

Université de Montréal

**Déterminer le rôle de C1orf106, un gène associé aux  
maladies inflammatoires de l'intestin**

Par  
Chloé Lévesque

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences  
en Sciences Biomédicales

Décembre 2015

© Chloé Lévesque, 2015

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :  
Déterminer le rôle de C1orf106, un gène associé aux  
maladies inflammatoires de l'intestin

Présenté par :  
Chloé Lévesque

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Martin Sirois, président-rapporteur  
John D. Rioux, directeur de recherche  
François Boudreau, membre du jury

## Résumé

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MIIs, [MIM 266600]) sont caractérisées par une inflammation chronique au niveau du tube gastro-intestinal. Les deux principales formes sont la maladie de Crohn (MC) et la colite ulcéreuse (CU). Les MIIs résulteraient d'un défaut du système immunitaire et de l'épithélium intestinal. Ce dernier forme une barrière physique et biochimique qui sépare notre système immunitaire des microorganismes commensaux et pathogènes de la microflore intestinale. Un défaut dans la barrière épithéliale intestinale pourrait donc mener à une réponse immunitaire soutenue contre notre microflore intestinale. Les études d'association pangénomiques (GWAS) ont permis d'identifier 201 régions de susceptibilité aux MIIs. Parmi celles-ci, la région 1q32 associée à la MC ( $p < 2 \times 10^{-11}$ ) et à la CU ( $p < 6 \times 10^{-7}$ ) contient 4 gènes, dont *C1orf106*, un gène codant pour une protéine de fonction inconnue. Le ré-séquençage de la région 1q32 a permis d'identifier une variante génétique rare de *C1orf106* (MAF < 1%) associée aux MIIs ( $p = 0,009$ ), Y333F. Nous avons démontré que la substitution de la tyr<sup>333</sup> par une phénylalanine semble avoir un effet sur la stabilité protéique de *C1orf106* tel que démontré lors de l'inhibition de la synthèse protéique induite par le cycloheximide. Nous avons déterminé que *C1orf106* est exprimé dans le côlon et l'intestin grêle. De plus, son expression est augmentée lors de la différenciation des cellules épithéliales Caco-2 en épithélium intestinal polarisé. Son profil d'expression correspond aux types cellulaires et tissulaires affectés dans les MIIs. De plus, *C1orf106* est partiellement co-localisée avec le marqueur des jonctions serrées, ZO-1. Toutefois, son marquage reproduit parfaitement celui du marqueur des jonctions adhérentes, E-cadhérine. Les jonctions serrées et adhérentes sont localisées du côté apical de la jonction intercellulaire et sont toutes deux impliquées dans l'établissement de la barrière épithéliale. Nous avons donc testé l'impact de *C1orf106* sur la perméabilité de l'épithélium intestinal. Nous avons observé une augmentation de la perméabilité épithéliale chez un épithélium intestinal formé par des cellules Caco-2 sous-exprimant *C1orf106*. Nos résultats suggèrent que *C1orf106* pourrait être le gène causal de la région 1q32.

**Mots-clés :** *C1orf106*, Maladies inflammatoires de l'intestin (MIIs), phosphorylation, jonctions serrées et adhérentes, stabilité protéique, résistance électrique trans-épithéliale (TEER)

## Abstract

The Inflammatory bowel diseases (IBD, [MIM 266600]) involve chronic inflammation of the digestive tract and include ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). IBD may result from defects in the homeostasis of immune system and intestinal epithelium. The latter forms a physical and biochemical barrier to commensal and pathogenic microorganisms. A dysfunction in the epithelial barrier may lead to a sustained immune response against the gut flora. Genome wide association studies (GWAS) have identified 200 susceptibility regions in IBD. Among these, the 1q32 region associated with risk of both CD ( $p < 2 \times 10^{-11}$ ) and UC ( $p < 6 \times 10^{-7}$ ), contains the gene *C1orf106*. Our targeted re-sequencing study has identified a low-frequency variant, Y333F ( $p = 0.009$ ) in *C1orf106*, a protein of unknown function and in which tyrosine333 is predicted to be phosphorylated. We demonstrated that its substitution by a phenylalanine may have an effect on C1orf106 protein stability as shown by cycloheximide treatment experiments. Our RNA expression analyses of human tissues and cell lines demonstrated that C1orf106 is mostly expressed in the small intestine and colon. It is also detectable in monocytic cell lines but more highly expressed in colonic epithelial cell lines. Furthermore, its expression is increased by 40% during differentiation of colonic epithelial Caco-2 cells into polarized epithelium. To provide further biological context, we generated colorectal LS174T cells that stably overexpress the Y333F alleles and demonstrated that it is partially localized with ZO-1, used as a tight junction (TJ) marker. We did observe tighter colocalization with E-cadherin, a canonical marker for adherens junctions (AJ), typically located below the TJ complex. AJ and TJ play an essential role in the establishment of epithelial barrier. The localization of C1orf106 at these regions suggests its possible implication in epithelial barrier homeostasis. Using trans-epithelial measurement of ions movement across epithelium, we demonstrated an increased in permeability of an epithelium formed by C1orf106 knock-down Caco-2 cells. Our results suggest that C1orf106 could be the causal gene of the 1q32 susceptibility region.

**Keywords:** *C1orf106*, Inflammatory bowel diseases (IBD), phosphorylation, tight and adherens junctions, protein stability, trans-epithelial electrical resistance (TEER)

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	v
Liste des figures supplémentaires.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Liste des symboles.....	x
Remerciements.....	xi
Introduction.....	1
1. La biologie du tube digestif.....	1
1.1 Les organes du tube digestif et leurs fonctions.....	1
1.2 La microflore du tube gastro-intestinal.....	3
1.2.1 Ses fonctions métaboliques.....	5
1.2.2 Ses fonctions structurales.....	6
1.2.3 Ses fonctions immunitaires.....	6
1.2.4 La flore intestinale et l'apparition des MIIs.....	7
2. Les systèmes généraux de défense.....	8
2.1 La barrière épithéliale de l'intestin.....	9
2.1.1 Les cellules qui forment l'épithélium intestinal.....	9
2.1.2 Les jonctions cellulaires.....	15
2.1.3 Implication de la barrière épithéliale dans les MIIs.....	17
2.2 Les défenses immunitaires (généralités).....	18
2.2.1 L'immunité et ses manifestations dans les MIIs.....	19
2.2.2 Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (MALT).....	23
2.2.3 Les mécanismes de tolérance à la flore intestinale.....	23
3. Les maladies inflammatoires de l'intestin (MIIs).....	25
3.1 Maladie de Crohn et colite ulcéreuse; les manifestations cliniques.....	25

3.2	Épidémiologie .....	25
3.3	Étiologie .....	26
3.3.1	Facteurs environnementaux .....	26
3.3.2	Facteurs génétiques.....	28
4.	Objectifs du projet de maîtrise.....	32
5.	Matériel et méthodes .....	33
5.1	Matériel .....	33
5.2	Méthodes .....	33
5.2.1	Culture des cellules Caco-2, LS174T et HEK293T .....	33
5.2.2	Différenciation des cellules Caco-2.....	34
5.2.3	Différenciation des cellules LS174T .....	34
5.2.4	Analyse de la stabilité protéique.....	34
5.2.5	Clonages .....	35
5.2.6	Transformation bactérienne, extraction et purification de l'ADN plasmidique.....	36
5.2.7	Séquençage .....	36
5.2.8	Production des lentivirus .....	36
5.2.9	Production des lignées cellulaires stables par transduction lentivirale.....	37
5.2.10	Extraction et dosage de l'ARN.....	38
5.2.11	Micropuce d'expression (puce à ADNc) .....	38
5.2.12	Rétro-transcription.....	39
5.2.13	PCR quantitatif (qPCR).....	39
5.2.14	Extraction et dosage des protéines totales .....	40
5.2.15	Électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) et immunobuvardage de type Western .....	40
5.2.16	Immunofluorescence et microscopie confocale .....	41
5.2.17	Mesure de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER).....	42
6.	Résultats.....	43
6.1	Définir les domaines et éléments fonctionnels de C1orf106.....	43
6.2	Déterminer le profil d'expression tissulaire et cellulaire de C1orf106 .....	44
6.3	Déterminer la localisation subcellulaire de C1orf106.....	48

6.4 Définir l'implication de C1orf106 sur des voies biologiques altérées dans les MIIs et vérifier l'impact de sa variante génétique rare sur ces dernières .....	54
6.4.1 Analyse de la stabilité protéique de C1orf106.....	54
6.4.2 Effet de C1orf106 sur la perméabilité épithéliale.....	55
7. Discussion et conclusion .....	58
Bibliographie.....	68
Annexe .....	xii

## Liste des tableaux

Tableau 1. Concentration de puromycine et temps de sélection pour les lignées cellulaires épithéliales transduites.....	38
Tableau 2. Liste des amorces de qPCR.....	40
Tableau 3. Liste des amorces de séquençage.....	xiii

## Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique de l'axe crypte-villosité.....	10
Figure 2. Représentation schématique des jonctions intercellulaires.....	17
Figure 3. Représentation schématique de la région de susceptibilité 1q32.....	30
Figure 4. Motifs et domaines protéiques de C1orf106 (isoforme 1).....	43
Figure 5. Profil d'expression de <i>C1orf106</i> obtenu par micropuce d'expression.....	45
Figure 6. Schéma expérimental de la différenciation des cellules Caco-2 en épithélium intestinal polarisé.....	46
Figure 7. Expression de C1orf106 pendant le processus de différenciation des cellules Caco-2 en épithélium intestinal polarisé.....	47
Figure 8. Localisation de C1orf106 dans les cellules Caco-2 prolifératives et différenciées en épithélium intestinal.....	48

Figure 9. Surexpression stable de C1orf106 produite par transduction lentivirale dans les cellules HEK293T.....	49
Figure 10. Détection de la localisation de C1orf106 par immunofluorescence dans les cellules HEK293T surexprimant de façon stable C1orf106. ....	50
Figure 11. Effet de l'acide butyrique (BTA) sur l'expression des ARNm de <i>MUC2</i> et de <i>C1orf106</i> endogène dans les cellules LS174T.....	51
Figure 12. Surexpression stable de C1orf106 produite par transduction lentivirale dans les cellules épithéliales coloniques LS174T.....	52
Figure 13. Co-localisation de C1orf106 avec les marqueurs des jonctions intercellulaires, ZO-1 et E-cadhérine, par immunofluorescence dans les cellules stables LS174T surexprimant les deux allèles de C1orf106. ....	53
Figure 14. Analyse de la stabilité de C1orf106*Y333 et de C1orf106*333F suite au traitement des cellules LS174T avec 50µg/ml de cycloheximide (CHX). ....	55
Figure 15. Analyse de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) dans le modèle cellulaire Caco-2 sous-exprimant C1orf106. ....	56
Figure 16. Sous-expression stable de C1orf106 produite par transduction lentivirale dans les cellules Caco-2 prolifératives (T=2). ....	57

## Liste des figures supplémentaires

Figure suppl. 1. Profil d'expression de <i>KIF21B</i> et <i>CACNAIS</i> produit par micropuce d'expression.....	xii
Figure suppl. 2. Détermination de la dose de cycloheximide (CHX) pour l'étude de la stabilité protéique de C1orf106 dans cellules stables LS174T surexprimant l'une ou l'autre des deux allèles de C1orf106. ....	xiii
Figure suppl. 3. Analyse de la stabilité de C1orf106*Y333 et de C1orf106*333F suite au traitement des cellules LS174T avec 50µg/ml de cycloheximide (CHX). ....	xiii

## Liste des abréviations

a.a. : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AGCC : acide gras à courte chaîne

ARN : acide ribonucléique

BMP : *bone morphogenesis protein*

BTA : *butyric acid* ou acide butyrique

*Clorf106* : *Chromosome 1 open reading frame 106*

CAR : *coxsackievirus and adenovirus receptor*

cDs : cellules dendritiques

CEIs : cellules épithéliales intestinales

CHX : cycloheximide

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CU : colite ulcéreuse

DP, desmoplakine

EGF : *epidermal growth factor*

FBS : *foetal bovine serum* ou sérum de veau foetal.

fs : *frame shift*

GAPDH : *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GI : gastro-intestinal

GWAS : *genome wide association studies* ou études d'association pangénomique

Igs : immunoglobulines

IL : interleukine

ILC : cellules lymphoïdes innées

JAMs : *junctional adhesion molecules*

*KIF21B* : *Kinesin family member 21 B*

KO : *knock-out*

KD : *knock-down*

LPS : lipopolysaccharide

MALT : tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale

MC : maladie de Crohn

MDP : *muramyl dipeptide*

MEC : matrice extracellulaire

MIIs : maladies inflammatoires de l'intestin

MUC2 : mucine 2

ND : non-déTECTable

NDS : *normal donkey serum* ou sérum d'âne normal

NOD : *nucleotide-binding oligomerization domain*

PAMs : peptides antimicrobiens

PAMPs : *pathogen-associated molecular patterns*

Pb : paire de bases

PMNs : polymorphonucléaires

PRRs : *pattern recognition receptors*

qPCR : réaction de polymérisation en chaîne quantitative

*shRNA* : *small hairpin RNA*

SI : *sucrase-isomaltase*

SNP : *single nucleotide polymorphism* ou polymorphisme nucléotidique

T<sub>C</sub> : lymphocyte T cytotoxique

TEM : transition épithéliale-mésenchyme

TEER : *trans-epithelial electrical resistance*, ou résistance électrique trans-épithéliale

TGF- $\beta$  : *transforming growth factor- $\beta$*

T<sub>H</sub> : lymphocyte T *helper* ou T auxiliaire.

TNF- $\alpha$  : facteur de tumeur nécrosante- $\alpha$

TFF3 : *trefoil factor 3*

Tregs : lymphocytes T régulateurs

TLR : *toll-like receptor*

tyr : tyrosine

WGA : *wheat germ agglutinin*

ZO-1 : *zonula occludens-1*

## Liste des symboles

Å : Ångström (unité de longueur valant 0,1 nanomètre ( $0,1 \times 10^{-9}$ ))

°C : degré Celsius

% : pourcent

Ca<sup>2+</sup> : ion calcium

g : force centrifuge

m : milli ( $10^{-3}$ )

M : mole par litre (unité de concentration, molarité)

mA : milliampère (mesure du courant électrique)

mm : millimètre

n : nano ( $10^{-9}$ )

$\Omega \cdot \text{cm}^2$  : ohm par centimètre carré (mesure de la résistance électrique par la surface de croissance)

rpm : rotation par minute

TU : *transducing unit* ou unité transductrice

U : unité

$\mu$  : micro, ( $10^{-6}$ )

## Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr. John D. Rioux pour son accueil dans son laboratoire. Ce fut une expérience très enrichissante et je pense maintenant avoir tous les outils nécessaires pour relever de nouveaux défis.

Je remercie également tous les membres de l'équipe (assistants et associés de recherche) qui ont participé de près ou de loin à mon projet de maîtrise. Parfois en tant qu'étudiant, on a l'impression d'être envahissant avec nos tonnes de questions. Vous avez toujours été disponibles et j'en suis très reconnaissante. Un merci tout particulier à Guy Charron pour son aide indispensable tout au long de ma maîtrise ainsi qu'à l'écriture de mon mémoire et sans qui, je n'y serais pas arrivé à temps!

J'ai aussi une petite pensée pour Claudine, qui un jour m'a dit « respire ». Merci pour tes conseils.

Merci à mes amis, plus particulièrement à Virginie, avec qui j'ai évolué pendant 3 ans à la maîtrise. Merci pour ton écoute et tes conseils tant au niveau professionnel que personnel.

Merci à ma famille, à mes parents qui m'ont encouragé et appuyé de toute part. Je sais à quel point vous êtes fière de moi et ça me rend heureuse. Finalement, merci à mon amoureux, Martin-Pierre, qui m'a supporté (dans tous les sens du terme!) pendant mes études.

# Introduction

## 1. La biologie du tube digestif

Le système gastro-intestinal (GI) est formé d'une série d'organes creux organisés en un long tube qui permet le passage des aliments de la bouche à l'anus. On retrouve, dans l'ordre antéro-postérieur, la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon, qui inclus le rectum et l'anus. La fonction principale du tube GI est l'absorption des nutriments et de l'eau. Le foie et le pancréas participent à la digestion des aliments en sécrétant, respectivement, la bile et des enzymes digestives qui jouent un rôle dans la décomposition et l'assimilation des nutriments [1].

Le tube GI est colonisé par une communauté complexe de microorganismes; la microflore intestinale. Cette dernière évolue avec l'hôte dans une relation commensale et parfois même symbiotique. C'est-à-dire que l'hôte fournit les nutriments essentiels à la croissance et à la survie des microorganismes alors que ceux-ci jouent un rôle majeur dans la digestion et l'assimilation des nutriments par l'hôte. La microflore intestinale produit des métabolites qui agissent localement sur l'épithélium intestinal et qui régulent, à distance, d'autres systèmes comme le système immunitaire et le système endocrinien. À ce titre on la considère comme un organe [2, 3].

### 1.1 Les organes du tube digestif et leurs fonctions

#### Cavité orale et œsophage

Dans la bouche, la digestion est à la fois mécanique et biochimique. La mastication permet de broyer les aliments et de les mélanger à la salive pour former le bol alimentaire. L'amylase salivaire amorce la digestion biochimique de l'amidon et du glycogène.

Il n'y a pas de digestion dans le pharynx et l'œsophage. Les muscles de l'œsophage permettent le péristaltisme, une onde de contractions musculaires qui a pour but de propulser le bol alimentaire et les fluides jusqu'à l'estomac [1, 4].

## Estomac

L'estomac est la région du tube GI où se produit la digestion des protéines. Cette fonction est assurée par les cellules principales qui sécrètent le pepsinogène, la forme inactive de la pepsine. Cette dernière est une enzyme protéolytique qui hydrolyse les protéines et dont l'activité enzymatique dépend du pH de l'estomac. Le pepsinogène est donc activé au contact de l'acide chlorhydrique (HCl) sécrété par les cellules pariétales [5]. Le pH de l'estomac humain adulte varie entre 1,5 et 3,5 [1]. En soit, l'acidité de l'estomac représente une barrière chimique importante qui bloque l'accès des bactéries pathogènes à l'intestin [5]. D'autre part, la muqueuse gastrique doit aussi se protéger des dommages que peut occasionner un pH aussi acide. La muqueuse gastrique est recouverte d'une épaisse couche de mucus riche en ions carbonates qui neutralisent localement l'acidité. Les cellules épithéliales de la muqueuse sont jointes les unes aux autres par des jonctions serrées qui empêchent l'acide gastrique d'atteindre les tissus sous-jacents. Les cellules épithéliales endommagées sont continuellement remplacées suite à la différenciation de cellules progénitrices produites par les cellules souches pluripotentes localisées dans les glandes de l'épithélium gastrique [6]. Les cellules pariétales sécrètent également le facteur intrinsèque qui aide à l'absorption de la vitamine B12 dans l'intestin grêle, plus précisément dans l'iléon. La sécrétion du facteur intrinsèque est la seule fonction vitale de l'estomac [1]. La maladie de Crohn (MC) représente un facteur de risque de la malabsorption de la vitamine B12 en raison de l'atteinte iléale de l'intestin grêle [7].

## L'intestin grêle et les glandes annexes

L'intestin grêle est le principal organe de la digestion. Sans son tonus musculaire, il mesurerait entre 6 à 7 mètres. Sa paroi forme des plis, les microvillosités, qui multiplient sa surface d'absorption. Celle-ci est estimée à environ 200 m<sup>2</sup>, ce qui fait d'elle la plus grande surface d'absorption du corps humain [8]. L'intestin grêle comprend trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon qui sont tous impliqués dans l'absorption des nutriments [9]. Des marqueurs

spécifiques permettent de mettre en évidence des fonctions propres à chacun d'eux. Le cytochrome B réductase 1, impliqué dans le métabolisme du fer, est plus fortement exprimé dans le duodénum, là où se produit l'absorption du fer. La bile et les sucs pancréatiques se déversent dans le duodénum. La bile est produite par le foie et possède un rôle dans le transport des lipides. Une autre fonction importante du foie est la conversion des acides aminés (a.a.) issus de la protéolyse stomacale en protéines plasmatiques. Ces dernières sont indispensables au transport du fer, des hormones, des vitamines et des acides gras. Les sucs pancréatiques aident aussi à la digestion. Ils sont riches en enzymes digestives et en bicarbonates qui neutralisent l'acidité du bol alimentaire [10]. L'acide biliaire, produite par le foie suite à l'oxydation du cholestérol, est responsable de l'émulsion des lipides. L'acide biliaire est réabsorbé dans l'iléon et son transporteur, *Apical sodium dependent bile acid transporter*, y est fortement exprimé [9].

### Le côlon

Le rôle principal du côlon est la réabsorption de l'eau et des électrolytes. Sa fonction principale est d'acheminer les résidus alimentaires non-digérés et les fèces jusqu'à l'anus. L'épithélium du côlon contient un grand nombre de glandes sécrétant un mucus épais qui permet de diminuer la résistance du bol alimentaire lors de son transit jusqu'à l'anus.

## **1.2 La microflore du tube gastro-intestinal**

La microflore humaine est l'ensemble des microorganismes et de leur matériel génétique présents à la surface et à l'intérieur du corps humain. Sa composition varie énormément d'un individu à l'autre et selon des facteurs génétiques, environnementaux et pathologiques [11]. Depuis longtemps, on soupçonne l'influence de la microflore humaine dans l'étiologie de plusieurs maladies. Toutefois, l'étude du microbiome intestinal est limitée par la difficulté à obtenir des échantillons. La grande majorité des échantillons utilisés pour l'analyse de la microflore intestinale proviennent des fèces alors qu'ils sont peu représentatifs du tube GI proximal [2]. Des biopsies œso-gastro-duodénales sont nécessaires pour l'étude de cette

région. Cependant, elles sont difficiles à obtenir chez les sujets sains [2]. Malgré ces limitations, le projet international « The Human Microbiome Project » vise à caractériser la microflore humaine et à vérifier l'impact de sa composition sur le développement des maladies humaines [2].

L'étude de la microflore est aujourd'hui un sujet de recherche en expansion qui utilise l'approche métagénomique telle que le séquençage à haut débit des acides ribonucléiques (ARN) ribosomiaux 16S et le séquençage global (*whole-genome shotgun*) [2]. C'est ainsi qu'il a été établi que la microflore du tube GI en santé contiendrait entre 70 et 100 espèces de bactéries connues. Lorsque les espèces bactériennes de faible abondance, jamais cultivées et encore non-classifiées sont prises en compte, le nombre total excèderait 1000 espèces [2]. Les microorganismes de notre microflore intestinale produisent des métabolites dont certains ont un effet local sur l'épithélium intestinal mais aussi à distance sur d'autres organes. Il n'est donc pas surprenant qu'une altération de sa composition, la dysbiose, puisse avoir un impact important sur notre santé [12].

Le nombre de microorganismes de la microflore humaine est 10 fois supérieur au nombre de cellules humaines [13, 14]. Autrement dit, 90% des cellules qui composent notre organisme sont des cellules microbiennes [15]. Dans la lumière intestinale, on retrouve approximativement  $10^{12}$  microorganismes par gramme de contenu luminal [16] dont seulement 0,1% d'entre eux sont des espèces pathogènes telles que *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* et *Vibrio cholerae* [2]. La microflore intestinale est composée de bactéries, d'archéobactéries, de microorganismes eucaryotes (champignons, helminthes et protozoaires) et de virus [2]. Sa composition diffère suivant l'axe longitudinal du tube GI mais aussi entre la lumière et la surface de la muqueuse intestinale [2, 17]. De plus, la diversité microbienne tend à augmenter de la bouche à l'anus. Du côté distal de l'œsophage, la diversité de la microflore y est faible et est essentiellement composée d'espèces de *Streptococcus* [2]. Dans l'estomac, l'acidité des sucs gastriques contribue à limiter la croissance et la diversité des populations microbiennes. Les microorganismes qui y survivent sont acido-résistants et le genre *Streptococcus* y est aussi le plus abondant [2]. Il existe encore peu d'études métagénomiques portant sur la microflore de l'intestin grêle. Le genre *Streptococcus* y serait aussi abondant et

la diversité augmenterait du duodénum vers l'iléon [2]. C'est dans le côlon qu'est retrouvée la plus grande diversité de microorganismes [17]. Chez des sujets sains, les microorganismes des phylums Firmicutes et Bacteroidetes y seraient dominants [2].

### **1.2.1 Ses fonctions métaboliques**

À l'équilibre, la microflore intestinale et l'hôte entretiennent une relation commensale [18]. L'hôte fournit un microenvironnement qui favorise la survie des microorganismes alors que ceux-ci dégradent les nutriments complexes issus de notre alimentation et les rendent assimilables par l'hôte [19]. Pour être transportés vers la circulation sanguine et lymphatique, les sucres complexes (oligosaccharides) doivent être décomposés en sucres simples (monosaccharides et disaccharides) [20]. Cette étape du processus de la digestion est à la fois accomplie par divers enzymes produits au niveau de la bordure en brosse des entérocytes (représentée à la figure 2) et par de nombreux microorganismes de la microflore intestinale. Alors que les cellules humaines ne produisent pas plus de 20 enzymes capables de décomposer ces sucres complexes, plusieurs bactéries de la microflore intestinale sont spécialisées dans cette tâche [2]. Le génome de *Bacteroides fragilis* 638R, une bactérie fibrolytique du phylum des Bacteroidetes, coderait pour plus de 200 glycosides hydrolases [21]. Il est aussi intéressant de noter que la colonisation de l'intestin par la microflore intestinale se produirait de manière à ne pas entrer en compétition avec l'hôte pour les nutriments. L'absorption des sucres simples se produit du côté proximal de l'intestin grêle. Alors qu'ils sont un substrat de choix pour la microflore, la colonisation bactérienne de l'intestin grêle proximal est faible. Les polysaccharides et autres composés non-assimilables par l'hôte voyagent alors jusqu'à l'extrémité distal de l'intestin grêle et jusqu'au côlon où la colonisation est forte [19].

Plusieurs bactéries, présentes dans le côlon, produisent des acides gras à chaîne courte (AGCC). Ceux-ci sont issus de la fermentation des sucres complexes tels que l'amidon et les fibres alimentaires [22-24]. Les principaux AGCC sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Le butyrate est la source principale d'énergie utilisée par les entérocytes et représente environ 60 à 70% de leur apport énergétique. Hormis son rôle nutritionnel, le butyrate confère aussi

plusieurs effets bénéfiques sur l'épithélium intestinal du côlon. Il y favorise l'absorption nette des ions et de l'eau [19]. Les AGCC ont aussi un rôle majeur dans la fonction de barrière physique et dans la réponse immunitaire (section 2.2). Outre les AGCC, les bactéries synthétisent aussi des acides aminés et des vitamines essentielles. Par exemple, certaines espèces de *Bacteroidetes* synthétisent de la vitamine K [25].

### **1.2.2 Ses fonctions structurales**

Les microorganismes de la microflore intestinale forment un biofilm protecteur à la surface de l'épithélium intestinal [26]. C'est-à-dire qu'ils constituent une barrière physique naturelle qui empêche l'invasion par des microorganismes pathogènes en bloquant l'accès aux sites de liaison présents sur l'épithélium intestinal et en compétitionnant pour les nutriments [13]. De plus, les microorganismes produisent des composés antimicrobiens comme des acides organiques, des bactériocines [13] et des métabolites qui soutiennent la fonction de barrière. Par exemple, le butyrate favoriserait l'assemblage des jonctions serrées *via* la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate [23] et favoriserait aussi la sécrétion de mucine, la composante majeure du mucus [27].

