristiques constituent une aide précieuse dans la confirmation du diagnostic de la MC. Ils existent également d'autres techniques de détection de la maladie : les ultrasons, détectant des signes tels que l'épaississement de la paroi de l'intestin et la perte de stratification murale normale (Fraquelli *et al.* 2008); l'entéroclyse, un examen radiologique permettant de visualiser l'intestin grêle et pouvant détecter l'implication jéjuno-iléale (rétrécissement, apparence de pavé et dilatation pré-sténotique de l'intestin) (Saibeni *et al.* 2007). Parmi les techniques d'imagerie, la tomodensitométrie et la résonance magnétique permettent aux spécialistes d'afficher une image en coupe transversale de l'intestin sans être limitée à la couche superficielle de la muqueuse de l'intestin, comme c'est le cas de l'endoscopie (Al-Hawary et Zimmermann 2012).

1.2.4. Classification de la maladie de Crohn

Au fil du temps plusieurs classifications phénotypiques ont fait leur apparition; Rome en 1988, Vienne en 1998, et Montréal en 2005 (D'Amato et Rioux 2013). La plus récente et, par le fait même, la plus complète s'intéresse à l'âge de l'apparition, à la localisation de la maladie et au comportement de celle-ci (**Tableau I**) (Silverberg *et al.* 2005). Cette classification est surtout utilisée dans les études, mais contient certaines ambiguïtés. Par exemple, aucun consensus n'existe à propos d'une inflammation microscopique dans une muqueuse macroscopiquement normale constitue ou non une manifestation de la maladie. De même, lorsque l'iléon est atteint avec la participation du caecum limitée, la classification ne permet pas de distinguer s'il s'agit d'un cas appartenant à l'iléale (L1) ou à l'iléocolique (L3). Les modifications pédiatriques à la classification de Montréal dans la classification de Paris essaient de surmonter ces ambivalences (Levine *et al.* 2011) (**Tableau I**). Malgré ces classifications, 5-10% des patients de MICI n'ont aucun diagnostic défini. Pour ces cas particuliers, le terme MICI non défini est utilisé (Laass *et al.* 2014). Le but premier de la classification des patients est de fournir un nouvel aperçu des symptômes afin d'opter pour le meilleur traitement possibles pour chaque cas particulier.

Tableau I. Catégorisation de la maladie de Crohn selon la classification de Vienne, Montréal et Paris.

	Vienne	Montréal	Paris
Age du diagnostic (A)	A1 En dessous de 40 ans	A1 En dessous de 17 ans	A1a En dessous de 10 ans A1b Entre 10 et 16 ans
	A2 Au-dessus de 40 ans	A2 Entre 17 et 40 ans A3 Au-dessus de 40 ans	A2 Entre 17 et 40 ans A3 Au-dessus de 40 ans
Localisation (L)	L1 Iléale	L1 Iléale	L1 Iléale
	L2 Coloque	L2 Coloque	L2 Coloque
	L3 Iléocolique	L3 Iléocolique	L3 Iléocolique
	L4 Supérieur	L4 Maladies GI supérieures isolées ¹	L4a Maladies GI supérieures proximale du ligament de Treitz ¹ L4b Maladies GI supérieures distale du ligament de Treitz et proximal du 1/3 de l'iléon ¹
Comportement (B)	B1 Aucune sténose et pénétration	B1 Aucune sténose et pénétration	B1 Aucune sténose et pénétration
	B2 Sténose	B2 Sténose	B2 Sténose
	B3 Pénétrante	B3 Pénétrante	B3 Pénétrante ² B2B3 Pénétrante et sténose, à des temps différent ou en même temps
Croissance (G)		p Modificateur de la maladie périanale ²	P Modificateur de la maladie périanale G0 Aucun retard de Croissance G1 Retard de Croissance

1. L4 ou L4a/L4b est un modificateur qui peut être ajouté à L1-L3 lorsque concomitant avec une maladie gastro-intestinale supérieure. 2. "p" est ajouté à B1-B3 lorsque concomitant avec une maladie péri-anale

1.2.5. Traitement de la maladie de Crohn

À ce jour, il n'y a aucun traitement de la MC qui permette la guérison totale. L'objectif des traitements est de ralentir la progression de la maladie (rémission), et de traiter les symptômes et les complications, notamment en favorisant la cicatrisation de la muqueuse (Baumgart et Sandborn 2012, De Cruz *et al.* 2013, Di Sabatino *et al.* 2013).

Pour ce faire, plusieurs éléments sont à considérer, puisque la progression de la maladie diffère d'un patient à un autre. Une surveillance attentive du phénotype de la maladie est alors cruciale pour la maximisation des bénéfices du traitement (Cosnes *et al.* 2011, Baumgart et Sandborn 2012, Vermeire *et al.* 2012). Ainsi, l'historique médical ou l'anamnèse des patients permet de prédire le pronostic et d'adapter le traitement. En fait, l'approche thérapeutique diffère selon la localisation, la présentation et la sévérité de la pathologie (Di Sabatino *et al.* 2013). De plus, la classification de Paris permet une meilleure catégorisation des patients ce qui se traduit par un meilleur traitement des patients pédiatriques (Vermeire *et al.* 2012).

Les thérapies biologiques sont de récentes avancées dans la gestion de la MC. Le choix du type de thérapie utilisé dépend principalement de la nature et la sévérité des symptômes, des maladies concomitantes et les facteurs personnels (Baumgart et Sandborn 2012, Lahad et Weiss 2015). Les premiers traitements consistent en la prise de médicaments ciblant des composantes spécifiques des processus d'inflammation, notamment des drogues fixant le TNF (*Tumor Necrosis Factor*) - α (Morrison *et al.* 2009, Lahad et Weiss 2015). Des études ont démontré une augmentation de la concentration de TNF- α , une molécule activant une voie de signalisation responsable de l'inflammation chronique de la maladie (Ruemmele *et al.* 2004), cependant il n'a pas encore été déterminé si cette cytokine contribue ou résulte de la maladie. Ainsi, par l'utilisation de bloqueurs de TNF- α , empêchant la molécule de se fixer à son récepteur, la signalisation intracellulaire produisant des protéines pro-inflammatoires est inhibée. D'autres études ont également montré la participation des molécules d'adhésion cellulaire (MAC), tels les intégrines, lors de la recrudescence retrouvée chez la MC. En bloquant l'habileté des cellules de communiquer entre-elles par les MAC, la migration des leucocytes diminue ce qui en retour diminue la fréquence et la sévérité de l'inflammation (Panes *et al.* 2007). L'administration de monothérapie ou de combinaison de traitement aux stéroïdes et/ou aux agents anti-TNF- α est également utilisé pour contrôler l'inflammation (Baumgart et Sandborn 2012, Lahad et Weiss 2015). Par ailleurs, les médicaments à action rapide, comme les stéroïdes, sont souvent combinés avec des médicaments à action lente, tels que l'immunothérapie (Baumgart et Sandborn 2012, Morrison *et al.* 2009). Lorsque la thérapie par prise de médicaments échoue et que les dommages à la paroi de l'intestin sont trop importants, la résection chirurgicale doit être considérée (Cosnes

et al. 2011). La majorité des patients de la MC, entre 70 et 80%, requiert une intervention chirurgicale dans les 20 années qui suivent le diagnostic (Cosnes *et al.* 2011), et la majorité des patients subissant une chirurgie risquent une récurrence de la maladie (De Cruz *et al.* 2013). La proportion de patients où les résultats de leur endoscopie sont normal 10 ans post-chirurgicale représente moins de 5% (Cosnes *et al.* 2011). Le risque de réapparition dépend de l'usage de tabac, l'étendue des dommages causés à la paroi du tractus GI, et l'historique chirurgical du patient (Baumgart et Sandborn 2012).

De nouveaux traitements sont en plein développement, la recherche enquête sur l'efficacité des anticorps ciblant soit les IL impliquées dans la cascade pro-inflammatoire (Johnson and Johnson pharmaceutical research and development 2013, Anonyme 2013 A, B), thérapie anti cellule T (Sandborn *et al.* 2010, Sandborn *et al.* 2012, Ciccocioppo *et al.* 2011), thérapie anti-inflammatoire (Buruiana *et al.* 2010), hormone de croissance humaine (Denson *et al.* 2010), l'acide linoléique conjugué (Bassaganya-Riera *et al.* 2012), la rifaximin (Lee 2012).

1.2.6. Maladie de Crohn en pédiatrie

1.2.6.1. Fréquence

La distribution selon l'âge de l'apparition de la maladie n'est pas uniforme dans la population des gens atteints de la MC, elle est bimodale. Le premier pic de diagnostic survient dans le début de la vingtaine suivi d'un second pic, entre 50 et 70 ans. Quant à eux, les cas pédiatriques représentent environ 25% de tous les cas diagnostiqués (Benchimol *et al.* 2011). Les caractéristiques des patients et de la MC diffèrent entre les cas adultes et pédiatriques. Par exemple, les hommes sont plus souvent diagnostiqués à l'enfance, alors que la majorité des cas adultes sont des femmes. De plus, la MC est légèrement plus fréquente chez les femmes avec un ratio H:F égale à 1:1.2 (Loftus 2004). Cependant, il a été démontré que l'incidence de la MC chez les hommes a augmenté et va éventuellement égaler celle des femmes. (Cosnes *et al.* 2011, Benchimol *et al.* 2011). De plus, les cas pédiatriques de la MC posent des défis uniques à ce sous-groupe, puisqu'il affecte les individus durant une période de développement (Bousvaros *et al.* 2006).

1.2.6.2. Défis

Le retard de croissance est un des premiers défis rencontrés par les enfants souffrant d'une MC. En 2012, une méta-analyse de plusieurs études a reporté que la MC provoque une diminution de la croissance chez l'enfant (Abraham *et al.* 2012). Le taux de retard de croissance, défini par une grandeur au-dessous du troisième percentile, était enregistrée et variait entre 10% et 56% au moment du diagnostic de la MC (Abraham *et al.* 2012). Ceci est principalement dû par

la diminution de la capacité affaiblie du tractus GI à absorber les nutriments causée par l'inflammation de la MC. La résultante est des enfants/adolescents incapables de combler leur besoin calorique, donc une croissance diminuée (Bousvaros *et al.* 2006). Les risques d'une déficience nutritionnelle sont nombreux, notamment l'insuffisance en vitamine D cause une déminéralisation des os (Kim et Ferry 2004). La défaillance de l'absorption des nutriments n'est pas le seul facteur responsable du retard de croissance, le déséquilibre immunologique retrouvé chez les enfants atteints de la MC peut perturber la libération d'hormone de croissance (Kim et Ferry 2004).

Les conditions de vie des cas pédiatriques sont gravement affectées dues à la nature chronique de la maladie, soit le retour incessant des symptômes. La réduction de la qualité de vie se manifeste à travers des conflits familiaux, des problèmes de socialisation, d'observance thérapeutique, d'absence répétée à l'école ou aux activités parascolaires, sans oublier la possibilité de dépression et d'anxiété (Bousvaros *et al.* 2006). Les enfants et adolescents atteints pas la MC sont significativement plus à risque de développer des désordres psychiatriques, comparativement à la population en général (Kim et Ferry 2004).

1.2.7. Épidémiologie

1.2.7.1. Tendances temporelle

Au cours du dernier siècle, il y a eu une augmentation notable de l'incidence de la MC. Une étude par Molodecky et ses collaborateurs démontre une augmentation chez 75% des tendances régionales, et est statistiquement significatif à travers le temps. Cette méta-analyse évalue cette augmentation entre 2.4% et 18.1% (**Figure 1.3**) (Molodecky *et al.* 2012). Toutefois, cette tendance pourrait être expliquée par une amélioration des techniques de diagnostic à travers le temps (Lowe *et al.* 2009). Du côté des cas pédiatriques, la prévalence a également augmenté dans les 40 dernières années (Kim et Ferry 2004). En 2011, une revue systématique au niveau internationale des taux d'incidences des cas pédiatriques de la MC a démontré que 60% des études interrogées ont reporté une augmentation tangible de l'incidence de la maladie (Benchimol *et al.* 2011).

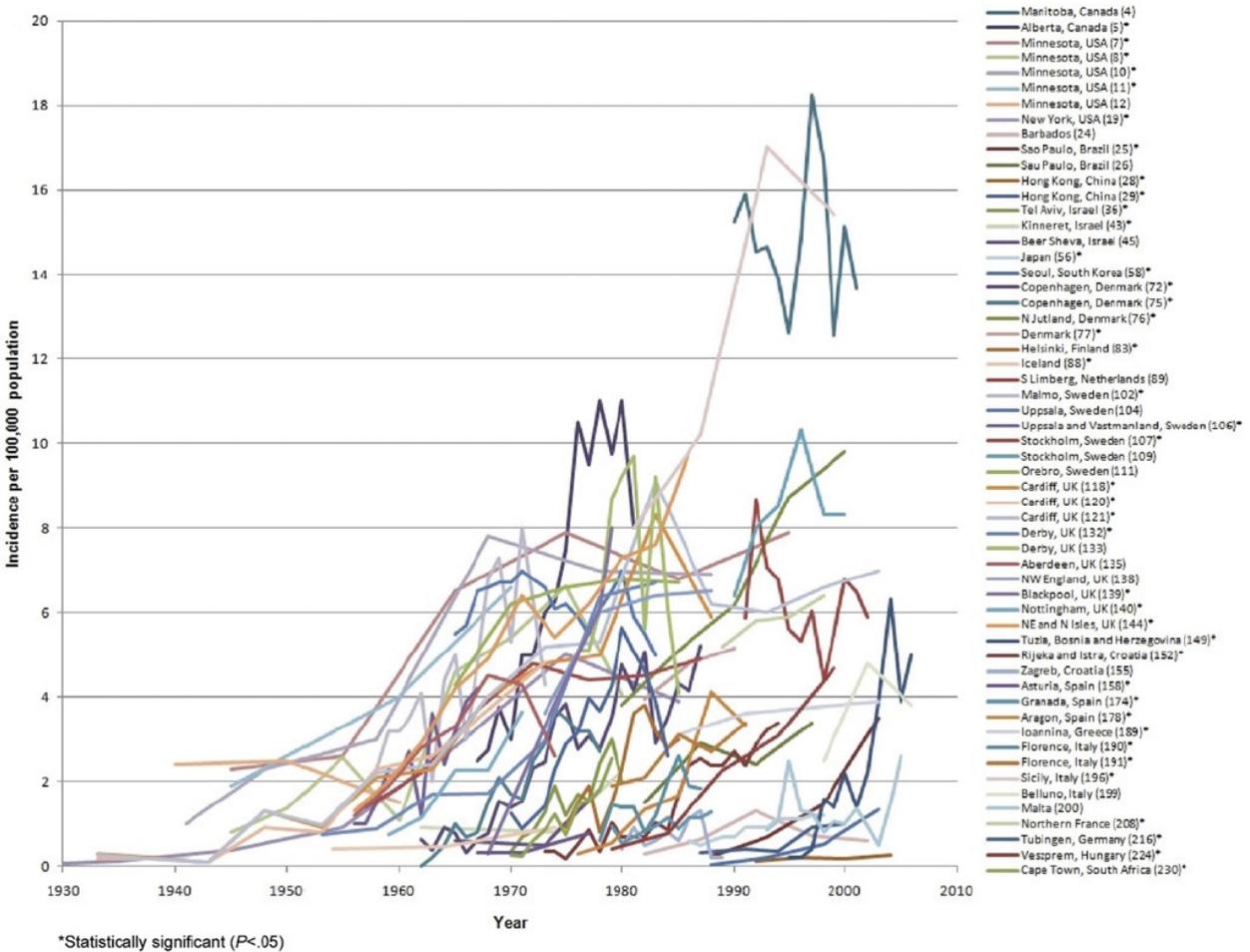


Figure 1.3. Tendances temporelles des taux d'incidence pour les études ayant reportées un minimum de 10 ans de données et avec au moins 3 points dans le temps pour la maladie de Crohn. (Référence : Molodecky *et al.* 2012).

1.2.7.2. Tendence géographique

Toujours d'après l'étude de Molodecky et ses collègues, ils ont déterminé la prévalence et le taux d'incidence des MICI depuis 1980 par région. Une haute incidence est observée dans les pays développés, soit en Amérique de Nord, en Europe et en Australie. Le contraire est également observé en Afrique, en Asie et en Amérique du Sud (**Figure 1.4**). Ces données concordent avec une revue littéraire précédente, conduit par Economou et Pappas en 2008 (Economou et Pappas 2008). Cependant, il est important de noter que la plupart des études épidémiologiques sont faite en Europe du Nord, au Royaume-Uni et en Amérique du Nord (Ng *et al.* 2013, Molodecky *et al.* 2012). Le manque de données collectées dans d'autres pays peut expliquer en partie la différence entre les taux d'incidences. Les tendances géographiques observées dans les cas adultes de la MC sont également présent chez les cas pédiatriques de la MC, démontré par Benchimol et ses

collaborateurs (Benchimol *et al.* 2011). Cependant, au cours des dernières années, une stagnation est observée dans des pays développés et une augmentation dans des pays en voie de développement autant chez les adultes que chez les enfants (Hou *et al.* 2009). Au Canada, il existe un gradient Ouest-Est; le taux d'incidence est plus bas en Colombie-Britannique, et plus élevé au Québec et en Nouvelle-Écosse (Lowe *et al.* 2009). La cause du gradient est inconnue, mais peut être expliquée par les différences entre les régions rurales et urbaines, étant plus élevé dans les régions urbaines (Ananthakrishnan 2015), et par une distribution de l'immigration asymétrique (Lowe *et al.* 2009, Molodecky *et al.* 2012).

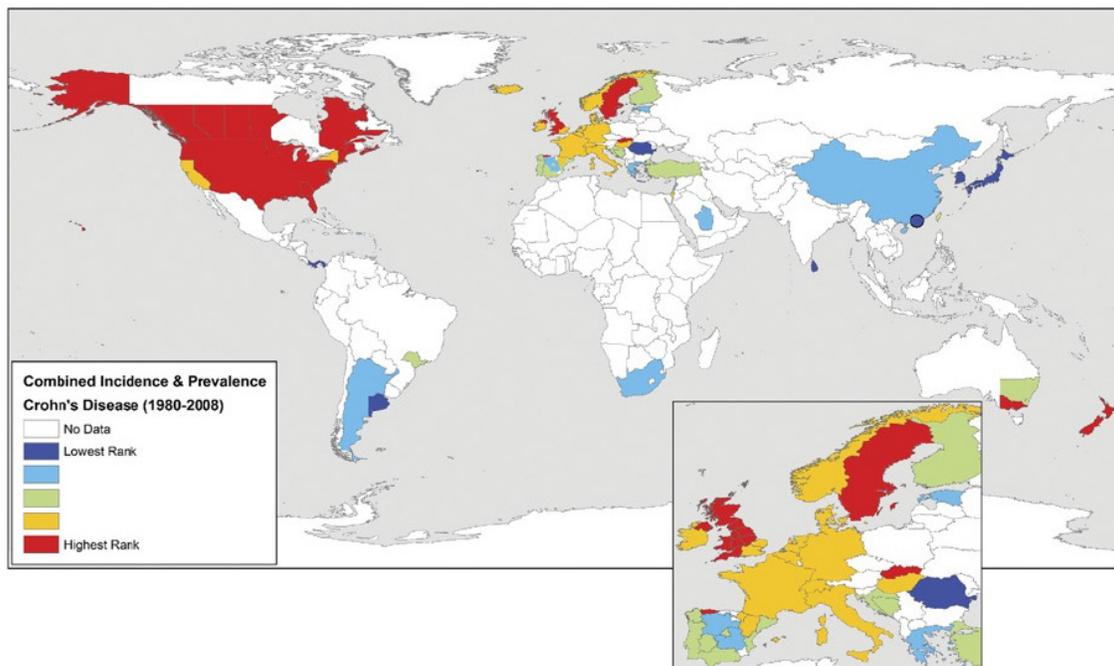


Figure 1.4. Taux d'incidence et/ou de prévalence mondiale de la maladie de Crohn pour les pays ayant fournies des données. Les valeurs d'incidences et de prévalences ont été classées en quintiles représentant de faibles (bleu foncé et bleu clair) à intermédiaire (green) à occurrences élevées (jaune et rouge) (Référence : Molodecky et al. 2012).

1.2.8. Étiopathogénèse de la Maladie de Crohn: Facteurs de risques

L'étiologie de la MC est inconnue, mais elle serait le résultat d'une combinaison de facteurs génétiques, environnementaux et immunologiques.

1.2.8.1. Facteurs Génétiques

La susceptibilité génétique est supportée par les données épidémiologiques, incluant les prévalences familiales et chez les jumeaux, et les différences ethniques. Plus particulièrement, des études sur des jumeaux monozygotes ont montré que la concordance des taux de la MC est autour

de 20 à 50%, tandis que chez les jumeaux dizygotiques élevés dans le même environnement est moins de 10% (Halme *et al.* 2006).

Plus récemment, les dernières avancées dans la compréhension génétique de cette maladie proviennent d'études d'association pangénomique (GWAS). Une méta-analyse récente de six GWAS sur la MC a identifié jusqu'à ce jour plus de 71 loci affectés dans cette maladie (Franke *et al.* 2010). Parmi ceux-ci, NOD (*nucleotide-binding-oligomerization domain*) -2, qui est localisé sur le chromosome 16 dans le locus IBD1 (*Inflammatory Bowel Disease protein 1*), a été largement le plus étudié (Ogura *et al.* 2001, Strober *et al.* 2008). NOD2, également appelé CARD15 *caspase activation recruitment domain family-15*, est une protéine intracellulaire exprimée par les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques (DC) et les cellules de Paneth dans la lamina propria. Elle joue aussi un rôle clé dans l'immunité innée intestinale. CARD15 reconnaît le muramyl-dipeptide, un composé retrouvé chez les bactéries Gram positifs et Gram négatifs, déclenchant la production de cytokines pro-inflammatoires et, conséquemment, déterminant s'il y a ou non inflammation intestinale. Les malades de Crohn ayant une mutation de NOD2 sont associées à une apparition plus précoce de la maladie localisée à l'iléon, ainsi qu'à la présence de sténose plus étendues et de fistules entéro-entériques.

L'altération du traitement intracellulaire des bactéries dans la pathogenèse de la MC est davantage confirmée par l'association spécifique des gènes de l'autophagie, dont l'ATG16L1 (*Autophagy-related protein 16-like 1*), et l'IRGM, (*Immunity-related GTPase family M protein*) (Noomen *et al.* 2009). Outre l'autophagie, l'apoptose est l'un des processus affectés dans la MC, tel que démontré par la corrélation de polymorphismes des gènes pro-apoptotiques et anti-apoptotiques (Fiocchi 2009).

De plus, la MC partage plusieurs locus avec la CU, incluant : le gène codant pour le transporteur de cations l'IBD5 (*Inflammatory Bowel Disease 5*) localisé sur le chromosome 5; l'OCTN (*Organic Cation/Carnitine Transporter*)-1 et -2; le gène codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité IBD3 (*Inflammatory Bowel Disease 3*) localisés sur le chromosome 6; le variant de DLG5 (*Disk Large Homolog 5*) codant pour la protéine d'échafaudage impliqué dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium; le récepteur de l'IL-23 (IL-23R) activant l'axe des cellules Th17; ainsi que le TLR4 impliqué dans la signalisation du LPS et, associé à la MC et à la CU (Kaser *et al.* 2010, Cătană *et al.* 2015). La présence de ces loci chez la MC et la CU suggèrent des mécanismes pathogéniques additionnels expliquant l'inflammation retrouvée dans l'intestin. Au total, plus de 160 loci sont associés au MICI et 140 loci sont associés avec la MC (Ananthakrishnan 2013, Jostins *et al.* 2012). Cependant, la présence de loci particuliers

expliquent moins du tiers des cas de MC, supportant l'idée d'une interaction entre les gènes et l'environnement.

1.2.8.2. Facteurs environnementaux

Plusieurs facteurs environnementaux ont été identifiés, mais d'autres demeurent ambigus, par exemple la diète. À ce jour, il n'y a toujours pas d'évidence sur le rôle possible de la diète dans la pathogenèse de la MC. Cependant, une hypothèse suggère que l'absorption excessive de sucre raffiné ou bien de gras polyinsaturés puisse augmenter le risque de MICI, particulièrement pour la MC (Lee *et al.* 2015) et qu'une diète incluant des fibres serait protectrice contre le développement de MICI (Liu *et al.* 2015). Par ailleurs, le tabagisme aggrave la progression de la MC, ainsi elle favorise l'apparition de fistules et de sténose, il y a également augmentation de la fréquence des recrudescences de la maladie et des rechutes post-chirurgicales. Récemment, l'exposition à la fumée secondaire a aussi été identifiée comme étant un facteur de risque au développement de la MC (van der Heire *et al.* 2009).

Parmi les facteurs environnementaux, les microorganismes sont généralement ciblés pour la MC. Dû à sa ressemblance avec la maladie de Johne, une entérite chronique causée par une infection communément appelé paratuberculose, la MC a été associée avec une infection à *Mycobacterium avium* (Feller *et al.* 2007). Toutefois, des thérapies antituberculeuses ont été démontrées inefficaces dans ces conditions (Selby *et al.* 2007). De plus, une étude utilisant des souris maintenues en environnement stérile a démontré l'absence de développement de la CU, supportant l'hypothèse d'une implication de la flore intestinale dans la pathogenèse des MICI. Les recherches se sont concentrées sur *Bacteroides* et *Escherichia coli* dus à leur aptitude de produire des molécules d'adhésion capable de promouvoir la colonisation de l'épithélium intestinale, en plus de sécréter des cytotoxines responsables de la perturbation de l'épithélium et de la réponse immunitaire. Il y a peu de preuve suggérant qu'une infection virale et aucune, que la vaccination contenant des virus atténués de rougeole, oreillons, et de rubéole cause des MICI (Di Sabatino *et al.* 2013).

Certains éléments appuient l'association entre la prise de drogues anti-inflammatoires non stéroïdiennes et la recrudescence des symptômes des MICI (Singh *et al.* 2009). De plus, une récente méta-analyse a procuré des indices sur une association entre l'utilisation d'agents contraceptifs oraux et le développement de MICI, particulièrement dans la MC (Cornish *et al.* 2008).

Le stress psychologique et la dépression ont un rôle possible, quoique très controversé encore, concernant les poussées de douleurs chez les malades de Crohn se trouvant à un stade

quiescent de la maladie. Toutefois, des études récentes montrent une interaction étroite entre les systèmes nerveux et immunitaires (Collins et Bercik 2009).

D'autre part, une opération chirurgicale, telle l'appendicectomie, est susceptible d'avoir un effet négatif. Cette opération est associée avec un risque plus élevé de développer des sténoses intestinales chez les patients atteints de la MC (Lakatos 2009). Il existe d'autres risques possibles pour la MC, tel sont l'utilisation d'antibiotiques et le statut socioéconomique. Tandis que l'allaitement et l'exposition à la lumière, soit l'augmentation de la production de la vitamine D, sont considérés comme ayant un effet protecteur (Frolkis *et al.* 2013, Ananthakrishnan 2013, Ng *et al.* 2013, Green *et al.* 2006). Toutefois, les données entourant ces facteurs sont toujours inconsistantes, et leur association avec la MC est encore controversée.