### **1.2.3 Ses fonctions immunitaires**

La colonisation bactérienne du tube GI du nouveau-né se produit rapidement, après la naissance, au contact avec la microflore maternelle (peau, vagin, etc.) [28]. C'est pendant la première année de vie que la microflore se forme. Elle dépend, en grande partie, de facteurs environnementaux tels que la diète, la qualité de l'eau de consommation, les conditions d'hygiène, etc. [15]. Chez la souris dépourvue d'une microflore, on note un défaut du développement des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses ainsi qu'un défaut dans la production d'anticorps. La microflore intestinale semblerait stimuler, en continu, le système immunitaire ce qui favoriserait son développement [18]. D'autres études ont démontré que certaines bactéries de la microflore intestinale réguleraient spécifiquement des composantes du

système immunitaire [26]. Par exemple, 17 souches de *Clostridium* supporteraient un environnement riche en *Transforming growth factor* (TGF- $\beta$ ) qui favorise la prolifération et l'expansion des cellules T régulatrices (Tregs) (section 2.2.3) [29]. Ces dernières jouent un rôle de premier plan dans la tolérance immunitaire face à la microflore intestinale [30]. *Bacteroides fragilis* sécrète le polysaccharide A qui favoriserait aussi une réponse tolérogène des cellules Tregs [29]. D'autres métabolites bactériens réprimeraient l'expression et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Les AGCC diminuent l'expression des cytokines pro-inflammatoires *via* l'inhibition de l'activité du *nuclear factor- $\kappa$ B* et la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  [31]. Certaines bactéries participent, dans l'estomac, à la conversion de la L-histidine issue du catabolisme des protéines en histamine. Cette dernière aurait un effet anti-inflammatoire en réprimant la production du facteur de tumeur nécrosante (TNF) par les cellules épithéliales *via* leur récepteur à l'histidine de type 2 [2, 32].

#### **1.2.4 La flore intestinale et l'apparition des MIIs**

Chez les individus en santé, on remarque la présence de certaines classes de microorganismes qui sont soit reliées au métabolisme (sucres, cofacteurs et biosynthèse des sucres), à la tolérance immunitaire (anti-inflammatoires) ou encore à la résistance au cancer [2]. À l'équilibre, les bactéries bénéfiques supportent un environnement tolérogénique. La dysbiose favoriserait plutôt un environnement pro-inflammatoire. Chez les patients atteints de la MC avec une atteinte iléale, une dysbiose intestinale est observée par la diminution du nombre de microorganismes producteurs d'AGCC [33]. Certains facteurs de risque génétiques peuvent affecter la composition de la microflore intestinale. Par exemple, la variante génétique Leu1007fs du gène NOD2 (*Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*) serait associée à une dysbiose chez les patients atteints de la MC [34, 35]. NOD2 est le récepteur intracellulaire du muramyl dipeptide (MDP), un peptidoglycan bactérien. Leu1007fs réduirait la sécrétion d' $\alpha$ -défensine par les cellules de Paneth [36, 37]. Ce dernier est un peptide antimicrobien qui contrôle la prolifération des bactéries commensales et pathogènes.

La microflore humaine est aussi composée de virus, le virome, qui contient principalement des bactériophages. Ils infectent les bactéries et altéreraient, par le fait même, la composition de la microflore bactérienne. À l'équilibre, les bactériophages les plus abondants sont de l'ordre des Caudovirale et de la famille des Microviridae. Une étude récente a démontré, chez des patients atteints d'une MII, qu'une diminution de la richesse et de la diversité des bactéries serait associée à une augmentation de la richesse des bactériophages [38].

## **2. Les systèmes généraux de défense**

Les muqueuses sont des composantes importantes de l'immunité innée. Elles représentent une barrière qui protège l'intérieur de l'organisme des agents pathogènes. Parmi ces barrières anatomiques, on compte la peau et la surface des muqueuses, incluant la muqueuse épithéliale du tractus respiratoire, urogénital et gastro-intestinal. La barrière épithéliale intestinale est composée d'une monocouche de cellules épithéliales polarisées qui sépare la communauté complexe de microorganismes qu'abrite le tube GI de notre système immunitaire [9, 39]. Comme nous l'avons décrit précédemment (section 1.2), la muqueuse intestinale est colonisée par une microflore dite « normale ». Si la croissance de la microflore n'est pas contrôlée, les microorganismes commensaux peuvent devenir invasifs. Le contrôle de la prolifération est donc primordial pour maintenir l'homéostasie intestinale. Elle est assurée par le système immunitaire et l'épithélium intestinal. En plus de former une barrière physique, les cellules épithéliales ont aussi une fonction immunitaire. Elles sécrètent, par exemple, des cytokines pro-inflammatoires, des dérivés réactifs de l'oxygène et des peptides antimicrobiens en réponse aux pathogènes invasifs [40, 41]. Des cellules épithéliales, les cellules M (pour « Microfold »), sont spécialisées dans l'échantillonnage et le transport d'antigènes de la lumière intestinale vers la muqueuse gastro-intestinale qui contient des follicules lymphoïdes [42, 43]. Ces derniers forment des structures spécialisées appelées plaques de Peyer, principale composante du tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (MALT). Ce dernier est constamment exposé à notre microflore. Il est donc intéressant d'observer que chez des individus en santé, il n'y a pas d'inflammation au niveau de la muqueuse intestinale [44]. Les cellules épithéliales intestinales (CEIs) ainsi que le MALT ont mis en place des mécanismes

de tolérance qui permettent de limiter la réponse immunitaire face aux microorganismes commensaux de la microflore intestinale.

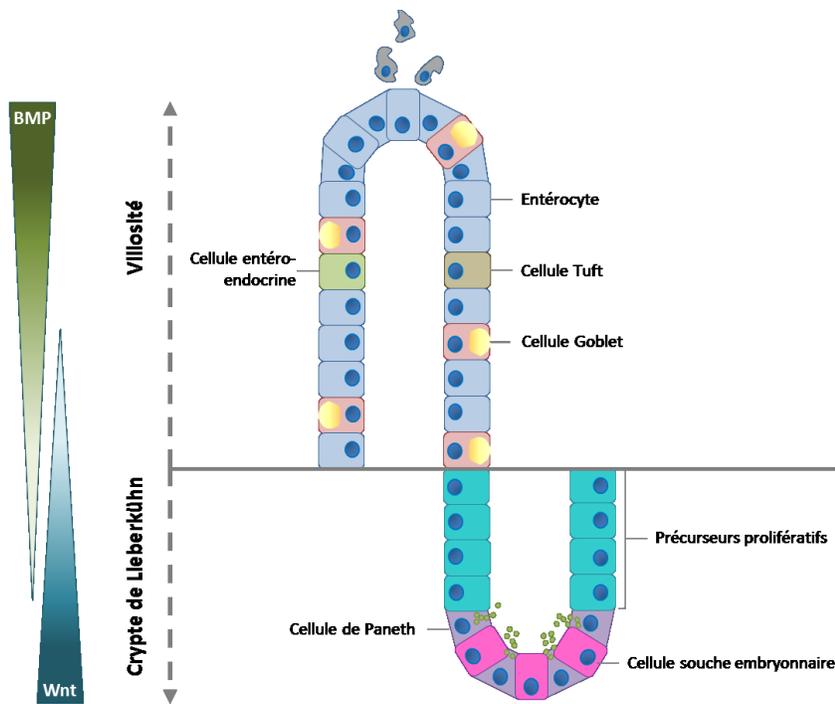
## **2.1 La barrière épithéliale de l'intestin**

L'épithélium intestinal est composé d'au moins six différents types cellulaires différenciés et organisés selon un axe crypte-villosité [39, 45]. Les cryptes de Lieberkühn représentent le compartiment prolifératif de l'épithélium intestinal. Elles contiennent les cellules souches pluripotentes, responsables du renouvellement continu de l'épithélium intestinal, les précurseurs prolifératifs et les cellules de Paneth [9]. Les villosités contiennent tous les autres types cellulaires différenciés tels que les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules Tuft [9]. Par ses composantes structurelles et biochimiques, la barrière épithéliale de l'intestin joue un rôle de premier plan dans l'immunité innée. Les cellules caliciformes et les cellules de Paneth contribuent à l'établissement d'une barrière biochimique. Elles sécrètent, respectivement, le mucus et des peptides antimicrobiens qui ont pour but de limiter l'accès des microorganismes commensaux ou pathogènes à l'épithélium intestinal. Dans les cryptes, les cellules M servent d'interface entre le système immunitaire et le contenu de la lumière intestinale [45].

### **2.1.1 Les cellules qui forment l'épithélium intestinal**

Les CEIs sont exposées à l'environnement défavorable de la lumière intestinale. À tous les jours, environ  $10^{11}$  cellules épithéliales ( $\sim 200$  g) se détachent de l'épithélium intestinal [46] et celui-ci se régénère complètement tous les trois à sept jours [47]. Le renouvellement continu des CEIs est contrôlé par la niche de cellules souches pluripotentes située dans le tiers inférieur des cryptes. Les cellules souches donnent naissance aux précurseurs prolifératifs qui occupent la région supérieure des cryptes. En présence des facteurs de croissance biologiques appropriés, les précurseurs prolifératifs se différencient, puis migrent vers le haut des villosités pour remplacer les cellules épithéliales qui se sont détachées de l'épithélium (figure 1) [39, 42, 46]. La différenciation des précurseurs prolifératifs est finement régulée par des facteurs de signalisation provenant, entre autres, des cellules mésenchymateuses et des CEIs [39]. Le

produit des gènes *WNT*, *Notch*, *Epidermal growth factor (EGF)* et *Bone morphogenesis protein (BMP)* forment un gradient précis le long de l'axe crypte-villosité [9, 48]. Par exemple, WNT et EGF forment un gradient décroissant du bas de la crypte à la jonction crypte-villosité. Une forte expression de WNT favorise le renouvellement des centres germinaux en stimulant la survie des cellules souches pluripotentes et la prolifération des progéniteurs alors qu'une faible expression de WNT favorise leur différenciation [9, 48]. Le facteur BMP fait partie de la grande famille du TGF- $\beta$ . L'expression de BMP est augmentée dans les villosités et s'oppose à WNT en favorisant la différenciation. Une altération de son expression semble être associée au développement du cancer colorectal [48].



**Figure 1. Représentation schématique de l'axe crypte-villosité.**

### Les entérocytes

L'épithélium intestinal est majoritairement composé d'entérocytes qui sont spécialisés dans l'assimilation des nutriments et dans l'absorption de l'eau [9]. Les entérocytes sont des cellules polarisées. C'est-à-dire que la distribution des structures cellulaires et des complexes

protéiques est asymétrique entre la face apicale, en contact avec la lumière intestinale, et la face basale, orientée vers la lamina propria [49]. Le pôle apical est recouvert de microvillosités qui sont de fins prolongements cellulaires qui augmentent la surface d'absorption pour les nutriments et forment une structure appelée bordure en brosse des entérocytes. Elle est riche en hydrolases, en canaux et en transporteurs de peptides [50, 51]. Elle exprime fortement la sucrase-isomaltase (SI), une enzyme qui hydrolyse l'amidon, le sucrose et l'isomaltose [50, 52]. Le pôle apical des CEIs est en perpétuel contact avec la flore intestinale et pour se protéger, les CEIs expriment la phosphatase alcaline [29, 53]. Cette dernière est une métalloprotéinase qui diminue l'affinité du lipopolysaccharide (LPS) de la paroi bactérienne des bactéries à gram négatif pour son récepteur immunitaire, le *Toll Like Receptor 4* (TLR4), se trouvant à la surface des CEIs. Le LPS est un puissant inducteur de l'immunité innée et des voies pro-inflammatoires [53, 54].

Le pôle basolatéral des entérocytes adhère fermement à la matrice extracellulaire (MEC) *via* les hémidesmosomes [55]. Ces derniers sont des complexes protéiques transmembranaires formés d'intégrines. Ils se lient fermement au collagène, à la laminine ou à la fibronectine de la MEC ainsi qu'à la kératine intracellulaire ce qui confère un ancrage du cytosquelette à la MEC [56]. Le pôle basolatéral des entérocytes se trouve à proximité des cellules immunitaires résidentes de la lamina propria et soutient la fonction immunitaire. Comme nous le verrons plus loin (section 2.2.2), des pores dans la membrane basale des entérocytes permettraient l'échantillonnage d'antigènes par les lymphocytes T, les macrophages et les cellules dendritiques (cDs) [57, 58].

### Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes sécrètent la mucine qui est la principale composante de la couche de mucus recouvrant l'épithélium intestinal [59]. Cette dernière a pour fonction de limiter l'accès des microorganismes à l'épithélium intestinal [60]. Les mucines sont des O-glycoprotéines dont 70% de la masse est formée de chaînes glycaniques de différentes longueurs et structures [61]. Les glycanes confèrent à la mucine une hydrophobicité ainsi qu'une résistance aux enzymes protéolytiques endogènes tout autant qu'à celles d'origine microbienne. Le

mucus est une barrière bactériostatique qui protège l'épithélium intestinal des agressions chimiques que représente le pH acide des sucs digestifs. Chez l'humain, plus de 20 gènes codent pour les différentes mucines. Elles peuvent être classifiées en deux groupes; les mucines associées aux membranes et les mucines sécrétées [59-61]. Les mucines associées aux membranes forment un revêtement filamenteux polysaccharidique que l'on appelle glycocalyx. Ils sont fermement ancrés dans la membrane cellulaire et assurent la fixation de la mucine sécrétée. La sécrétion de mucine est, entre autres, régulée par la microflore intestinale [47]. Le nombre de microorganismes augmente de l'intestin grêle au côlon, tout comme le nombre de cellules caliciformes. Elles représentent environ 4% des cellules épithéliales de l'intestin grêle alors que dans le côlon, la proportion y est de 16% [61]. Le côlon est recouvert d'une couche externe de mucus riche en nutriments qui favorise la colonisation des microorganismes et d'une couche interne fermement attachée aux cellules épithéliales dont la grosseur des pores la rend exempte de microorganismes [47, 60]. Quant à lui, l'intestin grêle est recouvert d'une seule couche de mucus dont la porosité reste permissive [47]. Cette caractéristique favoriserait l'absorption des nutriments [62]. Les cellules caliciformes sécrètent aussi le *Trefoil factor 3* (TFF3) qui régule la restitution et le renouvellement de l'épithélium intestinal [63]. TFF3 a un effet anti-apoptotique sur ce dernier et interagirait spécifiquement avec la mucine 2 (MUC2) pour améliorer la fonction de barrière [59, 64].

### Les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth sont regroupées à la base des cryptes et sont plus nombreuses dans l'iléon [36]. Leur cytoplasme renferme de larges granules de sécrétion qui contiennent principalement des peptides antimicrobiens (PAMs); les défensines [13, 65]. Elles ont pour fonction principale de limiter la croissance des microorganismes commensaux et pathogènes. Elles sont efficaces contre les bactéries à gram positif et négatif, les virus et les levures [66]. Leur mécanisme d'action est encore mal compris. Toutefois, deux modèles ont été proposés lesquels mèneraient à la perméabilisation de la membrane des microorganismes. Les défensines (ex.  $\beta$ -défensine) peuvent former des oligomères, ou agrégats, qui se lient aux membranes pour former des pores. Elles peuvent aussi recouvrir les cellules cibles de manière à déstabiliser les charges électrostatiques des membranes. Globalement, elles se lient aux

charges négatives des phospholipides des membranes et aux groupements phosphates du LPS des bactéries à gram négatif ainsi qu'à l'acide lipotechoïque de la membrane externe des bactéries à gram positif [66]. Les PAMs sont relâchés dans la lumière intestinale des cryptes et diffusent dans la couche de mucus [13]. La sécrétion des granules est régulée par la présence des bactéries et plus spécifiquement par leurs composantes et produits métaboliques *via* la signalisation du TLR et NOD (NOD2 a été décrit à la section 1.2.4) [41, 66]. Ils sont sécrétés en continu, à un niveau basal élevé en raison de l'omniprésence de la flore intestinale [13, 66].

Mis à part leur rôle dans la défense biochimique, les défensines modulent aussi le système immunitaire [66]. La sécrétion du *human-β-defensin 2* permet le recrutement, au site d'inflammation, des cDs et des cellules T mémoires et assurent la prolifération et la survie des cellules T CD4<sup>+</sup> *via* son interaction avec le TLR4 [66, 67]. De par leurs rôles, il n'est donc pas étonnant que certaines défensines soient associées à des maladies inflammatoires. C'est le cas de DEFB4A qui est un facteur de risque pour le psoriasis, une maladie inflammatoire qui affecte la peau [68]. Les cellules de Paneth expriment aussi des facteurs de croissance qui supportent la pluripotence des cellules souches épithéliales tels que l'*Epidermal growth factor* (EGF), le *Transforming growth factor-α* (TGF-α), Wnt3 [45, 69] et du lysozyme, une enzyme capable de dégrader le peptidoglycan de la paroi bactérienne [70].

### Cellules *Microfold* « M »

Dans l'épithélium intestinal, les cellules M échantillonnent le contenu de la lumière intestinale et présentent les antigènes aux cellules immunitaires des plaques de Peyer. Chez l'humain, elles représentent environ 10% des CEIs des plaques de Peyer. Contrairement aux autres CEIs, les cellules M sont caractérisées par une bordure en brosse irrégulière presque dépourvue de microvillosités et par une réduction considérable des glycocalyx à leur surface [42]. Ces particularités favoriseraient leur rencontre avec les antigènes de la lumière intestinale [23]. La membrane basolatérale des cellules M peut s'invaginer pour former une « poche » dans laquelle résident des cellules immunitaires [42]. Elles expriment, à leur surface, des protéines et des récepteurs qui leur permettent d'adhérer à certains motifs moléculaires bactériens. Par exemple, la glycoprotéine 2 adhère au flagelle bactérien et la PGLRP1 (*peptidoglycan*

*recognition protein 1*) adhère au peptidoglycan de la paroi bactérienne [42]. Suite à leur adhérence, les cellules M ingèrent ces antigènes à l'intérieur de vésicules soit par endocytose ou par phagocytose et assurent leur transport vers la lamina propria occupée par les cellules immunitaires [23, 42].

### Les cellules entéro-endocrines

Les cellules entéro-endocrines sont dispersées dans l'épithélium et représentent moins de 1% des CEIs [45]. Elles sont des cellules chimio-sensorielles qui agissent en médiateur entre le système digestif et le système nerveux autonome. Elles sécrètent plus d'une vingtaine d'hormones peptidiques et aminées qui agissent localement sur le tube GI ou à distance sur le système nerveux autonome. Il existe deux types de cellules entéro-endocrines; les cellules de type ouvert ou fermé. Les cellules de type ouvert réagissent au contenu de la lumière intestinale et sont, par exemple, des « capteurs » du contenu luminal en nutriments. Les cellules de type fermé sont plus rares et sécrètent des hormones en réponse à des stimuli neuronaux ainsi qu'à des facteurs paracrines [70, 71].

### Les cellules Tuft

Les cellules Tuft représentent 0.4% de l'épithélium intestinal chez la souris adulte [45]. Elles prennent leur nom en raison de l'extrémité émoussée des microvillosités [72]. Elles sont très peu étudiées et leur rôle précis est encore inconnu. Elles sont caractérisées par la présence de granules cytoplasmiques apicales [72] qui contiendraient des ions carbonates sécrétés en réponse à l'acidité du milieu externe [73]. Les cellules Tuft expriment le dimère TAS1R1-TAS1R3 aussi retrouvé chez les cellules sensorielles gustatives. Celui-ci répond aux acides aminés (ex. glutamate) et aux nucléosides tels que l'acide inosinique et monophosphate de guanosine qui sont des exhausteurs de goût [71, 73]. Dans l'estomac, les cellules de Tuft produisent la ghréline, une hormone endocrine qui stimule l'appétit. Chez la souris, elles sont plus souvent retrouvées à proximité des cellules entéro-endocrines. Ces caractéristiques indiquent qu'elles pourraient représenter un nouveau type de cellules endocrines du tube GI [71].

## 2.1.2 Les jonctions cellulaires

L'épithélium intestinal est composé d'une monocouche de CEIs. Il doit être étanche afin de créer une barrière distincte entre la microflore intestinale et notre système immunitaire. Les CEIs adhèrent entre elles grâce à des complexes protéiques qui forment des jonctions intercellulaires [74]. Globalement, ces jonctions jouent un rôle dans l'adhérence intercellulaire, dans la diffusion et dans le transport de molécules. Elles participent également à la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire [74, 75]. Quatre types majeurs de jonctions sont retrouvés dans l'épithélium intestinal; les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes.

### Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont situées du côté apical de la jonction intercellulaire et permettent un contact étroit entre les CEIs adjacentes [74, 76]. Elles régulent la perméabilité trans-épithéliale, c'est-à-dire la diffusion des molécules à travers l'espace paracellulaire (entre deux cellules adjacentes) des CEIs. Les jonctions serrées restreignent même le passage de certains médicaments à travers l'épithélium intestinal [77]. Toutefois, leur principale fonction est d'assurer l'étanchéité de la barrière épithéliale [74, 78]. Elles sont formées de protéines transmembranaires; les occludines, les claudines, les *Jonctionnal adhesion molecules* (JAMs), la tricelluline ainsi que les protéines d'assemblage *Zonula occludens-1/2/3* (ZO-1/2/3) [77]. ZO-1 relie les protéines des jonctions serrées les unes aux autres, au cytosquelette d'actine ainsi qu'aux molécules de signalisation. Leur assemblage est dépendant du calcium ( $Ca^{2+}$ ) qui favorise la translocation des protéines des jonctions serrées du cytoplasme vers la membrane cytoplasmique [23].

### Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes confèrent un site d'attachement au cytosquelette d'actine et assurent l'adhésion dynamique intercellulaire [74, 79]. Elles sont localisées sous les jonctions serrées ou distribuées le long de la membrane basolatérale pour former une ceinture d'attache [74, 79, 80]. L'E-cadhérine (*Epithelial-cadherin*) est la principale protéine d'adhésion intercellulaire

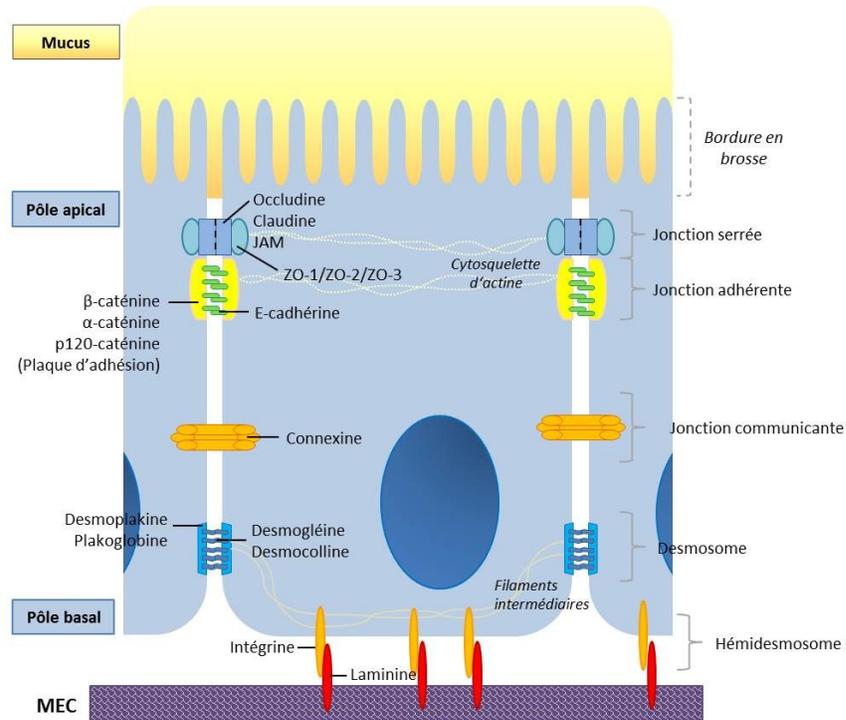
[81] et fait partie de la famille des cadhérines classiques dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ . Elle possède une portion transmembranaire et une portion cytoplasmique qui forme un complexe avec les caténines des cellules adjacentes [82]. L' $\alpha$ - et la  $\beta$ -caténine sont responsables de la liaison au cytosquelette d'actine et stabilisent ainsi l'adhésion cellulaire [82]. Le complexe formé de l'E-cadhérine et des caténines serait impliqué dans la transition épithéliale-mésenchyme (TEM), un processus à l'origine de certains cancers [83, 84]. La TEM des cellules épithéliales est caractérisée par une diminution de l'expression de l'E-cadhérine et de ZO-1 [82, 83, 85].

### Les desmosomes

Les desmosomes fournissent un site d'ancrage aux filaments intermédiaires et sont le point d'attache mécanique entre les cellules adjacentes [79]. Ils jouent un rôle important dans la résistance mécanique et sont présents dans les tissus soumis à des forces physiques importantes comme celles rencontrées dans le cœur et la peau [86]. L'épithélium intestinal est aussi exposé à divers stress mécaniques causés, par exemple, par le mouvement continu des microvillosités, par le péristaltisme et le transit du bol alimentaire [87]. Les desmosomes régulent aussi l'architecture, la mobilité et la prolifération cellulaire [88]. Trois familles majeures de protéines forment la plaque desmosomale. La desmogléine et la desmocoline sont des sous-types de cadhérines desmosomales responsables de l'adhésion cellulaire dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  [86]. Les protéines de la famille Armadillo forment un pont entre les cadhérines desmosomales et les protéines de la famille des plakines qui comprend la desmoplakine (DP). Cette dernière lie les kératines des filaments intermédiaires à la plaque desmosomale [86].

### Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes forment des pores qui permettent les échanges rapides d'ions, de petites molécules hydrophiles, de nutriments et de molécules de signalisation cellulaires [78]. Elles permettent la communication entre cellules voisines. Les jonctions communicantes sont formées d'un hexamère de connexines et sont généralement distribuées tout le long de la membrane latérale des entérocytes [74]. Elles peuvent parfois être co-localisées avec les protéines ZO dans les jonctions serrées [78].



**Figure 2. Représentation schématique des jonctions intercellulaires.**

### 2.1.3 Implication de la barrière épithéliale dans les MII

Des études ont démontré une corrélation entre la perméabilité intestinale et l'activité de la maladie chez les patients atteints d'une MII [89]. Il s'agit des jonctions serrées qui sont majoritairement responsables de la perméabilité trans-épithéliale [74, 78]. Lorsque cette dernière augmente, elle pourrait initier le processus inflammatoire. Encore aujourd'hui, on ne sait pas avec certitude si un défaut dans la fonction de barrière est une cause ou une conséquence des MII [39].

Il est connu que plusieurs médiateurs pro-inflammatoires ont un effet sur la perméabilité trans-épithéliale. Par exemple, une stimulation prolongée au TNF- $\alpha$  induit l'endocytose ou la dégradation de plusieurs protéines de jonctions serrées [39, 80]. Le TNF- $\alpha$  produirait un réarrangement du cytosquelette d'actine qui mènerait à la déstabilisation des jonctions serrées [39]. Ces observations tendent à favoriser l'hypothèse selon laquelle une atteinte des jonctions cellulaires serait une conséquence des MII. Toutefois, chez la souris déficiente pour la

protéine JAM-A (*F11r<sup>-/-</sup>*), une augmentation de la perméabilité trans-épithéliale d'au moins 10 fois est observée même si ces souris ne développent pas de colite spontanée. Néanmoins, dans ce modèle, on note une augmentation du nombre de lymphocytes (B et T) dans le MALT, de la sécrétion de TGF- $\beta$  et des immunoglobulines de type A (IgAs) qui ensemble pourraient compenser pour le défaut dans la perméabilité trans-épithéliale [90]. Un polymorphisme commun dans le gène *CDH1* (code pour la protéine E-cadhérine) est associé à la CU ainsi qu'au cancer colorectal [91]. Ce polymorphisme serait à l'origine d'une protéine CDH1 tronquée qui affecterait sa localisation à la membrane et son accumulation dans le cytoplasme [81]. Chez le modèle murin *CDH1<sup>KO</sup>*, des anomalies dans la polarisation des CEIs et dans le cytosquelette d'actine, ainsi qu'une apoptose prématurée des CEIs ont été observées [80].