1.2.8.3. Facteurs Immunologiques

Il est communément accepté que la MC soit le résultat d'une réponse inappropriée de l'immunité de la muqueuse intestinale face à la flore microbienne. Cependant, le mécanisme exact de l'apparition de la maladie reste toujours incompris. À ce jour, la communauté scientifique propose que la présence de facteurs multiples est responsable de l'activation de la cascade d'inflammation ce qui mène ultimement à des lésions intestinales. Plus spécifiquement, un épithélium ayant un défaut dans sa perméabilité est susceptible de permettre le passage paracellulaire de bactéries antigéniques. Ces pathogènes, lorsque présents dans la lamina propria, sont présentés de façon aberrante aux macrophages et aux cellules T qui, activés, participent à stimuler la cascade de l'inflammation. Qui plus est, les bactéries peuvent déclencher une inflammation même si elles ne passent pas à travers la barrière intestinale; elles peuvent être capturées par les DC, allongeant leurs pseudopodes à travers les espaces intercellulaires, ou être capturées via les récepteurs de type Toll (TLR) exprimé à la surface des cellules épithéliales (Rescigno et Di Sabatino 2009).

Parmi les facteurs immunologiques, le débalancement entre l'expression des gènes pro-apoptotiques et anti-apoptotique cause une déficience de l'apoptose des lymphocytes de la lamina propria provoquant une augmentation de la survie des cellules T. Conséquemment, ces cellules, responsables de la relâche de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires, perpétuent les dommages à la muqueuse intestinale. Dans la MC, les DC et les macrophages activés polarisent les lymphocytes T naïfs en lymphocyte T auxiliaire (Th) de type 1 ou 17 par l'action de l'IL-12 ou IL-23, respectivement. D'un côté, IL-12 stimule les cellules Th1 à produire de large quantités de TNF- α , d'interféron (IFN)- γ , et d'IL-2 tous sous le contrôle du facteur de transcription *T-bet* (Macdonald et Monteleone 2005, Cătană *et al.* 2015). D'un autre côté, l'IL-23

maintient la prolifération de la population Th17 et la production de l'IL-17 sous le contrôle du récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) *-related orphan receptor C* (RORC) (Abraham et Cho 2009). Pendant que les cytokines de **type** Th1 agissent sur les populations locales et promeuvent la phagocytose, s'accroît par la suite le recrutement d'autres types cellulaires inflammatoires, et une augmentation de la destruction des tissus. Pour ce qui est de l'IL-17, elle promeut le recrutement des neutrophiles aux régions inflammées de l'intestin par l'induction de la sécrétion de l'IL-8 des cellules épithéliales (Laan *et al.* 2001) (**Figure 1.5**).

La progression de l'inflammation dans la MC est un sujet bien compris, cependant les connaissances concernant l'apparition des sténoses demeurent limitées. Selon la littérature, l'inflammation intestinale transmurale et la réparation de blessure déclenchent une dérégulation du remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) qui ultimement cause la fibrose des parois de l'intestin. Le renouvellement normal de la MEC est régulé par un balancement des métalloprotéinases matricielles (MMP) et des *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMP). Les MMP dégradent plusieurs protéines extracellulaires, comme le collagène, laminine, et la fibronectine, et leurs activités accrues dans la MC peuvent amener vers une MEC altéré, soit l'apparition d'ulcère et de fistule. Les TIMP quant à eux inhibent l'activité des MMP et peuvent mener à l'apparition de fibrose et de sténose.

Il n'y a aucun doute que plusieurs types cellulaires, plutôt qu'un seul type, soient responsables de l'apparition de la fibrogenèse intestinale. Parmi les différentes cytokines impliquées dans la fibrogenèse, la plus étudiée est le facteur de croissance transformant (TGF)- β . Cette cytokine ainsi que ces récepteurs sont surexprimés au niveau des sténoses. Le TGF- β , mis à part une augmentation de la production de la MEC, provoque un changement phénotypique, soit une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Un mécanisme par lequel le phénotype épithélial, caractérisé par des jonctions cellules-cellules fortes et une polarité, est remplacé par un phénotype mésenchymateux, soit caractérisé par une interaction intercellulaire atténuée et une morphologie fibroblastique (Rieder et Fiocchi 2009, Di Sabatino *et al.* 2009).

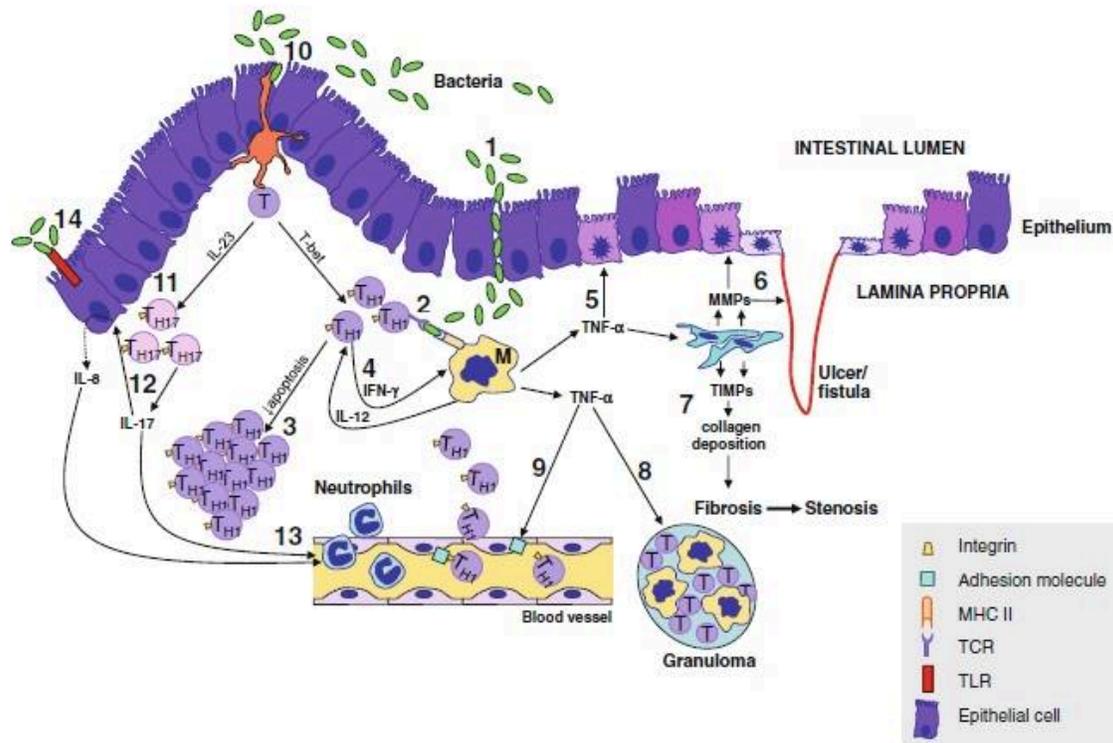


Figure 1.5 : Représentation schématique de l'immunopathogénèse retrouvée chez la maladie de Crohn. Transmigration paracellulaire des pathogènes/antigènes (1). Les bactéries peuvent déclencher l'inflammation soit par les TLR (14) ou bien par les DC (10). Les DC polarisent les lymphocytes T en Th17 via IL-23 (11). Les Th1, activé de façon aberrante, produisent de grande quantité de cytokines pro-inflammatoires (2). Parmi ceux-ci, l'IFN- γ promeut la production de l'IL-12 par les macrophages. L'IL-12 va soutenir l'activation des cellules T (4). L'altération de l'apoptose des cellules T observée dans la lamina propria cause alors l'augmentation de leur survie (3). L'IL-17, produit par les Th17, promeut le recrutement des neutrophiles dans l'intestin inflammé (13). De plus, les cellules épithéliales sécrètent l'IL-8, déclenché par l'IL-17 et les TLR activés (12) (14) qui va promouvoir le recrutement des neutrophiles à la muqueuse inflammé. Par ailleurs, les macrophages sécrètent TNF- α causant le recrutement des neutrophiles dans l'intestin inflammé, par le recrutement de molécule d'adhésion des cellules endothéliales (9). Le TNF- α est responsable des dommages à l'épithélium (5), à la formation de granulomes (8). Le TNF- α provoque un déséquilibre de la sécrétion d'enzyme des fibroblastes, soit par la production de MMP, responsable de la dégradation des tissus conjonctifs et l'apparition d'ulcère et de fistule (6), ou vers un excès de TIMP créant des dépôts de collagène, menant vers la fibrose et des sténoses (7). (Référence : Di Sabatino *et al.* 2013).

1.3. Inflammation

Comme la MC est caractérisée par la présence d'une inflammation chronique, un bref aperçu de ce sujet est présenté dans cette section.

L'inflammation est une réponse biologique aux dommages cellulaires et tissulaire, et aux irritants (chimique, mécanique, thermique, stimuli radiatif). Ce phénomène permet de contrer les infections, ou autres stress cellulaires. Il est caractérisé par 4 signes : la chaleur, la douleur, la rougeur et un gonflement. Ce processus, qu'est l'inflammation, est initié par les cellules formant le système immunitaire inné et adaptatif, ainsi que les autres cellules immunocompétentes. Ces cellules incluent les macrophages, les mastocytes, les granulocytes, les DC, les cellules *Natural Killer* (NK), les cellules endothéliales, et les cellules épithéliales de la muqueuse (Jha et Ting 2015). Les cellules du système immunitaire inné surveillent l'espace extracellulaire aussi bien que plusieurs compartiments subcellulaires et possèdent de nombreux récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR), afin de repérer les différents motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) ou bien des motifs moléculaires associés aux dégâts ou danger (DAMP). Ces molécules exogènes et endogènes altérées peuvent activer le système immunitaire lorsque trop abondantes ou localisées atypiquement (Kawai et Akira 2011, Kato *et al.* 2011, Corridoni *et al.* 2014). Les PRR incluent les TLR, les récepteurs de type NOD (NLR), les récepteurs de type RIG-I (*Retinoid acid-inducible gene-I-Like Receptors*, RLR), les récepteurs de type C des lectines (*C-type Lectin Receptor*, CLR), et les récepteurs de type AIM2 (ALR) (Matusiak *et al.* 2015). Parmi lesquels, les deux formes majeures de ce type de récepteurs sont les TLR et NLR et, une fois activés, déclenchent une réaction inflammatoire. Par ailleurs, les cellules du système immunitaire innées vont, par exemple, phagocyter et éliminer les particules étrangères, les débris ou les pathogènes. Simultanément, celles-ci relâchent des cytokines, des chimiokines et d'autres médiateurs, déclenchant chez les cellules environnantes des réponses immunitaires nécessaires pour la protection de l'hôte. Ces réponses se traduisent par l'activation des voies de signalisation de NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*), de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), et d'IFN de type I (Jha et Ting 2015).

Pour ce qui est de la flore microbienne, les pathogènes envahissant et causant des dommages tissulaires doivent être éliminés, alors que la flore commensale favorisant la survie de l'hôte doit être tolérée (Buccigrossi et al. 2013). Dans ce cas, l'inflammation aiguë permet de protéger la flore ainsi que l'hôte contre les infections. Si l'inflammation devient chronique, incontrôlée et non résolue, il y a apparition de maladie. En effet, une inflammation dérégulée est la cause centrale de plusieurs maladies, telle les maladies auto-immunes, les allergies, les cancers, les maladies métaboliques et, bien entendu, les MICI. Ces dérégulations peuvent être expliquées par des failles dans les mécanismes d'atténuation de l'inflammation. La modulation du système immunitaire peut être regroupée en cinq stratégies. Le premier niveau agit au niveau de la régulation transcriptionnelle, par exemple la réponse contre le LPS des TLR déclenche une

reprogrammation de milliers d'ARNm incluant des gènes pro-inflammatoires, mais également des gènes anti-inflammatoires. Une deuxième tactique se trouve dans la demi-vie des transcrits de gènes inflammatoires, les motifs ARE (*adenylate-uridylate-rich elements*) dans les ARNm non traduits déclenchent une dégradation rapide des transcrits (Carpenter *et al.* 2014). Une troisième stratégie s'effectue via la régulation spatio-temporelle de l'expression des gènes inflammatoires. Par exemple, certains TLR localisés où il y a une forte exposition aux micro-organismes, tel le tractus GI, sont exprimés à des concentrations faibles. Par ailleurs, une tolérance face à une exposition prolongée d'un ligand se traduit par une diminution de l'expression de TLR. Ces deux phénomènes empêchent l'exposition continue de provoquer une inflammation non contrôlée. La quatrième modulation englobe les leurres, des molécules dont les domaines nécessaires à la transduction du signal sont absents. Ces leurres compétitionnent avec les vrais modulateurs ce qui affaiblit l'inflammation. En effet, l'IL-18BP sécrétée neutralise l'activité pro-inflammatoire de l'IL-18, empêchant celle-ci de se lier à IL-18R (Novick *et al.* 1999). Finalement, les dominants négatifs représentent une classe de molécules modulant la transduction du signal des réponses immunitaire innée et ce, en interférant physiquement avec les récepteurs immunitaires ou tout autres molécules adaptatrices (Matusiak *et al.* 2015). Par exemple, SIGIRR interfère avec les récepteurs de la famille des TIR tel que nous le verrons plus en détail, en plus du lien avec l'inflammasome.

1.4. Inflammasome

Un inflammasome est un complexe multimoléculaire qui entraîne l'activation de la caspase-1. La caspase-1 activée, parmi d'autres substrats, clive et convertit plusieurs membres des cytokines de la famille de l'IL-1 (par exemple, l'IL-1, l'IL-18, l'IL-37, etc.) à leurs formes matures. Puisque le complexe permet la maturation de l'IL-37, nouvellement identifié comme ligand de SIGIRR, nous nous intéresserons à ce sujet.

1.4.1. NLR

Les NLR sont un groupe conservé de PRR intracellulaires jouant un rôle pivot dans l'immunité innée. La famille des NLR inclut 22 protéines identifiées chez les humains et approximativement 33 gènes de NLR chez la souris (Chen *et al.* 2009). La structure des NLR sont caractérisés par : un domaine central NOD qui médie l'auto-oligomérisation et par le fait même l'activation des signaux pro-inflammatoires; une région variable en N-terminale possédant un domaine d'interaction protéine-protéine défini par le recrutement d'un domaine CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain*); et un domaine répété riche en leucine (LRR) en C-terminal capable de détecter les PAMP et DAMP directement et/ou indirectement. Selon la variation

retrouvée au domaine N-terminales, la famille des NLR peut être classifiée en 5 sous-groupes : NLRA ; NLRB ; NLRC (incluant la molécule CARD) ; NLRP (contenant un domaine pyrine; PYD); et NLRX. NLRX est une sous-famille additionnelle qui n'a pas d'homologie avec le domaine-N-terminale des 4 autres sous-ensembles et possède un seul membre, NLRX1, retrouvé dans la mitochondrie (Corridoni *et al.* 2014).

Jusqu'à ce jour plusieurs NLR ont été identifiés comme composante des inflammasomes. Celui-ci est un complexe oligomérique de protéines, lorsqu'assemblé, capable d'activer une réponse pro-inflammatoire rapide et puissante par deux voies de signalisation, toutes deux dépendant de l'activation de la caspase-1. La première par le traitement de cytokines pro-inflammatoires, l'IL-18 et l'IL-1 β , et l'autre par le déclenchement de la pyroptose, forme de mort cellulaire. Le rôle de la pyroptose est de d'éliminer toutes cellules affectés pouvant être nocif pour l'organisme. Ainsi, la pyroptose est caractérisée par le gonflement de la cellule, par la libération d'éléments cytosoliques, suivi par l'inflammation (Jang *et al.* 2015). Les inflammasomes, de façon générale, sont constituées d'une *inflammasome sensor molecule* souvent un NLR, d'une protéine adaptatrice ASC (*Apoptotic-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain*), et de la caspase 1 (Latz *et al.* 2014). Plusieurs inflammasomes activent la caspase 1, mais le plus important demeure le NLRP3.

1.4.2. NLRP3

Le NLRP3 est un membre de la sous-famille des NLRP unique en son genre, puisqu'il possède un niveau basal d'expression insuffisant pour activer la formation de l'inflammasome chez les cellules quiescentes (Bauernfeind *et al.* 2009, Franchi *et al.* 2009). L'inflammasome provenant de l'activation de NLRP3 est organisé de façon plutôt simple; une molécule de NLRP3 (LRR-NOD-PYD), une molécule ASC, et la caspase-1 (**Figure 1.6**). Cet inflammasome reconnaît une variété de stimuli exogènes et endogènes, tel que le muramyl-dipeptide (MDP), le LPS, l'acide ribonucléique (ARN) bactérien, l'ARN / l'acide désoxyribonucléique (ADN) virale, et des cristaux d'acide urique (Corridoni *et al.* 2014).

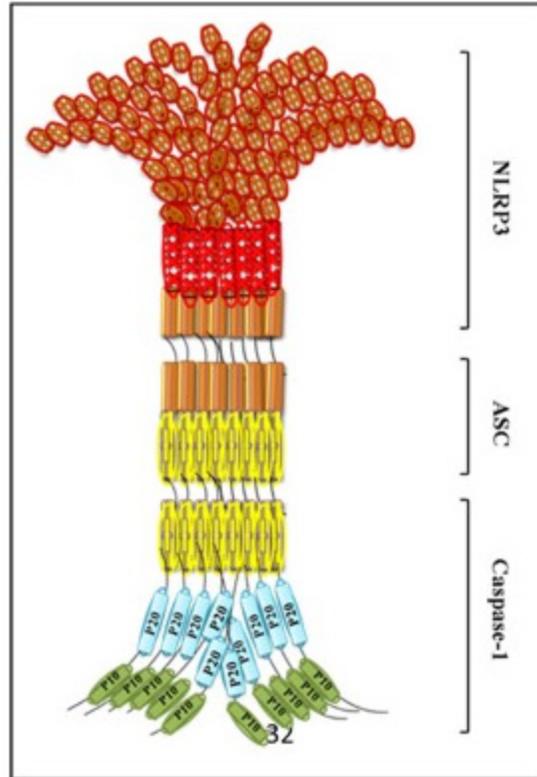


Figure 1.6. Structure et l'assemblage d'un inflammasome. Représentation de l'assemblage d'un inflammasome (NLRP3). La molécule NLRP3 est composé d'un domaine LRR, un domaine NOD, et un domaine PYD, la molécule ASC est composé d'un domaine PYD et CARD, et la caspase-1 est composé d'un domaine CARD et des sous-unités P20 et P10. (Référence : Ahmad A *et al.* 2015).

Le faible niveau basal de NLRP3 est expliqué par le mécanisme-même d'activation de l'inflammasome. Ce mécanisme déclenche une réaction inflammatoire forte par la relâche de cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 β et l'IL-18, et s'accomplit en deux étapes : un signal d'amorçage suivi d'un signal d'activation. Le signal d'amorçage débute par la détection d'un PAMP par un TLR. Cette reconnaissance induit, dans la cellule, un programme d'expression pro-inflammatoire où l'expression de protéines telles que la pro-IL-1 β , la pro-IL-18, la pro-caspase-1, et le NLRP3 augmentent. La deuxième étape, celle d'activation, est le mécanisme menant à l'assemblage de l'inflammasome. Cette étape débute par la reconnaissance des ligands de NLRP3. Cette interaction déclenche l'assemblage avec la protéine adaptatrice ASC, par une interaction PYD-PYD, en une protéine large consistant en grande partie de multimères et de dimères d'ASC (Latz *et al.* 2013). Par la suite, à l'aide de son domaine CARD, ASC recrute et amène des monomères de pro-caspase-1 à proximité, ce qui initie l'auto-clivage de la pro-caspase-1 et forme l'hétéro-tétramère actif de la caspase 1. Cette enzyme, maintenant active, va

cliver certaines protéines, tel que la pro-IL- β et la pro-IL-18. Le tout se termine par la relâche de l'IL-1 β et l'IL-18 biologiquement actives, qui participent à promouvoir l'inflammation (Aguilera *et al.* 2014) (**Figure 1.7**).

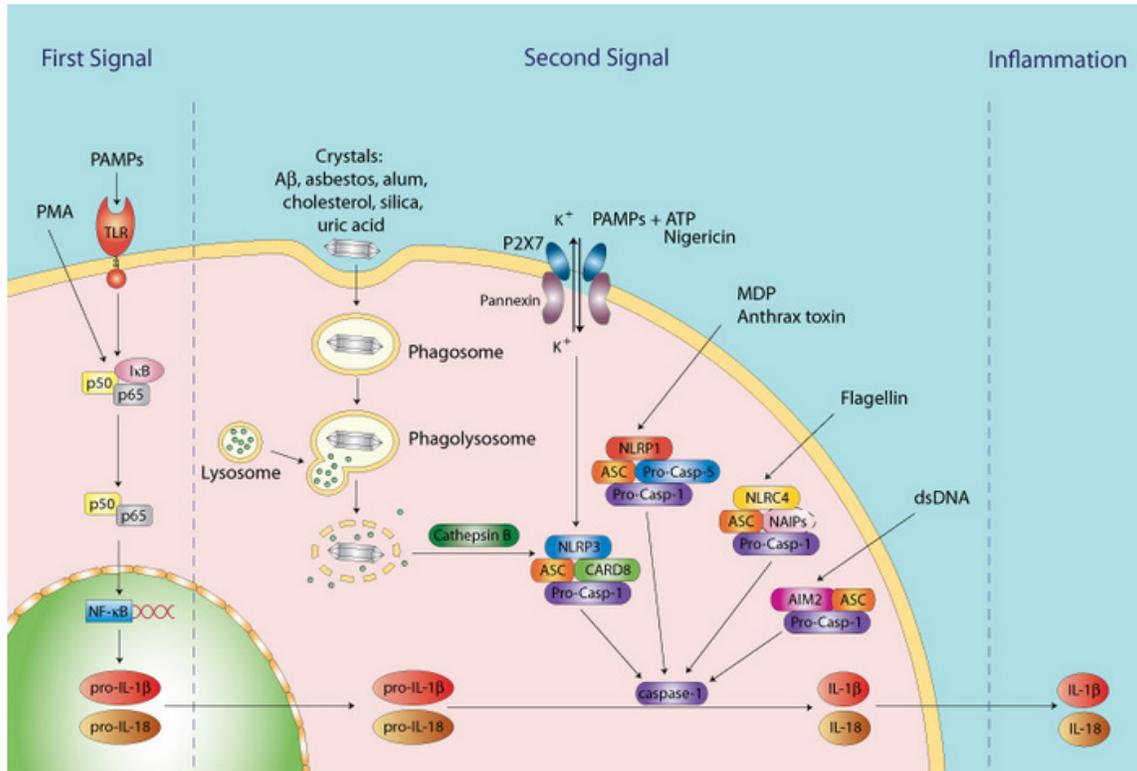


Figure 1.7. Mécanisme d'activation des inflammasomes. Le signal d'amorçage déclenche l'augmentation de l'expression des protéines pro-IL-18 et pro-IL-1 β . Le signal d'activation induit l'assemblage des inflammasomes et l'activation de la caspase-1. Il y a par sécrétion des cytokines matures, IL-18 e IL-1 β , clivé par la caspase-1. PMA : *Phorbol 12-myristate 13-acetate*. (Référence : Invivogen 2012)

De plus, les études sur de souris déficientes en NLRP3 et en caspase-1 montrent des signes sévères d'inflammation chronique, ces défauts permettent aux bactéries d'envahir la lamina propria et la muqueuse intestinale. NLRP3 possède un effet bénéfique dans l'homéostasie et en cas d'une dérégulation peut être responsable d'une maladie inflammation chronique, déclenchant une colite chez la souris ou des cancers associés à la colite (CAC) (Hirota *et al.* 2011, Baeur *et al.* 2010, Dupaul-Chicoine *et al.* 2010, Allen *et al.* 2010). Pris ensemble, ces résultats indiquent que NLRP3 joue un rôle central dans la régulation de l'intégrité de la muqueuse intestinale sous conditions homéostatiques et dans le contrôle de l'immunité innée. De plus, l'absence de NLRP3 est associée à des défauts de production de certaines cytokines : l'IL-18 et l'IL-1 β . Ceci résulte en une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal. Les

effecteurs de NLRP3, l'IL-1 β et l'IL-18, jouent un rôle double; une dérégulation au niveau de leur expression peut amener une protection bénéfique pour l'hôte, soit causer une inflammation dommageable dépendamment de la phase de la maladie (Corridoni *et al.* 2014, Palomo *et al.* 2015).

Tel que mentionné plus haut, la dérégulation peut être causée par les mécanismes d'atténuation de l'inflammation. Plusieurs régulateurs négatifs existent pour contrer les effets des inflammasomes notamment des protéines contenant seulement un domaine PYD (*Pyrin-Only Protein*, POP) ou CARD (*CARD-Only Protein*, COP) ce qui prévient respectivement la formation des interactions PYD-PYD et CARD-CARD. Ainsi, ces molécules inhibent la formation des inflammasomes (Matusiak *et al.* 2015, Le et Harton 2013). Certains NLR possèdent des activités autorégulatrices agissant comme point de contrôle de la réponse immunitaire (la signalisation immunitaire, les infections et l'inflammation lors de cancer), parmi lesquels nous comptons : NLRX1, NLRP4, NLRP6, NLRP12, NLRC3, et NLRC5 (Jha et Ting 2015). L'IL-37, membre de la famille de l'IL-1, est une nouvelle cytokine intéressante inhibant l'inflammasome et également l'inflammation en générale (Bulau *et al.* 2014, Li *et al.* 2014).

1.5. Interleukine-37

L'IL-37 est un nouveau membre de la famille des IL-1 et partage, avec la sous-famille de l'IL-18, beaucoup de similarités structurales (Ahmad *et al.* 2015). Ils existent 5 variants provenant d'un épissage alternatif, nommés IL-37a à IL-37e. L'isoforme le plus important et le mieux caractérisé est l'IL-37b (Lee et Mazmanian 2010). Elle est principalement exprimée par les cellules sanguines, dans le tractus respiratoire, le tractus GI, et les kératinocytes de la peau (Chen et Fang 2004). Jusqu'à ce jour, aucun homologue n'a été identifié chez la souris. Les études de la fonction de l'IL-37 humaine chez le modèle murin médié par l'expression transgénique, l'infection adénovirale, par l'insertion d'un plasmide ou par l'injection de la protéine recombinante, ont toutes révélé des effets anti-inflammatoires bénéfiques. Qui plus est, plusieurs études sur des maladies inflammatoires, telles que le psoriasis, l'allergie des voies respiratoires, la polyarthrite rhumatoïde, ont récemment révélées une expression altérée de l'IL-37 dans le sérum des patients (Lunding *et al.* 2015, Nold *et al.* 2010, Teng *et al.* 2014, Sakai *et al.* 2012, Ye *et al.* 2015, Palomo *et al.* 2015).

L'IL-37b contient un pro-domaine ainsi qu'un tonneau β , domaine typique retrouvé chez les IL-1 (Li *et al.* 2014). Comme l'IL-1 β et l'IL-18, le pro-domaine de l'IL-37b doit être clivé par la caspase-1 pour le convertir en sa forme mature (Palomo *et al.* 2015). De plus, le domaine en C-terminal possède la capacité de se transloquer au noyau des cellules suivant la stimulation au LPS

(Bulau *et al.* 2014, Sharma *et al.* 2008, Ross *et al.* 2013). En effet, il a été proposé que cette cytokine agisse via deux modes d'action, l'un intracellulaire et l'autre extracellulaire. Suivant sa translocation au noyau, l'IL-37 peut interagir avec SMAD3 (*Mothers Against Decapentaplegic homolog 3*) ce qui lui confère un rôle de modulateur transcriptionnel (Bulau *et al.* 2014, Nold *et al.* 2010). Au niveau extracellulaire, une affinité faible envers l'IL-18Ra a été identifiée, cependant aucun effet n'a été observé quant à la production d'IFN- γ induit par l'IL-18 (Kumar *et al.* 2002). De plus, la liaison de l'IL-37 à l'IL-18BP a aussi été observée et associée à un effet inhibiteur de l'IL-37 sur l'activité de l'IL-18, lorsque l'IL-18BP se trouve à des niveaux faibles (Bufler *et al.* 2002). Récemment, un complexe, formé de l'IL-37, l'IL-18Ra et SIGIRR, a été identifié comme étant capable d'initier les effets anti-inflammatoires extracellulaires de l'IL-37 (Nold-Petry *et al.* 2015). Comme nous l'avons vu dans ce chapitre, SIGIRR et les TLRs possèdent un lien étroit avec la régulation des fonctions des inflammasomes. Les récepteurs de la famille TIR seront abordés plus en détail dans la prochaine section.

1.6. Membre de la Famille des Récepteurs de type Toll/Interleukine-1

SIGIRR est un membre des récepteurs dotés d'un domaine TIR. Ces récepteurs sont brièvement décrits ici. Les membres de la famille des IL-1R, ainsi que les TLR, appartiennent à une superfamille de protéines phylogénétiquement conservées impliquées dans l'immunité innée et l'inflammation (Dinarello 2009, Dinarello 2010, O'Neill 2008; Takeda *et al.* 2003; van de Veerdonk *et al.* 2011). La caractéristique commune des membres de cette famille est un domaine conservé dans la région cytoplasmique, appelé domaine TIR. Ce domaine TIR a recours à des molécules de signalisation tel que MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), IRAK (*IL-1R-associated kinase*) et TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) menant à la translocation de NF- κ B vers le noyau et l'activation de protéines kinases, tel que p38, JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*), et les MAPK, ainsi que l'activation de facteurs de transcription, tel que IRF3 (*Interferon Regulatory Factor 3*) (Barton et Medzhitov 2003).

1.6.1. Les TLR

Comme son acronyme l'indique, la famille des récepteurs TIR est divisée en deux sous-groupes de récepteurs : les TLR et les IL-1R. La première est caractérisée par un domaine extracellulaire LRR. Jusqu'à ce jour 10 TLR chez l'homme, 13 chez la souris, ont été identifiés et localisés soit à la surface cellulaire ou à l'intérieur des endosomes (Takeda *et al.* 2003, Pandey *et al.* 2015, Akira 2006) (**Tableau II**). Tel que mentionné précédemment, ces récepteurs sont des PRR et sont aptes à reconnaître certains PAMP et DAMP, par exemple le LPS, la flagelline, et

certaines formes d'ADN et d'ARN virales (Jiménez-Dalmaroni *et al.* 2015). L'activation de ces PRR est déclenchée par la reconnaissance de leur ligand spécifique. Il s'ensuit une homo/hétéro-dimérisation des TLR par le domaine intracellulaire TIR, et engendre l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires (Pandey *et al.* 2015).

Tableau II. Caractéristiques des différents TLR. (Référence : Jiménez-Dalmaroni *et al.* 2015).

Type of TLR	Microbial ligands (PAMPs)	Potential endogenous TLR ligands (DAMPs)
TLR2 (in association with TLR1 or 6)	Lipomannan (Mycobacterium), Lipoteichoic Acids (Gram-positive bacteria), di-acylated and try-acylated bacterial lipopeptides	HSP 60, HSP70, HSP 96, HMGB-1, gp96, Biglycan, SP-D,
TLR4	LPS (Gram-negative bacteria)	Biglycan, HSP 60, HSP 70, HSP 96, fibrinogen, fibronectin, hyaluronic acid, HMGB-1, OxLDL(in association with TLR6), beta amyloid (in association with TLR6)
TLR5	Flagellin (Gram-negative bacteria)	Undetermined
TLR3	dsRNA (virus)	mRNA (necrotic cells)
TLR7	ssRNA(virus)	ssRNA, imiquimod
TLR8	ssRNA(virus)	ssRNA, microRNAs
TLR9	CpG motif (bacteria, virus)	Self-DNA

1.6.2. Les IL-1R

Le deuxième sous-groupe, les IL-1R, contient 3 domaines d'immunoglobulines (Ig) extracellulaires, excepté pour SIGIRR qui n'en compte qu'un seul. Cette famille inclut 10 membres : IL-1R1, IL-1R2, IL-1RAcP (IL-1R *Accesory Protein*), IL-18R α , IL-18R β , ST2 (ou IL-33R), IL-36R, SIGIRR, TIGIRR-2 (*Three Ig domain-containing IL-1R related-2*, ou IL-1RAPL1), et TIGIRR-1 (IL-1RAPL2) (Palomo *et al.* 2015) (**Tableau III**). IL-1R2 est le seul n'ayant pas de domaine TIR intracellulaire. Pour chacun de ces membres, une liaison à leur ligand respectif déclenche leur hétérodimérisation avec leurs co-récepteurs (Palomo *et al.* 2015). Par la suite, il y a, pour la majorité d'entre eux, une amplification de la cascade de résistance innée et de l'inflammation contribuant également à l'activation et l'orientation de l'immunité adaptative (Arend *et al.* 2008, Dinarello *et al.* 2010, Towne *et al.* 2004).

Tableau III. Les récepteurs de la famille des IL-1R. (Référence : Boraschi et Tagliabue 2013)

Table 1 Receptors of the IL-1R family.					
Name	Synonym	Gene (hu)	Chr. (hu)	Ligand	Expression
IL-1R1	IL-1RI CD121a	<i>IL1R1</i>	2q12	It initiates immune and inflammatory responses upon binding the agonist ligands IL-1 α and IL-1 β ; inhibited upon binding the antagonist ligand IL-1Ra; the co-receptor is IL-1R3. Binding of IL-38 has been reported	Expressed by all cells responsive to IL-1, predominant type of IL-1R on T cells, fibroblasts, epithelial and endothelial cells. Human precursor protein is 569 amino acids long
IL-1R2	IL-1RII CD121b	<i>IL1R2</i>	2q12	It binds IL-1 β and less efficiently IL-1 α and IL-1Ra; decoy receptor, unable to initiate signal transduction. Both membrane and soluble form have inhibitory activity	Expressed by many cell types, abundant on B cells, mononuclear phagocytes, polymorphonuclear leukocytes and bone marrow cells. Human precursor protein is 569 amino acids long, soluble form 398 aa
IL-1R3	IL-1RAcP	<i>IL1RAP</i>	3	Co-receptor for IL-1R1 responsible for signalling after binding agonist ligands IL-1 α or IL-1 β ; forms inactive complexes with IL-1R2 bound to IL-1; co-receptor for IL-1R4 activation by IL-33 and for IL-1R6 activation by IL-36	Ubiquitous; expressed by all cells responsive to IL-1. Human precursor protein is 570 amino acids long
IL-1R3b	IL-1RAcPb	<i>IL1RAP</i>	2q12	Co-receptor for IL-1R1, brain-specific isoform of IL-1R3 generated by alternative splicing. It mediates IL-1 α and IL-1 β p38 and Src phosphorylation, does not (?) recruit MyD88 and IRAK-4	Brain, cerebellum, foetal brain, spinal cord. Human precursor protein is 687 amino acids long
IL-1R4	T1 ST2, ST2L DER4 Fit-1	<i>IL1RL1</i>	2q12	It binds IL-33 using IL-1R3 as co-receptor, initiating Th2-related responses	Th2 cells, mast cells, fibroblasts. Long transmembrane precursor protein is 556 amino acids long, soluble form is 328 amino acids long
IL-1R5	IL-18R α IL-1Rrp1 IL-1Rrp	<i>IL18R1</i>	2q12	It binds IL-18 using IL-1R7 as co-receptor; also binds IL-37b but without recruiting IL-1R7	Mononuclear phagocytes, neutrophils, Th1 cells, NK cells, endothelial cells, smooth muscle cells. Human precursor protein is 541 amino acids long
IL-1R6	IL-1Rrp2 IL-1RL2	<i>IL1RL2</i>	2q12	It binds IL-36 α , IL-36 β and IL-36 γ , using IL-1R3 as co-receptor and initiating inflammatory responses; binding of IL-36Ra inhibits signalling. Binding of IL-38 has been reported	Lung, epididymis, lower levels in testis and cerebral cortex (non-neuronal), skin, increased in psoriasis, at lower levels in prostate, ovary, thyroid, uterus, liver, kidney, lung, and trachea. Human precursor protein is 575 amino acids long
IL-1R7	IL-18R β AcPL	<i>IL18RAP</i>	2q12	Co-receptor for IL-1R5 responsible for signalling after binding of IL-18	Mononuclear phagocytes, neutrophils, Th1 cells, NK cells, endothelial cells, smooth muscle cells. Human precursor protein is 599 amino acids long
IL-1R8	TIR8 SIGIRR	<i>SIGIRR</i>	11p15.5	Orphan receptor; negative regulator of TLR4/IL-1R signalling; responsible for anti-inflammatory homeostatic signalling of mucosae; involved in the anti-inflammatory effects of IL-36Ra in brain and glial cells	Ubiquitous; abundantly expressed in mucosal epithelial cells and DC. Human precursor protein is 410 amino acids long
IL-1R9	IL-1RAPL IL-1RAPL1 TIGIRR-2 IL-1R8	<i>IL1RAPL1</i>	Xp22	Orphan receptor; mutations/deletions involved in X-linked mental retardation, autism and schizophrenia; it activates JNK but not NF κ B, ERK and p38; inhibition of N-type voltage-gated calcium channel activity and Ca ²⁺ -dependent exocytosis through NCS-1	Mainly expressed in adult and foetal brain and primary neuronal and astroglial cells from several brain structures; found also in heart, ovary, skin; weaker expression in tonsil, foetal liver, prostate, testis, small intestine, placenta; no expression in spleen, lymph node, thymus, bone marrow, leukocytes, lung, liver, kidney and pancreas. Human precursor protein is 696 amino acids long

L'activation de la signalisation des IL-1R et des TLR est étroitement régulée. En cas de dérégulation, ces récepteurs provoquent une sécrétion de protéines pro-inflammatoires, qui peut engendrer des dommages locaux et systémiques dus à une réaction inflammatoire incontrôlée et non résolue (Garlanda *et al.* 2013, Zhao *et al.* 2012, Jiménez-Dalmaroni *et al.* 2015). Les mécanismes de régulation identifiée dans le système d'IL-1, incluant les ligands, les récepteurs, et la voie de signalisation, jouent leurs rôles tant au niveau extracellulaire qu'intracellulaire (Mantovani *et al.* 2004). Pour n'en nommer que quelques-uns, il y a les antagonistes du récepteur de l'IL-1, IL-1Ra et IL-36Ra, qui sont des polypeptides en concurrence avec les ligands endogènes pour la liaison au récepteur (Aksentijevich *et al.* 2009, Costelloe *et al.* 2008, Dinarello 2009, Reddy *et al.* 2009, Towne *et al.* 2004). Ils existent aussi des micro-ARN ciblant les protéines de signalisation ou les facteurs de transcription des TLR et des IL-1R, comme les micro-ARN 155, 21, 146a, 132, 9, et 147. Leur transcription est induite par des médiateurs de

l'inflammation passant par NF- κ B (Bazzoni *et al.* 2009, Nahid *et al.* 2011, Quinn et O'Neill 2011). SIGIRR, membre de la famille des TIR et régulateur des TLR et IL-1R, fait partie de ces modulateurs négatifs (Garlanda *et al.* 2013). De nombreuses découvertes à son sujet au fil des dernières années a mené plusieurs scientifiques, tel que Garlanda, Riva, Mantovani et Anders, à se poser des questions quant à son utilité dans la répression de l'inflammation, d'où l'intérêt de se concentrer plus particulièrement sur cette protéine.

1.7. Single Immunoglobulin Interleukin-1 Receptor Related molecule

1.7.1. SIGIRR : Découverte

Découvert par l'équipe de Thomassen chez la souris et l'homme, TIR8, nommé ainsi puisque qu'au moment de sa découverte elle était la 8^e molécule clonée comportant un domaine TIR, est décrit également comme étant IL-1R8 et mieux connu sous le nom de SIGIRR (Thomassen *et al.* 1999). Celui-ci est un membre à part de cette famille puisqu'il comporte des irrégularités dans sa structure le rendant incompatible avec la signalisation conventionnelle de cette famille de récepteurs (Li et Qin 2005, Garlanda *et al.* 2009).

1.7.2. Structure moléculaire de SIGIRR

Le gène chez l'homme est localisé sur la bande p15.5 du chromosome 11, présente 10 exons et contient environ 11700 paires de bases. Du côté murin, ce gène est localisé sur la bande F4 du chromosome 7, et inclut 9 exons sur une longueur d'environ 4000 paires de base (Thomassen *et al.* 1999). La protéine humaine est constituée de 410 acides aminés se définissant en 4 parties distinctes. Un domaine extracellulaire comportant un seul domaine d'Ig, ce qui diffère des autres membres de la famille des IL-1R qui, eux, en ont 3. Cette protéine possède également un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire TIR. L'extrémité C-terminale se termine par une queue de 95 acides aminés, prolongée par rapport aux autres membres de la superfamille des TIR et ce, par plus de 73 acides aminés (Thomassen *et al.* 1999). Il est important de noter que deux résidus dans le domaine TIR, la sérine447 et la tyrosine536, considérés comme étant nécessaire dans la transduction du signal des TIR sont remplacés ici par une cystéine222 et une leucine305, respectivement chez SIGIRR. Par ailleurs, ce récepteur est abondamment N-glycosylé et O-glycosylé. En fait, chez l'homme on détecte plus de 5 sites potentiels de N-glycosylation et aussi 5 chez la souris, tous retrouvés dans la portion extracellulaire de la protéine (Thomassen *et al.* 1999, Lech *et al.* 2007).

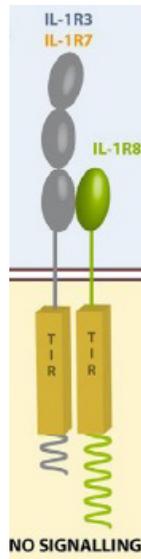


Figure 1.8. SIGIRR (IL-1R8) inhibe l'activité biologique des IL-1R par interaction avec son domaine intracellulaire et extracellulaire directe, avec les récepteurs accessoires IL-1AcP (IL-1R3) et IL-18RAP (IL-1R8). (Référence : Boraschi et Tagliabue 2013).

1.7.3. Tolérance microbienne

Le tractus intestinal est colonisé par des trillions de microbes qui sont collectivement référés à la microflore commensale. L'hôte a développé un lien de mutualisme avec ces bactéries commensales, ou chacun retire un bénéfice de l'autre (Hooper et Gordon 2001). Un aspect important de cette relation est la tolérance microbienne programmée par le système immunitaire de l'hôte. Comme il a été décrit précédemment, un groupe de protéines membranaires et intracellulaires, les TLR et NLR, ont la capacité de reconnaître les PAMP des bactéries pathogéniques résidentes de l'intestin et d'activer, par la suite, une réponse inflammatoire (Zhao *et al.* 2012, Jha et Pan-Yun Ting 2015). Une activation inappropriée de ces récepteurs est impliquée dans la pathogenèse des MICI (Clevers 2004, Corridoni et al. 2014). De plus, des études ont démontré que les patients atteints par la CU et la MC détiennent un risque plus élevé de développer un cancer du côlon, indiquant une association entre l'inflammation et la tumorigenèse (Clevers 2004, Bitton et al. 2015). Cette inflammation chronique est la cause de la transformation néoplasique de l'épithélium intestinale (Balkwill *et al.* 2005). Ainsi donc, la tolérance microbienne de l'épithélium intestinale n'est pas seulement cruciale pour le contrôle de l'inflammation locale, mais également pour la prévention de la tumorigenèse du colon.

Cependant peu est connu au sujet des mécanismes de tolérance microbienne, plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le mécanisme derrière la reconnaissance sélective des bactéries résidentes du système immunitaire de l'hôte tout en conservant ces habilités contre les invasions pathogéniques. Un modèle propose que l'expression des TLR est régulée de façon

spatiotemporelle, ce qui restreint leur exposition aux PAMP afin d'éviter une réponse endémique de l'inflammation (Zhao *et al.* 2012). Cependant, certaines ambiguïtés autour de ce modèle demeurent, l'expression des TLR dans l'intestin n'est pas complètement inactif face à la flore microbienne. En effet, la signalisation par les TLR fournit aux cellules épithéliales intestinales (CEI) des signaux importants de survie et de réparation des tissus suivant des lésions (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004). Un second mécanisme connu pour expliquer la tolérance repose sur les régulateurs négatifs de la signalisation des TLR et IL-1R, dont SIGIRR est un membre important.

1.7.4. Évolution Phylogénique

SIGIRR présente une séquence et un motif d'expression conservé à travers les vertébrés, et ce du poulet à l'homme (Riva *et al.* 2009). En particulier la séquence protéique de SIGIRR humaine et murine ont 82% d'homologie. Peu est connue sur l'évolution phylogénétique de SIGIRR, mais la découverte de DIGIRR (*Double Ig IL-1R Related molecule*) chez des poissons-téléostéens a aidé à développer une hypothèse sur l'historique de l'évolution de SIGIRR. En effet, des études ont démontré de grandes homologues entre DIGIRR et SIGIRR. Cette protéine est constituée par deux domaines d'Ig dans sa région extracellulaire, une région transmembranaire, et un domaine TIR intracellulaire contenant deux substitutions (Arg419-Tyr420), responsable de la perte de la signalisation. L'ARN messager (ARNm) de DIGIRR est exprimé dans plusieurs tissus et retrouvé aussi chez les leucocytes, mais contrairement à SIGIRR est régulé à la hausse suivant la stimulation au LPS, suggérant l'implication de mécanismes différents entre ces deux molécules lors de l'inflammation. Cependant, plusieurs évidences démontrent une capacité d'agir comme régulateur négatif de l'inflammation induite par le LPS et IL-1 β . En effet, des ARN interférant contre DIGIRR montrent une augmentation de la production de cytokine induite par l'IL-1 β dans le foie, les reins et les leucocytes. De plus, l'administration *in vitro* de DIGIRR chez le poisson-zèbre inhibe de façon significative l'activation de NF- κ B induite par le LPS et IL-1 β (Gu *et al.* 2011). Les auteurs suggèrent que DIGIRR et SIGIRR dériveraient d'un ancêtre commun qui a perdu un ou deux domaines d'Ig ainsi que l'apparition de mutations dans leur domaine TIR. DIGIRR représente une protéine transitoire entre un récepteur de la famille des IL-1R et SIGIRR, démontrant un besoin évolutif de réguler l'inflammation, et ce par la transformation d'un récepteur ayant une fonction activatrice, un IL-1R, en un régulateur négatif, SIGIRR.

1.7.5. L'expression de SIGIRR

SIGIRR est exprimé de façon ubiquitaire dans plusieurs tissus, les reins, le tractus GI, le foie, les poumons, et les organes lymphoïdes (Thomassen *et al.* 1999, Polentarutti *et al.* 2003). On retrouve une plus grande concentration particulièrement dans les reins, où son expression est

élevée à la bordure luminale et dans la membrane basolatérale des cellules tubulaires proximales (Polentarutti *et al.* 2003, Lech *et al.* 2007). SIGIRR s'exprime en grande quantité dans l'épithélium bronchique des poumons, les cellules endothéliales des parois des vaisseaux sanguins (Veliz Rodriguez *et al.* 2012), mais également sur les CEI et les cellules du système immunitaire, telles que les cellules (NK), les lymphocytes B, les monocytes et les DC immatures des organes lymphoïdes (Polentarutti *et al.* 2003, Garlanda *et al.* 2004, Lech *et al.* 2007, Xiao *et al.* 2007).

1.7.6. Régulation de l'expression de SIGIRR

Plusieurs exemples de régulation de l'expression de SIGIRR ont été déterminés jusqu'à ce jour, mais les stimuli définissant ces inductions d'expression ainsi que les mécanismes les gouvernants ne sont pas connus.

1.7.6.1. Régulation de la protéine SIGIRR

Kadota et ses collaborateurs ont identifié un facteur de transcription responsable de l'activation de l'expression de SIGIRR, et constitue l'explication la plus tangible concernant la régulation de SIGIRR. Cette étude démontre que le promoteur proximal de SIGIRR présente un site de liaison pour le facteur de transcription sp1 (*specificity protein 1*), une protéine à doigt de zinc capable de se lier directement à l'ADN et d'activer la transcription du gène SIGIRR. En présence de LPS, la liaison de sp1 au promoteur de SIGIRR diminue et, conséquemment, l'expression de la protéine SIGIRR est inhibée chez les cellules épithéliales (Kadota *et al.* 2010, Ueno-Shuto *et al.* 2014). Ces données semblent expliquer le phénomène précédemment observé par d'autres études où l'expression de SIGIRR humain et murin chez les CEI, les DC, les monocytes, et les granulocytes est diminuée par la stimulation au LPS ou toutes autres conditions inflammatoires comparées aux conditions physiologiques (Polentarutti *et al.* 2003, Wald *et al.* 2003, Huang *et al.* 2006).

D'autre part, des études récentes ont démontré que la voie TLR4-p38, activée par le LPS chez les cellules du sang périphérique mononuclées (PBMC) et les neutrophiles, est responsable de l'expression diminuée de SIGIRR (Ueno-Shuto *et al.* 2014). Par ailleurs, le même phénomène est observé dans le cas d'une infection bactérienne intestinale. Les CEI exposées à la flagelline possèdent une expression protéique de SIGIRR transitoirement diminuée. Inversement, une surexpression stable de SIGIRR diminue l'expression de NF- κ B (Khan *et al.* 2010). Chez des patients atteints de bactériurie asymptomatiques, l'expression de SIGIRR et de TLR4 est significativement plus basse comparée aux contrôles appariés selon l'âge (Ragnarsdottir *et al.* 2007). Chez les lymphocytes T, la polarisation Th2 induit une expression plus élevée de SIGIRR

comparativement à une polarisation Th1 ou une condition de non-différenciation (Bulek *et al.* 2009).

1.7.6.2. Régulation de l'ARNm de SIGIRR

L'ARNm de SIGIRR (*Sigirr*) a également été étudié lors de plusieurs conditions inflammatoires. Nanthakumar et ses collaborateurs ont démontré que *Sigirr* est exprimé à des niveaux bas dans les entérocytes de fœtus humains et à des niveaux encore plus bas chez les CEI atteintes d'entéocolite nécrosante. Le contraire est observable chez les gènes pro-inflammatoires, ils sont exprimés à des concentrations plus hautes, ce qui peut expliquer l'inflammation excessive retrouvée dans l'intestin (Nanthakumar *et al.* 2011). Chez les gens atteints de psoriasis, les PBMC expriment des niveaux plus bas de *Sigirr* et d'autres molécules anti-inflammatoires (Batliwalla *et al.* 2005). Chez la souris, l'ARNm *Sigirr* diminue au niveau des cellules pulmonaires et des neutrophiles après une infection à *Pseudomonas aeruginosa* (Veliz Rodriguez *et al.* 2012), ainsi qu'au niveau des CEI suivant une infection à *Toxoplasma gondii* (Gopal *et al.* 2008). Cependant, Adib-Conquy et ses collaborateurs ont reporté que les monocytes humains régulent à la hausse le transcrite de SIGIRR au cours de septicémie et d'inflammation systémique stérile (Adib-Conquy *et al.* 2006). Le microorganisme probiotique, *Lactobacillus jensenii*, induit une hausse de l'expression de *Sigirr* dans les plaques de Peyer porcines, et ce, chez les cellules présentatrices d'antigènes (Villena *et al.* 2012). Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont également démontré une hausse de l'expression de l'ARNm de *Sigirr* induit par le LPS chez les DC des plaques de Peyer de modèles murins. Cependant, cette hausse n'est pas retrouvée chez les DC de la rate. Les auteurs suggèrent que les DC des plaques de Peyer utilisent cette protéine dans son arsenal pour prévenir l'initiation de la signalisation des TLR (Davies *et al.* 2010).

1.7.7. Régulation de la signalisation des IL-1R et TLR par SIGIRR

SIGIRR est un régulateur négatif des voies signalisation des IL-1R et des TLR, cette protéine emploie deux mécanismes. Premièrement, SIGIRR interfère avec l'hétérodimérisation des domaines d'Ig intracellulaire des IL-1R. Deuxièmement, SIGIRR inhibe les TLR et les IL-1R via son domaine TIR en empêchant le recrutement de molécules adaptatrices au complexe des récepteurs (Riva *et al.* 2012, Qin *et al.* 2005). Ainsi, SIGIRR régule l'activation de NF- κ B dépendant des membres de la famille des TIR. Cependant, elle n'affecte pas l'activation de NF- κ B dépendant de TNF- α ou de l'activation de STAT1 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) par l'INF- γ (Wald *et al.* 2003, Garlanda *et al.* 2004). En bref, cette activité inhibitrice touche IL-1R1, IL-18R, T1/ST2, TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR7 et TLR9 (Wald *et al.* 2003, Garlanda *et al.* 2004, Qin *et al.* 2005, Lech *et al.* 2007). Cependant, peu est connu sur les

interactions moléculaires entre SIGIRR et les membres de sa super famille, et les données sont parfois contradictoires. Ceci pourrait être expliqué par l'expression spécifique de cette protéine, ou toutes autres composantes d'un complexe inconnu, dans divers types cellulaires. Une autre explication possible impliquerait des modifications post-transcriptionnelles, tel que la glycosylation, ce qui modulerait la fonction biologique de SIGIRR (Garlanda *et al.* 2004). Nous allons voir plus en détail les mécanismes de SIGIRR concernant leur relation avec les IL-1R et les TLR.

Qin et ses collègues ont proposé, par des études de mutagenèse, que le domaine extracellulaire d'Ig de SIGIRR interfère avec la dimérisation de l'IL-1R1 et d'IL-1RAcP, son corécepteur. De plus, ils ont conclu que le domaine intracellulaire TIR de SIGIRR séquestre les molécules adaptatrices contenant un domaine TIR responsable de la continuation du signal par MyD88, IRAK et TRAF6 après stimulation à l'IL-1. Cette étude a démontré que seulement le domaine TIR de SIGIRR, excluant la partie C-terminale, est nécessaire pour l'inhibition de la signalisation de TLR4 (Qin *et al.* 2005).