Dans le modèle desmoplakine *DP<sup>KO</sup>*, la perte d'expression de la DP ne semble pas avoir d'impact sur l'adhésion cellulaire mais plutôt sur la structure et la longueur des microvillosités [86, 87]. D'autres études démontrent qu'une baisse de l'expression des protéines desmosomales augmenterait la perméabilité trans-épithéliale. Les cadhérines desmosomales sont la cible des protéases contenues dans les granules lytiques des cellules immunitaires polymorphonucléaires (PMNs). Dans les MIIs, une migration massive de ces cellules est observée [88, 92].

Jusqu'à présent, les régions de susceptibilité associées aux MIIs contenant les gènes *GNAI2*, *LAMB1* et *PTPN2* ont été associées aux MIIs. Même si aucune étude ne semble encore les identifier comme des gènes causals, ces derniers seraient impliqués dans la fonction de barrière épithéliale [93].

## 2.2 Les défenses immunitaires (généralités)

Les cellules immunitaires sont issues d'un même précurseur; les cellules souches hématopoïétiques. Ces dernières donnent naissance aux cellules myéloïdes (macrophages, cDs, neutrophiles, etc.) et aux cellules lymphoïdes (lymphocytes T, B et cellules *Natural killer*). Elles participent aux deux grands systèmes de défense dont dispose l'organisme pour se protéger des microorganismes commensaux et pathogènes; l'immunité innée et l'immunité

adaptative. L'immunité innée confère une réponse rapide mais non-spécifique. Ses composantes sont déjà en place avant même une infection ce qui fait d'elle, la première ligne de défense contre les agents pathogènes. L'immunité adaptative confère une réponse plus tardive mais de longue durée contre des agents pathogènes spécifiques. De plus, les cellules de l'immunité adaptative ont la capacité de développer une mémoire immunologique. Cette dernière caractéristique, des plus importantes, nous protège lorsqu'un même pathogène nous infecte une seconde fois. Ainsi, lors d'une deuxième exposition, les cellules mémoires induiront une réponse des plus rapides et hautement spécifique contre l'antigène. C'est d'ailleurs sur ce concept de l'immunologie que s'appuie la vaccination. Conjointement, la réponse immunitaire innée et adaptative assurent l'équilibre entre l'élimination des antigènes et la tolérance immunitaire [94].

### **2.2.1 L'immunité et ses manifestations dans les MIIs**

Pour infecter l'organisme, les microorganismes commensaux et pathogènes doivent d'abord franchir les barrières physiques et biochimiques que sont les muqueuses ainsi que leurs composantes bactériostatiques [95]. En cas d'intrusion, ce sont alors les phagocytes (macrophages, cDs et neutrophiles) qui sont chargés d'éliminer rapidement, par phagocytose, les antigènes ayant franchi ces barrières. Les molécules solubles, telles que les cytokines, soutiennent autant l'immunité innée que l'immunité adaptative.

#### Les récepteurs immunitaires

Les cellules immunitaires reconnaissent, à l'aide de récepteurs appelés *Pattern recognition receptors* (PRRs), des motifs moléculaires conservés uniques aux pathogènes (PAMPs) [96]. Les TLRs sont les PRRs les mieux caractérisés [96]. Chez l'humain, onze TLRs ont été identifiés [97]. Le TLR4, en association avec son corécepteur MD-2, reconnaît le LPS de la membrane externe des bactéries à gram négatif [96]. Certains TLRs sont localisés à l'intérieur de compartiments intracellulaires et reconnaissent principalement les acides nucléiques de virus et de bactéries [98, 99]. Globalement, la reconnaissance d'un PAMP par un PRR induit,

entre autres, l'immunité adaptative, l'expression des molécules d'adhésion nécessaires à la migration des cellules immunitaires [100], la phagocytose et la sécrétion de cytokines [98].

### Les cytokines

Les cytokines sont des protéines solubles sécrétées par les cellules immunitaires et qui modulent, localement ou à distance, l'activité du système immunitaire. Certaines cytokines possèdent des propriétés anti-inflammatoires alors que d'autres sont pro-inflammatoires. Ensembles, elles agissent pour contrôler et maintenir une réponse appropriée face aux microorganismes pathogènes. La sécrétion non-contrôlée du TNF- $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire, induit l'apoptose des cellules de Paneth et compromet la fonction de barrière épithéliale. Pour contrer l'effet du TNF- $\alpha$ , l'usage clinique d'anticorps neutralisants anti-TNF- $\alpha$  (Infliximab) permet de contrôler et d'améliorer les symptômes associés aux MII [101]. Il est connu que le niveau d'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires est augmenté dans la muqueuse inflammée des patients atteints d'une MII [102, 103].

### Les cellules phagocytaires

Les macrophages et les neutrophiles sont les principaux phagocytes [95, 104, 105]. Ils sont responsables de la phagocytose et peuvent également réaliser l'autophagie. Ce sont deux processus biologiques apparentés. La phagocytose consiste à la capture de matériel extracellulaire par une cellule. Elle se produit suite à la reconnaissance d'un PAMP par le PRR d'un phagocyte. Ce dernier ingère l'antigène dans une vacuole appelée phagosome. L'antigène est ensuite dégradé suite à la fusion du phagosome avec des lysosomes. L'autophagie, d'abord connue pour son rôle dans l'élimination et le recyclage des composantes cellulaires endommagées, désigne l'ensemble des mécanismes de dégradation intracellulaire par le lysosome [104]. Elle est aussi connue pour son implication dans la phagocytose et dans la présentation antigénique [37, 106, 107]. Il a été démontré que les cDs isolées de patients atteints de la MC porteurs d'un polymorphisme dans le gène *ATG16L1* (T300A) ont une anomalie dans la dégradation d'antigènes par le lysosome et dans la présentation antigénique. *ATG16L1* code pour une protéine *Autophagy related* (Atg), nécessaire à la biogénèse de

l'auto-phagosome [108]. L'autophagie est l'un des processus biologiques fortement associés aux MIIs [108, 109].

### Les neutrophiles

Les neutrophiles, ou leucocytes PMNs, sont les premières cellules à migrer vers l'intestin lors d'une intrusion microbienne [92, 110]. En quelques minutes, ils traversent l'endothélium des vaisseaux sanguins pour atteindre la lamina propria intestinale [92]. Malgré la présence des jonctions cellulaires, les neutrophiles peuvent traverser l'épithélium intestinal. La  $\beta_2$ -intégrine (CD11b/CD18) permet d'abord l'adhésion des neutrophiles à la membrane basale des CEIs. La migration trans-épithéliale est ensuite possible par l'interaction entre CAR (*coxsackievirus and adenovirus receptor*) et JAM-like (JAM-L), une protéine apparentée à la molécule d'adhésion jonctionnelle (JAM). Le récepteur CAR est localisé au niveau des jonctions serrées des CEIs et JAM-L est exprimé par les neutrophiles [111]. Chez les patients atteints d'une MII, on observe une migration trans-épithéliale non-contrôlée des neutrophiles. Ils déstabiliseraient la barrière épithéliale consécutive à une diminution de l'expression de plusieurs protéines de jonctions serrées [88, 92]. Les leucocytes PMNs produisent et emmagasinent, à l'intérieur de granules cytoplasmiques, des composés toxiques tels que des peptides antimicrobiens ( $\alpha$ -défensines), des enzymes hydrolytiques et des protéases qui sont relâchés au contact des pathogènes [92]. Certaines protéases dégraderaient la desmoglérine-2, une cadhérine desmosomale, résultant en une réduction de l'adhésion intercellulaire des CEIs [88, 92].

### Les lymphocytes T et B

L'activation des cellules immunitaires adaptatives est initiée par la présentation antigénique des cellules immunitaires innées et mène à la production de lymphocytes T et B spécifiques. Ces derniers passeront par plusieurs étapes de maturation avant d'exprimer, à leur surface, un récepteur transmembranaire spécifique à un antigène donné. Ces récepteurs font partie de la famille des immunoglobulines (Igs) de surface composées d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde. Les gènes codant pour ces deux chaînes subissent, durant la maturation de chaque lymphocyte, un réarrangement chromosomique aléatoire qui conduit à la production d'un

récepteur ayant une affinité particulière pour un antigène [112]. Ils subiront ensuite une sélection finement régulée durant laquelle les lymphocytes possédant un récepteur de bonne affinité seront conservés et leur expansion favorisée [30]. Globalement, ce processus permet la création d'un vaste répertoire de lymphocytes ayant différentes réactivités. La production des premiers lymphocytes matures prend de 4 à 5 jours ce qui fait de l'immunité adaptative une réponse tardive mais nettement plus spécifique que la réponse immunitaire innée [95].

Les lymphocytes T peuvent être différenciés en deux groupes principaux; les cellules T cytotoxiques ( $T_C$ ) et les cellules T auxiliaires ( $T_H$ ). Les cellules  $T_C$  sont spécialisées dans l'élimination des pathogènes intracellulaires (ex. virus) en relâchant des composés cytotoxiques (perforines, granzymes et granulosines) qui provoquent l'apoptose des cellules infectées [30, 113]. Les cellules  $T_H$  peuvent être divisées en différents sous-types (ex.  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$ ,  $T_H22$ ), lesquels sécrètent des cytokines « signatures » qui, par exemple, mènent à l'activation des lymphocytes B, à la production d'anticorps et au recrutement des cellules immunitaires. D'autres lymphocytes T, les cellules Tregs, possèdent une fonction régulatrice importante dans la tolérance immunitaire. Elles expriment le marqueur Foxp3, nécessaire à leur fonction tolérogène. Elles régulent l'activité immunitaire des cellules T auto-réactives dont le récepteur reconnaît des antigènes de l'organisme (ou antigènes du Soi, « *self-antigens* ») [114]. Les cellules Tregs sont abondantes dans la muqueuse intestinale et modulent à la baisse la réponse immunitaire médiée contre la flore intestinale. Elles ont donc des propriétés anti-inflammatoires importantes [115].

Les lymphocytes B sont des cellules sécrétrices d'anticorps. Dans la muqueuse intestinale, ils se différencient en plasmocytes suite à la présentation antigénique des cDs qui échantillonnent la lumière intestinale [116]. Les plasmocytes sont différents des cellules B par leur aptitude à produire une quantité massive d'anticorps solubles et par leur incapacité à proliférer. Dans la muqueuse intestinale, les plasmocytes sécrètent essentiellement des IgAs. 90% de celles-ci sont sécrétées sous l'influence de la microflore intestinale [117]. La membrane basolatérale des CEIs exprime le récepteur des immunoglobulines polymériques (pIgR) qui permet la transcytose des IgAs dans la lumière intestinale [118, 119]. Les bactéries qui s'y trouvent sont recouvertes d'IgAs ce qui les empêcheraient d'adhérer à l'épithélium intestinal [42, 120].

Certaines cytokines sécrétées par les CEIs favorisent la sécrétion d'Igs de type A2 (IgA2) qui sont plus résistantes aux protéases endogènes ainsi qu'à celles d'origine microbienne [43, 119].

### **2.2.2 Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (MALT)**

La muqueuse intestinale contient un grand nombre de cellules immunitaires telles que des lymphocytes B, des plasmocytes, des cellules T<sub>H</sub> activées, des cDs et des macrophages. Elle contient des structures spécialisées, les plaques de Peyer, composées d'une centaine de follicules lymphoïdes qui contiennent des lymphocytes [23, 42].

Le transit des antigènes à travers l'épithélium intestinal se fait principalement par le biais des cellules M. Il existe toutefois des voies alternatives de transport. Les cDs peuvent elles-mêmes échantillonner le contenu de la lumière intestinale à l'aide de leurs fins prolongements cytoplasmiques, les dendrites [23]. Elles expriment les protéines de jonctions serrées ZO-2 et claudine-4 qui favoriseraient leur passage dans l'espace paracellulaire [23, 57]. Les antigènes de faible poids moléculaire peuvent diffuser à travers les jonctions serrées [29] et par transcytose à travers les cellules caliciformes [42, 58]. Des pores sont aussi présents dans la membrane basale des CEIs et permettraient aux lymphocytes ainsi qu'aux macrophages de faire traverser leurs prolongements cytoplasmiques du côté de la lumière intestinale. Les cDs prendraient aussi avantage de ces pores [57, 58]. Les cDs et les macrophages présents dans la lamina propria intestinale jouent un rôle central dans la tolérance à la flore intestinale [121, 122].

### **2.2.3 Les mécanismes de tolérance à la flore intestinale**

L'homéostasie intestinale repose sur une réponse immunitaire appropriée face au contenu de la lumière intestinale. Les CEIs, certaines cellules immunitaires et les bactéries commensales contrôlent la réponse immunitaire par la production de cytokines anti-inflammatoires,

d'hormones et de métabolites, afin que cette dernière demeure physiologique (ou à l'équilibre) [2, 116].

Une population tolérogène de cDs réside dans la lamina propria intestinale. Les cDs CD103<sup>+</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>-</sup> soutiennent le développement des cellules Tregs [58] par la sécrétion de *Thymic Stromal Lymphoprotein* (TSLP), de TGF-β et d'acide rétinoïque [57, 93]. Les CEIs produisent également des immunomodulateurs [39, 93]. Elles expriment constitutivement l'interleukine-33 (IL-33) qui favorise l'accumulation et la survie des cellules Tregs dans la muqueuse intestinale [17, 39, 123]. L'IL-22, produite par les cellules T<sub>H</sub>17, soutient la production de peptides antimicrobiens et de mucus et favorise le renouvellement et la réparation de l'épithélium intestinal. L'IL-22 est également produite par d'autres types cellulaires immuns tels que les cellules lymphoïdes innées de type 3 (ILC3) [116]. Plus récemment identifiées, les ILCs ont une morphologie cellulaire lymphoïde classique mais ne possèdent pas de spécificité antigénique [124]. Les ILC3 sont des CPA qui expriment le récepteur RORγt nécessaire à leur développement. Elles jouent un rôle majeur dans l'homéostasie intestinale en limitant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (ex. IL-1β, IL-12 et IL-23) par les macrophages [39]. Comme les cellules Tregs, elles répriment l'activité des lymphocytes T [124]. Un défaut dans la réponse des cellules ILC3 RORγt<sup>+</sup> serait associé à une réponse inappropriée des cellules T<sub>H</sub>17 face à la microflore intestinale [124].

Tout comme les cellules immunitaires, les CEIs expriment des TLRs et sécrètent des cytokines suite à la reconnaissance de PAMPs. Pour limiter l'activation des voies pro-inflammatoires, le TLR2 et le TLR4 seraient plus faiblement exprimés du côté apical des CEIs iléales, en contact avec la flore intestinale, que du côté basal, à proximité des cellules immunitaires [29, 43].

Les macrophages de la lamina propria intestinale produisent moins de cytokines pro-inflammatoires mais possèdent toujours une forte activité phagocytaire [93]. Il a été démontré qu'ils expriment le TLR4 alors que l'expression de son corécepteur MD-2 est absent [93, 125].

### **3. Les maladies inflammatoires de l'intestin (MIIs)**

Les deux principales formes de MIIs sont la maladie de Crohn (MC) et la colite ulcéreuse (CU). Elles sont toutes deux définies par une réaction anormale et persistante du système immunitaire chez des individus génétiquement prédisposés et exposés à l'environnement [93, 126]. Globalement, les MIIs sont en partie expliquées par des facteurs de risque génétiques et environnementaux qui mèneraient au dérèglement du système immunitaire, de la barrière épithéliale ainsi qu'à la dysbiose de la microflore intestinale.

#### **3.1 Maladie de Crohn et colite ulcéreuse; les manifestations cliniques**

Dans la MC, l'inflammation touche toutes les parties du tube GI, de la bouche à l'anus, mais plus souvent l'iléon terminal et le côlon. Elle est caractérisée par des lésions intestinales segmentaires, avec une alternance de régions non-affectées par l'inflammation. De plus, l'inflammation est dite transmurale. C'est-à-dire qu'elle touche, en profondeur, toutes les couches du tissu GI. La MC est souvent associée à des complications telles que l'apparition d'abcès profonds et de fistules (ulcères) reliant l'intestin aux organes adjacents [81, 93]. Dans la CU, l'inflammation débute généralement dans le rectum et s'étend, de façon continue, jusqu'au côlon sigmoïde. Contrairement à la MC, l'inflammation observée dans la CU est superficielle. Elle affecte la muqueuse et parfois la sous-muqueuse intestinale [93, 108].

#### **3.2 Épidémiologie**

Les MIIs se manifestent principalement dans les pays occidentaux et sont peu fréquentes dans les pays en développement [126]. C'est d'ailleurs en Amérique du Nord, au Royaume-Uni et en Europe que l'incidence est la plus élevée alors qu'elle augmente progressivement avec l'industrialisation des pays en développement (Thaïlande, Afrique du Nord, Inde, etc.) [127]. En Amérique du Nord, la prévalence pour la MC est de 26 à 199 cas par 100 000 habitants et

37 à 246 cas par 100 000 habitants pour la CU. Au Canada, 0, 6% de la population est atteinte d'une MII [81, 126].

Les MIIs sont généralement diagnostiquées vers la fin de l'adolescence et chez les jeunes adultes. La MC se produit plus fréquemment entre l'âge de 15 et 30 ans [128]. Toutefois, un second pic d'incidence moins important entre l'âge de 60 et 70 est aussi observé. Le pic d'incidence de la CU se situe plutôt entre 20 et 29 ans [129].

### **3.3 Étiologie**

#### **3.3.1 Facteurs environnementaux**

##### Le tabagisme

La vaste majorité des facteurs de risque environnementaux sont communs entre la MC et la CU à l'exception du tabagisme [130, 131]. Alors que l'usage du tabac est un facteur de risque dans la MC, il semble être protecteur dans la CU. En effet, le risque d'être atteint de la CU augmente dans les 2 à 5 premières années qui suivent l'arrêt du tabagisme [130]. Un effet de dose sur la sévérité des symptômes et sur la localisation de l'inflammation est également observé chez les fumeurs atteints de la MC. Chez ces derniers, la localisation de l'inflammation serait influencée par l'usage du tabac. Les patients fumeurs auraient une atteinte iléo-terminale et iléo-colonique alors que l'inflammation serait plutôt colonique avec une diminution des risques de complications chez les patients non-fumeurs [130]. La fumée de cigarette contient plus de 7000 composés chimiques et des radicaux libres [132]. Ceux-ci auraient des effets négatifs sur l'endothélium vasculaire, sur la muqueuse intestinale ainsi que sur la production du mucus [131].

##### L'industrialisation

Des études ont démontré que des individus qui émigrent d'une région à faible prévalence vers un pays où les MIIs sont plus répandues augmenteraient leur risque de développer les MIIs, en particulier chez les enfants de la première génération [131]. De meilleures conditions

d'hygiène, telles que l'accès à l'eau potable et à la réfrigération des aliments, sont reliées à l'industrialisation des pays en développement. L'hypothèse de l'hygiène stipule que de meilleures conditions sanitaires diminueraient l'exposition à des parasites endémiques alors qu'ils favoriseraient le développement du système immunitaire [27, 133].

Plusieurs facteurs environnementaux tels que l'âge, la diète, l'usage d'antibiotiques et plusieurs autres facteurs liés à l'industrialisation sembleraient affecter la composition de la microflore intestinale [2].

### Les antibiotiques

Les antibiotiques peuvent, potentiellement, modifier la composition de la microflore intestinale, en particulier pendant la première année de vie durant laquelle la flore commensale se stabilise. Les antibiotiques ciblent les bactéries pathogènes tout autant que les bactéries bénéfiques de notre flore intestinale [25, 134]. Chez des souris ayant subi un traitement antibiotique *in utero* prolongé, on note qu'après la naissance, il a non seulement réduit le nombre total des microorganismes de la microflore intestinale mais aussi sa composition [28].

### La diète

Les espèces prédominantes de la microflore intestinale néonatale appartiennent au genre *Bifidobacterium* et sont spécialisées dans le métabolisme des sucres présents dans le lait maternel. À l'âge adulte, il s'agit plutôt des espèces des phylums Bacteroidetes et Firmicutes qui y sont dominants [2]. Plusieurs études récentes ont mis en évidence l'effet de la diète occidentale sur la composition du microbiome intestinal. Cette dernière est caractérisée par un apport élevé en gras et en aliments transformés et est faible en fibres alimentaires (fruits/légumes). Une diète riche en fibres serait reliée à une augmentation du nombre de bactéries productrices d'AGCC [27, 135].

### L'âge

Les MII sont généralement diagnostiquées dans la vingtaine ou la trentaine [128, 129] et tel qu'observé dans plusieurs maladies chroniques, leur prévalence tend à augmenter avec l'âge [136]. Le vieillissement est caractérisé par un changement dans la physiologie du tube digestif

et dans la diète [137], par une immunosénescence [27] et par des changements dans la composition de la flore intestinale [138]. Des études métagénomiques produites à partir des selles d'individus centenaires ont démontré une diminution des gènes bactériens impliqués dans le métabolisme des acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) et des AGCC [138].

### **3.3.2 Facteurs génétiques**

L'influence des gènes dans les MIIs a depuis longtemps été rapportée. Elle a été confirmée par des études populationnelles qui démontrent que 5 à 10% des patients atteints d'une MII ont au moins un membre de leur famille qui en est aussi affecté [81]. En 2015, une étude statistique Danoise conduite sur un peu plus de 45 000 patients nés ou vivants entre 1977 et 2011, a démontré que 12% des patients MC et 9% des patients atteints de la CU ont des antécédents familiaux au premier degré [139].

Des études de jumeaux démontrent que le taux de concordance, c'est-à-dire le pourcentage de paires de jumeaux dans lesquelles les deux sont atteints de la MC, peut atteindre 50% dans le cas des jumeaux monozygotes alors qu'il diminue autour de 7% chez les jumeaux dizygotes [140, 141]. Ceci met en lumière l'importance des facteurs génétiques dans le développement des MIIs [93].

#### **3.3.2.1 Identification des facteurs de risque génétiques par approche pangénomique**

Historiquement, les études sur la génétique humaine s'intéressaient principalement aux maladies monogéniques où la mutation dans un seul gène occasionne un phénotype quantifiable. À l'opposé des maladies monogéniques, les maladies génétiques complexes sont expliquées par plusieurs gènes et par l'environnement. Indépendamment, ces gènes n'ont qu'un effet modeste sur le développement de ces maladies. Dans ces conditions, les études d'association pangénomiques (GWAS) permettent d'évaluer l'association des variations nucléotidiques de l'acide désoxyribonucléique (ADN), appelées polymorphismes

nucléotidiques (SNPs), à travers le génome de patients et d'individus sains (contrôles) [142, 143]. Lorsqu'un SNP est significativement plus abondant chez les patients, on dira qu'il est associé à la maladie. Le seuil statistique pangénomique (valeur «p») est généralement fixé à  $p < 5 \times 10^{-8}$  [144, 145]. La taille de l'échantillonnage (cohorte) des GWAS doit être grande afin de pouvoir détecter l'effet des variantes génétiques. En 2012, la méta-analyse de 15 GWAS, sur un total de plus de 75 000 patients et individus sains de descendance européenne a permis d'identifier 163 régions de susceptibilité dans les MIIs, parmi lesquelles 110 sont associées à la MC et à la CU, 30 sont spécifiques à la MC et 23 sont spécifiques à la CU [145]. Il est aussi intéressant de noter que certaines de ces régions sont aussi associées à d'autres maladies inflammatoires et auto-immunes [93, 143]. Plus récemment, une nouvelle méta-analyse trans-ethnique comptant près de 95 000 individus de descendance Européenne et non-Européenne a permis d'identifier 38 nouveaux facteurs de risque génétiques portant le compte à 201 [144].

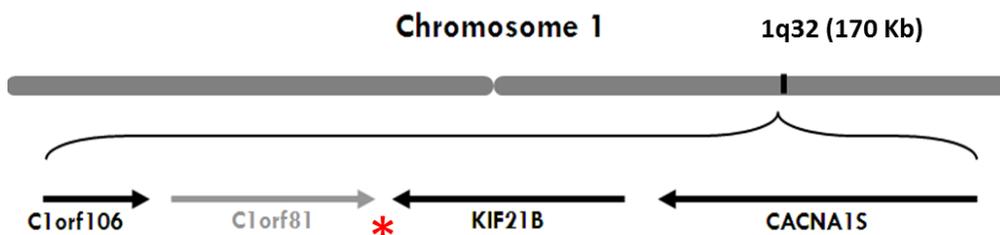
Les régions de susceptibilité associées aux MIIs contiennent de un à plusieurs dizaines de gènes pour lesquels la fonction biologique et la causalité doivent être déterminées. Jusqu'à maintenant, les gènes causals n'ont été identifiés que pour quelques régions. Ils ont toutefois permis l'identification de processus biologiques impliqués dans les MIIs. Cependant, la grande majorité des gènes candidats ont à ce jour des fonctions peu ou encore mal connues [143]. Le défi de l'étude des maladies génétiques complexes réside dans le développement d'une approche permettant de déterminer la causalité d'une variante génétique sur les processus biologiques associés.

### **3.3.2.2 La région de susceptibilité 1q32**

La région de susceptibilité 1q32 (rs11584383) a d'abord été associée à la MC ( $p = 1,43 \times 10^{-11}$ ) grâce à une méta-analyse de trois GWAS indépendants comptabilisant un total de 3230 individus atteints de la MC et 4829 individus contrôles tous d'ascendance européenne [146]. Une méta-analyse de six GWAS a ensuite permis d'associer la région 1q32 à la CU ( $p = 3,71 \times 10^{-11}$ ) [147]. Le SNP associé aux MIIs (rs11584383) est localisé dans la région intergénique entre *C1orf81* et *KIF21B*. L'étendue de la région de susceptibilité a été établie en

incluant les gènes corrélés ( $r^2=0.5$ ) avec le SNP rs11584383. Dans l'étude de Jostins et al. [145], la région 1q32 (rs7554511) a aussi été associée aux MIIs.

La région de susceptibilité 1q32 contient quatre gènes : *Chromosome 1 open Reading Frame 106 (C1orf106)*, *Chromosome 1 open Reading Frame 81 (C1orf81)*, *Kinesin family member 21B (KIF21B)* et *Calcium channel, voltage-dependant, L type, alpha 1S subunit (CACNA1S)* (figure 3).



**Figure 3. Représentation schématique de la région de susceptibilité 1q32.**

Région de susceptibilité 1q32 associée à la MC ( $p=1,43 \times 10^{-11}$ ) et à la CU ( $p=3.71 \times 10^{-11}$ ). \* Indique la localisation du SNP référence (rs11584383).

### C1orf81

*C1orf81*, aussi connu sous le nom *Heat-Like Repeat Family Member 3 (MROH3P)* est un pseudogène unitaire de 2284 nucléotides. Chez l'humain, une insertion d'un nucléotide dans l'exon 8 entraîne un changement dans le cadre de lecture qui génère un arrêt (codon stop) prématuré dans l'exon 9 ce qui mène à son inactivation puis à sa dégradation. Chez le chimpanzé et le singe rhésus, *C1orf81* code respectivement pour une protéine de 762 et 714 a.a. d'une fonction inconnue [148].