Gong et ses collaborateurs ont utilisé une approche computationnelle pour dévoiler le mécanisme moléculaire derrière l'interaction de SIGIRR-TLR4 et -TLR7. Ils ont construit un modèle en 3 dimensions pour les domaines TIR de TLR4, TLR7, MyD88, et SIGIRR (Gong *et al.* 2010). Les auteurs ont déterminé, en accord avec la littérature, que l'activation du récepteur déclenche la formation d'un dimère TIR de TLR4/4 et TLR7/7. Par la suite, il y a recrutement du dimère TIR MyD88/MyD88, ce qui résulte en un tétramère (Loiarro *et al.* 2005, Núñez Miguel *et al.* 2007). Ce modèle révèle SIGIRR fixé à TLR4 et TLR7 en occupant leurs sites d'auto-interactions. Cette interaction provoque un changement de conformation ce qui perturbe l'environnement électrique de la pochette où MyD88 s'y loge normalement. De plus, SIGIRR peut se lier à MyD88 et interrompre l'homodimérisation de MyD88 (Gong *et al.* 2010) (**Figure 1.9**). Ces deux interactions de SIGIRR sont possibles grâce à sa région *BB-loop*. Celle-ci est hautement conservée à travers les différentes molécules contenant un domaine TIR et joue un rôle crucial dans la formation des dimères de TIR (Gay *et al.* 2011). Par conséquent, l'interférence exercée par la région *BB-loop* de SIGIRR empêche la dimérisation des composantes du complexe protéique abolissant ainsi la transduction du signal. Conformément aux observations faites par d'autres études, l'unique queue en C-terminal de SIGIRR est distante de l'activité inhibitrice de la région *BB-loop*, confirmant qu'elle n'est point nécessaire à l'activité inhibitrice de SIGIRR sur la signalisation des TLRs (Qin *et al.* 2005).

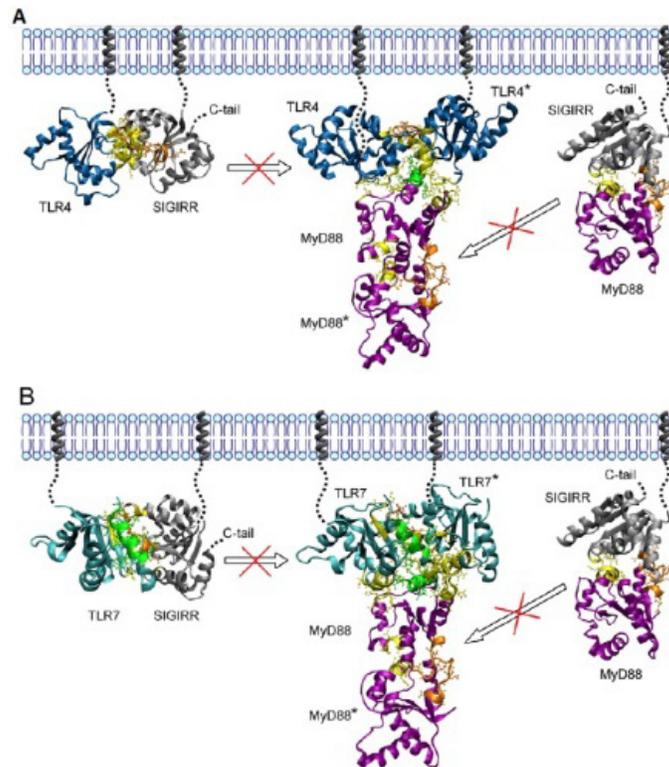


Figure 1.9. Modèles de SIGIRR inhibant la signalisation de MyD88 dépendant de TLR4 ou TLR7. Région d'interaction (BB-loop) en orange (A) Modèle de SIGIRR inhibant TLR4. (B) Modèle de SIGIRR inhibant TLR7. (Référence : Gong *et al.* 2010).

Il est à noter que SIGIRR module aussi la phosphorylation de JNK et la kinase mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) induite par l'IL-1 chez les lymphocytes Th17. Les deux contribuent au contrôle des Th17, autant à leur différenciation qu'à leur prolifération et la production de cytokine (Gulen *et al.* 2010). Dans le même ordre d'idée, SIGIRR régule l'activation de la voie Akt (*serine/threonine-protein kinase*) -mTOR par les IL-1R et les TLR chez les CEI. La voie de signalisation Akt-mTOR favorise la progression du cycle cellulaire grâce à son effet sur les régulateurs post-transcriptionnel clés du cycle cellulaire et l'instabilité génétique conséquente (Xiao *et al.* 2010, Zhao *et al.* 2012). Ces résultats laissent présager un rôle important à SIGIRR agissant comme modulateur de maladies auto-immunes et de suppresseur de tumeur.

1.7.8. Régulation d'autre systèmes par SIGIRR

De plus, SIGIRR agit dans l'homéostasie et la tolérance de la flore microbienne (Xiao *et al.* 2007, Sham *et al.* 2013). Ils existent des évidences claires du rôle de SIGIRR dans la tumorigenèse de cancer colorectale, de CAC chez les souris, et de carcinome de la prostate (Zhao *et al.* 2015, Zhao *et al.* 2012, Bauman *et al.* 2015). SIGIRR possèdent une influence sur plusieurs

autres maladies inflammatoires, dont la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrite psoriasique, le lupus érythémateux, et l'entérocolite nécrosante néonatale (Batliwalla *et al.* 2005, Drexler *et al.* 2010, Russell *et al.* 2013, Wang *et al.* 2013, Sampath *et al.* 2015). SIGIRR est impliqué dans la restriction de l'inflammation (Stahl *et al.* 2014) en limitant les réponses excessives lors de dommages en condition stérile ou lors d'infections, par exemple au niveau des reins (Lech *et al.* 2009, Noris *et al.* 2009, Leemans *et al.* 2012) ou des poumons (Garlanda *et al.* 2007, Veliz Rodriguez *et al.* 2012, Barry *et al.* 2013, Horne *et al.* 2012). Au niveau de l'intestin, SIGIRR possède un rôle protecteur contre les maladies inflammatoires intestinales (Riva *et al.* 2012).

1.7.9. Ligand de SIGIRR

La structure unique de SIGIRR fut qu'elle soit considérée longtemps comme un récepteur orphelin. Néanmoins, des études ont démontré que SIGIRR était capable d'interagir avec l'IL-36Ra exprimé par les cellules gliales. Cette implication, du moins partielle, de SIGIRR permet une régulation de la réponse inflammatoire dans le cerveau chez ces cellules par la production de l'IL-4 (Costelloe *et al.* 2008, Watson *et al.* 2010). Par ailleurs, l'équipe de Nold-Petry a démontré pour la première fois l'interaction entre SIGIRR et une autre molécule, l'IL-37, à la surface des PBMC. Cette étude montre **que** l'IL-37 se lie à IL-18R α en utilisant SIGIRR comme corécepteur et formant ainsi un complexe à trois apte à activer un signal anti-inflammatoire intracellulaire. Les molécules anti-inflammatoires Mer, PTEN, STAT3, et p62 sont alors activées, tandis que la kinase TAK1 et la transcription de NF- κ B, des MAPK sont inhibés (Nold-Petry *et al.* 2015). Mon projet s'intéresse particulièrement à cette interaction nouvellement identifiée.

Chapitre 2

2. Hypothèse et Objectifs

Dans le cadre de mon projet de recherche, l'objectif primaire était de déterminer le rôle de SIGIRR, afin d'y caractériser ces effets dans le contexte de la MC en pédiatrie. Nous avons abordé la question en proposant que la modulation de l'expression et/ou le fonctionnement de SIGIRR et son ligand (IL-37) peuvent contribuer à la pathogenèse de la MC.

Justification

Comme il a été décrit dans la section précédente, la MC est une inflammation chronique au niveau du tractus GI. Nos connaissances au sujet de la MC ont grandement évolué, mais l'étiologie exacte reste toujours inconnue à ce jour. Conséquemment, les traitements se sont améliorés, mais il n'existe aucune cure de la MC. Afin de remédier à cette situation, il est nécessaire d'investiguer toutes les pistes dans le but d'obtenir une meilleure compréhension de la maladie, et d'aboutir à de nouveaux et meilleurs traitements. Dans le cours de ce projet, nous nous sommes interrogés sur la place de SIGIRR, un régulateur négatif de l'inflammation, dans la MC. De nombreuses études à son sujet ont eu lieu chez plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunitaires, mais jamais cette protéine n'a été explorée dans le contexte de la MC. En effet, ces propriétés inhibitrices naturelles lui ont valu d'être examinée chez plusieurs modèles d'inflammation. Par exemple, chez des modèles murins de la colite induit par le sulfate de dextrane sodique (*Dextran Sulfate Sodium*, DSS) SIGIRR prévient l'inflammation pathogénique (Garlanda *et al.* 2004, Garlanda *et al.* 2007, Xiao *et al.* 2007). La CU a obtenu beaucoup plus d'attention scientifique, et toutes les études à son sujet démontrent un rôle protecteur de SIGIRR (Kadota *et al.* 2010). L'importance de SIGIRR comme régulateur de l'inflammation est indéniable et comme il a été décrit précédemment, SIGIRR a l'IL-37 comme ligand (Nold-Pety *et al.* 2015). Lors de ce projet, nous allons étudier cette relation ainsi que les éléments ayant un lien avec ce complexe, soit l'IL-18 et l'antagoniste IL-18BP.

Objectifs

Pour ce faire, nous avons :

- Déterminé l'expression de SIGIRR chez différents types cellulaires du sang périphérique chez des enfants atteints de la MC.
- Déterminé la concentration de SIGIRR dans le plasma de contrôle et de patients atteints par la MC ayant reçu ou non de traitement.

- Déterminé la concentration de l'IL-37, l'IL-18, et l'IL18BP dans le plasma de contrôle et de patients atteints par la MC ayant reçu ou non de traitement.
- Calculé la concentration de l'IL-18 libre dans la circulation sanguine des échantillons de contrôles, d'individus atteints de la MC sans et avec traitement.
- Identifié une corrélation entre les diverses protéines détectées dans le plasma chez les 3 conditions (contrôle, malades de Crohn non traité, malades de Crohn traité).

Chapitre 3

3. Matériels et Méthodes

3.1. Population étudiée

Tous les sujets recrutés pour ce projet étaient âgés entre 6 et 18 ans et d'origine caucasienne; les sujets présentant toute autre origine retrouvée chez les parents et grands-parents ont été systématiquement exclus. Un total de 55 patients diagnostiqués de façon définitive avec la MC ont été recrutés au CHU Ste-Justine. Trente-deux malades de Crohn sous traitement et 22 malades de Crohn nouvellement diagnostiqués ou sans traitement ont été inclus dans la période de mai 2013 à septembre 2015. Le diagnostic de la MC a été effectué sur des bases cliniques, endoscopiques et histologiques caractéristiques de la pathologie. Les indications suivantes ont été relevées à partir des dossiers médicaux : le sexe, l'âge du diagnostic, la durée du diagnostic, le comportement de la maladie, l'activité de la maladie, et le traitement actuel. L'activité de la MC a été évaluée selon le PCDAI (**Tableau I**). De plus, 30 contrôles ont été recrutés chez des personnes en santé subissant une colonoscopie pour un dépistage de cancer colorectal, une surveillance de polypes, ou pour une suspicion de MC. Ces sujets étaient indemnes de symptômes gastro-intestinaux et d'autres maladies inflammatoires. Seuls les sujets ayant une colonoscopie, à la fois, macroscopique et microscopique normale ont été inclus. Aucun des sujets en bonne santé dans l'étude ne prenait des médicaments connus pour affecter le tractus GI ou le système immunitaire. Cette étude a été effectuée après l'autorisation écrite du consentement éclairé de tous les cas présentés, et approuvée par le comité d'éthique du CHU Ste-Justine.

3.2. Collecte des échantillons

Une prise de sang à jeun a été effectuée sur tous les patients et les personnes saines. Chaque échantillon de sang a été centrifugé à 150 x g pour 10 minutes à température de pièce, pour séparer le plasma et le sang furent séparés. Le plasma a été centrifugé une deuxième fois à 1000 x g pour 10 minutes, aliquoté et conservé à une température de -80°C, jusqu'à l'analyse.

3.3. Cytométrie en flux : marquages des cellules sanguines

L'expression de SIGIRR a été déterminée sur des cellules sanguines par immunofluorescence et cytométrie en flux. Les cellules sanguines ont été recueillies à partir des prélèvements sanguins. Une lyse des globules rouges par un «*RBC Lysis Buffer*» (eBioscience, San Diego, CA, USA), suivi de lavages avec une solution de lavage constitué de PBS

(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X (DPBS), Wisent Inc, Saint-Jean-Baptiste, Qc, Can) contenant 2% de FBS (Fetal Bovine Serum, Wisent Inc, Saint-Jean-Baptiste, Qc, Can) a été faite. Par la suite, une incubation avec le *Human Fc Receptor Binding Inhibitor Purified* (Fc Blocking, eBioscience, San Diego, CA, USA) a été faite. Pour le marquage, les anticorps utilisés sont anti-SIGIRR humain monoclonal conjugué à l'Allophycocyanin (APC) (Clone #162201) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-CD3 humain monoclonal conjugué à la phycoérythrine (PE) (Clone UCHT1) (eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD3 humain monoclonal conjugué au PerCP (*Peridinin-Chlorophyll-Protein*) eFluor® 710 (Clone OKT3) (eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD4 humain monoclonal conjugué au *Brillant Violet* (Clone RPA-T4) (Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-CD8 humain monoclonal conjugué à la PE (Clone OKT-8) (eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD14 humain monoclonal conjugué au PerCP-eFluor® 710 (Clone 61D3) (eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD16 humain monoclonal conjugué à la PE-Cyanine (Cy) 7 (Clone CB16) (eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD19 humain monoclonal conjugué à l'APC-Cy7 (Clone HIB19) (Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-CD20 humain monoclonal conjugué à l'APC-Cy7 (Clone 2H7) (eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD66b humain monoclonal (Clone G10F5) (eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD56 humain monoclonal conjugué avec FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*) (Clone MEM-188) (eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-Alexa Fluor® 700 lapin (Clone M1/70) (Life Technology, Carlsbad, CA, USA). Pour tous les échantillons, des isotypes contrôles ont été utilisés. Les cellules ont ensuite été lavées avec la solution de lavage, puis fixées avec du paraformaldehyde 2% (Paraformaldehyde 96%, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). L'expression de SIGIRR, et les différentes populations ont été évaluées par un cytomètre en flux (LSRFortessa, BD, Mississauga, On, Can), où 10 000 événements ont été comptés pour chaque condition et analysés à l'aide du logiciel BD FACSDiva (Becton Dickinson, Mississauga, On, Can). Les monocytes (CD14+,CD3-), les neutrophiles (CD16+, CD66b), les lymphocytes T CD4 (CD3+,CD4+), les lymphocytes T CD8 (CD3-, CD8+), les lymphocytes B (CD19+,CD20+), les cellules NK (CD3-, CD56+) ont été identifiés à l'aide d'une stratégie de sélection (*gating strategy*), dont un exemple est expliqué à la **Figure 3.1**.

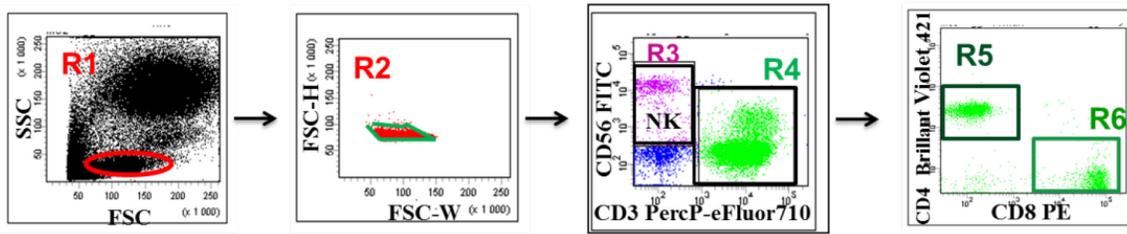
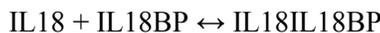


Figure 3.1. Gating Strategy : exemple de sélection de types cellulaires. Nous avons sélectionné la population de lymphocytes par le rapport de SSC (*Side-scattered light*) et FCS (*Forward-scattered light*) (R1). Nous avons éliminé les doublets (R2), puis identifié notre population de lymphocyte T CD3 (PercP-eFluor 710) positif (R4), et de cellules NK CD56 (FITC) positif (R3). Par la suite, nous avons sélectionné les sous-populations de lymphocytes T, soit les cellules T CD4 (*Brillant Violet*) positifs (R5) et les cellules CD8 (PE) positifs (R6).

3.4. ELISA

Les concentrations dans le plasma des différentes protéines, soit l'IL-37, l'IL-18, l'IL-18BP et SIGIRR, ont été mesurées à l'aide de trousse commerciale de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Les trousse ont été obtenus : pour l'IL-18 humaine de eBioscience (San Diego, CA, USA), pour l'IL-37 humaine et de SIGIRR humaine de MyBioSource (San Diego, CA, USA), et pour l'IL-18BP humaine de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Tous les dosages de ces protéines ont été effectués en duplicata et en conformité avec le protocole du manufacturier. L'IL-18 libre (non liés à l'IL-18BP) dans la circulation sanguine des donneurs a été déterminé par la stœchiométrie connue du complexe (1 :1), par l'utilisation de la loi d'action de masse et de la constante de dissociation ($K_d = 400\text{pM}$), comme décrit précédemment et dans cette section (Ianello *et al.* 2010).

Si l'IL-18 lie l'IL-18BP, alors un équilibre est formé :



Où l'IL-18 et IL-18BP sont des formes libres; l'IL18IL18BP est la forme liée des deux protéines.

Il existe un ratio entre les espèces libres et liées.

Dans un ensemble donné de conditions, ce rapport est fixe :

$$K_d = \frac{[\text{IL18libre}] [\text{IL18BPlibre}]}{[\text{IL18IL18BP}]}$$

Pour la quantité totale de l'IL-18 :

$$[IL18total] = [IL18libre] + [IL18IL18BP]$$

$$\text{Équivalent à : } [IL18libre] = [IL18total] - [IL18IL18BP]$$

Pour la quantité totale de l'IL-18BP :

$$[IL18BPtotal] = [IL18BPlibre] + [IL18IL18BP]$$

$$\text{Équivalent à : } [IL18BPlibre] = [IL18BPtotal] - [IL18IL18BP]$$

Donc :

$$Kd = \frac{([IL18tot] - [IL18IL18BP]) ([IL18BPtot] - [IL18IL18BP])}{[IL18IL18BP]}$$

Par transformations algébriques :

$$0 = [IL18IL18BP]^2 - ([IL18tot + [IL18BPtot] + Kd])[IL18IL18BP] + [IL18tot][IL18BPtot]$$

$$\text{Selon la formule quadratique : si } ax^2 + bx + c = 0, \text{ alors } x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

Par conséquent :

$$[IL18IL18BP] = \frac{([IL18tot] + [IL18BPtot]) \pm \sqrt{([IL18tot] + [IL18BPtot] + Kd)^2 - 4[IL18tot][IL18BPtot]}}{2}$$

Sachant que l'ELISA mesure les valeurs totales des protéines, nous pouvons déterminer la concentration de l'IL-18 libre à l'aide de la formule suivante :

$$[IL18libre] = [IL18total] - [IL18IL18BP].$$

3.5. Analyses Statistiques

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) et l'attribution d'une courbe d'étalonnage avec le logiciel Curve Expert 1.4 Basic (CurveExpert, Madison, AI, USA). Les données de cytométrie en flux ont été analysées par le test de Student afin d'identifier une différence entre le groupe contrôles et les groupes des patients. Les données provenant des ELISA et des ratios ont été assujetties à l'analyse de la variance (*ANOVA*) et suivies du test de Tukey afin d'évaluer les différences des moyennes entre les groupes étudiés. L'association entre les différents niveaux de protéines a été analysée par régression linéaire, afin de calculer les pentes et les corrélations entre les niveaux de protéines

dans le plasma. Pour l'ensemble des tests effectués, la signifiante statistique a été attribuée à une valeur de $P < 0,05$.

Chapitre 4

4. Résultats

4.1. L'expression de SIGIRR à la surface de cellules sanguines

Dans le but de déterminer s'il y a une altération de l'expression de la protéine de SIGIRR chez les cellules sanguines des patients atteints de la MC, un marquage spécifique à l'aide d'anticorps a été effectué afin de déterminer le niveau d'expression de SIGIRR sur les monocytes (CD14+, CD3-), les lymphocytes T CD4 (CD3+, CD4+), les lymphocytes T CD8 (CD3+, CD8+), les lymphocytes B (CD19+, CD20+), les cellules NK (CD56+, CD3-) et par la suite analysé par cytométrie en flux. Tel qu'indiqué sur la **figure 4.1**, une diminution d'intensité du MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) constatée chez les patients atteints de la MC comparativement aux contrôles, et ce, pour tous les lymphocytes B ($P < 0,01$) et les cellules NK ($P < 0,05$). Aucune différence statistiquement significative n'a été détectée sur les monocytes, les neutrophiles et les deux sous-populations de lymphocyte T. Toutes les populations étudiées ont été analysé par test de Student, et tous les échantillons ont été préparés dans les mêmes conditions et analysés par les mêmes paramètres de l'instrument. Ces données suggèrent que les cas pédiatriques atteints par la MC ont une diminution du niveau d'expression de la protéine SIGIRR sur les lymphocytes B et les cellules NK comparativement aux personnes saines.

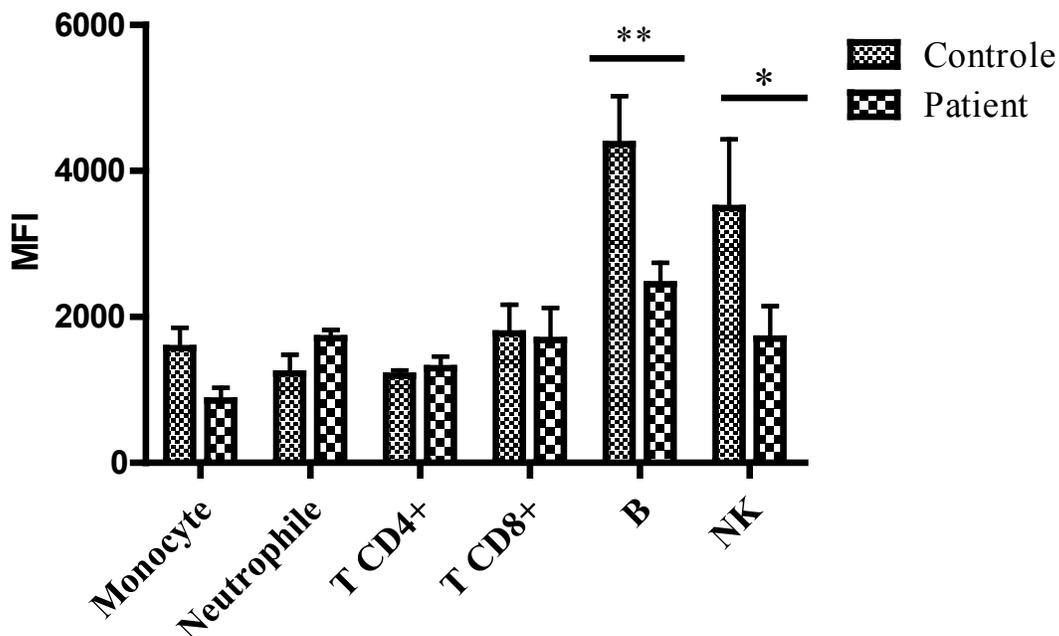


Figure 4.1. Comparaison de l'expression de SIGIRR à la surface de cellules sanguines entre des patients de la maladie de Crohn et des personnes saines. Les anticorps spécifiques couplés à un fluorochrome ont identifiés SIGIRR (anti-humain SIGIRR APC) à la surface de monocytes (CD14+, CD3-), de neutrophiles (CD66b+, CD16+), de lymphocytes T CD4+ (CD3+, CD4+), de lymphocytes T CD8+ (CD3+, CD8+), de lymphocytes B (CD19+, CD20+), et de cellules NK (CD3-, CD56+). Le marquage a été analysé par LSRFortessa à l'aide du logiciel FACSDiva (n = 4). Le MFI est représenté sous forme de moyenne \pm l'écart-type (SEM), les patients sont représentés par un quadrillé à gros carré et les contrôles à quadrillé à petit carré. Les données ont été analysés par test t, $P < 0.05$ (*) et $P < 0,01$ (**), où il y a signification statistique.

4.2. Concentration de SIGIRR soluble dans la circulation sanguine

Ayant observé une diminution de l'expression de la protéine SIGIRR à la surface de plusieurs types de cellules sanguines (**figure 4.1**), nous voulions déterminer si cette perte est également présente et détectable dans le plasma. Il a été décrit que SIGIRR se produit également sous forme soluble. Nous avons procédé à une ELISA afin de doser SIGIRR. Nous observons à la **figure 4.2** que la concentration moyenne de SIGIRR soluble chez les contrôles est de $198,2 \pm 41,48$ pg/mL, la moyenne des patients non traités est deux fois plus concentrés, soit de $399,8 \pm 94,80$ pg/mL, et les patients traités possèdent une moyenne de $306,2 \pm 70,95$ pg/mL. Sans être significatif, le test ANOVA et de Tukey nous permet de détecter une tendance ($P = 0,08$) entre les moyennes des différents groupes. Ces données proposent que l'inflammation chez les patients de

la MC, provoquant la diminution de la forme associée à la membrane de SIGIRR observé chez les cellules sanguines (**Figure 4.1**), soit retrouvé sous forme soluble. En outre, suivant un traitement, le niveau d'expression de SIGIRR soluble tend à se rapprocher de la condition contrôle.

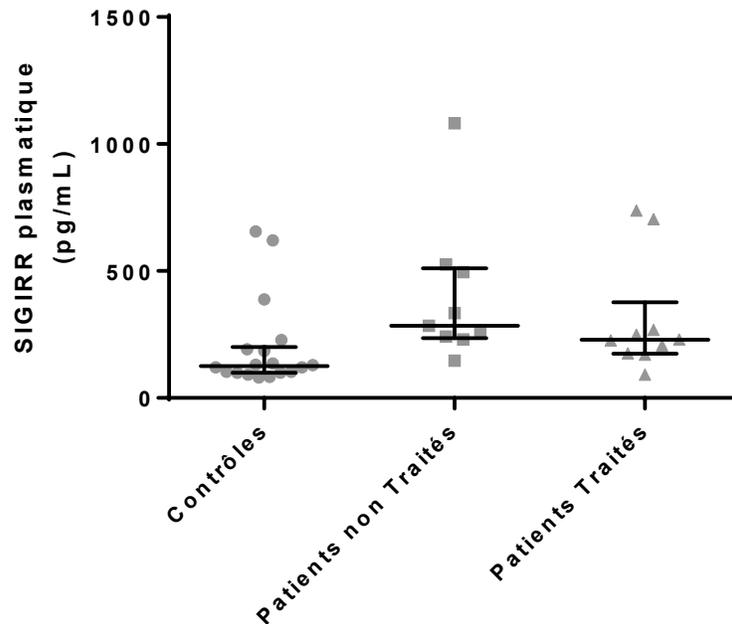


Figure 4.2. Comparaison des niveaux d'expression de SIGIRR plasmaticque entre les contrôles, les patients atteints de la maladie de Crohn non-traités, et traités. Les échantillons de plasma recueillis ont été utilisés afin de déterminer la concentration (pg/mL) de SIGIRR soluble par l'utilisation de kit d'ELISA commerciale, et ce chez des contrôles, des patients atteints de la MC sans traitement et avec traitement. Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM, SIGIRR (n= 9-18 par groupe) Les données ont été analysé par ANOVA et le test de Tukey, $P < 0.05$ (*) où il y a signification statistique.