### CACNA1S

*CACNA1S* pour « *Calcium Channel, Voltage-Dependent, L Type, Alpha 1S Subunit* » (ou Cav1.1) code pour la sous-unité alpha 1S ( $\alpha 1s$ , 190 kDa) des canaux calciques voltage-dépendants lents (ou de type L pour « *long-lasting* », référant à la longueur d'activation). Cette protéine est nécessaire à la contraction musculaire squelettique via l'afflux de calcium ( $Ca^{2+}$ )

dans le cytosol [149]. La sous-unité  $\alpha 1s$  forme le pore du canal et à elle seule, permet un transport fonctionnel du  $Ca^{2+}$ . CACNA1S est aussi impliqué dans la sécrétion d'hormones par les cellules endocrines (ex. sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques) [150], et dans la sécrétion de neurotransmetteurs par les neurones récepteurs [151]. Plusieurs mutations ont été identifiées et certaines affectent la fonction de CACNA1S. Par exemple, la mutation R528H est un facteur de risque génétique pour la paralysie périodique hypokaliémique, une maladie autosomale dominante rare, avec un risque augmenté d'arythmie cardiaque [152]. L'expression de CACNA1S est retrouvée principalement dans le muscle squelettique (figure suppl. 1).

### KIF21B

*KIF21B* code pour une protéine motrice de la famille des kinésines. Elle a un rôle important dans le transport intracellulaire des protéines cargos, des organelles (ex. lysosomes et endosomes), des vésicules de sécrétion et des complexes protéiques. KIF21B est composé de deux domaines qui hydrolysent l'adénosine triphosphate (ATP) [153], d'un domaine liaison aux microtubules et d'un domaine de liaison aux protéines cargos. Les kinésines sont principalement exprimées dans la rate et le cerveau, plus précisément au niveau des dendrites neuronales [154]. Nous avons démontré que KIF21B est aussi exprimé dans les tissus et les cellules immunitaires (figure suppl. 1).

### C1orf106

*C1orf106* est un gène de fonction inconnue encore très peu étudié. L'analyse de l'expression des gènes du chromosome 1 dans différents sous-types d'adénocarcinomes pulmonaires a démontré une augmentation de l'expression de *C1orf106* dans tous les types de tumeurs [155]. De plus, il est exprimé dans les cellules épithéliales du tube GI [143].

Une étude de séquençage chez 350 patients atteints de la MC et 350 individus contrôles suivie du génotypage de 13991 patients MC et UC a permis d'identifier une variante rare (MAF<1%) de *C1orf106*, Y333F (p=0.009), associée aux MIIs. Cette dernière mène à la substitution d'une tyrosine (tyr) par une phénylalanine en position 333 [156].

## 4. Objectifs du projet de maîtrise

Les MIIs sont des maladies complexes causées par de multiples facteurs de risque environnementaux et génétiques qui mènent au dérèglement de la fonction immunitaire et de la barrière épithéliale intestinale. Les GWAS ont permis d'identifier des régions de susceptibilité associées aux MIIs dont la région 1q32 qui contient 4 gènes. Toutefois, aucun de ces gènes n'ont été formellement reliés aux MIIs. Jusqu'à maintenant, les gènes causals qui ont été identifiés possèdent un profil d'expression et une fonction biologique compatible avec la physiopathologie des MIIs et possèdent au moins une variante génétique qui affecte la fonction ou l'expression de la protéine.

Dans la région de susceptibilité 1q32, seul *C1orf06* possède une variante génétique rare (MAF<1%), Y333F (p=0.009) [156]. Globalement, mon projet de maîtrise vise à évaluer l'importance de *C1orf106* et de sa variante génétique rare dans le contexte des MIIs. Notre approche expérimentale a pour but de;

- 1) Définir les domaines et éléments fonctionnels de sa séquence peptidique primaire afin d'établir un lien avec un processus biologique.
- 2) Définir son profil d'expression tissulaire, cellulaire ainsi que sa localisation subcellulaire et la mettre en relation avec la physiopathologie des MIIs.
- 3) Suite aux analyses 1) et 2), définir l'implication de *C1orf106* sur des voies biologiques altérées dans les MIIs puis vérifier l'impact de sa variante génétique rare sur ces dernières.

## 5. Matériel et méthodes

### 5.1 Matériel

Les lignées cellulaires HEK293T, LS174T et Caco-2, le milieu *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) ont été obtenus d'*American Type Culture Collection* (ATCC) et le milieu *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) de chez Wisent. Le sérum de veau fœtal (FBS), la pénicilline, la streptomycine et la L-glutamine proviennent de ThermoFisher. Les vecteurs viraux utilisés pour la production de lentivirus proviennent de Sigma-Aldrich. Le polybrene<sup>®</sup>, l'acide butyrique, le cycloheximide, le fluorure de sodium (NaF), l'orthovanadate de sodium, le Tween-20, le Triton X-100, le sérum d'âne (NDS) et le DAPI proviennent de chez Sigma-Aldrich. Les inhibiteurs de protéases (*cOmplete<sup>TM</sup>, Mini, EDTA-free*) proviennent de la compagnie Roche. Les anticorps secondaires couplés à la HRP ont été obtenus de Cederlane et Abcam et le substrat de la HRP (*Western Blot Lightning Plus-ECL*) de Perkin Elmer. Les anticorps secondaires couplés aux fluorophores *Alexa Fluor<sup>®</sup>* utilisés pour les immunofluorescences proviennent de chez ThermoFisher.

### 5.2 Méthodes

#### 5.2.1 Culture des cellules Caco-2, LS174T et HEK293T

Les cellules Caco-2 ont été maintenues en phase exponentielle de croissance dans un milieu EMEM contenant 20% de FBS décomplémenté et 100U/ml de pénicilline et de streptomycine (pen/strep), à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules LS174T ont été maintenues en culture dans du milieu EMEM contenant 10% de FBS et 100U/ml de pen/strep. Les cellules HEK293T ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de FBS, 4mM de L-glutamine et 100U/ml de pen/strep.

### **5.2.2 Différenciation des cellules Caco-2**

Les cellules Caco-2 ont étéensemencées à une confluence de 50% puis maintenues pendant 20 jours en culture. Le milieu de culture des cellules a été changé à tous les deux jours. Les cellules atteignent normalement une confluence de 100% après trois jours en culture et sont entièrement différenciées 16 jours suivant l'atteinte d'une confluence de 100%. La différenciation terminale des cellules a été validée par la quantification par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) de la sucrase isomaltase (*SI*), un marqueur de la différenciation des cellules Caco-2.

### **5.2.3 Différenciation des cellules LS174T**

Les cellules LS174T ont été traitées avec de l'acide butyrique (BTA) à une concentration de 2mM puis ont été incubées pendant 24 heures à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. L'ARN a été extrait à l'aide de la trousse *RNeasy plus mini* et les niveaux d'expression de *C1orf106* et de *MUC2* ont été déterminés par qPCR en utilisant les amorces hum-C1orf106-01 et hum-MUC2-01 (Section 5.2.13 Tableau 2).

### **5.2.4 Analyse de la stabilité protéique**

Les cellules LS174T surexprimant C1orf106\*Y333 ou C1orf106\*333F ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> en présence de cycloheximide (CHX) à une concentration de 50 µg/ml. Les protéines ont été extraites à tous les 4, 8, 16 et 24 heures suivant l'ajout du CHX et le taux de dégradation de C1orf106 a été déterminé par immunobuvardage de type Western.

## 5.2.5 Clonages

### Optimisation de la séquence nucléotidique de C1orf106

Environ un codon sur cinq de la séquence nucléotidique endogène de C1orf106 a été modifié (séquence en annexe) pour l'optimisation de son expression dans différents systèmes biologiques (*GeneOptimizer*<sup>®</sup>). L'optimisation de la séquence nucléotidique ne change pas la séquence protéique de C1orf106.

### pLVX-EF1a-IRES-puro/eGFP-C1orf106\*Y333-opt

La séquence optimisée de C1orf106 (C1orf106-opt) a été synthétisée chez Thermo Fisher (*GeneArt*<sup>™</sup>) dans le vecteur pDONR<sup>™</sup>221, compatible pour le clonage *Gateway*<sup>®</sup> (vecteur donneur). C1orf106-opt a ensuite été transféré par recombinaison Gateway dans le vecteur d'expression pLVX-EF1a-IRES-puro/eGFP (vecteur de destination).

### pLVX-EF1a-IRES-puro/eGFP-C1orf106\*333F-opt

La séquence optimisée de C1orf106 a été modifiée pour remplacer la tyrosine par une phénylalanine en position 333. Un fragment d'ADN contenant la séquence de C1orf106-opt entre les nucléotides 822 à 1820 et présentant la variante génétique 333F a été synthétisé chez Thermo Fisher. Des sites de restriction *StuI* placés aux extrémités du fragment nous ont permis de faire le clonage direct du fragment 333F (cassette) dans le vecteur pDONR<sup>™</sup>221-C1orf106-opt. La présence ainsi que l'orientation de la cassette ont été vérifiées par amplification PCR avec les amorces M13-sens (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') et hum-C1orf106-opt-01-anti (5'-GCTTGCCTGGAAGAACTG-3'). C1orf106\*333F-opt a ensuite été transféré par recombinaison Gateway dans le vecteur d'expression pLVX-EF1a-IRES-puro/eGFP.

### **5.2.6 Transformation bactérienne, extraction et purification de l'ADN plasmidique**

Des bactéries compétentes *NEB 5-alpha High efficiency* ont été transformées selon les spécifications du fabricant (New England Biolabs). Le produit de la recombinaison Gateway a été ajouté à 50µl de bactéries compétentes. La transformation des bactéries a été effectuée par choc thermique : 30 minutes sur glace, 30 secondes à 42°C puis 2 minutes sur glace. 250µl de milieu S.O.C. a été ajouté aux bactéries puis elles ont été incubées à 37°C pendant une heure sous agitation constante à 250 rpm. Après une centrifugation d'une minute à 10 000 rpm, le culot de bactéries a été étalé sur un Pétri Luria-Bertani (Agar LB) contenant 100µg/ml d'ampicilline et les Pétris ont été incubés à 37°C pendant 18 heures. Des colonies bactériennes isolées ont été inoculées dans 3ml de milieu LB contenant 100µg/ml d'ampicilline puis les cultures ont été incubées à 37°C durant 18 heures. L'ADN plasmidique des bactéries a été purifié à l'aide de la trousse *Miniprep* (Qiagen) puis dosé par spectrométrie (NanoDrop UV-VIS). La présence de la cassette a été vérifiée par cartographie de restriction et par séquençage (Tableau 3 en annexe).

### **5.2.7 Séquençage**

Toutes les constructions plasmidiques ont été validées par séquençage de type Sanger en utilisant la technologie 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Les séquences ont été analysées avec le logiciel CLC DNA Workbench (CLC Bio).

### **5.2.8 Production des lentivirus**

Trois vecteurs ont été utilisés pour produire les particules virales infectieuses nécessaires à l'étude par sur- et par sous-expression de C1orf106. Le vecteur *packaging*-MISSION codant pour les gènes viraux *gag*, *pol* et *rev*, le vecteur *Envelope*-MISSION, codant pour l'enveloppe virale ainsi qu'un ou l'autre des vecteurs d'expression suivants; pLVX-EF1a-IRES-puro/eGFP, pLVX-EF1a-IRES-puro/eGFP-C1orf106\*Y333, pLVX-EF1a-IRES-puro/eGFP-C1orf106 \*333F ou du vecteur de sous-expression PLKO.1-puro contenant un *small hairpin*

RNA (shRNA) de C1orf106 (TRCN0000140233 (TRC1.5) NM\_018265.1-3236s1c1) (Sigma). Un mélange contenant 21µg du plasmide *packaging*-MISSION, 21µg du plasmide *Envelope*-MISSION et 10,5µg des vecteurs de surexpression ou des vecteurs de sous-expression a été préparé dans un volume total de 945µl et auquel 105µl d'une solution de phosphate de calcium (CaCl<sub>2</sub>) 2,5M a été ajoutée. En maintenant une agitation, 1050µl d'une solution HBSS (280mM NaCl, 50mM HEPES, 1,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) à pH 7,1 a été ajoutée progressivement et la solution de transfection a été incubée 15 minutes à température ambiante jusqu'à la formation d'un précipité blanchâtre. La solution de transfection a ensuite été ajoutée au milieu de culture des cellules HEK293T maintenues à une confluence de 70%. Le milieu de transfection a été remplacé par du milieu de culture frais après une incubation de 8 heures à une température de 37°C sous une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture contenant les virus a été prélevé 48 heures après le début de la transfection et les virus ont été concentrés à l'aide du réactif *Lenti-X concentrator* selon le protocole du fabricant (Clontech). Le culot de virus a été resuspendu dans un milieu de culture sans sérum ni antibiotique compatible avec les lignées cellulaires devant être utilisées. Les virus destinés aux études de surexpression ont été quantifiés par titrage effectif et les virus de sous-expression ont été titrés à l'aide de la trousse ELISA p24-associé *QuickTiter Lentivirus titer kit*, selon le protocole du fabricant (Cell Biolabs).

### **5.2.9 Production des lignées cellulaires stables par transduction lentivirale**

Les cellules ont étéensemencées à une densité de 20 à 30% dans des plaques de 24 puits. 200µl d'un milieu contenant 8µg/ml de polybrene<sup>®</sup>, 1% de FBS (milieu minimal) ainsi que les particules virales (MOI ~20) ont été ajoutés aux cellules puis elles ont été incubées pendant 8 heures. 800µl de milieu minimal a ensuite été ajouté. 48 heures après l'infection, une concentration effective de puromycine a été ajoutée aux cellules. La concentration de puromycine ainsi que le temps de sélection ont été déterminés suite à une courbe de mortalité produite pour chaque lignée cellulaire utilisée (tableau 1). Au terme de la période de sélection, l'ARN et les protéines ont été extraits pour valider la sur- et la sous-expression de C1orf106.

**Tableau 1. Concentration de puromycine et temps de sélection pour les lignées cellulaires épithéliales transduites.**

Lignée cellulaire	Concentration (µg/ml)	Temps ou nombre de passages
<b>Caco-2</b>	10	2 à 3 passages
<b>LS174T</b>	2	72 h
<b>HEK293T</b>	2	72 h

### 5.2.10 Extraction et dosage de l'ARN

Les ARN totaux ont été isolés avec la trousse *Rneasy Plus Mini kit* (Qiagen). Les cellules HEK293T, LS174T et Caco-2 ont été lavées une fois avec du DPBS puis traitées avec un tampon de lyse *RLT* contenant 10%  $\beta$ -mercaptoéthanol en accord avec les recommandations du manufacturier (Qiagen). Les lysats ont été homogénéisés et l'ADN génomique a été éliminé de la façon suivante : 350µl de tampon *RWI* a été ajouté à la colonne *RNeasy Mini Spin Column* puis centrifugée à 8000 xg pendant 15 secondes. 30U d'enzymes DNaseI (Qiagen) ont été ajoutées dans la colonne qui a été incubée 15 minutes à température ambiante. Finalement, 350µl de tampon *RWI* a été ajouté à la colonne puis centrifugée à 8000 xg pendant 15 secondes. L'ARN a été élué dans 30µl d'eau. Toutes les préparations d'ARN totaux ont été dosées par spectrométrie (NanoDrop UV-VIS) puis diluées à une concentration de 100ng/µl pour le dosage avec la trousse *Agilent RNA 6000 Nano* afin d'en déterminer l'indicatif d'intégrité de l'ARN (RIN). Les étapes du dosage ont été réalisées selon les recommandations du fabricant (Agilent).

### 5.2.11 Micropuce d'expression (puce à ADNc)

Le profil d'expression de C1orf106 a été établi à l'aide d'une micropuce à ADNc « *custom made* » qui contient une sonde par exon de tous les gènes testés. Les préparations d'ARN complémentaire (ARNc) marqués ont été synthétisées à l'aide de la trousse *Low Input Quick Amp WT labeling* à partir de 50ng d'ARN de chaque échantillon. La quantité ainsi que la qualité des ARNc ont été vérifiées par spectrométrie (NanoDrop UV-VIS). L'hybridation des ARNc a été produite selon le protocole du fabricant (Agilent) et la lecture des lames à l'aide

du lecteur *Sure Scan Microarray Scanner*. Une donnée d'expression a été obtenue par la moyenne géométrique de la valeur d'intensité des sondes pour C1orf106, suivie par une normalisation médiane de tous les gènes sur la micropuce. Une moyenne et une erreur standard géométrique ont été calculées à partir des valeurs d'intensité de trois expériences indépendantes.

### **5.2.12 Rétro-transcription**

Entre 200ng et 1µg d'ARN ont été rétro-transcrits en ADNc à l'aide de la trousse *High Capacity cDNA Reverse Transcription* selon le protocole du fabricant (Applied Biosystem). Les ADNc ont été conservés à -20°C.

### **5.2.13 PCR quantitatif (qPCR)**

La séquences des amorces de qPCR ont été déterminées avec le logiciel *Beacon Designer v.6* et ont été synthétisées chez *Integrated DNA Technologies (IDT)*. Elles ont été utilisées à une concentration finale de 0,5µM et seules les amorces ayant une efficacité supérieure à 90% ont été utilisées (tableau 2). L'ADNc a été amplifié à l'aide du réactif *2x platinum SYBR green mix* selon les recommandations du fabricant (Invitrogen) et avec le thermocycleur *Stratagene Mx3005p* en utilisant le programme cyclique suivant; un cycle de 10 minutes à 95°C, suivi de 40 cycles de 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 55°C et 45 secondes à 72°C, puis finalement un cycle de 30 secondes à 72°C. Les données d'expression relative ont été normalisées par rapport au gène *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase*. Les valeurs supérieures à 30 cycles d'amplification ont été considérées comme non-détectables (ND).

**Tableau 2. Liste des amorces de qPCR.**

Gène	Espèce	Nom des amorces	Séquence 5' – 3'
<b>C1orf106</b>	<i>H. sapiens</i>	hum-C1orf106-01-sens	CCGACAGTGGCATCATCC
		hum-C1orf106-01-anti	CCTTGCCAGCGGAGTATC
<b>C1orf106-optimisé</b>	NA	hum-C1orf106-opt-01-sens	CTACGAGAAGCCCAGAAAGAG
		hum-C1orf106-opt-01-anti	GCTTGCCTGGAAGAACTG
<b>MUC2</b>	<i>H. sapiens</i>	hum-MUC2-01-sens	GGAGTGCTGTAAGAAGTGTG
		hum-MUC2-01-anti	CATCTCGTCCGTCTCCAA
<b>HPRT</b>	<i>H. sapiens</i>	hum-HPRT1-01-sens	TGGCGTCGTGATTAGTGATG
		hum-HPRT1-01-anti	CCATCACATTGTAGCCCTCTG

### 5.2.14 Extraction et dosage des protéines totales

Les cellules ont d'abord été lavées deux fois avec du DPBS froid puis un tampon de lyse (50mM Tris-HCl pH 7,6, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 1% Triton X-100) contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases (*cOmplete<sup>TM</sup>, Mini, EDTA-free*), 5mM de fluorure de sodium (NaF) et 1mM d'orthovanadate de sodium (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) a été ajouté. Les lysats ont été agités à 4°C pendant 15 minutes puis centrifugés à 14000 xg pendant 15 minutes à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires et les protéines insolubles. Les surnageants ont été récoltés puis conservés à -80°C. Les protéines totales ont été dosées à l'aide de la trousse BCA selon les recommandations du manufacturier (ThermoFisher). Il s'agit d'une méthode colorimétrique basée sur l'oxydation du cuivre par les protéines en milieu alcalin.

### 5.2.15 Électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) et immunobuvardage de type Western

Les protéines ont été diluées dans un tampon Laemmli (Biorad) pour électrophorèse auquel a été ajouté 2,5% de β-mercaptoéthanol. Pour dénaturer les protéines, les échantillons ont été chauffés à 95°C pendant 5 minutes puis ont été séparées, à un voltage de 25mA/gel pendant environ 2 heures, sur gel d'acrylamide 10% contenant 0,4% de SDS dans un tampon 1,5M Tris·Cl à pH 8,8. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose d'une porosité de 0,2µm par électro-transfert dans un tampon 25mM Tris·Cl, 225mM glycine, 20% méthanol. La membrane a été incubée dans une solution de blocage à base de TBS (*tris buffer*

saline 100mM Tris·Cl pH 7,5, 150mM NaCl) contenant 5% de lait évaporé et 0,1% Tween-20 pendant 30 minutes. La membrane a ensuite été incubée pendant une heure à température ambiante et sous agitation constante, dans du tampon de blocage contenant l'anticorps primaire (Anti-C1orf106, Sigma #HPA027499). La membrane a subi quatre lavages consécutifs de cinq minutes dans une solution de TBS contenant 0,1% Tween-20 avant d'être incubée une heure avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP). Quatre autres lavages ont été réalisés. La membrane a ensuite été incubée 1 minute avec le substrat de la peroxydase pour révéler le marquage. La luminescence a été révélée sur des films photographiques sensibles à la lumière (*Kodak BioMax light film*). Le *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) (Anti-GAPDH, R&D Systems #MAB5718) ou la  $\beta$ -actine (Anti- $\beta$ -actin, Abcam #AB8227) ont servi de contrôle de chargement pour la normalisation des signaux spécifiques obtenus dans chaque échantillon. L'analyse de l'intensité relative a été effectuée à l'aide du logiciel d'imagerie *Image J*.

### **5.2.16 Immunofluorescence et microscopie confocale**

Les cellules ont été ensemencées sur des lamelles de verre traitées avec de la laminine (15 $\mu$ g/ml) et préalablement déposées dans le fond de plaques de 6 puits (Corning). Les cellules adhérentes sur les lamelles de verre ont été lavées trois fois avec du milieu DMEM sans rouge phénol puis fixées avec une solution de paraformaldéhyde 2% pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées à trois reprises avec du PBS pH 7,2 (Gibco) puis perméabilisées avec une solution de PBS pH 7,2 contenant 0,1% de Triton X-100 et 2% de NDS, pendant 30 minutes à température ambiante. Les lamelles ont ensuite été incubées 18 heures à 4°C en présence des anticorps primaires (Anti-C1orf106 (Sigma #HPA027499), Anti-ZO-1 (Invitrogen #339100), Anti-E-cadhérine (Santa Cruz #sc-21797)) dans une solution de PBS pH 7,2 contenant 0,05% de Triton X-100 et 0,5% de NDS. Les lamelles ont subi trois lavages dans du PBS pH 7,2 puis ont été incubées une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à un Alexa Fluor® et dilué dans une solution de PBS 1X pH 7,2 contenant 0,05% de Triton X-100, 0,5% de NDS et 1 $\mu$ g/ml de DAPI afin de marquer les noyaux. Les lamelles ont finalement été lavées trois fois dans du PBS pH 7,2 puis déposées sur des lames de microscopie sur lesquelles 30 $\mu$ l d'une solution de

DABCO 0,4% dilué dans du glycérol a été déposée. La lecture des lames a été faite par microscopie confocale à fluorescence (LSM 510 Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) et le traitement des images à l'aide du logiciel ZEN 2012 (Carl Zeiss, *bleu edition*).

### **5.2.17 Mesure de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER)**

Les cellules Caco-2 ont été utilisées pour l'analyse de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER).  $5,5 \times 10^4$  cellules ont étéensemencées sur une membrane de polytétrafluoroéthylène traitée avec du collagène (*Transwell*<sup>®</sup>). Le milieu de culture des cellules a été changé à tous les deux jours. La mesure de la TEER a été prise à l'aide de l'appareil *Millicell ERS-2 Voltohmmeter* (Millipore). Comme la TEER dépend de la surface de croissance des cellules, la valeur de résistance ( $\Omega$ ) obtenue a été multipliée par la surface de croissance ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ).

## 6. Résultats

### 6.1 Définir les domaines et éléments fonctionnels de C1orf106

C1orf106 possède deux isoformes principaux. L'isoforme 1 est le transcrit le plus long et produit une protéine de 72 kilodaltons (kDa) alors que l'isoforme 2, produit une protéine plus courte de 86 a.a. (1 – 86) et d'un poids moléculaire de 56 kDa (ensembl.org). L'analyse sommaire de la séquence peptidique de C1orf106 effectuée à l'aide d'outils bio-informatiques et de bases de données (pfam, phosphoSitePlus et InterPro Scan, décembre 2015) n'a dévoilée aucun domaine ou motif caractéristique d'une famille protéique connue. C1orf106 contient toutefois un *domain of unknown function 3338* (86-216) et un domaine riche en proline (pro-riche) (282-357) qui porte la tyrosine affectée par la variante génétique Y333F. En utilisant l'outil *phosphoSitePlus*, une base de données qui contient des résultats d'immunoprécipitation des phospho-tyr couplée à la spectrométrie de masse, nous avons déterminé que trois tyrosines sont possiblement utilisées par des kinases. La tyr<sup>333</sup> qui est substituée par une phénylalanine dans la variante génétique rare Y333F fait partie de ces trois sites de phosphorylation potentiels (figure 4).



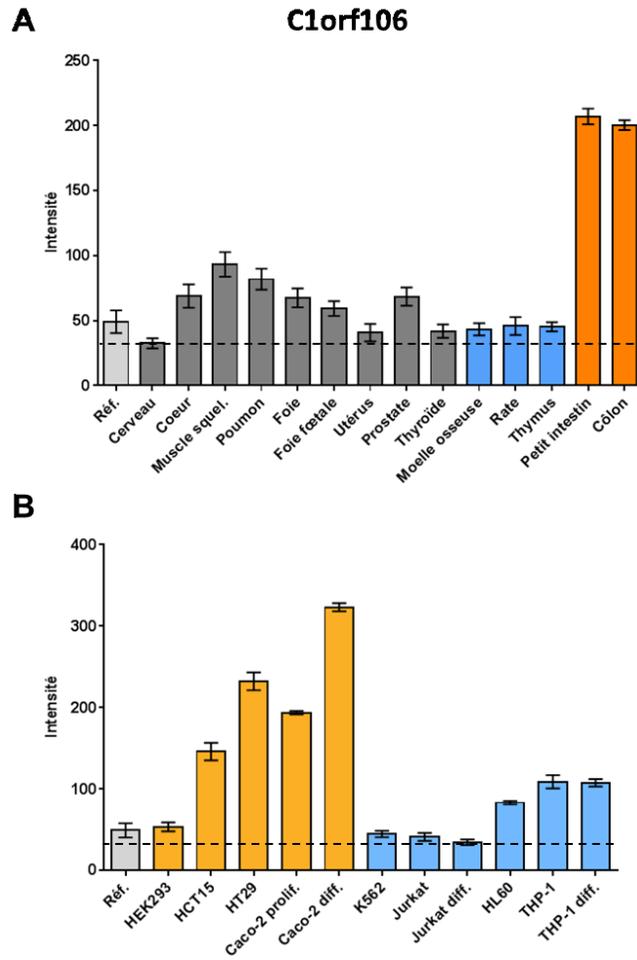
**Figure 4. Motifs et domaines protéiques de C1orf106 (isoforme 1).**

Représentation schématique des domaines et motifs protéiques de C1orf106 obtenus à l'aide de bases de données bio-informatiques publiques. Les tyrosines prédites comme étant phosphorylées avec plus de cinq références (phosphosite.org) sont indiquées en rouge.

## 6.2 Déterminer le profil d'expression tissulaire et cellulaire de *C1orf106*

Afin d'établir le profil d'expression de *C1orf106* dans différents tissus et lignées cellulaires immortalisées humaines et pertinentes pour l'étude des MII, nous avons opté pour une approche utilisant des micropuces à ADNc. Les micropuces utilisées ont été développées spécifiquement pour notre usage et comprennent des sondes pour chacun des exons de tous les gènes candidats des MII, de la maladie cœliaque, du lupus érythémateux et de la sclérose en plaque. Elles ont permis l'analyse simultanée de l'expression génique de 2982 gènes dont la plupart sont impliqués dans des pathologies auto-immunes et inflammatoires. Ils incluent aussi des gènes *housekeeping* (~40), des marqueurs de la différenciation des lignées cellulaires qui ont été utilisées (~150) et des gènes associés aux maladies cardiovasculaires (~150).

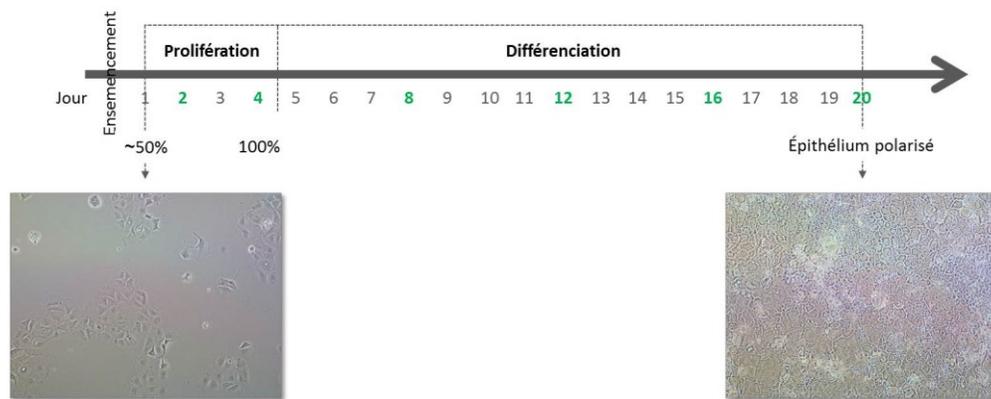
Le profil d'expression obtenu pour *C1orf106* démontre que son expression est principalement retrouvée dans l'intestin grêle et le côlon alors qu'il est presque absent dans les tissus immunitaires (figure 5A). Conséquemment, les niveaux d'expression dans les lignées cellulaires immunitaires sont faibles et limités aux cellules promyélocyaires HL-60 et monocytaires THP-1. De plus, l'expression de *C1orf106* n'a pas été modulée suite à l'induction du programme de différenciation des cellules THP-1 en monocytes induit par le PMA et le TNF- $\alpha$  (figure 5B). Il en est tout autrement pour les lignées épithéliales coloniques, HCT15, HT29 et Caco-2, dans lesquelles *C1orf106* est fortement exprimé. De plus, son expression augmente de 40% suite à la différenciation des cellules Caco-2 en épithélium intestinal polarisé (figure 5B), suggérant un rôle potentiel de *C1orf106* au niveau de l'épithélium intestinal.



**Figure 5. Profil d'expression de *Clorf106* obtenu par micropuce d'expression.**

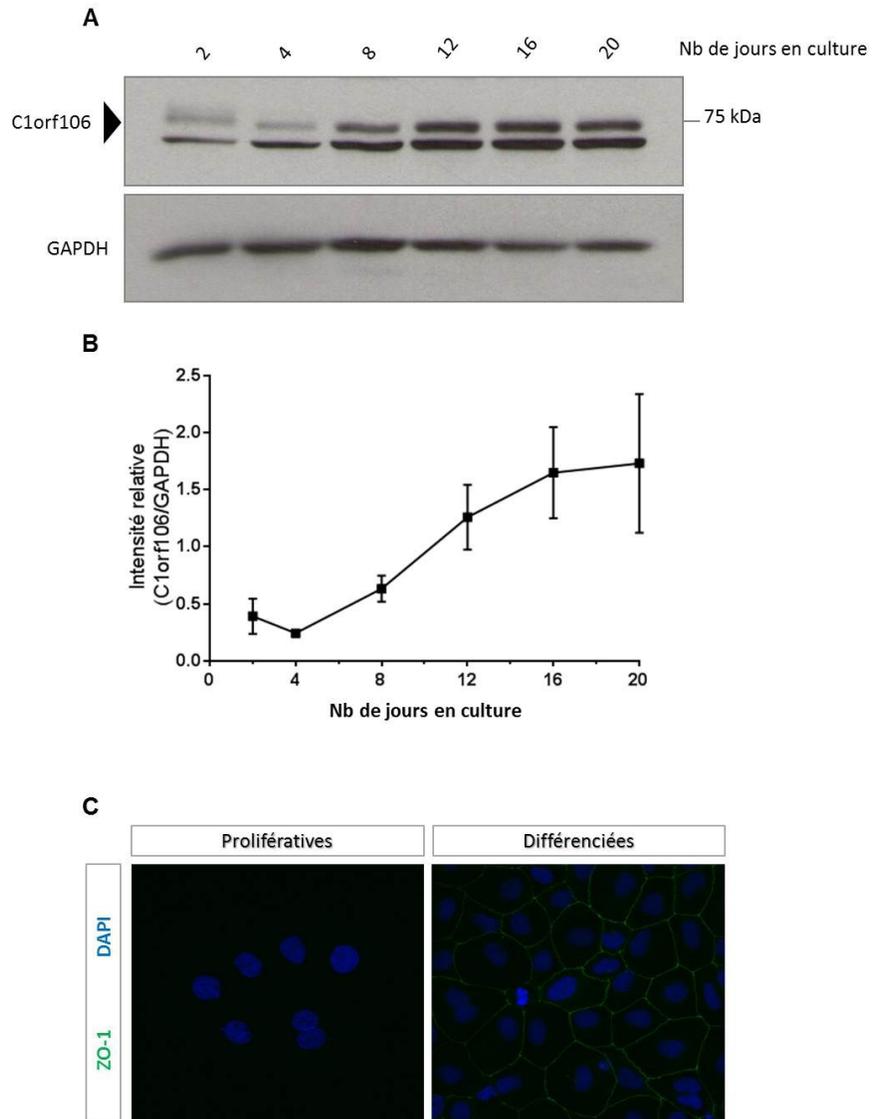
Profil d'expression de *Clorf106* obtenu à partir des ARN totaux isolés (A) de tissus humains adultes et en (B) de lignées cellulaires humaines immortalisées. Les cellules Caco-2 ont été différenciées en épithélium intestinal après 21 jours en culture. Les cellules Jurkat ont été activées suite à une stimulation de 6 heures avec du PMA (40ng/ml) et de l'ionomycine (1µg/ml) (Jurkat diff.). Les cellules THP-1 ont été différenciées en macrophages suite à une stimulation de 24 heures avec de l'IFN-γ (400U/ml) et du TNF-α (10ng/ml) (THP-1 diff.). Les données d'intensité sont exprimées en moyenne géométrique de 3 expériences indépendantes. Chacune d'elle représente la moyenne géométrique d'intensité des sondes pour chaque gène (une sonde par exon) suivie d'une normalisation médiane de tous les gènes sur la micropuce d'expression. Les barres d'erreur représentent l'écart-type géométrique et la ligne pointillée représente une mesure arbitraire pour refléter le bruit de fond fixé à 32. La référence (gris pâle) est composée d'un mélange d'ARN, à parts égales, de 10 tissus humains différents.

Les cellules Caco-2 sont, depuis longtemps, utilisées pour étudier la fonction de barrière épithéliale de l'intestin. Elles possèdent des caractéristiques morphologiques et expriment des marqueurs spécifiques des entérocytes matures polarisés. Elles se différencient entièrement après 16 à 21 jours en culture confluente (figure 6). De façon à établir le profil d'expression de C1orf106 au cours de la différenciation des cellules Caco-2 en épithélium polarisé, elles ont été ensemencées à une confluence de 50% puis laissées différenciées 16 jours suivant une confluence de 100%. Les protéines ont été prélevées à tous les quatre jours et l'expression de C1orf106 a été quantifiée suite à sa détection par immunobuvardage de type Western.



**Figure 6. Schéma expérimental de la différenciation des cellules Caco-2 en épithélium intestinal polarisé.**

Les résultats indiquent que l'expression maximale de C1orf106 est atteinte après 20 jours en culture et coïncide avec la différenciation complète des cellules Caco-2 (figure 7A), telle que l'indique le marquage de ZO-1, une protéine présente dans les jonctions serrées et qui confirme la formation terminale d'un épithélium polarisé (figure 7C). Le poids moléculaire attendu pour la protéine C1orf106 est de 72,9kDa. Le patron de bandes obtenu par immunobuvardage de type Western présente deux bandes spécifiques, possiblement issues de modifications post-traductionnelles, à proximité du poids moléculaire de 75 kDa. Les quantifications indépendantes pour chacune des bandes, normalisées sur GAPDH, ont démontré un profil d'expression similaire et indiquent que l'induction de C1orf106 obtenue dans les cellules Caco-2 différenciées par rapport au niveau de base exprimé par les cellules prolifératives (T=2) est d'environ 5 fois (figure 7B).

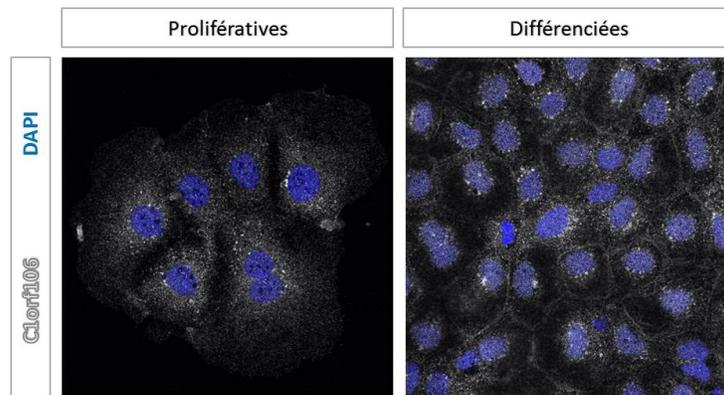


**Figure 7. Expression de C1orf106 pendant le processus de différenciation des cellules Caco-2 en épithélium intestinal polarisé.**

Profil d'expression de C1orf106 durant la différenciation des cellules Caco-2. (A) Détection de C1orf106 (Anti-C1orf106, 0,2 $\mu$ g/ml) par immunobuvardage de type Western. L'anticorps Anti-GAPDH (0,05 $\mu$ g/ml) a été utilisé comme contrôle interne de chargement (B) Intensité relative de C1orf106 (quantification de la bande supérieure) normalisée par rapport à la protéine GAPDH (ratio C1orf106/GAPDH). Chaque point représente la moyenne d'intensité relative de deux expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent l'erreur standard. (C) Localisation de ZO-1 détectée par immunofluorescence (vert; Anti-ZO-1, 10 $\mu$ g/ml) dans les cellules Caco-2 prolifératives et différenciées. Les noyaux sont marqués à l'aide du DAPI (bleu). Grossissement = 40X.

### 6.3 Déterminer la localisation subcellulaire de C1orf106

Nous avons procédé à la détection de la protéine endogène de C1orf106 par immunofluorescence dans les cellules Caco-2 prolifératives ou différenciées en épithélium intestinal. Les résultats démontrent que, malgré le faible niveau détecté, la localisation de C1orf106 dans les cellules en prolifération présente un patron d'expression homogène cytoplasmique. Dans les cellules différenciées, C1orf106 est relocalisée du cytoplasme à proximité de la membrane cytoplasmique (figure 8).

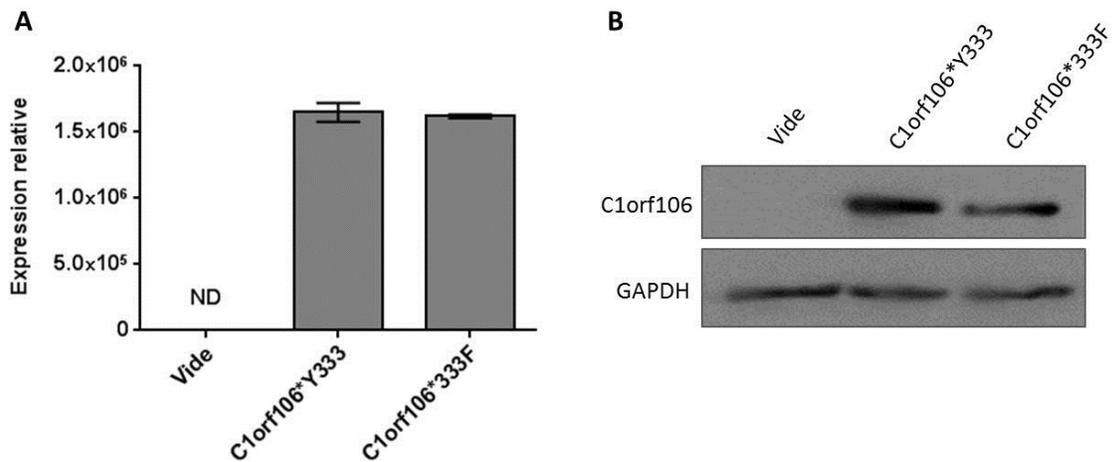


**Figure 8. Localisation de C1orf106 dans les cellules Caco-2 prolifératives et différenciées en épithélium intestinal.**

Détection par immunofluorescence de C1orf106 (blanc; Anti-C1orf106, 0,2 $\mu$ g/ml) dans les cellules Caco-2 prolifératives (image de gauche) et dans les Caco-2 différenciées (image de droite). Les noyaux ont été marqués à l'aide du DAPI (bleu). Grossissement = 40X.

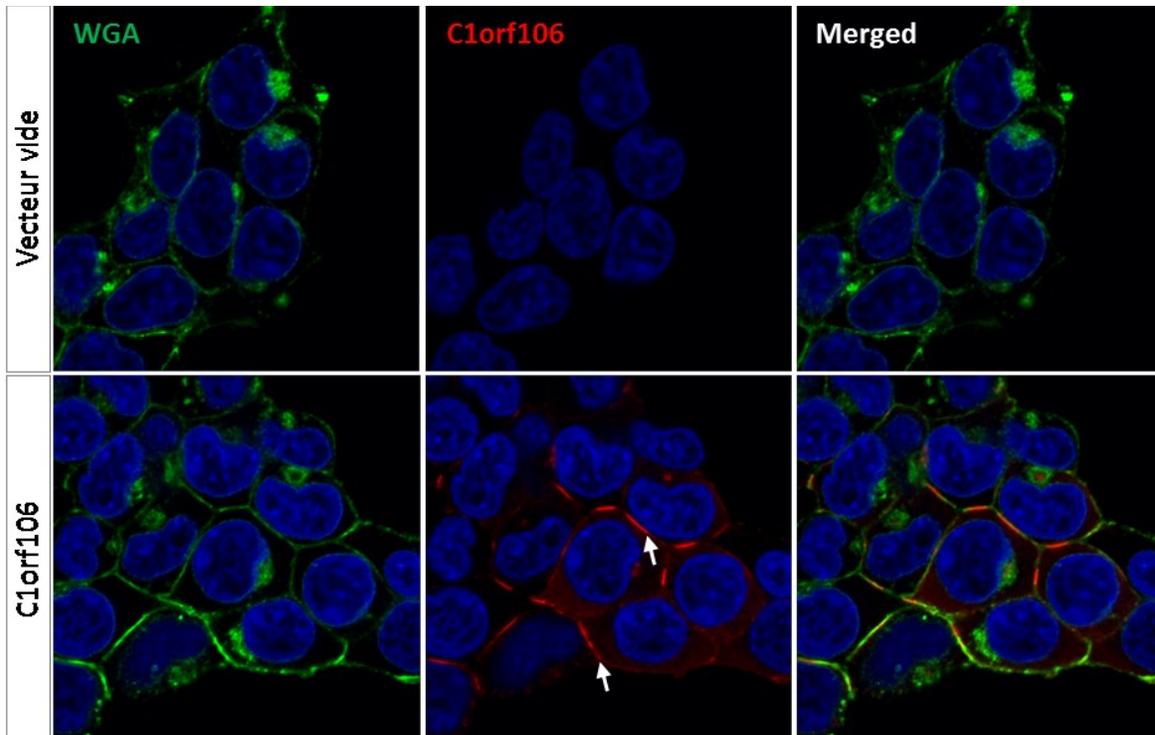
Le faible niveau d'expression de la protéine C1orf106 endogène observé dans les cellules Caco-2 rend difficile l'étude de sa co-localisation avec des marqueurs protéiques de différentes structures cellulaires qui pourraient permettre d'orienter l'identification d'une fonction pour C1orf106. Afin d'augmenter le signal obtenu en immunofluorescence, nous avons produit la surexpression stable, par transduction lentivirale, de l'une ou l'autre des allèles de C1orf106 dans les cellules HEK293T. Dans ce modèle, le niveau d'expression des ARNm (figure 9A) et des protéines (figure 9B) obtenu confirme la surexpression de C1orf106 et nous permet de procéder à l'analyse de sa co-localisation. L'agglutinine *wheat germ*

*agglutinin* (WGA) a été utilisée pour marquer les membranes cellulaires. Nous avons observé que C1orf106 est localisée à proximité de la membrane cytoplasmique uniquement dans les régions où les cellules sont juxtaposées (figure 10). Sa localisation dans ces régions rappelle celle des protéines des jonctions intercellulaires nécessaires à la formation des épithéliums, ce qui indique que C1orf106 pourrait être impliquée dans les jonctions intercellulaires (schématisées à la figure 2).



**Figure 9. Surexpression stable de C1orf106 produite par transduction lentivirale dans les cellules HEK293T.**

Surexpression stable des deux allèles de C1orf106 dans les cellules HEK293T démontrée (A) par qPCR. Les barres représentent la moyenne de l'expression relative d'un duplicata biologique exprimée en unités arbitraires (dRn) et les barres d'erreur représentent l'erreur standard. (B) Détection de la surexpression de C1orf106 par immunobuvardage de type Western. L'anticorps Anti-GAPDH (0.05µg/ml) a été utilisé comme contrôle interne de chargement. **ND** signifie Non-DéTECTable

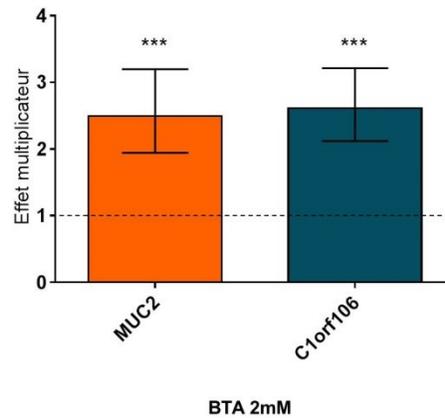


**Figure 10. Détection de la localisation de C1orf106 par immunofluorescence dans les cellules HEK293T surexprimant de façon stable C1orf106.**

Marquage de C1orf106 (rouge; Anti-C1orf106, 1 $\mu$ g/ml) avec les membranes cellulaires à l'aide de l'agglutinine WGA (vert). Les noyaux ont été marqués avec le DAPI (bleu). Les flèches blanches montrent les régions intercellulaires dans lesquelles C1orf106 est localisée au niveau de la membrane cytoplasmique. Grossissement = 63X.

Les cellules HEK293T n'expriment que très faiblement les protéines ZO-1 et E-cadhérine qui servent de marqueurs des jonctions serrées et adhérentes, respectivement (données non-montrées). Elles ne représentent donc pas un modèle pertinent pour étudier la co-localisation de C1orf106 dans les jonctions intercellulaires. Contrairement à ces dernières, les cellules épithéliales coloniques LS174T expriment plus fortement ZO-1 et E-cadhérine. Ces dernières sont issues d'un cancer colorectal et possèdent plusieurs caractéristiques des cellules caliciformes (*Goblet-like*). Elles se caractérisent principalement par leur capacité à produire une grande quantité de mucines (MUC2) suite à une stimulation avec du butyrate, un métabolite produit par les bactéries de la flore intestinale. Le butyrate favoriserait aussi l'assemblage des jonctions serrées [23]. Tout comme les cellules Caco-2, il s'agit d'un modèle

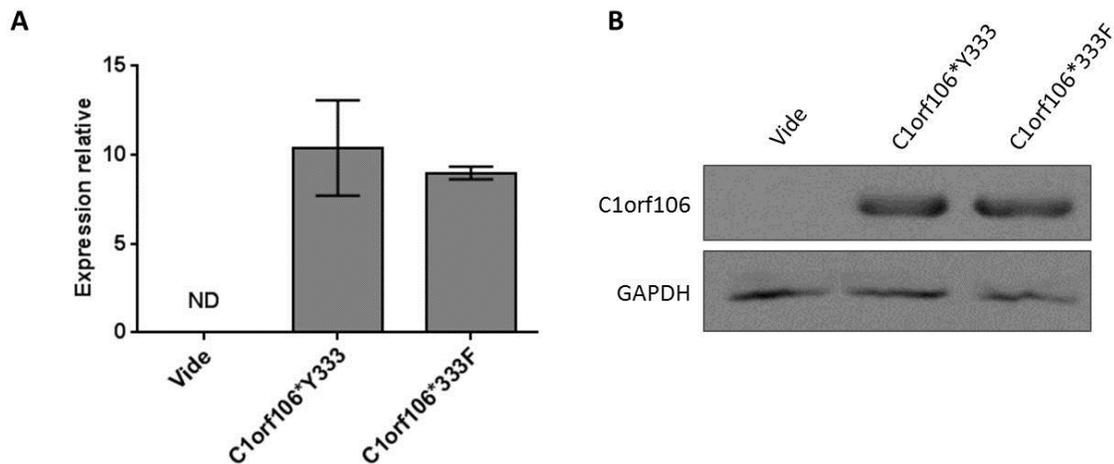
de différenciation dans lequel on observe une augmentation de l'expression endogène de *C1orf106* de 2,6 fois suite à leur différenciation induite par l'acide butyrique (2mM) (figure 11). Le gène *MUC2* sert de marqueur de la différenciation en cellules *Goblet-like* et son expression est augmentée de 2,5 fois (figure 11). Nous avons donc procédé à la surexpression stable des deux allèles de *C1orf106* dans les cellules LS174T.



**Figure 11. Effet de l'acide butyrique (BTA) sur l'expression des ARNm de *MUC2* et de *C1orf106* endogène dans les cellules LS174T.**

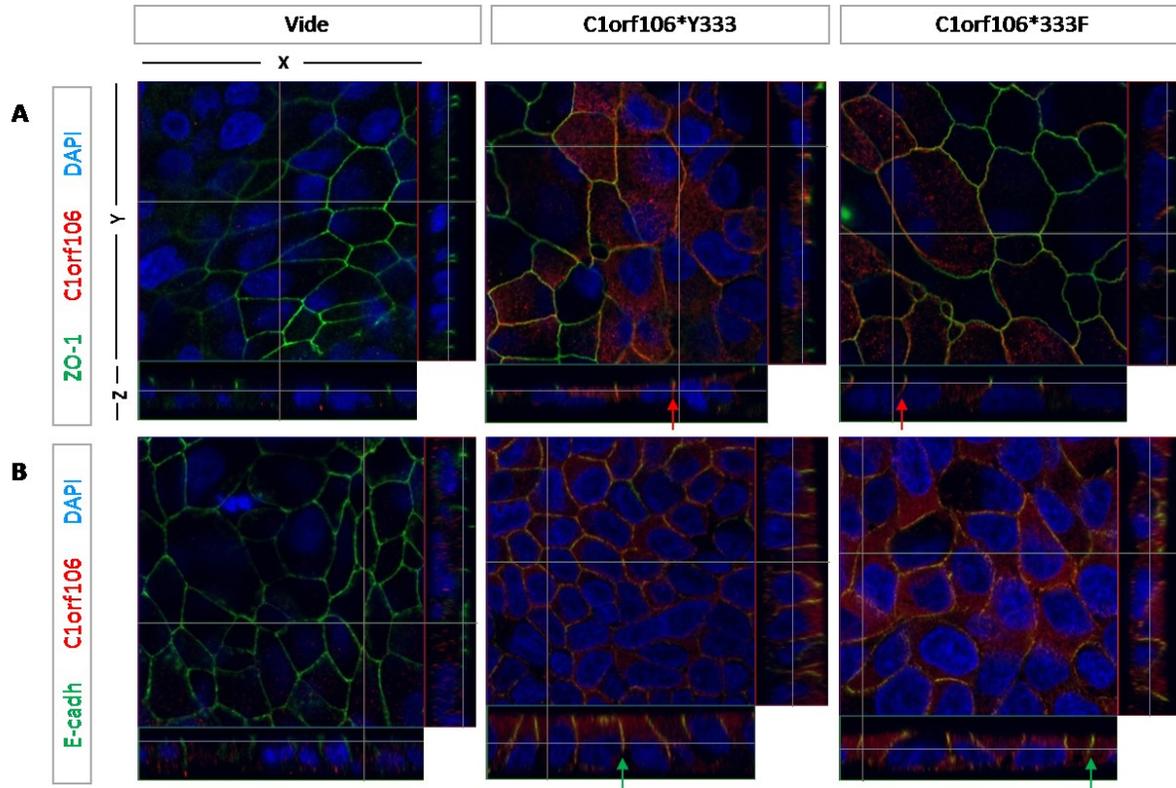
Expression relative des ARNm de *MUC2* et de *C1orf106* démontrée par qPCR, suite à un traitement de 24 heures avec de l'acide butyrique 2 mM. Les résultats d'expression ont été rapportés sur l'effet nul des cellules LS174T non-traitées, représenté par la ligne pointillée située à 1. n=2 \*\*\*  $p \leq 0.005$  (test de T non-pairé).

Dans les cellules LS174T, le niveau d'expression des ARNm (figure 12A) et des protéines (figure 12B) obtenu confirme la surexpression des deux allèles de C1orf106. La co-localisation de C1orf106\*Y333 et C1orf106\*333F par immunofluorescence démontre que les deux protéines ont des profils membranaires identiques et que toutes deux co-localisent partiellement avec le marqueur des jonctions serrées ZO-1 (figure 13A en Z, flèches rouges), situé de côté apical de la jonction intercellulaire. On note toutefois que le marquage obtenu pour C1orf106 est plus étendu et couvre toute la jonction intercellulaire latérale (figure 13B en Z, flèches verts). Sa co-localisation avec le marqueur des jonctions adhérentes, E-cadhérine, y est complète.



**Figure 12. Surexpression stable de C1orf106 produite par transduction lentivirale dans les cellules épithéliales coloniques LS174T.**

Surexpression stable des deux allèles de *C1orf106* dans les cellules LS174T démontrée (A) par qPCR. Les barres représentent la moyenne de l'expression relative d'un duplicata biologique exprimée en unités arbitraires et les barres d'erreur représentent l'erreur standard. (B) Détection de la surexpression de C1orf106 par immunobuvardage de type Western. L'anticorps Anti-GAPDH (0,05µg/ml) a été utilisé comme contrôle interne de chargement. ND signifie Non-DéTECTable.