4.3. Concentration de l'IL-37 dans la circulation sanguine de patients de la MC et de contrôles

Des études récentes ont montré que SIGIRR sert de co-récepteur à l'IL-37 (Nold-Petry *et al.* 2015). Par conséquent, nous avons décidé de déterminer les niveaux de cette cytokine dans la circulation de ces patients en utilisant une trousse commerciale d'ELISA. Les résultats des concentrations de l'IL-37 plasmaticque des 3 groupes sont présentés à la **figure 4.3**. Nous pouvons observer une concentration moyenne des contrôles de $17,20 \pm 5,26$ pg/mL, celle des patients non traités 4 fois plus concentrés, soit de $69,86 \pm 37,49$ pg/mL, et les patients traités montrent une moyenne de $16,51 \pm 6,39$ pg/mL. Par le test d'ANOVA et de Tukey, nous avons obtenu une tendance entre les moyennes des différents groupes ($P = 0,07$). Ces données suggèrent que les

personnes atteintes de la MC ont une concentration d'IL-37 altérée, et cette concentration tend à revenir à la normale lorsque l'inflammation est contrôlée par médication. Cependant, une grande variabilité existe dans le groupe de malades non traités et seulement 3 patients expliquent cette conclusion.

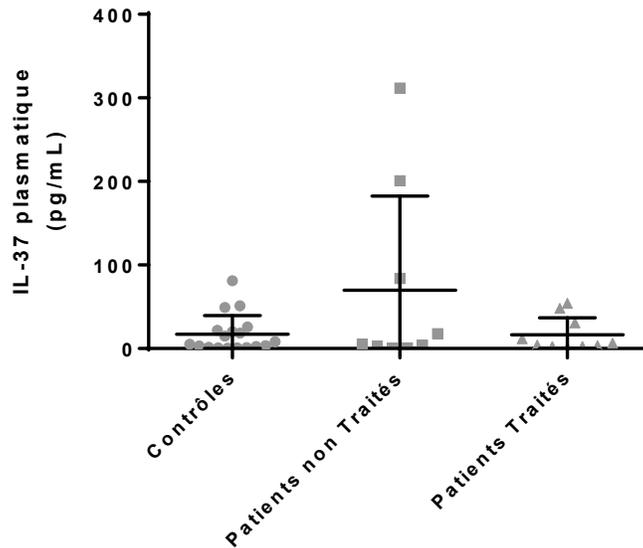


Figure 4.3. Comparaison des niveaux d'expression de l'IL-37 entre les contrôles, les patients atteints de la maladie de Crohn non-traités, et traités. Les échantillons de plasma recueillis ont été utilisés afin de déterminer la concentration (pg/mL) de IL-37 par l'utilisation de kit d'ELISA commerciale, et ce chez des contrôles, des patients atteints de la MC sans traitement et avec traitement. Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM, IL-37 (n = 9-18 par groupe). Les données ont été analysées par ANOVA et le test de Tukey, $P < 0.05$ (*) où il y a signification statistique.

4.4. Concentration de l'IL-18BP dans la circulation sanguine de patients de la MC et de contrôles

Comme l'IL-37 se lie à l'IL-18BP, ce qui augmente l'activité anti-inflammatoire de ce dernier, nous avons mesuré les concentrations de l'IL-18BP dans la circulation de ces donneurs. Nous avons utilisé les mêmes échantillons que précédemment et rajouté des contrôles et patients. Nous avons utilisé un ELISA commercial. À la **figure 4.4**, nous observons une concentration moyenne de l'IL-18BP chez les contrôles de $3231 \pm 218,3$ pg/mL. Les patients non traités ont une concentration plus élevée par rapport aux contrôles, soit de 3833 ± 326 pg/mL, et les patients traités montrent une concentration moyenne équivalente à celle retrouvée chez les contrôles, soit de $3033 \pm 215,4$ pg/mL. Selon le test d'ANOVA et de Tukey, une tendance a été identifiée entre

les 3 groupes ($P = 0,08$). Ces données suggèrent que les personnes atteintes de la MC ont une concentration de l'IL-18BP altérée, et tend à se normaliser lorsque l'inflammation est diminuée par la médication. Toutefois, comme présenté à la figure 4.3, il y a eu une grande variabilité au sein du groupe des patients non-traités; en effet, 4 des patients montrent des valeurs extrêmes de la concentration plasmatique de l'IL-18BP.

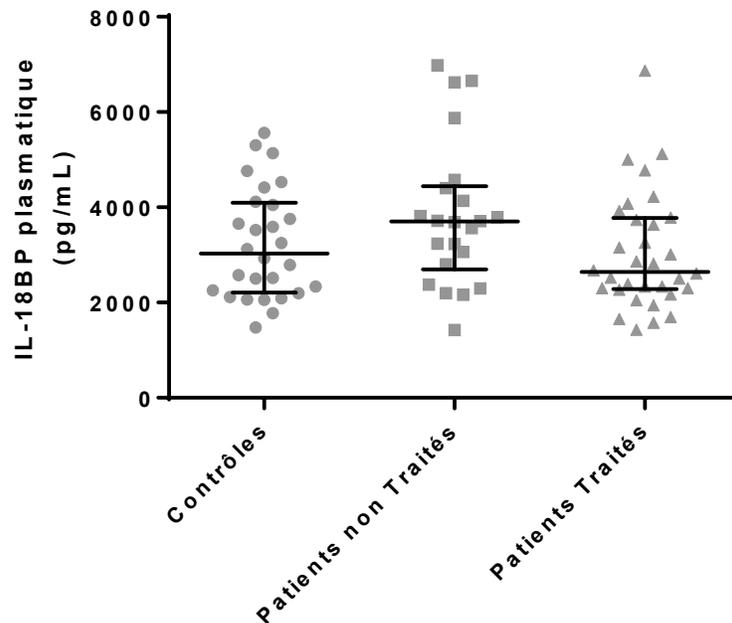


Figure 4.4. Comparaison des niveaux d'expression de l'IL-18BP plasmatique entre les contrôles, les patients atteints de la maladie de Crohn non-traités, et traités. Les échantillons de plasma recueillis ont été utilisés afin de déterminer la concentration (pg/mL) de IL-18BP par l'utilisation de kit d'ELISA commerciale, et ce chez des contrôles, des patients atteints de la MC non-traités et traités. Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM, IL-18BP ($n = 22-32$ par groupe). Les données ont été analysé par ANOVA et le test de Tukey, $P < 0.05$ (*) où il y a signification statistique.

4.5. Concentration de l'IL-18 dans la circulation sanguine de patients de la MC et de contrôles

L'IL-37 ressemble structurellement à l'IL-18, et se lie aussi à l'IL-18BP. En fait, l'IL-18BP a été découvert et nommé en raison de sa capacité à lier l'IL-18. Considérant, que l'IL-18BP module les effets anti-inflammatoires de l'IL-37 et inactive l'IL-18, les concentrations d'IL-18 dans la circulation sont importantes dans la détermination de la disponibilité de l'IL-18BP pour l'IL-37. Compte tenu de ces facteurs, nous avons décidé de mesurer les concentrations de l'IL-18 dans la circulation sanguine des patients de la MC. Nous avons utilisé les mêmes

échantillons et comparé les 3 mêmes groupes utilisés pour mesurer les concentrations de l'IL-18BP. Tel qu'indiqué dans la **figure 4.5**, la concentration moyenne de l'IL-18 plasmatique chez les contrôles est de $323,9 \pm 35,79$ pg/mL, celle des patients non traités plus élevés, soit de $382,9 \pm 33,6$ pg/mL, et les patients traités possède une moyenne inférieure à celle des contrôles, soit de $262,1 \pm 36,8$ pg/mL. Par le test ANOVA, une tendance a été détectée entre les moyennes des différents groupes ($P = 0,07$). Ces données suggèrent que les personnes atteintes de la MC ont une concentration de l'IL-18 altérée, et tendent à avoir un profil normal lorsque l'inflammation est contrôlée par traitement.

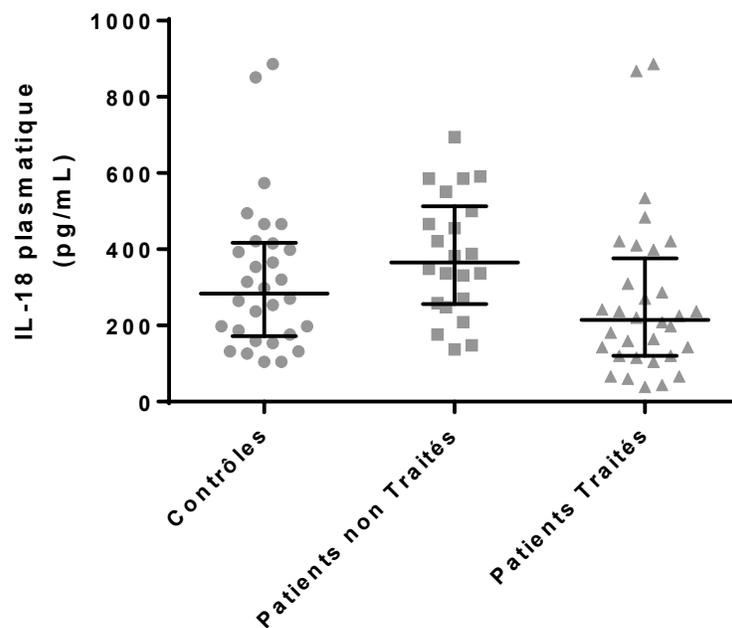


Figure 4.5. Comparaison des niveaux d'expression de l'IL-18 plasmatique entre les contrôles, les patients atteints de la maladie de Crohn non-traités, et traités. Les échantillons de plasma recueillis ont été utilisés afin de déterminer la concentration (pg/mL) de IL-18 par l'utilisation de kit d'ELISA commerciale, et ce chez des contrôles, des patients atteints de la MC sans traitement et avec traitement. Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM, IL-18 (n=22-32 par groupe). Les données ont été analysé par ANOVA et le test de Tukey, $P < 0.05$ (*) où il y a signification statistique.

4.6. Concentration de l'IL-18 Libre dans la circulation sanguine de patients de la MC et de contrôles

L'IL-18 libre, étant la forme biologiquement active, est plus probable d'être pertinente à la pathologie de la MC. Compte tenu de ces facteurs, nous avons décidé de mesurer les concentrations de l'IL-18 libre dans la circulation sanguine de chaque groupe étudié s'appuyant

sur la base de la stœchiométrie connue et par la loi d'action de masse en utilisant la constante de dissociation du complexe entre l'IL18 et l'IL18BP, soit $K_d = 400\text{pM}$ (Ianello *et al.* 2010). Tel qu'indiqué dans la **figure 4.6**, on observe que la concentration moyenne de l'IL-18 libre plasmatique chez les contrôles est de $241,4 \pm 29,19 \text{ pg/mL}$, celle des patients non traités est plus élevée, de $280,8 \pm 24,25 \text{ pg/mL}$, et chez les patients traités montrent une moyenne inférieure à celle des contrôles, soit de $193 \pm 23,76 \text{ pg/mL}$. Par le test ANOVA une tendance a été détectée entre les moyennes des différents groupes ($P = 0,07$). Ces données suggèrent que les personnes atteintes de la MC ont une concentration de l'IL-18 libre altérée, et tend à revenir à la normale lorsque l'inflammation est contrôlée par le traitement.

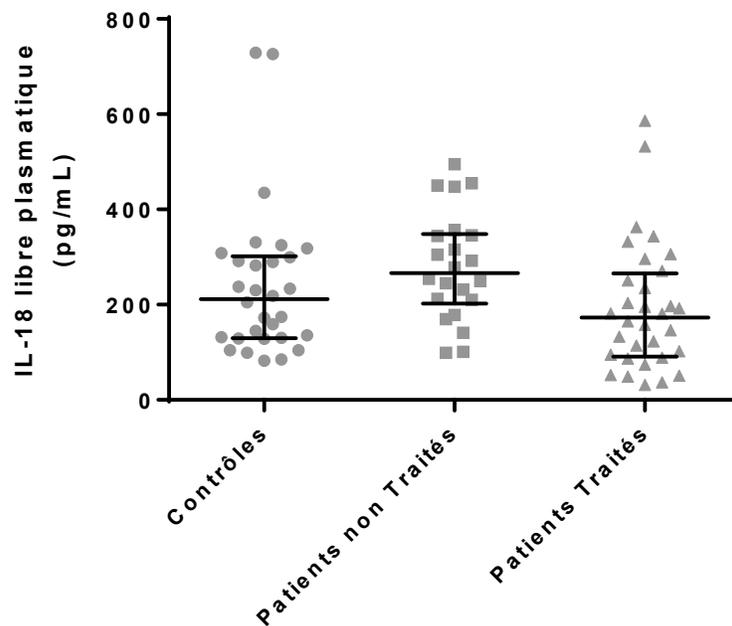


Figure 4.6. Comparaison des niveaux d'expression de l'IL-18 libre plasmatique entre les contrôles, les patients atteints de la maladie de Crohn non-traités, et traités. L'IL-18 libre dans la circulation sanguine des donneurs a été déterminé en utilisant la loi d'action de masse en utilisant la constante de dissociation ($K_d = 400\text{pM}$), et ce chez des contrôles, des patients atteints de la MC sans traitement et avec traitement. Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM, IL-18 libre ($n=22-32$ par groupe). Les données ont été analysé par ANOVA et le test de Tukey, $P < 0.05$ (*) où il y a signification statistique.

4.7. Les ratios de l'IL18/l'IL-18BP et de l'IL18/l'IL37

L'IL-37 est capable d'inhiber les effets de l'IL-18 sur des cellules humaines, de même que l'IL-18BP se lie et inactive l'IL-18. Par conséquent, à partir des données obtenues de nos

ELISA, nous avons voulu déterminer les rapports entre les protéines dosées afin d'observer une altération de la concentration de ces protéines chez les patients sans traitement. Nous avons déterminé les ratios des concentrations en picogramme/mL entre l'IL-18 et l'IL-18BP ainsi que l'IL-18 par rapport à l'IL-37 parmi les 3 conditions de nos ELISA, soit chez les personnes saines, atteintes de la MC sous traitement et sans traitement. Ces données sont illustrées sous forme de diagramme en boîte et les analyses statistiques ont été faites selon le test ANOVA suivi du test de Tukey, où $* = P < 0,05$. Comme observé dans la **figure 4.7 (A)**, les ratios entre l'IL-18 et l'IL-18BP montre peu de différence entre les quartiles (Q) 1, Q2, Q3, le minimum et le maximum, et ce à travers toutes les conditions étudiées. On observe également une plus grande variabilité chez les patients non traités. Cependant, sans être statistiquement significatif, on peut observer une tendance par laquelle les patients non traités ont une concentration moyenne plus élevées par rapport aux contrôles. Les résultats montrent que les concentrations en IL-18 par rapport à l'IL-18BP ont tendance à augmenter chez les patients non traités CD et ils ont tendance à se normaliser lors d'un traitement. La **figure 4.7 (B)** représente le ratio inverse de cette relation et démontre tout à fait la même chose. Dans la **figure 4.7 (C)**, le rapport entre l'IL-18 et l'IL-37 a été étudié. Nous avons obtenu peu de différence entre les 3 conditions, le même phénomène qu'à la **figure 4.3 (A)**. De plus, sans être significatif, on peut souligner une tendance, chez les patients non traités, où le Q2, Q3 et le maximum sont plus élevés par rapport aux contrôles et aux patients traités. On observe également une plus grande variabilité chez les patients non traités. Le ratio inverse de cette relation est représenté dans la **figure 4.7 (D)** et démontre exactement un effet similaire. Ces données suggèrent, malgré une légère augmentation des quartiles chez les patients non traités, que les ratios entre l'IL-18 et l'IL-18BP ainsi que ceux de l'IL-18 et l'IL-37 changent peu, autant lors d'une inflammation ou que lors de conditions normales. Nous interprétons que l'augmentation de la concentration de l'IL-18BP, de même que l'IL-37 va de pair avec l'augmentation de l'IL-18.

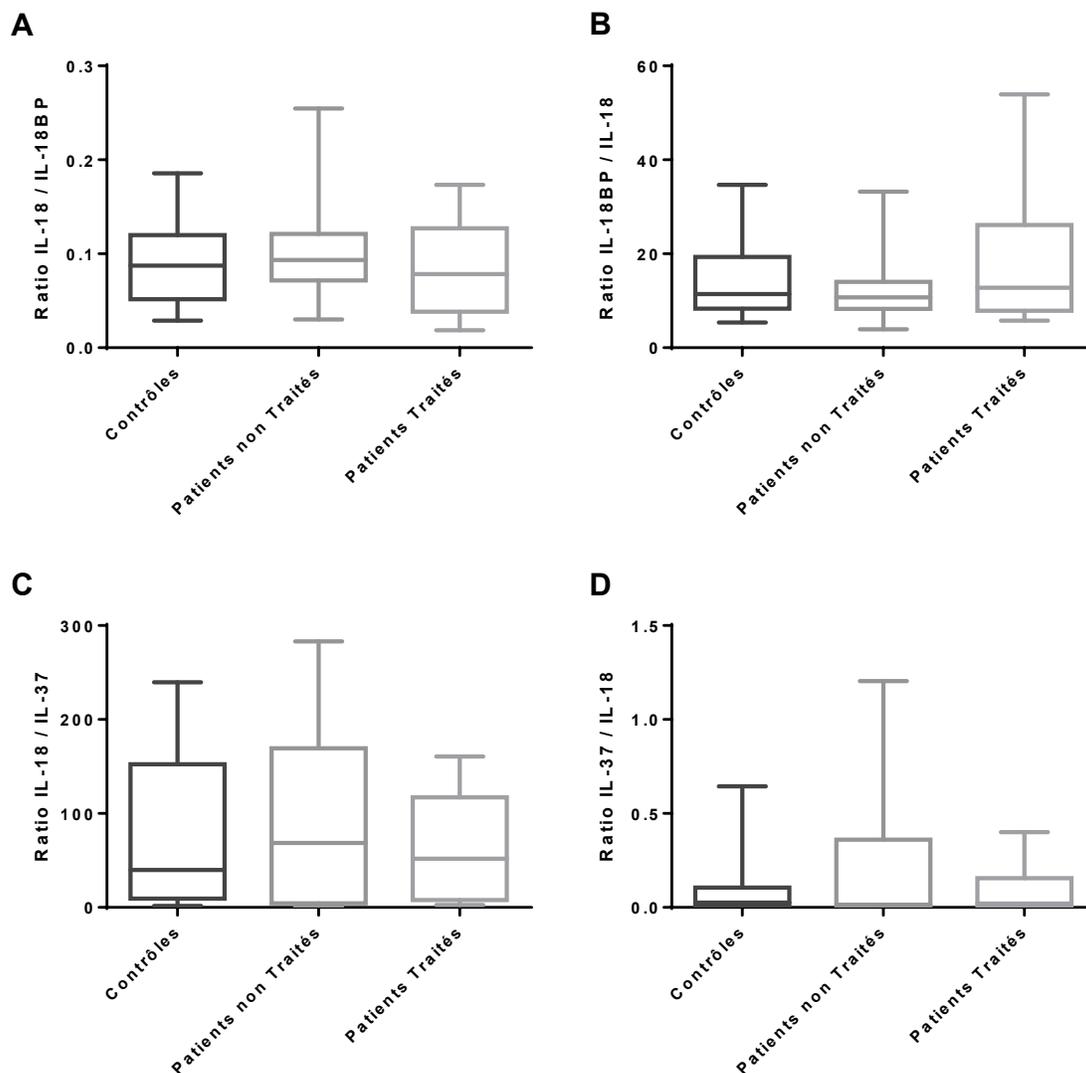


Figure 4.7. Rapport entre les concentrations plasmatique de l'IL-18 et l'IL-18BP (A et B) ainsi que l'IL-18 et l'IL-37 (C et D) chez les contrôles, les patients atteints de la maladie de Crohn sans traitement, et sous traitement. Les ratios ont été calculés selon les valeurs obtenues des ELISA et ont été exprimées sous forme de diagramme en boîte. Les données ont été analysé par ANOVA et le test de Tukey, $P < 0.05$ (*) où il y a signification statistique.

4.8. Association de l'expression plasmatique entre l'IL-18 et l'IL-18BP

Dans le but de vérifier l'existence d'une corrélation entre l'IL-18 et l'IL18BP, nous avons évalué et analysé par régression linéaire les valeurs obtenues à partir des ELISA de l'IL-18 et l'IL-18BP (Figure 4.4 et 4.5). Tel que présenté à la figure 4.8 A, le modèle linéaire des contrôles correspond à l'équation : $Y = 4,054 * X + 2065$, pour laquelle la pente est de 4,054 (Intervalle de confiance (IC 95% 0,4333 ; 7,675, $P < 0,05$) et le coefficient de détermination (R^2) équivaut à

0,1755. Le modèle linéaire représentant les patients non traités (**Figure 4.8 B**), quant à lui, correspond à l'équation : $Y = 2,919 * X + 2591$ ($R^2 = 0,08124$), où la pente est de 2,919 (IC 95% ; -1,536-7,374, $P = 0,1874$). Pour ce qui est des patients traités (**Figure 4.8 C**), l'équation correspondant à la régression linéaire est : $Y = 4,334 * X + 1897$ ($R^2 = 0,05484$), dont la pente est de 4,334 (IC 95% 2,868 ; 5,801, $P < 0,0001$). Pour les groupes contrôles et patients traités, la régression linéaire décrit une variation linéaire avec les variables mesurées ayant une pente positive indiquant que l'augmentation en IL-18 est associée avec l'augmentation en IL-18BP. Toutefois, chez les patients non traités, on peut observer une perte d'association puisque qu'elle n'est pas significative. Ces données semblent révéler une tendance positive associant le niveau d'expression plasmatique d'IL-18BP à IL-18 qui diminuerait chez les malades de Crohn, et qui serait rétabli suivant un traitement. Ainsi, ces données démontrent une corrélation entre l'IL-18 et l'IL18BP, et cette corrélation pourrait être perdue, en partie, lors d'une inflammation. Cependant, le R^2 est bas pour toutes ces conditions.

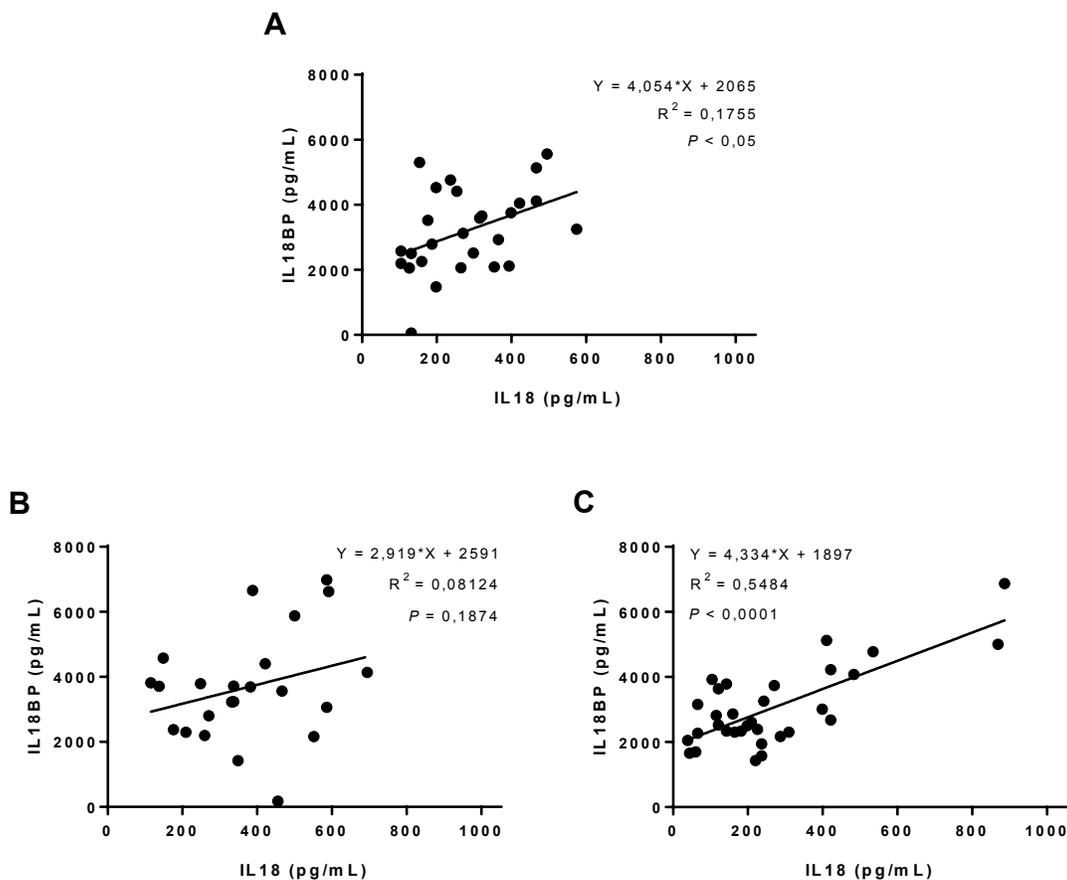


Figure 4.8. Association du niveau d'expression plasmatique des IL-18 et 18BP chez les contrôles (A), les personnes atteintes de la maladie de Crohn sans traitement (B) et avec traitement (C). Les associations des protéines quantifiées ont été analysées par régression linéaire à partir des données obtenues par les ELISA (Figure 4.4 et 4.5) de l'IL-18 et l'IL-18BP. L'équation des contrôles (A) : $Y = 4,054 * X + 2065$, (IC 95% 0,4333 ; 7,675, $P < 0,05$), $R^2 = 0,1755$. L'équation des patients non traités : $Y = 2,919 * X + 2591$, (IC 95% ; -1,536-7,374, $P = 0,1874$) ($R^2 = 0,08124$). L'équation des patients traités : $Y = 4,334 * X + 1897$ ($R^2 = 0,5484$), dont la pente est de 4,334 (IC 95% 2,868 ; 5,801, $P < 0,0001$). Les deux axes montrent une échelle de concentration linéaire.

4.9. Association de l'expression plasmatique entre l'IL-18 et l'IL-37

Comme l'IL-18 et l'IL-37 représentent des cytokines pro- et anti-inflammatoires, respectivement, et étroitement liés, il serait intéressant de voir s'ils se régulent mutuellement. Par conséquent, nous avons vérifié l'existence d'une possible corrélation entre l'IL-18 et l'IL37, nous avons évalué et analysé par une régression linéaire les valeurs obtenues à partir des ELISA de l'IL-18 et l'IL-37 (Figure 4.3, Figure 4.4). Tel qu'indiqué dans la figure 4.9 (A) le modèle linéaire des contrôles correspond à l'équation $Y = -0,02779 * X + 27,67$ pour laquelle la pente est

de -0,02779 (IC 95% -0,08150 ; 0,02593, $P = 0,289$) et le coefficient de détermination (R^2) équivaut à 0,06991. Les patients non traités sont représenté à la **figure 4.9 (B)**, et le modèle linéaire correspond à l'équation $Y = -0,006199 * X + 71,94$ ($R^2 = 6,461e-005$), et la pente de -0,006199 (IC 95% -0,6956 ; 0,6832, $P = 0,9836$). Du côté des patients traités (**Figure 4.9 C**), l'équation correspondant à la régression linéaire est $Y = -0,07447 * X + 35,33$ ($R^2 = 0,1851$), et une pente de -0,07447 (IC 95% -0,2019 ; 0,05293, $P = 0,2146$). Pour tous les groupes, la régression linéaire décrit une variation linéaire avec les variables mesurées ayant une pente négative indiquant que l'augmentation en IL-18 est associée avec une diminution en IL-37. Toutefois, aucune des régressions linéaires ne sont statistiquement significatives et possèdent un R^2 très faible. On peut cependant suggérer une tendance négative où l'association du niveau d'expression plasmatique de l'IL-37 à l'IL18 diminue chez les patients de la MC, et est rétablie à la suite d'un traitement. Ainsi, ces données révèlent une corrélation possible entre l'IL-18 et l'IL-37, et cette corrélation pourrait être perdue, en partie, lors d'une inflammation.

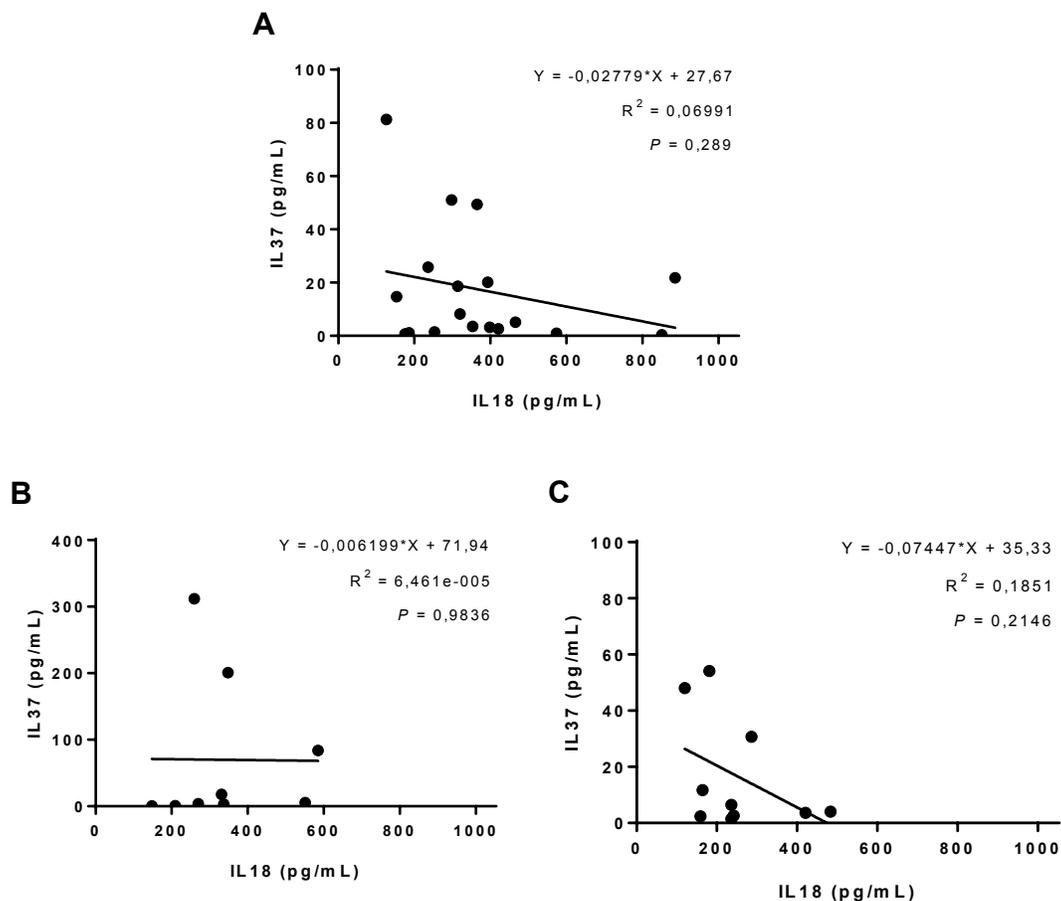


Figure 4.9. Association du niveau d'expression plasmatique de l'IL-18 et l'IL-37 chez les contrôles (A), les patients de la maladie de Crohn sans traitement (B) et avec traitement (C). Les associations des protéines quantifiées ont été analysées par régression linéaire à partir des données obtenues par les ELISA (Figure 4.3 et 4.4) de l'IL-37 et l'IL-18. L'équation des contrôles (A) : $Y = -0,02779 \cdot X + 27,67$, (IC 95% -0,08150 ; 0,02593, $P = 0,289$) ($R^2 = 0,06991$). L'équation des patients non traités (B) : $Y = -0,006199 \cdot X + 71,94$ ($R^2 = 6,461e-005$), (IC 95% -0,6956 ; 0,6832, $P = 0,9836$). L'équation des patients traités (C) : $Y = -0,07447 \cdot X + 35,33$ ($R^2 = 0,1851$), (IC 95% -0,2019 ; 0,05293, $P = 0,2146$). Les deux axes montrent une échelle de concentration linéaire.

4.10. Association de l'expression plasmatique entre SIGIRR et l'IL-37

Dans le but de vérifier l'existence d'une corrélation entre SIGIRR et l'IL-37, nous avons évalué et analysé par régression linéaire les valeurs obtenues à partir des ELISA de SIGIRR et l'IL-37 (Figure 4.2 et 4.3). Tel qu'indiqué dans la figure 4.10 (A) où le modèle linéaire correspondant aux contrôles montre une équation de : $Y = -0,01102 \cdot X + 19,42$ ($R^2 = 0,007490$), dont la pente est de -0,01102 (IC 95% -0,07825 ; 0,05621, $P = 0,7328$). Les patients non traités sont représenté par la régression linéaire (Figure 4.10 B), dont l'équation correspond à : $Y = -$

0,1350*X + 123,8 ($R^2 = 0,1165$), et la pente égale à : -0,1350 (IC 95% -0,4673 ; 0,1973, $P = 0,3688$). Finalement, tel qu'indiqué à la **figure 4.10 (C)**, le modèle linéaire représentant les patients traités correspond à une équation : $Y = 0,01022*X + 13,38$ ($R^2 = 0,01289$), dont la pente est de 0,01022 (IC 95% -0,06270 ; 0,08314, $P = 0,7549$). Pour les malades de Crohn sans traitement, la régression linéaire décrit une variation linéaire avec les variables mesurées ayant une pente négative indiquant que l'augmentation en IL-18 est associée avec une diminution en IL-37. Les contrôles et les patients traités semblent montrer aucune régression. Cependant, aucune des régressions linéaires ne sont statistiquement significatives et montrent un R^2 très faible; nous pouvons conclure qu'il n'existe aucune corrélation. On peut alors suggérer une tendance négative ou l'association du niveau d'expression plasmatique de l'IL-37 à SIGIRR soluble diminue lors d'une inflammation, soit chez les malades de Crohn sans traitement. Cette association est perdue lorsque cette inflammation est atténuée comme on peut observer chez les contrôles et chez les patients traités. Ainsi, ces données suggèrent une corrélation possible entre SIGIRR soluble et l'IL-37 en condition d'inflammation, et cette corrélation pourrait être atténué, en partie, dans la condition contrôle.

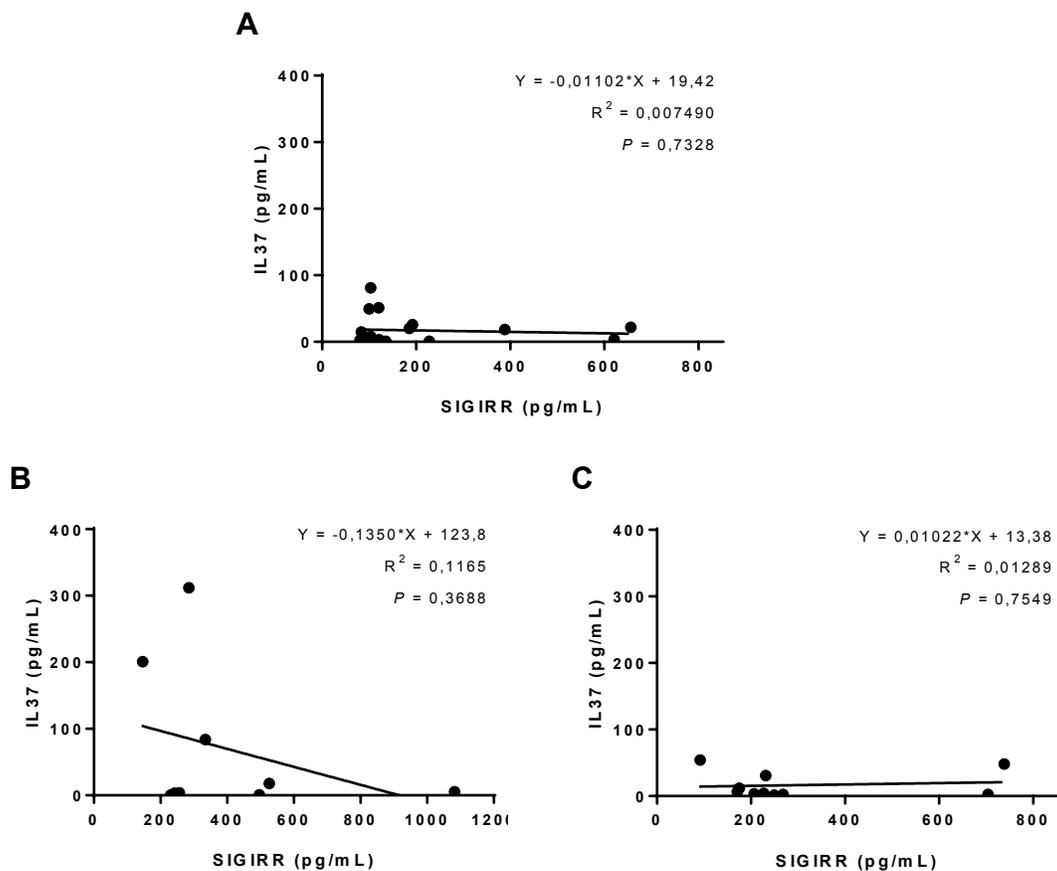


Figure 4.10. Association du niveau d'expression plasmatique de SIGIRR soluble et de l'IL-37 des contrôles (A), des patients de la maladie de Crohn sans traitement (B) et avec traitement (C). Les associations des protéines quantifiées ont été analysées par régression linéaire à partir des données obtenues par les ELISA (Figure 4.2 et 4.3) de SIGIRR et l'IL-37. L'équation des contrôles (A) : $Y = -0,01102*X + 19,42$, (IC 95% -0,07825 ; 0,05621, $P = 0,7328$) ($R^2 = 0,007490$). L'équation des patients non traités (B) : $Y = -0,1350*X + 123,8$, (IC 95% -0,4673 ; 0,1973, $P = 0,3688$) ($R^2 = 0,1165$). L'équation des patients traités (C) : $Y = 0,01022*X + 13,38$, (IC 95% -0,06270 ; 0,08314, $P = 0,7549$) ($R^2 = 0,01289$). Les deux axes montrent une échelle de concentration linéaire.

Chapitre 5

5. Discussion

Ce projet a tenté pour la toute première fois d'étudier le rôle de SIGIRR chez les cas pédiatriques de la MC. Supposant que la modulation de l'expression de SIGIRR et son ligand, l'IL-37, contribue à la pathogenèse de la MC, nous avons tenté d'approfondir cette question par des études de cytométrie en flux et de dosage de protéines plasmatiques (ELISA). Nous avons observé une diminution significative de l'expression de SIGIRR à la surface lymphocytes B et les cellules NK et une tendance à diminuer chez les monocytes des personnes atteintes de la MC comparativement aux personnes saines a été observée. De plus, cette diminution constatée chez les cellules immunitaires peut s'expliquer par l'augmentation plasmatique de SIGIRR soluble. Outre SIGIRR soluble, nous avons observé que les patients traités et non-traités de la MC possèdent des concentrations altéré des cytokines étudiées, soit l'IL-37, l'IL-18BP, l'IL-18, ainsi que la forme libre de cette dernière. Ce profil inflammatoire tend à revenir à la normale lorsque l'inflammation est contrôlée par la prise de médicaments, y compris l'expression de la forme soluble de SIGIRR. Par analyse de régressions linéaires, nous avons identifié des corrélations positives entre l'IL-18 et l'IL18BP et des tendances négatives entre l'IL-18 et l'IL-37. Toutefois, l'ensemble de ces corrélations est perdue chez les malades de Crohn non traités. Finalement, une tendance négative entre SIGIRR soluble et l'IL-37 a été observée uniquement chez les personnes atteintes de la MC non traitée (**Chapitre 4**).

Nous nous sommes d'abord intéressés à l'expression de la protéine SIGIRR chez les cellules sanguines que nous avons étudiées par cytométrie en flux. Ainsi, nous avons constaté une diminution de l'expression de SIGIRR chez certains types de cellules immunitaires des personnes atteintes de la MC comparativement aux contrôles (**Figure 4.1**), ce qui concorde avec la littérature. En effet, plusieurs études ont démontré cette baisse dans d'autres maladies inflammatoire. Comme mentionné au chapitre 1, plusieurs travaux ont démontré que l'expression de SIGIRR humaine et murine chez plusieurs types cellulaires immunitaires tels les DC, monocytes et granulocytes, est diminuée par la stimulation au LPS comparé à la condition contrôle (Polentarutti *et al.* 2003, Wald *et al.* 2003, Huang *et al.* 2006). La réaction inflammatoire simulée par le LPS occasionne une réponse exagérée de l'immunité muqueuse contre la flore microbienne, ce qui correspond à l'explication plausible communément acceptée sur l'inflammation retrouvée dans la MC (Rescigno et Di Sabatino 2009). Pour ce qui est de nos travaux, nous avons observé cette diminution auprès des lymphocytes B et des cellules NK. Cette

diminution de l'expression de SIGIRR chez les personnes atteintes de la MC pourrait indiquer une réaction normale de l'organisme face à des signaux d'inflammation. En effet, les CEI sont constamment exposées à des microbes entériques et, bien qu'elles expriment des TLR reconnaissant des produits bactériens, l'activation de ces TLR est strictement contrôlée. Ces récepteurs sont maintenus à un stade d'hyporéactivité prévenant toute réaction inflammatoire indésirable. Lorsqu'un pathogène fait son apparition, la concentration de SIGIRR diminue transitoirement afin de permettre aux TLR de déclencher une réaction inflammatoire puissante contre ces pathogènes, puis revient à un niveau physiologique (Khan *et al.* 2010, Kadota *et al.* 2010). Selon nos résultats, l'inflammation chronique retrouvée chez ces individus souffrant de la MC peut expliquer l'incapacité de l'organisme à retrouver un niveau normal d'expression de SIGIRR. Il est possible que des signaux constants d'inflammation empêchent le retour à la normale de SIGIRR ce qui serait causé par un défaut épigénétique ou génétique affectant l'expression chez les cellules testées. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que les PBMC des patients de la MC sont susceptibles d'être moins sensibles à son ligand, l'IL-37. Le cas contraire a été observé chez les neutrophiles et les monocytes, n'étant pas statistiquement significatif. De plus, ces résultats peuvent être expliqués par la divergence biologique et l'échantillonnage faible ($n = 4$). Ce phénomène peut être interprété par la capacité de ces cellules à agir à l'intérieur de tissus, tels que la muqueuse intestinale (Fournier et Parkos 2012, Sartor 2006). Il serait alors plus intéressant de regarder le niveau d'expression de SIGIRR à la surface des macrophages et des neutrophiles ayant infiltré la muqueuse. En effet, il sera alors possible pour ces cellules d'arborer un phénotype différent que ceux en circulation.

À la suite de l'observation de la diminution de l'expression de SIGIRR chez les patients de la MC (**Figure 4.1**) nous voulions déterminer la cause de cette diminution. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette diminution, certains récepteurs sont clivés et rejetés dans la circulation sanguine, tels que la molécule transmembranaire TNF- α qui est clivé par la MMP extracellulaire d'enzyme de conversion TNF- α (TACE), connue aussi sous le nom de ADAM17, et relâchant par la suite la forme soluble (TNF- α) (Moss *et al.* 1997, Müller *et al.* 2009). Il existe également le cas du récepteur membranaire CD16 (FcR γ IIIa) responsable de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) chez les cellules NK. Lorsqu'activé, CD16 est également clivé par ADAM17, diminuant les effets des voies de signalisation activées par ce récepteur (Romee *et al.* 2013, Lajoie *et al.* 2013) D'autres sont également recyclés par endocytose, phénomène majeur dans la régulation de la signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase (Goh et Sorkin 2013). À l'aide d'un ELISA spécifique à SIGIRR, nous avons détecté chez tous les échantillons de plasma utilisé, une forme soluble de SIGIRR (**Figure 4.2**). Ce résultat semble suggérer qu'il

s'agirait d'un mécanisme semblable à la première hypothèse, ou encore qu'il s'agirait d'une forme soluble sécrétée et non clivée par le récepteur. De plus, une tendance à l'augmentation, près de la signifiante statistique ($P = 0,08$), de la concentration de SIGIRR soluble chez les patients non traités comparativement aux contrôles a été mesurée. Nous avons pour la première fois décrit un phénotype clinique chez la MC impliquant SIGIRR soluble. Nous savons que l'IL37 est le ligand de SIGIRR (Nold-Pety *et al.* 2015, Moretti *et al.* 2014, Lunding *et al.* 2015). Toutefois, cette liaison nécessite l'IL-18R α pour ce faire. Il est alors possible que le mécanisme de clivage du récepteur SIGIRR, soit homologue à celui de CD16 clivé par ADAM17. Ensemble, nos résultats semblent être compatibles avec cette interprétation, par laquelle la forme soluble de SIGIRR est clivée et limite l'action anti-inflammatoire de l'IL-37.

Suivant ce résultat, nous avons dosé diverses cytokines en lien avec le complexe formé de SIGIRR et l'IL-18R α , soit l'IL-37, le ligand, l'IL-18, le ligand naturel de l'IL-18R α , et l'IL-18BP, l'antagoniste de l'IL-18. Nous avons voulu déterminer si ces cytokines peuvent être débalancées lors de la MC. Nous avons ainsi observé une différence proche de la signifiante statistique à travers chaque cytokine entre les patients non traités les contrôles (**Figure 4.3, Figure 4.4, Figure 4.5**), et obtenu une différence statistiquement significative ($P < 0,05$) entre les patients non traités et traités chez l'IL18. Ces résultats corroborent d'autres travaux réalisés sur la MC et la CU. En effet, plusieurs équipes étudiant individuellement l'IL-18 et l'IL-18BP ou les deux ensembles, ont démontré une hausse de l'expression de ces cytokines dans le plasma et/ou le sérum comparativement aux contrôles (Corbaz *et al.* 2002, Ludwiczek *et al.* 2005, Leach *et al.* 2008, Haas *et al.* 2009, Naftali *et al.* 2007, Pizarro *et al.* 1999). L'IL-37 a également été étudié dans le cadre de plusieurs maladies et a été démontré une altération similaire que celles retrouvées chez l'IL-18 et l'IL-18BP. (Ji *et al.* 2014, Zhao *et al.* 2014, Xia *et al.* 2015, Farrokhi *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2015) Cependant, il y a peu de travaux qui se soient intéressées à ces 3 cytokines, en plus de SIGIRR. Nous supposons que l'organisme, en contexte de la MC, reçoit des signaux inflammatoires ininterrompus et est en perpétuel travail d'atténuation de l'inflammation causant, par le fait même, la dérégulation de cet ensemble de protéines.

Le calcul de l'IL-18 libre nous a permis d'identifier une diminution significative chez les patients traités comparativement aux patients non traités ($P < 0,05$) et le groupe contrôle montre une moyenne plus basse que les patients non traités, sans atteindre la signifiante statistique (**Figure 4.6**). Plusieurs études ont démontré la même tendance. En effet, ces observations ont été faites dans la MC auprès de cas adultes et de cas pédiatriques et démontrent une augmentation de l'IL-18 libre dans la circulation sanguine (Ludwiczek *et al.* 2005, Naftali *et al.* 2007, Leach *et al.* 2008). De plus, ces travaux ont montré que l'IL-18 libre se retrouve en plus grandes

concentrations chez les cas sévères de MC comparativement aux cas modérés et légers. Par conséquent, nos résultats et les leurs suggèrent que l'augmentation compensatoire de l'IL-18BP est insuffisante pour contrôler l'activité pro-inflammatoire de l'IL-18 libre.

Par la suite, nous avons évalué les ratios, et ratios inverses entre l'IL-18 et l'18BP ainsi que l'IL-18 et l'IL-37, afin de confirmer l'existence d'une anomalie au niveau de la concentration d'une des 3 cytokines étudiées. Nous n'avons observé aucun changement significatif entre les concentrations moyennes des 3 conditions étudiées, et ce pour les l'IL-37 et l'IL-18BP (**Figure 4.7**). Toutefois, il est possible d'observer une tendance sur le diagramme en boîte de l'IL-18 et l'IL-18BP. En effet, il semble plus élevé chez les patients non traités comparativement aux contrôles. C'est-à-dire que la concentration de l'IL-18BP par rapport à l'IL-18 est légèrement moins élevée chez les patients non traités. Pour ce qui est du ratio entre l'IL-18 et l'IL-37, la trop grande variabilité retrouvée chez les patients non traités rend difficile toute conclusion. Toutefois, nous pouvons interpréter la perte de réactivité face aux pathogènes par la diminution de la concentration de l'IL-18BP, ce qui est soutenu par les résultats obtenus du calcul de l'IL-18 libre. Il est possible de penser que le problème se situe dans l'incapacité de terminer la réaction inflammatoire, et elle devient chronique à long terme. En effet, découvert en 1989 sous le nom de *IFN- γ -inducing factor*, et renommé en 1995 (Okmura *et al.* 1995), l'IL-18 est responsable de l'inflammation, en partie, par l'induction de l'expression de l'IFN- γ . Cette cytokine est associée à plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunes lorsque retrouvé en haute concentration dont le lupus érythémateux disséminé, la polyarthrite rhumatoïde, le diabète de type 1, le psoriasis, la maladie du greffon contre l'hôte et également la MC (Dinarello *et al.* 2013). D'ailleurs, l'IFN- γ est ciblé par plusieurs équipes comme traitement possible contre la MC (Cui *et al.* 2013, Hommes *et al.* 2006, Reinisch *et al.* 2010). Il est tentant de spéculer que cette tendance observée, soit le ratio entre l'IL-18 et l'IL18BP plus élevé chez les patients non traités, ainsi que la concentration plus élevée de l'IL-18 libre indiquerait une dérégulation de l'inflammation chez la MC.

Nous avons associé le niveau d'expression plasmatique de l'IL-18 en rapport avec l'IL-18BP chez les contrôles, les patients non-traités et les patients traités (**Figure 4.8**). Par régression linéaire nous avons obtenu une corrélation positive chez les contrôles ($P < 0,05$) et les patients traités ($P < 0,001$). Chez les patients non traités, nous avons obtenu une tendance positive, sans toutefois observer de signifiante statistique. Les régressions linéaires et les ratios de l'IL-18 et l'IL18BP (**Figure 4.8** et **Figure 4.7**) suggèrent une diminution de l'association entre l'expression de l'IL-18 et l'IL-18BP chez les patients non traités. En condition normale, l'organisme tient à garder l'expression de l'IL-18BP proportionnelle selon l'IL-18 (**Figure 4.8 A, C**), puisqu'une

molécule d'IL-18BP inhibe directement une molécule de l'IL-18 par interaction (Dinarello *et al.* 2013). Cette liaison possède une plus forte affinité que l'IL-18 et IL-18R α , l'organisme prévient alors une inflammation exagérée par l'induction de l'IFN- γ créé par l'IL-18, en augmentant également IL-18BP (Dinarello *et al.* 2013). En accord avec la littérature, la **figure 4.8 (B)** décrit une baisse de la capacité des personnes atteintes de la MC sans traitement à réagir face à l'inflammation, suggérant que l'augmentation compensatoire de l'expression de l'IL-18BP est insuffisante à réguler l'inflammation induite par IL-18. (Corbaz *et al.* 2002, Ludwiczek *et al.* 2005, Leach *et al.* 2008, Haas *et al.* 2009, Naftali *et al.* 2007, Pizarro *et al.* 1999). Toutefois, cette conclusion reste à être confirmée, puisque le coefficient de détermination très faible.