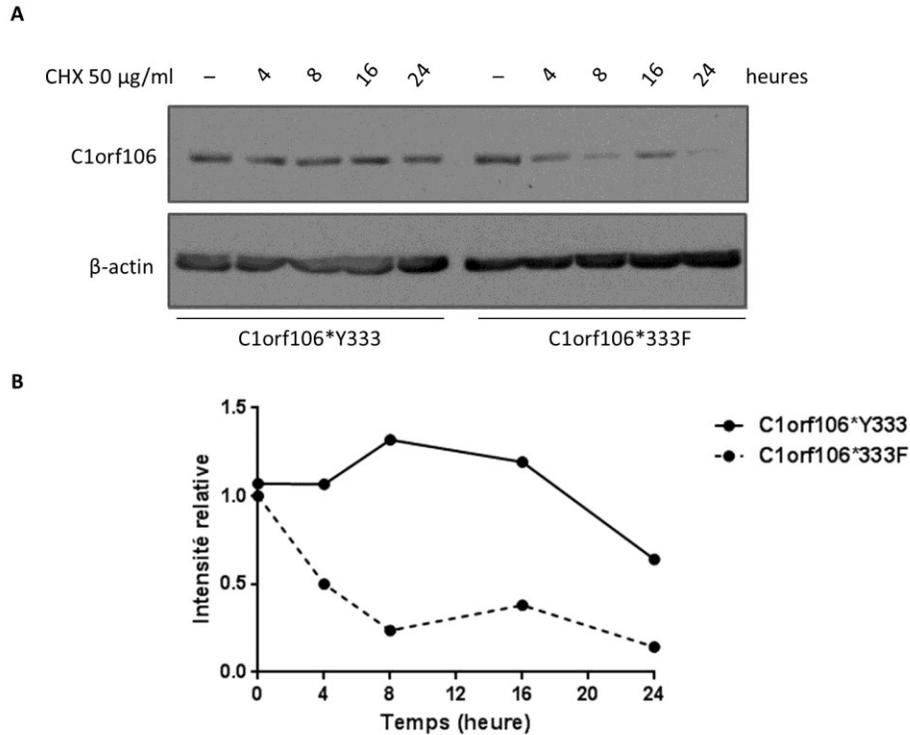
**Figure 13. Co-localisation de C1orf106 avec les marqueurs des jonctions intercellulaires, ZO-1 et E-cadhérine, par immunofluorescence dans les cellules stables LS174T surexprimant les deux allèles de C1orf106.**

Détection par immunofluorescence de C1orf106 (rouge; Anti-C1orf106, 2 $\mu$ g/ml) avec (A) la protéine des jonctions serrées ZO-1 (vert; Anti-ZO-1, 10 $\mu$ g/ml) et avec (B) la protéine des jonctions adhérentes E-cadhérine (vert; Anti-E-cadhérine, 4 $\mu$ g/ml). Les noyaux ont été marqués à l'aide du DAPI (bleu). Les images (plans XZ et YZ) ont été prises en microscopie confocale à un grossissement de 63X.

## **6.4 Définir l'implication de C1orf106 sur des voies biologiques altérées dans les MIIs et vérifier l'impact de sa variante génétique rare sur ces dernières**

### **6.4.1 Analyse de la stabilité protéique de C1orf106**

Nous avons tenté d'établir la possible implication de la variante rare C1orf106\*333F sur la stabilité de C1orf106 et conséquemment, sur son niveau protéique à l'équilibre. Pour ce faire, les cellules LS174T surexprimant l'une ou l'autre des allèles de C1orf106 ont subi un traitement avec du cycloheximide (CHX), un puissant inhibiteur de la synthèse protéique [157]. Lorsque cette dernière est bloquée, la dégradation des protéines peut être mesurée. Dans un premier temps, la dose de CHX a été déterminée suite à une courbe dose-réponse produite sur les cellules LS174T surexprimant C1orf106. Une dose de 50µg/ml a été choisie parce qu'elle a provoqué une baisse significative de l'expression de C1orf106 sans causer de mort cellulaire apparente (figure suppl. 2 en annexe). Les protéines ont été extraites sur une période de 24 heures (4, 8, 16 et 24 heures) et le niveau des protéines a été quantifié par immunobuvardage de type Western. Nous avons déterminé que l'expression de C1orf106\*Y333 a été diminuée de 35% 24 heures suivant l'ajout du CHX alors que l'expression de C1orf106\*333F a diminuée de 85% (figure 14). Ce résultat suggère que la stabilité de C1orf106 est affectée par la substitution de la tyr<sup>333</sup> par une phénylalanine. L'analyse de la stabilité de C1orf106 devra être répliquée puisqu'il s'agit des résultats d'une seule expérience. Toutefois, d'autres expériences démontrent une même tendance (figure suppl. 3 en annexe).



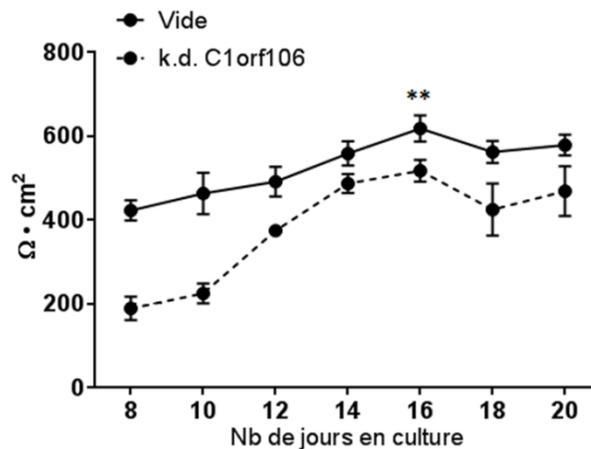
**Figure 14. Analyse de la stabilité de C1orf106\*Y333 et de C1orf106\*333F suite au traitement des cellules LS174T avec 50µg/ml de cycloheximide (CHX).**

(A) Détection du niveau d'expression en protéines de C1orf106\*Y333 et de C1orf106\*333F (anti-C1orf106, 0,2µg/ml) 4, 8 16, 24 heures suivant le traitement des cellules LS174T avec 50 µg/ml de CHX, démontré par immunobuvardage de type Western. L'anticorps anti-β-actine (0,33µg/ml) a été utilisé comme contrôle interne de chargement (B) Intensité relative de C1orf106\*Y333 et de C1orf106\*333F normalisée sur la β-actine (ratio C1orf106/β-actine).

#### 6.4.2 Effet de C1orf106 sur la perméabilité épithéliale

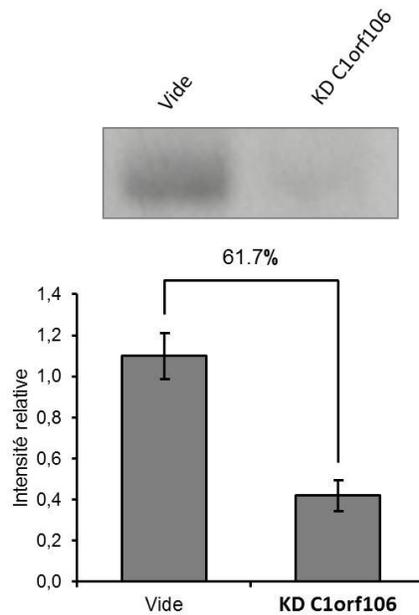
Les jonctions serrées et adhérentes sont en partie responsables du maintien de la perméabilité de l'épithélium intestinal. Étant donnée la localisation de C1orf106 dans ces régions ainsi qu'une diminution de la stabilité induite par la variante génétique rare 333F, nous avons évalué l'impact de C1orf106 sur la perméabilité des cellules Caco-2. L'analyse de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) est utilisée pour mesurer la perméabilité d'un l'épithélium polarisé et par le fait même, l'intégrité de la barrière épithéliale. Le modèle Caco-2 est l'un des modèles les plus couramment utilisés pour ce type d'analyse. Dans les cellules Caco-2 différenciées, la TEER atteint généralement un plateau après 15 jours en culture [158]. Nous

avons utilisé deux lignées cellulaires différentes; une lignée cellulaire Caco-2 sous-exprimant C1orf106 (KD de C1orf106) et dans laquelle l'expression de la protéine endogène est diminuée de 62% ainsi qu'une lignée cellulaire contrôle vide. Elles ont été produites par l'expression stable d'un *shRNA* spécifique de C1orf106 (figure 16). Nous avons choisi cette approche plutôt que de tester l'effet direct du variant rare 333F puisque les cellules Caco-2 expriment un niveau détectable de la protéine endogène qui risquerait d'amoinrir son effet sur la TEER. Il s'agit également d'un modèle pertinent compte tenu de l'effet du variant sur la stabilité de C1orf106. La mesure de la TEER effectuée sur les cellules Caco-2 contrôles et KD de C1orf106 atteint une valeur plateau autour du 16<sup>ième</sup> jour en culture. La TEER de l'épithélium formé par les cellules contrôles atteint une valeur moyenne maximale de 617.9  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  alors que celle des cellules Caco-2 KD de C1orf106 atteint une valeur plus faible égale à 517.2  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , qui représente une diminution significative de 16% ( $p=0,0041$ ) (figure 15). Nos résultats semblent indiquer qu'un abaissement de 62% de l'expression endogène de C1orf106 dans les cellules Caco-2 prolifératives est suffisant pour observer un impact sur la perméabilité trans-épithéliale.



**Figure 15. Analyse de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) dans le modèle cellulaire Caco-2 sous-exprimant C1orf106.**

(A) Étude de la résistance électrique trans-épithéliale des cellules Caco-2 KD de C1orf106 lors de la différenciation en épithélium intestinal. Chaque point de la courbe représente la moyenne expérimentale de cinq mesures indépendantes et les barres d'erreur représentent l'erreur standard.  $n=5$   
 \*\*  $p \leq 0.005$  (test de T non-pairé).



**Figure 16. Sous-expression stable de C1orf106 produite par transduction lentivirale dans les cellules Caco-2 prolifératives (T=2).**

Sous-expression stable de C1orf106 dans les cellules Caco-2 démontrée par immunobuvardage de type Western. Le rouge ponceau a été utilisé pour normaliser l'expression de C1orf106. Les barres représentent la moyenne de l'intensité relative d'un duplicata expérimental et les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

## 7. Discussion et conclusion

Les MIIs sont des maladies inflammatoires chroniques qui impliquent à la fois les cellules de l'intestin et les cellules du système immunitaire. Les GWAS ont permis d'identifier un total de 201 régions de susceptibilité aux MIIs [144]. Ces dernières contiennent de un à plusieurs dizaines de gènes pour lesquels la grande majorité sont encore peu étudiés [143]. L'annotation fonctionnelle des gènes candidats associés à la CU a permis de les regrouper par voies biologiques. On observe ainsi un enrichissement des gènes impliqués dans la production des cytokines, dans l'activation des lymphocytes (B, T et cellules *Natural killer*), dans la réponse immunitaire médiée par des molécules d'origine microbienne, dans le stress du réticulum endoplasmique ainsi que dans la fonction de barrière épithéliale [81]. Jusqu'à présent, au plus de deux douzaines de gènes ont clairement été associés à l'étiologie des MIIs et ils possèdent une fonction dans l'une ou l'autre de ces voies biologiques. Ces gènes, que l'on peut qualifier de causals, possèdent tous une ou plusieurs variantes génétiques qui altèrent soit leur expression, soit leur fonction biologique [159]. Toutefois, la vaste majorité des gènes se trouvant dans les régions de susceptibilité aux MIIs sont encore peu connus. La région de susceptibilité 1q32 fait partie de ses régions. Des 4 gènes de cette région, seul *C1orf106* possède une variante génétique rare associée [156].

En 2012, l'étude par séquençage des régions de susceptibilité associées aux MIIs a permis d'identifier une variante génétique rare (MAF<1%) dans *C1orf106*, soit Y333F (p=0,009) [156]. Cette dernière mène à la substitution de la tyr<sup>333</sup> par une phénylalanine. La base de données *PhosphoSitePlus*, qui regroupe des expériences d'immunoprécipitation des phosphotyrosines couplée à la spectrométrie de masse, a permis d'identifier plus de 260 000 sites de phosphorylation uniques sur environ 20 000 protéines humaines, murines et d'autres espèces (*phosphosite.org*; 2015/12/11). 13 expériences indépendantes colligées dans cette ressource montrent que la tyr<sup>333</sup> de la protéine *C1orf106* est phosphorylée (figure 4) dans les lignées cellulaires de cancers gastriques MKN-45 et NUGC-3. De tous les sites de phosphorylation identifiés dans *C1orf106*, la tyr<sup>333</sup> est celle qui possède le plus de références expérimentales. La phosphorylation des tyrosines est très répandue et a été impliquée, entre autres, dans la

régulation de la fonction des protéines. La perte d'un site de phosphorylation a donc la possibilité d'affecter la fonction biologique de C1orf106 [160].

Seuls *KIF21B* et *C1orf106* possèdent un profil d'expression compatible avec les MII (KIF21B; figure suppl. 1 en annexe, C1orf106; figure 5). *KIF21B* est exprimé dans le cerveau, où il participerait au transport des vésicules de GABA<sub>A</sub>R dans les dendrites neuronales [161, 162]. Son expression dans les tissus immunitaires (rate, thymus et moelle osseuse) ainsi que dans les lignées cellulaires immunitaires (THP-1 et THP-1 différenciées, JURKAT et HL-60) suggère un rôle dans l'immunité [154] (figure suppl. 1 en annexe). D'autres kinésines sont connues pour leurs fonctions immunitaires. C'est le cas de KIF5B qui est impliquée dans le transport des granules lytiques et de leur relâchement par les lymphocytes T<sub>C</sub> [163]. Jusqu'à présent, aucune variante codante de KIF21B n'a été associée dans les MII.

*C1orf106* est principalement exprimé dans l'intestin grêle et le côlon alors que son expression est presque absente dans les tissus immunitaires (figure 5A). Conséquemment, on observe une expression faible dans les lignées cellulaires promyélocytaire HL60 et monocytaires THP-1. Toutefois, son expression n'est pas modulée par la différenciation des cellules THP-1 en macrophages. C'est surtout dans les lignées cellulaires épithéliales intestinales que C1orf106 s'exprime (figure 5B). Son expression en ARNm est augmentée de 40% suivant la différenciation des cellules Caco-2 en épithélium polarisé. L'expression de la protéine atteint un maximum dès que l'épithélium forme des jonctions cellulaires étanches (figure 7A et B), tel que démontré par la détection de la localisation de la protéine ZO-1 dans les jonctions serrées (figure 7C). La régulation de l'expression de C1orf106 suite à la formation d'un épithélium étanche est intéressante puisqu'une altération de la barrière épithéliale pourrait être à l'origine des MII. Des gènes candidats associés aux MII ont, par leur fonction, mis en évidence l'importance de la fonction de barrière épithéliale intestinale. Le gène *HNF4A* en est un bon exemple. Son expression est forte dans les tissus du tube GI (duodénum, intestin grêle, côlon et rectum), dans l'épithélium intestinal [81], dans les reins, le foie et le pancréas (proteintlas.org). Il a été démontré qu'il serait exprimé à la baisse dans l'intestin de patients atteints d'une MII [164]. HNF4 $\alpha$  est un facteur de transcription qui régule l'expression des protéines des jonctions serrées, telles que la claudin-7 [165]. Chez les souris ayant subi une

ablation d'*HNF4A* spécifiquement dans les CEIs, on observe une augmentation de la susceptibilité à développer une colite induite chimiquement [166].

Traditionnellement, la fonction de barrière épithéliale intestinale a été étudiée en utilisant le modèle cellulaire Caco-2. Ces cellules expriment plusieurs marqueurs communs aux entérocytes matures. Tout comme ces derniers, les cellules Caco-2 différenciées possèdent une morphologie polarisée. Elles développent une bordure en brosse, des microvillosités et des jonctions cellulaires qui leur permettent de former un épithélium étanche [167, 168]. On observe aussi, suivant leur différenciation, une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la fonction de barrière épithéliale. Pour ces raisons, les cellules Caco-2 représentent un bon modèle pour l'étude de *C1orf106* dans un contexte permettant d'évaluer son implication dans la barrière épithéliale de l'intestin. Dans ce modèle, on note une augmentation de 40% de l'expression de *C1orf106* (figure 5B) et une relocalisation de la protéine du cytoplasme vers la proximité de la membrane cytoplasmique suite à l'établissement d'un épithélium polarisé (figure 8). La relocalisation protéique est aussi observée pour les protéines des jonctions intercellulaires telles que ZO-1, E-cadhérine et  $\beta$ -caténine [169, 170]. Ces dernières sont peu exprimées ou non-déTECTABLES dans les cellules Caco-2 prolifératives et leur expression augmente pendant la différenciation. Nos résultats d'expression et de co-localisation de *C1orf106* dans les cellules Caco-2 nous indiquent qu'elle pourrait avoir une fonction dans l'établissement des structures associées à la fonction différenciée des cellules Caco-2.

En raison de la faiblesse du signal obtenu pour la protéine *C1orf106* endogène dans le modèle Caco-2, nous avons procédé à sa surexpression stable par transduction lentivirale dans les cellules HEK293T. Il s'agit d'un modèle épithélial moins pertinent pour l'étude des MIIs mais qui contrairement au modèle Caco-2, est facile à infecter et ne présente aucun niveau détectable de *C1orf106* ce qui rend possible les analyses comparatives entre *C1orf106*\*Y333 et sa variante 333F. Le co-marquage de *C1orf106* et des membranes cellulaires au WGA a démontré que *C1orf106* est majoritairement localisée à proximité de la membrane cytoplasmique et ce, dans les régions où les cellules sont jointes les unes aux autres par des jonctions intercellulaires (figure 10; flèches blanches). Ces régions contiennent des complexes

protéiques spécialisés dans l'adhérence intercellulaire nécessaire à la fonction de barrière épithéliale. La localisation de C1orf106 dans ces régions qui participent au contact cellule-cellule est une évidence de plus qui permet d'associer C1orf106 à une fonction dans la barrière épithéliale. De manière à établir sa localisation dans les jonctions intercellulaires, nous avons fait le co-marquage de C1orf106 avec ZO-1 et E-cadhérine, des marqueurs spécifiques, respectivement, des jonctions serrées et adhérentes. Leur expression est faible dans les cellules HEK293T (données non-montrées) mais détectable dans les cellules épithéliales coloniques LS174T. Les cellules LS174T acquièrent un phénotype *goblet-like* suite à un traitement avec du butyrate. Ce dernier est un acide gras à courte chaîne (AGCC) produit par les bactéries de la flore intestinale. Les AGCC agissent favorablement sur le système immunitaire tout autant que sur la fonction de barrière épithéliale. Ils accélèrent l'assemblage des protéines des jonctions serrées *via* la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate [23]. Le butyrate augmenterait aussi la fonction de barrière d'un épithélium formé par les cellules Caco-2 [171]. Il est alors intéressant de noter que l'expression endogène de C1orf106, suite à la différenciation des cellules LS174T induite par l'acide butyrique, a été augmentée de 2,6 fois (figure 11). Cette hausse est proportionnelle à celle de la protéine claudine-1 dans les CEIs de rat transformées avec le gène *cdx2* qui induit la formation d'un épithélium polarisé [172]. Dans la lignée cellulaire humaine HeLa, l'expression des protéines cinguline et occludine est aussi augmentée par le butyrate [173].

Dans le modèle LS174T, C1orf106 présente une localisation en partie apicale, et co-localise avec le marqueur des jonctions serrées, ZO-1 (figure 13A en Z, flèches rouges). Toutefois, son profil de marquage ressemble d'avantage à celui d'E-cadhérine qui couvre toute la jonction latérale intercellulaire (figure 13B en Z, flèches vertes). Dans les cellules Caco-2, ce type de profil a également été observé pour la protéine des jonctions serrées claudin-7 [165].

Ensembles, les jonctions serrées et adhérentes forment le complexe de jonction apicale et le rôle de chacune y est bien défini. Les jonctions adhérentes initient le contact et assurent l'adhésion intercellulaire puis les jonctions serrées scellent l'espace paracellulaire pour former un épithélium étanche [174]. Les protéines des jonctions serrées ZO-1/2/3 sont des protéines cytoplasmiques de structure qui relient les protéines des jonctions serrées, entre-elles, au

cytosquelette d'actine et aux molécules de signalisation [23]. Il a été proposé que les protéines ZO puissent aussi lier les jonctions adhérentes [175, 176]. L'assemblage des jonctions serrées dépend avant tout de la formation des jonctions adhérentes puisqu'en leur absence, l'assemblage des protéines des jonctions serrées est retardé [175]. De plus, lorsque l'interaction entre ZO-1 et l' $\alpha$ -caténine est bloquée, une altération de la barrière épithéliale est observée subséquente à la déstabilisation des jonctions serrées [177]. Les interactions que forment les protéines du complexe de jonction apicale sont importantes dans l'assemblage des jonctions intercellulaires. Étant donnée la localisation de *C1orf106* à proximité de ces deux types de jonctions cellulaires, il serait intéressant de vérifier si elle fait partie de ces complexes. Les protéines ZO ont des domaines protéiques qui permettent leur liaison avec des partenaires dans les jonctions cellulaires et avec le cytosquelette d'actine [178]. Toutefois, l'analyse de la séquence peptidique primaire de *C1orf106* n'a révélée aucun de ces motifs qui pourraient expliquer sa localisation à proximité des jonctions intercellulaires. C'est pourquoi des expériences d'immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse pourraient permettre d'identifier ses partenaires de liaison et de confirmer son implication dans ces complexes.

Il est intéressant de noter que les ARNm de *C1orf106* sont détectés dans la lignée cellulaire THP-1 (figure 5B). Les cellules THP-1 non-stimulées (monocytes) expriment l'ARNm des protéines des jonctions serrées telles que l'occludine, la tricelluline, JAM-A, ZO-1/2 ainsi que les claudines -4, -7, -8, et -9 [179]. Les cellules THP-1 peuvent être différenciées en macrophages suite à une stimulation de 24 heures avec de l'IFN- $\gamma$  (400U/ml) et du TNF- $\alpha$  (10ng/ml). Toutefois, il n'y a aucune évidence d'une induction de l'expression des protéines des jonctions serrées dans les cellules THP-1 différenciées en macrophages. Toutefois, lorsqu'elles sont différenciées en cDs suivant une stimulation avec un mélange d'inducteurs (IL-4, GM-CSF, TNF- $\alpha$  et ionomycine), elles produisent de longues extensions cytoplasmiques et l'expression de la protéine JAM-A augmentent significativement [179].

Les leucocytes (neutrophiles) [111], les macrophages [179] et les cDs expriment des protéines de jonctions intercellulaires [179-181]. Les cellules immunitaires associées à la muqueuse intestinale doivent pouvoir traverser l'épithélium intestinal pour échantillonner le contenu

antigénique de la lumière intestinale. Pour accomplir cette tâche, elles établissent des structures qui ressemblent aux jonctions serrées (*tight junction-like structure*) avec les cellules épithéliales ce qui leur permet de faire traverser leurs dendrites dans l'espace paracellulaire sans perturber les jonctions serrées ni altérer l'étanchéité de la barrière épithéliale [179]. Dans la muqueuse intestinale, les neutrophiles expriment la protéine JAM-L qui leur permet de franchir l'épithélium intestinal. La migration trans-épithéliale des neutrophiles est un mécanisme qui a été identifié dans l'étiologie des MIIs [88, 92, 111]. Les cDs et les macrophages dérivés du sang d'individus en santé expriment aussi des protéines de jonctions serrées. *In vitro*, ils sont capables de traverser l'épithélium sans affecter l'étanchéité de barrière épithéliale [179, 181]. Étant donné que nous avons uniquement évalué l'expression de *C1orf106* dans les cellules THP-1 différenciées en macrophages, il serait intéressant de vérifier si son expression est modulée lors de la différenciation en cDs.

La co-localisation de *C1orf106* avec des marqueurs des jonctions intercellulaires, nous indique qu'elle est potentiellement impliquée dans la fonction de barrière épithéliale et conséquemment dans l'étiologie des MIIs. La détection par immunofluorescence des deux allèles de *C1orf106* surexprimées dans les cellules LS174T (figure 12) nous a permis de déterminer que la variante génétique rare 333F n'a pas d'impact sur sa localisation subcellulaire (figures 13). D'autres protéines de jonctions cellulaires présentent des polymorphismes qui affectent leur localisation. C'est le cas du polymorphisme affectant la protéine des jonctions adhérentes CDH1 et qui contribue à modifier, à la fois, sa localisation subcellulaire et son assemblage dans la membrane cytoplasmique. Le polymorphisme  $\Delta 72$  du gène *CHDI* (rs10431923) a été associé à la MC et est à l'origine d'une délétion de 72 a.a. dans la protéine E-cadhérine ( $\Delta 72$ -E-cadhérine). Ce polymorphisme empêche son assemblage dans la membrane cytoplasmique. Faute d'être assemblée,  $\Delta 72$ -E-cadhérine s'accumule dans le cytoplasme.  $\Delta 72$ -E-cadhérine déstabilise les jonctions adhérentes menant à un défaut dans la fonction de barrière épithéliale [93, 182].

La variante génétique rare de *C1orf106* affecte la tyr<sup>333</sup> qui possède un potentiel de phosphorylation (figure 4). Sa substitution par une phénylalanine pourrait donc altérer sa fonction biologique. Il est connu que les protéines des jonctions serrées et adhérentes sont

régulées à plusieurs niveaux. Leur assemblage et la stabilité des complexes qu'elles forment dans la membrane cytoplasmique sont, entre autres, régulés par le cytosquelette d'actine, par le clivage protéolytique et par la phosphorylation [183].

Notre essai de stabilité protéique a démontré que la variante génétique rare 333F de C1orf106 diminue considérablement sa stabilité et conséquemment, son niveau protéique à l'équilibre. La dégradation de C1orf106\*333F est environ 2,5 fois plus rapide que celle de C1orf106\*Y333 (figure 14 et figure suppl. 3 en annexe). Même si la stabilité protéique n'est pas toujours associée à un état de phosphorylation, la diminution du niveau en protéines peut avoir un impact sur les processus biologiques surtout si cette protéine fait partie d'un complexe dont la stœchiométrie est importante. Une diminution de l'adhésion intercellulaire est corrélée avec un changement dans la phosphorylation des protéines des jonctions serrées et adhérentes et elle dépend, entre autres, du type de stimuli et de l'environnement local [184].

Les protéines des jonctions adhérentes sont continuellement renouvelées et la balance entre l'assemblage et le désassemblage (*turnover*) des complexes est principalement régulée par la phosphorylation. Vers la fin des années 1990, plusieurs études ont déterminé le rôle de la phosphorylation dans l'assemblage des jonctions adhérentes. En procédant à l'inhibition complète des phosphatases, ces études ont démontré une perturbation des jonctions adhérentes signifiant que la phosphorylation régule négativement leur assemblage. Plus récemment, des études ont révélé que tous les sites de phosphorylation sur les tyrosines ne sont pas égaux et que certains agissent tels des interrupteurs sur la fonction des protéines des jonctions adhérentes [185, 186]. C'est le cas pour la phosphorylation, par la kinase Src, de la tyr<sup>753</sup> et de la tyr<sup>755</sup> d'E-cadhérine qui crée un site de liaison pour la ligase E3 Hakai [185, 187]. La liaison de cette dernière entraîne l'ubiquitination d'E-cadhérine, sa dégradation puis une altération des jonctions adhérentes [185, 187]. À l'opposé, la phosphorylation de la tyr<sup>148</sup> de l' $\alpha$ -caténine augmente son affinité pour la  $\beta$ -caténine [188, 189]. La liaison de l' $\alpha$ -caténine à la  $\beta$ -caténine (stœchiométrie 1:1) contribue à la liaison de la F-actine aux jonctions adhérentes, un processus qui est nécessaire à l'adhérence intercellulaire [190, 191]. Globalement, le *turnover* des protéines des jonctions adhérentes est finement régulé par la phosphorylation spécifique de certaines tyrosines [185, 192].