Nous savons que l'IL-37 inhibe les réponses immunitaires (Nold *et al.* 2010, Sharma *et al.* 2008) et supprime l'inflammation intestinale chez les souris (McNamee *et al.* 2011), le niveau d'expression plasmatique de l'IL-18 et celui de l'IL-37 chez les contrôles, les patients non-traités et les patients traités ont été analysés afin d'observer une possible association. Contrairement aux ratios (**Figure 4.7**), l'analyse par régression linéaire révèle, sans être significative, une tendance négative chez les contrôles ($P = 0,2890$) et les patients traités ($P = 0,2146$) (**Figure 4.9**). Nous savons que la forme mature de l'IL-18 est clivée et activée par l'inflammasome (Aguilera *et al.* 2014), et que l'IL-37 est capable d'inhiber l'activation de l'inflammasome chez un modèle d'aspergillose pulmonaire invasive murine (Moretti *et al.* 2014). Ainsi, selon la littérature, nous nous attendrions à observer une corrélation négative entre l'expression d'IL-37 et d'IL-18. Cependant, nous n'avons pu démontrer de façon claire cette corrélation négative, nos résultats n'indiquant, tout au plus, qu'une tendance. En effet, nos résultats des contrôles et des patients traités sont proches de conditions physiologiques, alors que les patients non traités ne présente plus cette tendance négative entre IL-37 et IL-18 ($P = 0,9836$). Il est intéressant de noter que la concentration de l'IL-37 est plus élevée chez les patients non-traités observés (**Figure 4.3**) ne se traduise pas en une tendance positive. Cependant, ce point est à débattre; plusieurs travaux semblent montrer des concentrations contradictoires au niveau du sérum ou du plasma. En effet, plusieurs maladies inflammatoires, dont le syndrome coronarien aigu (Ji *et al.* 2014), la polyarthrite rhumatoïde (Zhao *et al.* 2014, Xia *et al.* 2015), la sclérose en plaques (Farrokhi *et al.* 2015) et la tuberculose pulmonaire active (Zhang *et al.* 2015), ont démontré une concentration plus élevée de l'IL-37 à travers la circulation sanguine par rapport aux personnes saines. Inversement, les enfants ayant l'asthme (Charrad *et al.* 2015), la tuberculose (Huang *et al.* 2015), la CU ou la MC (Li *et al.* 2014) ont présenté une diminution de l'IL-37 à travers le sérum et/ou le plasma comparativement aux individus sains. L'étude de Li et ses collaborateurs, qui est la plus similaire aux présents travaux, démontre des résultats diamétralement opposés à la nôtre et

pourrait être justifiée par la divergence d'origine des populations étudiées, soit chinoise versus caucasienne. De plus, l'âge des patients participants aux études ne sont pas les mêmes. En effet, notre étude se situe au niveau pédiatrique tandis que la leur est chez les adultes, l'âge moyen étant de 39 ans. Il est également possible que le développement du système immunitaire intestinal des enfants nécessite un niveau plus élevé de cytokines immuno-modulatrices pour maintenir l'homéostasie muqueuse par rapport au système immunitaire mature des adultes. En fait, cette différence d'expression entre enfants et adulte a également été observée au niveau de l'épithélium. Plusieurs équipes étudiant l'expression de l'IL-37 au niveau de tissus intestinaux chez la MC adulte ont démontré une augmentation chez les malades de Crohn (Fonseca-Camarillo *et al.* 2015, Imaeda *et al.* 2013, Li *et al.* 2014), tandis qu'une étude au niveau pédiatrique n'a observé aucune différence significative (Weidlich *et al.* 2014). Ainsi, nous suggérons que la corrélation perdue chez les patients non traités indique un débalancement des cytokines responsables de la régulation de l'inflammation. Toutefois, la grande variabilité et la petitesse de cet échantillonnage ne permettent de valider ces spéculations.

Nous avons révélé une tendance négative entre SIGIRR soluble et l'IL-37 chez les patients (**Figure 4.10**). Ce résultat, sans être significatif ($P = 0,3688$), est compatible avec notre interprétation, selon laquelle le récepteur de SIGIRR pourrait être clivé suite à une réponse inflammatoire. Ainsi, nous supposons que la forte concentration en IL-37, induisant des signaux anti-inflammatoires, pourrait restreindre le clivage de SIGIRR. Nous suggérons, à partir de nos résultats obtenus, un mécanisme général de SIGIRR dans le contexte de la MC. Lorsqu'un pathogène déclenche des signaux inflammatoires et est détecté par l'organisme à l'aide des TLR. Comme décrit par Kadota et ses collaborateurs, cette détection provoque l'augmentation de l'expression de TLR4 et la diminution de SIGIRR (Kadota *et al.* 2010). Comme nous l'avons démontré, la concentration du récepteur SIGIRR diminue chez les cellules immunitaires (**Figure 4.1**). Cette diminution pourrait être expliquée par le clivage de SIGIRR (**Figure 4.2**) via une enzyme non identifiée. Tel que vu dans le chapitre 1, l'activation des TLR déclenche et induit l'expression de plusieurs composantes associées à NLRP3 (Aguilera *et al.* 2014). Cette induction permet d'activer le NLRP3, et s'ensuit la clive et la sécrétion de plusieurs cytokines, soit l'IL-1 β , l'IL-18, et l'IL-37. D'un côté, l'IL-18 déclenche une cascade d'événement pro-inflammatoire et de l'autre, une rétroaction négative par l'IL-37 à l'aide d'un complexe composé d'IL-18R α et le récepteur SIGIRR (Nold-Pety *et al.* 2015, Moretti *et al.* 2014, Lunding *et al.* 2015). Cette activité biologique de l'IL-37, lorsque lié au complexe, pourrait empêcher, en partie, le clivage du récepteur SIGIRR. Ainsi, la réduction de l'IL-37 retrouvée chez les malades de Crohn limiterait

sa liaison au complexe IL-18R α -SIGIRR. En effet, cette diminution favoriserait le clivage du récepteur SIGIRR tel que supporté par la corrélation négative de SIGIRR et IL-37 (**Figure 4.10**).

Lors de ce projet, nous avons établi pour la première fois un phénotype impliquant SIGIRR dans le contexte de la MC. En effet, par technique de cytométrie en flux nous avons déterminé une diminution de l'expression de SIGIRR à la surface de cellules sanguines. Nous avons caractérisé pour la première fois une forme soluble de SIGIRR dans la circulation sanguine chez tous les échantillons testés. Fait intéressant, les individus atteints de la MC sans traitement détiennent un accroissement de cette forme soluble à travers la circulation, et une médication tend à diminuer la concentration. D'après ces résultats, nous avons suggéré un nouveau mécanisme chez SIGIRR réagissant face à l'inflammation retrouvé dans la MC. Par ailleurs, nous avons également caractérisé l'altération des cytokines en lien avec le complexe formé par SIGIRR et IL-18R α , soit l'IL-18, ainsi que sa forme libre, l'IL-18BP et l'IL-37. Toutefois, les malades de Crohn non traités représentent un groupe particulier comparativement aux contrôles et patients traités. Une corrélation positive entre l'IL18 et l'IL18BP est perdue, une tendance négative entre IL-18 et l'IL37 est perdue, et une tendance négative gagnée entre SIGIRR solubles et l'IL37 sont tous les 3 caractéristiques chez les patients non traités.

Il sera important d'augmenter l'échantillonnage afin d'augmenter la puissance statistique de nos tests et, ainsi, confirmer ou infirmer la véracité de nos spéculations. Il sera aussi intéressant d'obtenir certaines informations concernant la population étudiée, tels les marqueurs d'inflammations et cliniques, afin de vérifier la représentativité de la cohorte étudiée au sein de la population cible, soit les cas pédiatriques de la MC. En fait, due à l'absence de ces données, nous n'avons pu pousser l'analyse par des associations entre le CDAI des patients avec l'expression de SIGIRR soluble, ou toutes autres molécules étudiées. De plus, cette population est intéressante, puisqu'elle est l'une des plus touchées dans le monde (Molodecky et al. 2012, Crohn's and Colitis Canada 2015). Cependant, il est important de souligner que les contrôles recrutés le sont suivant une colonoscopie afin de diagnostiquer la douleur ressentie par ces individus. Ainsi, les contrôles, bien que sans signes visibles de maladie, peuvent ressentir de la douleur due à une inflammation et aurait alors un motif d'expression de protéines différent de celui physiologique. Toutefois, selon les conditions de l'étude, ils demeurent les meilleurs contrôles possibles que nous avons pu obtenir; les biopsies, étant invasives, seraient très difficiles à obtenir de la part de personne en santé. De plus, plusieurs études ont reporté que les enfants souffrent d'effets négatifs de l'hospitalisation, incluant l'anxiété, des cauchemars et de l'irritabilité, face aux procédures douloureuses (Rossen et McKeever 1996, Sheldon 1997, White *et al.* 1996, Wright 1995, Melnyk

et al. 2004, Renninck *et al.* 2002, Evagelia *et al.* 2001). Il faut garder en tête que nos résultats peuvent être influencés par la douleur et le stress encouru par l'hospitalisation.

Plusieurs questions sans réponse et devront être approfondis dans le futur. Il sera possible de déterminer l'expression du récepteur SIGIRR et d'autres composantes reliées avec SIGIRR, tels l'IL-18Ra et les TLR, sur les autres types de cellules immunitaires non étudiés dans ce projet afin de confirmer les conclusions de notre projet. Outre les cellules immunitaires, il serait intéressant d'observer ce complexe ainsi que son ligand chez les CEI par cytométrie en flux, par immunohistochimie et par immunobuvardage de type western. L'expression des ARNm pourra être quantifiée par qPCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*) parmi les différentes cellules immunitaires et les CEI afin de confirmer nos résultats. Par des études *in vitro*, il sera également intéressant d'observer comment un traitement au LPS affecte les cytokines étudiées. Il est crucial de caractériser la forme soluble de SIGIRR. Est-ce SIGIRR est clivé ou bien fait à partir d'un gène sans la partie transmembranaire? Par des études de souris déficientes en SIGIRR, nous serons en mesure d'observer si le clivage de SIGIRR est également présent. De plus, il serait possible de l'isoler par purification par chromatographie, et d'étudier sa structure par résonance magnétique nucléaire et cristallographie. De plus, la séquence protéique pourrait être déterminée par spectrométrie de masse et permettrait d'identifier des sites de clivage, puis de cibler les enzymes responsables de ce clivage. Par technique de FRET (transfert d'énergie par résonance de type Förster), nous pourrions également de déterminer si SIGIRR soluble peut se lier à l'IL-37 et l'IL-18. À l'aide des cellules sanguines de patients et de contrôles étudier leurs réponses à l'IL-37 ou bien au LPS. Une étude de criblage pourra être faite afin de déterminer si une ou plusieurs molécules possèdent une action semblable à l'IL-37. Ceci permettrait d'identifier une molécule capable d'activer le complexe IL-18Ra/SIGIRR/IL-37. Cette réaction pourrait augmenter l'atténuation de l'inflammation et pourrait éventuellement devenir un traitement envisageable pour la MC ou toutes autres maladies chroniques où l'inflammation est exagérée. Ce projet, complété dans son intégralité, permettrait de caractériser un nouvel ensemble d'acteurs jouant un rôle potentiel dans la pathogenèse de la MC.

Chapitre 6

6. Conclusion

Ce projet de recherche a permis de caractériser pour la première fois le rôle de SIGIRR dans le contexte de la MC pédiatrique. Plus spécifiquement, nous avons proposé que la modulation de l'expression et/ou le fonctionnement même de SIGIRR et son ligand (IL-37) contribuent à la pathogenèse de la MC. Par des techniques de cytométrie en flux et d'ELISA, nous avons pu confirmer cette hypothèse.

En effet, une modulation à la baisse de l'expression a été observée dans l'ensemble des cellules immunitaires testées chez les enfants atteints de la MC comparativement aux enfants sains. Cette modulation a été observée chez le ligand de SIGIRR, l'IL-37, mais également chez l'IL-18BP et l'IL18, ainsi que sa forme soluble. Cette altération de l'expression de ces cytokines, à la hausse chez les patients non traités comparé aux contrôles qui tend à revenir à la normale suivant le traitement, démontre que le changement significatif de SIGIRR et l'IL-37 chez la MC joue probablement un rôle dans le développement de la maladie. Bien que nous n'ayons pas étudié le fonctionnement de SIGIRR, nous avons découvert que la forme soluble dans la circulation sanguine, qui a été détectée dans l'ensemble des échantillons testés, augmente significativement chez les patients non traités par rapport aux contrôles. Nos résultats confirment ainsi notre hypothèse, puisque l'expression du profil inflammatoire et de la forme soluble de SIGIRR, dont la fonction sera importante à déterminer, semblent être altérées dans la MC dévoilant que SIGIRR est susceptible de jouer un rôle important dans l'atténuation de l'inflammation intestinale.

Bien que plusieurs études se soit intéressé à SIGIRR et à la MC, il reste beaucoup à découvrir à leurs sujets. Qui plus ait, ce régulateur négatif de l'inflammation constitue une cible thérapeutique potentielle mais qui, jusqu'à ce jour, n'a pas encore été développé. Il serait alors intéressant d'estimer si SIGIRR détient un effet thérapeutique permettant d'atténuer considérablement l'inflammation chronique observée chez les malades de Crohn, notamment les cas pédiatriques. En effet, le complexe formé par SIGIRR, l'IL-37 et l'IL-18R α pourrait être une cible de choix dans l'élaboration d'un médicament. Une molécule structurellement homologue ou possédant le domaine de liaison de l'IL-37 pourrait ainsi activer la voie de signalisation anti-inflammatoire qui éventuellement serait non seulement bénéfiques dans le cadre de la MC, mais chez l'ensemble des maladies inflammatoires, dont l'arthrite, l'asthme, et l'hépatite.

Pour conclure, la MC représente un défi de taille. Son incidence croissante à travers le monde classe la MC en tant que maladie mondiale émergente (Molodecky *et al.* 2012). Le Canada dénombrait, en 2012, plus de 129 000 cas diagnostiqués, faisant des canadiens le peuple ayant le taux de prévalence et d'incidence les plus élevés dans le monde (Bernstein *et al.* 2006, Rocchi *et al.* 2012). Actuellement, le Canada maintient toujours ces chiffres, 1 Canadien sur 150 vit avec la MC ou la CU (Crohn's and Colitis Canada 2015). De plus, les immigrants au Canada développent la MC pour la première fois, et leurs enfants ont d'autant plus de chance de développer la MC (Ananthkrishnan 2015). De surcroît, les nouveaux cas pédiatriques de MC au Canada ont presque doublé depuis 1995 (Crohn's and Colitis Canada 2015). Tout juste derrière la Nouvelle-Écosse, le Québec est 2^e en terme d'incidence au pays (Lowe *et al.* 2009, Economou et Pappas 2008). Une étude menée dans la province et utilisant les bases de données de l'assurance maladie universelle, la Régie de l'Assurance-Maladie du Québec (RAMQ) a estimé que l'incidence spécifique de la province est de 20.2 cas par 100 000 personnes. Cette forte prévalence en sol canadien et québécois, en plus de la chronicité de la maladie, cause un fardeau financier important, il est donc primordial de continuer la recherche ce qui permettra de déboucher sur de meilleurs traitements et, ainsi réduire le fardeau de cette maladie chronique sur notre système de santé, tout en améliorant la qualité de vie de ceux affectés. L'amélioration de la qualité de vie des malades de Crohn est d'autant plus importante chez les cas pédiatriques, puisque le développement physique et psychologique sont affectés. Des traitements plus efficaces pourront les soustraire à ces désagréments et contribueront à augmenter leur niveau de qualité de vie. Néanmoins, la recherche n'est pas le seul axe à contribuer au bien fait des patients. Le Canada se doit d'offrir une meilleure sensibilisation et éducation envers les MICI au sein de la population, mais également auprès des professionnels de la santé. Les diagnostics tardifs et inappropriés, un accès inéquitable aux services de soins de santé, le traitement dispendieux, les perspectives d'emplois diminués, en plus d'un soutien communautaire limité sont des facteurs aggravant la qualité de vie des gens affectés par la MC (Rocchi *et al.* 2012). La sensibilisation doit donc mieux préparer les gens touchés par cette maladie et est un pilier nécessaire à la recherche afin de mieux combattre la MC.

Bibliographie

- Abraham B, Mehta S, et El-Serag H. (2012). Natural history of pediatric-onset inflammatory bowel disease: a systematic review. *J Clin Gastroenterol*, 46:581-589.
- Abraham C et Cho J. (2009). Inflammatory bowel disease. *New Engl J Med*, 361:2066-2078.
- Abraham C, et Cho J. (2009). Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 15:1090-1100.
- Adib-Conquy M, Adrie C, Fitting C, et al. (2006). Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients. *Crit Care Med*, 34: 2377-2385.
- Aguilera M, et al. (2014). The complex role of inflammasomes in the pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases - lessons learned from experimental models. *Cytokine Growth Factor Rev*, doi : 10.1016/j.cytogfr.2014.04.003.
- Ahmad A et al. (2015). Imbalanced production of IL-18 and its antagonist in human diseases: the paradigm of HIV-1 infection. *Cytokine*, en révision.
- Akira S. (2006). TLR Signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*, 311: 1-16.
- Aksentijevich I, et al. (2009). An auto-inflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *N Engl J Med*, 360: 2426-2437.
- Al-Hawary M, et Zimmermann E. (2012). A new look at Crohn's disease: novel imaging techniques. *Curr Opin Gastroenterol*, 28:321-326.
- Allen IC, TeKippe EM, Woodford RM, et al. (2010). The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med*, 207 : 1045-1056.
- Ananthakrishnan A. (2013). Environmental triggers for inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep*, 15:302.
- Ananthakrishnan A. (2015) Epidemiology and risk factors for IBD. *Gastroenterol Hepatol*, 12: 205-217.
- Anonyme. A. (2013). Multiple Ascending Doses of AMG 139 in Healthy and Crohn's Disease Subjects, *Natl Lib Med*, doi: clinicaltrials.gov/show/NCT01258205.
- Anonyme. B. (2013). AMG 827 in Subjects With Moderate to Severe Crohn's Disease, *Natl Lib Med*, doi: clinicaltrials.gov/show/NCT01150890.
- Aoki K, Tamai Y, Horiike S, et al. (2003). Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in APC+/Delta716Cdx2+ compound mutant mice. *Nat Genet*, 35: 323-330.
- Arend WP, Palmer G, et Gabay C. (2008). IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev*, 223: 20-38.
- Balkwill F, Charles KA, et Mantovani A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 7: 211-217.
- Baltiwalla FM, Li W, Ritchlin CT, et al. (2005). Microarray analyses of peripheral blood cells identical unique gene expression signature in psoriatic arthritis. *Mol Med*, 11: 21-29.
- Barral M, Dohan A, Allez M, Boudiaf M, et al. (2015). Gastrointestinal cancers in inflammatory bowel disease: An update with emphasis on imaging findings. *Crit Rev Oncol Hematol*, doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.08.005.

- Barry J, Loh Z, Collison A, *et al.* (2013) Absence of Toll-IL-1 receptor 8/single immunoglobulin IL-1 receptor-related molecule reduces house dust mite-induced allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 49: 481–490.
- Barton GM et Medzhitov R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, 300: 1524-1525.
- Bassaganya-Riera J, Hontecillas R, Horne W, et al. (2012). Conjugated linoleic acid modulates immune responses in patients with mild to moderately active Crohn's disease. *Clin Nutr*, 31:721-727.
- Bauer C, DUEWELL P, Mayer C, *et al.* (2010) Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut*, 59 : 1192-1199.
- Bauernfeind FG, *et al.* (2009). Cutting-edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*, 183 : 787-791.
- Bauman TM, *et al.* (2015). SIGIRR/TIR8, an important regulator of TLR4 and IL-1R-mediated NF- κ B activation, predicts biochemical recurrence after prostatectomy in low-grade prostate carcinomas. *Human Pathology*, doi: 10.1016/j.humpath.2015.07.015.
- Baumgart DC et Sandborn WJ. (2012). Crohn's disease. *Lancet*. 380(9853):1590-1605.
- Bazzoni F, Rossato M, *et al.* (2009). Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 5282-5287.
- Beattie R, Croft N, Fell J, Afzal N, et Heuschkel R. (2006). Inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child*. doi:10.1136/adc.2005.080481.
- Benchimol E, Fortinsky K, Gozdyra P, Van Den Heuvel M, Van Limbergen J, et Griffiths A. (2011). Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. *Inflamm Bowel Dis*, 17:423-439.
- Bernstein C, Waida A, Svenson L, et al. (2006). The epidemiology of inflammatory disease in Canada: a population based study. *American Journal of Gastroenterology*, 101:1559-1568.
- Best W, Bechtel J, Singleton J, *et al.* (1976). Development of a Crohn's disease activity index National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 70:439-444.
- Bitton A, Vutcovici M, Sewitch M, *et al.* (2015). Mortality Trends in Crohn's disease and Ulcerative Colitis: A Population-based Study in Québec, Canada. *Inflamm Bowel Dis*, doi : 10.1097/MIB.0000000000000608.
- Boraschi D et Tagliabue A. (2013). The interleukin-1 receptor family. *Semin Immunol*, 6 : 394-407.
- Bousvaros A, Sylvester F, Kugathasan S, et al. (2006). Challenges in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 12:885-913.
- Buccigrossi V, Nicastro E, et Guarino A. (2013) Functions of intestinal microflora in children. *Curr Opin Gastroenterol*, 29 : 31-38.
- Bufler P, Azam T, Gamboni-Robertson F, *et al.* (2002). A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 : 13723-13728.
- Bulau AM, Nold MF, Li S, et al. (2014). Role of caspase-1 in nuclear translocation of IL-37, release of the cytokine, and IL-37 inhibition of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111 : 2650-2655.

- Bulek K, Swaidani S, Qin J, *et al.* (2009). The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. *J Immunol*, 182: 2601-2609.
- Burisch J, et Munkholm P. (2013). Inflammatory bowel disease epidemiology. *Curr Opin Gastroenterol*, 29: 357-362.
- Buruiana FE, Solà I, et Alonso-Coello P. (2010). Recombinant human interleukin 10 for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Sys Rev*, doi: 10.1002/14651858.CD005109.pub3.
- Carpenter S, Ricci EP, Mercier BC, Moore MJ, et Fitzgerald KA. (2014). Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 14 : 361-376.
- Cătană CS, Neagoe IB, Cozma V, et al. (2015). Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 21: 5823-5830.
- Charrad R, Berraïes A, Hamdi B, Ammar J, Hamzaoui K, et Hamzaoui A. (2015). Anti-inflammatory activity of IL-37 in asthmatic children: Correlation with inflammatory cytokines TNF- α , IL- β , IL-6 and IL-17A. *Immunobiology*, doi:10.1016/j.imbio.2015.09.009.
- Chen G, Shaw MH, Kim YG, et Nunez G. (2009). NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol*, 4 : 365-398.
- Chen P, et Fang S. (2004). The expression of human antimicrobial peptide IL-37 in the human nasal mucosa. *The American Journal of Rhinology*, 18 : 381-385.
- Ciccocioppo R, Bernardo M, Sgarella S, et al. (2011). A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's disease. *Gut*, 60:788-798.
- Clevers H. (2004). At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell*, 118: 671-674.
- Collins S, et Bercik P. (2009). The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology*, 136:2003-2014.
- Colotta F, Allavena P, Sica A, *et al.* (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark or cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30: 1073-1081.
- Corbaz A, ten Hove T, Herren S, *et al.* (2002). IL-18-binding protein expression by endothelial cells and macrophages is up-regulated during active Crohn's disease. *J Immunol*, 168: 3608-3616.
- Cornish J, Tan E, Simillis C, et al. (2008). The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 103:2394-2400.
- Corridoni D, Arseneau KO, et Cominelli F. (2014). Inflammatory bowel disease. *Immunol Lett*. doi:10.1016/j.imlet.2014.04.004.
- Corridoni D, Arseneau KO, Cifone MG, et Cominelli F. (2014) The dual of nod-like receptors in mucosal innate immunity and chronic intestinal inflammation. *Fimmu*, doi : 10.3389/fimmu.2014.00317.
- Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, et Cortot, A. (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. doi:10.1053/j.gastro.2011.01.055.
- Costelloe C, Watson M, Murphy A, *et al.* (2008). IL-1F5 mediates anti-inflammatory activity in the brain through induction of IL-4 following interaction with SIGIRR/TIR8. *J Neurochem*, 105: 1960-1969.
- Crohn et Colite Canada. (2015). Facts and Statistics. Réperé à http://www.crohnsandcolitis.ca/site/c.dtJRL9NUJmL4H/b.9221471/k.5D6A/Facts_and_Statistics.htm.

- Cui D, Huang G, Yang D, Huang B, et An B. (2013). Efficacy and safety of interferon-gamma-targeted therapy in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, doi:10.1016/j.clinre.2012.12.004.
- Davies JM, MacSharry J, et Shanahan F. (2010). Differential regulation of toll-like receptor signaling in spleen and Peyer's patch dendritic cells. *Immunology*, 131: 438-448.
- D'Amato M et Rioux J. (2013). *Molecular Genetics of Inflammatory Bowel Disease*. New York: Springer.
- De Cruz P, Kamm M, Prideaux L, Allen P, et Moore G. (2013). Mucosal healing in Crohn's disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis*, 19:429-444.
- Denson L, Kim M, Bezoid R, et al. (2010). A randomized controlled trial of growth hormone in active pediatric Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 51:130-139.
- Dinarello C. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, 27: 519-550.
- Dinarello C. (2010). Anti-inflammatory agents: present and future. *Cell*, 140: 935-950.
- Dinarello CA, Novick D, Kim S, et Kaplanski G. (2013). Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. *Front Immunol*, doi:10.3389/fimmu.2013.00289.
- Dinarello C, Arend W, Sims J, et al. (2010). IL-1 family nomenclature. *Nat Immunol*, 11: 973.
- Di Sabatino A, Jackson C, Pickard K, et al. (2009). transforming growth factor beta signalling and matrix metalloproteinases in the mucosa overlying Crohn's disease structures. *Gut*, 58:777-789.
- Di Sabatino A, Rovedatti L, Vidali F, Macdonald T, et Corazza G. (2013). Recent advances in understanding Crohn's disease. *Intern Emerg Med*, 8:101-113.
- Dupont-Chicoine J, Yeretssian G, Doiron K, et al. (2010). Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity*, 32 : 367-378.
- Drexler SK, Kong P, Inglis J, Williams RO, Garlanda C, Mantovani A, Yazdi AS, Brennan F, Feldmann M, Foxwell BM. (2010). SIGIRR/TIR-8 is an inhibitor of Toll-like receptor signaling in primary human cells and regulates inflammation in models of rheumatoid arthritis, 62: 2249-61.
- Loftus EV. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126: 1504-1517.
- Economou M, et Pappas G. (2008). New global map of Crohn's disease: Genetic, environmental, and socioeconomic correlations. *Inflamm Bowel Dis*, 14:709-720.
- Evagelia K, Heleni T, Ioanna P, Crisoula D, Vasilios D, et Evagelos K. (2001). How do patients experience stress caused by hospitalisation and how do nurses perceive this stress experienced by patients? A comparative study. *ICU NURS WEB J*, 7: 1-17.
- Farrokhi M, Rezaei A, Amani-Beni A, Etemadifar M, Kouchaki E, Zahedi A. (2015). Increased serum level of IL-37 in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Acta Neurol Belg*. doi:10.1007/s13760-015-0491-3.
- Feller M, Huwiler K, Stephan R, et al. (2007). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 7:607-613.
- Ferkolj I, Gangl A, Galle P, et Vucelic B. (2008). Pathogenesis and Clinical Practice in Gastroenterology. *Springer and Falk Foundation*. 160:127-136.