L'assemblage des protéines des jonctions serrées est aussi régulé *via* la phosphorylation. À l'équilibre, l'occludine est phosphorylée par la kinase c-Yes, ce qui favorise son assemblage [193]. La phosphorylation peut également mener à la déstabilisation des jonctions serrées. C'est le cas pour la phosphorylation des tyrosines de l'extrémité C-terminale de l'occludine qui réduirait son affinité pour les protéines ZO [194]. La phosphorylation est donc l'une des modifications post-traductionnelles les plus importantes qui régulent l'assemblage des complexes de jonction apicale.

Une baisse de l'expression des protéines des jonctions intercellulaires est associée à une diminution de la perméabilité de l'épithélium intestinal [195, 196]. Des études ont démontré une relation entre la perméabilité intestinale et la gravité des symptômes chez les patients atteints d'une MII [89, 197]. L'impact de la variante 333F sur C1orf106 est une baisse de sa stabilité qui contribue à abaisser son niveau d'expression en protéines à l'équilibre. Nous avons reproduit, dans les cellules Caco-2, l'effet de la variante 333F en utilisant un *shRNA* spécifique pour C1orf106. Nos résultats démontrent que le KD entraîne une baisse d'expression de 62% du niveau endogène de C1orf106 dans les cellules Caco-2 prolifératives (figure 16). En l'absence d'une lignée cellulaire présentant la variante génétique 333F à l'état homozygote, l'utilisation d'un KD de C1orf106 représente le meilleur modèle pour mimer l'effet de la variante rare sur le niveau d'expression de C1orf106.

L'épithélium intestinal est la première ligne de défense qui sépare notre système immunitaire des microorganismes de la microflore intestinale. Une augmentation de la perméabilité épithéliale peut contribuer au passage des bactéries intestinales et de leurs composantes pro-inflammatoires (ex. toxines, LPS, etc.) menant à l'activation soutenue du système immunitaire associé à la muqueuse intestinale [198]. La résistance électrique trans-épithéliale (TEER) est la mesure de la perméabilité épithéliale et peut être influencée par la porosité des jonctions serrées, par leur assemblage et par la confluence des cellules. Le profil de la TEER observé pour les cellules Caco-2 KD de C1orf106 diffère de celui des cellules contrôles malgré une quantité égale de cellules mises en culture. Durant la différenciation et la formation d'un épithélium, la TEER des cellules KD demeure significativement plus faible que celle des cellules contrôles. Toutefois, elles atteignent toutes deux un plateau après 16 jours en culture. À ce moment, la TEER des cellules KD est de 16% inférieure à celle des cellules contrôles. La

TEER évolue avec la formation des jonctions intercellulaires et se stabilise au moment où l'épithélium est entièrement formé. L'atteinte d'un plateau à 16 jours signifie qu'à ce moment, l'épithélium est entièrement formé. 16 jours correspond au temps normal que prennent les cellules Caco-2 pour former un épithélium étanche [199]. La diffusion sélective des ions et des solutés à travers l'épithélium est régulée principalement par les jonctions serrées, plus précisément par les protéines de type claudine [198]. Ces dernières possèdent deux fonctions fondamentales. Elles ont une fonction de barrière qui limite le passage des macromolécules (claudines-1, -3, -4, -5, -8, -9, -11 et -14) et une fonction de transport sélectif des ions qui dépend de la charge de ses résidus d'acides aminés dans l'espace paracellulaire (claudines-2, -7, -12 et -15) [198, 200, 201]. Quant aux jonctions adhérentes, elles n'ont pas de rôle direct dans le transport sélectif. Toutefois, un défaut d'assemblage peut mener à une augmentation de la diffusion paracellulaire.

Une baisse de 16% dans la perméabilité épithéliale peut sembler marginale. Il faut cependant tenir compte que cette baisse est la résultante de plusieurs mécanismes de compensation. D'autres structures cellulaires sont responsables du maintien de la perméabilité trans-épithéliale et pourraient effectivement compenser pour l'effet occasionné par la diminution de l'expression de C1orf106. Chez la souris, le KO pour l'occludine ne produit aucun défaut dans la fonction de barrière épithéliale. D'autres protéines des jonctions serrées comme la tricelluline fournissent une « redondance fonctionnelle » nécessaire pour maintenir une fonction de barrière intacte [175]. C'est donc une diminution effective de 16% de la perméabilité épithéliale qui a été observée dans les cellules KD de C1orf106. Cette baisse pourrait être suffisante pour mener au passage des microorganismes à travers l'épithélium intestinal.

La progression de la TEER des cellules KD de C1orf106 et de la lignée parentale n'évolue pas de la même façon. Après 8 jours en culture, la différence observée entre la TEER des deux lignées cellulaires est de plus de 50% alors qu'elle devient moins prononcée après 12 jours (figure 15). Cette différence pourrait indiquer un ralentissement dans l'assemblage des jonctions intercellulaires. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions produire une expérience de « *calcium switch* » dans les cellules Caco-2 KD et contrôles. Cet essai nous permettrait de déterminer l'effet du KD de C1orf106 sur la cinétique d'assemblage des jonctions

intercellulaires [195]. L'assemblage des jonctions serrées et adhérentes est dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  et lorsque ce dernier est limitant, les protéines des jonctions intercellulaires sont internalisées dans le cytoplasme. Lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  est réintroduit dans le milieu de culture, elles sont réassemblées au niveau de la membrane cytoplasme. L'impact du KD de C1orf106 sur ce processus pourrait être évalué ainsi. Il serait aussi pertinent de vérifier si la perméabilité accrue de l'épithélium occasionnée par le KD de C1orf106 coïncide avec une augmentation de la porosité des jonctions serrées. Des molécules de différentes tailles (le mannitol (4,2Å), l'inuline (15Å) et le dextran de différents poids moléculaires couplé à une molécule fluorescente peuvent être utilisées pour mesurer la perméabilité de l'épithélium et pour établir la grosseur des pores créés dans l'épithélium intestinal [196, 202]. Nous pourrions donc déterminer si l'augmentation de la perméabilité épithéliale occasionnée par le KD de C1orf106 pourrait permettre le passage des bactéries et de leurs composantes pro-inflammatoires à travers l'épithélium intestinal [202].

La TEER des cellules Caco-2 varient énormément en fonction de la clonalité des cellules. Les cellules Caco-2 utilisées dans notre expérience ont subi une sélection antibiotique qui a pu mener à l'enrichissement d'une sous-population cellulaire qui forme un épithélium moins étanche. Dans ces conditions, la diminution de la TEER observée dans les cellules Caco-2 KD de C1orf106 pourrait être causée par la sélection clonale. Pour limiter cet effet, d'autres populations de cellules devront être produites et cette expérience sera reprise pour confirmer l'effet de C1orf106 sur la perméabilité épithéliale. Il en demeure que nos résultats semblent lier C1orf106 à un processus biologique connu pour être altéré dans les MIIs.

Globalement, C1orf106 possède un profil d'expression compatible avec la physiopathologie des MIIs. Tout comme d'autres gènes candidats impliqués dans la fonction de barrière épithéliale, C1orf106 s'exprime dans les tissus intestinaux et dans les cellules épithéliales coloniques. De plus, il est co-localisé au niveau des jonctions intercellulaires, plus précisément à proximité des jonctions serrées et adhérentes, ce qui suggère qu'il pourrait jouer un rôle dans la fonction de barrière épithéliale. La variante C1orf106\*333F n'affecte pas sa localisation subcellulaire mais plutôt sa stabilité protéique résultant en une diminution de son abondance à l'équilibre. Lorsque modélisée par un *shRNA* spécifique de C1orf106, cette baisse du niveau protéique de C1orf106 engendre une diminution significative de la résistance électrique trans-

épithéliale. Dans son ensemble, nos résultats tendent à confirmer un rôle de C1orf106 dans un mécanisme biologique affecté dans la physiopathologie des MIIs ce qui le placerait sur la liste des gènes causals des MIIs.

## Bibliographie

1. N, M.E., *Anatomie et physiologie humaine*, ed. 3e. 2005.
2. Hollister, E.B., C. Gao, and J. Versalovic, *Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(6): p. 1449-58.
3. Evans, J.M., L.S. Morris, and J.R. Marchesi, *The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host*. *J Endocrinol*, 2013. **218**(3): p. R37-47.
4. Mittal, R.K., S.J. Hong, and V. Bhargava, *Longitudinal muscle dysfunction in achalasia esophagus and its relevance*. *J Neurogastroenterol Motil*, 2013. **19**(2): p. 126-36.
5. Beasley, D.E., et al., *The Evolution of Stomach Acidity and Its Relevance to the Human Microbiome*. *PLoS One*, 2015. **10**(7): p. e0134116.
6. Barker, N., et al., *Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro*. *Cell Stem Cell*, 2010. **6**(1): p. 25-36.
7. Ward, M.G., et al., *Prevalence and Risk Factors for Functional Vitamin B12 Deficiency in Patients with Crohn's Disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2015.
8. Barmeyer, C., J.D. Schulzke, and M. Fromm, *Claudin-related intestinal diseases*. *Semin Cell Dev Biol*, 2015.
9. Middendorp, S., et al., *Adult stem cells in the small intestine are intrinsically programmed with their location-specific function*. *Stem Cells*, 2014. **32**(5): p. 1083-91.
10. Raymond Gilles, M.A., *Physiologie animale*, ed. D.B. Supérieur. 2006.
11. Benson, A.K., et al., *Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(44): p. 18933-8.
12. Frohlich, E.E., R. Mayerhofer, and P. Holzer, *Reevaluating the hype: four bacterial metabolites under scrutiny*. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 2015. **5**(1): p. 1-13.

13. Bevins, C.L. and N.H. Salzman, *Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(5): p. 356-68.
14. O'Hara, A.M. and F. Shanahan, *The gut flora as a forgotten organ*. EMBO Rep, 2006. **7**(7): p. 688-93.
15. Pflughoeft, K.J. and J. Versalovic, *Human microbiome in health and disease*. Annu Rev Pathol, 2012. **7**: p. 99-122.
16. Becker, S., et al., *Bacteria regulate intestinal epithelial cell differentiation factors both in vitro and in vivo*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55620.
17. Brown, E.M., M. Sadarangani, and B.B. Finlay, *The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine*. Nat Immunol, 2013. **14**(7): p. 660-7.
18. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 313-23.
19. Hooper, L.V., T. Midtvedt, and J.I. Gordon, *How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 283-307.
20. Goodman, B.E., *Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans*. Adv Physiol Educ, 2010. **34**(2): p. 44-53.
21. Flint, H.J., et al., *Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut*. Gut Microbes, 2012. **3**(4): p. 289-306.
22. Wang, A., et al., *Butyrate activates the cAMP-protein kinase A-cAMP response element-binding protein signaling pathway in Caco-2 cells*. J Nutr, 2012. **142**(1): p. 1-6.
23. Peng, L., et al., *Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers*. J Nutr, 2009. **139**(9): p. 1619-25.
24. Canani, R.B., et al., *Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(12): p. 1519-28.
25. Blaser, M., *Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria*. Nature, 2011. **476**(7361): p. 393-4.

26. Ivanov, II, et al., *Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(4): p. 337-49.
27. Thorburn, A.N., L. Macia, and C.R. Mackay, *Diet, metabolites, and "western-lifestyle" inflammatory diseases*. Immunity, 2014. **40**(6): p. 833-42.
28. Deshmukh, H.S., et al., *The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to Escherichia coli K1 sepsis in neonatal mice*. Nat Med, 2014. **20**(5): p. 524-30.
29. Chistiakov, D.A., et al., *Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 781.
30. Oh, J. and J.S. Shin, *The Role of Dendritic Cells in Central Tolerance*. Immune Netw, 2015. **15**(3): p. 111-20.
31. Segain, J.P., et al., *Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease*. Gut, 2000. **47**(3): p. 397-403.
32. Thomas, C.M., et al., *Histamine derived from probiotic Lactobacillus reuteri suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31951.
33. Willing, B.P., et al., *A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes*. Gastroenterology, 2010. **139**(6): p. 1844-1854 e1.
34. Dalal, S.R. and E.B. Chang, *The microbial basis of inflammatory bowel diseases*. J Clin Invest, 2014. **124**(10): p. 4190-6.
35. Frank, D.N., et al., *Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(1): p. 179-84.
36. Wehkamp, J., et al., *NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1658-64.
37. Naser, S.A., et al., *Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(5): p. 412-24.
38. Norman, J.M., et al., *Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease*. Cell, 2015. **160**(3): p. 447-60.
39. Peterson, L.W. and D. Artis, *Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 141-53.

40. Yu, L.C., et al., *Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology*. World J Gastrointest Pathophysiol, 2012. **3**(1): p. 27-43.
41. Kurashima, Y., Y. Goto, and H. Kiyono, *Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation*. Eur J Immunol, 2013. **43**(12): p. 3108-15.
42. Mabbott, N.A., et al., *Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(4): p. 666-77.
43. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.
44. Smythies, L.E., et al., *Inflammation anergy in human intestinal macrophages is due to Smad-induced IkappaBalpha expression and NF-kappaB inactivation*. J Biol Chem, 2010. **285**(25): p. 19593-604.
45. Gerbe, F., C. Legraverend, and P. Jay, *The intestinal epithelium tuft cells: specification and function*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(17): p. 2907-17.
46. Barker, N., *Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(1): p. 19-33.
47. Birchenough, G.M., et al., *New developments in goblet cell mucus secretion and function*. Mucosal Immunol, 2015. **8**(4): p. 712-9.
48. Powell, D.W., et al., *Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria*. Annu Rev Physiol, 2011. **73**: p. 213-37.
49. Lee, J., et al., *Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(12): p. 1327-36.
50. Thomson, A.B., et al., *Small bowel review: Normal physiology, part 1*. Dig Dis Sci, 2003. **48**(8): p. 1546-64.
51. Ubelmann, F., et al., *Enterocyte loss of polarity and gut wound healing rely upon the F-actin-severing function of villin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(15): p. E1380-9.
52. Drozdowski, L.A. and A.B. Thomson, *Intestinal sugar transport*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(11): p. 1657-70.
53. Yang, Y., et al., *Dynamic Evolution of the LPS-Detoxifying Enzyme Intestinal Alkaline Phosphatase in Zebrafish and Other Vertebrates*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 314.
54. Lalles, J.P., *Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet*. Nutr Rev, 2010. **68**(6): p. 323-32.

55. Byron, A., J.D. Humphries, and M.J. Humphries, *Defining the extracellular matrix using proteomics*. Int J Exp Pathol, 2013. **94**(2): p. 75-92.
56. Walko, G., M.J. Castanon, and G. Wiche, *Molecular architecture and function of the hemidesmosome*. Cell Tissue Res, 2015. **360**(2): p. 363-78.
57. Farache, J., et al., *Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation*. Immunity, 2013. **38**(3): p. 581-95.
58. McDole, J.R., et al., *Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine*. Nature, 2012. **483**(7389): p. 345-9.
59. Longman, R.J., et al., *Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa*. Gut, 2000. **47**(6): p. 792-800.
60. Tailford, L.E., et al., *Mucin glycan foraging in the human gut microbiome*. Front Genet, 2015. **6**: p. 81.
61. Kim, Y.S. and S.B. Ho, *Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress*. Curr Gastroenterol Rep, 2010. **12**(5): p. 319-30.
62. Lawley, T.D. and A.W. Walker, *Intestinal colonization resistance*. Immunology, 2013. **138**(1): p. 1-11.
63. Hensel, K.O., et al., *Differential expression of mucosal trefoil factors and mucins in pediatric inflammatory bowel diseases*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 7343.
64. Aamann, L., E.M. Vestergaard, and H. Gronbaek, *Trefoil factors in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(12): p. 3223-30.
65. Okamoto, R. and M. Watanabe, *Role of epithelial cells in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease*. J Gastroenterol, 2015.
66. Machado, L.R. and B. Ottolini, *An evolutionary history of defensins: a role for copy number variation in maximizing host innate and adaptive immune responses*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 115.
67. Funderburg, N., et al., *Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(47): p. 18631-5.

68. Aldhous, M.C., C.L. Noble, and J. Satsangi, *Dysregulation of human beta-defensin-2 protein in inflammatory bowel disease*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6285.
69. Sato, T., et al., *Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 415-8.
70. Paul Richard Wheeler, B.Y., John W. Heath, *Histologie fonctionnelle*, D. Boeck, Editor. 2011.
71. Reimann, F., G. Tolhurst, and F.M. Gribble, *G-protein-coupled receptors in intestinal chemosensation*. Cell Metab, 2012. **15**(4): p. 421-31.
72. Sato, A., *Tuft cells*. Anat Sci Int, 2007. **82**(4): p. 187-99.
73. Martin, K., *Nutrient Metabolism: Structure, Functions, and Genes*. 2015.
74. Matter, K. and M.S. Balda, *Signalling to and from tight junctions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(3): p. 225-36.
75. Su, L., et al., *Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis*. Gastroenterology, 2009. **136**(2): p. 551-63.
76. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(6): p. C1213-28.
77. Chiba, H., et al., *Transmembrane proteins of tight junctions*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 588-600.
78. Rajasekaran, S.A., K.W. Beyenbach, and A.K. Rajasekaran, *Interactions of tight junctions with membrane channels and transporters*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 757-69.
79. Denker, B.M. and S.K. Nigam, *Molecular structure and assembly of the tight junction*. Am J Physiol, 1998. **274**(1 Pt 2): p. F1-9.
80. Mehta, S., et al., *Defects in the adherens junction complex (E-cadherin/ beta-catenin) in inflammatory bowel disease*. Cell Tissue Res, 2015. **360**(3): p. 749-60.
81. Mauro d'Amato, J.D.R., *Molecular genetics of inflammatory bowel disease*, ed. Springer. 2013. 343.
82. Tian, X., et al., *E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 567305.

83. Bronsert, P., et al., *Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer-host interface*. J Pathol, 2014. **234**(3): p. 410-22.
84. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
85. Maupin, K.A., et al., *Glycogene expression alterations associated with pancreatic cancer epithelial-mesenchymal transition in complementary model systems*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e13002.
86. Kowalczyk, A.P. and K.J. Green, *Structure, function, and regulation of desmosomes*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013. **116**: p. 95-118.
87. Sumigray, K.D. and T. Lechler, *Desmoplakin controls microvilli length but not cell adhesion or keratin organization in the intestinal epithelium*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(5): p. 792-9.
88. Sumagin, R. and C.A. Parkos, *Epithelial adhesion molecules and the regulation of intestinal homeostasis during neutrophil transepithelial migration*. Tissue Barriers, 2015. **3**(1-2): p. e969100.
89. Gerova, V.A., et al., *Increased intestinal permeability in inflammatory bowel diseases assessed by iohexol test*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(17): p. 2211-5.
90. Khounlotham, M., et al., *Compromised intestinal epithelial barrier induces adaptive immune compensation that protects from colitis*. Immunity, 2012. **37**(3): p. 563-73.
91. Consortium, U.I.G., et al., *Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region*. Nat Genet, 2009. **41**(12): p. 1330-4.
92. Fournier, B.M. and C.A. Parkos, *The role of neutrophils during intestinal inflammation*. Mucosal Immunol, 2012. **5**(4): p. 354-66.
93. Khor, B., A. Gardet, and R.J. Xavier, *Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature, 2011. **474**(7351): p. 307-17.
94. Lanier, L.L. and J.C. Sun, *Do the terms innate and adaptive immunity create conceptual barriers?* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 302-3.
95. Kubly Janis, G.R.A., Kindt Thomas J, Osborne Barbara A, Fridman Catherine, *Immunologie : avec questions de révision*, ed. 6ième.
96. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science, 2010. **327**(5963): p. 291-5.

97. Wang, P.F., et al., *Function and mechanism of toll-like receptors in cerebral ischemic tolerance: from preconditioning to treatment*. J Neuroinflammation, 2015. **12**: p. 80.
98. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
99. Blasius, A.L. and B. Beutler, *Intracellular toll-like receptors*. Immunity, 2010. **32**(3): p. 305-15.
100. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(2): p. 240-73, Table of Contents.
101. Neurath, M.F., *Cytokines in inflammatory bowel disease*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(5): p. 329-42.
102. Fujino, S., et al., *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease*. Gut, 2003. **52**(1): p. 65-70.
103. Moldoveanu, A.C., M. Diculescu, and C.F. Braticevici, *Cytokines in inflammatory bowel disease*. Rom J Intern Med, 2015. **53**(2): p. 118-27.
104. Cuervo, A.M., *Autophagy: in sickness and in health*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(2): p. 70-7.
105. Platt, N. and P. Fineran, *Measuring the phagocytic activity of cells*. Methods Cell Biol, 2015. **126**: p. 287-304.
106. Lassen, K.G., et al., *Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(21): p. 7741-6.
107. Yang, Z., J.J. Goronzy, and C.M. Weyand, *Autophagy in autoimmune disease*. J Mol Med (Berl), 2015. **93**(7): p. 707-17.
108. Salem, M., et al., *ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease*. Autophagy, 2015. **11**(4): p. 585-94.
109. Cooney, R., et al., *NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation*. Nat Med, 2010. **16**(1): p. 90-7.
110. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
111. Zen, K., et al., *Neutrophil migration across tight junctions is mediated by adhesive interactions between epithelial coxsackie and adenovirus receptor and a junctional*

- adhesion molecule-like protein on neutrophils*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(6): p. 2694-703.
112. Travis, J., *Origins. On the origin of the immune system*. Science, 2009. **324**(5927): p. 580-2.
  113. Voskoboinik, I., J.C. Whisstock, and J.A. Trapani, *Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(6): p. 388-400.
  114. Van, V.Q., et al., *Cutting edge: CD47 controls the in vivo proliferation and homeostasis of peripheral CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells that express CD103*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5204-8.
  115. Cording, S., et al., *The intestinal micro-environment imprints stromal cells to promote efficient Treg induction in gut-draining lymph nodes*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(2): p. 359-68.
  116. Belkaid, Y. and T.W. Hand, *Role of the microbiota in immunity and inflammation*. Cell, 2014. **157**(1): p. 121-41.
  117. Slack, E., et al., *Functional flexibility of intestinal IgA - broadening the fine line*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 100.
  118. Menard, S., N. Cerf-Bensussan, and M. Heyman, *Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens*. Mucosal Immunol, 2010. **3**(3): p. 247-59.
  119. McGhee, J.R. and K. Fujihashi, *Inside the mucosal immune system*. PLoS Biol, 2012. **10**(9): p. e1001397.
  120. Ramirez, C. and A. Gebert, *Vimentin-positive cells in the epithelium of rabbit ileal villi represent cup cells but not M-cells*. J Histochem Cytochem, 2003. **51**(11): p. 1533-44.
  121. Scott, C.L., et al., *CCR2(+)/CD103(-) intestinal dendritic cells develop from DC-committed precursors and induce interleukin-17 production by T cells*. Mucosal Immunol, 2015. **8**(2): p. 327-39.
  122. Panea, C., et al., *Intestinal Monocyte-Derived Macrophages Control Commensal-Specific Th17 Responses*. Cell Rep, 2015. **12**(8): p. 1314-24.
  123. Cuasnicu, P.S. and J.M. Bedford, *The effect of moderate epididymal aging on the kinetics of the acrosome reaction and fertilizing ability of hamster spermatozoa*. Biol Reprod, 1989. **40**(5): p. 1067-73.
  124. Artis, D. and H. Spits, *The biology of innate lymphoid cells*. Nature, 2015. **517**(7534): p. 293-301.

125. Wu, H.J. and E. Wu, *The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity*. Gut Microbes, 2012. **3**(1): p. 4-14.
126. Molodecky, N.A., et al., *Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review*. Gastroenterology, 2012. **142**(1): p. 46-54 e42; quiz e30.
127. Loftus, E.V., Jr., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-17.
128. Abraham, C. and J.H. Cho, *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2009. **361**(21): p. 2066-78.
129. Johnston, R.D. and R.F. Logan, *What is the peak age for onset of IBD?* Inflamm Bowel Dis, 2008. **14 Suppl 2**: p. S4-5.
130. Rosenfeld, G. and B. Bressler, *The truth about cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease*. Am J Gastroenterol, 2012. **107**(9): p. 1407-8.
131. Bernstein, C.N. and F. Shanahan, *Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases*. Gut, 2008. **57**(9): p. 1185-91.
132. Bhattacharyya, A., et al., *Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases*. Physiol Rev, 2014. **94**(2): p. 329-54.
133. Geary, R.B. and A.J. Dodgshun, *The "hygiene hypothesis" in IBD*. J Crohns Colitis, 2012. **6**(8): p. 869; author reply 870.
134. Ng, S.C., et al., *Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease*. Gut, 2013. **62**(4): p. 630-49.
135. Bellaguarda, E. and E.B. Chang, *IBD and the gut microbiota--from bench to personalized medicine*. Curr Gastroenterol Rep, 2015. **17**(4): p. 15.
136. Betteridge, J.D., et al., *Inflammatory bowel disease prevalence by age, gender, race, and geographic location in the U.S. military health care population*. Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(7): p. 1421-7.
137. Rampelli, S., et al., *Functional metagenomic profiling of intestinal microbiome in extreme ageing*. Aging (Albany NY), 2013. **5**(12): p. 902-12.
138. Saraswati, S. and R. Sitaraman, *Ageing and the human gut microbiota--from correlation to causality*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 764.

139. Moller, F.T., et al., *Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977-2011*. Am J Gastroenterol, 2015. **110**(4): p. 564-71.
140. Halme, L., et al., *Family and twin studies in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(23): p. 3668-72.
141. Halfvarson, J., et al., *Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics*. Gastroenterology, 2003. **124**(7): p. 1767-73.
142. Bush, W.S. and J.H. Moore, *Chapter 11: Genome-wide association studies*. PLoS Comput Biol, 2012. **8**(12): p. e1002822.
143. Graham, D.B. and R.J. Xavier, *From genetics of inflammatory bowel disease towards mechanistic insights*. Trends Immunol, 2013. **34**(8): p. 371-8.
144. Liu, J.Z., et al., *Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations*. Nat Genet, 2015. **47**(9): p. 979-86.
145. Jostins, L., et al., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. Nature, 2012. **491**(7422): p. 119-24.
146. Barrett, J.C., et al., *Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease*. Nat Genet, 2008. **40**(8): p. 955-62.
147. McGovern, D.P., et al., *Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci*. Nat Genet, 2010. **42**(4): p. 332-7.
148. Toulza, E., et al., *Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function*. Genome Biol, 2007. **8**(6): p. R107.
149. Catterall, W.A., *Voltage-gated calcium channels*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(8): p. a003947.
150. Yang, S.N. and P.O. Berggren, *The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology*. Endocr Rev, 2006. **27**(6): p. 621-76.
151. Catterall, W.A. and A.P. Few, *Calcium channel regulation and presynaptic plasticity*. Neuron, 2008. **59**(6): p. 882-901.
152. Stunnenberg, B.C., et al., *Cardiac arrhythmias in hypokalemic periodic paralysis: Hypokalemia as only cause?* Muscle Nerve, 2014. **50**(3): p. 327-32.

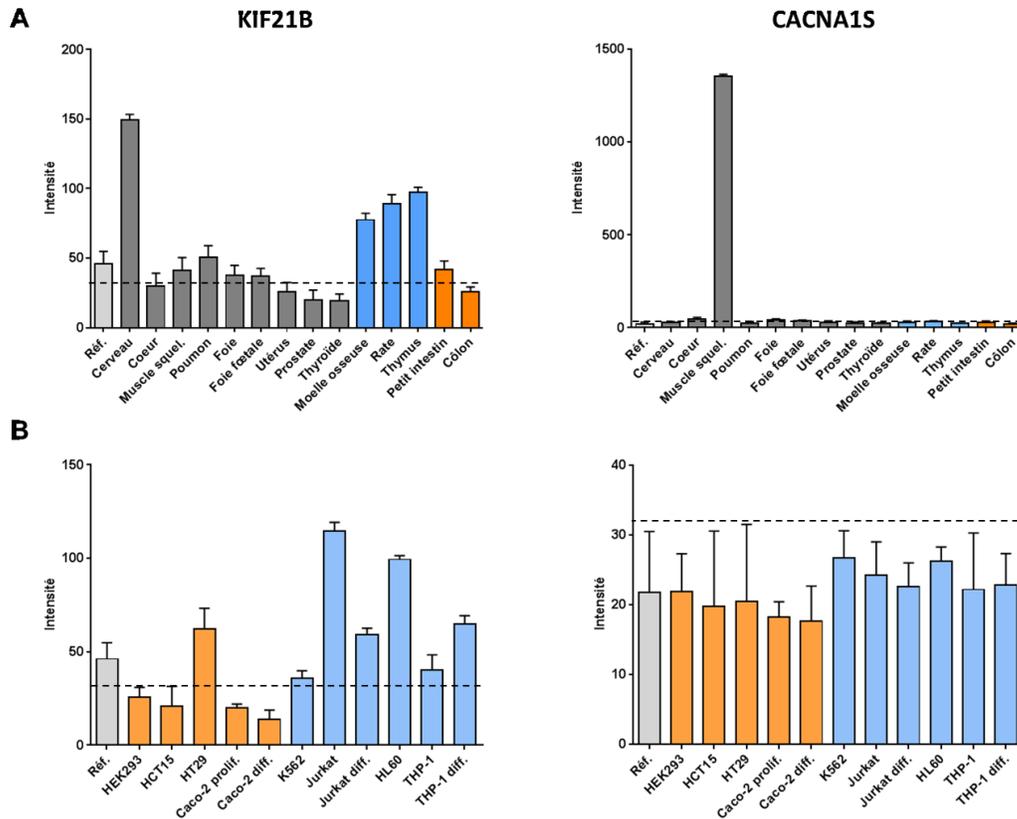
153. Ross, J.L., M.Y. Ali, and D.M. Warshaw, *Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(1): p. 41-7.
154. Kreft, K.L., et al., *Abundant kif21b is associated with accelerated progression in neurodegenerative diseases*. *Acta Neuropathol Commun*, 2014. **2**: p. 144.
155. Zhang, Y., et al., *Global analysis of chromosome 1 genes among patients with lung adenocarcinoma, squamous carcinoma, large-cell carcinoma, small-cell carcinoma, or non-cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2015. **34**(2): p. 249-64.
156. Rivas, M.A., et al., *Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease*. *Nat Genet*, 2011. **43**(11): p. 1066-73.
157. Dai, C.L., et al., *Inhibition of protein synthesis alters protein degradation through activation of protein kinase B (AKT)*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(33): p. 23875-83.
158. Sambuy, Y., et al., *The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics*. *Cell Biol Toxicol*, 2005. **21**(1): p. 1-26.
159. Budarf, M.L., et al., *GWA studies: rewriting the story of IBD*. *Trends Genet*, 2009. **25**(3): p. 137-46.
160. Nishi, H., K. Hashimoto, and A.R. Panchenko, *Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function*. *Structure*, 2011. **19**(12): p. 1807-15.
161. Labonte, D., et al., *TRIM3 regulates the motility of the kinesin motor protein KIF21B*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e75603.
162. Labonte, D., E. Thies, and M. Kneussel, *The kinesin KIF21B participates in the cell surface delivery of gamma2 subunit-containing GABAA receptors*. *Eur J Cell Biol*, 2014. **93**(8-9): p. 338-46.
163. Kurowska, M., et al., *Terminal transport of lytic granules to the immune synapse is mediated by the kinesin-1/Slp3/Rab27a complex*. *Blood*, 2012. **119**(17): p. 3879-89.
164. Ahn, S.H., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4alpha in the intestinal epithelial cells protects against inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(7): p. 908-20.
165. Farkas, A.E., et al., *HNF4alpha regulates claudin-7 protein expression during intestinal epithelial differentiation*. *Am J Pathol*, 2015. **185**(8): p. 2206-18.

166. Coskun, M., *Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease*. Front Med (Lausanne), 2014. **1**: p. 24.
167. Mariadason, J.M., et al., *A gene expression profile that defines colon cell maturation in vitro*. Cancer Res, 2002. **62**(16): p. 4791-804.
168. Tremblay, E., et al., *Gene expression profiles of normal proliferating and differentiating human intestinal epithelial cells: a comparison with the Caco-2 cell model*. J Cell Biochem, 2006. **99**(4): p. 1175-86.
169. Natoli, M., et al., *Good Caco-2 cell culture practices*. Toxicol In Vitro, 2012. **26**(8): p. 1243-6.
170. Chae, B., et al., *Adherens junction-dependent PI3K/Akt activation induces resistance to genotoxin-induced cell death in differentiated intestinal epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **378**(4): p. 738-43.
171. Peng, L., et al., *Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier*. Pediatr Res, 2007. **61**(1): p. 37-41.
172. Wang, H.B., et al., *Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription*. Dig Dis Sci, 2012. **57**(12): p. 3126-35.
173. Bordin, M., et al., *Histone deacetylase inhibitors up-regulate the expression of tight junction proteins*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(12): p. 692-701.
174. Lechuga, S., S. Baranwal, and A.I. Ivanov, *Actin-interacting protein 1 controls assembly and permeability of intestinal epithelial apical junctions*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015. **308**(9): p. G745-56.
175. Hartsock, A. and W.J. Nelson, *Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 660-9.
176. Rodgers, L.S. and A.S. Fanning, *Regulation of epithelial permeability by the actin cytoskeleton*. Cytoskeleton (Hoboken), 2011. **68**(12): p. 653-60.
177. Maiers, J.L., et al., *ZO-1 recruitment to alpha-catenin--a novel mechanism for coupling the assembly of tight junctions to adherens junctions*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 17): p. 3904-15.
178. Lee, S.H., *Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases*. Intest Res, 2015. **13**(1): p. 11-8.
179. Ogasawara, N., et al., *Induction of JAM-A during differentiation of human THP-1 dendritic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **389**(3): p. 543-9.

180. Blank, F., et al., *Macrophages and dendritic cells express tight junction proteins and exchange particles in an in vitro model of the human airway wall*. Immunobiology, 2011. **216**(1-2): p. 86-95.
181. Rescigno, M., et al., *Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 361-7.
182. Muise, A.M., et al., *Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease*. Gut, 2009. **58**(8): p. 1121-7.
183. Niessen, C.M., *Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(11): p. 2525-32.
184. Stamatovic, S.M., R.F. Keep, and A.V. Andjelkovic, *Brain endothelial cell-cell junctions: how to "open" the blood brain barrier*. Curr Neuropharmacol, 2008. **6**(3): p. 179-92.
185. Bertocchi, C., M. Vaman Rao, and R. Zaidel-Bar, *Regulation of adherens junction dynamics by phosphorylation switches*. J Signal Transduct, 2012. **2012**: p. 125295.
186. Landry, C.R., et al., *Turnover of protein phosphorylation evolving under stabilizing selection*. Front Genet, 2014. **5**: p. 245.
187. Kowalczyk, A.P. and B.A. Nanes, *Adherens junction turnover: regulating adhesion through cadherin endocytosis, degradation, and recycling*. Subcell Biochem, 2012. **60**: p. 197-222.
188. Utech, M., R. Mennigen, and M. Bruewer, *Endocytosis and recycling of tight junction proteins in inflammation*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 484987.
189. Burks, J. and Y.M. Agazie, *Modulation of alpha-catenin Tyr phosphorylation by SHP2 positively effects cell transformation induced by the constitutively active FGFR3*. Oncogene, 2006. **25**(54): p. 7166-79.
190. Han, S.P. and A.S. Yap, *An alpha-catenin deja vu*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(3): p. 238-9.
191. Desai, R., et al., *Monomeric alpha-catenin links cadherin to the actin cytoskeleton*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(3): p. 261-73.
192. Adam, A.P., *Regulation of Endothelial Adherens Junctions by Tyrosine Phosphorylation*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 272858.

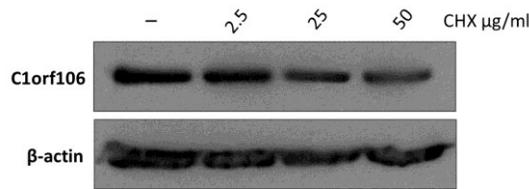
193. Chen, Y.H., et al., *Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(4): p. 1227-37.
194. Kale, G., et al., *Tyrosine phosphorylation of occludin attenuates its interactions with ZO-1, ZO-2, and ZO-3*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **302**(2): p. 324-9.
195. McNeil, E., C.T. Capaldo, and I.G. Macara, *Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(4): p. 1922-32.
196. Gunzel, D. and A.S. Yu, *Claudins and the modulation of tight junction permeability*. *Physiol Rev*, 2013. **93**(2): p. 525-69.
197. Zeissig, S., et al., *Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease*. *Gut*, 2007. **56**(1): p. 61-72.
198. Suzuki, T., *Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions*. *Cell Mol Life Sci*, 2013. **70**(4): p. 631-59.
199. Buzza, M.S., et al., *Membrane-anchored serine protease matriptase regulates epithelial barrier formation and permeability in the intestine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(9): p. 4200-5.
200. Van Itallie, C.M. and J.M. Anderson, *Claudins and epithelial paracellular transport*. *Annu Rev Physiol*, 2006. **68**: p. 403-29.
201. Shen, L., et al., *Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo*. *Annu Rev Physiol*, 2011. **73**: p. 283-309.
202. Anderson, J.M. and C.M. Van Itallie, *Physiology and function of the tight junction*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009. **1**(2): p. a002584.

# Annexe



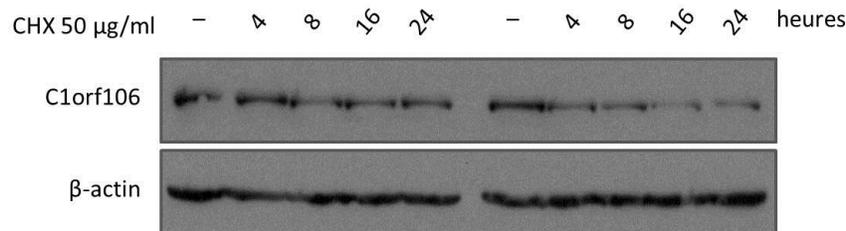
**Figure suppl. 1. Profil d'expression de *KIF21B* et *CACNA1S* produit par micropuce d'expression.**

Profil d'expression de *KIF21B* et *CACNA1S* obtenu à partir des ARN totaux isolés (A) de tissus humains adultes et en (B) de lignées cellulaires humaines immortalisées. Les cellules Caco-2 ont été différenciées en épithélium intestinal après 21 jours en culture. Les cellules Jurkat ont été activées suite à une stimulation de 6 heures avec du PMA (40ng/ml) et de l'ionomycine (1µg/ml) (Jurkat diff.). Les cellules THP-1 ont été différenciées en macrophages suite à une stimulation de 24 heures avec de l'IFN-γ (400U/ml) et du TNF-α (10ng/ml) (THP-1 diff.). Les données d'intensité sont exprimées en moyenne géométrique de 3 expériences indépendantes. Chacune d'elle représente la moyenne géométrique d'intensité des sondes pour chaque gène (une sonde par exon) suivie d'une normalisation médiane de tous les gènes sur la micropuce d'expression. Les barres d'erreur représentent l'écart-type géométrique et la ligne pointillée représente une mesure arbitraire pour refléter le bruit de fond fixé à 32. La référence (gris pâle) est composée d'un mélange d'ARN, à parts égales, de 10 tissus humains différents.



**Figure suppl. 2. Détermination de la dose de cycloheximide (CHX) pour l'étude de la stabilité protéique de C1orf106 dans cellules stables LS174T surexprimant l'une ou l'autre des deux allèles de C1orf106.**

Stabilité de la protéine C1orf106 suite au traitement des cellules LS174T avec différentes doses de cycloheximide pendant 24 heures, démontrée par immunobuvardage de type Western. L'anticorps Anti-β-actine (0,33µg/ml) est utilisé comme contrôle interne de chargement.



**Figure suppl. 3. Analyse de la stabilité de C1orf106\*Y333 et de C1orf106\*333F suite au traitement des cellules LS174T avec 50µg/ml de cycloheximide (CHX).**

Détection du niveau d'expression en protéines de C1orf106\*Y333 et de C1orf106\*333F (anti-C1orf106, 0,2µg/ml) 4, 8 16, 24 heures suivant le traitement des cellules LS174T avec 50 µg/ml de CHX, démontré par immunobuvardage de type Western. L'anticorps anti-β-actine (0,33µg/ml) a été utilisé comme contrôle interne de chargement.

**Tableau 3. Liste des amorces de séquençage.**

Plasmide	Nom des amorces	Séquence 5' – 3'
pLVX-EF1a-IRES-puro/eGFP-C1orf106*333F-opt.	seq-pLVX-LR-01-sens	CAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGT
	hum-C1orf106-opt-01-sens	CTACGAGAAGCCCAGAAAGAG
	hum-C1orf106-opt-01-anti	GCTTGCCCTGGAAGAACTG
	hum-C1orf106-opt-02-sens	CTACGAGAAGCCCAGAAAGAG
	hum-C1orf106-opt-02-anti	CCTGTGGCTGCTGGAACC
	seq-pLVC-04-anti	ATATCCAGCACAGTGGCG

## Alignement des séquences de C1orf106 (NM\_018265.3) et de C1orf106-optimisé

```

#####
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: C1orf106-opt.
# 2: C1orf106 (NM_018265.3)
# Matrix: EDNAFULL
# Gap_penalty: 15.0
# Extend_penalty: 2.0
#
# Length: 1991
# Identity:   1565/1991 (78.6%)
# Similarity: 1565/1991 (78.6%)
# Gaps:       0/1991 (0.0%)
# Score: 6121.0
#
#####

C1orf106-opt.      1 ATGCTGCAGATGCCCAAGCTGAACGAGATCCCCCCTGGCAGAGCCGGCAG      50
  ||| ||| ||| . ||| | . ||| . | . | . | . | . | . | . | . | . |
NM_018265.3       43 ATGCTGCAAATGCCGAAGTTAAATGAAATACCTCCGGGGAGGGCAGGCCG      92

C1orf106-opt.     51 AAGAGAGGCCAGAGGCGAGGGCAGATGGCCTGGCCAGACAGGACCTGAGG     100
  . || . ||| ||| . . . | . | . ||| ||| . ||| ||| ||| ||| . | . | . | . |
NM_018265.3       93 CAGGGAGGCTCGGGGGGAGGGAAGATGGCCTGGACAAACAGGTCTCTGAAG     142

C1orf106-opt.     101 CCGCCAGACTGGAATGGCGGGCTCAGGGACAGGCTGGCGGAGCCAGAGCC     150
  | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
NM_018265.3       143 CTGCGAGGCTGGAGTGGAGGGCGCAGGGGCAGGCGGGCGGCAGGCTGAGCT     192

C1orf106-opt.     151 CCTTGGGATAGCTGGGGCAGCAGCAGACTGCCACACAGCCTGGCCCTGG     200
  || . ||| ||| . ||| ||| ||| . ||| . . ||| . | . | . | . | . | . | . |
NM_018265.3       193 CCATGGGACAGCTGGGGAAGCTCCAGGCTACCTACACAACCTGGCCAGG     242

C1orf106-opt.     201 CTGGTCCAGATGCCCCCTTCTCTGCTGTGCGCCCTGAGCTTCCAGAAAA     250
  ||| ||| . . . | . | . ||| ||| . | . | . | . | . | . | . | . | . |
NM_018265.3       243 CTGGTCACGGTGTCCCCCTCCCTGCTCTGTGCCCTCTCCTTCCAGAAAT     292

C1orf106-opt.     251 GCACAATGGAAGCAAGGACGAGGTGTCCGACACCGACAGCGGCATCATC     300
  . || | . ||| ||| . | . | . ||| ||| . . . ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
NM_018265.3       293 CCACCATGGAGAGTAAGGATGAGGTCAGCGACACCGACAGTGGCATCATC     342

C1orf106-opt.     301 CTGCAGAGCGGCCCTGACAGCCCCGTGTCCCCCATGAAGGAACTGACCCA     350
  ||| ||| . . . ||| ||| ||| ||| . | . | . | . | . | . | . | . | . |
NM_018265.3       343 CTGCAGTCTGGCCCCGACAGCCCGTCTCCCCAATGAAGGAGCTGACCCA     392

C1orf106-opt.     351 CGCCGTGCACAAGCAGCAGCGGGCCCTGGAAGCCCGGCTGGAAGCTTGCC     400
  . || . ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
NM_018265.3       393 TGCAGTGCACAAGCAGCAGAGGGCCCTGGAAGCGAGGCTGGAGGCCTGCC     442

```

Clorf106-opt.	401	TGGAAGAACTGCGGCGGCTGTGCCTGAGAGAGGCCGAGCTGACAGGCACC	450
		.   .    .   .   .     .   .   .     .     .	
NM_018265.3	443	TGGAGGAGCTGAGGAGACTCTGCCTTCGGGAAGCGGAGCTGACGGGCACC	492
Clorf106-opt.	451	CTGCCC GCCGAGTATCCTCTGAAGCCTGGCGAGAAGGCCCCCAAAGTGCG	500
		.    .   .     .     .   .   .   .   .     .     .   .	
NM_018265.3	493	TTGCCAGCGGAGTATCCCCTCAAACCAGGGGAAAAGGCCCCCAAAGTTTCG	542
Clorf106-opt.	501	GCGGAGAATCGGAGCCGCCTACAAGCTGGACGACTGGGCCCTGCACAGAG	550
		.   .   .     .     .     .     .     .     .	
NM_018265.3	543	CCGCAGGATCGGAGCGGCTTACAAACTGGATGACTGGGCCTTGCACAGAG	592
Clorf106-opt.	551	AGGACCCCTGAGCAGCCTGGAACGGCAGCTGGCCCTGCAGCTCCAGATC	600
		.     .     .   .     .     .     .     .	
NM_018265.3	593	AGGACCCCTAAGCAGCCTGGAGCGCCAGCTGGCCCTGCAGCTGCAGATC	642
Clorf106-opt.	601	ACCGAGGCCGCTCGGAGACTGTGTCTGGAAGAGAACCTGAGCCGGCAGGC	650
		.     .   .   .   .     .     .     .     .     .	
NM_018265.3	643	ACAGAGGCAGCCCGTCGGCTGTGCCTGGAGGAGAACCTCAGCAGGCAGGC	692
Clorf106-opt.	651	CAGACGGCAGCGGAAGCACAGCATGCTGCAAGAGGAAAAGAAGCTGCAAG	700
		.. .     .     .     .   .     .     .     .     .	
NM_018265.3	693	TCGGCGGCAGCGGAAGCACTCCATGCTGCAGGAGGAGAAGAAGCTGCAGG	742
Clorf106-opt.	701	AGCTGCAGCGGTGCCTGGTGGAACGGCGGAGAAACAGCGAGCCTCCTCCT	750
		.     .     .     .   .     .     .     .     .	
NM_018265.3	743	AGCTCCAGCGCTGCCTGGTTCGAGCGGCGGCGCAATAGCGAGCCACCTCCG	792
Clorf106-opt.	751	GCCGCTGCCCTGCCACTGGGAAGAGAGCTGAGCGCCAGCGACGACAGCAG	800
		.     .   .   .     .   .     .   .   .   .     .	
NM_018265.3	793	GCTGCTGCTCTCCCCTGGGCCGAGAGCTCAGTGCTCTGATGACAGCTC	842
Clorf106-opt.	801	CCTGAGCGACGGCCTGCTGCTGGAAGAGGAAGAGAGCCAGGTCCCAAGC	850
		.   .     .   .   .     .   .   .   .   .     .	
NM_018265.3	843	CCTGTCAGATGGGCTCCTCCTGGAGGAAGAGGAATCCCAAGTGCCAAAAC	892
Clorf106-opt.	851	CCCCACCTGAGAGCCCTGCCCTCCTAGCAGACCCCTGCCCCCTCAGACA	900
		.   .   .     .   .     .   .     .   .   .   .   .	
NM_018265.3	893	CTCCTCCAGAGTCTCCAGCCCACCTTCTCGGCCTCTCCACCCCAAACC	942
Clorf106-opt.	901	CTGGAAGGCCTGCAGCCAACAGGCCAGAGGCCGGCTCTCCTGAACGGGC	950
		.     .   .     .     .   .     .   .     .   .	
NM_018265.3	943	CTTGAGGGTCTGCAGCCAACAGGACCTGAGGCTGGGAGCCAGAACGGGC	992
Clorf106-opt.	951	CCCTGTGCAGAACAGCCCCTGGAAAGAGACAAGCCTGGACCACCCCTACG	1000
		.   .   .     .     .     .   .   .     .     .     .	
NM_018265.3	993	TCCAGTCCAGAACAGCCCCTGGAAAGAAACCAGCCTGGACCACCCCTATG	1042

Clorf106-opt. NM_018265.3	1001 1043	AGAAGCCCAGAAAGAGCAGCGAGCCTTGAGCGAGAGCAGCAGCCCTGCC        .    . ....   .       . .       .    AGAAGCCCAGGAAGTCTTCTGAGCCCTGGAGCGAGTCCAGCAGCCCAGCC	1050 1092
Clorf106-opt. NM_018265.3	1051 1093	ACCACCCCTCAGGATGGCCCTAGCGCCAGCAGCCTGTGGCTGCTGGAACC      . . .       . . . . . . . . . . . . . . . .  ACCACACCACAGGATGGGCCAGTGCCTCCAGCCTGTGGCTTCTGGAGCC	1100 1142
Clorf106-opt. NM_018265.3	1101 1143	CGCCAGCTACCACGTGGTGGCCATCAGAGGCGTGCCCGACAGTGGCAGG .  TGCCCTCTACCACGTGGTTCCCATCCGTGGTGTCTCTGGCCAGTGGCAGG	1150 1192
Clorf106-opt. NM_018265.3	1151 1193	GAAGAACCTCTGCCCTGCCACCCCGAGATCCAGGGCAGAAGAGGCCAG  .  GCCGACCAGTGGCCAGCCACCCCTGAGATACAGGGGAGGAGGGGCCAG	1200 1242
Clorf106-opt. NM_018265.3	1201 1243	TCCCAGAGCCTGCGGGTGGACAGCTTTAGAGCCGGCCCTGAGGGCAGAGG  .  TCGCAGTCTCTGAGGGTGGATTCTTCCGGGCGGGTCTCTGAGGGCCGAGG	1250 1292
Clorf106-opt. NM_018265.3	1251 1293	CAGAAGCGCCTTCCCCAGAAGGCGGCCACCCACTACACCGTGACCGTGC .  TCGCAGCGCCTTCCCCCGCGCCGCCCCACTACTACACGGTGACAGTGC	1300 1342
Clorf106-opt. NM_018265.3	1301 1343	CCGATAGCTGCTTCCCAGCACCAAGCCTCCACTGCCTCACGCCGCTGC  .  CAGATTCCTGCTTCCCAGCACCAAGCCTCCACTGCCTCACGCCGCTGC	1350 1392
Clorf106-opt. NM_018265.3	1351 1393	CACAGCTGTAGCGAGGATAGCGGCAGCGACGTGTCCAGCATCAGCCACCC    .  CACTCCTGCTCAGAAGACAGTGGTCTGTACGTCTCCAGCATCACCACCC	1400 1442
Clorf106-opt. NM_018265.3	1401 1443	TACCAGCCCCGGCAGCAGCTCCCCGACATCAGCTTCTGCAGCCCCTGA .  CACTTCGCGGGCAGCAGCAGCCCCGACATCTCCTTTCTGCAGCCTCTCT	1450 1492
Clorf106-opt. NM_018265.3	1451 1493	GCCCCCAAGACCCACAGACATAGAGGCGCCTGGGTGCCAGCCGGCAGC .  CCCCTCCAAGACCCATCGTCACCGGGGCCCTGGGTCCAGCCGGCAGC	1500 1542
Clorf106-opt. NM_018265.3	1501 1543	AGGGAAGTGGTGGCCACCACCCTAAGCTGCTGCTGCCTCCCGGCTACTT  .  AGAGAGCTGGTGGCCACCACCCTAAGCTGCTGCTGCCTCCCGGCTACTT	1550 1592
Clorf106-opt. NM_018265.3	1551 1593	CCCTGCCGGCAGATACGTGGTGGTGGCCGAGTCTCCACTGCCCCCTGGCG    .  CCCGCGGGCGGTACGTGGTGGTGGCTGAGAGCCCCTGCCGCTGGCG	1600 1642

C1orf106-opt.	1601	AGTGGGAACTGAGAAGGGCCGCTCCCGGCCCTGCCTACGAGGAAGAGGGC	1650
		.   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .	
NM_018265.3	1643	AGTGGGAGCTGCGCCGCGCAGCCCCGGGCCCTGCTTACGAGGAGGAGGGC	1692
C1orf106-opt.	1651	ACCCCCCTGAGATACCAGCGGCTGGTGCCAGCCGGTCCAGAATCGTGCG	1700
		.     .   .       .       .       .     .   .   .	
NM_018265.3	1693	ACTCCCCTGCGCTACCAGCGTCTGGTGCCCTCCCGCAGCCGCATCGTGCG	1742
C1orf106-opt.	1701	GACCCCCAGCCTGAAGGACAGCCCTGCCGGAAGAGGCCTGAGCAAGGCCG	1750
		.   .   .       .       .   .   .   .   .	
NM_018265.3	1743	GACGCCCTCCCTGAAGGACAGCCCGCAGGCCGGGGGCTCAGCAAGGCCG	1792
C1orf106-opt.	1751	CCGTGTCCGAGGAACTGAAGTGGTGGCACGAGCGGGCCAGACTGCGGAGC	1800
		.     .   .       .       .   .   .   .	
NM_018265.3	1793	CCGTGTCCGAGGAGCTCAAGTGGTGGCACGAGCGTGCACGCCTCCGGAGC	1842
C1orf106-opt.	1801	ACCAGACCCACAGCCTGGACAGGCAGGGCGCCTTCAGAGTGCGGTCCCT	1850
		.   .     .   .     .   .   .   .   .   .   .   .	
NM_018265.3	1843	ACCCGCCCCCACTCACTGGACCGCCAAGGAGCTTCCGGGTCAGGAGCCT	1892
C1orf106-opt.	1851	GCCTCTGGGCCGCGAGGGATTGGCAGAGCCCTGGGACCTAGAGCCCAGG	1900
		.   .   .   .     .   .   .       .       .     .   .	
NM_018265.3	1893	GCCCCCTGGGAGAGAGGGCTTCGGACGAGCCCTGGGACCCCGGGCACAGG	1942
C1orf106-opt.	1901	TGCCACCGTGTGCGTGCTGAGAAGATCCCCGATGGCGCCCCCTGTCCAG	1950
		.   .   .       .   .     .   .     .       .   .	
NM_018265.3	1943	TGCCACAGTTTGTGTGCTGCGGAGATCGCCTGATGGGGCCCCCTGTGCAA	1992
C1orf106-opt.	1951	GTGTTCTGTCGCCGAGAAGGGCGAGATCATCAGCCAGGTGTA	1991
		.   .   .   .   .   .       .       .	
NM_018265.3	1993	GTCTTTGTACCTGAAAAAGGAGAGATCATCAGCCAGGTGTA	2033