- Fiocchi, C. (2009). Susceptibility genes and overall pathogenesis of inflammatory bowel disease: where do we stand? *Dig Dis*, 27:226-235.
- Fonseca-Camarillo G, Furuzawa-Carballeda J, et Yamamoto-Furusho JK. (2015). Interleukin 35 (IL-35) and IL-37: Intestinal and peripheral expression by T and B regulatory cells in patients with Inflammatory Bowel Disease. *Cytokine*, doi:10.1016/j.cyto.2015.04.009.
- Fournier BM et Parkos CA. (2012) The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunology*, 5: 354-366
- Franchi L, Eigenbrod T, et Núñez G. (2009). Cutting edge: TNF- α mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol*, 183 : 792-796.
- Franke A, McGovern, D, et Barret JE. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*, 42:1118-1125.
- Fraquelli M, Sarno A, Girelli C, et al. (2008). Reproducibility of bowel ultrasonography in the evaluation of Crohn's disease. *Dig Liver Dis*, 40:860-866.
- Frolkis A, Dieleman L, Barkema H, et al. (2013). Environment and the inflammatory bowel diseases. *Can J Gastroenterol*, 27:18-24.
- Garlanda C, Riva F, Polentarutti N, et al. (2004). Intestinal inflammation in mice deficient in Tir8, an inhibitory member of the IL-1 receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 3522-3526.
- Garlanda C, Riva F, Bonavita E, Gentile S et Mantovani A. (2013). Decoys and regulatory receptors of the IL-1/Toll-like receptor superfamily. *F immu*, doi: 10.3389/fimmu.2013.00180
- Garlanda C, Anders HJ, et Mantovani A. (2009). TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization. *Trends Immunol*, 30: 439-446.
- Garlanda C, Riva F, Veliz T, et al. (2007). Increased susceptibility to colitis-associated cancer of mice lacking TIR8, an inhibitory member of the interleukin-1 receptor family. *Cancer Res*, 67: 6017-6021.
- Garlanda C, Di Liberto D, Vecchi A, et al. (2007). Damping excessive inflammation and tissue damage in Mycobacterium tuberculosis infection by Toll IL-1 receptor 8/single Ig IL-1-related receptor, a negative regulator of IL-1/TLR signaling. *J Immunol*, 179 : 3119-3125.
- Gay NJ, Gangloff M, et O'Neill LA. (2011). What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunol*, 32: 104-109.
- Geboes K, Colombel J, Greenstein A, et al. (2008). Indeterminate colitis: a review of the concept-what's in a name? *Inflammatory Bowel Disease*, 14(6): 850-857.
- Goh LK et Sorkin A. (2013). Endocytosis of Receptor Tyrosine Kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, doi:10.1101/cshperspect.a017459.
- Gong J, Wei T, Stark RW, et al. (2010). Inhibition of toll-like receptors TLR4 and 7 signaling pathways by SIGIRR: a computational approach. *J Struct Biol*, 169: 323-330.
- Gopal R, Birdsell D, et Monroy FP. (2008). Regulation of toll-like-receptor in intestinal epithelial cells by stress and Toxoplasma gondii infection. *Parasite immunol*, 30: 563-576.
- Green C, Elliot L, Beaudoin C, et Bernstein C. (2006). A population-based ecologic study of inflammatory bowel disease: searching for etiologic clues. *Am J Epidemiol*, 164:615-623.

- Gu YF, Fang Y, Jin Y, *et al.* (2011). Discovery of the DIGIRR gene from teleost fish: a novel toll-IL-1 receptor for family member serving as a negative regulator of IL-1 signaling. *J Immunol*, 187: 2514-2530.
- Gulen MF, Kang Z, Bulek K, *et al.* (2010). The receptor SIGIRR suppresses Th17 cell proliferation via inhibition of the interleukin-1 receptor pathway and mTOR kinase activation. *Immunity*, 32: 54-66.
- Halme L, Paavola-Sakki P, et Turunen UE. (2006). Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 12:3668-3672.
- Hirota SA, Ng J, Lueng A, *et al.* (2011). NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm Bowel Dis*, 17 : 1359-1372.
- Hooper L et Gordon J. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292: 1115-1118.
- Horne DJ, Randhawa AK, Chau TT, *et al.* (2012). Common polymorphisms in the PKP3-SIGIRR-TMEM16J gene region are associated with susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis*, 205: 586–594.
- Hou J, El-Serag H, et Thirumurthi S. (2009). Distribution and manifestations of inflammatory bowel disease in Asians, Hispanics, and African Americans : a systematic review. *Am J Gastroenterol*, 104:2100-2109.
- Imaeda H, Takahashi K, Fujimoto T, Kasumi E, Ban H, Bamba S, Sonoda H, Shimizu T, Fujiyama Y, et Andoh A. Epithelial expression of interleukin-37b in inflammatory bowel disease. (2013). *Clinical and Experimental Immunology*, 172: 410–416.
- Iannello A, Boulassel MR, Samarani S, Tremblay C, Toma E, Routy JP, Ahmad A. (2010). HIV-1 causes an imbalance in the production of interleukin-18 and its natural antagonist in HIV-infected individuals: implications for enhanced viral replication. *J Infect Dis*, doi: 10.1086/650314.
- InvivoGen. (2015). Inflammasomes – Review. Référé à : <http://www.invivogen.com/review-inflammasome>.
- Jan Irvine E, Farrokhyar F, et Swarbrick E. (2001). A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of gastroenterology*, 36: 2-15.
- Jang Y, Lee AY, Jeong SH, *et al.* (2015). Chlorpyrifos induces NLRP3 inflammasome and pyroptosis/apoptosis via mitochondrial oxidative stress in human keratinocyte HaCaT cells. *Toxicology*, 338, 37-48.
- Jha S et Ting JP. (2015) Holding the inflammatory system in check: NLRs keep it cool. *F1000Prime Reports*, doi : 10.12703/P7-15.
- Ji Q, Zeng Q, Huang Y, Shi Y, Lin Y, Lu Z, Meng K, Wu B, Yu K, Chai M, Liu Y, et Zhou Y. (2014). Elevated Plasma IL-37, IL-18, and IL-18BP Concentrations in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Mediators Inflamm*, doi:10.1155/2014/165742.
- Jiménez-Dalmaroni MJ, *et al.* (2015) The critical role of toll-like receptors - From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmunity*, doi: 10.1016/j.autrev.2015.08.009.
- Johns Hopkins Medicine Gastroenterology & Hepatology. (2015). Crohn's Disease: Introduction. Référé à : https://gi.jhsps.org/GDL_Disease.aspx?CurrentUDV=31&GDL_Cat_ID=024C_C2E1-2AEB-4D50-9E02-C79825C9F9BF&GDL_Disease_ID=291F2209-F8A9-4011-8094-11EC9BF3100E.

- Johnson and Johnson pharmaceutical research and development. (2013). A Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Ustekinumab Maintenance Therapy in Patients With Moderately to Severely Active Crohn's Disease (IM-UNITI), *Natl Lib Med*, doi: clinicaltrials.gov/show/NCT01369355.
- Jostins L, Ripke S, Weersma R, et al. (2012). Host-microbes interactions have shaped the genetics architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 491:119-124.
- Haas SL, Abbatista M, Brade J, Singer MV, et Böcker U. (2009). Interleukin-18 serum levels in inflammatory bowel diseases: correlation with disease activity and inflammatory markers. *Swiss Med Wkly*, 139: 140-145.
- Hommes DW, Mikhajlova TL, Stoinov S, Stimac D, Vucelic B, Lonovics J, Zákuciová M, D'Haens G, Van Assche G, Ba S, Lee S, et Pearce T. (2006). Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut*, 55: 1131-1137.
- Huang X, Hazlett LD, Du W, et al. (2006). SIGIRR promotes resistance against *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by down-regulating type-1 immunity and IL-1R1 and TLR4 signaling. *J Immunol*, 177: 548-556.
- Huang Z, Gao C, Chi X, Hu YW, Zheng L, Zeng T, et Wang Q. (2015). IL-37 Expression is Upregulated in Patients with Tuberculosis and Induces Macrophages Towards an M2-like Phenotype. *Scand J Immunol*, doi:10.1111/sji.12326.
- Kadota C, Ishihara S, Aziz MM, et al. (2010). Down-regulation of single immunoglobulin interleukin-1R-related molecule (SIGIRR)/TIR8 expression in intestinal epithelial cells during inflammation. *Clin Exp Immunol*, 162: 348-361.
- Karin M, Lawrence T, et Nizet V. (2006). Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*, 124: 823-835.
- Kaser A, Zeissig S, et Blumberg R. (2010). Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol*, 28:573-621.
- Kato H, Takahashi K. et Fujita T. (2011) RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunol Rev*, 243 : 91–98.
- Kawai T, et Akira S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34 : 637–650.
- Khan MA, Sham HP, Bergstrom K, et al. (2010). The single IgG IL-1-related receptor controls TLR responses in differentiated human intestinal epithelial cells. *J Immunol*, 184: 2305-2313.
- Kim SC, & Ferry GD. (2004). Inflammatory bowel diseases in pediatric and adolescent patients: clinical, therapeutic, and psychosocial considerations. *Gastroenterology*, 126:1550-1560.
- Kumar S, Hanning CR, Brigham-Burke MR, et al. (2002). Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production. *Cytokine*, 18 : 61-71.
- Laan M, Lötval J, Chung K, et al. (2001). IL-17-induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro: role of mitogen-activated protein (MAP) kinases. *Br J Pharmacol*, 133:200-206.
- Laass MW, Roggenbuck D, et Conrad K. (2014). Diagnosis and classification of Crohn's disease. *Autoimmunity Reviews*, 13:467-471.

- Lahad A et Weiss Batia. (2015) Current therapy of pediatric Crohn's disease. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 6: 33-42.
- Lajoie L, Congy-Jolivet N, Bolzec A, Gouilleux-Gruart V, Sicard E, Sung HC, Peiretti F, Moreau T, Vie H, Clémenceau B, et Thibault G. (2013). ADAM17-Mediated Shedding of FcγRIIIA on Human NK Cells: Identification of the Cleavage Site and Relationship with Activation. *J Immunol*, doi:10.4049/jimmunol.1301024.
- Lakatos P. (2009). Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: have we made progress? *Dig Dis*, 27:215-225.
- Latz E, Xiao TS, et Stutz A. (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*, 13 : 397-411.
- Le HT, et Harton JA. (2013). Pyrin- and CARD-only proteins as regulators of NLR functions. *F Immunol*, doi : 10.3389/fimmu.2013.00275.
- Leach ST, Messina I, Lemberg DA, Novick D, Rubenstein M, et Day AS. (2008). Local and systemic interleukin-18 and interleukin-18-binding protein in children with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 14: 68-74.
- Lech M, Garlanda C, et al. (2007). Different roles of TIR8/SigIRR on toll-like receptor signaling in intrarenal antigen-presenting cells and tubular epithelial cells. *Kidney Int*, 72: 182-192.
- Lech M, Avila-Ferrufino A, Allam R, Segerer S, Khandoga A, Krombach F, et al. (2009). Resident dendritic cells prevent postischemic acute renal failure by help of single Ig IL-1 receptor-related protein. *J Immunol*, 183 : 4109–4118.
- Lee D, Albenberg L, et al. (2015). Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 148:1087-1106.
- Lee YK et Mazmanian SK. (2010). Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*, 330 : 1768-1773.
- Lee S. (2012). Induction of clinical response using rifaximin in Crohn's disease. *Natl Lib Med*, clinicaltrials.gov/show/NCT00603616.
- Leemans JC, Butter LM, Teske GJ, Stroo L, Pulskens WP, Florquin S. (2012). The toll interleukin-1 receptor (IL-1R) 8/single Ig domain IL-1R-related molecule modulates the renal response to bacterial infection. *Infect Immun*, 80 : 3812–3820.
- Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson D, Turner D, Russell R, et al. (2011). Pediatric modification of the Montreal Classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis*, 17:1314-1321.
- Li X et Qin X. (2005). Modulation of toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J Mol Med*, 83: 258-266.
- Li Y, Wang Y, Liu Y, et al. (2014) The possible role of the novel cytokines IL-35 and IL-37 in Inflammatory Bowel Disease. *Mediat Inflamm*, doi: 10.1155/2014/136329.
- Liu X, Wu Y, Li F et Zhang D. (2015). Dietary fiber intake reduces risk of inflammatory bowel disease: result from a meta analysis. *Nutrition Research*, 35: 753-758.
- Loiarro M, Sette C, Gallo G, et al. (2005). Peptide-mediated interference of TIR domain dimerization in MyD88 inhibits interleukin-1-dependant activation of NF-κB. *J Biol Chem*, 280: 15809-15814.
- Lowe A, Roy P, et al. (2009). Epidemiology of Crohn's disease in Quebec, Canada. *Inflamm Bowel Dis*, 15:429-435.

- Ludwiczek O, Kaser A, Novick D, Dinarello CA, Rubinstein M, et Tilg H. (2005). Elevated systemic levels of free interleukin-18 (IL-18) in patients with Crohn's disease. *Eur Cytokine Netw*, 16: 27-33.
- Lunding L, Webering S, Vock C, et al. (2015). IL-37 requires IL-18R α and SIGIRR/IL-1R8 to diminish allergic airway inflammation in mice. *Allergy*, 70 : 366-373.
- Macdonald T, et Monteleone G. (2005). Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, 307:1920-1925.
- Mantovani A, Locati M, Polentarutti N, Vecchi A, et Garlanda C. (2004). Extracellular and intracellular decoys in the tuning of inflammatory cytokines and Toll-like receptors: the new entry TIR8/SIGIRR. *J Leukocyte Biol*, 75: 738-742.
- Matusiak M, Van Opdenbosch N, et Lamkafi M. (2015). CARD- and pyrin-only proteins regulating inflammasome activation and immunity. *Immunological Reviews*, 265 : 217-230.
- McNamee EN, Masterson JC, Jedlicka P, et al. (2011) Interleukin 37 expression protects mice from colitis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 16711–16711.
- Melnyk BM et al. (2006). Two decades of evidence to support implementation of the COPE program as standard practice with parents of young unexpectedly hospitalized/critically ill children and premature infants. *Pediatric Nursing*, 32: 475–481.
- Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, et al. (2012) Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time on systematic review. *Gastroenterology*, 142:46-54.
- Moretti S, Bozza S, Oikonomou V, Renga G, Casagrande A, et al. (2014). IL-37 Inhibits Inflammasome Activation and Disease Severity in Murine Aspergillosis. *PLoS Pathog*, doi:10.1371/journal.ppat.1004462.
- Morrison G, Headon B, et Gibson P. (2009). Update in inflammatory bowel disease. *Aust Fam Physician*. 38:956-961.
- Moss ML, Jin SL, Milla ME, et al. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumor-necrosis factor- α . *Nature*, 385: 733-736.
- Müller S, Rihs S, Schneider JM, et al. (2009). Soluble TNF- α but not transmembrane TNF- α sensitizes T cells for enhanced activation-induced cell death. *Eur J Immunol*, 39: 3171-3180.
- Naftali T, Novick D, Gabay G, Rubinstein M, et Novis B. (2007). Interleukin-18 and its binding protein in patients with inflammatory bowel disease during remission and exacerbation. *Isr Med Assoc J*, 9: 504-508.
- Nahid M, Satoh M, et Chan E. (2011). MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cell Moll Immunol*, 8: 388-403.
- Nanthakumar N, Meng D, Goldstein AM, et al. (2011). The mechanism of excessive intestinal inflammation in necrotizing enterocolitis: an immature innate immune response. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0017776.
- Naser SA, Romero C, Urbina P, et al. (2011) Cellular infiltration and cytokine expression correlate with fistulizing state in Crohn's disease. *Clin Vaccine Immunol*, 18 : 1416-1419.
- Ng S, Bernstein C, Vatn M, et al. (2013). Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut*, 62:630-649.
- Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, et al. (2010). IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol*, 11 : 1014-1022.

- Nold-Petry CA, Lo CY, Rudloff I, *et al.* (2015). IL-37 requires the receptors IL-18R α and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction. *Nature Immunol*, doi: 10.1038/ni.3103.
- Noomen C, Hommes D, et Fidler H. (2009). Update on genetics in inflammatory disease. *Best Pract Res ClinGastroenterol*, 23:233-243.
- Noris M, Cassis P, Azzollini N, Cavinato R, Cugini D, Casiraghi F, *et al.* (2009). The Toll-IL-1R member Tir8/SIGIRR negatively regulates adaptive immunity against kidney grafts. *J Immunol*, 183: 4249–4260.
- Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, et Rubinstein M. (1999). Interleukin-18 binding protein : a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity*, 10 : 127-136.
- Núñez Miguel R, Wong J, Westoll JF, *et al.* (2007). A dimer of the toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0000788.
- Ogura Y, Bonen D, Inohara N, et al. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411:603-606.
- Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tanimoto T, Nukata Y, Tanabe F, *et al.* (1995). A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect Immun*, 63: 3966–72.
- O'Neill L. (2008). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev*, 226: 10-18.
- Palomo J, Dietrich D, Martin P, et al. (2015). The interleukin (IL)-1 cytokine family - Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine*, 76: 25-37.
- Pandey S, Kawai T, et Akira S. (2015). Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7, doi: 10.1101/cshperspect.a016246.
- Panes J, Gomollon F, Taxonera C, et al. (2007). Crohn's disease: a review of current treatment with a focus on biologics. *Drugs*, 67:2511-2537.
- Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF Jr, Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, et Cominelli F. (1999). IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol*, 162: 6829-6835.
- Polentarutti N, *et al.* (2003). Unique pattern of expression and inhibition of IL-1 signaling by the IL-1 receptor family member TIR8/SIGIRR. *Eur Cytokine Netw*, 14: 211-218.
- Qin J, Qian Y, Yao J, *et al.* (2005). SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms. *J Biol Chem*, 280: 25233-25241.
- Quinn SR et O'Neill LA. (2011). A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signaling. *Int Immunol*, 23: 421-425.
- Ragnarsdottir B, Samuelsson M, Gustafsson MC, *et al.* (2007). Reduced toll-like receptor 4 expression in children with asymptomatic bacteriuria. *J Infect Dis*, 196: 475-484.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneth F, *et al.* (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118: 229-241.

- Reddy S, Jia S, *et al.* (2009). An autoinflammatory disease due to homozygous deletion of the IL1RN locus. *N Engl J Med*, 360: 2438-2444.
- Reinisch W, de Villiers W, Bene L, Simon L, Rácz I, Katz S, Altorjay I, Feagan B, Riff D, Bernstein CN, Hommes D, Rutgeerts P, Cortot A, Gaspari M, Cheng M, Pearce T, et Sands BE. (2010). Fontolizumab in moderate to severe Crohn's disease: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple-dose study. *Inflamm Bowel Dis*, doi:10.1002/ibd.21038.
- Rennick J *et al.* (2002). Children's psychological responses after critical illness and exposure to invasive technology. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, 23: 133–144.
- Rescigno M, et Di Sabatino A. (2009). Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest*, 119: 2441-2450.
- Rieder F, et Fiocchi C. (2009). Intestinale fibrosis in IBD - a dynamic, multifactorial process. *Nat Rev*, 6:228-235.
- Riva F, Bonavita E, Barbati E, *et al.* (2012). TIR8/SIGIRR is an interleukin-1 receptors3toll like receptor family member with regulatory functions in inflammation and immunity. *F Immu*, doi: 10.3389/fimmu.2012.00322.
- Riva F, *et al.* (2009). The expression pattern of TIR8 is conserved among vertebrates. *Vet Immunol Immunopathol*, 131: 44-49.
- Rocchi A, Benchimol, E, Bernstein C. *et al.* (2012). Inflammatory bowel disease: a Canadian burden of illness review. *Canadian Journal of gastroenterology*, 26:811-817.
- Romee R, Foley B, Lenvik T, Wang Y, Zhang B, Ankarlo D, Luo X, Cooley S, Verneris M, Walcheck B et Miller J. (2013). NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood*, doi:10.1182/blood-2012-04-425397.
- Ross R, Grimm J, Goedicke S, *et al.* (2013). Analysis of nuclear localization of interleukin-1 family cytokines by flow cytometry. *J Immunol Meth*, 387 : 219-227.
- Rossen BE et McKeever PD. (1996). The behavior of preschoolers during and after brief surgical hospitalizations. *Issues in Compr Pediatr Nurs*, 19: 121–133.
- Ruemmele FM, Prieur A, Talbotec C, *et al.* (2004). Development. *Development of Crohn disease during anti-TNF-alpha therapy in a child with juvenile idiopathic arthritis*. *J Pediatr Gastroenterol*, 39:203-206.
- Sakai N, Van Sweringen HL, Belizaire RM, *et al.* (2012). Interleukin-37 reduces liver inflammatory injury via effects on hepatocytes and non-parenchymal cells. *J Gastroenterol Hepatol*, 27 : 1609-1616.
- Saibeni S, Rondonotti E, Iozzeli A, *et al.* (2007). Imaging of the small bowel in Crohn's disease: a review of old and new techniques. *World J Gastroenterol*, 13(24): 3279-3287.
- Sampath V, Menden H, Helbling D, *et al.* (2015). SIGIRR Genetic Variants in Premature Infants With Necrotizing Enterocolitis. *PEDIATRICS*, Doi: 10.1542/peds.2014-3386.
- Sandborn W, Colombel J, Frankel M, *et al.* (2010). Anti-CD3 antibody visilizumab is not effective in patients with intravenous corticosteroid-refractory ulcerative colitis. *Gut*, 59:1485-1492.
- Sandborn W, Colombel J, Sands B, *et al.* (2012). Abatacept for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 143:62-69.

- Sartor BR. (2006). Mechanisms of Disease: Pathogenesis of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 3: 390-407.
- Selby W, Pavli P, Crotty B, et al. (2007). Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology*, 132:2313-2319.
- Sham HP, Yu EY, Gulen MF, Bhinder G, Stahl M, Chan JM, et al. (2013). SIGIRR, a negative regulator of TLR/IL-1R signalling promotes Microbiota dependent resistance to colonization by enteric bacterial pathogens. *PLoS Pathog*. 9 e1003539.
- Sharma S, Kulk N, Nold MF, et al. (2008). The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines. *J Immunol*, 180 : 5477-5482.
- Sheldon L. (1997). Hospitalising children: A review of the effects. *Nursing Standard*, 12: 44-47.
- Silverberg M, Satsangi J, Ahmad T, Arnott I, Bernstein CB, et al. (2005). Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*, 19:5-36.
- Singh S, Graff L, et Bernstein C. (2009). Do NSAIDs, antibiotics, infections, or stress trigger flares in IBD? *Am J Gastroenterol*, 104:1298-1313.
- Stahl M, Ries J, Vermeulen J, Yang H, Sham HP, et al. (2014). A Novel Mouse Model of *Campylobacter jejuni* Gastroenteritis Reveals Key Pro-inflammatory and Tissue Protective Roles for Toll-like Receptor Signaling during Infection. *PLoS Pathog*, doi:10.1371/journal.ppat.1004264.
- Strober W, Kitani A, et Fuss I. (2008). The molecular basis of NOD2 susceptibility mutation in Crohn's disease. *Mucosal Immunol*, doi: 10.1038/mi.2008.42.
- Takeda K, Kaisho T et Akira S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 21: 335-376.
- Teng X, Hu Z, Wei X, et al. (2014). IL-37 ameliorates the inflammatory process in psoriasis by suppressing proinflammatory cytokine production. *J Immunol*, 192 : 1815-1823.
- Thomassen E, Renshaw BR, et Sims JE. (1999). Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily. *Cytokine*, 11: 389-399.
- Towne JE, Garka KE, Renshaw BR, Virca GD et Sims JE. (2004). Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-1RAcP to activate the pathway leading to NF-kappaB and MAPKs. *J Biol Chem*, 279: 13677-13688.
- Tumer D, Griffiths A, Walters T, Seah T, Markowitz J, Pfefferkorn M, et al. (2010). Appraisal of the pediatric Crohn's disease activity index on four prospectively collected datasets: recommended cutoff values and clinimetric properties. *Am J Gastroenterol*. 105(9):2085-2092.
- Ueno-Shuto K, Kato K, Tasaki Y, et al. (2014). Lipopolysaccharide decreases single immunoglobulin interleukin-1 receptor-related molecule (SIGIRR) expression by suppressing Sp1 via TLR4-p38 pathway in monocytes and neutrophils. *J Biol Chem*, doi : 10.1074/jbc.M113.532093.
- van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, et Joosten LA. (2011). Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol*, 32: 110-116.

- van der Heide, F, Dijkstra A, Weersma R, et al. (2009). Effects of active and passive smoking on disease course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 15:1199-1207.
- Veliz Rodriguez T, Moalli F, Polentarutti N, et al. (2012). Role of toll interleukin-1 receptor (IL-1R) 8, a negative regulator of IL-1R/toll-like receptor signaling, in resistance to acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Infect Immun*, 80: 100-109.
- Vermeire S, Van Assche G, et Rutgeerts P. (2012). Classification of inflammatory bowel disease: the old and the new. *Curr Opin gastroenterol*, 28:321-326.
- Villena J, Suzuki R, Fujie H, et al. (2012). Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* modulates the Toll-like receptor 4-induced inflammatory response via negative regulation in porcine antigen-presenting cells. *Clin Vaccine Immunol*, 19: 1038-1053.
- Voronov E, Shouval D, Krelin Y, et al. (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 2645-2650.
- Wald D, et al. (2003). SIGIRR, a negative regulator of toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol*, 4: 920-927.
- Watson MB, Costello DA, Carney DA, McQuillan K, Lynch MA. (2010). SIGIRR modulates the inflammatory response in the brain. *Brain Behav Immun*, 24: 985-995.
- Weidlich S, Bulau AM, Schwerd T, Althans J, Kappler R, Koletzko S, Mayr D, et Bufler P. (2014). Intestinal Expression of the Anti-Inflammatory Interleukin-1 Homologue IL-37 in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, doi:10.1097/MPG.0000000000000387.
- White MA et al. (1990). Sleep onset latency and distress in hospitalized children. *Nursing Research*, 39: 134-139.
- Wright MC. (1995). Behavioural effects of hospitalization in children. *Journal of Paediatric Child Health*, 31: 165-167.
- Wright EM et al. (2015). Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn's disease: A systematic review. *Inflamm Bowel Dis*, 21: 1219-1228.
- Xia L, Shen H, et Lu J. (2015). Elevated serum and synovial fluid levels of interleukin-37 in patients with rheumatoid arthritis: Attenuated the production of inflammatory cytokines. *Cytokine*, doi:10.1016/j.cyto.2015.06.005.
- Xiao H, et al. (2007). The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. *Immunity*, 26: 461-475.
- Xiao H, Yin W, Khan MA, et al. (2010). Loss of immunoglobulin interleukin-1 receptor-related molecule leads to enhanced colonic polyposis in *Apc(min)* mice. *Gastroenterology*, 139: 574-585.
- Ye L, Jiang B, Deng J, et al. (2015). IL-37 Alleviates Rheumatoid Arthritis by Suppressing IL-17 and IL-17-Triggering Cytokine Production and Limiting Th17 Cell Proliferation. *J Immunol*, 194 : 5110-5119.
- Zhang J, Liu G, Zeng J, Wang W, Xiang W, Kong B, Yi L, et Xu J. (2015). [Clinical detection and significance of plasma IL-37 in patients with active pulmonary tuberculosis]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 31: 520-523.
- Zhao J, Zepp J, Bulek K, et Li X. (2012). SIGIRR, a negative regulator of colon tumorigenesis. *Drug Discov Today Dis Mech*, 8: 63-69.

- Zhao PW, Jiang WG, Wang L, Jiang ZY, Shan YX, et Jiang YF. (2014). Plasma Levels of IL-37 and Correlation with TNF- α , IL-17A, and Disease Activity during DMARD Treatment of Rheumatoid Arthritis. *PLoS One*, doi:10.1371/journal.pone.0095346.
- Zhao J, Bulek K, Gulen MF, et al. (2015). Human Colon Tumors Express a Dominant-negative Form of SIGIRR That Promotes Inflammation and Colitis-associated Colon Cancer in Mice. *Gastroenterology*, doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.051.
- Zlotogora, J., Zimmerman, J., & Rachmilewitz, D. (1990). Crohn's disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology*, 286-287.